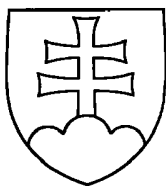


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

- (22) Dátum podania prihlášky: 22.04.1999
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 98107925.4
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: 30.04.1998
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: EP
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: 09.04.2001
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: PCT/EP99/02711
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: WO 99/57151

(21) Číslo dokumentu:

1619-2000

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.⁷:

C 07K 16/00

(71) Prihlasovateľ: BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH, Ingelheim am Rhein, DE;

(72) Pôvodca vynálezu: Park John Edward, Dr., Biberach, DE;
Garin-Chesa Pilar, Dr., Biberach/Riss, DE;
Bamberger Uwe, Dr., Ochsenhausen, DE;
Rettig Wolfgang J., Dr. med., Biberach/Riss, DE;
LŠger Olivier, Annemasse, FR;
Saldanha Jose William, Enfield, Middlesex, GB;

(74) Zástupca: Majlingová Marta, Ing., Bratislava, SK;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Protilátkový proteín, nukleotidová sekvencia kódujúca proteín, rekombinantný DNA vektor, hostiteľská bunka, spôsob jeho výroby, farmaceutický prostriedok s jeho obsahom a jeho použitie**

(57) Anotácia:
Rekombinantné proteíny protilátok, ktoré majú komplementaritu determinujúce oblasti monoklonálnej protilátky F19, ATCC č. HB8269 a špecificky sa viažu na fibroblastový aktivačný proteín alfa (FAP α), obsahujú modifikácie kostry, ktorých výsledkom je zlepšená schopnosť ich produkcie hostiteľskými bunkami v porovnaní s chimérnou protilátkou, ktorá má variabilné oblasti F19 a cudzie konštantné oblasti. Ďalej je opísané použitie uvedených protilátok na diagnostické a terapeutické účely a spôsoby ich výroby.

Protilátkový proteín, nukleotidová sekvencia kódujúca proteín, rekombinantný DNA vektor, hostiteľská bunka, spôsob jeho výroby, farmaceutický prostriedok s jeho obsahom a jeho použitie

Oblasť techniky

Predložený vynález sa týka protilátkových proteínov, ktoré špecificky viažu fibroblastový aktivačný proteín alfa ($FAP\alpha$). Vynález sa týka aj použitia týchto protilátok na diagnostické a terapeutické účely a spôsobov výroby protilátok.

Doterajší stav techniky

Invazívny rast epiteliálnych rakovín je spojený s množstvom charakteristických bunkových a molekulových zmien v podpornej stróme. Veľmi typickou molekulovou črtou reaktívnej strómy mnohých typov epiteliálnej rakoviny je indukcia fibroblastového aktivačného proteínu alfa (ďalej označovaný ako FAP), bunkovej povrchovej molekuly reaktívnych strómových fibroblastov, ktorá bola pôvodne identifikovaná monoklonálnou protilátkou F19 (Garin-Chesa P., Old L. J. a Retting W. J. (1990) Cell surface glycoprotein of reactive stromal fibroblasts as a potential antibody target in human epithelial cancers. Proc. Natl. Acad Sci. 87: 7235). Keďže FAP antigén sa selektívne exprimuje v stróme radu epiteliálnych karcinómov, nezávisle od lokalizácie a histologického typu, vyvinul sa FAP-zacieľovací koncept na zobrazenie, diagnostiku a liečbu epiteliálnych rakovín a určitých iných stavov. Za týmto účelom sa vyvinula monoklonálna protilátka nazývaná F19, ktorá sa špecificky viaže na FAP, a je opísaná v US patentoch č. 5059523 a WO 93/05804, ktoré sú tu celé začlenené ich citáciou.

Vážnym problémom, ktorý vzniká pri použití nehumánných protilátok na *in vivo* aplikácie ľuďom, je že tieto rýchlo vyvolávajú odpoveď človeka proti nehumánnej protilátke, ktorá znižuje účinok protilátky u pacientov a bráni tomu, aby sa pokračovalo v jej podávaní. Humanizácia nehumánných protilátok sa bežne dosahuje jedným z dvoch spôsobov: 1) konštrukciou nehumánných/humánných

chimérnych protilátok, v ktorých sú nehumánne variabilné oblasti spojené s humánnymi konštantnými oblasťami (Boulianne G.L., Hozumi N. a Shulman, M. J. (1984) Production of functional chimeric mouse/human antibody Nature 312:643) alebo 2) zaštepením komplementaritu determinujúcich oblastí (CDRs) z nehumánných variabilných oblastí do humánných variabilných oblastí, a potom spojením týchto "pretvarovaných humánných" variabilných oblastí s humánnymi konštantnými oblasťami (Riechmann L., Clark M., Waldmann H. a Winter G. (1988) Reshaping human antibodies for therapy. Nature 332: 323). Chimérne protilátky, hoci sú významne lepšie ako myšie protilátky, môžu ešte vždy vyvolať anti-myšiu odpoveď u ľudí (LoBuglio A.F., Wheeler R. H., Trang J., Haynes A., Rogers K., Harvey E. B., Sun L., Ghayeb J. a Khazaeli M. B. (1989) Mouse/human chimeric monoclonal antibody in man: Kinetics and immune response. Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 4220). CDR-štepené alebo pretvarované humánne protilátky obsahujú malé alebo žiadne proteínové sekvencie, ktoré môže byť označené ako odvodené od myších protilátok. Hoci protilátka humanizovaná CDR-zaštepením môže byť ešte schopná vyvolať nejaké imunitné reakcie, ako napríklad anti-alotypovú alebo anti-idiotypovú odpoveď, ktoré je možné pozorovať aj pri prirodzených humánných protilátkach, bude CDR-zaštepená protilátka významne menej imunogénna ako myšia protilátka, čím sa umožní dlhšia liečba pacientov.

Ďalším vážnym obmedzením týkajúcim sa komerčného použitia protilátok na diagnostiku, zobrazovanie a liečbu je schopnosť ich produkcie vo veľkých množstvách. V mnohých prípadoch je rekombinantná expresia prirodzených, chimérnych a/alebo CDR-zaštepených protilátok v systémoch bunkových kultúr slabá. Faktory, ktoré sa podieľajú na slabej schopnosti produkcie môžu zahŕňať výber vedúcich sekvencií a výber hostiteľských buniek na produkciu, ako aj nesprávne sformovanie a zníženú sekréciu. Nesprávne sformovanie môže viesť k nedostatočnému spájaniu ťažkých a ľahkých reťazcov alebo ku konformácii, ktorú nie je možné transportovať, a ktorá bráni vylučovaniu jedného alebo oboch reťazcov. Vo všeobecnosti sa akceptuje, že L-reťazec zabezpečuje schopnosť sekrécie zostaveného proteínu. V niektorých prípadoch môže byť výsledkom viacnásobných alebo aj jednej substitúcie zvýšená schopnosť produkcie protilátok.

Kvôli klinickej dôležitosti špecifického imunologického *in vitro* a *in vivo* nasmerovania špecifických antigénov spojených s ochorením, na diagnostiku a liečbu ľudí, existuje rastúca potreba protilátok, ktoré majú kombinované znaky antigénovej špecificity, nízkej imunogénnosti a schopnosti vysokej produkcie.

Preto je problémom, ktorý rieši predložený vynález poskytnutie protilátkových proteínov, ktoré majú kombinované vlastnosti, a síce, že sa špecificky viažu na FAP, majú nízku imunogénnosť u ľudí a v rekombinantných systémoch je ich možné produkovať vo veľkých množstvách.

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu sú protilátkové proteíny, ktoré majú komplementaritu determinujúce oblasti monoklonálnej protilátky F19 (ATCC prístupové č. HB 8269), špecificky sa viažu na fibroblastový aktivačný proteín (FAP), a ktoré obsahujú modifikácie kostry, ktorých výsledkom je zlepšená schopnosť ich produkcie v hostiteľských bunkách v porovnaní s chimérnou protilátkou, ktorá má variabilné oblasti z F19 a cudzie konštantné oblasti.

Tu používaný výraz "protilátkový proteín" znamená proteín s antigénovou väzobnou špecificitou monoklonálnej protilátky.

"Komplementaritu determinujúce oblasti monoklonálnej protilátky" sú tie aminokyselinové sekvencie, ktoré sa podieľajú na špecifickom viazaní antigénu podľa Kabáta (Kabat E. A., Wu T. T., Perry H. M., Gottesman K. S. a Foeller C. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest (5. vyd.). NIH publikácia č. 91-3242. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.), v spojitosti s Chothia a Lesk (Chothia a Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917).

Tu používaný výraz "modifikácie kostry" znamená zámenu, deléciu alebo pridanie jednej alebo viacerých aminokyselín do variabilných oblastí, ktoré obklopujú jednotlivé komplementaritu determinujúce oblasti. Modifikácie kostry môžu vplývať na imunogénnosť, schopnosť produkcie alebo väzobnú špecificitu protilátkového proteínu.

"Fibroblastový aktivačný proteín (FAP)", označovaný aj ako fibroblastový aktivačný proteín alfa (FAP α), je na membránu viazaný glykoproteín patriaci do serín proteázovej génovej rodiny (WO 97/34927). Nie je známa žiadna rozdelená alebo sekretovaná forma FAP. FAP je možné charakterizovať jeho väzbou na monoklonálnu protilátku F19 (F19 je možné získať z hybridómovej bunkovej línie s prístupovým č. HB 8269, ktorá je uložená v ATCC).

Výraz "fibroblastový aktivačný proteín špecificky viažuci" protilátkový proteín je tu definovaný prostredníctvom schopnosti špecificky rozoznávať a viazať FAP-exprimujúce ľudské bunky. Väzobná špecifita proteínov podľa vynálezu sa môže stanoviť štandardnými metódami na zhodnotenie väzobnej špecifity, ako je opísané formou príkladov v príkladoch 6, 8 a 12.

Výraz "chimérna protilátka" znamená protilátkový proteín, ktorý obsahuje variabilné oblasti ľahkého a ťažkého reťazca ako sú znázornené na obrázkoch 17 a 18 a cudzie konštantné oblasti. "Cudzie konštantné oblasti", ako sú tu definované, sú konštantné oblasti, ktoré sa líšia od konštantných oblastí F19. Je potrebné, aby bolo zrejmé, že na porovnávanie protilátkového proteínu podľa vynálezu s chimérnou protilátkou, musí takáto chimérna protilátka obsahovať rovnaké konštantné oblasti ako uvedený protilátkový proteín. Za účelom demonštrácie a porovnania sa ako príklad použili samostatné konštantné ťažké a ľahké reťazce znázornené na obrázkoch 19 až 22.

Na poskytnutie protilátkových proteínov podľa predloženého vynálezu sa určili nukleotidové sekvencie génov ťažkého a ľahkého reťazca hlodavčej protilátky označenej ako F19 z RNA extrahovanej z F19 hybridómových buniek (ATCC prístupové č. HB 8269).

Jedno uskutočnenie predloženého vynálezu sa týka protilátkových proteínov, ktoré majú komplementaritu determinujúce oblasti monoklonálnej protilátky F19 (ATCC prístupové č. HB 8269), špecificky sa viažu na fibroblastový aktivačný proteín (FAP), a vyznačujú sa tým, že majú modifikácie kostry, ktorých výsledkom je zlepšená schopnosť ich produkcie v hostiteľských bunkách v porovnaní s chimérnou protilátkou, ktorá má variabilné oblasti F19 a cudzie konštantné oblasti,

pričom uvedený protilátkový proteín je odvodený od hlodavčej protilátky označenej ako F19 (ATCC prístupové č. HB 8269).

Na generovanie humanizovaných FAP-špecifických protilátkových proteínov sa skonštruovala chimérna protilátka, ktorá má variabilné oblasti ľahkého a ťažkého reťazca z F19 a konštantné oblasti ľudského ľahkého a ťažkého reťazca. Konštrukcia a produkcia chimérnych myších/ľudských protilátok je dobre známa (Boulianne a ďalší, (1984), citované vyššie) a formou príkladov je demonštrovaná v príkladoch 1 a 2.

Variabilné oblasti protilátkových proteínov podľa predloženého vynálezu sú typicky spojené aspoň časťou imunoglobulínovej konštantnej oblasti (Fc), typicky tou časťou, ktorá prislúcha ľudskému imunoglobulínu. DNA sekvencie ľudskej konštantnej oblasti je možné izolovať podľa dobre známych postupov z rôznych ľudských buniek, ale výhodne z imortalizovaných B buniek (pozri Kabat a ďalší, vyššie, a WO 87/02671). Takže protilátkové proteíny podľa vynálezu môžu obsahovať celú alebo len časť konštantnej oblasti, pokiaľ vykazujú špecifickú väzbu na FAP antigén. Voľba typu a rozsahu konštantnej oblasti závisí na tom, aké efektorové funkcie, napríklad komplementová fixácia alebo na protilátke závislá bunková toxicita, sú požadované, a na požadovaných farmakologických vlastnostiach protilátkového proteínu. Protilátkový proteín podľa vynálezu bude typicky tetramér pozostávajúci z dvoch párov ľahký reťazec/ťažký reťazec, alebo môže byť aj dimérom, tzn. môže pozostávať z páru ľahký reťazec/ťažký reťazec, napr. Fab alebo Fv fragment.

Preto sa ďalšie uskutočnenie vynálezu týka protilátkových proteínov podľa vynálezu, ktoré majú oblasť variabilného ľahkého reťazca a oblasť variabilného ťažkého reťazca spojenú ľudskou konštantnou oblasťou. Konkrétne, variabilná oblasť ľahkého reťazca sa spojila s ľudskou kappa konštantnou oblasťou a variabilná oblasť ťažkého reťazca sa spojila s ľudskou gama-1 konštantnou oblasťou. Pre odborníka sú dostupné aj iné ľudské konštantné oblasti na humanizáciu ľahkého a ťažkého reťazca.

Preto v jednom konkrétnom uskutočnení protilátkové proteíny podľa vynálezu obsahujú ľudskú kapa konštantnú oblasť.

V inom konkrétnom uskutočnení protilátkové proteíny podľa vynálezu obsahujú ľudskú gama-1 konštantnú oblasť.

Jeden konkrétny "chimérny F19 protilátkový" proteín (cF19) pozostáva z variabilných oblastí ľahkého a ťažkého reťazca a z konštantných oblastí znázornených na obrázkoch 17 až 22. CF19 demonštruje špecifickú väzbu a vysokú aviditu voči FAP antigénu. Ako je ukázané v príklade 2, expresia cF19 v COS bunkách (bunky odvodené od obličiek africkej zelenej opice) je slabá, v rozsahu od približne 10 do 60 ng/ml, čo je najmenej 10 krát menej ako pre väčšinu protilátok.

Pri pokuse zvýšiť hladiny expresie cF19 sa zmenila vedúca sekvencia F19 V_L oblasti substitúciou prolínu za leucín v polohe -9. Výsledkom tejto jedinej zmeny v aminokyseline vo vedúcej sekvencii bolo najmenej zdvojnásobenie množstva chimérnej protilátky produkovanej v COS bunkách. Na expresiu tejto konkrétnej chimérnej protilátky v COS bunkách sa použila nasledujúca mutovaná vedúca sekvencia ľahkého reťazca: MDSQAQVLMLLLWWSGTCG, a nasledujúca vedúca sekvencia ťažkého reťazca: MGWSWWFLFLLSGTAGVLS.

Podľa vynálezu znamená výraz "zlepšená schopnosť produkcie" v hostiteľských bunkách podstatné zlepšenie hladín expresie a/alebo výťažkov purifikovanej protilátky, v porovnaní s hladinami expresie a/alebo výťažkami protilátky pri chimérnej protilátke bez modifikácií kostry, ako bola definovaná vyššie. Dva konkrétne, ale neobmedzujúce, príklady na demonštráciu zlepšenej schopnosti produkcie sú uvedené pre COS expresný systém (v príkladoch 2 a 5) a pre CHO bunkový expresný systém (v príkladoch 10 a 11).

Zatiaľ čo mutácia vo vedúcej sekvencii vedie len k zdvojnásobeniu výťažku expresie chimérnej F19 protilátky, tu definované podstatné zlepšenie znamená zlepšenie hladiny expresie a/alebo výťažku purifikácie najmenej 10 násobne.

Výhodné uskutočnenie vynálezu sa týka protilátkových proteínov, ktoré sa vyznačujú tým, že ich úrovne expresie vo vzorkách surového média, stanovené prostredníctvom ELISA, a/alebo výťažky purifikovanej protilátky presahujú úrovne expresie a/alebo purifikačné výťažky chimérnych protilátok bez modifikácií kostry najmenej 10 násobne.

Výhodnejšie uskutočnenie vynálezu sa týka protilátkových proteínov, ktoré sa vyznačujú tým, že ich úrovne expresie vo vzorkách surového média, stanovené prostredníctvom ELISA, a/alebo výťažky purifikovanej protilátky presahujú úroveň expresie a/alebo purifikačné výťažky chimérnych protilátok bez modifikácií kostry najmenej 20 násobne.

Najvýhodnejšie uskutočnenie vynálezu sa týka protilátkových proteínov, ktoré sa vyznačujú tým, že ich úrovne expresie vo vzorkách surového média, stanovené prostredníctvom ELISA, a/alebo výťažky purifikovanej protilátky presahujú úroveň expresie a/alebo purifikačné výťažky chimérnych protilátok bez modifikácií kostry najmenej 100 násobne.

Zlepšenú schopnosť produkcie rekombinantných protilátkových proteínov podľa vynálezu je možné demonštrovať v eukaryotických bunkách, ako je vo všeobecnosti ukázané pre COS a CHO (bunky odvodené z vaječníkov čínskeho škrečka) eukaryotické bunky (pozri príklady 5 a 11). Ďalšie uskutočnenie predloženého vynálezu sa týka rekombinantných protilátkových proteínov, ktoré sa vyznačujú tým, že je ich možné lepšie produkovať v eukaryotických bunkách.

Výhodné uskutočnenie predloženého vynálezu sa týka protilátkových proteínov, pri ktorých produkcii sa používajú ako eukaryotické bunky vaječníkové bunky čínskeho škrečka (CHO bunky).

Neočakávane sa zistilo, že určité modifikácie kostry variabilných oblastí ľahkého reťazca zlepšujú schopnosť produkcie protilátkových proteínov podľa vynálezu. Pripravili sa tri verzie pretvarovaných variabilných reťazcov, označené ako verzia A, B a C, ako je znázornené na obrázkoch 1 až 6.

Verzie variabilnej oblasti ľahkého reťazca A, B a C vykazujú podstatne zlepšenú schopnosť produkcie v CHO bunkách (pozri príklad 11). Hoci sa A a C verzie variabilnej oblasti ľahkého reťazca líšia od B verzie variabilnej oblasti ľahkého reťazca len dvoma spoločnými aminokyselinovými zvyškami, vykazujú ešte podstatnejšie zlepšenie schopnosti ich produkcie. Existuje najmenej 10 násobný rozdiel v úrovniach vylučovania protilátky medzi B verzou ľudského pretvarovaného F19 ľahkého reťazca a A alebo C verzou. A a B verzie pretvarovaného ľudského F19 ľahkého reťazca sa líšia v ich aminokyselinovej sekvencii len dvoma zvyškami

v polohách 36 (mutácia Tyr na Phe) a 87 (mutácia Tyr na Asp) (nomenklatúra podľa Kabata). Tento negatívny účinok na vylučovaciu schopnosť protilátok obsahujúcich B verziu variabilnej oblasti ľahkého reťazca, by mohol byť nepriamy, ak by mutácie Tyr na Asp a Tyr na Phe, brané do úvahy jednotlivo alebo spolu, spôsobovali len nesprávne podkladanie proteínu. Tento prípad je však nepravdepodobný, pretože antigénové väzobné testy ukázali, že imunoglobulíny obsahujúce B verziu F19 ľahkého reťazca majú podobné avidity ako imunoglobulíny spojené s A alebo C verziami F19 ľahkého reťazca, čo naznačuje, že nie sú výrazne nesprávne poskladané.

Keď sa porovnávajú verzie A a C, za redukciu vylučovania B verzie sa zdá byť zodpovedný najmä zvyšok 87 v pretvarovanom ľudskom F19 ľahkom reťazci.

Výhodné uskutočnenie predloženého vynálezu sa týka protilátkových proteínov podľa vynálezu, v ktorých aminokyselina v Kabat polohe 87 oblasti ľahkého reťazca nie je asparagín.

Výhodnejšie uskutočnenie predloženého vynálezu sa týka protilátkových proteínov podľa vynálezu, v ktorých aminokyselina v Kabat polohe 87 oblasti ľahkého reťazca je vybraná z aromatických alebo alifatických aminokyselín.

Najvýhodnejšie uskutočnenie predloženého vynálezu sa týka protilátkových proteínov podľa vynálezu, v ktorých aminokyselina v Kabat polohe 87 oblasti ľahkého reťazca je tyrozín alebo fenylalanín.

Ďalšie uskutočnenie predloženého vynálezu sa týka protilátkových proteínov podľa vynálezu, v ktorých aminokyselina v Kabat polohe 36 oblasti ľahkého reťazca je vybraná z aromatických aminokyselín.

Konkrétne uskutočnenie vynálezu sa týka špecifických protilátkových proteínov, ktoré je možné pripraviť z jednotlivo opísaných pretvarovaných variabilných oblastí ľahkých a ťažkých reťazcov.

Na uskutočňovanie vynálezu sú vhodné najmä A a C verzie variabilných oblastí ľahkého reťazca, pretože majú výnimočne vysokú schopnosť produkcie, pričom si zachovávajú úplnú FAP-väzobnú špecifitu a dosahujú nízku imunogénnosť. To platí najmä pri porovnaní s chimérnou protilátkou, ktorá má

variabilné oblasti F19 a rovnaké konštantné oblasti, ale aj pri porovnaní s B verziou ľahkého reťazca.

Preto sa jedno uskutočnenie predloženého vynálezu týka protilátkových proteínov, ktoré obsahujú variabilnú oblasť ľahkého reťazca uvedenú ako sekv. č. 2.

Ďalšie uskutočnenie vynálezu sa týka aj protilátkových proteínov, ktorých variabilná oblasť ľahkého reťazca je kódovaná nukleotidovou sekvenciou uvedenou v sekv. č. 1.

Jedno uskutočnenie predloženého vynálezu sa týka protilátkových proteínov, ktoré obsahujú variabilnú oblasť ľahkého reťazca uvedenú ako sekv. č. 6.

Ďalšie uskutočnenie vynálezu sa týka aj protilátkových proteínov, ktorých variabilná oblasť ľahkého reťazca je kódovaná nukleotidovou sekvenciou uvedenou v sekv. č. 5.

Predložený vynález opisuje aj niekoľko rôznych variabilných oblastí ťažkého reťazca, ktoré veľmi dobre fungujú s A a C verziami variabilných oblastí ľahkého reťazca, ak sa berie do úvahy zlepšená účinnosť ich produkcie.

Jedno uskutočnenie vynálezu sa týka protilátkových proteínov, ktoré obsahujú ktorúkoľvek variabilnú oblasť ťažkého reťazca uvedenú ako sekv. č. 8, 10, 12, 14.

Ďalšie uskutočnenie vynálezu sa týka protilátkových proteínov, ktorých variabilná oblasť ťažkého reťazca je kódovaná ktoroukoľvek nukleotidovou sekvenciou uvedenou v sekv. č. 7, 9, 11, 13.

Veľmi konkrétne uskutočnenie vynálezu sa týka protilátkových proteínov, ktoré obsahujú variabilnú oblasť ľahkého reťazca uvedenú ako sekv. č. 2 a variabilnú oblasť ťažkého reťazca uvedenú ako sekv. č. 12. Najvýhodnejšie tento protilátkový proteín navyše obsahuje konštantnú oblasť ľahkého reťazca uvedenú ako sekv. č. 20 a konštantnú oblasť ťažkého reťazca uvedenú ako sekv. č. 22.

Takže ďalším predmetom predloženého vynálezu je protilátkový proteín, ktorý obsahuje aminokyselinovú sekvenciu uvedenú ako sekv. č. 2. Výhodnejšie takýto protilátkový proteín ďalej obsahuje aminokyselinovú sekvenciu uvedenú ako sekv. č. 12. Výhodnejšie protilátkový proteín ďalej obsahuje aminokyselinovú

sekvenciu uvedenú ako sekv. č. 20 a aminokyselinovú sekvenciu uvedenú ako sekv. č. 22. Ďalším predmetom vynálezu je protilátkový proteín opísaný v tomto odstavci, ktorý je konjugovaný s rádioizotopom, výhodne ^{131}I , ^{125}I , ^{186}Re , ^{188}Re alebo ^{90}Y . Ďalším predmetom predloženého vynálezu je DNA molekula, ktorá kóduje protilátkový proteín opísaný v tomto odstavci. Ďalším predmetom vynálezu je hostiteľská bunka nesúca túto DNA molekulu. Ďalším predmetom vynálezu je spôsob výroby protilátkového proteínu opísaného v tomto odstavci, ktorý zahŕňa kultiváciu uvedenej hostiteľskej bunky v podmienkach, v ktorých je protilátkový proteín hostiteľskou bunkou exprimovaný, a izoláciu proteínu. Ďalším predmetom vynálezu je farmaceutický prostriedok, ktorý obsahuje protilátkový proteín podľa predloženého vynálezu a farmaceuticky prijateľný nosič. Ďalšie konkrétne uskutočnenie vynálezu sa týka protilátkových proteínov, ktorých variabilná oblasť ľahkého reťazca je kódovaná nukleotidovou sekvenciou uvedenou v sekv. č. 1 a variabilná oblasť ťažkého reťazca je kódovaná nukleotidovou sekvenciou uvedenou v sekv. č. 11.

Ďalšie konkrétne uskutočnenie vynálezu sa týka protilátkových proteínov obsahujúcich variabilnú oblasť ľahkého reťazca uvedenú ako sekv. č. 2 a variabilnú oblasť ťažkého reťazca uvedenú ako sekv. č. 8.

Ďalšie konkrétne uskutočnenie vynálezu sa týka protilátkových proteínov, ktorých variabilná oblasť ľahkého reťazca je kódovaná nukleotidovou sekvenciou uvedenou v sekv. č. 1, a ktorých variabilná oblasť ťažkého reťazca je kódovaná nukleotidovou sekvenciou uvedenou v sekv. č. 7.

Humanizácia variabilnej oblasti hlodavčej protilátky sa môže dosiahnuť použitím spôsobov známych v oblasti. EP 0239400 opisuje zaštepnenie CDRs hlodavčej variabilnej oblasti do kostry ľudskej variabilnej oblasti. WO 90/07861 opisuje spôsoby pretvárania CDR-zaštepenej variabilnej oblasti zavedením ďalších modifikácií kostry. WO 92/11018 opisuje spôsoby produkcie humanizovanej Ig kombinovaním donorových CDRs s akceptorovou kostrou, ktorá je vysoko homologická s donorovou kostrou. WO 92/05274 opisuje prípravu protilátok s mutovanou kostrou vychádzajúc z hlodavčej protilátky. Ďalšími publikáciami predchádzajúceho stavu techniky, ktoré sa týkajú humanizácie hlodavčích

monoklonálnych protilátok, sú EP 0368684; EP 0438310; WO 92/07075 alebo WO 92/22653. Takže odborník môže vyrobiť protilátky podľa predloženého vynálezu vychádzajúc z verejne dostupnej hľadavčej monoklonálnej protilátky F19 a použitím techník známych v oblasti, napr. z WO 92/05274. Samozrejme, DNA molekuly kódujúce protilátkové proteíny podľa predloženého vynálezu je možné získať syntetickými postupmi známymi v oblasti, napr. chemickou syntézou príslušných oligonukleotidov a následnou ligáciou a amplifikáciou (pozri napr. Frank a ďalší, (1987) Methods Enzymol. 154: 221-249).

Ďalší predmet predloženého vynálezu sa týka molekúl nukleovej kyseliny, ktoré obsahujú kódujúcu informáciu pre protilátkové proteíny podľa vynálezu, ako sú opísané vyššie. Výhodne molekula nukleovej kyseliny podľa predloženého vynálezu obsahuje nukleotidovú sekvenciu vybranú zo sekv. č. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 alebo 15.

Ďalším predmetom predloženého vynálezu je rekombinantný DNA vektor obsahujúci nukleotidovú sekvenciu ktorejkoľvek z vyššie uvedených nukleových kyselín, najmä ak je uvedená nukleotidová sekvencia operačne spojená s expresnou riadiacou sekveniou, ako v expresných vektoroch. Výhodným rekombinantným DNA vektorom je expresný vektor.

Ďalším predmetom predloženého vynálezu je hostiteľská bunka nesúca opísaný vektor, najmä expresný vektor. Takouto hostiteľskou bunkou môže byť prokaryotická alebo eukaryotická bunka. Výhodne je takouto hostiteľskou bunkou eukaryotická bunka, kvasinková bunka alebo cicavčia bunka. Výhodnejšie je takouto hostiteľskou bunkou CHO bunka alebo COS bunka.

Ešte ďalším predmetom predloženého vynálezu je spôsob produkcie protilátkových proteínov podľa vynálezu. Takýto spôsob zahŕňa nasledujúce kroky:

- a) kultiváciu vyššie opísanej hostiteľskej bunky v podmienkach, v ktorých je protilátkový proteín hostiteľskou bunkou exprimovaný, a
- b) izoláciu protilátkového proteínu.

Výhodné sú cicavčie hostiteľské bunky, výhodne CHO alebo COS. Hostiteľské bunky na produkciu protilátkových proteínov podľa vynálezu sa môžu transfekovať jedným vektorom obsahujúcim expresné jednotky pre oba, ľahký aj

ťažký reťazec (pozri napr. WO 94/11523). Jedno konkrétne uskutočnenie spôsobu výroby protilátkových proteínov podľa vynálezu používa hostiteľské bunky, ktoré sú kotransfekované dvoma plazmidmi, z ktorých jeden nesie expresnú jednotku pre ľahký a druhý expresnú jednotku pre ťažký reťazec (pozri napr. EP 0481790).

Protilátkové proteíny podľa vynálezu poskytujú vysoko špecifický nástroj na nasmerovanie terapeutických činidiel voči FAP antigénu. Preto sa ďalší predmet vynálezu týka protilátkových proteínov podľa vynálezu, ktoré sú konjugované s terapeutickým činidlom. Z mnohých terapeutických činidiel známych v oblasti sú výhodné terapeutické činidlá vybrané zo skupiny, ktorá zahŕňa rádioizotopy, toxíny, toxoidy, inflamátogénne činidlá, enzýmy, antisense molekuly, peptidy, cytokíny a chemoterapeutické činidlá. Spomedzi rádioizotopov je možné ako terapeutické činidlá použiť rádioizotopy emitujúce gama, beta a alfa žiarenie. Ako terapeutické rádioizotopy sú výhodné β -emitujúce rádioizotopy. Na dosiahnutie lokalizovaného žiarenia a na deštrukciu malígnych nádorových buniek sa osvedčili ako užitočné β -emitujúce izotopy $^{186}\text{rénium}$, $^{188}\text{rénium}$, $^{131}\text{jód}$ a $^{90}\text{ytrium}$. Preto sú rádioizotopy vybrané zo skupiny zahŕňajúcej $^{186}\text{rénium}$, $^{188}\text{rénium}$, $^{131}\text{jód}$ a $^{90}\text{ytrium}$ výnimočne výhodné ako terapeutické činidlá na konjugovanie s protilátkovými proteínmi podľa vynálezu. Na označenie protilátky podľa vynálezu rádioaktívnym jódom môže byť použitý napríklad spôsob opísaný vo WO 93/05804.

Ďalším predmetom predloženého proteínu sú značené protilátkové proteíny podľa vynálezu. Takáto FAP-špecificky značená protilátka umožňuje lokalizáciu a/alebo detekciu FAP antigénu *in vitro* a/alebo *in vivo*. Značka je definovaná ako marker, ktorý môže byť priamo alebo nepriamo detekovateľný. Nepriamy marker je definovaný ako marker, ktorý nemôže byť detekovaný ako taký, ale vyžaduje ďalší priamo detekovateľný marker špecifický pre nepriamy marker. Výhodnými značkami na uskutočňovanie vynálezu sú detekovateľné markery. Z veľkého množstva detekovateľných markerov sú najvýhodnejšie detekovateľné markery vybrané zo skupiny zahŕňajúcej enzýmy, farbičky, rádioizotopy, digoxigenín a biotín.

Ďalší predmet predloženého vynálezu sa týka protilátkových proteínov podľa vynálezu, ktoré sú konjugované so zobraziteľným činidlom. Zo stavu techniky je

dostupné veľké množstvo rôznych zobraziteľných činidiel. Na uskutočňovanie vynálezu sú výhodnejšie gama-emitujúce izotopy. Najvýhodnejší je $^{125}\text{Jód}$.

Jeden predmet predloženého vynálezu sa týka farmaceutických prostriedkov, ktoré obsahujú vyššie opísaný protilátkový proteín podľa predloženého vynálezu a farmaceuticky prijateľný nosič. Takéto farmaceutické prostriedky sú užitočné na liečbu nádorov, ktoré sú spojené s aktivovanými stromálnymi fibroblastmi. Existujú dva možné efektorové princípy na protinádorovú stromálnu imunoterapiu, ktoré môžu účinkovať synergicky: a) Nemodifikovaná (nekonjugovaná, "nahá") protilátka podľa vynálezu môže indukovať imunitnú deštrukčnú reakciu alebo zápalovú reakciu v nádorovej stróme, zatiaľ čo b) protilátka konjugovaná s terapeutickým činidlom, ako napríklad rádioizotopom alebo inou toxickou látkou, môže spôsobiť lokalizované ožiarenie a deštrukciu malígnych nádorových buniek. Z toho vyplýva, že ďalším predmetom predloženého vynálezu je použitie opísaného protilátkového proteínu na výrobu farmaceutického prostriedku najmä na liečbu nádorov.

Ďalším uskutočnením sú farmaceutické prostriedky obsahujúce protilátkový proteín podľa vynálezu konjugovaný s vyššie opísaným terapeutickým činidlom a farmaceuticky prijateľný nosič, ktoré sú užitočné na liečbu nádorov, pričom uvedené nádory sú asociované s aktivovanými stromálnymi fibroblastmi. Ďalšie uskutočnenie sa týka farmaceutických prostriedkov, ktoré obsahujú protilátkový proteín podľa predloženého vynálezu konjugovaný s vyššie opísaným zobraziteľným činidlom a farmaceuticky prijateľný nosič, ktoré sú užitočné na zobrazovanie prítomnosti aktivovaných stromálnych fibroblastov v hojacej sa rane, zapálenej pokožke alebo nádore u ľudského pacienta. Najvýhodnejšie uskutočnenie sa týka vyššie uvedených farmaceutických prostriedkov, kde nádory sú vybrané z rakovinovej skupiny zahŕňajúcej kolorektálnu rakovinu, pľúcnu rakovinu iných ako malých buniek, rakovinu prsníka, rakovinu hlavy a krku, rakovinu vaječníkov, rakovinu pľúc, invazívnu rakovinu močového mechúra, rakovinu pankreasu a metastatickú rakovinu mozgu.

V prípade živočíšneho alebo ľudského tela sa môže osvedčiť ako výhodné aplikovať vyššie opísané farmaceutické prostriedky intravenóznou alebo inou cestou, napr. systémovo, lokálne alebo do cieľového tkaniva alebo orgánu, v

závislosti na type a pôvode ochorenia alebo problému, ktorý sa má liečiť, napr. nádoru. Systémový spôsob účinku je želateľný napríklad keď je potrebné liečiť rôzne orgány alebo systémy orgánov, ako je tomu napr. pri systémových autoimunitných ochoreniach alebo alergiách alebo pri transplantáciách cudzích orgánov alebo tkanív alebo pri nádoroch, ktoré sú difúzne alebo ťažko lokalizovateľné. Lokálny spôsob účinku by mal byť braný do úvahy, keď sa očakávajú len lokálne manifestácie neoplastického alebo imunologického účinku, ako napríklad pri lokálnych nádoroch.

Protilátkové proteíny podľa predloženého vynálezu je možné podávať rôznymi spôsobmi aplikácie, ktoré sú odborníkovi známe, najmä intravenóznou injekciou alebo priamou injekciou do cieľových tkanív. Na systémovú aplikáciu sú výhodné intravenózne, intravaskulárne, intramuskulárne, intraarteriálne, intra-peritoneálne, orálne alebo intratekálne spôsoby. Lokálnejšia aplikácia sa môže uskutočňovať subkutánne, intrakutánne, intrakardiálne, intralobálne, intra-medulárne, intrapulmonálne alebo priamo do alebo blízko tkaniva, ktoré sa má ošetriť (spojovacie, kostné, svalové, nervové, epiteliálne tkanivo). V závislosti na požadovanom trvaní a účinnosti liečby sa môžu farmaceutické protilátkové prostriedky podávať raz alebo niekoľkokrát, aj periodicky, napríklad denne počas niekoľkých dní, týždňov alebo mesiacov a v odlišných dávkach.

Na prípravu vhodných protilátkových prostriedkov na vyššie opísané aplikácie musí odborník použiť známe injektovateľné, fyziologicky prijateľné sterilné roztoky. Na prípravu roztokov pripravených na použitie na parenterálnu injekciu alebo infúziu sú bežne dostupné vodné izotonické roztoky, ako napr. fyziologický roztok alebo zodpovedajúce plazmatické proteínové roztoky. Farmaceutické prostriedky môžu byť vo forme lyofylizátov alebo ako suché prípravky, ktoré je možné rekonštituovať známym injektovateľným roztokom priamo pred použitím v sterilných podmienkach, napr. ako sada jednotiek. Finálne prípravky protilátkových prostriedkov podľa predloženého vynálezu sú pripravené na injekciu, infúziu alebo perfúziu zmiešaním purifikovaných protilátok podľa vynálezu so sterilným, fyziologicky prijateľným roztokom, ktorý môže byť obohatený o známe nosičové látky a/alebo aditíva (napr. sérový albumín, dextrózu, síran sodný, EDTA).

Množstvo aplikovanej protilátky závisí na povahe ochorenia. U pacientov s rakovinou môže byť aplikovaná dávka "nahej" protilátky medzi 0,1 a 100 mg/m², výhodne medzi 5 a 50 mg/m² na aplikáciu. Pre rádioaktívne značené protilátky, napr. s jódom-131, sa musí stanoviť maximálna tolerovaná dávka (MTD), ktorá sa nesmie pri liečbe prekročiť. Aplikácia rádioaktívne značenej protilátky pacientom s rakovinou sa potom môže uskutočňovať opakovane (mesačne alebo týždenne) intravenóznou infúziou dávky, ktorá je nižšia ako MTD (pozri napr. Welt a ďalší (1994) J. Clin. Oncol. 12: 1193-1203).

Ďalej sa jeden predmet vynálezu týka použitia protilátkových proteínov podľa vynálezu na liečbu rakoviny. Výhodné uskutočnenie predloženého vynálezu sa týka použitia protilátkových proteínov podľa vynálezu, konjugovaných s vyššie opísaným terapeutickým činidlom, na liečbu rakoviny. Iné výhodné uskutočnenie predloženého vynálezu sa týka použitia protilátkových proteínov podľa vynálezu, konjugovaných so zobraziteľným činidlom, na zobrazenie aktivovaných stromálnych fibroblastov. Ďalšie výhodné uskutočnenie predloženého vynálezu sa týka použitia značených protilátkových proteínov podľa vynálezu na detekciu prítomnosti aktivovaných stromálnych fibroblastov vo vzorke.

Jeden predmet vynálezu sa týka spôsobu liečby nádorov, ktoré majú spojitosť s aktivovanými stromálnymi fibroblastami schopnými špecificky vytvárať komplex s protilátkovými proteínmi podľa vynálezu, ktoré sú vo forme nahých/nemodifikovaných protilátok, modifikovaných protilátkových proteínov, ako napr. fúzovaných proteínov, alebo protilátkových proteínov konjugovaných s terapeutickým činidlom, pričom tento spôsob zahŕňa uvedenie nádoru do kontaktu s účinným množstvom uvedených protilátok. Výhodné uskutočnenie predloženého vynálezu sa týka vyššie uvedeného spôsobu liečby nádorov, pričom nádorom je nádor majúci rakovinové bunky vybrané so skupiny rakovín, ktorá zahŕňa kolorektálnu rakovinu, pľúcnu rakovinu iných ako malých buniek, rakovinu prsníka, rakovinu hlavy a krku, rakovinu vaječníkov, rakovinu pľúc, invazívnu rakovinu močového mechúra, rakovinu pankreasu a metastatickú rakovinu mozgu. Vyššie opísaný spôsob liečby nádorov sa môže uskutočňovať *in vitro* alebo *in vivo*.

Ďalší predmet vynálezu sa týka spôsobu detekcie prítomnosti aktivovaných stromálnych fibroblastov pri hojení rán, zápale alebo nádoroch, ktorý zahŕňa:

- a) uvedenie vzorky, ktorá možno obsahuje aktivované stromálne fibroblasty, do kontaktu s protilátkovým proteínom podľa vynálezu v podmienkach, ktoré sú vhodné na vytvorenie komplexu medzi protilátkou a antigénom,
- b) detekciu prítomnosti komplexu, a tým detekciu prítomnosti aktivovaných stromálnych fibroblastov pri hojení rán, zápale alebo v nádore.

Výhodné uskutočnenie predloženého vynálezu sa týka spôsobu detekcie prítomnosti aktivovaných stromálnych fibroblastov v nádore, pričom nádorom je nádor majúci rakovinové bunky vybrané so skupiny rakovín, ktorá zahŕňa kolorektálnu rakovinu, pľúcnu rakovinu iných ako malých buniek, rakovinu prsníka, rakovinu hlavy a krku, rakovinu vaječníkov, rakovinu pľúc, invazívnu rakovinu močového mechúra, rakovinu pankreasu a metastatickú rakovinu mozgu. Najvýhodnejšími protilátkovými proteínmi podľa vynálezu sú proteíny značené ako bolo opísané vyššie.

Ďalší predmet vynálezu sa týka spôsobu zobrazenia prítomnosti aktivovaných fibroblastov v hojacej sa rane, zápalovom tkanive (pozitívna je aj reumatoidná artritída a cirhóza) alebo v nádore ľudských pacientov, ktorý zahŕňa:

- a) podanie protilátkového proteínu podľa predloženého vynálezu, ktorý je konjugovaný so zobraziteľným činidlom, ľudskému pacientovi v podmienkach vhodných na vytvorenie komplexu protilátka-antigén,
- b) zobrazenie akéhokoľvek komplexu vytvoreného týmto spôsobom,
- c) tým zobrazenie prítomnosti aktivovaných stromálnych fibroblastov v ľudskom pacientovi.

Výhodné uskutočnenie predloženého vynálezu sa týka vyššie opísaného spôsobu zobrazenia prítomnosti aktivovaných stromálnych fibroblastov v nádoroch, pričom nádorom je nádor majúci rakovinové bunky vybrané so skupiny rakovín, ktorá zahŕňa kolorektálnu rakovinu, pľúcnu rakovinu iných ako malých buniek, rakovinu prsníka, rakovinu hlavy a krku, rakovinu vaječníkov, rakovinu pľúc, rakovinu močového mechúra, rakovinu pankreasu a metastatickú rakovinu mozgu.

Ďalší predmet predloženého vynálezu sa týka spôsobu detekcie nádorovej strómy, ktorý zahŕňa:

- a) uvedenie vhodnej vzorky do kontaktu s protilátkovým proteínom podľa predloženého vynálezu v podmienkach vhodných na vytvorenie komplexu protilátka-antigén,
- b) detekciu prítomnosti akéhokoľvek takto vytvoreného komplexu,
- c) ododenie prítomnosti nádorovej strómy od prítomnosti uvedeného komplexu.

Protilátkové proteíny na uskutočňovanie vynálezu sú výhodne značené detekovateľným markerom.

Ďalší predmet predloženého vynálezu sa týka spôsobu zobrazenia nádorovej strómy v ľudskom pacientovi, ktorý zahŕňa:

- a) podanie protilátky podľa vynálezu, konjugovanej s vyššie opísaným zobrazovateľným činidlom, pacientovi v podmienkach vhodných na vytvorenie komplexu protilátka-antigén,
- b) zobrazenie takto vytvoreného komplexu, a tým, zobrazenie prítomnosti nádorovej strómy u ľudského pacienta.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Obrázok 1. DNA sekvencia A verzie variabilnej oblasti ľudského F19 pretvarovaného ľahkého reťazca (hF19L_A), sekv. č. 1.

Obrázok 2. Aminokyselinová sekvencia A verzie variabilnej oblasti ľudského F19 pretvarovaného ľahkého reťazca (hF19L_A), sekv. č. 2.

Obrázok 3. DNA sekvencia B verzie variabilnej oblasti ľudského F19 pretvarovaného ľahkého reťazca (hF19L_B), sekv. č. 3. Nukleotidy, ktorými sa líši od A verzie sú podčiarknuté a vytlačené hrubo.

Obrázok 4. Aminokyselinová sekvencia B verzie variabilnej oblasti ľudského F19 pretvarovaného ľahkého reťazca (hF19L_B), sekv. č. 4. Aminokyseliny, ktorými sa líši od A verzie sú podčiarknuté a vytlačené hrubo.

Obrázok 5. DNA sekvencia C verzie variabilnej oblasti ľudského F19 pretvarovaného ľahkého reťazca (hF19L_C), sekv. č. 5. Nukleotidy, ktorými sa líši od A verzie sú podčiarknuté a vytlačené hrubo.

Obrázok 6. Aminokyselinová sekvencia C verzie variabilnej oblasti ľudského F19 pretvarovaného ľahkého reťazca (hF19L_C), sekv. č. 6. Aminokyseliny, ktorými sa líši od A verzie sú podčiarknuté a vytlačené hrubo.

Obrázok 7. DNA sekvencia A verzie variabilnej oblasti ľudského F19 pretvarovaného ťažkého reťazca (hF19H_A), sekv. č. 7.

Obrázok 8. Aminokyselinová sekvencia A verzie variabilnej oblasti ľudského F19 pretvarovaného ťažkého reťazca (hF19H_A), sekv. č. 8.

Obrázok 9. DNA sekvencia B verzie variabilnej oblasti ľudského F19 pretvarovaného ťažkého reťazca (hF19H_B), sekv. č. 9. Nukleotidy, ktorými sa líši od A verzie sú podčiarknuté a vytlačené hrubo.

Obrázok 10. Aminokyselinová sekvencia B verzie variabilnej oblasti ľudského F19 pretvarovaného ťažkého reťazca (hF19H_B), sekv. č. 10. Aminokyseliny, ktorými sa líši od A verzie sú podčiarknuté a vytlačené hrubo.

Obrázok 11. DNA sekvencia C verzie variabilnej oblasti ľudského F19 pretvarovaného ťažkého reťazca (hF19H_C), sekv. č. 11. Nukleotidy, ktorými sa líši od A verzie sú podčiarknuté a vytlačené hrubo.

Obrázok 12. Aminokyselinová sekvencia C verzie variabilnej oblasti ľudského F19 pretvarovaného ťažkého reťazca (hF19H_C), sekv. č. 12. Aminokyseliny, ktorými sa líši od A verzie sú podčiarknuté a vytlačené hrubo.

Obrázok 13. DNA sekvencia D verzie variabilnej oblasti ľudského F19 pretvarovaného ťažkého reťazca (hF19H_D), sekv. č. 13. Nukleotidy, ktorými sa líši od A verzie sú podčiarknuté a vytlačené hrubo.

Obrázok 14. Aminokyselinová sekvencia D verzie variabilnej oblasti ľudského F19 pretvarovaného ťažkého reťazca (hF19H_D), sekv. č. 14. Aminokyseliny, ktorými sa líši od A verzie sú podčiarknuté a vytlačené hrubo.

Obrázok 15. DNA sekvencia E verzie variabilnej oblasti ľudského F19 pretvarovaného ťažkého reťazca (hF19H_E), sekv. č. 15. Nukleotidy, ktorými sa líši od A verzie sú podčiarknuté a vytlačené hrubo.

Obrázok 16. Aminokyselinová sekvencia E verzie variabilnej oblasti ľudského F19 pretvarovaného ťažkého reťazca (hF19H_E), sekv. č. 16. Aminokyseliny, ktorými sa líši od A verzie sú podčiarknuté a vytlačené hrubo.

Obrázok 17. Aminokyselinová sekvencia variabilnej oblasti F19 chimérneho ľahkého reťazca (chF19LC), sekv. č. 17.

Obrázok 18. Aminokyselinová sekvencia variabilnej oblasti F19 chimérneho ťažkého reťazca (chF19HC), sekv. č. 18.

Obrázok 19. DNA sekvencia ľudského kapa ľahkého konštantného reťazca, sekv. č. 19.

Obrázok 20. Aminokyselinová sekvencia ľudského ľahkého konštantného reťazca, sekv. č. 20.

Obrázok 21. DNA sekvencia ľudského ťažkého konštantného reťazca, sekv. č. 21.

Obrázok 22. Aminokyselinová sekvencia ľudského ťažkého konštantného reťazca, sekv. č. 22.

Obrázok 23. Cicavčie bunkové expresné vektory použité na výrobu chimérnych a pretvarovaných ľudských protilátok s ľudskými kapa ľahkými reťazcami a ľudskými gama-1 ťažkými reťazcami.

A. Expresný vektor pre ľahký reťazec: pKN100

B. Expresný vektor pre ťažký reťazec: pG1D105

Obrázok 24. DNA a aminokyselinová sekvencia variabilnej oblasti myšieho F19 ľahkého reťazca ako boli modifikované na použitie na konštrukciu chimérneho F19 ľahkého reťazca. Restričné miesta sú označené hrubo vytlačenými písmenami. Kozak sekvencia, CDRs 1 až 3 a zostrihové donorové miesto sú podčiarknuté.

Obrázok 25. DNA a aminokyselinová sekvencia variabilnej oblasti myšieho F19 ťažkého reťazca ako boli modifikované na použitie na konštrukciu chimérneho F19 ťažkého reťazca. Restričné miesta sú označené hrubo vytlačenými písmenami. Kozak sekvencia a zostrihové donorové miesto sú podčiarknuté.

Obrázok 26. DNA sekvencia F19 chimérnej protilátky klonovanej do pKN100 cicavčieho expresného vektora. Restričné miesta sú označené hrubými písmenami

a podčiarknuté. CDRs 1 až 3 a zostrihové donorové miesto sú podčiarknuté. Toto je DNA sekvencia myšieho F19 ľahkého reťazca vo vnútri pKN100 eukaryotického expresného vektora. Tento vektor má cDNA verziu génu ľudskej kapka konštantnej oblasti (alotyp Km(3)), ktorá je ukončená silnou umelou terminačnou sekvenciou. Okrem toho, aj Neo selekčný gén je ukončený touto umelou sekvenciou a je aj v rovnakej orientácii ako expresná kazeta pre kapka ľahký reťazec.

Základnými zložkami pKN100 eukaryotického expresného vektora sú:

1 až 6	<i>EcoRI</i> miesto
7 až 1571	HCMVi promótor/zosilovač
583 až 587	TATAA box
610	začiatok transkripcie
728 až 736	zostrihové donorové miesto
731	začiatok intrónu
1557	koniec intrónu
1544 až 1558	zostrihové akceptorové miesto
1590 až 1598	Kozak sekvencia
1599 až 1658	peptidová vedúca sekvencia
1659 až 1997	myši F19 ľahký reťazec
1996 až 2004	zostrihové donorové miesto
2011 až 2657	cDNA kópia génu ľudskej kapka konštantnej oblasti (Km(3))
2664 až 2880	umelá spaC2 terminačná sekvencia
2887 až 7845	to je DNA fragment pSV2neo vektora, ktorý obsahuje gén Amp-rezistencie (v opačnej orientácii), ColEI a SV40 počiatky replikácie a gén Neo-rezistencie (v rovnakej orientácii ako HCMVi-KCT kazeta)
7852 až 8068	umelý spaC2 terminačný signál

Táto sekvencia končí presne pred *EcoRI* miestom (poloha 1 až 6) na začiatku sekvencie. Ako vektor by bola táto DNA sekvencia kruhová.

Obrázok 27. DNA sekvencia F19 chimérnej protilátky klonovanej do pg1d105 cicavčieho expresného vektora. Restrikčné miesta sú označené hrubo vytlačenými písmenami a podčiarknuté. CDRs 1 až 3 a zostrihové donorové miesto sú

podčiarknuté. Toto je DNA sekvencia eukaryotického expresného vektora pG1D105, ktorý obsahuje variabilnú oblasť myšieho F19 ťažkého reťazca. Tento vektor obsahuje cDNA verziu ľudskej gama-1 konštantnej oblasti (alotyp G1m (non-a, z, -x), tiež známy ako Gm1(17) alotyp).

Základnými zložkami konštruktu sú:

1 až 2501	sekvencia založená na pBR322 obsahujúca gén ampicilínovej rezistencie, ColEI a SV40 počiatky replikácie a poškodený SV40 skorý promótor
2502 až 3226	dhfr gén
3233 až 4073	SV40 poly A sekvencia atď.
4074 až 4079	ligované <i>Bam</i> HI a <i>Bgl</i> II miesto (<i>Bst</i> YI)
4080 až 4302	SPA miesto plus C2 terminačný signál
4303 až 5867	HCMV promótor
5879 až 5885	unikátne <i>Hind</i> III restričné miesto na klonovanie imunoglobulínových variabilných génov
5886 až 5894	Kozak sekvencia
5895 až 5951	signálny peptid
5952 až 6323	myši F19 ťažký reťazec
6323 až 6330	zostrihové donorové miesto
6331 až 6336	unikátne <i>Bam</i> HI restričné miesto na klonovanie imunoglobulínových variabilných génov
6337 až 7388	cDNA kópia ľudských gama-1 konštantných oblastí, ktorým predchádza 62 bp intrón
7389 až 7709	Arnie terminačná sekvencia

Ľudská gama-1 konštantná oblasť použitá v tomto konštrukte má G1m (non-a, z,-x), známy aj ako Gm1(17) alotyp, ktorý je definovaný zvyškom kyseliny glutámovej (E) v polohe 356 (podľa Eu číslovania), metionínovým (M) zvyškom v polohe 358 (podľa Eu číslovania) a lyzínovým (K) zvyškom v polohe 214 (podľa Eu číslovania). Vo vyššie uvedenej sekvencii sú tieto tri zvyšky podčiarknuté.

Obrázok 28. Spôsob konštrukcie ľudského pretvarovaného F19 ľahkého reťazca na základe PCR. Tento obrázok poskytuje schematický pohľad na stratégiu

konštrukcie. Bodkované čiary označujú komplementárne sekvencie medzi primermi, ktoré majú dĺžku najmenej 21 báz.

Obrázok 29. Nukleotidová a odvodená sekvencia A, B a C verzie variabilných oblastí ľudského F19 ľahkého reťazca. Nukleotidové a odvodené aminokyselinové sekvencie sú zoradené a porovnané s A verziou, čiarky znamenajú zhodu nukleotidov, bodky znamenajú zhodu aminokyselín. Amino-kyseliny sú číslované podľa Kabat a ďalší (1991). Lokalizácie CDRs sú označené rámkami.

Obrázok 30. DNA sekvencia F19L_A (A verzia ľudského pretvarovaného ľahkého reťazca) klonovaná do pKN100 cicavčieho expresného vektora. Restrikčné miesta sú označené hrubými písmenami a podčiarknuté. CDRs 1 až 3 a zostrihové donorové miesto sú podčiarknuté. Toto je DNA sekvencia A verzie pretvarovaného F19 ľahkého reťazca, ktorá je klonovaná do pKN100 eukaryotického expresného vektora. Tento vektor má cDNA verziu génu ľudskej kapa konštantnej oblasti (alotyp Km(3)), ktorá je ukončená silnou umelou terminačnou sekvenciou. Okrem toho, aj Neo selekčný gén je ukončený touto umelou sekvenciou a je aj v rovnakej orientácii ako expresná kazeta pre kapa ľahký reťazec.

Zložkami vektora sú:

7 až 1571	HCMVi promótor/zosilovač
583 až 587	TATAA box
610	začiatok transkripcie
728 až 736	zostrihové donorové miesto
731	začiatok intrónu
1557	koniec intrónu
1544 až 1558	zostrihové akceptorové miesto
1590 až 1598	Kozak sekvencia
1599 až 1658	peptidová vedúca sekvencia
1659 až 1997	A verzia pretvarovaného F19 ľahkého reťazca
1996 až 2004	zostrihové donorové miesto
2011 až 2657	cDNA kópia génu ľudskej kapa konštantnej oblasti (Km(3))
2664 až 2880	umelá spaC2 terminačná sekvencia

- 2887 až 7845 to je DNA fragment pSV2neo vektora, ktorý obsahuje gén Amp-rezistencie (v opačnej orientácii), ColEI a SV40 počiatky replikácie a gén Neo-rezistencie (v rovnakej orientácii ako HCMVi-KCT kazeta)
- 7852 až 8068 umelý spaC2 terminačný signál

Táto sekvencia končí presne pred *EcoRI* miestom (poloha 1 až 6) na začiatku sekvencie. Ako vektor by bola táto DNA sekvencia kruhová.

Obrázok 31. Spôsob konštrukcie ľudského pretvarovaného F19 ťažkého reťazca na základe PCR. Tento obrázok poskytuje schematický pohľad na stratégiu konštrukcie. Bodkované čiary označujú komplementárne sekvencie medzi primermi, ktoré majú dĺžku najmenej 21 báz.

Obrázok 32. Nukleotidová a odvodená sekvencia a až e verzie variabilných oblastí pretvarovaného ľudského F19 ťažkého reťazca. Nukleotidové a odvodené aminokyselinové sekvencie sú zoradené a porovnané s A verziou, čiarky znamenajú zhodu nukleotidov, bodky znamenajú zhodu aminokyselín. Aminokyseliny sú číslované podľa Kabat a ďalší (1991). Lokalizácie CDRs sú označené rámkami.

Obrázok 33. DNA sekvencia F19Ha (a verzia ľudského pretvarovaného ťažkého reťazca) klonovaná do pg1d105 cicavčieho expresného vektora. Restrikčné miesta sú označené hrubo vytlačenými písmenami a podčiarknuté. CDRs 1 až 3 a zostrihové donorové miesto sú podčiarknuté. Toto je DNA sekvencia eukaryotického expresného vektora pG1D105, ktorý obsahuje A verziu variabilnej oblasti pretvarovaného F19 ťažkého reťazca. Tento vektor obsahuje cDNA verziu ľudskej gama-1 konštantnej oblasti (alotyp G1m (non-a, z, -x), tiež známy ako Gm1(17) alotyp).

Základnými zložkami konštruktu sú:

- 1 až 2501 sekvencia založená na pBR322 obsahujúca gén ampicilínovej rezistencie, ColEI a SV40 počiatky replikácie a poškodený SV40 skorý promótor
- 2502 až 3226 dhfr gén
- 3233 až 4073 SV40 poly A sekvencia atď.

4080 až 4302	SPA miesto plus C2 terminačný signál
4303 až 5867	HCMV promótor/zosiľovač
5879 až 5885	unikátne <i>HindIII</i> restričné miesto na klonovanie imuno-globulínových variabilných génov
5886 až 5894	Kozak sekvencia
5895 až 5951	signálny peptid
5952 až 6323	A verzia pretvarovaného F19 ťažkého reťazca
6323 až 6330	zostrihové donorové miesto
6331 až 6336	unikátne <i>BamHI</i> restričné miesto na klonovanie imuno-globulínových variabilných génov
6337 až 7388	cDNA kópia ľudských gama-1 konštantných oblastí, ktorým predchádza 62 bp intrón
7389 až 7709	Arnie terminačná sekvencia

Ľudská gama-1 konštantná oblasť použitá v tomto konštrukte má G1m (non-a, z,-x), známy aj ako Gm1(17) alotyp, ktorý je definovaný zvyškom kyseliny glutámovej (E) v polohe 356 (podľa Eu číslovania), metionínovým (M) zvyškom v polohe 358 (podľa Eu číslovania) a lyzínovým (K) zvyškom v polohe 214 (podľa Eu číslovania). Vo vyššie uvedenej sekvencii sú tieto tri zvyšky podčiarknuté.

Obrázok 34. Schematický prehľad. Počas exprese protilátky F19 v cicavčích bunkách prebieha RNA rozstrih ťažkých (panel A) a ľahkých (panel B) reťazcov.

A. zostrih RNA pre ťažký reťazec

B. zostrih RNA pre kapa ľahký reťazec

Obrázok 35. Koncentračná závislosť väzby L_AH_C supernatantu na CD8-FAP.

Obrázok 36. Väzba biotinylovaného L_AH_C na ľudský FAP.

Obrázok 37. CD8-FAP nesie F19 epitop, ako sa detegovalo s cF19.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Konštrukcia myších-ľudských chimérnych génov

Navrhla sa chimérna F19 (cF19) protilátka tak, aby mala myšiu F19V_L oblasť spojenú s ľudskou kapa konštantnou oblasťou a myšiu F19V_H oblasť spojenú s ľudskou gama-1 konštantnou oblasťou. Použili sa PCR primery na modifikáciu 5'- a 3'-sekvencií ohraničujúcich cDNA sekvencie, ktoré kódujú F19V_L a V_H oblasti (tabuľka 1). Navrhli sa PCR primery špecifické pre V-oblasť F19 ľahkého reťazca. Tieto adaptované myšie F19 variabilné oblasti sa potom subklonovali do cicavčích bunkových expresných vektorov, ktoré už obsahujú ľudskú kapa (pKN100 vektor) alebo gama-1 (pG1D104 vektor) konštantnú oblasť (obrázok 23). Tieto vektory využívajú ľudský cytomegalovírusový (HCMV) promótor/zosilovač na účinnú transkripciu ľahkého a ťažkého reťazca. Vektory obsahujú aj SV40 počiatok replikácie, ktorý umožňuje účinnú DNA replikáciu a následnú expresiu proteínu v COS bunkách. Expresné vektory boli navrhnuté tak, aby mali variabilné oblasti začlenené ako *HindIII*-*BamHI* DNA fragmenty. Navrhli sa PCR primery na zavedenie týchto restričných miest na 5'- (*HindIII*) a 3'-(*BamHI*) konce cDNA kódujúcej V-oblasti. Okrem toho boli navrhnuté PCR primery na zavedenie Kozak sekvencie (GCCGCCACC) na 5'-konce cDNA pre ľahký aj ťažký reťazec, aby sa umožnila účinná translácia (Kozak M.: At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. (1987) J. Mol. Biol. 196: 947), a na zavedenie zostrihových donorových miest na 3'-konce cDNA pre ľahký aj ťažký reťazec, aby sa variabilné oblasti zostrihli do susedstva konštantných oblastí. PCR primery použité na konštrukciu chimérnych F19 ľahkých a ťažkých reťazcov sú znázornené v tabuľke 1. DNA a aminokyselinové sekvencie myších F19 V_L a V_H oblastí, ako boli upravené na použitie na konštrukciu chimérnych F19 ľahkých a ťažkých reťazcov, sú znázornené na obrázkoch 24 a 25. DNA sekvencie myších F19 ľahkých a ťažkých reťazcov klonované do eukaryotických expresných vektorov pKN100 a pG1D105 sú znázornené na obrázkoch 26 a 27.

Tabuľka 1

PCR primery na konštrukciu chimérnej F19 protilátky

A. Variabilná oblasť ľahkého reťazca

1. Primer na konštrukciu 5'-konca (37mér)

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

HindIII Kozak sekv. M D S Q A Q

2. Primer na konštrukciu 3'-konca (35mér)

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

BamHI zostrihové donorové miesto

A. Variabilná oblasť ťažkého reťazca

1. Primer na konštrukciu 5'-konca (37mér)

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

HindIII Kozak sekv. M G W S W V

2. Primer na konštrukciu 3'-konca (35mér)

5' CCGA GGATCC ACTCACGTT TGA GGA GAC GGT GAC TGA 3'

BamHI zostrihové donorové miesto

Príklad 2

Expresná a väzobná aktivita chimérnej F19 protilátky

Dve plazmidové DNA kódujúce chimérne F19 ľahké a ťažké reťazce (pozri príklad 1) sa ko-transfekovali do COS buniek na prechodnú expresiu chimérnej F19 protilátky ako je opísané nižšie. Po 72 hodinovom inkubovaní sa zhromaždilo médium, centrifugovalo sa, aby sa odstránili bunkové zvyšky, a analyzovalo sa prostredníctvom ELISA z hľadiska produkcie ľudskej protilátky podobnej IgG1. Supernatant COS buniek obsahujúci chimérnu F19 protilátku sa analyzoval z hľadiska jeho schopnosti viazať sa na HT 1080 bunky (pozri príklad 13), ktoré na svojom povrchu exprimujú FAP antigén.

Transfekcia COS buniek použitím elektroporácie

Cicavčí expresný vektor pg1d105 obsahujúci verziu pretvarovaného ľudského ťažkého reťazca a cicavčí expresný vektor pKN100 obsahujúci verziu pretvarovaného ľudského ľahkého reťazca sa testovali v COS bunkách z hľadiska prechodnej expresie F19 protilátok. COS7 bunky s rutinne pasážovali v DMEM (Gibco BRL, č. kat. 41966) s obsahom penicilínu (50 IU/ml), streptomycínu (50 µg/ml), L-glutamínu a 10% teplom inaktivovaného fetálneho hovädzieho séra bez gama globulínu (FCS, Harlan Sera-Lab č. kat. D0001). DNA sa zaviedla do COS buniek elektroporáciou použitím Gene Pulsar aparatury (BioRad). DNA (10 µg z každého vektora) sa pridala k 0,8ml alikvot 1x10⁷ buniek/ml vo fosfátom tlmenom fyziologickom roztoku (PBS, bez Ca²⁺ a Mg²⁺). Dodal sa pulz s hodnotou 1900 voltov, a kapacitou 25 µF. Po 10 minútovej zotavovacej perióde pri teplote okolia sa elektroporované bunky pridali do 8 ml DMEM s obsahom 5% FCS. Po 72 hodinách inkubovania pri 37 °C sa médium zhromaždilo, centrifugovalo, aby sa odstránili bunkové zvyšky, a uskladnilo sa v sterilných podmienkach pri 4 °C na krátky čas alebo pri -20 °C na dlhší čas.

ELISA spôsob na meranie koncentrácií zostavenej IgG1/kapa protilátky v supernatantoch COS buniek

Vzorky protilátok produkovaných v transfekovaných COS bunkách sa testovali prostredníctvom ELISA, aby sa stanovilo koľko chimérnej alebo pretvarovanej ľudskej protilátky sa produkovalo. Na detekciu protilátky sa platne pokryli kozou anti-ľudskou IgG (špecifickou voči Fcγ fragmentu) protilátkou (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., č. 109-005-098). Vzorky z COS buniek sa sériovo nariedili a pridali sa do každej jamky. Po hodinovom inkubovaní pri 37 °C a premytí sa pridal s chrenovou peroxidázou konjugovaný kozí anti-ľudský kapa ľahký reťazec (Sigma, A-7164). Po 30 minútovom inkubovaní pri 37 °C a premytí sa pridal K-blue substrát (zmes 3,3',5,5'-tetrametylbenzidínu a hydrogénperoxidu, Bionostics Limited, č. KB175) na 30 minút pri laboratórnej teplote. Reakcia sa zastavila použitím Red Stop roztoku (Bionostics Limited, č. RS20) a odčítala sa optická

hustota na mikroplatňovom snímači pri 650 nm. Ako štandard sa použila purifikovaná ľudská IgG1/kapa protilátka (Sigma, I-3889) so známou koncentráciou.

Expresia chimérnej F19 protilátky v COS bunkách bola slabá (tabuľka 2), medzi 10 a 60 ng/ml, čo je najmenej 10 krát menej ako pri väčšine protilátok.

Ako pokus zvýšiť expresné hladiny chimérnej F19 protilátky sa zmenila vedúca sekvencia F19V_L oblasti substitúciou leucínu na prolín v polohe -9. Táto zmena jedinej aminokyseliny vo vedúcej sekvencii viedla k najmenej zdvojnásobeniu množstva chimérnej protilátky produkovanej v COS bunkách.

Výsledky bunkovej väzby ukazujú, že chimérna F19 sa viaže špecificky, a s predpokladanou aviditou na FAP cieľ.

Tabuľka 2

Koncentrácie chimérnej F19 protilátky v COS bunkových supernatantoch (sú to výsledky troch nezávislých transfekcií)

Transfekované zložky protilátky		ľudská γ 1/K
Ťažký reťazec	Kapa ľahký reťazec	[μ g/ml]
cF19	cF19 (cF19 vedúca sekvencia)	0,060
cF19	cF19 (cF19 mutovaná vedúca sekvencia)	0,212
cF19	cF19 (cF19 vedúca sekvencia)	0,056
cF19	cF19 (cF19 mutovaná vedúca sekvencia)	0,108
cF19	cF19 (cF19 vedúca sekvencia)	0,011
cF19	cF19 (cF19 mutovaná vedúca sekvencia)	0,087

Príklad 3

Konštrukcia A verzie pretvarovaného ľudského F19 ľahkého reťazca na C(L_A-L_B)

Konštrukcia prvej verzie pretvarovanej ľudskej F19V_L oblasti (L_A) sa uskutočňovala použitím prekrývajúcich sa PCR fragmentov spôsobom podobným metóde opísanej v Daugherty B. L., DeMartino J. A., Law M. F., Kawka D. W.,

Singer I. I. a Mark G. E. (1991) Polymerase chain reaction (PCR) facilitates the cloning, CDR-grafting, and rapid expression of a murine monoclonal antibody directed against the CD18 component of leukocyte integrins. Nucl. Acids Res. 19: 2471. Syntetizovalo sa desať oligonukleotidov, ktoré pozostávali z piatich párov primerov, APCR1-vla1, vla2-vla3, vla4-vla5, vla6-vla7 a vla8-APCR4 (tabuľka 3 a obrázok 28). Priľahlé páry mali prekrywajúce sa sekvencie s dĺžkou najmenej 21 báz (obrázok 28). APCR1 a APCR4 hybridizovali s ohraničujúcimi sekvenciami pUC19 vektora. Mutagénne primery sa navrhli tak, aby ich 5' koniec nasledoval hneď za kolísavou polohou kodónu. Táto stratégia sa použila preto, aby sa zabránilo zbytočnému pridaniu jedného nukleotidu na 3' koniec vlákna komplementárneho s mutagénnym primerom DNA polymerázou počas PCR (Sharrocks A. D. a Shaw P. E. (1992) Improved primer design for PCR-based, site-directed mutagenesis. Nucl. Acids Res. 20: 1147). Vhodný pár primerov (0,2 μ M z každého) sa kombinoval s 10 ng cDNA pre "B" verziu pretvarovanej ľudskej L25V_L oblasti a 1 jednotkou AmpliTaq (Perkin Elmer Cetus) DNA polymerázy v 50 μ l PCR tlmivého roztoku obsahujúceho 10mM Tris-HCl (pH 8,3), 50mM KCl, 200 μ M dNTPs a 1,5mM MgCl₂. Toto sa prekrylo minerálnym olejom a PCR sa uskutočňovala v 25 cykloch, pričom každý cyklus pozostával s denaturačného kroku v trvaní 1 minúty pri 94 °C, kroku anelovania primeru v trvaní 1 minúty pri 55 °C a predlžovacieho kroku v trvaní 2 minút pri 72 °C. Potom nasledoval jeden cyklus pozostávajúci z ďalšieho elongačného kroku v trvaní 10 minút pri 72 °C a nasledovalo ochladenie na 4 °C. Časový rozdiel medzi krokom anelácie primerov a predlžovacím krokom bol 2,5 minúty. PCR produkty piatich reakcií (A, B, C, D a E) sa potom purifikovali gélovou elektroforézou a nasledovala DNA elúcia použitím Wizard PCR preps (Promega). PCR produkty A, B, C, D a E sa zostavili prostredníctvom ich vzájomnej komplementarity. V druhej sade PCR reakcií sa PCR produkty B a C, a D a E (50 ng z každého) pridali do 50 μ l PCR reakčných zmesí (ako boli opísané vyššie), z ktorých každá obsahovala 1 jednotku AmpliTaq (Perkin Elmer Cetus) DNA polymerázy. Uskutočnilo sa 20 reakčných cyklov, ktoré boli opísané vyššie s tou výnimkou, že anelačná teplota sa zvýšila na 60 °C. V tretej sade PCR reakcií sa

PCR produkty F a G PCR amplifikovali použitím 1 μ l z každej predchádzajúcej PCR reakčnej zmesi a príslušného páru PCR primerov (vla2-vla5 alebo vla6-APCR4). PCR reakčné zmesi obsahovali 1 jednotku AmpliTaq DNA polymerázy v 50 μ l PCR reakčnej zmesi (ako bola opísaná vyššie) a amplifikovali sa 25 cyklov ako v prvom štádiu. V štvrtej sade PCR reakcií s prostredníctvom PCR amplifikoval PCR produkt H použitím 1 μ l každej z predchádzajúcich PCR reakčných zmesí a vla2-APCR4 páru PCR primerov. Nakoniec sa PCR produkty A a H zostavili prostredníctvom ich vzájomnej komplementarity v dvoj krokovej PCR reakcii podobnej s reakciou opísanou vyššie použitím RSP a UP ako terminálnych primerov. Kompletne zostavený fragment predstavujúci celú pretvarovanú F19V_L oblasť vrátane vedúcej sekvencie sa poštípil s *HindIII* a *BamHI* a klonoval sa do pUC19, za účelom sekvenovania. Klon so správnou DNA sekvenciou sa označil reshF19La (obrázok 29) a potom sa subklonoval do eukaryotického expresného vektora pKN100. DNA sekvencia reshF19La klonovaného do pKN100 je znázornená na obrázku 30.

Druhá verzia pretvarovanej F19V_L oblasti (L_B) sa skonštruovala použitím rovnakej schémy ako bola opísaná pre L_A, ale vla4 a vla7 primery boli nahradené primermi vlb4 a vlb7 (tabuľka 3). DNA sekvencia L_B je znázornená na obrázku 29.

Tretia verzia pretvarovanej ľudskej F19V_L oblasti (L_C) sa skonštruovala použitím QuikChange™ miestne špecifického mutagenizačného kitu od Stratagene. QuikChange miestne špecifický spôsob mutovania sa uskutočňoval podľa inštrukcií výrobcu, použitím reshF19La v pKN100 vektore ako dvojvláknového DNA templátu. V súlade s inštrukciami výrobcu sa navrhli mutagenické oligonuklotidové primery F19Lc-sense a F19Lc-antisense (tabuľka 3) na použité v tomto postupe. Stručne, oba mutačné primery obsahovali požadované miesto mutácie (kodón TTT v Kabat polohe 49 (Phe) sa zamenil na TAT, ktorý kóduje Tyr) a anelovali na rovnakú sekvenciu na opačných vláknach L_A v pKN100 vektore. Miesto mutácie bolo overené DNA sekvenovaním celej V_L oblasti. DNA sekvencia L_C je znázornená na obrázku 29. Aby sa eliminovala možnosť náhodných mutácií v pKN100 počas PCR reakcie, V_L oblasť sa vyštíčila z pKN100 vektora ako *HindIII/BamHI* fragment a

znovu sa subklonovala do nemodifikovaného pKN100 vektora, ktorý bol predtým poštiepený rovnakými restriktčnými enzýmami.

Tabuľka 3

PCR primery na konštrukciu variabilných oblastí pretvarovaného ľudského F19 ľahkého reťazca

1. Primery na syntézu "A" verzie

F19vla1 (36mér)

5' GTCATCACAATGTCTCCGGAGGAACCTGGAACCCAG 3'

F19vla2 (29mér)

5' CTCCGGAGACATTGTGATGACCCAATCTC 3'

F19vla3 (45mér)

5'GAATATAAAAGGCTCTGACTGGACTTGGACTTGCAAGTTGATGGTGGCCCTC 3'

F19vla4 (72mér)

5'CAGTCAGAGCCTTTTATATTCTAGAAATCAAAGAACTACTTGGCCTGGTATC
AGCAGAAACCAGGACAGCC 3'

F19vla5 (44mér)

5' ACCCCAGATTCCCTAGTGCTAGCCCCAAAAGATGAGGAGTTTGGG 3'

F19vla6 (67mér)

5'TAGCACTAGGGAATCTGGGGTACCTGATAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTTTGG
GACAGACTTCACCCTC 3'

F19vla7 (53mér)

5'GTCCCTTGTCCGAACGTGAGGCGGATAAGCTAAAATATTGCTGACAGTAATA
AAC 3'

F19vIa8 (33mér)

5' GCTCACGTTCCGGACAAGGGACCAAGGTGGAAAT 3'

2. Primery na syntézu "B" verzie

F19vIb4 (72mér)

5'CAGTCAGAGCCTTTTATATTCTAGAAATCAAAGAACTACTTGGCCTGGTTCC
AGCAGAAACCAGGACAGCC 3'

F19vIb7 (57mér)

5'GTCCCTTGTCCGAACGTGAGCGGATAGCTAAAATATTGCTGACAGTCATAAA
CTGCC 3'

3. Primery na syntézu "C" verzie

F19Lc-sense (34mér)

5' CCCAAACTCCTCATCTATTGGGCTAGCACTAGGG 3'

F19Lc-antisense (34-mér)

5' CCCTAGTGCTAGCCCAATAGATGAGGAGTTTGGG 3'

4. Primery hybridizujúce s ohraničujúcimi sekvenciami pUC19 vektora

APCR1 (17mér, sense primer): 5' TACGCAAACCGCCTCTC 3'

APCR4 (18mér, anti-sense primer): 5' GAGTGCACCATATGCGGT 3'

RSP (-24) (16mér, sense primer): 5' AACAGCTATGACCATG 3'

UP (-40) (17mér, anti-sense primer): 5' GTTTTCCCAGTCACGAC 3'

Príklad 4

Konštrukcia A až E (H_A - H_E) verzií pretvarovaného ľudského F19 ťažkého reťazca

"A" verzia pretvarovaných oblastí ľudského F19 V_H (H_A) sa skonštruovala použitím rovnakých PCR metód ako boli opísané pre konštrukciu "A" verzie pretvarovanej ľudskej F19 V_L oblasti (L_A) (obrázok 31). Templátovou DNA bola "A"

verzia ľudského 226 V_H (Léger O. J. P., Yednock T. A., Tanner L., Horner H. C., Hines D. K., Keen S., Saldanha J., Jones T., Fritz L. C. a Bendig M. M. (1997). Humanization of a mouse antibody against human alpha-4 integrin: a potential therapeutic for the treatment of multiple sclerosis. Hum. Antibod. 8: 3). Navrhlo a syntetizovalo sa šesť PCR primerov na konštrukciu "A" verzie pretvarovanej ľudskej F19 V_H oblasti (tabuľka 4). PCR produkty A, B, C a D sa získali použitím APCR1-Vha1, Vha2-Vha3, Vha4-Vha5 a Vha6-APCR4 párov PCR primerov. PCR podmienky boli v podstate rovnaké ako bolo opísané pri konštrukcii pretvarovanej ľudskej F19 V_L oblasti. Klon majúci správnu DNA sekvenciu sa označil ako reshF19Ha (obrázok 32) a potom sa táto sekvencia subklonovala do eukaryotického expresného vektora pG1D105. DNA sekvencia reshF19Ha klonovaná v pG1D105 je znázornená na obrázku 33.

Tretia verzia pretvarovanej ľudskej F19 V_H oblasti (H_C) sa skonštruovala použitím rovnakej schémy ako bola opísaná pre H_A, ale Vha4 primer bol nahradený primerom Vhc4 (tabuľka 4). DNA sekvencia H_C je znázornená na obrázku 32. Druhá (H_B) a štvrtá (H_D) verzia pretvarovanej ľudskej F19 V_H oblasti sa skonštruovali na základe PCR-mutagenizačných metód podľa Kamman a ďalší (Kamman M., Laufs J., Schell J. a Gronenborn B. (1989) Rapid insertional mutagenesis of DNA by polymerase chain reaction (PCR). Nucl. Acids Res. 17: 5404). Na konštrukciu H_B a H_D sa použili v PCR reakciách mutačné primery F19VHbd6 (Tyr-91 až Phe-91, tabuľka 4) spolu s APCR4, pričom ako templátová DNA sa použili H_A, respektíve H_C. PCR produkty Vhb a Vhd sa poštípili restriktónymi enzýmami *Pst*I a *Bam*HI a subklonovali sa do reshF19Ha a reshF19Hc, ktoré sa predtým poštípili rovnakými restriktónymi enzýmami. DNA sekvencie H_B a H_D sú znázornené na obrázku 32.

"E" verzia pretvarovanej ľudskej F19 V_H oblasti (H_E) sa skonštruovala na základe PCR-mutagenizačných metód podľa Kamman a ďalší (1989), ktoré už boli uvedené vyššie:

Pre reshF19He sa použil mutagenizačný primer F19MscIHe (tabuľka 5) v páre s primerom F19VHHindIII (tabuľka 5) v PCR reakciách, pričom templátovou DNA bol H_C klonovaný v pg1d105 cicavčom expresnom vektore. Príslušný pár primerov (0,2 μM z každého) sa skombinoval z 10 ng cDNA "A" verzie

pretvarovanej ľudskej 226 V_H oblasti v 100 µl PCR tlmivom roztoku obsahujúcom 10mM KCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 20mM Tris-HCl (pH 8,8), 2mM MgSO₄, 0,1% Triton X-100 a 200µM dNTPs. Reakčné zmesi sa preliali minerálnym olejom a nechali sa pri 94 °C 5 minút. Potom sa pridala 1 jednotka Deep Vent DNA polymerázy (New England Biolabs) ("Hot Start" PCR; Chou Q, Russell M., Birch D., Raymond J. a Bloch W. (1992) Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. Nucl. Acids Res. 20: 1717) a PCR sa uskutočňovala v 25 cykloch na TRIO-Thermoblock termálnom cykleri (Biometra, Göttingen, Nemecko). Každý cyklus pozostával z denaturačného kroku pri 94 °C v trvaní 1 minúty, z kroku anelovania primerov pri 70 °C v trvaní 1 minúty a predlžovacieho kroku pri 72 °C v trvaní 2 minút. Nasledoval jediný cyklus pozostávajúci z ďalšieho elongačného kroku pri 72 °C v trvaní 10 minút a nasledovalo ochladenie na 4 °C. PCR produkty sa potom extrahovali a purifikovali z TAE 1,4% štandardného agarózového gélu použitím QIAquickTM gélového extrakčného kitu podľa protokolu dodaného výrobcom (QIAGEN Ltd., UK). PCR produkt V_He sa potom poštíepil restriknými enzýmami *MscI* a *HindIII* a ligoval sa do reshF19Hc klonovaného v pg1d105, ktorý sa predtým poštíepil rovnakými restriknými enzýmami. *MscI* restrikné rozoznávacie miesto je len jedno vo všetkých verziách pretvarovanej ľudskej F19 V_H oblasti a nenachádza sa v pg1d105 expresnom vektore. V pg1d105 sa nachádza len jedno restrikné miesto rozoznávané *HindIII* na klonovanie V_H imunoglobulínových génov. Na elektroporáciu kompetentné XL-1 Blue *E. coli* bunky sa transformovali s 1 µl ligovanej DNA a vysiali sa na agarózové platne obsahujúce ampicilín. Kolónie sa potom skrínovali s hľadiska prítomnosti správnych inzertov prostredníctvom priamej PCR kolónií (Güssow D. a Clackson T. (1989) Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction. Nucl. Acids Res. 17: 4000) s primermi HCMi a Hucy1 hybridizujúcimi s ohraničujúcim rekvenciami pg1d105 vektora (tabuľka 5). DNA z pozitívnych kolónií sa pripravila použitím Plasmid Midi kitu podľa protokolu dodaného výrobcom (QIAGEN Ltd., UK). DNA sekvenovanie sa uskutočňovalo dideoxy reťazcovým terminačným spôsobom (Sanger F., Nicklen S.

a Coulson A. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463) priamo z kruhovej vektorovej DNA použitím bežnej denaturácie teplom (Andersen A., Pettersson A. a Kieldsen T. (1992) A fast and simple technique for sequencing plasmid DNA with sequenase using heat denaturation. Biotechniques 13: 678) a sekvenázy 2.0 (USB, Cleveland, OH). DNA sekvencia reshF19He je znázornená na obrázku 32.

Tabuľka 4

PCR primery na konštrukciu A až D verzií pretvarovaných variabilných oblastí ľudského F19 ťažkého reťazca

1. Primery na syntézu "A" verzie

F19vha1 (47mér)

5' GTGTATTCAAGTGAAGGTGTATCTACTAGTTTTACAGCTGACTTTTCAC 3'

F19vha2 (53mér)

5'TAGTAGATACACCTTCACTGAAGACACCATACACTGGGTTAGACAGGCCCT
G 3'

F19vha3 (71mér)

5'CCCTTGAAGTTCTGGTTGTAGTTAGGAATACCATTGTTAGGATTAATACCTCC
TATCCACTCCAGCCTTTG 3'

F19vha4 (71mér)

5'TAACTACAACCAGAAGTTCAAGGGCCGGGCCACCTTGACCGTAGGCAAGTCT
GCCAGCACCGCCTACATGG 3'

F19vha5 (63mér)

5'GCATGGCCCTCGTCGTAACCATAGGCGATTCTTCTTCTGGCGCAGTAGTAGA
CTGCAGTGTCC 3'

F19vha6 (48mér)

5'CTATGGTTACGACGAGGGCCATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAAC 3'

2. Primery na syntézu "C" verzie

F19vhc (71mér)

5'TAACTACAACCAGAAGTTCAAGGGCCGGGTCAACCATCACCGTAGACACCTCT
GCCAGCACCGCCTACATGG 3'

3. Primery na syntézu verzií "B" a "C"

F19vhbd6 (27mér)

5' GGACACTGCAGTCTACTTCTGCGCCAG 3'

4. Primery hybridizujúce s ohraničujúcimi sekvenciami pUC19 vektora

APCR1 (17mér, sense primer) 5' TACGCAAACCGCCTCTC 3'

APCR4 (18mér, anti-sense primer) 5' GAGTGCACCATATGCGGT 3'

Tabuľka 5

PCR primery na konštrukciu E verzie pretvarovaných variabilných oblastí ľudského
F19 ťažkého reťazca

1. Primer na syntézu "E" verzie

F19MscIHe (65mér, anti-sense)

5'CCTTTTGGCCAGGGGCCTGTCTAACCCAGTGTATGGTGTATTCAGTGAAGGTG
TATC

MscI

CACTAGTTTCCACTAGTTT 3'

2. Primery hybridizujúce s ohraničujúcimi sekvenciami pg1d105 cicavčieho expres-
ného vektora

HCMi (28mér, sense) 5'GTCACCGTCCTTGACACGCGTCTCGGGA 3'

Hucy1 (17mér, anti-sense) 5' TTGGAGGAGGGTGCCAG 3'

Príklad 5

Koncentrácie pretvarovanej ľudskej F19 protilátky v supernatantoch COS buniek

COS bunky sa transfekovali jedným párom série pretvarovaných ľudských F19 protilátkových konštruktov a merala sa koncentrácia ľudskej protilátky použitím IgG1/kapa ELISA, ako bolo opísané v príklade 2.

Tabuľka 6

Koncentrácie pretvarovanej ľudskej F19 protilátky v supernatantoch COS buniek

Transfekované protilátkové zložky		Ľudská γ 1/K
Ťažký reťazec	Kapa ľahký reťazec	Koncentrácia [μ g/ml]
H _A	L _A	2,5
H _A	L _B	0,18
H _B	L _A	1,25
H _B	L _B	0,10
H _D	L _A	1,15
H _D	L _B	0,18
H _A	L _A	1,50
H _A	L _C	1,56
H _C	L _A	1,47
H _C	L _C	1,97
cF19	L _A	1,54
cF19	L _B	0,07
cF19	L _C	2,14

Tabuľka 7

Koncentrácie pretvarovanej ľudskej F19 protilátky v supernatantoch COS buniek

Transfekované protilátkové zložky		Ľudská $\gamma 1/K$
Ťažký reťazec	Kľahký reťazec	Koncentrácia [$\mu\text{g/ml}$]
H _A	L _A	2,00
H _A	L _C	2,50
H _C	L _A	2,90
H _C	L _C	3,00
H _E	L _A	2,80
H _E	L _C	3,50

RNA zostrih je nevyhnutný na expresiu imunoglobulínových génov v cicavčích bunkách

Oba cicavčie expresné vektory pKN100 a pg1d105 majú intrón medzi variabilnou a konštantnou oblasťou, ktorý sa odstraňuje počas procesu génovej exprese, kedy vzniká mRNA. Zostrihový dej, ktorý pozostáva z DNA rekombinácie medzi zostrihovými donorovými miestami ťažkého a ľahkého reťazca a imunoglobulínovým zostrihovým akceptorovým miestom, je znázornený na obrázku 34.

Príklad 6

Prietoková cytometrická analýza väzby cF19 a L_AH_C na ľudské bunky exprimujúce FAP

Testovala sa schopnosť L_AH_C viazať sa tak na rekombinantný, ako aj na endogénne exprimovaný FAP na bunkovom povrchu.

Uskutočňoval sa experiment na stanovenie väzby L_AH_C na bunkový FAP. Ako bunkový cieľ sa použili tak ľudské MF-SH nádorové bunky, ktoré prirodzene exprimujú FAP (Shirasuma, K. a ďalší, Cancer 1985, 55:2521-32), ako aj ľudské

nádorové bunkové línie transfekované s FAP. L_AH_C sa študoval cytofluorometrickými testami stanovujúcimi priamu väzbu na cieľové bunky, ako aj prostredníctvom inhibičného účinku buď hľodavčej F19 protilátky, alebo chimérnej cF19 anti-FAP protilátky, na väzbu.

Použitými protilátkami a bunkovými líniami boli F19 (hľodavčia monoklonálna anti-humánna FAP protilátka, IgG1 podtrieda), mlgG (hľodavčí imunoglobulín, IgG trieda), cF19 (chimérna monoklonálna anti-humánna FAP protilátka, IgG1 podtrieda), L_AH_C (pretvarovaná anti-humánna FAP protilátka IgG1 podtrieda), hlgG1 (ľudský imunoglobulín, IgG1 podtrieda), MF-SH (bunková línia ľudských malígnych vláknitých histiocytoov), HT-1080 (ľudská fibrosarkómová bunková línia), HT-1080FAP klon 33 (HT-1080 bunková línia transfekovaná cDNA kódujúcou ľudský FAP). Protilátky boli biotinylované, ako je opísané v príkladoch 8 a 12.

Priama väzba L_AH_C na FAP na povrchu ľudských nádorových bunkových línii

5×10^5 buniek skúmanej nádorovej bunkovej línie sa inkubovalo s uvedenou koncentráciou testovanej alebo kontrolnej protilátky v celkovom objeme 0,2 ml fosfátom tlmeného fyziologickom roztoku (PBS), ktorý bol doplnený 1% hovädzím sérovým albumínom (BSA), 30 minút na ľade. Následne sa bunky dva krát premyli s 2 ml PBS, resuspendovali sa v 0,2 ml PBS, do ktorého sa doplnilo 1% BSA, pridal sa myši anti-ľudský IgG FITC-značený (Dianova) ako sekundárne reakčné činidlo v riedení 1:20, a inkubovanie prebiehalo ďalších 30 minút na ľade.

Alternatívne sa 5×10^5 buniek skúmanej nádorovej bunkovej línie inkubovalo s uvedenou koncentráciou biotínom značenej cF19 v celkovom objeme 0,2 ml PBS, ktorý bol doplnený 1% BSA, 30 minút na ľade. Následne sa bunky dva krát premyli s 2 ml PBS, resuspendovali sa v 0,2 ml PBS, do ktorého sa doplnilo 1% BSA, a inkubovali sa ďalších 30 minút na ľade so streptavidín-FITC (Dianova) ako sekundárnym činidlom v riedení 1:40.

Bunky sa znova dvakrát premyli s 2 ml PBS, resuspendovali sa v celkovom objeme 0,5 ml PBS doplnenom s 1% paraformaldehydrom (PFA) a udržiavali sa na ľade. Fluorescencia jednej bunky sa determinovala cytofluorometricky analýzou

bunkovej zelenej fluorescencie pri 488 nm v EPICS XL (Coulter) fluorescenčne aktivovanom bunkovom analyzátore.

Kompetícia L_AH_C pri väzbe biotinylovanej cF19 na bunkový povrchový FAP na ľudských bunkových líniách exprimujúcich FAP

5×10^5 buniek skúmanej nádorovej bunkovej línie sa inkubovalo s uvedenými množstvami neznačenej testovanej alebo kontrolnej protilátky, ktorá sa pridala spolu s 1 $\mu\text{g/ml}$ biotínom značenej cF19 protilátky. Následne sa bunky dva krát premyli s 2 ml PBS, resuspendovali sa v 0,2 ml PBS, do ktorého sa doplnilo 1% BSA, a inkubovali sa ďalších 30 minút na ľade so streptavidín-FITC (Dianova) ako sekundárnym činidlom v riedení 1:40.

Bunky sa potom dvakrát premyli s 2 ml PBS, resuspendovali sa v celkovom objeme 0,5 ml PBS doplnenom s 1% PFA a udržiavali sa na ľade. Fluorescencia jednej bunky sa determinovala cytofluorometricky analýzou bunkovej zelenej fluorescencie pri 488 nm v EPICS XL (Coulter) fluorescenčne aktivovanom bunkovom analyzátore.

Tak cF19, ako aj L_AH_C sa viažu na koncentrácii závislým spôsobom špecificky na FAP-transfekovaný HT-1080FAP klon 33 ľudské nádorové bunky (tabuľka 8). Nedetegovala sa žiadna väzba na FAP-negatívne HT-1080 bunky (tabuľka 9). Tak cF19, ako aj LAHC sa viazali na koncentrácii závislým spôsobom na ľudské MF-SH bunky, ktoré endogénne exprimujú FAP (tabuľka 10).

Biotinylovaná cF19 sa viaže na ľudský HT-1080FAP klon 33 (tabuľka 11) na koncentrácii závislým spôsobom. Žiadna väzba sa nedetegovala na FAP-negatívne HT-1080 bunky (tabuľka 12).

Väzba biotinylovanej cF19 na ľudský HT-1080FAP klon 33 bola inhibovaná tak neznačenou cF19, ako aj neznačenou L_AH_C (tabuľka 13).

Ukázalo sa, že chimérna anti-ľudská FAP monoklonálna protilátka cF19, ako aj pretvarovaná ľudská anti-humánna FAP monoklonálna protilátka L_AH_C (príklad 10) sa priamo viaže na FAP, ktorý je exprimovaný na ľudských bunkových líniách buď endogénne exprimujúcich tento proteín, alebo transfekovaných s cDNA, ktorá ho kóduje. Ukázalo sa, že táto väzba je závislá na koncentrácii. Väzba

biotinylovanej cF19 sa mohla inhibovať tak neznačenou cF19, ako aj neznačenou L_AH_C .

Použitím cytofluorometrickej technológie priama väzba, ako aj inhibícia špecificky sa viažucich reakčných činidiel vykazala špecificitu chimérnej cF19 protilátky a pretvrdzovanej L_AH_C ľudskej monoklonálnej protilátky voči na bunkovom povrchu exprimovanému FAP.

Tabuľka 8

Väzba anti-FAP protilátok na bunky HT-1080FAP klonu 33

Koncentrácia protilátky	Priemerná intenzita fluorescencie		
[ng/ml]	hlgG1	cF19	L_AH_C
500,0	0,12	6,65	2,76
100,0	0,12	1,63	0,66
20,0	0,12	0,43	0,22
4,0	0,12	0,17	0,15
0,8	0,12	0,14	0,13

Tabuľka 9

Väzba anti-FAP protilátok na netransfekované bunky HT-1080

Koncentrácia protilátky	Priemerná intenzita fluorescencie		
[ng/ml]	hlgG1	cF19	L_AH_C
500,0	0,11	0,11	0,12
100,0	0,11	0,11	0,11
20,0	0,11	0,11	0,12
4,0	0,11	0,11	0,12
0,8	0,11	0,11	0,11

Tabuľka 10

Väzba anti-FAP protilátok na MF-SH bunky

Koncentrácia protilátky [ng/ml]	Priemerná intenzita fluorescencie		
	hlgG1	cF19	L _A H _C
4000	0,6	3,6	2,8
2000	n.d.	3,3	2,5
1000	n.d.	2,4	1,9
500	n.d.	1,8	1,3

n.d.: neuskutočnené

Tabuľka 11

Väzba biotinylovanej cF19 protilátky na bunky HT-1080FAP klonu 33

Koncentrácia protilátky [ng/ml]	Priemerná intenzita fluorescencie	
	Biotinylovaná hlgG1	Biotinylovaná cF19
5000,0	0,2	36,5
1000,0	0,2	18,1
200,0	0,2	4,5
40,0	0,2	1,3
8,0	0,2	0,5
1,6	0,3	0,3

Tabuľka 12

Väzba biotinylovanej cF19 protilátky na netransfekované bunky HT-1080

Koncentrácia protilátky	Priemerná intenzita fluorescencie	
[ng/ml]	Biotinylovaná hlgG1	Biotinylovaná cF19
5000,0	0,1	0,1
1000,0	0,1	0,1
200,0	0,1	0,1
40,0	0,1	0,1
8,0	0,1	0,1
1,6	0,1	0,1

Tabuľka 13

Kompetícia anti-FAP protilátok s väzbou biotinylovanej cF19 na bunky HT-1080FAP klonu 33

Kompetičná protilátka č.	Koncentrácia kompetičnej protilátky [μg/ml]	Priemerná fluorescenčná koncentrácia
žiadna	0,00	11,2
hlgG1	1,00	9,0
hlgG1	3,16	11,3
hlgG1	10,00	9,8
hlgG1	31,66	10,3
cF19	1,00	7,5
cF19	3,16	4,8
cF19	10,00	1,3
cF19	31,66	1,2
L _A H _C	1,00	8,0
L _A H _C	3,16	5,5
L _A H _C	10,00	2,9
L _A H _C	31,66	1,7

Vo všetkých testoch znázornených v tabuľke 13 bola biotinylovaná cF19 použitá v koncentrácii 1 µg/ml.

Príklad 7

In vitro imunitné efektorové funkcie monoklonálnej protilátky L_AH_C

Tento experiment sa uskutočňoval na stanovenie potenciálu monoklonálnej protilátky (mAb) L_AH_C so špecificitou voči fibroblastovému aktivačnému antigénu (FAP) lyzovať FAP-exprimujúce ciele v prítomnosti ľudského komplementu alebo ľudských mononukleárných leukocytov.

Študovala sa najmä schopnosť L_AH_C sprostredkovať cytotoxické účinky voči bunkám HT-1080FAP klonu 33, ktoré na svojom povrchu exprimujú ľudský FAP. Cytotoxicita sa stanovovala *in vitro* použitím nasledujúceho postupu: ⁵¹Cr-značené cieľové bunky sa inkubovali v prítomnosti L_AH_C s ľudským sérom ako zdrojom komplementu alebo s ľudskými MNC (periférnych krvných mononukleárných buniek) ako efektormi. Ako miera lýzy cieľových buniek sa meralo vylučovanie ⁵¹Cr.

Použitými protilátkami a bunkovými líniami boli L_AH_C (pretvarovaná ľudská anti-ľudská FAP IgG1 protilátka), hlgG1 (kontrola ľudského IgG1 izotypu), 3S193 (hlodavčia monoklonálna anti-Lewis^x IgG3 protilátka), mlgG (hlodavčia IgG kontrola), HT-1080 (ľudský fibrosarkóm), HT-1080FAP klon 33 (HT1080 transfekovaný s cDNA kódujúcou ľudský FAP), MCF-7 (ľudská adenokarcinómová bunková línia).

Lýza cieľových buniek prostredníctvom L_AH_C sprostredkovaná komplementom

Nádorové bunky sa rádioaktívne značili inkubovaním v RPMI1640 médiu so 100 µCi ⁵¹Cr(NEN) pri 37 °C jednu hodinu. Následne sa bunky dva krát premyli s médiom bez ⁵¹Cr a resuspendovali sa na koncentráciu 2x10⁵ buniek na ml.

Ľudské sérum ako zdroj komplementu sa čerstvo pripravilo z krvi rôznych dobrovoľníkov. Krv sa odobrala vpichom do ramennej žily, nechala sa pri laboratórnej teplote jednu hodinu, čím sa umožnilo uskutočnenie zrážania, a cez

noc sa udržiavala pri 4 °C. Sérum sa separovalo centrifugáciou a oddelilo sa od sedimentu.

Študovaná protilátka sa nariedila zo zásobného roztoku na príslušnú koncentráciu v RPMI1640 bunkovom kultivačnom médiu.

1×10^5 rádioaktívne značených nádorových buniek uvedenej bunkovej línie sa inkubovalo 2 hodiny pri 37 °C v inkubátore (95 % vzduchu a 5 % CO₂) v prítomnosti rôznych koncentrácií testovanej alebo kontrolnej protilátky a 25% (v/v) ľudského séra ako zdroja ľudského komplementu. Inkubácie sa uskutočňovali v platničkách s 96 jamkami v tvare U v celkovom objeme 200 µl RPMI1640 a uskutočňovali sa trojmo. Po inkubačnej dobe sa platne centrifugovali, 100 µl supernatátu sa odstránilo a rádioaktivita sa snímala v gama snímači. Celkové množstvo zabudovanej rádioaktivity sa determinovalo meraním 10^4 cieľových buniek. Spontánne uvoľňovanie bolo definované ako aktivita uvoľnená z cieľových buniek bez prítomnosti tak protilátky, ako aj komplementu, počas opísanej inkubačnej doby.

Špecifická lýza sa vypočítala nasledovne:

$$\text{špecifická lýza (v \%)} = \frac{(\text{aktivita vzorky}) - (\text{aktivita spontánneho uvoľnenia})}{(\text{max. aktivita}) - (\text{aktivita spontánneho uvoľnenia})} \times 100$$

Bunková cytotoxicita L_AH_C závislá na protilátke (ADCC)

Nádorové bunky sa rádioaktívne značili inkubovaním v RPMI1640 médiu so 100 µCi ⁵¹Cr pri 37 °C jednu hodinu. Následne sa bunky dva krát premyli s médiom bez ⁵¹Cr a resuspendovali sa na koncentráciu 2×10^5 buniek na ml.

MNC (periférne krvné mononukleárne bunky) sa pripravili z periférnej krvi odobranej z ramennej žily zdravých ľudských dobrovoľníkov. Zrážaniu sa zabránilo pridaním 20% citrátového tlmivého roztoku. MNC zo 4 ml tohto krvného prípravku sa purifikovali centrifugáciou (30 minút pri 400 g a laboratórnej teplote) v 3 ml

lymfocytového prípravného média (Boehringer Mannheim, Nemecko). MNC (periférne krvné mononukleárne bunky) sa odobrali z gradientu, tri krát sa premyli a narieslili sa s RPMI1640 na príslušnú koncentráciu. Lymfocytové aktivované zabíjačské (LAK) bunky sa odvodili z MNC (periférne krvné mononukleárne bunky) inkubovaní počas najmenej 5 dní pri 37 °C v inkubátore s 95% vzduchu a 5% CO₂ pri počiatočnej hustote 1,3x10⁶ buniek na ml v prítomnosti 100 U rekombinantného ľudského interleukínu-2 (IL-2). Študovaná protilátka sa narieslila zo zásobného roztoku na príslušnú koncentráciu v RPMI1640 bunkovom kultivačnom médiu.

1x10⁴ rádioaktívne značených nádorových buniek uvedenej bunkovej línie sa inkubovalo 5 hodín pri 37 °C a 5% CO₂ v prítomnosti rôznych koncentrácií testovanej a kontrolnej protilátky a MNC. MNC sa pridávali v takých množstvách, aby dosiahli uvedený pomer efektor:cieľová bunka. Inkubovanie sa uskutočňovalo v 96 jamkových platniach s U-tvarom v celkovom objeme 200 µl RPMI1640 a uskutočňovalo sa dvojmo.

Po inkubačnej dobe sa platne centrifugovali, 100 µl supernatátu sa odstránilo a rádioaktivita sa snímala v gama snímači. Celkové množstvo zabudovanej rádioaktivity sa determinovalo meraním 10⁴ cieľových buniek. Spontánne uvoľňovanie bolo definované ako aktivita uvoľnená z cieľových buniek bez prítomnosti tak protilátky, ako aj efektorových buniek, počas opísanej inkubačnej doby.

Špecifická lýza sa vypočítala nasledovne:

$$\text{špecifická lýza (v \%)} = \frac{(\text{aktivita vzorky}) - (\text{aktivita spontánneho uvoľnenia})}{(\text{max. aktivita}) - (\text{aktivita spontánneho uvoľnenia})} \times 100$$

Protilátkou sprostredkovaná komplementová lýza nádorových buniek

Nebola pozorovaná žiadna L_AH_C -špecifická komplementom sprostredkovaná lýza (vyššia ako lýza pozorovaná s izotypovou kontrolou) buniek HT-1080FAP klonu 33, ktoré boli ošetrované s L_AH_C v koncentrácii do 50 $\mu\text{g/ml}$ (tabuľka 14, tabuľka 15a).

Lytická aktivita ľudského séra použitého ako zdroj komplementu sa dokázala prostredníctvom lýzy MCF-7 ľudských prsníkových nádorových buniek v prítomnosti 12,5 $\mu\text{g/ml}$ 3S193, hlodavčej monoklonálnej anti-Lewis^x protilátky so známou schopnosťou aktivovať komplement (tabuľka 15b).

Protilátkou sprostredkovaná bunková lýza nádorových buniek

V prítomnosti L_AH_C v koncentráciách do 10 $\mu\text{g/ml}$ nebola detekovateľná žiadna ADCC (na protilátke závislá bunková toxicita) sprostredkovaná ľudskými MNC (tabuľka 16) alebo ľudskými LAK bunkami (lymfokínové aktivované zabíjačské bunky, tabuľka 17) prostredníctvom L_AH_C na HT-1080FAP klone 33 čo bolo merané prostredníctvom lýzy, ktorá by bola vyššia ako ADCC pre izotypovú kontrolu, pri pomere efektor:cieľ 50:1.

V príslušných *in vitro* testoch buď s ľudským komplementom, alebo s ľudskými MNC, ako efektorovými mechanizmami, sa neodhalili žiadne detekovateľné cytotoxické účinky ľudskej anti-FAP monoklonálnej protilátky L_AH_C na FAP-exprimujúcu nádorovú bunkovú líniu HT-1080FAP klonu 33, ktoré by boli vyššie ako izotypové kontroly.

Tabuľka 14

Špecifická komplementová lýza (v %) HT-1080FAP klonu 33 nádorových bunkových cieľov sprostredkovaná L_AH_C

Zdroj ľudského séra	HT-1080 klon 33:	
Koncentrácia protilátky	hIgG1 izotypová kontrola	L_AH_C
A 50 $\mu\text{g/ml}$	5	4
A 10 $\mu\text{g/ml}$	5	3

B 50 µg/ml	7	5
B 10 µg/ml	6	5
0 µg/ml	0	0

Inkubovanie: 2 hodiny pri 37 °C, 25% sérum z ľudských dobrovoľníkov A alebo B ako zdroj komplementu

Tabuľka 15a

Špecifická komplementová lýza (v %) HT-1080FAP klonu 33 nádorových bunkových cieľov sprostredkovaná ľudskou anti-FAP monoklonálnou protilátkou L_AH_C

Zdroj ľudského séra	HT-1080 klon 33:	
Koncentrácia protilátky	hlgG1	L _A H _C
A 10 µg/ml	2	1
A 2,50 µg/ml	2	2
A 0,60 µg/ml	1	1
A 0,15 µg/ml	1	2
A 0,00 µg/ml	2	2
B 10 µg/ml	2	2
B 2,50 µg/ml	2	2
B 0,60 µg/ml	2	2
B 0,15 µg/ml	2	2
B 0,00 µg/ml	2	2
C 10 µg/ml	2	2
C 2,50 µg/ml	1	1
C 0,60 µg/ml	1	1
C 0,15 µg/ml	2	1
C 0,00 µg/ml	3	3

Inkubovanie: 2 hodiny pri 37 °C, 25% sérum z ľudských dobrovoľníkov A, B alebo C ako zdroj komplementu

Tabuľka 15b

Špecifická komplementová lýza (v %) MCF-7 nádorových bunkových cieľov sprostredkovaná hlodavčou anti-Lewis^y monoklonálnou protilátkou 3S193

Zdroj ľudského séra	MCF-7:	
Koncentrácia protilátky	mlgG	3S193
A 10 µg/ml	0	21
A 2,50 µg/ml	1	21
A 0,60 µg/ml	0	21
A 0,15 µg/ml	1	18
A 0,00 µg/ml	0	0
B 10 µg/ml	1	13
B 2,50 µg/ml	0	17
B 0,60 µg/ml	1	18
B 0,15 µg/ml	1	15
B 0,00 µg/ml	0	0
C 10 µg/ml	1	22
C 2,50 µg/ml	0	23
C 0,60 µg/ml	1	26
C 0,15 µg/ml	1	20
C 0,00 µg/ml	1	1

Inkubovanie: 2 hodiny pri 37 °C, 25% sérum z ľudských dobrovoľníkov A, B alebo C ako zdroj komplementu

Tabuľka 16

ADCC (na protilátke závislá bunková cytotoxicita) (špecifická lýza v %) HT-1080FAP klon 33 cieľových buniek prostredníctvom MNC (periférne krvné mononukleárne bunky) sprostredkovaná L_AH_C

Koncentrácia protilátky	HT-1080FAP klon 33:	
$\mu\text{g/ml}$	hlgG1	L_AH_C
10000	2	2
2500	2	2
0,625	2	2
0,156	3	3
0,000	3	3

Inkubovanie: 5 hodín pri 37 °C, 10^4 cieľových buniek a pomer efektor:cieľová bunka 50:1

Tabuľka 17

ADCC (na protilátke závislá bunková cytotoxicita) (špecifická lýza v %) HT-1080FAP klon 33 cieľových buniek prostredníctvom LAK buniek (lymfokínové aktivované zabíjačské bunky) sprostredkovaná L_AH_C

Koncentrácia protilátky	HT-1080FAP klon 33:	
$\mu\text{g/ml}$	hlgG1	L_AH_C
10000	12	14
2500	14	17
0,625	14	21
0,156	15	21
0,000	14	14

Inkubovanie: 5 hodín pri 37 °C, 10^4 cieľových buniek a pomer efektor:cieľová bunka 50:1

Príklad 8

Imunohistochemická analýza väzby monoklonálnej protilátky L_AH_C na normálne a neoplastické ľudské tkanivá

Tento experiment sa uskutočňoval na determináciu väzobných charakteristík humanizovanej mAb L_AH_C pre normálne a neoplastické ľudské tkanivá.

Použili sa nasledujúce protilátky: L_AH_C , cF19 a negatívna kontrola hlgG1 sa priamo biotinylovali spôsobmi známymi v oblasti a použili sa koncentrácie 2,5 až 0,25 mg/ml v 2% BSA/PBS (hovädzí sérový albumín vo fosfátom tlmenom fyziologickom roztoku). Hlodavčia mAb F19 sa použila vo forme supernatátu tkanivovej kultúry F19 hybridómu, v riedeniach 1:5 až 1:10 v 2% BSA/PBS.

Na imunochemické testy boli použité nasledujúce reakčné činidlá: streptavidín-peroxidázový komplex (Vector Labs, Burlingame, CA, USA), avidín-biotín peroxidázový komplex (Vector Labs), biotinylovaná koňská anti-myšia protilátka (Vector Labs.), DAB (diaminobenzidín, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA), Harrisov hematoxylin.

Skúmané čerstvé mrazené tkanivové vzorky zahŕňali: normálne črevo, prsník, pľúca, žalúdok, pankreas, pokožka, larynx, močový mechúr, hladké a kostrové svaly. Medzi testované nádory boli zaradené karcinómy prsníka, čreva, pľúc, ezofágu, maternice, vaječníkov, pankreasu, žalúdka a hlavy a krku.

Nepriama imunoperoxidázová metóda sa uskutočňovala podľa spôsobov doterajšieho stavu techniky (Garin-Chesa P., Old L.J., Rettig W.J.: Cell surface glycoprotein of reactive stromal fibroblasts as a potential antibody target in human epithelial cancers. Proc Natl Acad Sci USA (1990) 87:7235-7239) na čerstvých mrazených rezoch s hrúbkou päť mikrometrov. DAB bol použitý ako substrát pre finálny reakčný produkt. Rezy boli kontrastne farbené Harrisovým hematoxylinom a skúmali sa z hľadiska expresie antigénu.

L_AH_C expresia v normálnych ľudských tkanivách

Testované normálne tkanivá neexprimovali L_AH_C s výnimkou pankreasu, v ktorom sa identifikovala podsada pozitívnych endokrinných buniek v Langerhansových ostrovčekoch (A bunky) s L_AH_C, cF19 a F19 (tabuľka 18). Nepozorovala sa žiadna imunoreaktivita s hlgG1 (ľudská imunoglobulínová IgG1 podtrieda), ktorý bol použitý ako negatívna kontrola.

L_AH_C expresia v nádoroch

V nádorových vzorkách vykazovali L_AH_C, cF19 a F19 nejasný vzor expresie v nádorových stromálnych fibroblastoch. Vo väčšine skúmaných prípadov sa zistila silná a homogénna expresia, najmä v testovaných nádorových vzorkách odvodených od prsníka, čreva, pľúc, pankreasu a v karcinómoch šupinových buniek (SQCC) hlavy a krku (tabuľka 19). Žiadna imunoreaktivita nebola pozorovaná s hlgG1, ktorý bol použitý ako negatívna kontrola.

L_AH_C, cF19 a F19 vykazovali imunoreaktivitu s nádorovými stromálnymi fibroblastami v testovaných epiteliálnych nádorových vzorkách. Žiadna L_AH_C alebo F19 imunoreaktivita nebola pozorovaná ani s fibrocytmi normálnych orgánových mezenchýmových, ani parenchýmových buniek normálnych dospelých orgánov. Anti-FAP imunoreaktivita bola pozorovaná len v podtriede endokrinných buniek v ostrovčekoch pankreasu, pravdepodobne v glukakón produkujúcich A bunkách, a v štyroch z deviatich testovaných vzoriek maternice, ktoré predstavovali podtriedu stromálnych fibroblastov v týchto tkanivách.

Imunohistochemické analýzy L_AH_C v normálnych ľudských tkanivách a v ľudských karcinómoch exprimujúcich FAP vykazovali nejasné vzory väzby pri L_AH_C, cF19 a hlodavčej mAb F19.

Tabuľka 18

Typ tkaniva	č.	BIBH 1	cF19	F19
Prsník - kanáliky/lalôčky pre epiteliálne bunky - myoepiteliálne bunky - spojovacie tkanivo - krvné cievy	4	- - - -	- - - -	- - - -
Črevo - Lieberkühnove krypty - spojovacie tkanivo - lymfoidné tkanivo - hladné svaly - krvné cievy - myenterický plexus	6	- - - - - -	- - - - - -	- - - - - -
Pľúca Bronchus: - bronchiálny epitel - hyalínová chrupavka - spojovacie tkanivo - mukózne žľazy Alveoly: - pneumocyty (typ I/II) - alveolárne fagocyty - alveolárne kapiláry	4	- - - - - - - -	- - - - - - - -	- - - - - - - -

Typ tkaniva	č.	BIBH 1	cF19	F19
Žalúdok - povrchový epitel - žalúdočné žľazy: - hlavné bunky - parietálne (oxyntické) bunky - mukózne bunky - neuroendokrinné b. - spojovacie tkanivo - krvné cievy - hladký sval	3	- - - - - - - - -	- - - - - - - - -	- - - - - - - - -
Ezofágus - povrchový epitel - spojovacie tkanivo	1	- -	- -	- -
Tenké črevo - epitel klkov a krýpt - spojovacie tkanivo - hladký sval - krvné cievy - lymfoidné tkanivo	1	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Močový mechúr - urotelium - spojovacie tkanivo - hladký sval - krvné cievy	2	- - - -	- - - -	- - - -

Typ tkaniva	č.	BIBH 1	cF19	F19
Pankreas - epitel kanálik - epitel lalôčikov - Langerhansove ostrovčeky: - B bunky - A bunky - D bunky - spojovacie tkanivo - krvné cievy - nervy	3	- - - - +* - - -	- - - - +* - - -	- - - - +* - - -
Larynx - šupinový epitel - mukózne žľazy - spojovacie tkanivo - hyalínová chrupavka - krvné cievy - kostrový sval	1	- - - - - -	- - - - - -	- - - - - -
Lymfatická uzlina - lymfoidné bunky - lymfatické fistuly - spojovacie tkanivo - krvné cievy	1	- - - -	- - - -	- - - -
Slezina - červená a biela dreň - fistuly - spojovacie tkanivo	1	- - -	- - -	- - -

Typ tkaniva	č.	BIBH 1	cF19	F19
Pečeň	1			
- hepatocyty		-	-	-
- žlčovody		-	-	-
- portálna trojica		-	-	-
Štítna žľaza	2			
- folikulárny epitel		-	-	-
- parafolikulárne bunky		-	-	-
- spojovacie tkanivo		-	-	-
Prostatická žľaza	1			
- žľazový epitel		-	-	-
- stróma		-	-	-
Semeníky	1			
- semenovody		-	-	-
- stróma		-	-	-
Vaječník	3			
- folikuly		-	-	-
- stróma		-	-	-
Krčok maternice	1			
- epitel		-	-	-
- stróma		-	-	-
Maternica	9			
- endometrium:				
- žľazy		-	-	-
- stróma		+#	+#	+#
- krvné cievy		-	-	-
- myometrium		-	-	-

Typ tkaniva	č.	BIBH 1	cF19	F19
Mozgový kortex	1			
- neuróny		-	-	-
- neurogliové bunky		-	-	-
- krvné cievy		-	-	-
Mozoček	1			
- molekulová vrstva		-	-	-
- vrstva granulárnych buniek		-	-	-
- Purkiného bunky		-	-	-
- krvné cievy		-	-	-
Koža	3			
- šupinový epitel		-	-	-
- melanocyty		-	-	-
- kožné prívesky		-	-	-
- spojovacie tkanivo		-	-	-
- krvné cievy		-	-	-

Acetónom fixované zmrazené rezy sa testovali avidín-biotín komplexovým imunoperoxidázovým postupom.

č. - počet testovaných tkanivových vzoriek odobraných od rôznych jedincov

* - identifikácia A buniek bola založená na morfológii a lokalizácii vo vnútri ostrovčekov

- pozitívna imunoreaktivita v stróme 4 z 9 testovaných vzoriek; pozitívne vzorky predstavovali proliferatívne endometrium v skorej (2x) a v strednej (2x) fáze

Príklad 9

Druhovú špecificitu L_AH_C väzby v tkanivových rezoch

Tento experiment sa uskutočňoval na stanovenie reaktivity L_AH_C s tkanivami z myši, potkana, kráľika a paviána imunohistochemickými metódami.

Aj v týchto testoch sa použila cF19 a ľudský IgG1 (hIgG1) ako negatívne kontroly. Reakčnými činidlami použitými na imunohistochémiu boli streptavidín peroxidázový komplex (Vector Labs., Burlingame, CA, USA), DAB (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) a Harrisov hematoxylín.

Testované boli nasledujúce čerstvé mrazené tkanivové vzorky z myši, potkana, králik a paviána: mozog, pečeň, pľúca, obličky, žalúdok, pankreas, tenké črevo, týmus, koža, sval, srdce, slezina, vaječník, maternica a semeníky. Ako pozitívna kontrola boli do každého testu zahrnuté rezy normálneho ľudského pankreasu a vzorka nádora prsníka.

Imunohistochemia

Nepriamy imunoperoxidázový spôsob sa uskutočňoval ako je opísané v stave techniky (Garin-Chesa P., Old L.J., Rettig W.J.: Cell surface glycoprotein of reactive stromal fibroblasts as a potential antibody target in human epithelial cancers. Proc Natl Acad Sci USA (1990) 87: 7235-7239) na čerstvých zmrazených rezoch s hrúbkou päť mikrometrov. Protilátky L_AH_C , cF19 a hIgG1 (1 μ g/ml) sa biotinylovali v súlade so stavom techniky a detegovali sa streptavidín peroxidázovým komplexom. DAB sa použil ako substrát pre konečný reakčný produkt. Rezy sa kontrastne farbili Harrisovým hematoxylínom a skúmala sa expresia antigénu.

Normálne testované tkanivá v experimentoch nereagovali ani s L_AH_C , ani s cF19 (tabuľka 1).

Normálny ľudský pankreas použitý ako pozitívna kontrola vykazoval L_AH_C a cF19 väzbu v podtriade endokrinných buniek v Langerhansových ostrovčekoch, ako bolo predtým opísané pre F19. Navyše sa pozorovala väzba L_AH_C a cF19 v nádorových stromálnych fibroblastoch vo vzorke karcinómu prsníka.

Imunohistochemické analýzy normálnych tkanív z myši, potkana, králik a paviána v uskutočňovaných experimentoch nedetegovali žiadnu väzbu ani L_AH_C , ani cF19.

Tabuľka 20

Väzba L_AH_C na tkanivové rezy iných ako ľudských druhov, ako sa determinovalo imunohistochemicky

Typ orgánu/tkaniva	myš	potkan	králik	pavián
Mozog				
- mozgový kortex	-	-	-	-
- mozoček	-	-	-	-
Pečeň				
- hepatocyty	-	-	-	-
- portálna trojica	-	-	-	-
Pľúca				
- pľúcnica	-	-	-	-
- alveoly	-	-	-	-
Obličky				
- glomeruli	-	-	-	-
- tubulárny epitel	-	-	-	-
Žalúdok				
- epitel žliaz	-	-	-	-
- hladký sval	-	-	-	-
Pankreas				
- exokrinné lalôčky	-	-	-	-
- endokrinné ostrovčeky	-	-	-	-
Tenké črevo				
- žľazový epitel	-	-	-	-
- hladký sval	-	-	-	-
Týmus - lymfocyty	-	-	-	-

Typ orgánu/tkaniva	myš	potkan	králik	pavián
Koža				
- keratinocyty	-	-	-	-
- potné žľazy	-	-	-	-
- vlasové folikuly	-	-	-	-
Kostrový sval	-	-	-	-
Srdce	-	-	-	-
Slezina - lymfocyty	-	-	-	-
Vaječníky				
- folikulárny epitel	-	-	-	-
- stróma	-	-	-	-
Maternica				
- myometrium	-	-	-	-
- krček maternica	-	-	-	-
Semeníky - tubulárny epitel	nt	nt	nt	-
Spojovacie tkanivo	-	-	-	-

nt - netestované

Príklad 10

Konštrukcia bunkových línií produkujúcich chimérne a pretvarované anti-FAP monoklonálne protilátky

Predmetom tohto experimentu bolo demonštrovať stabilné bunkové línie podľa vynálezu, ktoré exprimujú L_AH_C , L_AH_A , L_BH_B , L_BH_D a cF19 v CHO DG44 bunkách. Vyrobili sa stabilné bunkové línie transfekované humanizovanou alebo chimérnou F19 protilátkou a ich identita sa potvrdila PCR amplifikáciou variabilných oblastí ťažkého a ľahkého reťazca použitím genomickej DNA odvodenej z každého transfektantu ako templátu.

CHO DG44 bunky sa udržiavali v podmienkach bez séra v SFM-II médiu. Lipofektín a SFM-II médium bez séra sa získali od Gibco/BRL. Geneticin a všetky

restrikčné enzýmy sa získali od Boehringer Mannheim. Pfu polymeráza sa získala od Stratagene.

DNA na transfekcie sa purifikovala z *E. coli* buniek použitím QiaFilter Maxi Cartridges (Qiagen) v súlade s inštrukciami výrobcu. Všetky DNA prípravky sa skúmali prostredníctvom štiepenia restrikčnými enzýmami. Sekvencie L_AH_C variabilných oblastí a ich príslušných vektorov sa potvrdili použitím ABI PRISM 310 sekvenátora (Perkin-Elmer).

Ďalšie informácie týkajúce sa použitých vektorov a DNA sekvencií sú dostupné v predchádzajúcich príkladoch.

Transfekcia CHO DG44 buniek

Bunky v logaritmickú fázu rastu sa umiestnili na 6 jamkové platne obsahujúce 1 ml čerstvého SFM-II média. Plazmidy kódujúce ťažký a ľahký reťazec humanizovanej alebo chimérnej F19 verzie sa kotransfekovali do CHO DG44 buniek použitím lipozomálnej transfekcie. Lipozómy sa pripravili použitím 6 μ l liofektinového reakčného činidla a 0,5 μ g každého vektora (jeden pre požadovaný ťažký reťazec a jeden pre ľahký reťazec), ako je opísané pre LipofectAMINE transfekcie s tou výnimkou, že na riedenie všetkých reakčných činidiel bolo použité SFM-II médium. O 24 hodín sa bunky nariedili na 1:10 v SFM-II médiu obsahujúcom 300 μ g/ml geneticínu. Po skončení počiatočnej fázy bunkového zabíjania (10 až 14 dní) sa koncentrácia geneticínu znížila na 200 mg/ml a pridal sa metotrexát do finálnej koncentrácie 5 nM. Po 10 až 14 dňoch sa koncentrácie metotrexátu zvýšili na konečnú koncentráciu 20 nM.

PCR amplifikácia transfektantovej DNA

10^7 CHO DG44 buniek sa centrifigovalo v Eppendorfovej mikrocentrifúge, krátko pri plnej rýchlosti, raz sa premylo s PBS a ešte raz sa peletovalo. Genomická DNA sa pripravila etanolovou precipitáciou bunkových peletov po SDS lýze a ošetroení s proteinázou K.

Zmes obsahujúca jeden z nasledujúcich párov primerov, dNTPs, tlmivý roztok a Pfu polymerázu sa použila na amplifikáciu variabilnej oblasti buď ťažkého, alebo ľahkého reťazca, pričom sa genomická DNA použila ako templát. Výsledné PCR produkty sa poštípili s príslušným restriktčným enzýmom a analyzovali sa agarózovou gélovou elektroforézou, aby sa potvrdila ich identita.

Set primerov pre ľahký reťazec:

5'-GAG ACA TTG TGA CCC AAT CTC C-3'	PKN 1690
5'-GAC AGT CAT AAA CTG CCA CAT CTT C-3'	PKN.1930.R

Set primerov pre ťažký reťazec:

5'-TTG ACA CGC GTC TCG GGA AGC TT-3'	PG5863
5'-GGC GCA GAG GAT CCA CTC ACC T-3'	PG 6332.R

Nepoštípený PCR produkt pre ťažký reťazec mal predpokladanú veľkosť 469 bp, zatiaľ čo PCR produkt pre ľahký reťazec mal predpokladanú veľkosť 286 bp. Overenie identity sa uskutočnilo štiepením restriktčným enzýmom *BstEII* (ťažký reťazec) alebo *NlaIV* (ľahký reťazec).

CHO bunkové línie sa transfekovali s L_AH_C , L_AH_A , L_BH_B , L_BH_D , ako aj s cF19. Získali sa geneticín-rezistentné bunky a tieto bunky sa ďalej selektovali na rezistenciu voči metotrexátu. PCR amplifikácia a následne štiepenie vyprodukovanej DNA pre ľahký a ťažký reťazec restriktčnými enzýmami viedlo k očakávaným pásom a potvrdilo identitu L_AH_C , L_BH_B , L_AH_A a L_BH_D transfektantov.

Opísané bunky sa stále udržiavali v podmienkach bez séra a neošetrovali sa žiadnym živočíšnym produktom, akým je napríklad trypsín.

Vyrobili sa produkčné bunkové línie transfekované exprimujúcimi sa monoklonálnymi protilátkami L_AH_C , L_AH_A , L_BH_B , L_BH_D a cF19. Ich identity sa potvrdili použitím PCR amplifikácie a restriktčným štiepením výsledných PCR produktov variabilných oblastí tak ich ťažkého, ako aj ľahkého reťazca.

Príklad 11

Expresia protilátkových proteínov v DG44 vaječníkových bunkách čínskeho škrečka a ich purifikácia

Predmetom tohto experimentu bolo exprimovať a purifikovať L_AH_C , L_AH_A , L_BH_B a L_BH_D mAbs, aby sa umožnila ich charakterizácia. Ďalšie ciele zahŕňali použitie kvantitatívnej ELISA, aby sa umožnilo meranie protilátkových koncentrácií tak vo vzorkách surového média, ako aj vo vzorkách purifikovaného Ig, a determináciu relatívnych hladín expresie rôznych humanizovaných F19 konštruktov použitím tohoto testu.

CHO DG44 bunky zbavené séra a USP-stupňový metotrexát sa získali od Biotechnical Production Unit of the Dr. Karl Thomae GmbH, Biberach, Nemecko; oba produkty sú aj komerčne dostupné. Bunky sa stále udržiavali v podmienkach bez séra. SFM-II médium bez séra sa získalo od Gibco/BRL. Proteín A agaróza bola od Pierce Chemical (Indianapolis, IN, USA). Ľudské IgG1 štandardy (č. katalógu I 3889), *p*-nitrofenylfosfátové tablety (N 2640), hovädzí sérový albumín (BSA) (A 7906) a kozia anti-ľudská kapa reťazcová špecifická protilátka konjugovaná s alkalickou fosfatázou (A 3813) sa získali od Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). Kozia anti-ľudská gama-reťazcová špecifická protilátka konjugovaná s alkalickou fosfatázou sa získala od Jackson ImmunoResearch Laboratories (cez Stratech Scientific). Tris-tlmený fyziologický roztok (TBS) pozostával zo 150mM NaCl, 50mM Tris, pH 7,5.

Bunkové kultivačné podmienky na expresiu protilátok

Bunky sa kultivovali a udržiavali v T-175 fľašiach v SFM-II médiu bez séra bez pretrepávania. Médium obsahovalo 200 μ g/ml gentamicínu a 20nM metotrexát bez antibiotík. Bunky sa pasážovali riedením, neboli priľnuté a rástli v malých klastroch. Keď bunky dosiahli stacionárnu fázu, médium sa odobralo a scentrifugovalo, aby sa odstránili bunky, a zamrazilo sa na -20 °C, pokiaľ nebolo potrebné.

Purifikácia L_AH_C

Všetky purifikačné kroky sa uskutočňovali pri 4 °C. C10/10 kolóna (Pharmacia Fine Chemicals) sa naplnila Proteín A agarózou (3 ml nanášací objem). Kolóna sa premyla s TBS a jeden krát sa predeluovala s 0,1M citrátom sodným, pH 3,0, aby sa zaistilo, že na kolóne nezostal žiadny omylom naviazaný materiál. Kolóna sa potom okamžite znovu ekvilibrovala s TBS a uskladnila sa pri 4 °C. Supernatanty z vyčerpanej kultúry sa rozmrazili a centrifugovali sa pri 10000 ot/min 30 minút pred Proteín A chromatografiou, aby sa odstránili zvyšky, a nariedili sa v rovnakom objeme TBS. Tento materiál sa naniesol na Proteín A kolónu rýchlosťou 0,5 ml/min použitím P-1 peristaltickej pumpy (Pharmacia) a premyl sa s TBS, pokiaľ nebola detekovateľná absorbancia pri 280 nm. Eluovanie protilátky sa začalo s 0,1mM citrátom sodným pH 3,0 rýchlosťou približne 0,2 ml/min. Eluovanie sa monitorovalo pri 280 nm a zbierali sa jedno ml frakcie eluovaného materiálu do skúmaviek obsahujúcich dostatočné množstvo Tris bázy, pH 9, na neutralizáciu citrátového tlmivého roztoku. Frakcie obsahujúce proteín sa zhromaždili a zakoncentrovali sa použitím Amicon filtračnej aparatury s YM-30 filtrom a dialyzovali sa oproti PBS. Kolóna sa okamžite regenerovala s TBS. Uskutočnili sa proteínové farbiace testy s BioRad (Hercules, Kalifornia) proteínovým determinačným kitom v súlade s inštrukciami výrobcu použitím sérového albumínu ako štandardu.

ELISA s ľudským IgG (gama imunoglobulín)

ELISA platne sa cez noc pokryli so 100 µl kozej anti-ľudskej protilátky špecifickej pre gama reťazec konjugovanej s alkalickou fosfatázou v 0,4 mg/ml v pokrývacom tlmivom roztoku pri 4 °C. Pokrývacia protilátka sa odstránila a platne sa blokovali s 2% BSA v PBS 2 hodiny. Všetky nasledujúce kroky sa uskutočňovali pri 37 °C. Blokovací tlmivý roztok sa nahradil vzorkami protilátky alebo ľudským IgG1 štandardom, ktoré boli nariedené v riediacom tlmivom roztoku, sériovo nariedené v objeme 200 µl a inkubovali sa jednu hodinu. Negatívne kontroly zahŕňali riediaci tlmivý roztok a/alebo kultivačné médium netransfekovaných buniek. Jamky sa premyli a pridalo sa 100 µl kozej anti-ľudskej protilátky špecifickej voči kapa

reťazcu konjugovanej s alkalickou fosfatázou a nariedenej v pomere 1:5000 a inkubovanie prebiehalo jednu hodinu. Jamky sa premyli a pridalo sa 100 μ l reakčného tlmivého roztoku a inkubovalo sa 30 minút. Reakcia sa ukončila pridaním 1M NaOH a odčítavala sa absorbancia pri 405 nm v snímači ELISA platní. Výsledky sa analyzovali porovnávaním s iteratívnou krivkou berúc do úvahy štyri parametre.

Aminokyselinová analýza sa uskutočňovala v súlade so spôsobmi dostupnými zo stavu techniky.

Vyrobila sa monoklonálna protilátka L_AH_C a purifikovala sa, až kým nebola homogénna, použitím Proteín A afinitnej chromatografie. Z ELISA testov využívajúcich ľudský IgG1 ako štandard vyplýval výťažok L_AH_C presahujúci 70%. Čistota materiálu bola prostredníctvom SDS-polyakrylamidovej gélovej elektroforézy odhadnutá na viac ako 90 %. Reprezentatívne údaje o expresii a typické purifikačné výťažky sú uvedené v tabuľke 21.

Tabuľka 21

Údaje o expresii a purifikačné výťažky FAP protilátkových proteínov v CHO buniek

Protilátka	Úrovně expresie vo vzorkách surového média (ELISA)	Výťažky purifikovanej protilátky	Zlepšenie výťažku purifikovanej protilátky
L_AH_C	7 až 10 mg/ml	~ 5 až 7 mg/l	500 až 700
L_AH_A	5 až 7 mg/ml	~ 2 až 4 mg/l	300 až 400
L_BH_B	0,5 až 1 mg/ml	~ 0,2 až 0,5 mg/l	20 až 50
L_BH_D	0,8 až 1,5 mg/ml	~ 0,3 až 0,8 mg/l	30 až 60
chimérna F19	~ 0,02 mg/ml	menej ako 0,01 mg/l	1

Uvedené sú reprezentatívne údaje o expresii pre každú z anti-FAP protilátok produkovaných v tejto štúdii. Výťažky po Proteín A agarózovej afinitnej

chromatografii sa určili na základe meraní prostredníctvom väzby farbičky purifikovaným Ig použitím BSA ako štandardu.

Príklad 12

Väzba monoklonálnej protilátky L_AH_C na izolovaný rekombinantný ľudský FAP

Predmetom tejto štúdie bolo charakterizovať väzbu L_AH_C na izolovaný rekombinantný ľudský FAP.

CD8-FAP ELISA

ELISA platne sa cez noc pokryli so 100 μ l myšej anti-potkanej protilátky (Sigma Chemical R0761) v riedení 1:2000 v pokrývacom tlmivom roztoku pri 4 °C. Pokrývacia protilátka sa odstránila a platne sa blokovali s 2% BSA v PBS jednu hodinu. Všetky nasledujúce kroky sa uskutočňovali pri laboratórnej teplote. Blokovací tlmivý roztok sa nahradil 100 μ l 1 μ g/ml potkanej anti-CD8 protilátky (Pharmingen 01041D) a platne sa inkubovali jednu hodinu. Platne sa premyli a pridalo sa 100 μ l supernatátu CD8-FAP kultúry (pozri príklad 14) (1:2 v PBS), ktorý sa nechal viazať jednu hodinu. Platne sa premyli a pridali sa vzorky protilátky (dvojnásobné sériové riedenia) v objeme 100 μ l a inkubovali sa jednu hodinu. Negatívne kontroly zahŕňali ľudský IgG a/alebo kultivačné médium netransfekovaných buniek. Jamky sa premyli a pridalo sa 100 μ l myšej anti-ľudskej IgG1 protilátky konjugovanej s chrenovou peroxidázou (HRP) (Zymed 05-3320) nariadenej v 1:500 v riediacom tlmivom roztoku a nechali sa jednu hodinu inkubovať. Jamky sa premyli a pridalo sa 100 μ l HRP substrátu (kyselina azinobis(3-etylbenztiazolín-6-sulfónová), Sigma Chemical A9941) a inkubovalo sa 60 minút. Reakcia sa ukončila pridaním 1M NaOH a odčítavala sa absorbancia pri 405/490 nm v snímači ELISA platní. Výsledky sa analyzovali porovnávaním s iteratívnou krivkou berúc do úvahy štyri parametre.

Alternatívne sa platne pokryli priamo s cF19. FAP (rekombinantný ľudský FAP, pozri príklad 13) sa nechal viazať na tieto platne, ako bolo opísané vyššie, a

potom sa pridala biotinylovaná L_AH_C (približne 1 $\mu\text{g/ml}$). Vázba protilátky sa detegovala s HRP-streptavidínovým konjugátom, ako bolo uvedené vyššie.

Solubilizácia na membránu viazaného FAP

293FAP 1/2 bunky exprimujúce FAP alebo kontrolné 293 bunky sa premyli s PBS a lyzovali sa s 1% Triton X-114 v Tris tlmivom fyziologickom roztoku. Jadrá a zvyšky sa odstránili centrifugáciou pri 10000 ot/min. Supernatant sa fázovo rozdelil (Estreicher A, Wohlend A, Belin D, Scheuning WD, Vasalli JD. Characterization of the cellular binding site for the urokinase-type plasminogen activator. (1989) J Biol Chem 264:1180-1189), aby sa obohatil o membránové proteíny. Odobrala sa detergentná fáza a nariesila sa v tlmivom roztoku obsahujúcom 1% Empigén BB (Calbiochem), aby sa zabránilo opätovnej agregácii Triton X-114. Tento materiál sa podrobil Konkanavalín A agarózovej chromatografii (Rettig WJ, Garin-Chesa P, Healey JH, Su SL, Ozer HL, Schwab, M, Albino AP, Old LJ. Regulation and heteromeric structure of the fibroblast activation protein in normal and transformed cells of mesenchymal and neuroectodermal origin. (1993) Cancer Res 53:3327-3335).

Biotinylácia L_AH_C

L_AH_C (1 až 2 mg) sa dialyzovala oproti 50mM hydrogénuhličitanovému tlmivému roztoku a biotinylovala sa s desaťnásobným molárnym nadbytkom sulfo-sukcinimidyl-6-biotínamido hexanoátu (NHS-LC biotín, Peirce Chemical, Rockford, Illinois, USA) 2 hodiny pri laboratórnej teplote. Nezreagovaný produkt sa odstránil opakovanými mikrodialýzami v mikrokonzentratore.

Prechodné transfekcie

COS-7 bunky (American Type Tissue Culture Collection, referenčné číslo CRL 1651) sa kotransfekovali elektroporáciou s vektormi kódujúcimi ťažký a ľahký reťazec L_AH_C .

Na mikrotitračných platniach sa imobilizovala anti-CD8 monoklonálna protilátka. Na tieto platne sa nechal naviazať CD8-FAP z média hmyzích buniek

infikovaných s CD8-FAP bakulovírusom. Vyčerpané médium z COS-7 bunkových kultúr, ktoré boli prechodne transfekované dvoma separátnymi vektormi kódujúcimi L_AH_C , sa sériovo nariedilo a pridalo sa do jamiek obsahujúcich imobilizovaný CD8-FAP. L_AH_C sa naviazal a izolovaný imobilizovaný CD8-FAP proteín (obrázok 35). Supernatanty kultúr falošne transfekovaných COS-7 buniek nedemonštrovali väzbu.

Rekombinantný membránovo viazaný FAP z detergentných extraktov 293FAP I/2 buniek alebo z kontrolných extraktov sa sériovo nariedil a imobilizoval sa prostredníctvom chimérnej F19 monoklonálnej protilátky na mikrotitračných platniach. Biotinylovaná L_AH_C viazala rekombinantných FAP imobilizovaný s cF19 (obrázok 36) na koncentrácii závislým spôsobom.

L_AH_C rozoznávala izolovaný imobilizovaný rekombinantný ľudský FAP nesúci epitop hlodavčej F19. L_AH_C sa viazala tak na CD8-FAP produkovaný v hmyzích bunkách, ako aj na FAP proteín produkovaný v 293FAP I/2 bunkách.

Supernatanty kultúr COS7 buniek transformovaných buď vektormi kódujúcimi ťažký a ľahký reťazec L_AH_C , alebo bez DNA (kontrola), sa izolovali tri dni po transfekcii. CD8-FAP sa imobilizoval prostredníctvom anti-CD8 protilátky ako je opísané v texte. Sériové riedenia COS7 supernatantov sa nechali viazať na imobilizovaný CD8-FAP a následne sa detegovali s HRP-konjugovanou anti-ľudskou IgG1 protilátkou.

Detergenčné extrakty FAP-exprimujúcich 293FAP I/2 buniek alebo kontrolných 293 buniek sa sériovo nariedili a pridali sa do mikrotitračných platní pokrytých s cF19. Pridala sa biotinylovaná L_AH_C a väzba biotinylovanej L_AH_C sa detegovala s HRP-konjugovaným streptavidínom.

Príklad 13

Charakterizácia HT-1080 fibrosarkómových buniek a 293 ľudských embryotických obličkových buniek transfekovaných cDNA kódujúcou ľudský FAP

Fibroblastový aktivačný proteín (FAP) je bunkový povrchový, na membránu naviazaný proteín, ktorý nesie F19 epitop a exprimuje sa na nádorových stromálnych fibroblastoch. Na charakterizáciu anti-FAP monoklonálnych protilátok

sa generovali bunkové línie exprimujúce rekombinantný FAP proteín a zodpovedajúce kontrolné línie bez FAP.

Použité boli HT-1080 bunky (referenčné číslo CCL 121) a 293 ľudské embryotické obličkové bunky (referenčné číslo CRL 1573), ktoré sa získali z American Type Culture Collection (Maryland, USA). Transfectam sa získal od Promega (Madison, WI). Geneticín a všetky restričné enzýmy sa získali od Boehringer Mannheim. DNA na transfekcie sa purifikovala z *E. coli* buniek použitím QiaFilter Maxi Cartridges (Qiagen) v súlade s inštrukciou výrobcu. Všetky DNA prípravky sa skúmali prostredníctvom štiepenia restričnými enzýmami. Vektorové sekvencie boli potvrdené použitím ABI PRIS 310 Sekvenátora.

Ďalšie informácie týkajúce sa použitých vektorov a DNA sekvencií boli opísané v Scanlan MJ, Raj BK, Calvo B, Garin-Chesa P, Sanz-Moncasi MP, Healey JH, Old LJ, Rettig WJ. Molecular cloning of fibroblast activation protein alpha, a member of the serine protease family selectively expressed in stromal fibroblasts of epithelial cancers. (1992) Proc Natl Acad Sci USA 89:10832-10836. FAP cDNA sekvencia bola uložená v Genbank (prístupové číslo HS09287).

Bunková kultúra a imunologické testy

HT-1080 bunky sa transfekovali 1 mg DNA použitím Transfectam v súlade s inštrukciami výrobcu. Ľudské embryotické obličkové 293 bunky sa transfekovali transfekciou prostredníctvom fosforečnanu vápenatého (Brann MR; Buckley NJ; Jones SVP; Bonner TI. Expression of cloned muscarinic receptor in A9 L bunkách. (1987) Mol Pharmacol 32:450-455) s 10 mg DNA. O 24 hodín sa bunky nariesili čerstvým médiom s obsahom 200 mg/ml geneticínu v pomere 1:10. Kolónie sa odpichli a skúmali sa prostredníctvom imunofluorescencie z hľadiska FAP expresie, ako je opísané v Rettig WJ; Garin-Chesa P; Beresford HR; Oettgen HF; Melamed MR; Old LJ. Cell-surface glycoproteins of human sarcomas: differential expression in normal and malignant tissues and cultured cells. (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85:3110-3114.

Uskutočňovali sa imunoprecipácie s cF19 s metabolicky značenými bunkami ako je opísané v Rettig WJ, Garin-Chesa P, Healey JH, Su SL, Ozer HL,

Schwab, M, Albino AP, Old LJ. Regulation and heteromeric structure of the fibroblast activation protein in normal and transformed cells of mesenchymal and neuroectodermal origin. (1993) Cancer Res 53:3327-3335.

HT-1080 a 293 bunky sa testovali z hľadiska expresie FAP antigénu v imunofluorescenčných testoch s anti-FAP protilátkami a zistilo sa, že sú antigén-negatívne. Výsledkom transfekcie týchto buniek s FAP.38 vektorom bolo generovanie geneticín-rezistentných kolónií. Izolované kolónie sa odpichli a imunofluorescenciou sa analyzovala expresia FAP. Identifikovali sa dve kolónie označené ako HT-1080FAP klon 33 a 293FAP I/2, ktoré exprimujú na bunkový povrch naviazaný FAP proteín, ktorý bol rozoznávaný cF19 protilátkou. Farbenie nepermeabilizovaných buniek HT-1080FAP klonu 33 a 293FAP I/2 s cF19 protilátkou potvrdilo lokalizáciu FAP proteínu na bunkovom povrchu.

Výsledkom imunoprecipitácie rádioaktívne značeného FAP proteínu s cF19 z extraktov ³⁵S-metionínom značených buniek HT-1080FAP klonu 33 alebo 293FAP I/2 buniek bolo objavenie sa 93 kilodaltonového pásu po autorádiografii. Tento pás nie je detekovateľný v imunoprecipitátoch rodičovských HT-1080 alebo 293 bunkových extraktoch.

Dve stabilne transfekované bunkové línie, HT-1080FAP klon 33 a 293FAP I/2, exprimujú na bunkovom povrchu FAP, čo bolo stanovené imunologickými testami s anti-FAP mAbs. Ani rodičovské HT-1080 bunky, ani rodičovské 293 bunky, neexprimujú detekovateľné hladiny FAP.

Príklad 14

Generovanie a charakterizácia CD8-FAP fúzovaného proteínu

Na charakterizáciu väzobného miesta pre anti-FAP mAbs v L_AH_C sa v hmyzích bunkách vyrobila rozpustná forma FAP (fibroblastový aktivačný proteín) vo forme CD8-FAP fúzovaného proteínu.

cDNA kódujúca extracelulárnu doménu CD8, pozostávajúcu z prvých 189 aminokyselín hlodavčieho CD8 α (Genbank M12825), sa spojila s DNA extracelulárnej domény FAP (aminokyseliny 27 až 760), ktorá je v podstate opísaná v Lane a ďalší (Lane P, Bocker T, Hubele S, Padovan E, Lazavecchia A, McConnell.

Soluble CD40 ligand can replace the normal T cell-derived CD40 ligand signal to B cells in T cell-dependent activation. (1993) J Exp Med 177:1209-1213) použitím štandardných PCR protokolov. Autenticita všetkých klonov sa overila DNA sekvenovaním. Výsledná DNA sa zaviedla do pVL1393 vektora (Invitrogen) a uskutočnila sa transfekcia Sf9 buniek (Invitrogen) s týmto vektorom a amplifikácia výsledného rekombinantného bakulovírusu, ako je opísané v Baculovirus Expression Vectors. A laboratory Manual. O'Reilly DR, Miller LK, Luckow VA, (vyd.), Oxford University Press: New York, 1994. Vyčerpané médium High Five™ buniek (Invitrogen), infikovaných rekombinantným CD8-FAP bakulovírusom počas štyroch dní, sa izolovalo a vyčistilo ultracentrifugáciou.

CD8-FAP ELISA (s enzýmom spojený imunoabsorbčný test) bola opísaná vyššie (príklad 12).

Kultúry hmyzích buniek infikovaných CD8-FAP vírusom sekretovali fúzovaný proteín do média, ktoré nesie F19 epitop a je rozoznávané anti-FAP protilátkou (obrázok 1). Ani samotné médium bunkovej kultúry, ani médium z hmyzích buniek infikovaných CD8-CD40L fúzovaným proteínom, neviazali anti-FAP protilátku.

Rozpustný CD8-FAP proteín nesúci F19 epitop bol sekretovaný do média infikovaných hmyzích bunkových kultúr. Supernatanty z buniek infikovaných kontrolným konštruktom neobsahovali antigén nesúci F19 epitop.

V hmyzích bunkách bola produkovaná rozpustná forma FAP, CD8-FAP a ukázalo sa, že CD8-FAP nesie epitop rozoznávaný prostredníctvom cF19.

Štyri dni po infekcii sa izolovali supernatanty z hmyzích buniek infikovaných rekombinantným bakulovírusom kódujúcim buď CD8-FAP, alebo CD8-CD40L fúzovaný proteín. Bunkové kultivačné médium bez buniek bolo použité ako ďalšie kontrolné médium. Sériové riedenia týchto materiálov sa pridali do mikrotitračných platní pokrytých anti-CD8 protilátkou a nechali sa naviazať sa. Následne sa pridala cF19 (1 mg/ml) a nechala sa naviazať sa. Vázba cF19 sa detekovala anti-ludskou protilátkou konjugovanou s chrenovou peroxidázou.

Zoznam sekvencií

<110> Boehringer Ingelheim International GmbH

<120> FAP α -špecifická protilátka so zlepšenou schopnosťou produkcie

<130> 12-196-PCT

<140> PCT/EP99/02711

<141> 1998-04-30

<160> 101

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 339

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

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

<210> 2

<211> 113

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

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

- 73 -

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Phe Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Phe Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95
Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 3

<211> 339

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

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

<210> 4

<211> 113

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

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

Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Phe	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Val
	50					55					60				
Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Phe	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr
65					70					75				80	
Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Asp	Cys	Gln	Gln
			85						90					95	
Tyr	Phe	Ser	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile
		100						105					110		

Lys

<210> 5

<211> 339

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 5

gacattgtga	tgaccaatc	tccagactct	ttggctgtgt	ctctagggga	gagggccacc	60
atcaactgca	agtccagtca	gagcctttta	tattctagaa	atcaaaaagaa	ctacttggcc	120
tggtatcagc	agaaaccagg	acagccaccc	aaactcctca	tctattgggc	tagcactagg	180
gaatctgggg	tacctgatag	gttcagtggc	agtggggttg	ggacagactt	caccctcacc	240
attagcagcc	tcgaggctga	agatgtggca	gtttattact	gtcagcaata	ttttagctat	300
ccgctcacgt	tcggacaagg	gaccaaggtg	gaaataaaa			339

<210> 6

<211> 113

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 6

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

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

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

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

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

Lys

<210> 7

<211> 372

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 7

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

<210> 8

<211> 124

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 9

<211> 372

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 9

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

<210> 10

<211> 124

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 10

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

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

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

- 77 -

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

<210> 11

<211> 372

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 11

cagggtgcaac tagtgccagtc cggcgccgaa gtgaagaaac ccggtgcttc cgtgaaagtc 60
agctgtaaaa ctagtagata caccttcact gaatacacca tacactgggt tagacaggcc 120
cctggccaaa ggctggagtg gataggaggt attaadccta acaatgggtat tcctaactac 180
aaccagaagt tcaagggccg ggtcaccatc accgtagaca cctctgccag caccgcctac 240
atggaactgt ccagcctgcg ctccgaggac actgcagtct actactgcgc cagaagaaga 300
atcgccctatg gttacgacga gggccatgct atggactact ggggtcaagg aacccttgtc 360
accgtctcct ca 372

<210> 12

<211> 124

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 12

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Arg Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
20 25 30

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

<210> 13

<211> 372

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 13

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

<210> 14

<211> 124

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 14

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

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

<210> 15

<211> 372

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 15

caggtgcaac	tagtgagtc	cggcgccgaa	gtgaagaaac	ccggtgcttc	cgtgaaagtc	60
agctgtaaaa	ctagtggata	caccttcact	gaatacacca	tacactgggt	tagacaggcc	120
cctggccaaa	ggctggagtg	gataggaggt	attaatccta	acaatgggtat	tcctaactac	180
aaccagaagt	tcaagggccg	ggtcaccatc	accgtagaca	cctctgccag	caccgcctac	240
atggaactgt	ccagcctgcg	ctccgaggac	actgcagtct	actactgcgc	cagaagaaga	300
atcgctatg	gttacgacga	gggccatgct	atggactact	gggggtcaagg	aacccttgtc	360
accgtctcct	ca					372

<210> 16

<211> 124

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 16

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

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

<210> 17

<211> 220

<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: chimérna variabilná oblasť ľahkého reťazca

<400> 17

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

Ile	Ser	Ser	Val	Gln	Ala	Glu	Asp	Leu	Ala	Val	Tyr	Asp	Cys	Gln	Gln
				85					90					95	
Tyr	Phe	Ser	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu
			100					105					110		
Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp
		115					120					125			
Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn
	130					135					140				
Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu
145					150					155					160
Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp
			165						170					175	
Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr
			180					185					190		
Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser
		195					200					205			
Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys				
	210					215					220				

<210> 18

<211> 453

<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: chimérna variabilná oblasť ťažkého reťazca

<400> 18

Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser
1				5					10					15	
Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Thr	Ser	Arg	Tyr	Thr	Phe	Thr	Glu	Tyr	Thr
			20					25					30		
Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ser	His	Gly	Lys	Ser	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly
		35					40					45			

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

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 19

<211> 321

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 19

cgtactgtgg ctgcaccatc tgtcttcac tccccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60
ggaactgcct ctggtgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagagggc caaagtacag 120
tggaagggtg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag 300
agcttcaaca ggggagagtg t 321

<210> 20

<211> 107

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 20

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

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

<210> 21

<211> 990

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 21

```

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60
ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg 120
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300
aaatcttgtg acaaaaactca cacatgcccc ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 360
ccgtcagctc tctcttcccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctc 420
gaggtcacat gcgtgggtgg ggacgtgagc cacgaagacc ctgagggtcaa gttcaactgg 480
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgaggagg gacgtacaac 540
agcacgtacc ggggtggtcag cgtcctcacc gtctctgacc aggactggct gaattggcaag 600
gagtacaagt gcaagggtct caacaaagcc ctcccagccc ccacgcagaa aaccatctcc 660
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggaggag 720
atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840
ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 960
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 990

```

<210> 22

<211> 330

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 22

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

<210> 23

<211> 427

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 23

aagcttgccg	ccaccatgga	ttcacaggcc	caggttctta	tgttactgcc	gctatgggta	60
tctggtacct	gtggggacat	tgtgatgtca	cagtctccat	cctccctagc	tgtgtcagtt	120
ggagagaagg	ttactatgag	ctgcaagtcc	agtcagagcc	ttttatatag	tcgtaatcaa	180
aagaactact	tggcctgggt	ccagcagaag	ccagggcagt	ctcctaaact	gctgattttc	240
tgggcatcca	ctagggaatc	tggggtcctt	gatcgcttca	caggcagtggt	atttgggacg	300
gatttcaatc	tcaccatcag	cagtgtgcag	gctgaggacc	tggcagttta	tgactgtcag	360
caatatttta	gctatccgct	cacgttcggg	gctgggacca	agctggagct	gaaacgtgag	420
tggatcc						427

<210> 24

<211> 133

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 24

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

<210> 25

<211> 457

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 25

```
aagcttgccg ccaccatggg atggagctgg gtctttctct ttctcctgtc aggaactgca 60
ggtgtcctct ctgagggtcca gctgcaacag tctggacctg agctggtgaa gcctggggct 120
tcagtaaaga tgtcctgcaa gacttctaga tacacattca ctgaatacac catacactgg 180
gtgagacaga gccatggaaa gagccttgag tggattggag gtattaatcc taacaatggt 240
attcctaact acaaccagaa gttcaagggc agggccacat tgactgtagg caagtcctcc 300
agcaccgcct acatggagct ccgcagcctg acatctgagg attctgcggt ctatttctgt 360
gcaagaagaa gaatcgccta tggttacgac gagggccatg ctatggacta ctgggggtcaa 420
ggaacctcag tcaccgtctc ctcaggtgag tggatcc 457
```

<210> 26

<211> 143

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 26

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

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

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

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

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

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Gly Lys Ser Ser Ser
85             90             95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100            105            110

Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Arg Ile Ala Tyr Gly Tyr Asp Glu Gly His
115            120            125

Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
130            135            140
```

<210> 27

<211> 8068

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 27

```
gaattccagc acactggcgg ccgttactag ttattaatag taatcaatta cggggtcatt 60
agttcatagc ccatatatgg agttccgcgt tacataactt acggtaaata gcccgcctgg 120
ctgaccgccc aacgaccccc gccattgac gtcaataatg acgtatgttc ccatagtaac 180
gccaataggg actttccatt gacgtcaatg ggtggagtat ttacggtaaa ctgcccactt 240
ggcagtagat caagtgtatc atatgccaa gacgccccct attgacgtca atgacggtaa 300
atggccccgc tggcattatg ccagtagat gaccttatgg gactttccta cttggcagta 360
catctacgta ttagtcatcg ctattacat ggtgatgcgg ttttggcagt acatcaatgg 420
gcgtggatag cggtttgact cacggggatt tccaagtctc caccctattg acgtcaatgg 480
gagtttgttt tggcaccaaa atcaacggga ctttccaaaa tgcgtaaca actccgcccc 540
attgacgcaa atgggcggta ggcgtgtacg gtgggaggtc tatataagca gagctcgttt 600
agtgaaccgt cagatcgctt ggagacgcca tccacgctgt tttgacctcc atagaagaca 660
ccgggaccga tccagcctcc gcggccggga acggtgcatt ggaacgcgga ttccccgtgc 720
caagagtgcg gtaagtaccg cctatagagt ctataggccc acccccttgg cttcttatgc 780
atgctatact gtttttggct tgggtctat acacccccgc ttcctcatgt tatagggtgat 840
ggtatagctt agcctatagg tgtgggttat tgaccattat tgaccactcc cctattgggtg 900
acgatacttt ccattactaa tccataacat ggctctttgc cacaactctc tttattggct 960
atatgccaat acactgtcct tcagagactg acacggactc tgtattttta caggatgggg 1020
tctcatttat tatttacaaa ttcacatata caacaccacc gtccccagtg cccgcagttt 1080
ttattaaaca taacgtggga tctccacgcg aatctcgggt acgtgttccg gacatgggct 1140
cttctccggt agcggcggag cttctacatc cgagccctgc tcccatgcct ccagcgactc 1200
atggctcgctc ggcagctcct tgctcctaac agtggaggcc agacttaggc acagcacgat 1260
gccaccacc accagtgtgc cgcacaaggc cgtggcggta gggatgtgt ctgaaaatga 1320
gctcggggag cgggcttgca ccgctgacgc atttggaaga cttaaggcag cggcagaaga 1380
agatgcaggc agctgagttg ttgtgttctg ataagagtca gaggtaactc ccgttgcggt 1440
gctgttaacg gtggagggca gtgtagtctg agcagtactc gttgctgccg cgcgcgccac 1500
cagacataat agctgacaga ctaacagact gttcctttcc atgggtcttt tctgcagtca 1560
ccgtccttga cacgcgtctc gggaagcttg ccgccaccat ggattcacag gcccaggttc 1620
ttatgttact gccgctatgg gtatctggta cctgtgggga cattgtgatg tcacagtctc 1680
catcctccct agctgtgtca gttggagaga aggttactat gagctgcaag tccagtcaga 1740
gccttttata ttctagaaat caaaagaact acttggcctg gttccagcag aagccagggc 1800
agtctcctaa actgctgatt ttctgggcat ccactaggga atctggggtc cctgatcgct 1860
tcacaggcag tggatttggg acggatttca atctcaccat cagcagtggt caggctgagg 1920
acctggcagt ttatgactgt cagcaatatt ttagctatcc gctcacgttc ggtgctggga 1980
ccaagctgga gctgaaacgt gagtggatcc atctgggata agcatgctgt tttctgtctg 2040
tccctaacat gccctgtgat tatgcgcaa caacacacc aagggcagaa ctttgttact 2100
taaacaccat cctgtttgct tctttcctca ggaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcatc 2160
ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat 2220
aacttctatc ccagagaggc caaagtacag tggaagggtg ataacgcctt ccaatcgggt 2280
aactcccagg agagtgtcac agagcaggac agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc 2340
accctgacgc tgagcaaagc agactacgag aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc 2400
catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaag agcttcaaca ggggagagtg ttagagggag 2460
aagtgcctcc acctgctcct cagttccagc ctgacccccct cccatccttt ggctctgac 2520
cctttttcca caggggacct accctatttg cggtcctcca gctcatcttt cacctcacc 2580
ccctcctcct ccttggcttt aattatgcta atgttggagg agaataagta aataaagtga 2640
atctttgcac ctgtgttgga tctaataaaa gatatttatt ttcattagat atgtgtgttg 2700
```

gttttttgtg	tgcagtgcct	ctatctggag	gccaggtagg	gctggccttg	ggggaggggg	2760
aggccagaat	gactccaaga	gctacaggaa	ggcaggtcag	agacccact	ggacaaacag	2820
tggctggact	ctgcaccata	acacacaatc	aacaggggag	tgagctggaa	atttgctagc	2880
gaattcttga	agacgaaagg	gcctcgtgat	acgcctat	ttataggtta	atgtcatgat	2940
aataatggtt	tcttagacgt	caggtggcac	ttttcgggga	aatgtgcgcg	gaaccctat	3000
ttgtttat	ttctaaatac	attcaaatat	gtatccgctc	atgagacaat	aaccctgata	3060
aatgcttcaa	taatatgaa	aaaggaagag	tatgagtatt	caacatttcc	gtgtcgccct	3120
tattcccttt	tttgcgcat	tttgccctcc	tgtttttgc	caccagaaa	cgctggtgaa	3180
agtaaaagat	gctgaagatc	agttgggtgc	acgagtgggt	tacatcgaa	tggatctcaa	3240
cagcggtaag	atccttgaga	gttttcgccc	cgaagaacgt	tttccaatga	tgagcacttt	3300
taaagtcttg	ctatgtggcg	cggtattatc	ccgtgttgac	gccgggcaag	agcaactcgg	3360
tcgccgcata	cactattctc	agaatgactt	ggttgagtac	tcaccagtca	cagaaaagca	3420
tcttacggat	ggcatgacag	taagagaatt	atgcagtgtc	gccataacca	tgagtataa	3480
cactgcggcc	aacttacttc	tgacaacgat	cggaggaccg	aaggagctaa	ccgctttttt	3540
gcacaacatg	ggggatcatg	taactcgcct	tgatcggttg	gaaccggagc	tgaatgaagc	3600
cataccaaac	gacgagcgtg	acaccacgat	gcctgcagca	atggcaacaa	cgttgcgcaa	3660
actattaaact	ggcgaactac	ttactctagc	ttcccggcaa	caattaatag	actggatgga	3720
ggcggataaa	gttgaggagc	cacttctgcg	ctcggccctt	ccggtggtgc	ggtttattgc	3780
tgataaatct	ggagccggtg	agcgtgggtc	tcgcggtatc	attgcagcac	tggggcccaga	3840
tggttaagccc	tcccgtatcg	tagttatcta	cacgacgggg	agtcaggcaa	ctatggatga	3900
acgaaataga	cagatcgctg	agataggtgc	ctcactgatt	aagcattggt	aactgtcaga	3960
ccaagtttac	tcataatac	tttagattga	tttaaaactt	catttttaat	ttaaaaggat	4020
ctaggtgaag	atcctttttg	ataatctcat	gaccaaatac	ccttaacgtg	agttttcgtt	4080
ccactgagcg	tcagaccccg	tagaaaagat	caaaggatct	tcttgagatc	ctttttttct	4140
gcgcgtaatc	tgctgcttgc	aaacaaaaaa	accaccgcta	ccagcgggtg	tttgtttgcc	4200
ggatcaagag	ctaccaactc	tttttccgaa	ggtaactggc	ttcagcagag	cgagataacc	4260
aaatactgtc	cttctagtgt	agccgtagtt	aggccaccac	ttcaagaact	ctgtagcacc	4320
gcctacatac	ctcgtctctg	taatcctgtt	accagtggct	gctgccagtg	gcgataagtc	4380
gtgtcttacc	gggttggtg	caagacgata	gttaccggat	aaggcgcagc	ggtcgggctg	4440
aacggggggg	tcgtgcacac	agcccagctt	ggagcgaacg	acctacaccg	aactgagata	4500
cctacagcgt	gagctatgag	aaagcggcac	gcttcccga	gggagaaaag	cggaacaggta	4560
tcgggtaagc	ggcagggctg	gaacaggaga	gcgcacgagg	gagcttccag	ggggaaacgc	4620
ctggtatctt	tatagtcctg	tcgggtttcg	ccacctctga	cttgagcgtc	gatttttgtg	4680
atgctcgtca	ggggggcgga	gcctatggaa	aaacgccagc	aacgcggcct	ttttacgggt	4740
cctggccttt	tgctggcctt	ttgctcacat	gttctttcct	gcgttatccc	ctgattctgt	4800
ggataaccgt	attaccgcct	ttgagtgaag	tgataaccgt	cgccgcagcc	gaacgaccga	4860
gcgcagcgag	tcagtgaagc	aggaagcgga	agagcgctct	atgcggtatt	ttctccttac	4920
gcatctgtgc	ggtattttac	accgcatatg	gtgactctc	agtacaatct	gctctgatgc	4980
cgcatagtta	agccagtata	cactccgcta	tcgctacgtg	actgggtcat	ggctgcgccc	5040
cgacacccgc	caacacccgc	tgacgcgccc	tgacgggctt	gtctgctccc	ggcatccgct	5100
tacagacaag	ctgtgaccgt	ctccgggagc	tgcatgtgtc	agaggttttc	accgtcatca	5160
ccgaaacgcg	cgaggcagct	gtggaatgtg	tgtcagttag	ggtgtggaaa	gtccccaggc	5220
tccccagcag	gcagaagtat	gcaaagcatg	catctcaatt	agtcagcaac	caggctcccc	5280
agcaggcaga	agtatgcaa	gcatgcatct	caattagtca	gcaaccatag	tcccggccct	5340
aactccgccc	atcccgcccc	taactccgcc	cagttccgcc	cattctccgc	cccattggctg	5400
actaatTTTT	tttattttatg	cagaggccga	ggccgcctcg	gcctctgagc	tattccagaa	5460
gtagtgagga	ggcttttttg	gaggcctagg	cttttgcaaa	aagctagctt	cacgctgccg	5520
caagcactca	gggcgcaagg	gctgctaaag	gaagcggaac	acgtagaaag	ccagtccgca	5580
gaaacggtgc	tgaccccgga	tgaatgtcag	ctactgggtc	atctggacaa	gggaaaacgc	5640
aagcgcaaag	agaaagcagg	tagcttgacg	tgggcttaca	tgccgatagc	tagactgggc	5700
ggttttatgg	acagcaagcg	aaccggaatt	gccagctggg	gcgccctctg	gtaaggttgg	5760
gaagccctgc	aaagtaaaact	ggatggcttt	cttgccgcca	aggatctgat	ggcgcagggg	5820
atcaagatct	gatcaagaga	caggatgagg	atcgtttcgc	atgattgaac	aagatggatt	5880
gcacgcaggt	tctccggccg	cttgggtgga	gaggctattc	ggctatgact	gggcacaaca	5940
gacaatcggc	tgctctgatg	ccgcggtgtt	ccggctgtca	gcgcaggggc	gcccggttct	6000
ttttgtcaag	accgacctgt	ccggtgccct	gaatgaactg	caggacgagg	cagcgcggct	6060
atcgtggctg	gccacgacgg	gcgttccttg	cgcagctgtg	ctcgacgttg	tactgaagc	6120
gggaagggac	tggttgctat	tgggcgaagt	gccggggcag	gatctcctgt	catctcacct	6180
tgctcttgcc	gagaaagtat	ccatcatggc	tgatgcaatg	cggcggtgc	atagccttga	6240
tccggctacc	tgcccatctg	accaccaagc	gaaacatcgc	atcgagcgag	cacgtactcg	6300
gatggaagcc	ggtcttgtcg	atcaggatga	tctggacgaa	gagcatcagg	ggctcgcgcc	6360

```

agccgaactg ttcgccaggc tcaaggcgcg catgcccagc ggcgaggatc tcgtcgtgac 6420
ccatggcgat gcctgcttgc cgaatatcat ggtggaaaat ggccgctttt ctggattcat 6480
cgactgtggc cggctgggtg tggcggaccg ctatcaggac atagcgttgg ctaccctgta 6540
tattgctgaa gagcttggcg gcgaatgggc tgaccgcttc ctctgtcttt acggtatcgc 6600
cgctcccgat tcgcagcgca tcgccttcta tcgccttctt gacgagttct tctgagcggg 6660
actctggggt tcgaaatgac cgaccaagcg acgcccaccc tgccatcacg agattttcgat 6720
tccaccgccg ccttctatga aagggtgggc ttcggaatcg tttccggga cgccggcttg 6780
atgatcctcc agcgcgggga tctcatgctg gagttcttcg cccaccccg gctcgatccc 6840
ctcgcgagtt gggttcagctg ctgcctgagg ctggacgacc tcgcgagatt ctaccggcag 6900
tgcaaattccg tcggcatcca ggaaaccagc agcggctatc cgcgcatcca tgccccgaa 6960
ctgcaggagt ggggaggcac gatggccgct ttggtcccgg atctttgtga aggaacctta 7020
cttctgtggt gtgacataat tggacaaact acctacagag atttaaagct ctaaggtaaa 7080
tataaaatth ttaagtgtat aatgtgttaa actactgatt ctaattgttt gtgtatttta 7140
gattccaacc tatggaactg atgaatggga gcagtgggtg aatgccttta atgaggaaaa 7200
cctgttttgc tcagaagaaa tgccatctag tgatgatgag gctactgctg actctcaaca 7260
ttctactcct ccaaaaaaga agagaaaggt agaagacccc aaggactttc cttcagaatt 7320
gctaagtttt ttgagtcatg ctgtgttttag taatagaact cttgcttgct ttgctattta 7380
caccacaaag gaaaaagctg cactgctata caagaaaatt atggaaaaat attctgtaac 7440
ctttataagt aggcataaca gttataatca taacatactg ttttttctta ctccacacag 7500
gcatagagtg tctgctatta ataactatgc tcaaaaattg tgtaccttta gctttttaat 7560
ttgtaaaggg gttaataagg aatatttgat gtatagtgcc ttgactagag atcataatca 7620
gccataccac atttgtagag gttttacttg ctttaaaaaa cctcccacac ctccccctga 7680
acctgaaaca taaaatgaat gcaattgttg ttgttaactt gtttattgca gcttataatg 7740
gttacaaata aagcaatagc atcacaaatt tcacaaataa agcatttttt tcaactgcatt 7800
ctagttgtgg tttgtccaaa ctcatcaatg tatcttatca tgtctggatc taataaaaaga 7860
tatttatttt cattagatat gtgtgttggt tttttgtgtg cagtgcctct atctggaggc 7920
caggtagggc tggccttggg ggagggggg gccagaatga ctccaagagc tacaggaagg 7980
caggtcagag accccactgg acaaacagtg gctggactct gcaccataac acacaatcaa 8040
caggggagtg agctggaaat ttgctagc 8068

```

<210> 28

<211> 239

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 28

```

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

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

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

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

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

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

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

```

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 29

<211> 7731

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 29

ttgaagacga	aagggcctcg	tgatacgcct	atTTTTatag	gttaatgtca	tgataataat	60
ggTTTTcttag	acgtcaggtg	gcactTTTcg	gggaaatgtg	cgcggaaccc	ctatttgttt	120
atTTTTctaa	atacattcaa	atatgtatcc	gctcatgaga	caataaccct	gataaatgct	180
tcaataatat	tgaaaaagga	agagtatgag	tattcaacat	ttccgtgtcg	cccttattcc	240
ctTTTTttgcg	gcattTTTgcc	ttcctgTTTT	tgctcaccga	gaaacgctgg	tgaaagtaaa	300
agatgctgaa	gatcagttgg	gtgcacgagt	gggttacatc	gaactggatc	tcaacagcgg	360
taagatcctt	gagagTTTTc	gccccgaaga	acgtTTTTcca	atgatgagca	cttttaaagt	420
tctgctatgt	ggcgcggtat	tatcccgTgt	tgacgcccgg	caagagcaac	tcggtcgccg	480
catacactat	tctcagaatg	acttggtTga	gtactcacca	gtcacagaaa	agcatcttac	540
ggatggcatg	acagtaagag	aattatgcag	tgctgccata	accatgagtg	ataacactgc	600
ggccaactta	cttctgacaa	cgatcggagg	accgaaggag	ctaaccgctt	ttttgcacaa	660
catgggggat	catgtaactc	gccttgatcg	ttgggaaccg	gagctgaatg	aagccatacc	720
aaacgacgag	cgtgacacca	cgatgcctgc	agcaatggca	acaacgttgc	gcaaactatt	780
aactggcgaa	ctacttactc	tagcttcccc	gcaacaatta	atagactgga	tggaggcgga	840
taaagttgca	ggaccacttc	tgcgctcggc	ccttcgggct	ggctggTTta	ttgctgataa	900
atctggagcc	ggtgagcgtg	ggtctcgcg	tatcattgca	gcactggggc	cagatggtaa	960
gcccctcccg	atcgtagtta	tctacacgac	ggggagtcag	gcaactatgg	atgaacgaaa	1020
tagacagatc	gctgagatag	gtgcctcact	gattaagcat	tggttaactgt	cagaccaagt	1080
ttactcatat	atactTTtaga	ttgattTtaa	acttcatttt	taattTtaaaa	ggatctaggt	1140

gaagatcctt	tttgataatc	tcatgaccaa	aatcccttaa	cgtgagtttt	cgttccactg	1200
agcgtcagac	cccgtagaaa	agatcaaagg	atcttcttga	gatccttttt	ttctgcgcgt	1260
aatctgctgc	ttgcaaacaa	aaaaaccacc	gctaccagcg	gtgggtttgtt	tgccggatca	1320
agagctacca	actctttttc	cgaaggtaac	tggtttcagc	agagcgcaga	taccaaatac	1380
tgtccttcta	gtgtagccgt	agttaggcca	ccacttcaag	aactctgtag	caccgcctac	1440
atacctcgct	ctgctaatac	tgttaccagt	ggctgctgcc	agtggcgata	agtctgtctt	1500
taccgggttg	gactcaagac	gatagttacc	ggataaggcg	cagcgggtcgg	gctgaacggg	1560
gggttcgtgc	acacagccca	gcttgagcg	aacgacctac	accgaactga	gatacctaca	1620
gcgtgagcta	tgagaaagcg	ccacgcttcc	cgaagggaga	aaggcggaca	ggtatccggt	1680
aagcggcagg	gtcggaacag	gagagcgcac	gaggagctt	ccagggggaa	acgcctggta	1740
tctttatagt	cctgtcgggt	ttcgccacct	ctgacttgag	cgtcgatttt	tgtgatgctc	1800
gtcagggggg	cggagcctat	ggaaaaacgc	cagcaacgcg	gcctttttac	ggttcctggc	1860
cttttgctgg	ccttttgctc	acatgttctt	tctgcgtta	tcccctgatt	ctgtggataa	1920
ccgtattacc	gcctttgagt	gagctgatac	cgctcgccgc	agccgaacga	ccgagcgcag	1980
cgagtcagt	agcgaggaag	cggaagagcg	cctgatgcgg	tattttctcc	ttacgcattc	2040
gtgcggtatt	tcacaccgca	tatggtgcac	tctcagtaca	atctgctctg	atgccgcata	2100
gttaagccag	tatacactcc	gctatcgcta	cgtgactggg	tcatggctgc	gccccgacac	2160
ccgccaacac	ccgctgacgc	gccctgacgg	gcttgtctgc	tcccggcatc	cgcttacaga	2220
caagctgtga	ccgtctccgg	gagctgcatg	tgtcagaggt	tttcaccgtc	atcaccgaaa	2280
cgcgcgaggc	agcatgcatc	tcaattagtc	agcaaccata	gtcccgcgcc	taactccgcc	2340
catcccgcgc	ctaactccgc	ccagttccgc	ccattctccg	ccccatggct	gactaatttt	2400
ttttatttat	gcagaggccg	aggccgcctc	ggcctctgag	ctattccaga	agtagtgagg	2460
aggctttttt	ggaggcctag	gcttttgcaa	aaagctagct	tacagctcag	ggctgcgatt	2520
tcgcgccaaa	cttgacggca	atcctagcgt	gaaggctggt	aggattttat	ccccgctgcc	2580
atcatgggtc	gaccattgaa	ctgcatcgtc	gccgtgtccc	aaaatatggg	gattggcaag	2640
aacggagacc	taccctggcc	tccgctcagg	aacgagttca	agtacttcca	aagaatgacc	2700
acaacctctt	cagtgggaag	taaacagaat	ctggtgatta	tgggtaggaa	aacctgggtc	2760
tccattcctg	agaagaatcg	acctttaaag	gacagaatta	atatagttct	cagtagagaa	2820
ctcaaagaac	caccacgagg	agctcatttt	cttgccaaaa	gtttggatga	tgcttaaga	2880
cttattgaac	aaccggaatt	ggcaagtaaa	gtagacatgg	tttggatagt	cggaggcagt	2940
tctgtttacc	aggaagccat	gaatcaacca	ggccacctca	gactctttgt	gacaaggatc	3000
atgcagggaat	ttgaaagtga	cacgtttttc	ccagaaattg	atttggggaa	atataaactt	3060
ctccagaat	acccaggcgt	cctctctgag	gtccaggagg	aaaaaggcat	caagtataag	3120
tttgaagtct	acgagaagaa	agactaacag	gaagatgctt	tcaagttctc	tgctcccctc	3180
ctaaagctat	gcatttttat	aagaccatgg	gacttttgct	ggcttttagat	ctttgtgaag	3240
gaaccttact	tctgtggtgt	gacataattg	gacaaaactac	ctacagagat	ttaaagctct	3300
aaggtaaata	taaaattttt	aagtgtataa	tgtgttaaac	tactgattct	aattgtttgt	3360
gtattttaga	ttccaacct	tggaaactgat	gaatgggagc	agtgggtgaa	tgcttttaat	3420
gaggaaaacc	tgttttgctc	agaagaaatg	ccatctagtg	atgatgaggc	tactgctgac	3480
tctcaacatt	ctactcctcc	aaaaaagaag	agaaaggtag	aagaccccaa	ggactttcct	3540
tcagaattgc	taagtttttt	gagtcatgct	gtgttttagta	atagaactct	tgcttgcttt	3600
gctattttaca	ccacaaagga	aaaagctgca	ctgctataca	agaaaattat	ggaaaaatat	3660
tctgtaacct	ttataagtag	gcataacagt	tataatcata	acatactgtt	tttcttact	3720
ccacacagcg	atagagtgtc	tgctattaat	aactatgctc	aaaaattgtg	tacctttagc	3780
tttttaattt	gtaaaggggt	taataaggaa	tatttgatgt	atagtgcctt	gactagagat	3840
cataatcagc	cataccacat	ttgtagaggt	tttacttgct	ttaaaaaacc	tcccacacct	3900
ccccctgaac	ctgaaacata	aaatgaatgc	aattgttggt	gttaacttgt	ttattgcagc	3960
ttataatggg	tacaaataaa	gcaatagcat	cacaaatttc	acaaataaag	catttttttc	4020
actgcattct	agttgtgggt	tgtccaaact	catcaatgta	tcttatcatg	tctggatcta	4080
ataaaagata	tttattttca	ttagatatgt	gtgttggttt	tttgtgtgca	gtgcctctat	4140
ctggaggcca	ggtagggctg	gccttggggg	agggggaggc	cagaatgact	ccaagagcta	4200
caggaaggca	ggtcagagac	cccactggac	aaacagtggc	tggactctgc	accataacac	4260
acaatcaaca	ggggagttag	ctggaaattt	gctagcgaat	tccagcacac	tgccggccgt	4320
tactagttat	taatagtaat	caattacggg	gtcattagtt	catagcccat	atatggagtt	4380
ccgcgttaca	taacttacgg	taaatggccc	gcctggctga	ccgcccaacg	acccccgcc	4440
attgacgtca	ataatgacgt	atgttcccat	agtaacgcc	atagggactt	tccattgacg	4500
tcaatgggtg	gagtattttac	ggtaaactgc	ccacttggca	gtacatcaag	tgtatcatat	4560
gccaagtacg	ccccctattg	acgtcaatga	cggtaaatgg	ccccctggc	attatgccca	4620
gtacatgacc	ttatgggact	ttcctacttg	gcagtacatc	tacgtattag	tcacgcctat	4680
taccatggtg	atgcggtttt	ggcagttac	caatgggcgt	ggatagcgg	ttgactcacg	4740
gggattttcca	agtctccacc	ccattgacgt	caatgggagt	ttgttttggc	acaaaaatca	4800

acgggacttt	ccaaaatgtc	gtaacaactc	cgccccattg	acgcaaattg	gcggtagggc	4860
tgtacggtgg	gagggtctata	taagcagagc	tcgttttagtg	aaccgtcaga	tcgcctggag	4920
acgccatcca	cgctgttttg	acctccatag	aagacaccgg	gaccgatcca	gcctccgcgg	4980
ccgggaacgg	tgcatggaa	cgcggtattcc	ccgtgccaaag	agtgcgtaa	gtaccgccta	5040
tagagtctat	aggcccaccc	ccttggtctc	ttatgcatgc	tatactgttt	ttggcttggg	5100
gtctatacac	ccccgcttcc	tcattgttata	ggtgatggta	tagcttagcc	tataggtgtg	5160
ggttattgac	cattattgac	cactccccta	ttggtgacga	tactttccat	tactaatcca	5220
taacatggct	ctttgccaca	actctcttta	ttggctatat	gccaatcac	tgtccttcag	5280
agactgacac	ggactctgta	tttttacagg	atgggggtctc	atattattatt	tacaaattca	5340
catatacaac	accaccgtcc	ccagtgtccc	cagtttttat	taaacataac	gtgggatctc	5400
cacgcgaatc	tcgggtacgt	gttccggaca	tgggtctctc	tcggtagcgg	gcggagcttc	5460
tacatccgag	ccctgctccc	atgcctccag	cgactcatgg	tcgctcggca	gtccttctgt	5520
cctaacagtg	gaggccagac	ttaggcacag	cacgatgccc	accaccacca	gtgtgccgca	5580
caaggccgtg	gcggtagggg	atgtgtctga	aaatgagctc	ggggagcggg	cttgaccgcg	5640
tgacgcattt	ggaagactta	aggcagcggc	agaagaagat	gcaggcagct	gagttgttgt	5700
gttctgataa	gagtcagagg	taactcccgt	tgcggtgctg	ttaacgggtg	agggcagctg	5760
agtctgagca	gtactcgttg	ctgccgcgcg	cgccaccaga	cataatagct	gacagactaa	5820
cagactgttc	ctttccatgg	gtcttttctg	cagtcaccgt	ccttgacacg	cgtctcggga	5880
agcttgccgc	caccatggga	tggagctggg	tctttctctt	tctcctgtca	ggaactgcag	5940
gtgtcctctc	tgaggtccag	ctgcaacagt	ctggacctga	gctggtgaag	cctggggctt	6000
cagtaaagat	gtcctgcaag	acttctagat	acacattcac	tgaatacacc	atacactggg	6060
tgagacagag	ccatggaaaag	agccttgagt	ggattggagg	tattaatcct	aacaatggta	6120
ttcctaacta	caaccagaag	ttcaagggca	gggccacatt	gactgtaggc	aagtcctcca	6180
gcaccgccta	catggagctc	cgcagcctga	catctgagga	ttctgcggtc	tatttctgtg	6240
caagaagaag	aatcgcctat	ggttacgacg	agggccatgc	tatggactac	tggggcaag	6300
gaacctcagt	caccgtctcc	tcaggtgagt	ggatcctctg	cgcctgggcc	cagctctgtc	6360
ccacaccgcg	gtcacatggc	accacctctc	ttgcagcctc	caccaagggc	ccatcggctc	6420
tccccctggc	accctcctcc	aagagcacct	ctgggggcac	agcggccctg	ggctgcctgg	6480
tcaaggacta	cttccccgaa	ccggtgacgg	tgtcgtggaa	ctcaggcgcc	ctgaccagcg	6540
gcgtgcacac	cttccccggt	gtcctacagt	cctcaggact	ctactccctc	agcagcgtgg	6600
tgaccgtgcc	ctccagcagc	ttgggcaccc	agacctacat	ctgcaacgtg	aatcacaaag	6660
ccagcaacac	caaggtggac	aagaaaagtg	agcccaaate	ttgtgacaaa	actcacacat	6720
gccccacgtg	cccagcacct	gaactcctgg	ggggaccgtc	agtcttcttc	ttccccccaa	6780
aacccaagga	cacctcatg	atctcccggg	cccctgaggt	cacatgcgtg	gtggtggacg	6840
tgagccacga	agaccctgag	gtcaagttca	actggtacgt	ggacggcgtg	gaggtgcata	6900
atgccaaagc	aaagccgcgg	gaggagcagt	acaacagcac	gtaccgggtg	gtcagcgtcc	6960
tcaccgtcct	gcaccaggac	tggctgaatg	gcaaggagta	caagtgcagg	gtctccaaca	7020
aagccctccc	agcccccatc	gagaaaacca	tctccaaagc	caaagggcag	ccccgagaac	7080
cacaggtgta	caccctgccc	ccatcccggg	aggagatgac	caagaaccag	gtcagcctga	7140
cctgcctggg	caaaggcttc	tatcccagcg	acatcgccgt	ggagtgggag	agcaatgggc	7200
agccggagaa	caactacaag	accacgcctc	ccgtgctgga	ctccgacggc	tccttcttcc	7260
tctacagcaa	gtcaccgtg	gacaagagca	ggtggcagca	ggggaacgtc	ttctcatgct	7320
ccgtgatgca	tgaggctctg	cacaaccact	acacgcagaa	gagcctctcc	ctgtctccgg	7380
gtaaattgagt	gcgacggccg	gcaagccccg	ctccccgggc	tctcgcggtc	gcacgaggat	7440
gcttggcacg	tacccccgtg	acatacttcc	cgggcgcccc	gcatggaaat	aaagcaccgg	7500
atctaataaa	agatatttat	tttcattaga	tatgtgtgtt	ggttttttgt	gtgcagtgcc	7560
tctatctgga	ggccaggtag	ggctggcctt	gggggagggg	gaggccagaa	tgactccaag	7620
agctacagga	aggcaggtca	gagacccac	tggacaaaca	gtggctggac	tctgcaccat	7680
aacacacaat	caacagggga	gtgagctgga	aatttgctag	cgaattaatt	c	7731

<210> 30

<211> 472

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 30

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

- 95 -

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
325 330 335

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
340 345 350

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
355 360 365

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
370 375 380

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
385 390 395 400

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
405 410 415

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
420 425 430

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
435 440 445

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
450 455 460

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

<210> 31

<211> 339

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 31

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

<210> 32

<211> 113

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 32

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

Lys

<210> 33

<211> 113

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 33

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

Lys

<210> 34

<211> 113

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 34

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

Lys

<210> 35

<211> 8068

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 35

gaattccagc	acactggcgg	ccgttactag	ttattaatag	taatcaatta	cgggggtcatt	60
agttcatagc	ccatatatgg	agttccgcgt	tacataactt	acggtaaagt	gcccgcctgg	120
ctgaccgccc	aacgaccccc	gccattgac	gtcaataatg	acgtatgttc	ccatagtaac	180
gccaataggg	actttccatt	gacgtcaatg	ggtggagtat	ttacggtaaa	ctgcccactt	240
ggcagtagat	caagtgtatc	atatgccaa	tacgccccct	attgacgtca	atgacggtaa	300
atggcccgcg	tggcattatg	cccagtagat	gaccttatgg	gactttccta	cttggcagta	360
catctacgta	ttagtcatcg	ctattacat	ggtgatgcgg	ttttggcagt	acatcaatgg	420
gcgtggatag	cggtttgact	cacggggatt	tccaagtctc	caccccatgg	acgtcaatgg	480
gagtttggtt	tggcaccaaa	atcaacggga	ctttccaaaa	tgtcgttaaca	actccgcccc	540
attgacgcaa	atgggcggta	ggcgtgtacg	gtgggaggtc	tatataagca	gagctcgttt	600
agtgaaccgt	cagatcgcc	ggagacgcca	tccacgctgt	tttgacctcc	atagaagaca	660
ccgggaccga	tccagcctcc	gcggccggga	acgggtgcatt	ggaacgcgga	ttccccgtgc	720
caagagtgcg	gtaagtaccg	cctatagagt	ctataggccc	accccttggt	cttcttatgc	780

atgctatact	gttttttggt	tgggggtctat	acacccccgc	ttcctcatgt	tataggtgat	840
ggtatagctt	agcctatagg	tgtgggttat	tgaccattat	tgaccactcc	cctattgggtg	900
acgatacttt	ccattactaa	tccataacat	ggctctttgc	cacaactctc	tttattggct	960
atatgccaat	acactgtcct	tcagagactg	acacggactc	tgtattttta	caggatgggg	1020
tctcatttat	tatttacaaa	ttcacatata	caacaccacc	gtccccagt	cccgcagttt	1080
ttattaaaca	taacgtggga	tctccacgcg	aatctcgggt	acgtgttccg	gacatgggct	1140
cttctccggt	agcggcggag	cttctacatc	cgagccctgc	tcccatgcct	ccagcgactc	1200
atggtcgctc	ggcagctcct	tgctcctaac	agtggaggcc	agacttaggc	acagcacgat	1260
gcccaccacc	accagtgtgc	cgcacaaggc	cgtggcggta	gggtatgtgt	ctgaaaatga	1320
gctcggggag	cgggcttgca	ccgctgacgc	atttggaaga	cttaaggcag	cggcagaaga	1380
agatgcaggc	agctgagttg	ttgtgttctg	ataagagtca	gaggtaactc	ccgttgcggt	1440
gctgttaacg	gtggagggca	gtgtagtctg	agcagtactc	gttgctgccg	cgcgcgccac	1500
cagacataat	agctgacaga	ctaacagact	gttcctttcc	atgggtcttt	tctgcagtca	1560
ccgtccttga	cacgcgtctc	gggaagcttg	ccgccaccat	ggagacagac	acactcctgc	1620
tatgggtgct	gctgctctgg	gttccaggtt	cctccggaga	cattgtgatg	acccaatctc	1680
cagactcttt	ggctgtgtct	ctaggggaga	gggccaccat	caactgcaag	tccagtcaga	1740
gcctttttata	ttctagaaat	caaaagaact	acttggcctg	gtatcagcag	aaaccaggac	1800
agccacccaa	actcctcatc	ttttgggcta	gcactaggga	atctggggta	cctgataggt	1860
tcagtggcag	tgggttttgg	acagacttca	ccctcaccat	tagcagcctg	caggctgaag	1920
atgtggcagt	ttattactgt	cagcaatatt	ttagctatcc	gctcacgttc	ggacaaggga	1980
ccaaggtgga	aataaaacgt	gagtggatcc	atctgggata	agcatgctgt	tttctgtctg	2040
tccctaacat	gccctgtgat	tatgcgcaaa	caacacaccc	aagggcagaa	ctttgttact	2100
taaacaccat	cctgttttgc	tcttttctca	ggaactgtgg	ctgcaccatc	tgtcttcac	2160
ttcccgccat	ctgatgagca	gttgaaatct	ggaactgcct	ctgttgtgtg	cctgtcgaat	2220
aactttctatc	ccagagaggc	caaagtacag	tggaaagggtg	ataacgccct	ccaactcgggt	2280
aactcccagg	agagtgtcac	agagcaggag	agcaaggaca	gcacctacag	cctcagcagc	2340
accctgacgc	tgagcaaaag	agactacgag	aaacacaaaag	tctacgcctg	cgaagtcacc	2400
catcaggggc	tgagctcgcc	cgtcacaaaag	agcttcaaca	ggggagagt	ttagaggggag	2460
aagtgccecc	acctgctcct	cagttccagc	ctgacccctc	cccctccttt	ggcctctgac	2520
ccctttttcca	caggggacct	acccctattg	cggctctcca	gctcatcttt	cacctcacc	2580
ccctcctcct	ccttggtctt	aattatgcta	atgttggagg	agaatgaata	aataaagtga	2640
atctttgcac	ctgtggtgga	tctaataaaa	gatattttat	ttcattagat	atgtgtgttg	2700
gtttttttgtg	tgcagtgcct	ctatctggag	gccaggtagg	gctggccttg	ggggaggggg	2760
aggccagaat	gactccaaga	gctacaggaa	ggcaggtcag	agacccact	ggacaaaacag	2820
tggctggact	ctgcaccata	acacacaatc	aacaggggag	tgagctggaa	atttgctagc	2880
gaattcttga	agacgaaagg	gcctcgtgat	acgcctatct	ttataggtta	atgtcatgat	2940
aataatgggt	tcttagacgt	caggtggcac	ttttcgggga	aatgtgcgcg	gaacccctat	3000
ttgtttatct	ttctaataac	attcaaatat	gtatccgctc	atgagacaat	aacctgata	3060
aatgcttcaa	taatattgaa	aaaggaagag	tatgagtatt	caacatttcc	gtgtcgccct	3120
tattcccttt	tttgcgcat	tttgcccttc	tgtttttgct	caccagaaa	cgctgggtga	3180
agtaaaagat	gctgaagatc	agttgggtgc	acgagtgggt	tacatcgaac	tggatctcaa	3240
cagcggtaag	atccttgaga	gttttcgccc	cgaagaacgt	tttccaatga	tgagcacttt	3300
taaagtctctg	ctatgtggcg	cggattatct	ccgtgttgac	gccgggcaag	agcaactcgg	3360
tcgccgcata	cactattctc	agaatgactt	ggttgagtac	tcaccagtca	cagaaaagca	3420
tcttacggat	ggcatgacag	taagagaatt	atgtagtgct	gccataacca	tgagtataa	3480
cactgcggcc	aacttacttc	tgacaacgat	cggaggaccg	aaggagctaa	ccgctttttt	3540
gcacaacatg	ggggatcatg	taactcgcct	tgatcgttgg	gaaccggagc	tgaatgaagc	3600
cataccaaac	gacgagcgtg	acaccacgat	gcctgcagca	atggcaacaa	cgttgcgcaa	3660
actattaact	ggcgaactac	ttactctagc	ttcccgga	caattaatag	actggatgga	3720
ggcggataaa	gttgaggac	cacttctgcg	ctcgccctt	ccggctggct	ggtttattgc	3780
tgataaatct	ggagccggtg	agcgtgggtc	tcgcggtatc	attgcagcac	tggggccaga	3840
tggtaagccc	tcccgtatcg	tagttatcta	cacgacgggg	agtcaggcaa	ctatggatga	3900
acgaaataga	cagatcgctg	agataggtgc	ctcactgatt	aagcattgggt	aactgtcaga	3960
ccaagtttac	tcatatatac	tttagattga	tttaaaactt	catttttaat	ttaaaaggat	4020
ctaggtgaag	atcctttttg	ataatctcat	gacaaaaatc	ccttaacgtg	agttttcggt	4080
ccactgagcg	tcagaccccg	tagaaaagat	caaaggatct	tcttgagatc	ctttttttct	4140
gcgcgtaatc	tgctgcttgc	aaacaaaaaa	accaccgcta	ccagcgggtg	tttgtttgcc	4200
ggatcaagag	ctaccaactc	tttttccgaa	ggtaactggc	ttcagcagag	cgcagatacc	4260
aaatactgtc	cttctagtgt	agccgtagtt	aggccaccac	ttcaagaact	ctgtagcacc	4320
gcctacatac	ctcgctctgc	taatcctggt	accagtggct	gctgccagtg	gcgataagtc	4380

gtgtcttacc	gggttgact	caagacgata	gttaccggat	aaggcgagc	ggctcgggctg	4440
aacggggggt	tcgtgcacac	agcccagctt	ggagcgaacg	acctacaccg	aactgagata	4500
cctacagcgt	gagctatgag	aaagcgccac	gcttcccga	gggagaaagg	cggacaggta	4560
tccggtaagc	ggcagggctg	gaacaggaga	gcgcacgagg	gagcttccag	ggggaaacgc	4620
ctgggtatctt	tatagtcctg	tcgggtttcg	ccacctctga	cttgagcgtc	gattttttgtg	4680
atgctcgtca	ggggggcgga	gcctatggaa	aaacgccagc	aacgcggcct	ttttacggtt	4740
cctggccttt	tgctggcctt	ttgctcacat	gttcttttct	gcgttatccc	ctgattctgt	4800
ggataaccgt	attaccgcct	ttgagtggagc	tgataccgct	cgccgcagcc	gaacgaccga	4860
gcgcagcgag	tcagtggagc	aggaagcgga	agagcgccctg	atgcggtatt	ttctccttac	4920
gcatctgtgc	ggatatttcac	accgcatactg	gtgcactctc	agtacaatct	gctctgatgc	4980
cgcatagtta	agccagtata	cactccgcta	tcgctacgtg	actgggtcat	ggctgcgccc	5040
cgacacccgc	caacacccgc	tgacgcgccc	tgacgggctt	gtctgctccc	ggcatccgct	5100
tacagacaag	ctgtgaccgt	ctccgggagc	tgcatgtgtc	agaggttttc	accgtcatca	5160
ccgaaacgcg	cgaggcgagc	gtggaatgtg	tgctagttag	gggtgtggaaa	gtccccaggc	5220
tccccagcag	gcagaagtat	gcaaagcatg	catctcaatt	agtcagcaac	caggctcccc	5280
agcaggcaga	agtatgcaaa	gcatgcatct	caattagtca	gcaaccatag	ttccgcctct	5340
aactccgccc	atcccgcccc	taactccgcc	cagttccgcc	cattctccgc	cccatggctg	5400
actaattttt	tttattttatg	cagaggccga	ggccgcctcg	gcctctgagc	tattccagaa	5460
gtagtgagga	ggctttttttg	gaggccctagg	cttttgcaaa	aagctagctt	cacgctgccg	5520
caagcactca	gggcgcaagg	gctgctaaag	gaagcggaac	acgtagaaaag	ccagtcgcga	5580
gaaacggtgc	tgacccccgga	tgaatgtcag	ctactgggct	atctggacaa	gggaaaacgc	5640
aagcgcaaaag	agaaagcagg	tagcttgagc	tgggcttaca	tggcgatagc	tagactgggc	5700
gggttttatgg	acagcaagcg	aaccggaatt	gccagctggg	gcgccctctg	gtaaggttgg	5760
gaagccctgc	aaagtaaact	ggatggcttt	cttgcccgcca	aggatctgat	ggcgaggggg	5820
atcaagatct	gatcaagaga	caggatgagg	atcgtttcgc	atgattgaac	aagatggatt	5880
gcacgcaggt	tctccggccg	cttgggtgga	gaggctattc	ggctatgact	gggcacaaca	5940
gacaatcggc	tgctctgatg	ccgctgctt	ccgctgtca	gcgcaggggc	gcccgttct	6000
ttttgtcaag	accgacctgt	ccggtgccct	gaatgaactg	caggacgagg	cagcgcggt	6060
atcgtggctg	gccacgacgg	gcgttccctg	gcgagctgtg	ctcgacgttg	tactgaagc	6120
gggaaggagc	tggtctgctat	tgggcgaaat	gccggggcag	gatctcctgt	catctcacct	6180
tgctcctgcc	gagaaaagtat	ccatcatggc	tgatgcaatg	cggcggtgc	atacgcttga	6240
tccggctacc	tgccccattcg	accaccaagc	gaaacatcgc	atcgagcgag	cacgtactcg	6300
gatggaagcc	ggtcttgtcg	atcaggatga	tctggacgaa	gagcatcagg	ggctcgcgcc	6360
agccgaactg	ttcgccaggc	tcaaggcgcg	catgcccgcg	ggcgaggatc	tcgtcgtgac	6420
ccatggcgat	gcctgcttgc	cgaatatcat	ggtggaaaaat	ggccgctttt	ctggattcat	6480
cgactgtggc	cggctgggtg	tggcggaccg	ctatcaggac	atagcgttgg	ctaccctgta	6540
tattgctgaa	gagcttggcg	gcgaatgggc	tgaccgcttc	ctcgtgcttt	acggtatcgc	6600
cgctcccgat	tcgcagcgca	tcgccttcta	tcgccttctt	gacgagttct	tctgagcggg	6660
actctggggg	tcgaaatgac	cgaccaagcg	acgcccaccc	tgccatcacg	agatttctgat	6720
tccaccgccc	ccttctatga	aaggttgggc	ttcggaatcg	ttttccggga	cgccggctgg	6780
atgatcctcc	agcgcgggga	tctcatgctg	gagttcttcg	cccaccccg	gctcgatccc	6840
ctcgcgagtt	ggttcagctg	ctgcctgagg	ctggacgacc	tcgcgaggtt	ctaccggcag	6900
tgcaaatccg	tcggcatcca	ggaaaccagc	agcggctatc	cgcgcatcca	tgcccccgaa	6960
ctgcaggagt	ggggaggcac	gatggccgct	ttggtcccg	atctttgtga	aggaacctta	7020
cttctgtggt	gtgacataat	tggacaaact	acctacagag	atttaaagct	ctaaggttaa	7080
tataaaattt	ttaagtgtat	aatgtgttaa	actactgatt	ctaattgttt	gtgtatttta	7140
gattccaacc	tatggaactg	atgaatggga	gcagtggtgg	aatgccttta	atgaggaaaa	7200
cctgttttgc	tcagaagaaa	tgccatctag	tgatgatgag	gctactgctg	actctcaaca	7260
ttctactcct	ccaaaaaaga	agagaaagg	agaagacccc	aaggactttc	cttcagaatt	7320
gctaagtttt	ttgagtcag	ctgtgtttag	taatagaact	cttgcttgct	ttgctattta	7380
caccacaaag	gaaaaagctg	cactgctata	caagaaaatt	atggaaaaat	attctgtaac	7440
ctttataagt	aggcataaca	gttataatca	taacatactg	ttttttctta	ctccacacag	7500
gcatagagt	tctgctatta	ataactatgc	tcaaaaattg	tgtaccttta	gctttttaat	7560
ttgtaaaggg	gttaataagg	aataattgat	gtatagtggc	ttgactagag	atcataatca	7620
gccataccac	atgtgtagag	gttttacttg	ctttaaaaaa	cctccacac	ctccccctga	7680
acctgaaaca	taaaatgaat	gcaattgttg	ttgttaactt	gtttattgca	gcttataatg	7740
gttacaaata	aagcaatagc	atcacaaatt	tcacaaataa	agcatttttt	tactgcatt	7800
ctagtgtgtg	tttgtccaaa	ctcatcaatg	tatcttatca	tgtctggatc	taataaaaaga	7860
tatttatattt	cattagatat	gtgtgtttgg	tttttgtgtg	cagtgcctct	atctggaggc	7920
caggtagggc	tggccttggg	ggagggggg	gccagaatga	ctccaagagc	tacaggaagg	7980
caggtcagag	acccactgg	acaaacagtg	gctggactct	gcaccataac	acaaatcaa	8040
caggggagtg	agctgaaat	ttgctagc				8068

<210> 36

<211> 234

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 36

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

<210> 37

<211> 372

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 37

```
cagggtgcaac tagtgcagtc cggcgccgaa gtgaagaaac ccggtgcttc cgtgaaagtc 60
agctgtaaaa ctagtagata caccttcact gaatacacca tacactgggt tagacaggcc 120
cctggccaaa ggctggagtg gataggaggt attaataccta acaatgggtat tcctaactac 180
aaccagaagt tcaagggccg ggccaccttg accgtaggca agtctgccag caccgcctac 240
atggaactgt ccagcctgcg ctccgaggac actgcagtct actactgcmc cagaagaaga 300
atcgccatg gttacgacga gggccatgct atggactact ggggtcaagg aacccttgtc 360
accgtctcct ca 372
```

<210> 38

<211> 124

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 38

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 39

<211> 124

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 39

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

<210> 40

<211> 124

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 40

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

```

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

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

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

```

<210> 41

<211> 124

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 41

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

<210> 42

<211> 7731

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 42

ttgaagacga	aagggcctcg	tgatacgcct	atTTTTatag	gttaatgtca	tgataataat	60
ggTTTTcttag	acgtcaggtg	gcactTTTTcg	gggaaatgtg	cgcggaaccc	ctatttgttt	120
atTTTTctaa	atacattcaa	atatgtatcc	gctcatgaga	caataaccct	gataaatgct	180
tcaataatat	tgaaaaagga	agagtatgag	tattcaacat	ttccgtgtcg	cccttattcc	240
ctTTTTtgcg	gcattttgcc	ttcctgTTTT	tgctcaccca	gaaacgctgg	tgaaagtaaa	300
agatgctgaa	gatcagttgg	gtgcacgagt	gggttacatc	gaactggatc	tcaacagcgg	360
taagatcctt	gagagttttc	gccccgaaga	acgttttcca	atgatgagca	cttttaaagt	420
tctgctatgt	ggcgcggtat	tatcccgtgt	tgacgccggg	caagagcaac	tcggtcgccg	480
catacactat	tctcagaatg	acttggttga	gtactcacca	gtcacagaaa	agcatcttac	540
ggatggcatg	acagtaagag	aattatgcag	tgctgccata	accatgagtg	ataacactgc	600
ggccaactta	cttctgacaa	cgatcgagg	accgaaggag	ctaaccgctt	ttttgcacaa	660
catgggggat	catgtaactc	gccttgatcg	ttgggaaccg	gagctgaatg	aagccatacc	720
aaacgacgag	cgtgacacca	cgatgcctcg	agcaatggca	acaacgttgc	gcaaaactatt	780
aaactggcgaa	ctacttactc	tagcttcccc	gcaacaatta	atagactgga	tgagggcgga	840
taaagttgca	ggaccacttc	tgcgctcggc	ccttccggct	ggctggttta	ttgctgataa	900
atctggagcc	ggtgagcgtg	ggtctcgcg	tatcattgca	gcactggggc	cagatggtaa	960
gccctcccgt	atcgtagtta	tctacacgac	ggggagtcag	gcaactatgg	atgaacgaaa	1020
tagacagatc	gctgagatag	gtgcctcact	gattaagcat	tggttaactgt	cagaccaagt	1080
ttactcatat	atacttttaga	ttgatttaaa	acttcatttt	taatttaaaa	ggatctaggt	1140
gaagatcctt	tttgataatc	tcatgaccaa	aatcccttaa	cgtgagtttt	cgttccactg	1200
agcgtcagac	cccgtagaaa	agatcaaagg	atcttcttga	gatccttttt	ttctgcgctg	1260
aatctgctgc	ttgcaaacaa	aaaaaccacc	gctaccagcg	gtggtttggt	tgccggatca	1320
agagctacca	actctttttc	cgaaggtaac	tggcttcagc	agagcgcaga	taccaaaatac	1380
tgctcttcta	gtgtagccgt	agttaggcca	ccacttcaag	aactctgtag	caccgcctac	1440
atacctcgct	ctgctaattc	tgttaccagt	ggctgctgcc	agtggcgata	agtcgtgtct	1500
taccgggttg	gactcaagac	gatagttacc	ggataaggcg	cagcggtcgg	gctgaacggg	1560
gggttcgtgc	acacagccca	gcttgagcgc	aacgacctac	accgaactga	gatacctaca	1620
gcgtgagcta	tgagaaagcg	ccacgcttcc	cgaagggaga	aaggcggaca	ggtatccggt	1680
aagcggcagg	gtcggaacag	gagagcgcac	gaggagcctt	ccagggggaa	acgcctggta	1740
tctttatagt	cctgtcgggg	ttcgccacct	ctgacttgag	cgtcgatttt	tgtgatgctc	1800
gtcagggggg	cggagcctat	ggaaaaacgc	cagcaacgcg	gcctttttac	ggttcctggc	1860
cttttgctgg	cttttgctc	acatgttctt	tcctgcgtta	tcccctgatt	ctgtggataa	1920
ccgtattacc	gcctttgagt	gagctgatac	cgctcgccgc	agccgaacga	ccgagcgcag	1980
cgagtcagtg	agcgagggaag	cggaagagcg	cctgatgcgg	tattttctcc	ttacgcatct	2040
gtgcggtatt	tcacaccgca	tatggtgcac	tctcagtaca	atctgctctg	atgccgcata	2100
gttaagccag	tatacactcc	gctatcgcta	cgtgactggg	tcatggctgc	gccccgacac	2160
ccgccaaac	ccgctgacgc	gccctgacgg	gcttgtctgc	tcccggcatc	cgcttacaga	2220
caagctgtga	ccgtctccgg	gagctgcatg	tgtcagaggt	tttcaccgct	atcaccgaaa	2280
cgcgcgaggc	agcatgcate	tcaattagtc	agcaaccata	gtcccgcgcc	taactccgcc	2340
catcccgcgc	ctaactccgc	ccagttccgc	ccattctccg	ccccatggct	gactaatttt	2400
ttttatttat	gcagaggccg	aggccgcctc	ggcctctgag	ctattccaga	agtagtgagg	2460
aggctttttt	ggaggccctag	gcttttgcaa	aaagctagct	tacagctcag	ggctgcgatt	2520
tcgcgccaaa	cttgacggca	atcctagcgt	gaaggctgg	aggattttat	ccccgctgcc	2580
atcatggttc	gaccattgaa	ctgcatcgtc	gccgtgtccc	aaaatatggg	gattggcaag	2640
aacggagacc	taccctggcc	tccgctcagg	aacgagttca	agtacttcca	aagaatgacc	2700
acaacctctt	cagtgggaag	taaacagaat	ctggtgatta	tgggtaggaa	aacctggttc	2760
tccattcctg	agaagaatcg	acctttaaag	gacagaatta	atatagttct	cagtagagaa	2820
ctcaaagaac	caccacgagg	agctcatttt	cttgccaaaa	gtttggatga	tgcccttaaga	2880
cttattgaac	aaccggaatt	ggcaagttaa	gtagacatgg	tttggatagt	cggaggcagt	2940
tctgtttacc	aggaagccat	gaatcaacca	ggccacctca	gactctttgt	gacaaggatc	3000
atgcaggaa	ttgaaagtga	cacgtttttc	ccagaaattg	atgtggggaa	atataaactt	3060
ctcccagaat	accagggcgt	cctctctgag	gtccaggagg	aaaaaggcat	caagtataag	3120
tttgaagtct	acgagaagaa	agactaacag	gaagatgctt	tcaagttctc	tgctcccctc	3180
ctaaagctat	gcatttttat	aagaccatgg	gacttttgct	ggcttttagat	ctttgtgaag	3240

gaaccttact	tctgtggtgt	gacataattg	gacaaactac	ctacagagat	ttaaagctct	3300
aaggtaaata	taaaattttt	aagtgtataa	tgtgttaaac	tactgattct	aattgtttgt	3360
gtattttaga	ttccaacctt	tggaaactgt	gaatgggagc	agtgggtgaa	tgcttttaac	3420
gaggaaaacc	tgttttgctc	agaagaaatg	ccatctagt	atgatgaggc	tactgtgac	3480
tctcaacatt	ctactcctcc	aaaaaagaag	agaaaggtag	aagaccccaa	ggactttcct	3540
tcagaattgc	taagtttttt	gagtcattgt	gtgttttagta	atagaactct	tgcttgcttt	3600
gctattttaca	ccacaaagga	aaaagctgca	ctgctataca	agaaaattat	ggaaaaatat	3660
tctgtaacct	ttataagtag	gcataacagt	tataatcata	acatactgtt	ttttcttact	3720
ccacacaggc	atagagtgtc	tgctattaat	aactatgctc	aaaaattgtg	taccttttagc	3780
tttttaattt	gtaaaggggt	taataaggaa	tatttgatgt	atagtgcctt	gactagagat	3840
cataatcagc	cataccacat	ttgtagaggt	tttacttgct	ttaaaaaacc	tcccacacct	3900
ccccctgaac	ctgaaacata	aatgaatgc	aattgttgtt	gttaacttgt	ttattgcagc	3960
ttataatggt	tacaaataaa	gcaatagcat	cacaaatttc	acaaataaaag	catttttttc	4020
actgcattct	agttgtggtt	tgtccaaact	catcaatgta	tcttatcatg	tctggatcta	4080
ataaaagata	tttattttca	ttagatatgt	gtgttggttt	tttgtgtgca	gtgcctctat	4140
ctggaggcca	ggtagggctg	gccttggggg	agggggaggc	cagaatgact	ccaagagcta	4200
caggaaggca	ggtcagagac	cccactggac	aaacagtggc	tggaactctg	accataacac	4260
acaatcaaca	ggggagttag	ctggaaattt	gtcagcgaat	tccagcacac	tgggggccgt	4320
tactagttaa	taactgtacg	caattacggg	gtcattagtt	catagcccat	atatggagtt	4380
ccgcgttaca	taacttacgg	taaattggcc	gcctggctga	ccgccaacg	accccgccc	4440
attgacgtca	ataatgacgt	atgttcccat	agtaacgcca	atagggactt	tccattgacg	4500
tcaatgggtg	gagtattttac	ggtaaactgc	ccacttgcca	gtacatcaag	tgtatcatat	4560
gccaagtacg	ccccctattg	acgtcaatga	cggtaaattg	cccgcctggc	attatgccc	4620
gtacatgacc	ttatgggact	ttcctacttg	gcagtacatc	tacgtattag	tcatcgctat	4680
taccatggtg	atgcggtttt	ggcagtacat	caatgggctg	ggatagcggg	ttgactcacg	4740
gggattttcca	agtctccacc	ccattgacgt	caatgggagt	ttgttttggc	acaaaaatca	4800
acgggacttt	ccaaaatgct	gtaacaactc	cgccccattg	acgcaaatgg	gcggtaggcg	4860
tgtacgggtg	gaggtctata	taagcagagc	tcgttttagtg	aaccgtcaga	tcgcctggag	4920
acgccatcca	cgctgttttg	acctccatag	aagacaccgg	gaccgatcca	gcctccgcgg	4980
ccgggaacgg	tgcatgtgaa	cgcggtattc	ccgtgccaa	agtgcgttaa	gtaccgccta	5040
tagagtctat	aggccccccc	ccttggcttc	ttatgcatgc	tatactgttt	ttggcttggg	5100
gtctatacac	ccccgcttcc	tcatgttata	ggtgatggta	tagcttagcc	tataggtgtg	5160
ggttattgac	cattattgac	cactccccta	ttggtgacga	tactttccat	tactaatcca	5220
taacatggct	ctttgccaca	actctcttta	ttggctatat	gccaatacac	tgtccttcag	5280
agactgacac	ggactctgta	tttttacagg	atggggctct	atttattatt	tacaaattca	5340
catatacaac	accaccgtcc	ccagtgtccc	cagtttttat	taaacataac	gtgggatctc	5400
cacgcgaatc	tcgggtacgt	gttccggaca	tgggctcttc	tccggtagcg	gcggagcttc	5460
tacactccag	ccctgtctcc	atgcctccag	cgactcatgg	tcgctcgcca	gtccttgct	5520
cctaacagtg	gaggccagac	ttaggcacag	cacgatgccc	accaccacca	gtgtgcccga	5580
caaggccgtg	gcggtagggg	atgtgtctga	aaatgagctc	ggggagcggg	cttgcaaccg	5640
tgacgcattt	ggaagactta	aggcagcggc	agaagaagat	gcaggcagct	gagttgttgt	5700
gttctgataa	gagtcagagg	taactcccg	tgcggtgctg	ttaacggtgg	agggcaggtg	5760
agtctgagca	gtactcgttg	ctgccgcg	cgccaccaga	cataatagct	gacagactaa	5820
cagactgttc	ctttccatgg	gtcttttctg	cagtcaccgt	ccttgacacg	cgtctcggga	5880
agcttgccgc	caccatggac	tggacctggc	gcgtgttttg	cctgctcgcc	gtggctcctg	5940
gggccacag	ccaggtgcaa	ctggtgcagt	ccggcgccga	agtgaagaaa	cccgggtgct	6000
ccgtgaaagt	cagctgtaaa	actagtagat	acaccttcac	tgaatacacc	atacactggg	6060
ttagacaggc	ccctggccaa	aggctggagt	ggataggagg	tattaatcct	aacaatggta	6120
ttcctaacta	caaccagaag	ttcaagggcc	gggccacctt	gaccgtaggc	aagtctgcca	6180
gcaccgccta	catggaactg	tccagcctgc	gctccgagga	cactgcagtc	tactactgcg	6240
ccagaagaag	aatcgccctat	ggttacgacg	agggccatgc	tatggactac	tggggccaag	6300
gaaccttgt	caccgtctcc	tcaggtgagt	ggatcctctg	cgcttgggcc	cagctctgtc	6360
ccacaccgcg	gtcacatggc	accacctctc	ttgcagcctc	caccaagggc	ccatcggtct	6420
tccccctggc	accctcctcc	aagagcacct	ctgggggcac	agcgccctg	ggctgcctgg	6480
tcaaggacta	cttccccgaa	ccggtgacgg	tgtcgtggaa	ctcaggcgcc	ctgaccagcg	6540
gcgtgcacac	cttcccggct	gtcctacagt	cctcaggact	ctactccctc	agcagcgtgg	6600
tgacctgtcc	ctccagcagc	ttgggcaccc	agacctacat	ctgcaacgtg	aatcacagct	6660
ccagcaacac	caaggtggag	aagaaaagttg	agcccaaattc	ttgtgacaaa	actcacacat	6720
gcccaccgtg	cccagcacct	gaactcctgg	ggggaccgtc	agtcttcctc	ttcccccaa	6780
aacccaagga	cacctctcatg	atctcccggg	cccctgaggt	cacatgcgtg	gtgggtggacg	6840
tgagccacga	agacctgtag	gtcaagttca	actggtacgt	ggacggcggtg	gaggtgcata	6900
atgccaagac	aaagccgcgg	gaggagcagt	acaacagcac	gtaccgggtg	gtcagcgtcc	6960
tcaccttct	gcaccaggac	tggctgaatg	gcaaggagta	caagtgcag	gtctccaaca	7020

```

aagccctccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac 7080
cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg aggagatgac caagaaccag gtcagcctga 7140
cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc 7200
agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttcc 7260
tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct 7320
ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg 7380
gtaaatgagt gcgacggccg gcaagccccg ctccccgggc tctcgcggtc gcacgaggat 7440
gcttggcacg taccctctgt acatacttcc cgggcgccca gcatggaaat aaagcaccgg 7500
atctaataaa agatatattat tttcattaga tatgtgtgtt ggttttttgt gtgcagtgcc 7560
tctatctgga ggccaggtag ggctggcctt gggggagggg gagggcagaa tgactccaag 7620
agctacagga aggcaggtca gagacccac tggacaaaca gtggctggac tctgcaccat 7680
aacacacaat caacagggga gtgagctgga aatttgctag cgaattaatt c 7731

```

<210> 43

<211> 472

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 43

```

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

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

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

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

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

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Gly Lys Ser Ala Ser
      85             90             95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
      100            105            110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Arg Ile Ala Tyr Gly Tyr Asp Glu Gly His
      115            120            125

Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ser
      130            135            140

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
      145            150            155            160

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
      165            170            175

```

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

<210> 44

<211> 25

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 44

accgtctcct caggtgagtg gatcc

25

<210> 45

<211> 14

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 45

cctctcttgc agcc

14

<210> 46

<211> 14

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 46

cctctcttgc agcc

14

<210> 47

<211> 4

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 47

Thr Val Ser Ser

1

<210> 48

<211> 4

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 48

Ser Thr Lys Gly
1

<210> 49

<211> 27

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 49

accgtctcct cagcctccac caagggc

27

<210> 50

<211> 8

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 50

Thr Val Ser Ser Ser Thr Lys Gly
1 5

<210> 51

<211> 27

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 51

accgtctcct cagcctccac caagggc

27

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 52

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
1 5

<210> 53

<211> 22

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 53

gaaataaaaac gtgagtggat cc

22

<210> 54

<211> 27

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 54

cttcttttcct caggaactgt ggctgca

27

<210> 55

<211> 4

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 55

Thr Val Ala Ala
1

<210> 56

<211> 24

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 56

gaaataaaaac gaactgtggc tgca

24

<210> 57

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 57

Glu Ile Lys Thr Val Ala Ala
1 5

<210> 58

<211> 24

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 58

gaaataaaaac gaactgtggc tgca

24

<210> 59

<211> 8

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 59

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
1 5

<210> 60

<211> 20

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 60

Met	Asp	Ser	Gln	Ala	Gln	Val	Leu	Met	Leu	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Ser
1				5					10					15	
Gly	Thr	Cys	Gly												
			20												

<210> 61

<211> 19

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 61

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

<210> 62

<211> 9

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 62

gccgccacc

9

<210> 63

<211> 37

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<213> Opis umelej sekvencie: PRIMER

<400> 63

cagaaagctt gccgccacca tggattcaca ggcccag

37

<210> 64

<211> 6

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 64

Met	Asp	Ser	Gln	Ala	Gln
1				5	

<210> 65

<211> 35

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<213> Opis umelej sekvencie: PRIMER

<400> 65

ccgaggatcc actcacgttt cagctccagc ttggt

35

<210> 66

<211> 37

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<213> Opis umelej sekvencie: PRIMER

<400> 66

cagaaagctt gccgccacca tgggatggag ctgggtc

37

<210> 67

<211> 6

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 67

Met Gly Trp Ser Trp Val
1 5

<210> 68

<211> 35

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<213> Opis umelej sekvencie: PRIMER

<400> 68

ccgaggatcc actcacctga ggagacggtg actga

35

<210> 69

<211> 36

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<213> Opis umelej sekvencie: PRIMER

<400> 69

gtcatcaciaa tgtctccgga ggaacctgga acccag

36

<210> 70

<211> 29

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<213> Opis umelej sekvencie: PRIMER

<400> 70

ctccggagac attgtgatga cccaatctc

29

<210> 71

<211> 45

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<213> Opis umelej sekvencie: PRIMER

<400> 71

gaatataaaa ggctctgact ggacttgcag ttgatggtgg ccctc

45

<210> 72

<211> 72

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<213> Opis umelej sekvencie: PRIMER

<400> 72

cagtcagagc cttttatatt ctagaaatca aaagaactac ttggcctggt atcagcagaa 60
accaggacag cc 72

<210> 73

<211> 44

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<213> Opis umelej sekvencie: PRIMER

<400> 73

accccagatt ccctagtgt agcccaaaag atgaggagtt tggg 44

<210> 74

<211> 67

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<213> Opis umelej sekvencie: PRIMER

<400> 74

tagcactagg gaatctgggg tacctgatag gttcagtggc agtggggttg ggacagactt 60
caccctc 67

<210> 75

<211> 53

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<213> Opis umelej sekvencie: PRIMER

<400> 75

gtcccttgtc cgaacgtgag cggatagcta aaatattgct gacagtaata aac

53

<210> 76

<211> 33

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<213> Opis umelej sekvencie: PRIMER

<400> 76

gctcacgttc ggacaagga ccaaggtgga aat

33

<210> 77

<211> 72

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<213> Opis umelej sekvencie: PRIMER

<400> 77

cagtcagagc cttttatatt ctagaaatca aaagaactac ttggcctggt tccagcagaa 60
accaggacag cc 72

<210> 78

<211> 57

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<213> Opis umelej sekvencie: PRIMER

<400> 78

gtcccttgtc cgaacgtgag cggatagcta aaatattgct gacagtcata aactgcc 57

<210> 79

<211> 34

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<213> Opis umelej sekvencie: PRIMER

<400> 79

cccaaactcc tcatctattg ggctagcact aggg 34

<210> 80

<211> 34

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<213> Opis umelej sekvencie: PRIMER

<400> 80

ccctagtgtc agcccaatag atgaggagtt tggg 34

<210> 81

<211> 17

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<213> Opis umelej sekvencie: PRIMER

<400> 81

tacgcaaacc gcctctc

17

<210> 82

<211> 18

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<213> Opis umelej sekvencie: PRIMER

<400> 82

gagtgcacca tatgcggt

18

<210> 83

<211> 16

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<213> Opis umelej sekvencie: PRIMER

<400> 83

aacagctatg accatg

16

<210> 84

<211> 17

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<213> Opis umelej sekvencie: PRIMER

<400> 84

gttttcccag tcacgac

17

<210> 85

<211> 47

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<213> Opis umelej sekvencie: PRIMER

<400> 85

gtgtattcag tgaaggtgta tctactagtt ttacagctga ctttcac

47

<210> 86

<211> 53

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<213> Opis umelej sekvencie: PRIMER

<400> 86

tagtagatac accttcactg aatacaccat acactggggtt agacaggccc ctg

53

<210> 87

<211> 71

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<213> Opis umelej sekvencie: PRIMER

<400> 87

```
cccttgaact tctggttgta gtttaggaata ccattgtag gattaatacc tcctatccac 60
tccagccttt g 71
```

<210> 88

<211> 71

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<213> Opis umelej sekvencie: PRIMER

<400> 88

```
taactacaac cagaagttca agggccgggc caccttgacc gtaggcaagt ctgccagcac 60
cgctacatg g 71
```

<210> 89

<211> 63

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<213> Opis umelej sekvencie: PRIMER

<400> 89

```
gcatggccct cgtcgtaacc ataggcgatt cttcttctgg cgcagtagta gactgcagtg 60
tcc 63
```

<210> 90

<211> 48

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<213> Opis umelej sekvencie: PRIMER

<400> 90

ctatgggttac gacgaggggcc atgctatgga ctactgggggt caaggaac

48

<210> 91

<211> 71

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<213> Opis umelej sekvencie: PRIMER

<400> 91

taactacaac cagaagttca agggccgggt caccatcacc gtagacacct ctgccagcac 60
cgctacatg g 71

<210> 92

<211> 27

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<213> Opis umelej sekvencie: PRIMER

<400> 92

ggacactgca gtctacttct gcgccag

27

<210> 93

<211> 17

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<213> Opis umelej sekvencie: PRIMER

<400> 93

tacgcaaacc gcctctc

17

<210> 94

<211> 18

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<213> Opis umelej sekvencie: PRIMER

<400> 94

gagtgcacca tatgcggt

18

<210> 95

<211> 75

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<213> Opis umelej sekvencie: PRIMER

<400> 95

cctttggcca ggggcctgtc taaccagtg tatggtgtat tcagtgaagg tgtatccact 60
agtttccact agttt 75

<210> 96

<211> 28

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<213> Opis umelej sekvencie: PRIMER

<400> 96

gtcaccgtcc ttgacacgcg tctcggga

28

<210> 97

<211> 17

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<213> Opis umelej sekvencie: PRIMER

<400> 97

ttggaggagg gtgccag

17

<210> 98

<211> 22

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<213> Opis umelej sekvencie: PRIMER

<400> 98

gagacattgt gacccaatct cc

22

<210> 99

<211> 25

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<213> Opis umelej sekvencie: PRIMER

<400> 99

gacagtcata aactgccaca tcttc

25

<210> 100

<211> 23

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<213> Opis umelej sekvencie: PRIMER

<400> 100

ttgacacgcg tctcgggaag ctt

23

<210> 101

<211> 22

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<213> Opis umelej sekvencie: PRIMER

<400> 101

ggcgcagagg atccactcac ct

22

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Protilátkový proteín, ktorý má komplementaritu determinujúce oblasti monoklonálnej protilátky F19, ATCC č. HB8269, a špecificky sa viaže na fibroblastový aktivačný proteín, pričom obsahuje modifikácie kostry, ktorých výsledkom je zlepšená schopnosť jeho produkcie hostiteľskými bunkami v porovnaní s chimérnou protilátkou, ktorá má variabilné oblasti F19 a cudzie konštantné oblasti.

2. Protilátkový proteín, ktorý má variabilnú oblasť ľahkého reťazca a variabilnú oblasť ťažkého reťazca podľa nároku 1, a každá je pripojená na ľudskú konštantnú oblasť.

3. Protilátkový proteín podľa nároku 2, pričom ľudská konštantná oblasť ľahkého reťazca je ľudská kapa konštantná oblasť.

4. Protilátkový proteín podľa nároku 2, pričom ľudská konštantná oblasť ťažkého reťazca je ľudská gama-1 konštantná oblasť.

5. Protilátkový proteín podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 4, ktorého hladina expresie vo vzorkách surového média stanovená prostredníctvom ELISA a/alebo výťažok purifikovanej protilátky presahuje hladinu expresie a/alebo purifikačný výťažok chimérnej protilátky bez modifikácií kostry najmenej desaťnásobne.

6. Protilátkový proteín podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 4, ktorého hladina expresie vo vzorkách surového média stanovená prostredníctvom ELISA a/alebo výťažok purifikovanej protilátky presahuje hladinu expresie a/alebo purifikačný výťažok chimérnej protilátky bez modifikácií kostry najmenej dvadsaťnásobne.

7. Protilátkový proteín podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 4, ktorého hladina expresie vo vzorkách surového média stanovená prostredníctvom ELISA a/alebo

výtťažok purifikovanej protilátky presahuje hladinu expresie a/alebo purifikačný výtťažok chimérnej protilátky bez modifikácií kostry najmenej stonásobne.

8. Protilátkový proteín podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 7, ktorý vykazuje zlepšenú schopnosť byť produkováný eukaryotickými bunkami.

9. Protilátkový proteín podľa nároku 8, pričom eukaryotickou bunkou je vaječníková bunka čínskeho škrečka - CHO bunka.

10. Protilátkový proteín podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 9, pričom aminokyselinou v Kabat polohe 87 oblasti ľahkého reťazca nie je asparagín.

11. Protilátkový proteín podľa nároku 10, pričom aminokyselina v Kabat polohe 87 oblasti ľahkého reťazca je vybraná z aromatických alebo alifatických aminokyselín.

12. Protilátkový proteín podľa nároku 11, pričom aminokyselinou v Kabat polohe 87 oblasti ľahkého reťazca je tyrozín alebo fenylalanín.

13. Protilátkový proteín podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 12, pričom aminokyselina v Kabat polohe 36 oblasti ľahkého reťazca je vybraná z aromatických aminokyselín.

14. Protilátkový proteín podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 13, ktorý obsahuje variabilnú oblasť ľahkého reťazca uvedenú ako sekv. č. 2.

15. Protilátkový proteín podľa nároku 14, ktorého variabilná oblasť ľahkého reťazca je kódovaná nukleotidovou sekvenciou uvedenou v sekv. č. 1.

16. Protilátkový proteín podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 13, ktorý obsahuje variabilnú oblasť ľahkého reťazca uvedenú ako sekv. č. 6.

17. Protilátkový proteín podľa nároku 16, ktorého variabilná oblasť ľahkého reťazca je kódovaná nukleotidovou sekvenciou uvedenou v sekv. č. 5.

18. Protilátkový proteín podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 17, ktorý obsahuje variabilnú oblasť ťažkého reťazca uvedenú ako sekv. č.: 8, 10, 12 alebo 14.

19. Protilátkový proteín podľa nároku 18, ktorého variabilná oblasť ťažkého reťazca je kódovaná nukleotidovou sekvenciou uvedenou v sekv. č.: 7, 9, 11 alebo 13.

20. Protilátkový proteín podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 14, ktorý obsahuje variabilnú oblasť ľahkého reťazca uvedenú ako sekv. č. 2 a variabilnú oblasť ťažkého reťazca uvedenú ako sekv. č. 12.

21. Protilátkový proteín podľa nároku 20, ktorého variabilná oblasť ľahkého reťazca je kódovaná nukleotidovou sekvenciou uvedenou v sekv. č. 1 a variabilná oblasť ťažkého reťazca je kódovaná nukleotidovou sekvenciou uvedenou v sekv. č. 11.

22. Protilátkový proteín podľa nároku 20 alebo 21, ktorý obsahuje konštantnú oblasť ľahkého reťazca uvedenú ako sekv. č. 20 a konštantnú oblasť ťažkého reťazca uvedenú ako sekv. č. 22.

23. Protilátkový proteín podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 13, 18 alebo 19, ktorý obsahuje variabilnú oblasť ľahkého reťazca uvedenú ako sekv. č. 2 a variabilnú oblasť ťažkého reťazca uvedenú ako sekv. č. 8.

24. Protilátkový proteín podľa nároku 23, ktorého variabilná oblasť ľahkého reťazca je kódovaná nukleotidovou sekvenciou uvedenou v sekv. č. 1 a variabilná

oblasť ťažkého reťazca je kódovaná nukleotidovou sekvenciou uvedenou v sekv. č. 7.

25. Nukleotidová sekvencia kódujúca protilátkový proteín podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 24.

26. Rekombinantný DNA vektor, ktorý obsahuje nukleotidovú sekvenciu podľa nároku 25.

27. Rekombinantný DNA vektor podľa nároku 26, ktorým je expresný vektor.

28. Hostiteľská bunka nesúca vektor podľa nároku 26 alebo 27.

29. Hostiteľská bunka podľa nároku 28, ktorou je eukaryotická bunka.

30. Hostiteľská bunka podľa nároku 29, pričom eukaryotickou bunkou je cicavčia bunka.

31. Hostiteľská bunka podľa nároku 30, ktorou je CHO alebo COS bunka.

32. Spôsob výroby protilátkových proteínov podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 24, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že zahŕňa:

a) kultiváciu hostiteľskej bunky podľa ktoréhokoľvek z nárokov 28 až 32 v podmienkach, pri ktorých sa v uvedenej hostiteľskej bunke exprimuje protilátkový proteín, a

b) izoláciu protilátkového proteínu.

33. Spôsob podľa nároku 32, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že hostiteľskou bunkou je cicavčia bunka, výhodne CHO alebo COS bunka.

34. Spôsob podľa nároku 32 alebo 33, vyznačujúci sa tým, že hostiteľská bunka je kotransfekovaná dvoma plazmidmi nesúcimi expresné jednotky pre ľahký, respektíve ťažký reťazec.

35. Protilátkový proteín podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 24, ktorý je konjugovaný s terapeutickým činidlom.

36. Protilátkový proteín podľa nároku 35, pričom terapeutické činidlo je vybrané zo skupiny zahŕňajúcej rádioizotopy, toxíny, toxoidy, zápalové činidlá a chemoterapeutické činidlá.

37. Protilátkový proteín podľa nároku 36, pričom rádioizotopom je β -emitujúci rádioizotop.

38. Protilátkový proteín podľa nároku 37, pričom rádioizotop je vybraný zo skupiny zahŕňajúcej $^{186}\text{rénium}$, $^{188}\text{rénium}$, $^{131}\text{jód}$ a $^{90}\text{ytrium}$.

39. Protilátkový proteín podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 24, ktorý je značený.

40. Protilátkový proteín podľa nároku 39, pričom značkou je detekovateľný marker.

41. Protilátkový proteín podľa nároku 40, pričom detekovateľný marker je vybraný zo skupiny zahŕňajúcej enzýmy, farbičky, rádioizotopy, digoxigenín a biotín.

42. Protilátkový proteín podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 24, ktorý je konjugovaný so zobraziteľným činidlom.

43. Protilátkový proteín podľa nároku 42, pričom zobraziteľným činidlom je rádioizotop.

44. Protilátkový proteín podľa nároku 43, pričom rádioizotopom je γ -emitujúci rádioizotop.

45. Protilátkový proteín podľa nároku 44, pričom rádioizotopom je ^{125}I .

46. Farmaceutický prostriedok, vyznačujúci sa tým, že obsahuje protilátkový proteín podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 24 a farmaceuticky prijateľný nosič.

47. Farmaceutický prostriedok, vyznačujúci sa tým, že obsahuje protilátkový proteín podľa ktoréhokoľvek z nárokov 35 až 38 a farmaceuticky prijateľný nosič.

48. Farmaceutický prostriedok, vyznačujúci sa tým, že obsahuje protilátkový proteín podľa ktoréhokoľvek z nárokov 42 až 45 a farmaceuticky prijateľný nosič.

49. Farmaceutický prostriedok podľa nárokov 46 až 48 na použitie na liečbu alebo zobrazenie nádorov, vyznačujúci sa tým, že nádory sú asociované s aktivovanými stromálnymi fibroblastmi, pričom výhodne sú nádory vybrané z rakovinovej skupiny zahŕňajúcej kolorektálnu rakovinu, pľúcnu rakovinu iných ako malých buniek, rakovinu prsníka, rakovinu hlavy a krku, rakovinu vaječníkov, rakovinu pľúc, rakovinu močového mechúra, rakovinu pankreasu a metastatickú rakovinu mozgu.

50. Použitie protilátkového proteínu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 24 na liečbu rakoviny.

51. Použitie protilátkového proteínu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 35 až 38 na liečbu rakoviny.

52. Použitie protilátkového proteínu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 42 až 45 na zobrazenie aktivovaných stromálnych fibroblastov.

53. Použitie protilátkového proteínu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 39 až 41 na detekciu prítomnosti aktivovaných stromálnych fibroblastov vo vzorke.

54. Spôsob liečby nádorov, ktoré sú asociované s aktivovanými stromálnymi fibroblastami schopnými špecificky vytvárať komplex s protilátkovými proteínmi podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 24 alebo 35 až 38, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že zahŕňa uvedenie nádora do kontaktu s protilátkovými proteínmi v množstve účinnom na liečbu nádora.

55. Spôsob podľa nároku 54, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že nádor má rakovinové bunky vybrané z rakovinovej skupiny zahŕňajúcej kolorektálnu rakovinu, pľúcnu rakovinu iných ako malých buniek, rakovinu prsníka, rakovinu hlavy a krku, rakovinu vaječníkov, rakovinu pľúc, rakovinu močového mechúra, rakovinu pankreasu a metastatickú rakovinu mozgu.

56. Spôsob podľa nároku 54, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že uvedenie do kontaktu sa uskutočňuje *in vitro*.

57. Spôsob podľa nároku 54, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že uvedenie do kontaktu sa uskutočňuje *in vivo*.

58. Spôsob detekcie prítomnosti aktivovaných stromálnych fibroblastov v hojacej sa rane, pri zápale alebo v nádore, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že:

a) vzorka, ktorá môže obsahovať aktivované stromálne fibroblasty, sa uvedie do kontaktu s protilátkovým proteínom podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 24 alebo 39

až 41 v podmienkach vhodných na vytvorenie komplexu medzi protilátkou a antigénom,

b) deteguje sa prítomnosť komplexu, a tým sa deteguje prítomnosť aktivovaných stromálnych fibroblastov v hojacej sa rane, pri zápale alebo v nádore.

59. Spôsob podľa nároku 58, vyznačujúci sa tým, že nádor má rakovinové bunky vybrané z rakovinovej skupiny zahŕňajúcej kolorektálnu rakovinu, pľúcnu rakovinu iných ako malých buniek, rakovinu prsníka, rakovinu hlavy a krku, rakovinu vaječníkov, rakovinu pľúc, rakovinu močového mechúra, rakovinu pankreasu a metastatickú rakovinu mozgu.

60. Spôsob podľa nároku 58 alebo 59, vyznačujúci sa tým, že protilátkovým proteínom je proteín podľa ktoréhokoľvek z nárokov 39 až 41.

61. Spôsob zobrazenia prítomnosti aktivovaných stromálnych fibroblastov v hojacej sa rane, zapálenej koži alebo nádore u ľudského pacienta, vyznačujúci sa tým, že

a) protilátkový proteín podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 24 konjugovaný so zobraziteľným činidlom sa podáva ľudskému pacientovi v podmienkach vhodných na vytvorenie komplexu protilátka-antigén,

b) zobrazenie akéhokoľvek týmto spôsobom vytvoreného komplexu.

62. Spôsob podľa nároku 61, vyznačujúci sa tým, že nádor má rakovinové bunky vybrané z rakovinovej skupiny zahŕňajúcej kolorektálnu rakovinu, pľúcnu rakovinu iných ako malých buniek, rakovinu prsníka, rakovinu hlavy a krku, rakovinu vaječníkov, rakovinu pľúc, rakovinu močového mechúra, rakovinu pankreasu a metastatickú rakovinu mozgu.

63. Spôsob detekcie nádorovej strómy, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že

- a) vhodná vzorka sa uvedie do kontaktu s protilátkovým proteínom podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 24 v podmienkach vhodných na vytvorenie komplexu protilátka-antigén,
- b) deteguje sa prítomnosť akéhokoľvek takto vytvoreného komplexu,
- c) odvodenie prítomnosti nádorovej strómy z prítomnosti uvedeného komplexu.

64. Spôsob podľa nároku 62, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že protilátka je značená detekovateľným markerom.

65. Spôsob zobrazenia nádorovej strómy u ľudského pacienta, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že zahŕňa:

- a) podávanie protilátkového proteínu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 42 až 45 ľudskému pacientovi v podmienkach vhodných na vytvorenie komplexu protilátka-antigén,
- b) zobrazenie akéhokoľvek takto vytvoreného komplexu, a tým zobrazenie prítomnosti nádorovej strómy u ľudského pacienta.

66. Protilátkový proteín obsahujúci aminokyselinovú sekvenciu uvedenú v sekv. č. 2.

67. Protilátkový proteín podľa nároku 66, ktorý ďalej obsahuje aminokyselinovú sekvenciu uvedenú v sekv. č. 12.

68. Protilátkový proteín podľa nároku 66 alebo 67, ktorý ďalej obsahuje aminokyselinovú sekvenciu uvedenú v sekv. č. 20 a aminokyselinovú sekvenciu uvedenú v sekv. č. 22.

69. DNA molekula, ktorá kóduje protilátkový proteín podľa ktoréhokoľvek z nárokov 66 až 68.

70. Hostiteľská bunka, ktorá nesie DNA molekulu podľa nároku 69.

71. Spôsob produkcie protilátkového proteínu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 66 až 68, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že zahŕňa:

- a) kultiváciu hostiteľskej bunky podľa nároku 70 v podmienkach, pri ktorých sa v uvedenej hostiteľskej bunke exprimuje protilátkový proteín, a
- b) izoláciu proteínu.

72. Protilátkový proteín podľa ktoréhokoľvek z nárokov 66 až 68, ktorý je konjugovaný z rádioizotopom, výhodne ^{131}I , ^{125}I , ^{186}Re , ^{188}Re alebo ^{90}Y .

73. Farmaceutický prostriedok, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že obsahuje protilátkový proteín podľa ktoréhokoľvek z nárokov 66 až 68 alebo 72 a farmaceuticky prijateľný nosič.

1/43

Obr. 1

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

Obr. 2

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

Obr. 3

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

2/43

Obr. 4

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

Obr. 5

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

Obr. 6

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

3/43

Obr. 7

```

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

```

Obr. 8

```

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

```

Obr. 9

```

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

```

4/43

Obr. 10

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

Obr. 11

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

Obr. 12

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

5/43

Obr. 13

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

Obr. 14

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

Obr. 15

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

6/43

Obr. 16

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

Obr. 17

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

Obr. 18

1
VQLQQSGPEL VKPGASVKMS CKTSRYTFTE YTIHWVRQSH GKSLEWIGGI
51
NPNNGIPNYN QKF~~K~~GRATLT VGKSSSTAYM ELRSLTSEDS AVYFCARRRI
101
AYGYDEGHAM DYWGQGTSTV VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
151
LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
201
TQTYICNVNH KPSNTKVDKK VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPVFLFP
251
PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
301
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
351
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
401
PPVLDSGGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSL
451
PGK

7/43

Obr. 19

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

Obr. 20

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

Obr. 21

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

9/43

Obr. 22

125

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV

175

HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHNKPS NTKVDKKVEP

225

KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS

275

HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK

325

EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC

375

LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW

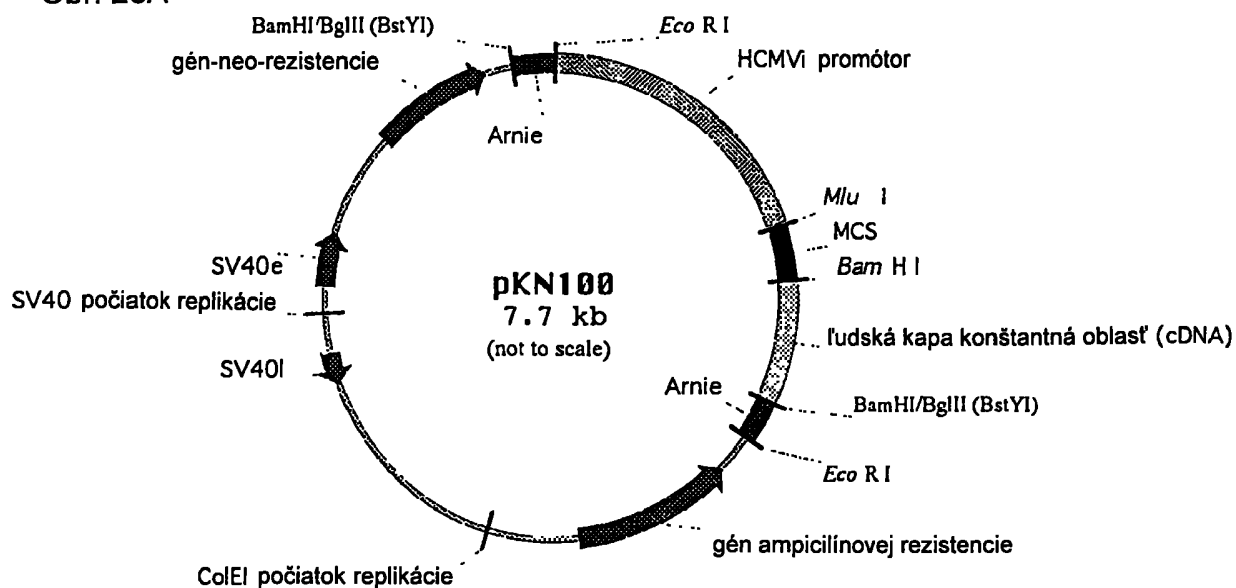
425

454

QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

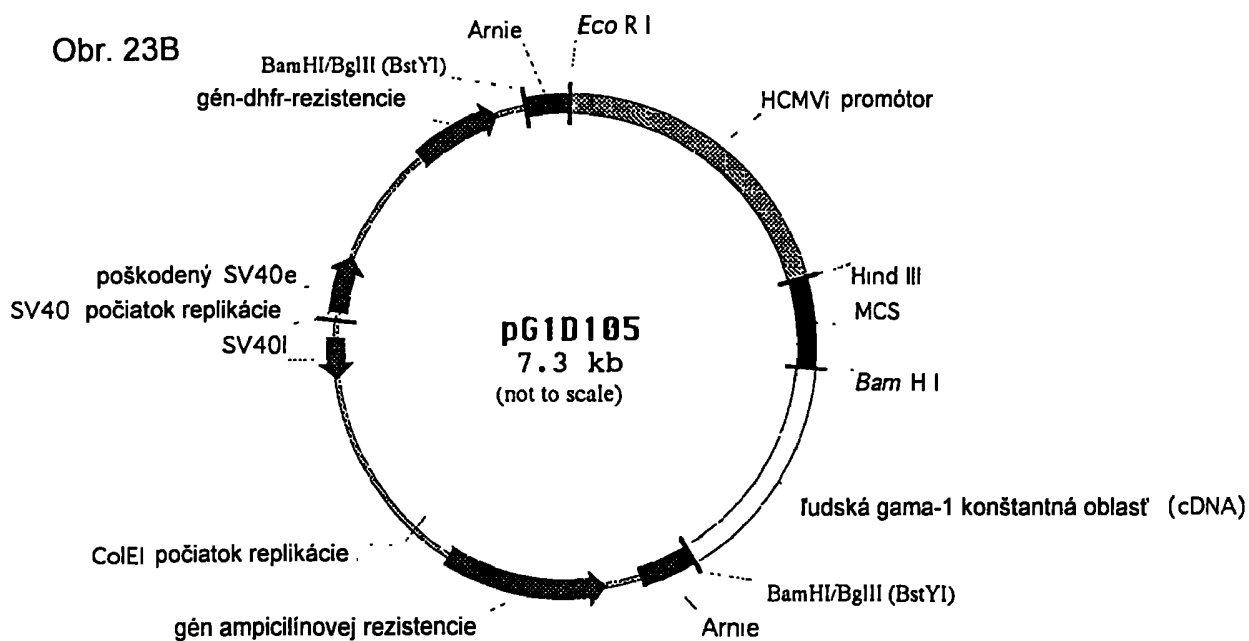
10/43

Obr. 23A



- HCMVi zosilňovacie/promótorové/intrónové elementy
- polyklonovacie miesto : 5' MluI-HindIII-SalI-XbaI-BamHI 3'
- spaC2 terminačná signálna sekvencia (tiež známa ako Arnie)
- fragment pSV2neo vektora

Obr. 23B



- HCMVi zosilňovacie/promótorové/intrónové elementy
- polyklonovacie miesto : 5' MluI-HindIII-Sse8387I-PmeI-SalI-XbaI-PacI-BamHI 3'
- spaC2 terminačná signálna sekvencia (tiež známa ako Arnie)
- fragment pSV2neo vektora

11/43

Obr. 24

HindIII
aagc**ttGCCGCCAC**Catggattcacaggcccaggttcttatgttactgccgctatgggta
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
ttcgaa**CGGCGGTGG**tacctaagtgtccgggtccaagaatacaatgacggcgatacccat
Kozak sekvencia
M D S Q A Q V L M L L P L W V
tctgggtacctgtggggacattgtgatgtcacagtctccatcctccctagctgtgtcagtt
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
agaccatggacacccctgtaaacactacagtgtcagaggtaggagggatcgacacagtcaa
S G T C G D I V M S Q S P S S L A V S V
ggagagaagggttactatgagctgcaagtcagtcagagccttttatatagtcgtaaatcaa
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
cctctcttccaatgatactcgacgttcaggtcagtcctcgaaaatatatcagcattagtt
G E K V T M S C K S S Q S L L Y S R N Q
CDR 1
aagaactacttggcctgggtccagcagaagccagggcagtcctcctaaactgctgattttc
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
ttcttgatgaaccggaccaaggtcgtcttcgggtcccgtcagaggatttgacgactaaaag
K N Y L A W F Q Q K P G Q S P K L L I F
tgggcatccactaggggaatctggggccctgatcgcttcacaggcagtggtttgggacg
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
acccgtaggtgatcccttagaccccagggactagcgaagtgtccgtcacctaaaccctgc
W A S T R E S G V P D R F T G S G F G T
CDR 2
gatttcaatctcaccatcagcagtggtgcaggctgaggacctggcagtttatgactgtcag
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
ctaaagttagagtggtagtcgtcacacgtccgactcctggaccgtcaaatactgacagtc
D F N L T I S S V Q A E D L A V Y D C Q
caatatttttagctatccgctcacgttcggtgctgggaccaagctggagctga**AACGTGAG**
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
gttataaaatcgataggcgagtgcaagccacgaccctgggttcgacctcgact**TTGCACTG**
zostrihové donorové miesto
Q Y F S Y P L T F G A G T K L E L K
CDR 3
BamHI
Tggatcc
421 ----- 427
Acctagg

12/43

Obr. 25

HindIII
 AAGCTTGCCGCCACCATGGGATGGAGCTGGGTCTTTCTCTTCTCCTGTCAGGAAGTCA
 1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TTCGAACGGCGGTGGTACCCTACCTCGACCCAGAAAGAGAAAGAGGACAGTCCTTGACGT
Kozak sekvencia
 M G W S W V F L F L L S G T A
 GGTGTCCTCTCTGAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCT
 61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CCACAGGAGAGACTCCAGGTCGACGTTGTCAGACCTGGACTCGACCACTTCGGACCCCGA
 G V L S E V Q L Q Q S G P E L V K P G A
 TCAGTAAAGATGTCCTGCAAGACTTCTAGATACACATTCACTGAATACACCATACTGG
 121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AGTCATTTCTACAGGACGTTCTGAAGATCTATGTGTAAGTGACTTATGTGGTATGTGACC
 S V K M S C K T S R Y T F T E Y T I H W
 CDR 1
 GTGAGACAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGGTATTAATCCTAACAATGGT
 181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CACTCTGTCTCGGTACCTTTCTCGGAACTCACCTAACCTCCATAATTAGGATTGTTACCA
 V R Q S H G K S L E W I G G I N P N N G
 CDR 2
 ATTCCTAACTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAGGGCCACATTGACTGTAGGCAAGTCCTCC
 241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TAAGGATTGATGTTAGTCTTCAAGTTCCCGTCCCGGTGTAAGTACATCCGTTACAGGAG
I P N Y N Q K F K G R A T L T V G K S S
 AGCACCGCCTACATGGAGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGATTCTGCGGTCTATTTCTGT
 301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TCGTGGCGGATGTACCTCGAGGCGTCGGACTGTAGACTCCTAAGACGCCAGATAAAGACA
 S T A Y M E L R S L T S E D S A V Y F C
 GCAAGAAGAAGAATCGCCTATGGTTACGACGAGGGCCATGCTATGGACTACTGGGGTCAA
 361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CGTTCTTCTTCTTAGCGGATACCAATGCTGCTCCCGGTACGATACCTGATGACCCAGTT
 A R R R I A Y G Y D E G H A M D Y W G Q
 CDR 3
 BamHI
 GGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGGTGAGTGGATCC
 421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 468
 CCTTGAGTCAGTGGCAGAGGAGTCCACTCACCTAGG
zostrihové donorové miesto
 G T S V T V S S

13/43

Obr. 26/1

```

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

```

14/43

Obr. 26/2

1301	GGGTATGTGT	CTGAAAATGA	GCTCgggggag	cgggcttgca	ccgctgacgc
		Afl II			
1351	at ttggaaga	<u>cttaagg</u> cag	cggcagaaga	agatgcaggc	agctgagttg
1401	ttgtgttctg	ataagagtca	gaggtaactc	ccgttgcggt	gctgttaacg
1451	gtggaggggca	gtgtagtctg	agcagtactc	gttgctgccg	cgcgcgccac
1501	cagacataat	agctgacaga	ctaacagact	gttcctttcc	atgggtcttt
			Mlu I	Hind III	
1551	tctgcagtca	ccgtccttga	<u>caecgcgt</u> c	<u>gggaagctt</u> G	CCGCCACCAT
					M
					Kpn I
1601	GGATTCACAG	CCCCAGGTTT	TTATGTTACT	GCCGCTATGG	GTATCT <u>GGTA</u>
	D S Q	A Q V	L M L L	P L W	V S G
1651	<u>CCTGTGGGGA</u>	CATTGTGATG	TCACAGTCTC	CATCCTCCCT	AGCTGTGTCA
	T C G D	I V M	S Q S	P S S L	A V S
1701	GTTGGAGAGA	AGGTTACTAT	GAGCTGCAAG	TCCAGTCAGA	GCCTTTTATA
	V G E	K V T M	S C K	S S Q	S L L Y
	<u>XbaI</u>			CDR 1	
1751	<u>TTCTAGAAAT</u>	CAAAAGAACT	ACTTGGCCTG	GTTCCAGCAG	AAGCCAGGGC
	S R N	Q K N	Y L A W	F Q Q	K P G
1801	AGTCTCCTAA	ACTGCTGATT	TTCTGGGCAT	CCACTAGGGA	ATCTGGGGTC
	Q S P K	L L I	F W A	S T R E	S G V
				CDR 2	
1851	CCTGATCGCT	TCACAGGCAG	TGGATTTGGG	ACGGATTTC	ATCTCACCAT
	P D R	F T G S	G F G	T D F	N L T I
1901	CAGCAGTGTG	CAGGCTGAGG	ACCTGGCAGT	TTATGACTGT	CAGCAATATT
	S S V	Q A E	D L A V	Y D C	<u>Q Q Y</u>
1951	TTAGCTATCC	GCTCACGTTT	GGTGCTGGGA	CCAAGCTGGA	GCTGAAAC <u>CGT</u>
	<u>F S Y P</u>	<u>L T F</u>	G A G	T K L E	L K R
	CDR 3				
	BamH I				
2001	<u>GAGTggatcc</u>	ATCTGGGATA	AGCATGCTGT	TTTCTGTCTG	TCCCTAACAT
2051	GCCCTGTGAT	TATGCGCAAA	CAACACACCC	AAGGGCAGAA	CTTTGTTACT
2101	TAAACACCAT	CCTGTTTGCT	TCTTTCCT <u>CA</u>	<u>GGA</u> ACTGTGG	CTGCACCATC
				T V	A A P S
2151	TGTCTTCATC	TTCCCGCCAT	CTGATGAGCA	GTTGAAATCT	GGAAGTGCCT
	V F I	F P P	S D E Q	L K S	G T A
2201	CTGTTGTGTG	CCTGCTGAAT	AACTTCTATC	CCAGAGAGGC	CAAAGTACAG
	S V V C	L L N	N F Y	P R E A	K V Q
2251	TGGAAGGTGG	ATAACGCCCT	CCAATCGGGT	AACTCCCAGG	AGAGTGTAC
	W K V	D N A L	Q S G	N S Q	E S V T
2301	AGAGCAGGAC	AGCAAGGACA	GCACCTACAG	CCTCAGCAGC	ACCCTGACGC
	E Q D	S K D	S T Y S	L S S	T L T

Obr. 26/3

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

16/43

Obr. 26/4

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

BspLU11I

17/43

Obr. 26/5

Bst1107I

4951 GTGCACTCTC AGTACAATCT GCTCTGATGC CGCATAGTTA AGCCAGTATA

5001 CACTCCGCTA TCGCTACGTG ACTGGGTCAT GGCTGCGCCC CGACACCCGC

5051 CAACACCCGC TGACGCGCCC TGACGGGCTT GTCTGCTCCC GGCATCCGCT

5101 TACAGACAAG CTGTGACCGT CTCCGGGAGC TGCATGTGTC AGAGGTTTTTC

5151 ACCGTCATCA CCGAAACGCG CGAGGCAGCT GTGGAATGTG TGTCAGTTAG

5201 GGTGTGGAAA GTCCCCAGGC TCCCCAGCAG GCAGAAGTAT GCAAAGCATG

5251 CATCTCAATT AGTCAGCAAC CAGGCTCCCC AGCAGGCAGA AGTATGCAAA

5301 GCATGCATCT CAATTAGTCA GCAACCATAG TCCCGCCCCT AACTCCGCCC

5351 ATCCCGCCCC TAACTCCGCC CAGTTCCGCC CATTCTCCGC CCCATGGCTG

Sfi I

5401 ACTAATTTTT TTTATTTATG CAGAGGCCGA GGCCGCCTCG GCCTCTGAGC

Stu I/Avr II

5451 TATTCCAGAA GTAGTGAGGA GGCTTTTTTG GAGGCCTAGG CTTTTGCAAA

5501 AAGCTAGCTT CACGCTGCCG CAAGCACTCA GGGCGCAAGG GCTGCTAAAG

5551 GAAGCGGAAC ACGTAGAAAG CCAGTCCGCA GAAACGGTGC TGACCCCGGA

5601 TGAATGTCAG CTACTGGGCT ATCTGGACAA GGGAAAACGC AAGCGCAAAG

5651 AGAAAGCAGG TAGCTTGCAG TGGGCTTACA TGGCGATAGC TAGACTGGGC

5701 GGTTTTATGG ACAGCAAGCG AACCGBAATT GCCAGCTGGG GCGCCCTCTG

5751 GTAAGGTTGG GAAGCCCTGC AAAGTAACT GGATGGCTTT CTTGCCGCCA

Bgl II/Bcl I

5801 AGGATCTGAT GCGCAGGGG ATCAAGATCT GATCAAGAGA CAGGATGAGG

5851 ATCGTTTCGC ATGATTGAAC AAGATGGATT GCACGCAGGT TCTCCGGCCG

5901 CTTGGGTGGA GAGGCTATTC GGCTATGACT GGGCACAACA GACAATCGGC

5951 TGCTCTGATG CCGCCGTGTT CCGGCTGTCA GCGCAGGGGC GCCCGGTTCT

6001 TTTTGTCAAG ACCGACCTGT CCGGTGCCCT GAATGAACTG CAGGACGAGG

Msc I

6051 CAGCGCGGCT ATCGTGGCTG GCCACGACGG GCGTTCCTTG CGCAGCTGTG

6101 CTCGACGTTG TCACTGAAGC GGGAAGGGAC TGGCTGCTAT TGGGCGAAGT

6151 GCCGGGGCAG GATCTCCTGT CATCTCACCT TGCTCCTGCC GAGAAAGTAT

6201 CCATCATGGC TGATGCAATG CGGCGGCTGC ATACGCTTGA TCCGGCTACC

Obr. 26/6

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

19/43

Obr. 26/7

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

Obr. 27/1

1 TTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAAT
 61 GGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTT
 121 ATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCT
 181 TCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCC
 241 CTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAA
 301 AGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGG
 361 TAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGT
 421 TCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCG
 481 CATACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTAC
 541 GGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGC
 Pvu I
 601 GGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCCTTTTTTGACAA
 661 CATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACC
 Fsp I
 721 AAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTTGCGCAACTATT
 781 AACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGA

20/43

Obr. 27/2

841 TAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAA
 901 ATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAA
 961 GCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAA
 1021 TAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGT
 1081 TTAATCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTTAATTTAAAGGATCTAGGT
 1141 GAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCTGTTCCACTG
 1201 AGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGT
 1261 AATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCA
 1321 AGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATAC
 1381 TGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTAC
 1441 ATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCT
 1501 TACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCTGGGCTGAACGGG
 1561 GGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACA
 1621 GCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGT
 1681 AAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTA
 1741 TCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTC
 1801 GTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGC
 1861 CTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAA
 1921 CCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCGAACGACCGAGCGCAG
 1981 CGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTCTCCTTACGCATCT
 2041 GTGCGGTATTTACACCGCATATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATA
 2101 GTTAAGCCAGTATACACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGGTCATGGCTGCGCCCCGACAC
 2161 CCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGA
 2221 CAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGAGGTTTTACCGTCATCACCGAAA
 2281 CGCGCGAGGCAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCCTAACTCCGCC
 2341 CATCCCGCCCCCTAACTCCGCCAGTTCGCCCCATTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTT
 2401 TTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATTCAGAAGTAGTGAGG
 2461 AGGCTTTTTTGAGGCCTAGGC'TTTTGCAAAAAGCTAGCTTACAGCTCAGGGCTGCGATT

21/43

Obr. 27/3

2521 TCGCGCCAACTTGACGGCAATCCTAGCGTGAAGGCTGGTAGGATTTTATCCCCGCTGCC
2581 ATCATGGTTCGACCATTGAACTGCATCGTCGCCGTGTCCCAAATATGGGGATTGGCAAG
2641 AACGGAGACCTACCCTGGCCTCCGCTCAGGAACGAGTTCAAGTACTTCCAAAGAATGACC
2701 ACAACCTCTTCAGTGGAAGGTAAACAGAATCTGGTGATTATGGGTAGGAAAACCTGGTTC
2761 TCCATTCTTGAGAAGAATCGACCTTTAAAGGACAGAATTAATATAGTTCTCAGTAGAGAA
2821 CTCAAAGAACCACCACGAGGAGCTCATTTTCTTGCCAAAAGTTTGGATGATGCCTTAAGA
2881 CTTATTGAACAACCGGAATTGGCAAGTAAAGTAGACATGGTTTGGATAGTCGGAGGCAGT
2941 TCTGTTTACCAGGAAGCCATGAATCAACCAGGCCACCTCAGACTCTTTGTGACAAGGATC
3001 ATGCAGGAATTTGAAAGTGACACGTTTTTCCCAGAAATTGATTTGGGGAAATATAAACTT
3061 CTCCCAGAATACCCAGGCGTCCTCTCTGAGGTCCAGGAGGAAAAGGCATCAAGTATAAG
3121 TTTGAAGTCTACGAGAAGAAAGACTAACAGGAAGATGCTTTCAAGTTCTCTGCTCCCCTC
3181 CTAAAGCTATGCATTTTTATAAGACCATGGGACTTTTGCTGGCTTTAGATCTTTGTGAAG
3241 GAACCTTACTTCTGTGGTGTGACATAATTGGACAACTACCTACAGAGATTTAAAGCTCT
3301 AAGGTAAATATAAAATTTTTAAGTGTATAATGTGTAAACTACTGATTCTAATTGTTTGT
3361 GTATTTTAGATTCCAACCTATGGAAGTATGAATGGGAGCAGTGGTGAATGCCTTTAAT
3421 GAGGAAAACCTGTTTTGCTCAGAAGAAATGCCATCTAGTGATGATGAGGCTACTGCTGAC
3481 TCTCAACATTCTACTCCTCCAAAAAGAAGAGAAAGGTAGAAGACCCCAAGGACTTTCCT
3541 TCAGAATTGCTAAGTTTTTTGAGTCATGCTGTGTTTAGTAATAGAACTCTTGCTTGCTTT
3601 GCTATTTACACCACAAAGGAAAAAGCTGCACTGCTATACAAGAAAATTATGGAAAAATAT
3661 TCTGTAACCTTTATAAGTAGGCATAACAGTTATAATCATAACATACTGTTTTTTCTTACT
3721 CCACACAGGCATAGAGTGTCTGCTATTAATAACTATGCTCAAAAATTGTGTACCTTTAGC
3781 TTTTTAATTGTAAAGGGTTAATAAGGAATATTTGATGTATAGTGCCTTGACTAGAGAT
BsaB I
3841 CATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCCACACCT
Mun I
3901 CCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGC
3961 TTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTC
4021 ACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCTA
4081 ATAAAAGATATTTATTTTCATTAGATATGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGCAGTGCCTCTAT
4141 CTGGAGGCCAGGTAGGGCTGGCCTTGGGGGAGGGGGAGGCCAGAATGACTCCAAGAGCTA
4201 CAGGAAGGCAGGTCAGAGACCCCACTGGACAAACAGTGGCTGGACTCTGCACCATAACAC

22/43

Obr. 27/4

4261 ACAATCAACAGGGGAGTGAGCTGGAAATTTGCTAGCGAATTCcagcacactggcgccggt
 Spe I
 4321 tACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTT
 4381 CCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCC
 4441 ATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACG
 4501 TCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATAT
 4561 GCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCA
 4621 GTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTAT
 4681 TACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACG
 4741 GGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGCACCAAAATCA
 4801 ACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCG
 4861 TGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAG
 4921 ACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGG
 4981 CCGGGAACGGTGCATTGGAACGCGGATTCCCCGTGCCAAGAGTGACGTAAGTACCGCCTA
 5041 TAGAGTCTATAGGCCACCCCTTGGCTTCTTATGCATGCTATACTGTTTTTGGCTTGGG
 5101 GTCTATACACCCCGCTTCTCATGTTATAGGTGATGGTATAGCTTAGCCTATAGGTGTG
 5161 GGTTATTGACCATTATTGACCACTCCCCTATTGGTGACGATACTTTCCATTACTAATCCA
 5221 TAACATGGCTCTTTGCCACAACCTCTCTTTATTGGCTATATGCCAATACACTGTCCTTCAG
 5281 AGACTGACACGGACTCTGTATTTTTACAGGATGGGGTCTCATTTATTATTACAAATTCA
 5341 CATATACAACACCACCGTCCCCAGTGCCCGCAGTTTTTTATTAAACATAACGTGGGATCTC
 5401 CACGCGAATCTCGGGTACGTGTTCCGGACATGGGCTCTTCTCCGGTAGCGGCGGAGCTTC
 5461 TACATCCGAGCCCTGCTCCCATGCCTCCAGCGACTCATGGTCGCTCGGCAGCTCCTTGCT
 5521 CCTAACAGTGAGGCCAGACTTAGGCACAGCACGATGCCCACCACCACAGTGTGCCGCA
 5581 CAAGGCCGTGGCGGTAGGGTATGTGTCTGAAAATGAGCTCggggagcgggcttgcaccgc
 5641 tgacgcatttggaagacttaaggcagcggcagaagaagatgcaggcagctgagttgtgt
 5701 gttctgataagagtcagaggtaactcccgttgcggtgctgttaacgggtggagggcagtg
 5761 agtctgagcagtaactcgttgctgcccgcgcgcgccaccagacataatagctgacagactaa
 5821 cagactgttcctttccatgggtcctttctgcagtcaccgtccttgacACGCGTCTCGGGA
 5881 AGCTTGCCGCCACCATGGGATGGAGCTGGGTCTTTCTCTTTCTCCTGTACGAACTGCAG
 M G W S W V F L F L L S G T A

23/43

Obr. 27/5

(Pvu II)

5941 GTGTCCTCTCTGAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTT
 G V L S E V Q L Q Q S G P E L V K P G A

Xba I Dra III

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

CDR 1

6061 TGAGACAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGGTATTAATCCTAACAATGGTA

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

6121 TTCCTAACTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAGGGCCACATTGACTGTAGGCAAGTCCTCCA
 I P N Y N Q K F K G R A T L T V G K S S

CDR 2

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

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

CDR 3 BamH I

6301 GAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGGTGAGTGGATCCTCTGCGCCTGGGCCCAGCTCTGTC
 G T S V T V S S

6361 CCACACCGCGGTACATGGCACCACCTCTCTTGACGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCT
 S T K G P S V

6421 TCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGG
 F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L

Age I

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

6541 GCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGG
 G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V

BstE II

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

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

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

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

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

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

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

24/43

Obr. 27/6

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

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

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

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

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

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

7381 GTAAATGAGTGCGACGGCCGGCAAGCCCCGCTCCCCGGGCTCTCGCGGTGCGACGAGGAT
G K *

7441 GCTTGGCACGTACCCCCTGTACATACTTCCCGGGCGCCAGCATGGAAATAAAGCACCGG

7501 ATCTAATAAAAGATATTTATTTTCATTAGATATGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGCAGTGCC

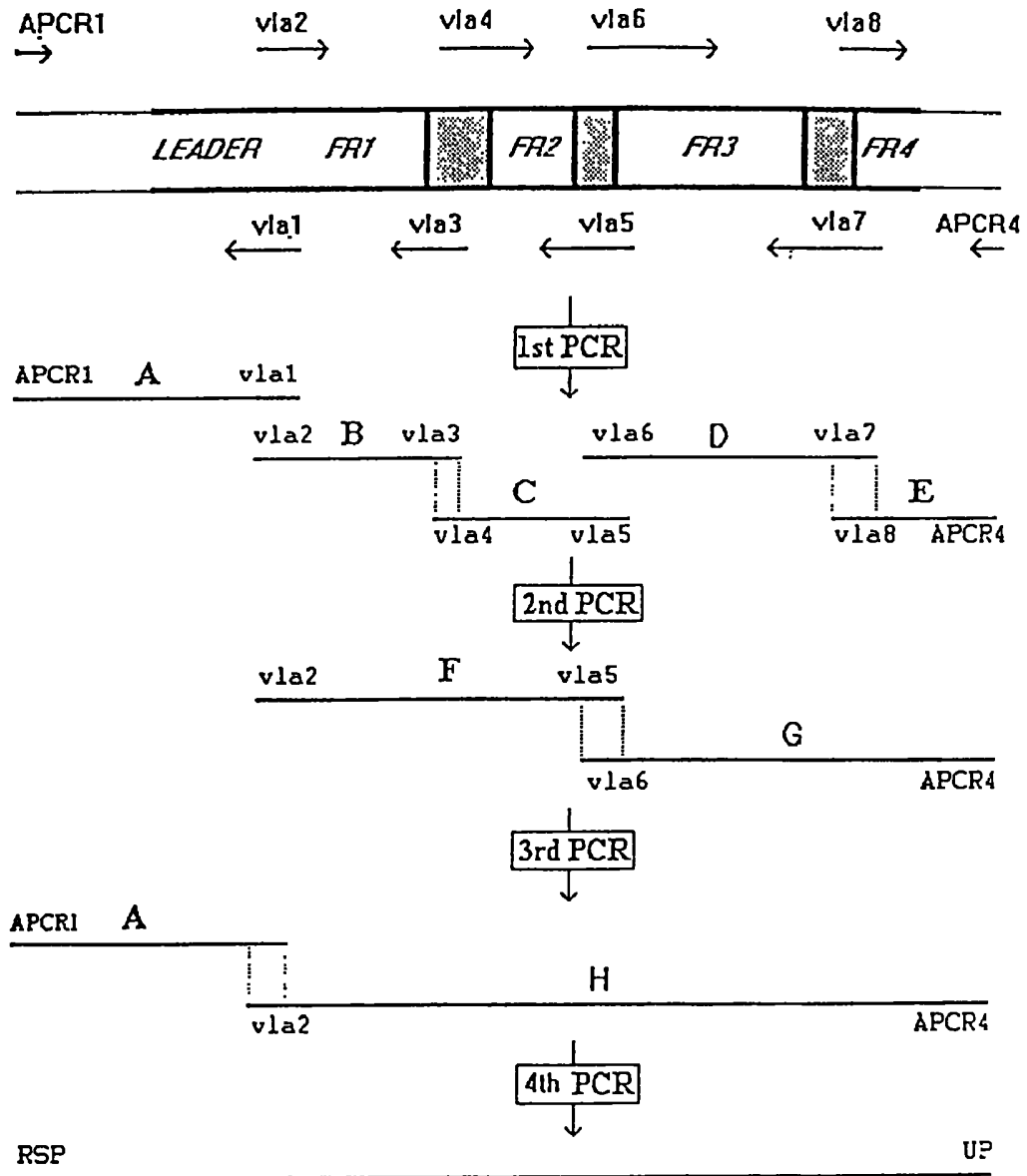
7561 TCTATCTGGAGGCCAGGTAGGGCTGGCCTTGGGGGAGGGGGAGGCCAGAATGACTCCAAG

7621 AGCTACAGGAAGGCAGGTCAGAGACCCCACTGGACAAACAGTGGCTGGACTCTGCACCAT

7681 AACACACAATCAACAGGGGAGTGAGCTGGaaatttgctagcgaattaattc 7731

25/43

Obr. 28



[illegible]

27/43

Obr. 30/1

Spe I

```

1  gaattccagc acactggcgg ccggttACTAG TTATTAATAG TAATCAATTA
51  CGGGGTCATT AGTTCATAGC CCATATATGG AGTTCCGCGT TACATAACTT
101 ACGGTAAATG GCCCGCCTGG CTGACCGCCC AACGACCCCC GCCCATTGAC
151 GTCAATAATG ACGTATGTTC CCATAGTAAC GCCAATAGGG ACTTTCATT
201 GACGTCAATG GGTGGAGTAT TTACGGTAAA CTGCCCCTT GGCAGTACAT
251 CAAGTGTATC ATATGCCAAG TACGCCCCCT ATTGACGTCA ATGACGGTAA
301 ATGGCCCGCC TGGCATTATG CCCAGTACAT GACCTTATGG GACTTTCCTA
      SnaB I
351 CTTGGCAGTA CATCTACGTA TTAGTCATCG CTATTACCAT GGTGATGCGG
401 TTTTGGCAGT ACATCAATGG GCGTGGATAG CGGTTTGA CT CACGGGGATT
451 TCCAAGTCTC CACCCCAT TG ACGTCAATGG GAGTTTGT TTT TGGCACCAAA
501 ATCAACGGGA CTTTCCAAA TGTCGTAACA ACTCCGCCCC ATTGACGCAA
551 ATGGGCGGTA GGCGGTGACG GTGGGAGGTC TATATAAGCA GAGCTCGTTT
601 AGTGAACCGT CAGATCGCCT GGAGACGCCA TCCACGCTGT TTTGACCTCC
      Sac II
651 ATAGAAGACA CCGGGACCGA TCCAGCCTCC GCGGCCGGA ACGGTGCATT
701 GGAACGCGGA TTCCCCGTGC CAAGAGTGAC GTAAGTACCG CCTATAGAGT
751 CTATAGGCCC ACCCCCTTGG CTTCTTATGC ATGCTATACT GTTTTTGGCT
801 TGGGGTCTAT ACACCCCCGC TTCCTCATGT TATAGGTGAT GGTATAGCTT
851 AGCCTATAGG TGTGGGTAT TGACCAT TAT TGACCACTCC CCTATTGGTG
901 ACGATACTTT CCATTACTAA TCCATAACAT GGCTCTTTGC CACAAC TCTC
951 TTTATTGGCT ATATGCCAAT AACTGTCCT TCAGAGACTG ACACGGACTC
1001 TGTATTTT TA CAGGATGGGG TCTCATTTAT TATTTACAAA TTCACATATA
1051 CAACACCACC GTCCCCAGTG CCCGCAGTTT TTATTAAACA TAACGTGGGA
      (BspE I)
1101 TCTCCACGCG AATCTCGGGT ACGTGTTCCG GACATGGGCT CTTCTCCGGT
1151 AGCGGCGGAG CTTCTACATC CGAGCCCTGC TCCCATGCCT CCAGCGACTC
1201 ATGGTCGCTC GGCAGCTCCT TGCTCCTAAC AGTGGAGGCC AGACTTAGGC

```

28/43

Obr. 30/2

1251 ACAGCACGAT GCCCACCACC ACCAGTGTGC CGCACAAGGC CGTGGCGGTA
1301 GGGTATGTGT CTGAAAATGA GCTCgggggag cgggcttgca ccgctgacgc
Afl II
1351 atttggaaga cttaaggcag cggcagaaga agatgcaggc agctgagttg
1401 ttgtgttctg ataagagtca gaggtaactc ccgttgcggt gctgttaacg
1451 gtggagggca gtgtagtctg agcagtactc gttgctgccg cgcgcgccac
1501 cagacataat agctgacaga ctaacagact gttcctttcc atgggtcttt
Mlu I Hind III
1551 tctgcagtca ccgtccttga cacgcgtctc gggaagcttG CCGCCACCAT
M
1601 GGAGACAGAC ACACTCCTGC TATGGGTGCT GCTGCTCTGG GTTCCAGGTT
E T D T L L L W V L L L W V P G
(BspE I)
1651 CCTCCGAGAG CATTGTGATG ACCCAATCTC CAGACTCTTT GGCTGTGTCT
S S G D I V M T Q S P D S L A V S
1701 CTAGGGGAGA GGGCCACCAT CAACTGCAAG TCCAGTCAGA GCCTTTTATA
L G E R A T I N C K S S Q S L L Y
XbaI CDR 1
1751 TTCTAGAAAT CAAAAGAACT ACTTGGCCTG GTATCAGCAG AAACCAGGAC
S R N Q K N Y L A W Y Q Q K P G
KpnI
1801 AGCCACCCAA ACTCCTCATC TTTTGGGCTA GCACTAGGGA ATCTGGGGTA
Q P P K L L I F W A S T R E S G V
CDR 2
1851 CCTGATAGGT TCAGTGGCAG TGGGTTTGGG ACAGACTTCA CCCTCACCAT
P D R F S G S G F G T D F T L T I
1901 TAGCAGCCTG CAGGCTGAAG ATGTGGCAGT TTATTACTGT CAGCAATATT
S S L Q A E D V A V Y Y C Q Q Y
1951 TTAGCTATCC GCTCACGTTT GGACAAGGGA CCAAGGTGGA AATAAACGT
F S Y P L T F G Q G T K V E I K R
CDR 3
BamH I
2001 GAGTggatcc ATCTGGGATA AGCATGCTGT TTTCTGTCTG TCCCTAACAT
2051 GCCCTGTGAT TATGCGCAAA CAACACACCC AAGGGCAGAA CTTTGTTACT
2101 TAAACACCAT CCTGTTTGCT TCTTTCCTCA GGAACTGTGG CTGCACCATC
T V A A P S
2151 TGTCTTCATC TTCCCGCCAT CTGATGAGCA GTTGAAATCT GGAAGTGCCT
V F I F P P S D E Q L K S G T A
2201 CTGTTGTGTG CCTGCTGAAT AACTTCTATC CCAGAGAGGC CAAAGTACAG
S V V C L L N N F Y P R E A K V Q
2251 TGAAGGTGG ATAACGCCCT CCAATCGGGT AACTCCCAGG AGAGTGTAC
W K V D N A L Q S G N S Q E S V T
2301 AGAGCAGGAC AGCAAGGACA GCACCTACAG CCTCAGCAGC ACCCTGACGC
E Q D S K D S T Y S L S S T L T

29/43

Obr. 30/3

```

2351  TGAGCAAAGC AGACTACGAG AAACACAAAG TCTACGCCTG CGAAGTCACC
      L S K A D Y E K H K V Y A C E V T
2401  CATCAGGGCC TGAGCTCGCC CGTCACAAAG AGCTTCAACA GGGGAGAGTG
      H Q G L S S P V T K S F N R G E C
2451  TTAGAGGGAG AAGTGCCCCC ACCTGCTCCT CAGTTCCAGC CTGACCCCCT
      *                               Psp5 II
2501  CCCATCCTTT GGCCTCTGAC CCTTTTTCCT CAGGGGACCT ACCCCTATTG

2551  CGGTCCTCCA GCTCATCTTT CACCTCACCC CCCTCCTCCT CCTTGGCTTT

2601  AATTATGCTA ATGTTGGAGG AGAATGAATA AATAAAGTGA ATCTTTGCAC

2651  CTGTGGTGGA TCTAATAAAA GATATTTATT TTCATTAGAT ATGTGTGTTG

2701  GTTTTTTGTG TGCAGTGCCT CTATCTGGAG GCCAGGTAGG GCTGGCCTTG

2751  GGGGAGGGGG AGGCCAGAAT GACTCCAAGA GCTACAGGAA GGCAGGTCAG

2801  AGACCCCACT GGACAAACAG TGGCTGGACT CTGCACCATA ACACACAATC

2851  AACAGGGGAG TGAGCTGGAA ATTTGCTAGC GAATTCTTGA AGACGAAAGG

2901  GCCTCGTGAT ACGCCTATTT TTATAGGTTA ATGTCATGAT AATAATGGTT

2951  TCTTAGACGT CAGGTGGCAC TTTTCGGGGA AATGTGCGCG GAACCCCTAT

3001  TTGTTTATTT TTCTAAATAC ATTCAAATAT GTATCCGCTC ATGAGACAAT

3051  AACCCTGATA AATGCTTCAA TAATATTGAA AAAGGAAGAG TATGAGTATT

3101  CAACATTTCC GTGTCGCCCT TATTCCCTTT TTTGCGGCAT TTTGCCTTCC

3151  TGTTTTTGTG CACCCAGAAA CGCTGGTGAA AGTAAAAGAT GCTGAAGATC

3201  AGTTGGGTGC ACGAGTGGGT TACATCGAAC TGGATCTCAA CAGCGGTAAG

3251  ATCCTTGAGA GTTTTCGCCC CGAAGAACGT TTTCCAATGA TGAGCACTTT

3301  TAAAGTTCTG CTATGTGGCG CGGTATTATC CCGTGTTGAC GCCGGGCAAG

3351  AGCAACTCGG TCGCCGCATA CACTATTCTC AGAATGACTT GGTTGAGTAC

3401  TCACCAGTCA CAGAAAAGCA TCTTACGGAT GGCATGACAG TAAGAGAATT

3451  ATGCAGTGCT GCCATAACCA TGAGTGATAA CACTGCGGCC AACTTACTTC
      Pvu I
3501  TGACAACGAT CGGAGGACCG AAGGAGCTAA CCGCTTTTTT GCACAACATG

3551  GGGGATCATG TAACTCGCCT TGATCGTTGG GAACCGGAGC TGAATGAAGC

```

30/43

Obr. 30/4

3601 CATACCAAAC GACGAGCGTG ACACCACGAT GCCTGCAGCA ATGGCAACAA
 3651 CGTTGCGCAA ACTATTA ACT GCGAACTAC TTA CTCTAGC TTCCCGGCAA
 3701 CAATTAATAG ACTGGATGGA GCGGATAAA GTTGCAGGAC CACTTCTGCG
 3751 CTCGGCCCTT CCGGCTGGCT GGT TATTGC TGATAAATCT GGAGCCGGTG
 3801 AGCGTGGGTC TCGCGGTATC ATTGCAGCAC TGGGGCCAGA TGGTAAGCCC
 3851 TCCCGTATCG TAGTTATCTA CACGACGGGG AGTCAGGCAA CTATGGATGA
 3901 ACGAAATAGA CAGATCGCTG AGATAGGTGC CTC ACTGATT AAGCATTTGGT
 3951 AACTGTCAGA CCAAGTTTAC TCATATATAC TTTAGATTGA TTTAAA ACTT
 4001 CATTTTTAAT TTAAAAGGAT CTAGGTGAAG ATCCTTTTTG ATAATCTCAT
 4051 GACCAAAATC CCTTAACGTG AGTTTTCGTT CCACTGAGCG TCAGACCCCG
 4101 TAGAAAAGAT CAAAGGATCT TCTTGAGATC CTTTTTTTCT GCGCGTAATC
 4151 TGCTGCTTGC AAACAAAAA ACCACCGCTA CCAGCGGTGG TTTGTTTGCC
 4201 GGATCAAGAG CTACCAACTC TTTTCCGAA GGTA ACTGGC TTCAGCAGAG
 4251 CGCAGATACC AAATACTGTC CTTCTAGTGT AGCCGTAGTT AGGCCACCAC
 4301 TTCAAGAACT CTGTAGCACC GCCTACATAC CTCGCTCTGC TAATCCTGTT
 4351 ACCAGTGGCT GCTGCCAGTG GCGATAAGTC GTGTCTTACC GGGTTGGACT
 4401 CAAGACGATA GTTACCGGAT AAGGCGCAGC GGTCCGGCTG AACGGGGGGT
 4451 TCGTGACAC AGCCCAGCTT GGAGCGAACG ACCTACACCG AACTGAGATA
 4501 CCTACAGCGT GAGCTATGAG AAAGCGCCAC GCTTCCCGAA GGGAGAAAGG
 4551 CGGACAGGTA TCCGGTAAGC GGCAGGGTCG GAACAGGAGA GCGCACGAGG
 4601 GAGCTTCCAG GGGGAAACGC CTGGTATCTT TATAGTCCTG TCGGGTTTCG
 4651 CCACCTCTGA CTTGAGCGTC GATTTTTGTG ATGCTCGTCA GGGGGGCGGA
 4701 GCCTATGGAA AAACGCCAGC AACGCGGCCT TTTTACGGTT CCTGGCCTTT
 4751 TGCTGGCCTT TTGCTCACAT GTCTTTCCT GCGTTATCCC CTGATTCTGT
 4801 GGATAACCGT ATTACCGCCT TTGAGTGAGC TGATAACCGCT CGCCGCAGCC

31/43

Obr. 30/5

4851 GAACGACCGA GCGCAGCGAG TCAGTGAGCG AGGAAGCGGA AGAGCGCCTG
 4901 ATGCGGTATT TTCTCCTTAC GCATCTGTGC GGTATTTTAC ACCGCATATG
 4951 GTGCACTCTC AGTACAATCT GCTCTGATGC CGCATAGTTA AGCCAGTATA ^{Bst1107I}
 5001 CACTCCGCTA TCGCTACGTG ACTGGGTCAT GGCTGCGCCC CGACACCCGC
 5051 CAACACCCGC TGACGCGCCC TGACGGGCTT GTCTGCTCCC GGCATCCGCT
 5101 TACAGACAAG CTGTGACCGT CTCCGGGAGC TGCATGTGTC AGAGGTTTTT
 5151 ACCGTCATCA CCGAAACGCG CGAGGCAGCT GTGGAATGTG TGTCAGTTAG
 5201 GGTGTGGAAA GTCCCCAGGC TCCCCAGCAG GCAGAAAGTAT GCAAAGCATG
 5251 CATCTCAATT AGTCAGCAAC CAGGCTCCCC AGCAGGCAGA AGTATGCAAA
 5301 GCATGCATCT CAATTAGTCA GCAACCATAG TCCCGCCCCT AACTCCGCCC
 5351 ATCCCGCCCC TAACTCCGCC CAGTTCCGCC CATTCTCCGC CCCATGGCTG
 5401 ACTAATTTTT TTTATTTATG CAGAGGCCGA ^{Sfi I} GGCCGCCTCG GCCTCTGAGC
 5451 TATTCCAGAA GTAGTGAGGA GGCTTTTTTG ^{Stu I/Avr II} GAGGCCTAGG CTTTTGCAAA
 5501 AAGCTAGCTT CACGCTGCCG CAAGCACTCA GGGCGCAAGG GCTGCTAAAG
 5551 GAAGCGGAAC ACGTAGAAAG CCAGTCCGCA GAAACGGTGC TGACCCCGGA
 5601 TGAATGTCAG CTA CTACTGGGCT ATCTGGACAA GGGAAAACGC AAGCGCAAAG
 5651 AGAAAGCAGG TAGCTTGACG TGGGCTTACA TGGCGATAGC TAGACTGGGC
 5701 GGTTTTATGG ACAGCAAGCG AACCGBAATT GCCAGCTGGG GCGCCCTCTG
 5751 GTAAGGTTGG GAAGCCCTGC AAAGTAACT GGATGGCTTT CTTGCCGCCA
 5801 AGGATCTGAT GCGCAGGGG ATCAAGATCT ^{Bgl II/Bcl I} GATCAAGAGA CAGGATGAGG
 5851 ATCGTTTCGC ATGATTGAAC AAGATGGATT GCACGCAGGT TCTCCGGCCC
 5901 CTTGGGTGGA GAGGCTATTC GGCTATGACT GGGCACAACA GACAATCGGC
 5951 TGCTCTGATG CCGCCGTGTT CCGGCTGTCA GCGCAGGGGC GCCCGGTTCT
 6001 TTTTGTCAAG ACCGACCTGT CCGGTGCCCT GAATGAACTG CAGGACGAGG
 6051 CAGCGCGGCT ATCGTGGCTG ^{Msc I} GCCACGACGG GCGTTCCTTG CGCAGCTGTG

32/43

Obr. 30/6

6101 CTCGACGTTG TCACTGAAGC GGAAGGGAC TGGCTGCTAT TGGGCGAAGT
 6151 GCCGGGGCAG GATCTCCTGT CATCTCACCT TGCTCCTGCC GAGAAAGTAT
 6201 CCATCATGGC TGATGCAATG CGGCGGCTGC ATACGCTTGA TCCGGCTACC
 6251 TGCCCATTCG ACCACCAAGC GAAACATCGC ATCGAGCGAG CACGTACTCG
 6301 GATGGAAGCC GGTCTTGTCG ATCAGGATGA TCTGGACGAA GAGCATCAGG
 6351 GGCTCGCGCC AGCCGAACTG TTCGCCAGGC TCAAGGCGCG CATGCCCCGAC
 6401 GGCGAGGATC TCGTCGTGAC CCATGGCGAT GCCTGCTTGC CGAATATCAT
 6451 GGTGGAAAAT GGCCGCTTTT CTGGATTCAT CGACTGTGGC CGGCTGGGTG
 6501 ^{Rsr II}
 TGGCGGACCG CTATCAGGAC ATAGCGTTGG CTACCCGTGA TATTGCTGAA
 6551 GAGCTTGCGG GCGAATGGGC TGACCGCTTC CTCGTGCTTT ACGGTATCGC
 6601 CGCTCCCGAT TCGCAGCGCA TCGCCTTCTA TCGCCTTCTT GACGAGTTCT
 6651 ^{Nsp V}
 TCTGAGCGGG ACTCTGGGGT TCGAAATGAC CGACCAAGCG ACCCCCAACC
 6701 TGCCATCACC AGATTTTCGAT TCCACCGCCG CCTTCTATGA AAGGTTGGGC
 6751 TTCGGAATCG TTTTCCGGGA CGCCGGCTGG ATGATCCTCC AGCGCGGGGA
 6801 ^{Sma I} ^{Nru I}
 TCTCATGCTG GAGTTCTTCG CCCACCCCGG GCTCGATCCC CTCGCGAGTT
 6851 GGTTTCAGCTG CTGCCTGAGG CTGGACGACC TCGCGGAGTT CTACCGGCAG
 6901 TGCAAATCCG TCGGCATCCA GGAAACCAGC AGCGGCTATC CGCGCATCCA
 6951 TGCCCCCGAA CTGCAGGAGT GGGGAGGCAC GATGGCCGCT TTGGTCCCGG
 7001 ATCTTTGTGA AGGAACCTTA CTTCTGTGGT GTGACATAAT TGGACAAACT
 7051 ACCTACAGAG ATTTAAAGCT CTAAGGTAAA TATAAAATTT TTAAGTGTAT
 7101 AATGTGTTAA ACTACTGATT CTAATTGTTT GTGTATTTTA GATTCCAACC
 7151 TATGGAAGCTG ATGAATGGGA GCAGTGGTGG AATGCCTTTA ATGAGGAAAA
 7201 CCTGTTTTGC TCAGAAGAAA TGCCATCTAG TGATGATGAG GCTACTGCTG
 7251 ACTCTCAACA TTCTACTCCT CCAAAAAAGA AGAGAAAGGT AGAAGACCCC
 7301 AAGGACTTTC CTTCAGAATT GCTAAGTTTT TTGAGTCATG CTGTGTTTAG

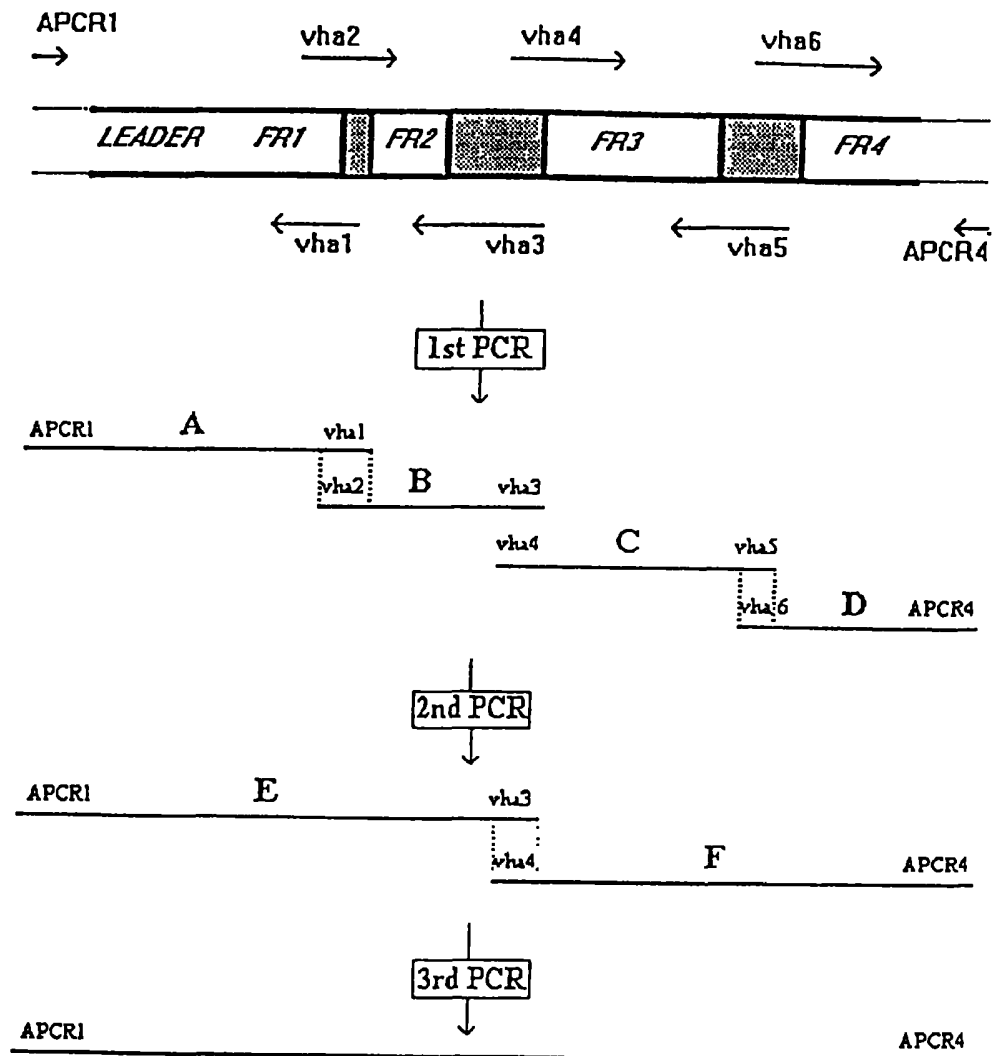
33/43

Obr. 30/7

7351 TAATAGAACT CTTGCTTGCT TTGCTATTTA CACCACAAAG GAAAAAGCTG
7401 CACTGCTATA CAAGAAAATT ATGGAAAAAT ATTCTGTAAC CTTTATAAGT
7451 AGGCATAACA GTTATAATCA TAACATACTG TTTTTTCTTA CTCCACACAG
7501 GCATAGAGTG TCTGCTATTA ATAACTATGC TCAAAAATTG TGTACCTTTA
7551 GCTTTTTTAAT TTGTAAAGGG GTTAATAAGG AATATTTGAT GTATAGTGCC
7601 TTGACTAGAG ATCATAATCA GCCATACCAC ATTTGTAGAG GTTTTACTTG
7651 CTTTAAAAAA CCTCCCACAC CTCCCCCTGA ACCTGAAACA TAAATGAAT
Mun I
7701 GCAATTGTTG TTGTAACTT GTTTATTGCA GCTTATAATG GTTACAAATA
7751 AAGCAATAGC ATCACAAATT TCACAAATAA AGCATTTTTTT TCACTGCATT
7801 CTAGTTGTGG TTTGTCCAAA CTCATCAATG TATCTTATCA TGTCTGGATC
7851 TAATAAAAGA TATTTATTTT CATTAGATAT GTGTGTTGGT TTTTGTGTG
7901 CAGTGCCTCT ATCTGGAGGC CAGGTAGGGC TGGCCTTGGG GGAGGGGGAG
7951 GCCAGAATGA CTCCAAGAGC TACAGGAAGG CAGGTCAGAG ACCCCACTGG
8001 ACAAACAGTG GCTGGACTCT GCACCATAAC ACACAATCAA CAGGGGAGTG
8051 AGCTGGAAAT TTGCTAGC

34/43

Obr. 31



[illegible]

36/43

Obr. 32/2

	92			CDR3					100		A	B	C	D	I	J	K	101		103
	C	A	R	R	R	I	A	Y	G	Y	D	E	G	H	A	M	D	Y	W	
A	TGC	GCC	AGA	AGA	AGA	ATC	GCC	TAT	GGT	TAC	GAC	GAG	GGC	CAT	GCT	ATG	GAC	TAC	TGG	
B	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
D	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
E	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	

	104									113	
	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	
A	GGT	CAA	GGA	ACC	CTT	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA	
B	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
D	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
E	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	

Obr. 33/1

1 TTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAAT
 61 GGTTCCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTT
 121 ATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCGTGATAAATGCT
 181 TCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCC
 241 CTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAA
 301 AGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGG
 361 TAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGT
 421 TCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCG
 481 CATACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTAC
 541 GGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGC
 Pvu I
 601 GGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGACAA
 661 CATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACC
 Fsp I
 721 AAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAATATT
 781 AACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGA

841 TAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAA
 901 ATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAA
 961 GCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAA
 1021 TAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGT
 1081 TTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTTAATTTAAAGGATCTAGGT
 1141 GAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTG
 1201 AGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGT
 1261 AATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTGCCGGATCA
 1321 AGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATAC
 1381 TGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTAC
 1441 ATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCT
 1501 TACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGGGCTGAACGGG
 1561 GGGTTGCTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACA
 1621 GCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGT
 1681 AAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCAGAGGGAGCTTCAGGGGGAAACGCCTGGTA
 1741 TCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTC
 1801 GTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGC
 1861 CTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAA
 1921 CCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAG
 1981 CGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTCTCCTTACGCATCT
 2041 GTGCGGTATTTACACCCGCATATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATA
 2101 GTTAAGCCAGTATACACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGGTGATGGCTGCGCCCCGACAC
 2161 CCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGA
 2221 CAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGTCAGAGGTTTTACCGTCATCACCGAAA
 2281 CGCGCGAGGCAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCCTAACTCCGCC
 2341 CATCCCGCCCCCTAACTCCGCCCAGTTCGCGCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTT
 2401 TTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGG
 2461 AGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTAGCTTACAGCTCAGGGCTGCGATT

BspLU11I

Bst1107 I

Sfi I

Stu I/Avr II

38/43

Obr. 33/3

2521 TCGCGCCAACTTGACGGCAATCCTAGCGTGAAGGCTGGTAGGATTTTATCCCCGCTGCC
2581 ATCATGGTTCGACCATTGAACTGCATCGTCGCCGTGTCCCAAATATGGGGATTGGCAAG
2641 AACGGAGACCTACCCTGGCCTCCGCTCAGGAACGAGTTCAAGTACTTCCAAAGAATGACC
2701 ACAACCTCTTCAGTGAAGGTAAACAGAATCTGGTGATTATGGGTAGGAAAACCTGGTTC
2761 TCCATTCTGAGAAGAATCGACCTTTAAAGGACAGAATTAATATAGTTCTCAGTAGAGAA
2821 CTCAAAGAACCACCACGAGGAGCTCATTTTCTTGCCAAAAGTTTGGATGATGCCTTAAGA
2881 CTTATTGAACAACCGGAATTGGCAAGTAAAGTAGACATGGTTTGGATAGTCGGAGGCAGT
2941 TCTGTTTACCAGGAAGCCATGAATCAACCAGGCCACCTCAGACTCTTTGTGACAAGGATC
3001 ATGCAGGAATTTGAAAGTGACACGTTTTTCCCAGAAATTGATTGGGGAAATATAAACTT
3061 CTCCCAGAATACCCAGGCGTCCTCTCTGAGGTCCAGGAGGAAAAAGGCATCAAGTATAAG
3121 TTTGAAGTCTACGAGAAGAAAGACTAACAGGAAGATGCTTTCAAGTTCTCTGCTCCCCCTC
3181 CTAAAGCTATGCATTTTTTATAAGACCATGGGACTTTTGCTGGCTTTAGATCTTTGTGAAG
3241 GAACCTTACTTCTGTGGTGTGACATAATTGGACAACTACCTACAGAGATTTAAAGCTCT
3301 AAGGTAAATATAAAATTTTTAAGTGTATAATGTGTAAACTACTGATTCTAATTGTTTGT
3361 GTATTTTAGATTCCAACCTATGGAAGTGAATGGGAGCAGTGGTGAATGCCTTTAAT
3421 GAGGAAAACCTGTTTTGCTCAGAAGAAATGCCATCTAGTGATGATGAGGCTACTGCTGAC
3481 TCTCAACATTCTACTCCTCCAAAAAGAAGAGAAAGGTAGAAGACCCCAAGGACTTTCCT
3541 TCAGAATTGCTAAGTTTTTTGAGTCATGCTGTGTTTAGTAATAGAACTCTTGCTTGCTTT
3601 GCTATTTACACCACAAAGGAAAAAGCTGCACTGCTATACAAGAAAATTATGGAAAAATAT
3661 TCTGTAACCTTTATAAGTAGGCATAACAGTTATAATCATAACATACTGTTTTTCTTACT
3721 CCACACAGGCATAGAGTGTCTGCTATTAATAACTATGCTCAAAAATTGTGTACCTTTAGC
3781 TTTTAAATTTGTAAAGGGTTAATAAGGAATATTTGATGTATAGTGCCTTGACTAGAGAT
BsaB I
3841 CATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCCACACT
Mun I
3901 CCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGC
3961 TTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTCACAAATAAAGCATTTTTTTC
4021 ACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCTA
4081 ATAAAAGATATTTATTTTCATTAGATATGTGTGTTGGTTTTTGTGTGCAGTGCCTCTAT
4141 CTGGAGGCCAGGTAGGGCTGGCCTTGGGGGAGGGGAGGCCAGAATGACTCCAAGAGCTA

Obr. 33/4

4201 CAGGAAGGCAGGTCAGAGACCCCCTGGACAAACAGTGGCTGGACTCTGCACCATAACAC
EcoR I
4261 ACAATCAACAGGGGAGTGAGCTGGAAATTTGCTAGCGAATTCcagcacactggcggccgt
(Spe I)
4321 tACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTT
4381 CCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCC
4441 ATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACG
4501 TCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCCTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATAT
4561 GCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCGCTGGCATTATGCCCA
SnaB I
4621 GTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTAT
4681 TACCATGGTGATGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACG
4741 GGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCA
4801 ACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCG
4861 TGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAG
4921 ACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGG
4981 CCGGGAACGGTGCAATTGGAACGCGGATTCCCCGTGCCAAGAGTGACGTAAGTACCGCCTA
5041 TAGAGTCTATAGGCCCCCCCCCTTGGCTTCTTATGCATGCTATACTGTTTTTGGCTTGGG
Bpu1102I
5101 GTCTATACACCCCCGCTTCCTCATGTTATAGGTGATGGTATAGCTTAGCCTATAGGTGTG
Xcm I
5161 GGTTATTGACCATTATTGACCACTCCCCTATTGGTGACGATACTTCCATTACTAATCCA
5221 TAACATGGCTCTTTGCCACAACCTCTCTTTATTGGCTATATGCCAATACACTGTCTTCAG
5281 AGACTGACACGGACTCTGTATTTTTACAGGATGGGGTCTCATTTATTATTTACAAATTCA
5341 CATATACAACACCACCGTCCCCAGTGCCCGCAGTTTTTTATTAAACATAACGTGGGATCTC
BspE I
5401 CACGCGAATCTCGGGTACGTGTTCCGGACATGGGCTCTTCTCCGGTAGCGGCGGAGCTTC
5461 TACATCCGAGCCCTGCTCCCATGCCTCCAGCGACTCATGGTCGCTCGGCAGCTCCTTGCT
5521 CCTAACAGTGGAGGCCAGACTTAGGCACAGCACGATGCCACCACCACAGTGTGCCGCA
5581 CAAGGCCGTGGCGGTAGGGTATGTGTCTGAAAATGAGCTCggggagcgggcttgaccgc
(Pvu II)
5641 tgacgcatttggaagacttaaggcagcggcagaagaagatgcaggcagctgagttgttgt
5701 gttctgataagagtcagaggttaactccggttgcggtgctgttaacggtggagggcagtg
5761 agtctgagcagtgactcggttgctgccgcgcgcgccaccagacataatagctgacagactaa
Mlu I
5821 cagactqttcctttccatgggtcttttctgcagtcaccgctccttgacACGCGTCTCGGGA

40/43

Obr. 33/5

Hind III

5881 AGCTTGCCGCCACCATGGACTGGACCTGGCGCGTGTTTTGCCTGCTCGCCGTGGCTCCTG
M D W T W R V F C L L A V A P

5941 GGGCCACAGCCAGGTGCAACTGGTGCAGTCCGGCGCCGAAGTGAAGAAACCCGGTGCTT
G A H S Q V Q L V Q S G A E V K K P G A
(Pvu II) (Spe I)

6001 CCGTGAAAGTCAGCTGTAAACTAGTAGATACACCTTCACTGAATACACCATACTACTGGG
S V K V S C K T S R Y T F T E Y T I H W
Msc I CDR 1

6061 TTAGACAGGCCCTTGGCCAAAGGCTGGAGTGGATAGGAGGTATTAATCCTAACAATGGTA
V R Q A P G Q R L E W I G G I N P N N G

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

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

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

6301 GAACCCTTGTCACCGTCTCCTCAGGTGAGTGGATCCTCTGCGCCTGGGCCCAGCTCTGTC
G T L V T V S S

6361 CCACACGCGGTACATGGCACCACCTCTCTTGCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCT
S T K G P S V

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

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

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

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

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

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

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

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

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

41/43

Obr. 33/6

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

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

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

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

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

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

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

NgoM I

7381 GTAAATGAGTGCGACGGCCCGGCAAGCCCCGCTCCCCGGGCTCTCGCGGTTCGCACGAGGAT
G K *

7441 GCTTGGCACGTACCCCCTGTACATACTTCCCGGGCGCCCAGCATGGAAATAAAGCACCGG

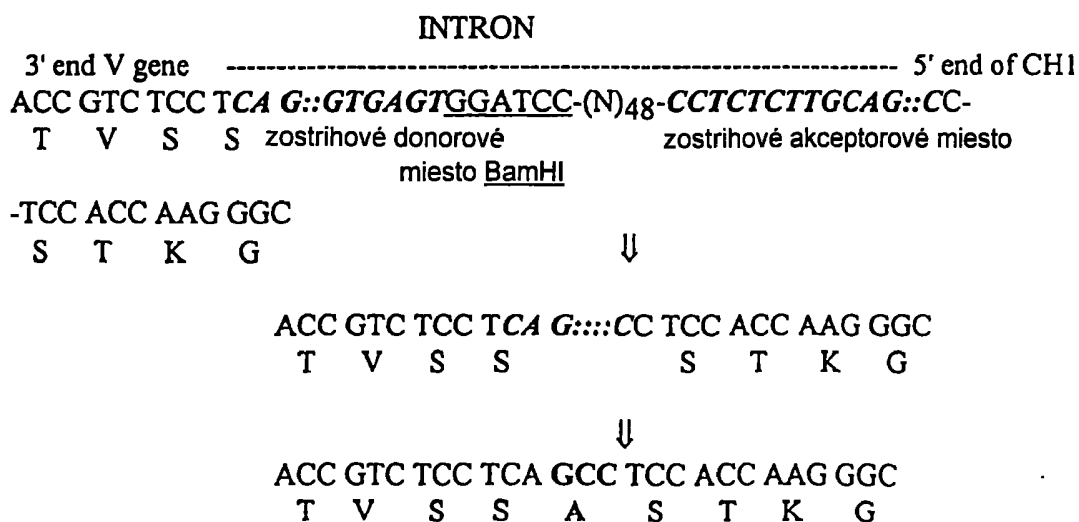
7501 ATCTAATAAAAGATATTTATTTTCATTAGATATGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGCAGTGCC

7561 TCTATCTGGAGGCCAGGTAGGGCTGGCCTTGGGGGAGGGGGAGGCCAGAATGACTCCAAG

7621 AGCTACAGGAAGGCAGGTCAGAGACCCCACTGGACAAACAGTGGCTGGACTCTGCACCAT

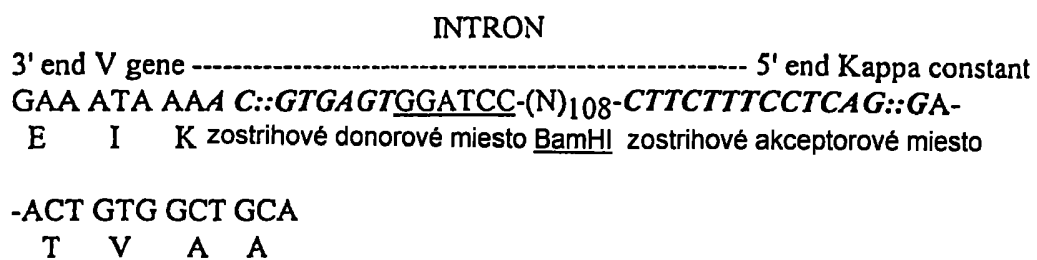
7681 AACACACAATCAACAGGGGAGTGAGCTGGaaatttgctagcgaattaattc 7731

Obr. 34A



42/43

Obr. 34B



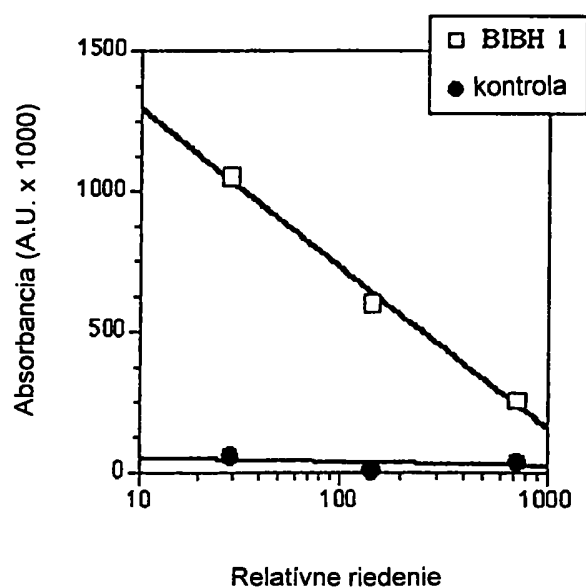
⇓



⇓

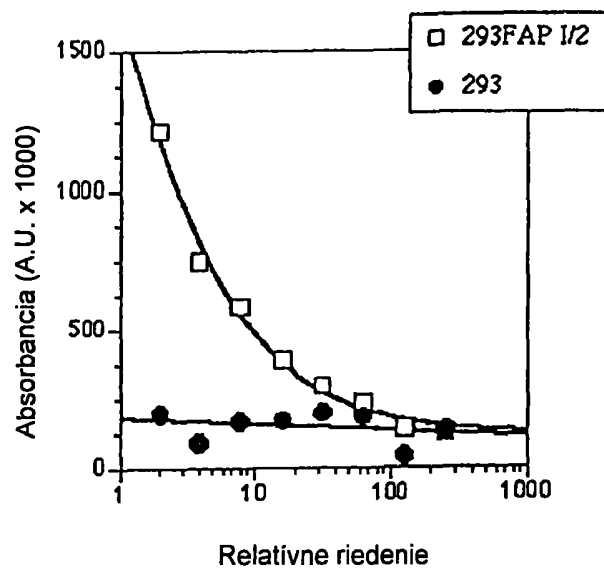


Obr. 35



43/43

Obr. 36



Obr. 37

