

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **24.04.2002**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **24.04.2001 17.07.2001**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **2001/01870088 2001/305604**
(33) Země priority: **EP US**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu:
(Věstník č. 8/2004)
(86) PCT číslo: **PCT/BE2002/000064**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2002/086101**

(21) Číslo dokumentu:

2003-2853

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. :
C 12 N 1/16

(71) Přihlašovatel:
INNOGENETICS N. V., Ghent, BE

(72) Původce:
Depla Erik, Destelbergen, BE
Bosman Alfons, Opwijk, BE
Deschamps Geert, Aalter, BE
Sablon Erwin, Merchtem, BE
Suckow Manfred, Düsseldorf, DE
Samson Isabelle, Heule, BE
Verheyden Gert, Holsbeek, BE

(74) Zástupce:
Čermák Karel jr., JUDr. Ph.D., Národní 32, Praha 1,
11000

(54) Název přihlášky vynálezu:
Obalové proteiny HCV glykosylované s jádrem glykosylace

(57) Anotace:
Řešení se týká obalových proteinů HCV nebo jejich částí, které jsou produktem exprese v eukaryontních buňkách. Konkrétně, obalové proteiny HCV jsou charakterizovány tím, že v průměru až 80 % jejich N-glykosylačních míst glykosylována s jádrem glykosylace. Z těchto N-glykosylačních míst je více než 70 % glykosylováno s oligomanózou obsahující 8 až 10 manóz. Kromě toho, poměr oligomanóz se strukturou Man(7)-GlcNAc(2) k oligomanózám se strukturou Man(8).GlcNAc(2) je menší nebo roven 0,45. Méně než 10 % oligomanóz je zakončeno s manózou, připojenou vazbou α 1,3. Obalové proteiny HCV podle předkládaného řešení jsou zejména vhodné pro diagnostické, profylaktické a terapeutické účely. Vhodnou eukaryontní buňkou pro přípravu obalových proteinů HCV podle předkládaného řešení je buňka Hansenu.

CZ 2003 - 2853 A3

OBALOVÉ PROTEINY HCV GLYKOSYLOVANÉ S JÁDREM GLYKOSYLACE**OBLAST TECHNIKY**

Předkládaný vynález se týká oblasti exprese rekombinantních proteinů, diagnostiky infekcí HCV, léčby nebo prevence infekcí HCV, prognózy/monitorování klinické účinnosti léčby jedince s chronickou hepatitidou, nebo prognózy/monitorování vlastního onemocnění.

Konkrétněji, předkládaný vynález se týká exprese obalových proteinů viru hepatitidy C v kvasinkách, kmenů kvasinek pro expresi obalových virových proteinů glykosylovaných s jádrem glykosylace („core glykosylated“) a použití obalových proteinů podle předkládaného vynálezu v diagnostice, profylaxi nebo terapii.

DOSAVADNÍ STAV TECHNIKY

Infekce virem hepatitidy C (Hepatitis C virus, HCV) je závažným zdravotním problémem jak v rozvinutých, tak v rozvojových zemích. Odhaduje se, že přibližně 1 až 5 % světové lidské populace je virem zachváčeno. Jeví se, že infekce HCV je jednou z nejvýznamnějších příčin hepatitidy spojené s transfúzí a často se vyvíjí v chronické poškození jater. Kromě toho existují důkazy, že HCV se účastní v indukci hepatocelulárního karcinomu. Z tohoto důvodu existuje naléhavá potřeba nalezení spolehlivých diagnostických metod a účinných terapeutických agens. Rovněž tak jsou potřebné citlivé a specifické metody pro screening HCV-kontaminovaných krevních produktů a zdokonalené metody kultivace HCV.

HCV je virus s RNA pozitivním řetězcem o přibližně

9600 bazích, který kóduje jediný polyproteinový prekursor o přibližně 3000 aminokyselinách. Bylo prokázáno, že proteolytické štěpení prekursoru spojené s ko- a posttranslačními modifikacemi vede k alespoň třem strukturním a šesti nestrukturním proteinům. Na základě sekvenční homologie byly strukturní proteiny funkčně zařazeny jako jeden protein jádra viru a dva obalové glykoproteiny: E1 a E2. Protein E1 sestává ze 192 aminokyselin a obsahuje 4 až 5 N-glykosylovaných míst v závislosti na genotypu HCV. Protein E2 sestává ze 363 až 370 aminokyselin a obsahuje 9 až 11 N-glykosylačních míst v závislosti na genotypu HCV (pro přehled viz: Major and Feinstone, 1997; Maertens and Stuyver, 1997). Protein E1 obsahuje různé variabilní domény (Maertens and Stuyver, 1997). Protein E2 obsahuje tři hypervariabilní domény, z nichž hlavní doména je lokalizována na N-konci proteinu (Maertens and Stuyver, 1997). HCV glykoproteiny jsou lokalizovány převážně v ER (endoplasmatickém retikulu), kde jsou modifikovány a upravovány do oligomerních komplexů.

U eukaryontních organismů jsou zbytky cukrů běžně navázané ke čtyřem odlišným zbytkům aminokyselin. Tyto aminokyselinové zbytky jsou klasifikovány jako O-vazebné (serin, threonin a hydroxylysin) a N-vazebné (asparagin). Cukry vázané přes kyslík (O-linked sugars) jsou syntetizovány v Golgiho aparátu nebo v hrubém endoplasmatickém retikulu (Endoplasmic Reticulum, (ER)) z cukrů nukleotidů. Cukry vázané přes dusík (N-linked sugars) jsou syntetizovány z běžného prekursoru a následně jsou zpracovávány. Předpokládá se, že obalové proteiny HCV jsou N-glykosylované. V oboru je známo, že přidání uhlovodanových řetězců připojených přes dusík (N-linked chains) má význam pro stabilizaci prostorového uspořádání

meziproduktů, a tím pro účinné skládání, zabránění chybného skládání a degeneraci proteinu v endoplasmatickém retikulu, v oligomerizaci, biologické aktivitě a v transportu glykoproteinů (viz přehled Rose et al., 1988; Doms et al., 1993; Helenius, 1994). Tripeptidové sekvence Asn-X-Ser a Asn-X-Thr (ve kterých X může být jakákoliv aminokyselina) jsou v polypeptidech tzv. konsensus místy pro vazbu N-vázaných oligosacharidů. Po připojení N-vázaného oligosacharidu k polypeptidu je oligosacharid dále zpracováván na komplexní typ (obsahující N-acetylglukosamin, manózu, fukózu, galaktózu a kyselinu sialovou), nebo na typ „high-mannose“ (obsahující N-acetylglukosamin a manózu). Předpokládá se, že obalové proteiny HCV jsou typu „high mannose“. U kvasinek je posttranslační úprava (processing, dále jen „úprava“,) ve smyslu připojení N-vázaných oligosacharidů zcela odlišná od úpravy v Golgiho aparátu u savců. U kvasinek jsou oligosacharidové řetězce v Golgiho aparátu prodlužovány postupným nasedáním struktur manózy, vedoucí k vytváření struktur „high mannose“, které je označováno jako hyperglykosylace. Ve srovnání s tím nejsou proteiny exprimované v prokaryotech nikdy glykosylovány.

Vzory glykosylace typu „high mannose“ byly stanoveny u proteinů nebo peptidů z eukaryontních buněk. V savčích buňkách v typu glykosylačního oligosacharidu s jádrem (core-glycosylation-type oligosaccharide) je průměrně 5 až 9 jednotek manózy připojeno ke dvěma N-acetylglukosaminovým podílům (struktura je zkráceně uváděna jako Man(5-9)GlcNAc(2)). Glykosylačním jádrem je míněna struktura podobná boxové struktuře podle Obrázku 3, uvedeném v Herscovics and Orleans (1993).

Bylo zjištěno, že v methylotrofní kvasince *Pichlia pastoris* se připojuje v průměru 8 až 14 manózových jednotek, tj. Man(8-14)GlcNAc(2) v jednom glykosylačním místě (Tschopp v EP 0256421) a přibližně 85 % z N-vázaných oligosacharidů spadá do rozsahu Man(8-14)GlcNAc(2) (Grinna and Tschopp 1989). Jinými autory byly publikovány mírně odlišné oligosacharidové struktury, které jsou připojeny k heterologním proteinům exprimovaným v *P. pastoris*: Man(8-9)GlcNAc(2) (Montesino et al. 1998), Man(9-14)GlcNAc(2) nebo Man(9-15)GlcNAc(2) (Kalidas et al. 2001), a Man(8-18)GlcNAc(2) s převahou Man(9-12)GlcNAc(2), a s tím, že celkově nejvýznamnějším oligosacharidem je Man(10)GlcNAc(2) (Miele et al. 1998). Trimble et al. (1991) popsali shodnou distribuci Man(8)GlcNAc(2) a Man(9)GlcNAc(2) u přibližně 75 % z N-vázaných oligosacharidů s dalšími 17 % N-glykosylovaných míst, která jsou obsazena s Man(10)GlcNAc(2), a zbývajících 8 % míst je obsazeno Man(11)GlcNAc(2). Hyperglykosylace proteinů, exprimovaných v *P. pastoris*, byla popsána ojediněle (Scorer et al. 1993).

V *Aspergillus niger* je k N-glykosylačním místům připojován Man(5-10)GlcNAc(2) (Panchal and Wodzinski 1998).

Glykosylačně deficientní mutanta *Saccharomyces cerevisiae mnn9* se liší od divokého typu *S. cerevisiae* tím, že buňky *mnn9* produkují místo hyperglykosylovaných proteinů proteiny glykosylované s modifikovaným oligosacharidem, jímž je Man(9-13)GlcNAc(2) (Mackay et al. v US patentu č. 5 135 854 a Kniskem et al. ve W094/01132). Byla popsána další mutanta *S. cerevisiae, och1mnn9*, ve které je v glykosylačních místech proteinů připojován Man(8)GlcNAc(2) (Yoshifumi et al. JP 06277086).

Základní charakteristikou pro oligosacharidy s jádrem ze *S. cerevisiae* (divokého typu a mutanty *mnn9*) je přítomnost terminálních α 1,3-vázaných zbytků manózy (Montesino et al. 1998). Oligosacharidy připojené k N-glykosylačním místům proteinů, exprimovaných v *P.pastoris* nebo v *S. cerevisiae ochlmnn1*, takové terminální α 1,3-vázané zbytky manózy postrádají (Gellissen et al. 2000). Předpokládá se, že α 1,3-vázané zbytky manózy jsou alergenní (Jenkins et al. 1996). Z tohoto důvodu nejsou proteiny nesoucí na svých oligosacharidech terminální α 1,3-vázané zbytky manózy vhodné pro diagnostické nebo terapeutické účely.

Až dosud nebyly detailně studovány glykosylační vzory proteinů, exprimovaných v methylotrófní kvasince *Hansenula polymorpha*, bez ohledu na použití této kvasinky pro přípravu značného množství heterologních proteinů (viz Tabulka 3 v Gellissen et al. 2000). Na základě pokusů Janowicz et al. (1991) a Diminsky et al. (1997) se předpokládá, že *H. polymorpha* buďto vůbec, nebo jen velice slabě glykosyluje velký nebo malý povrchový antigen viru hepatitidy B (HBsAg). Nejpravděpodobněji je toto způsobeno tím, že HBsAg byl exprimován bez signálního peptidu, a tím bylo zabráněno, aby produkovaný HBsAg vstupoval do lumen endoplasmatického retikula (ER), a tím i glykosylací. Bylo popsáno omezené nasedání mono- nebo dihexóz ke G-CSF (faktor stimulující kolonie granulocytů, granulocyte colony stimulating factor), produkovaném v *H. polymorpha* (Fischer et al. ve WO00/40727). Na druhé straně byla pozorována hyperglykosylace heterologní α -galaktosidasy, exprimované v buňkách *H. polymorpha* (Fellinger et al. 1991).

Až dosud se vakcinace proti nemocím osvědčila jako z hlediska nákladů nejefektivnější a současně účinná metoda pro kontrolu onemocnění. Nicméně, navzdory slibným výsledkům se úsilí o vyvinutí účinné vakcíny proti HCV potýká s obtížemi. Základní podmínkou úspěšnosti vakcín (*conditio sine qua non*) je indukce imunitní odpovědi u pacientů. Proto je třeba identifikovat antigenní determinanty HCV, které budou pacientům podávány ve vhodném provedení. Antigenní determinanty mohou být rozděleny alespoň na dvě formy, tj. lineární a konformační epitopy. Konformační epitopy jsou výsledkem skládání molekuly v trojrozměrném prostoru zahrnujícího ko- a posttranslační modifikace, jako je glykosylace. Obecně se předpokládá, že konformační epitopy mohou představovat nejúčinnější vakcíny, neboť se jedná o epitopy, které se podobají nativním epitopům HCV a které mohou být lépe konzervovány, než běžné lineární aminokyselinové sekvence. Z tohoto důvodu má konečný stupeň glykosylace obalových proteinů HCV největší význam pro generování antigenních determinant HCV podobných nativním determinantům. Nicméně, existují zdánlivě nepřekonatelné problémy s kultivací HCV, ve které vznikají pouze nepatrná množství virionů. Kromě toho existují obrovské problémy s expresí a purifikací rekombinantních proteinů, které vedou buďto k malým množstvím proteinů, k hyperglykosylovaným proteinům, nebo k proteinům, které nejsou glykosylovány.

Obalové proteiny HCV byly připraveny rekombinantními technikami v *Escherichia coli*, hmyzích buňkách, buňkách kvasinek a v savčích buňkách. Nicméně, exprese ve vyšších eukaryotech je charakterizována tím, že je obtížné získat velká množství antigenu pro skutečnou produkci vakcíny. Exprese v prokaryotech, jako je *E. coli*, vede k obalovým

proteinům HCV, které nejsou glykosylovány. Exprese obalových proteinů HCV v kvasinkách vede k hyperglykosylaci. Jak bylo již dříve prokázáno (Maertens et al., WO 96/04385), exprese obalového proteinu HCV E2 v *Saccharomyces cerevisiae* vede k proteinům, které jsou intenzivně glykosylovány. Hyperglykosylace vede k zakrytí proteinových epitopů. Ačkoliv Mustilli et al. (1999) nárokuje, že exprese HCV E2 v *S. cerevisiae* vede ke glykosylaci s jádrem, výsledky týkající se intracelulárně exprimovaného materiálu dokazují, že alespoň část je hyperglykosylována, zatímco správná úprava zbytku tohoto materiálu nebyla prokázána. Kromě toho hyperglykosylaci pozorované Mustilli et al. (1999) mohlo být zabráněno pouze v přítomnosti tunicamycinu, inhibitoru glykosylace, a není tak není reflektována glykosylace, probíhající za normálních, přirozených, růstových podmínek. Potřeba obalových proteinů HCV, získaných z intracelulárního zdroje, je plně akceptována (Maertens et al. ve WO 96/04385, Heile et al., 2000). Tato potřeba je dále ilustrována nízkou reaktivitou E2, sekretovaného kvasinkami, se séry šimpanzů imunizovaných proteiny E2, získanými ze savčí buněčné kultury, jak je zřejmé z Obrázku 5 v Mustilli et al (1999). Tato skutečnost je dále dokumentována v práci Rosa et al (1996), podle které se ukazuje, že imunizace s obalovými proteiny HCV získanými z kvasinek selhává v zabránění napadení virem HCV.

Proto existuje potřeba účinného systému expres, který by vedl k velkým a z hlediska nákladů efektivním množstvím proteinů, jež současně mají glykosylaci podobnou nativnímu vzoru glykosylace bez terminálních α 1,3-vázaných manóz. Zejména takové systémy jsou potřebné pro produkci obalových proteinů HCV.

PODSTATA VYNÁLEZU

První aspekt předkládaného vynálezu se týká izolovaného obalového proteinu HCV nebo jeho fragmentu, který obsahuje alespoň jedno N-glykosylační místo, přičemž protein nebo jeho fragment je charakterizován tím, že je produktem exprese v eukaryontní buňce a dále je charakterizován tím že v průměru až 80 % N-glykosylačních míst je glykosylováno s jádrem glykosylace. Konkrétně, více než 70 % míst glykosylovaných s jádrem je glykosylováno s oligomanózou se strukturou definovanou jako Man(8 až 10)GlcNAc(2). Dále, poměr oligomanózy se strukturou Man(7)GlcNAc(2) a oligomanózy se strukturou Man(8)GlcNAc(2) je menší než nebo roven 0,45. Konkrétněji, oligomanózy obsahují méně než 10 % terminální α 1,3 manózy. Eukaryontní buňkou, exprimující uvedený izolovaný obalový protein HCV nebo jeho část, může být buňka kvasinek, jako například buňka *Hansenula*.

Další aspekt předkládaného vynálezu se týká izolovaného obalového proteinu HCV nebo jeho částí podle vynálezu, který je derivován z proteinu, obsahujícího vedoucí peptid opičího lysozymu nebo jeho funkční variantu, jenž je připojen k uvedenému obalovému proteinu HCV nebo jeho fragmentu. Konkrétněji, izolovaný obalový protein HCV nebo jeho část je získán z proteinu charakterizovaného vzorcem

$$\text{CL}-[(\text{A1})_a - (\text{PS1})_b (\text{A2})_c]-\text{HCVENV}-[(\text{A3})_d - (\text{PS2})_e - (\text{A4})_f],$$

kde:

CL je vedoucí peptid opičího lysozymu nebo jeho funkční ekvivalent,

A1, A2, A3 a A4 jsou adaptorové peptidy, které mohou být odlišné nebo stejné,

PS1 a PS2 jsou místa úprav (processing sites), která mohou být odlišná nebo stejná,

HCVENV je obalový protein HCV nebo jeho část,

a, b, c, d, e, f jsou 0 nebo 1,

a kde případně jsou A1 a/nebo A2 částí PS1, a/nebo kde A3 a/nebo A4 jsou částí PS2.

Další aspekt předkládaného vynálezu zahrnuje izolovaný obalový protein HCV nebo jeho fragment podle vynálezu, který je obsažen ve struktuře vybrané ze skupiny sestávající z monomerů, homodimerů, heterodimerů, homo-oligomerů a hetero-oligomerů. Případně je izolovaný obalový protein HCV nebo jeho fragment podle vynálezu obsažen v částici podobné viru (virus-like particle). Konkrétněji, jakýkoliv obalový protein HCV nebo jeho fragment podle vynálezu může obsahovat cysteiny, ve kterém jsou thiolové skupiny cysteinu chemicky modifikovány.

Specifické aspekty vynálezu se týkají izolovaných obalových proteinů HCV nebo jejich fragmentů podle vynálezu, které jsou antigenní nebo imunogenní a/nebo které obsahují epitop stimulující T-buňky.

Další aspekt se týká kompozice obsahující izolovaný obalový protein HCV nebo jeho fragment podle vynálezu, Kompozice může dále obsahovat farmaceuticky přijatelný nosič a může být léčivem nebo vakcínou.

Vynález se rovněž týká způsobu přípravy izolovaného obalového proteinu HCV nebo jeho fragmentu podle vynálezu.

Další metodou podle vynálezu je způsob detekce přítomnosti anti-HCV protilátek ve vzorku, který je v podezření, že obsahuje anti-HCV protilátky, přičemž tento způsob zahrnuje:

- (i) kontaktování obalového proteinu HCV nebo jeho části podle kteréhokoliv z nároků 1 až 15 s uvedeným vzorkem za podmínek dovolujících komplexaci uvedeného obalového proteinu HCV nebo jeho části s anti-HCV protilátkami,
- (ii) (ii) detekci komplexu vytvořeného ve stupni (i), a
- (iii) vyvození závěru z (ii) o přítomnosti anti-HCV protilátek v uvedeném vzorku.

Konkrétněji, uvedený způsob může zahrnovat krok (i), ve kterém kontaktování probíhá za kompetitivních podmínek. Uvedené metody mohou specificky používat pevný nosič, ke kterému je obalový protein HCV nebo jeho část navázána.

Vynález se dále týká diagnostické soupravy (kitu) pro detekci přítomnosti anti-HCV protilátek ve vzorku, který je v podezření, že obsahuje anti-HCV protilátky, přičemž uvedená souprava obsahuje obalový protein HCV nebo jeho část podle vynálezu. Konkrétněji, souprava může obsahovat uvedený obalový protein HCV nebo jeho část navázanou na pevný nosič.

Vynález se rovněž týká léčiva nebo vakcíny obsahující obalový protein HCV nebo jeho část podle vynálezu.

Rovněž je v tomto vynálezu zahrnuta farmaceutická kompozice pro indukci specifické imunitní odpovědi proti HCV u savce, která obsahuje účinné množství obalového proteinu HCV nebo jeho části podle vynálezu a případně farmaceuticky přijatelné adjuvans. Farmaceutická kompozice může být alternativně schopná indukovat HCV-specifické protilátky u savce nebo indukovat T-buněčné funkce u savce. Kromě toho, farmaceutická kompozice může být profylaktickou kompozicí nebo terapeutickou kompozicí. Uvedeným savcem je konkrétně člověk.

POPIS OBRÁZKU

Obrázek 1. Schématická mapa vektoru pGEMT-E1sH6RB, který má sekvenci definovanou v SEQ ID NO: 6.

Obrázek 2. Schématická mapa vektoru pCHH-Hir, který má sekvenci definovanou v SEQ ID NO: 9.

Obrázek 3. Schématická mapa vektoru pFPMT121, který má sekvenci definovanou v SEQ ID NO: 12.

Obrázek 4. Schématická mapa vektoru pFPMT-CHH-E1-H6, který má sekvenci definovanou v SEQ ID NO: 13.

Obrázek 5. Schématická mapa vektoru pFPMT-MFa-E1-H6, který má sekvenci definovanou v SEQ ID NO: 16.

Obrázek 6. Schématická mapa vektoru pUC18-FMD-MFa-E1-H6, který má sekvenci definovanou v SEQ ID NO: 17.

Obrázek 7. Schématická mapa vektoru pUC18-FMD-CL-E1-H6, který má sekvenci definovanou v SEQ ID NO: 20.

Obrázek 8. Schématická mapa vektoru pFPMT-CL-E1-H6, který má sekvenci definovanou v SEQ ID NO: 21.

Obrázek 9. Schématická mapa vektoru pSP72E2H6, který má sekvenci definovanou v SEQ ID NO: 22.

Obrázek 10. Schématická mapa vektoru pMPT121, který má sekvenci definovanou v SEQ ID NO: 23.

Obrázek 11. Schématická mapa vektoru pFPMT-MFa-E2-H6, který má sekvenci definovanou v SEQ ID NO: 24.

Obrázek 12. Schématická mapa vektoru pMPT-MFa-E2-H6, který má sekvenci definovanou v SEQ ID NO: 25.

Obrázek 13. Schématická mapa vektoru pMF30, který má sekvenci definovanou v SEQ ID NO: 28.

Obrázek 14. Schématická mapa vektoru pFPMT-CL-E2-H6, který má sekvenci definovanou v SEQ ID NO: 32.

Obrázek 15. Schématická mapa vektoru pUC18-FMD-CL-E1, který má sekvenci definovanou v SEQ ID NO: 35.

Obrázek 16. Schématická mapa vektoru pFPMT-CL-E1, který má sekvenci definovanou v SEQ ID NO: 36.

Obrázek 17. Schématická mapa vektoru pUC18-FMD-CL-H6-E1-K-H6, který má sekvenci definovanou v SEQ ID NO: 39.

Obrázek 18. Schématická mapa vektoru pFPMT-CL-H6-K-E1, který má sekvenci definovanou v SEQ ID NO: 40.

Obrázek 19. Schématická mapa vektoru pYIG5, který má sekvenci definovanou v SEQ ID NO: 41.

Obrázek 20. Schématická mapa vektoru pYIG5E1H6, který má sekvenci definovanou v SEQ ID NO: 42.

Obrázek 21. Schématická mapa vektoru pSY1, který má sekvenci definovanou v SEQ ID NO: 43.

Obrázek 22. Schématická mapa vektoru pSY1aMFE1sH6a, který má sekvenci definovanou v SEQ ID NO: 44.

Obrázek 23. Schématická mapa vektoru pBSK-E2sH6, který má sekvenci definovanou v SEQ ID NO: 45.

Obrázek 24. Schématická mapa vektoru pYIG5HCCL-22aH6, který má sekvenci definovanou v SEQ ID NO: 46.

Obrázek 25. Schématická mapa vektoru pYYIGSE2H6, který má sekvenci definovanou v SEQ ID NO: 47.

Obrázek 26. Schématická mapa vektoru pYIG7, který má sekvenci definovanou v SEQ ID NO: 48.

Obrázek 27. Schématická mapa vektoru pYIG7E1, který má sekvenci definovanou v SEQ ID NO: 49.

Obrázek 28. Schématická mapa vektoru pSY1YIG7E1, který má sekvenci definovanou v SEQ ID NO: 50.

Obrázek 29. Schématická mapa vektoru pPICZalphaA, který má sekvenci definovanou v SEQ ID NO: 51.

Obrázek 30. Schématická mapa vektoru pPICZalphaD', který má sekvenci definovanou v SEQ ID NO: 52.

Obrázek 31. Schématická mapa vektoru pPICZalphaE', který má sekvenci definovanou v SEQ ID NO: 53.

Obrázek 32. Schématická mapa vektoru pPICZalphaD'E1sH6, který má sekvenci definovanou v SEQ ID NO: 58.

Obrázek 33. Schématická mapa vektoru pPICZalphaE'E1sH6, který má sekvenci definovanou v SEQ ID NO: 59.

Obrázek 34. Schématická mapa vektoru pPICZalphaD'E2sH6, který má sekvenci definovanou v SEQ ID NO: 60.

Obrázek 35. Schématická mapa vektoru pPICZalphaE'E2sH6, který má sekvenci definovanou v SEQ ID NO: 61.

Obrázek 36. Schématická mapa vektoru pUC18MFa, který má sekvenci definovanou v SEQ ID NO: 62.

Obrázek 37. Eluční profil z gelové chromatografie (rozměrově vylučovací chromatografie, size exclusion chromatografie) IMAC-purifikovaného proteinu E2-H6, exprimovaného v *Hansenula polymorpha* exprimující MFa-E2-H6 (viz Příklad 15). Osa X uvádí eluční objem (v ml).

Vertikální linie přes eluční profil označují odebírané frakce. „P1“ = smísené (pooled) frakce 4 až 9, „P2“ = smísené frakce 30 až 35, a „P3“ = smísené frakce 37 až 44. Osa Y uvádí absorbanci udávanou v mAU (mili jednotkách absorbance). Osa X uvádí eluční objem v ml.

Obrázek 38. Různé smísené vzorky (pools) a frakce odebrané po gelové chromatografii (viz Obrázek 37) byly analyzovány neredukční SDS-PAGE s následným barvením polyakrylamidových gelů stříbrem. Analyzované pooly („P1“, „P2“, a „P3“) a frakce (16 až 26) jsou uvedeny v horní části zobrazení stříbrem barveného gelu. Vlevo (linie „M“) jsou uvedeny velikosti markerů molekulové hmotnosti.

Obrázek 39. Frakce 17 až 23 ze stupně gelové chromatografie uvedeného na Obrázku 37 byly smíseny a alkylovány. Poté byl proteinový materiál podroben působení Endo H pro deglykosylaci. Neošetřený materiál a materiál ošetřený Endo H byly odděleny na SDS-PAGE gelu a přeneseny na membránu PVDF. Blot byl barven s amidovou černí.

Linie 1: Alkylovaný E2-H6 před působením Endo H

Linie 2: Alkylovaný E2-H6 po působení Endo H

Obrázek 40. Analýza Western-blotting buněčných lyzátů E1, exprimovaného v *Saccharomyces cerevisiae*. Western-blotting byl proveden s použitím E1-specifické monoklonální protilátky IGH 201. Linie 1-4: produkt exprese po 2, 3, 5 nebo 7 dnech exprese, v uvedeném pořadí, v klonu *Saccharomyces* transformovaném s pSY1YIG7E1s (SEQ ID NO: 50, Obrázek 28), který obsahuje nukleotidovou sekvenci kódující kuřecí sekvenci vedoucího peptidu pro lysozym připojenou k E1-H6.

Linie 5-7: produkt exprese po 2, 3 nebo 5 dnech exprese, v uvedeném pořadí, v klonu *Saccharomyces* transformovaném s pSY1aMFE1sH6aYIG1 (SEQ ID NO: 44, Obrázek 22), který obsahuje nukleotidovou sekvenci kódující vedoucí peptid α -párovacího faktoru (α -mating factor) připojenou k E1-H6.

Linie 8: markery molekulové hmotnosti o velikostech tak, jak je uvedeno.

Linie 9: purifikované Els, produkované savčími buňkami infikovanými HCV-rekombinantním virem vaccinia.

Obrázek 41. Analýza proteinu E2-H6 purifikovaného afinitní chromatografií na imobilizovaných iontech kovů (immobilized metal ion affinity chromatography, IMAC, dále označovaná „chromatografie IMAC“), který byl exprimován a upraven (posttranslačně) s *H. polymorpha* (viz Příklad 17). Proteiny v různých frakcích z promývání (linie 2 až 4) a eluční frakce (linie 5 až 7) byly analyzovány SDS-PAGE za redukujících podmínek s následným barvením gelu stříbrem. (A, horní obrázek) nebo s použitím Western blottingu za použití specifických monoklonálních protilátek namířených proti E2 (B, spodní obrázek). Velikosti markerů molekulové hmotnosti jsou uvedeny vlevo.

Obrázek 42. Eluční profil z prvního stupně chromatografie IMAC na sloupci Ni-IDA (Chelating Sepharose FF loaded with Ni^{+2} , Pharmacia) pro purifikaci sulfonovaného proteinu H6-K-E1, produkováného *H. polymorpha* (viz Příklad 18). Sloupec byl ekvilibrován s pufrem A (50 mM fosfát, 6 M GuHCl, 1 % Empigen BB (objem/objem), pH 7,2), doplněn s 20 mM imidazolu. Po nanesení vzorku byl sloupec promyt postupně s pufrem A obsahujícím 20 mM a 50 mM imidazolu, v uvedeném pořadí (jak je uvedeno na chromatogramu). Další promytí a stupeň eluce His-značených (His-tagged) produktů byl proveden postupnou aplikací pufru B (PBS, 1% Empigen BB, pH 7,2), doplněným s 50 mM imidazolu a 200 mM imidazolu, v uvedeném pořadí (jak je uvedeno na chromatogramu). Byly

smíseny následující frakce: pool z promytí 1 (frakce 8 až 11, promytí s 50 mM imidazolu). Eluovaný materiál byl odebírán jako oddělené frakce 63 až 72, nebo byl připraven jako smísený vzorek (frakce 63 až 69). Osa Y uvádí absorbanci uvedenou v mAU (mili jednotky absorbance) Osa X uvádí Eluční objem v ml.

Obrázek 43. Analýza IMAC-purifikovaného proteinu H6-K-E1 (viz Obrázek 42), exprimovaného a upraveného z CL-H6-K-E1 na H6-K-E1 v *H. polymorpha*. Proteiny v poolu z promytí 1 (linie 12) a eluční frakce 63 až 72 (linie 2 až 11) byly analyzovány se SDS-PAGE za redukujících podmínek s následným barvením gelu stříbrem (**A**, horní obrázek). Proteiny přítomné ve vzorku před IMAC chromatografií (linie 2), v poolu z průtoku (flow-through pool) (linie 4), v poolu z promytí 1 (linie 5) a v elučním poolu (linie 6) byly analyzovány metodou Western blotting s použitím specifických monoklonálních protilátek namířených proti E1 (**B**, dolní obrázek; na dráze 3 nebyl nanesen žádný vzorek). Velikosti markerů molekulové hmotnosti (linie M) jsou uvedeny vlevo.

Obrázek 44. Eluční profil z druhého stupně chromatografie IMAC na sloupci Ni-IDA (Chelating Sepharose FF loaded with Ni^{+2} , Pharmacia) pro purifikaci E1, rezultujícího z *in vitro* úpravy H6-K-E1 (purifikace viz Obrázek 42) s Endo Lys-C. Protékající eluát byl odebírán do oddělených frakcí (1 až 40), které byly testovány na přítomnost produktů E1s. Frakce (7 až 28), obsahující E1 produkovaný z H6-K-E1, byly spojeny. Osa Y uvádí absorbanci uvedenou v mAU (mili jednotky absorbance). Osa X uvádí eluční objem v ml.

Obrázek 45. Analýza Western-blotting znázorňující pruhy specifických proteinů Els, které reagují s biotinylovaným heparinem (viz rovněž Příklad 19). Byly analyzovány preparáty Els, purifikované ze savčí buněčné kultury infikované HCV-rekombinantním virem vaccinia nebo exprimované s *H. polymorpha*. Vpravo od svislé čáry jsou uvedeny výsledky Western-blotu s biotinylovanou E1 specifickou monoklonální protilátkou IGH 200. Vlevo od svislé čáry jsou uvedeny výsledky Western-blotu získané s biotinylovaným heparinem. Z těchto výsledků lze odvodit, že zejména méně glykosylované Els mají vysokou afinitu k heparinu.

Linie M: marker molekulové hmotnosti (molekulové hmotnosti jsou uvedeny vlevo).

Linie 1: Els ze savčích buněk a alkylované během izolace.

Linie 2: Els-H6 exprimované s *H. polymorpha* a sulfonované během izolace.

Linie 3: Els-H6 exprimované s *H. polymorpha* a sulfonované během izolace.

Linie 4: materiál shodný s tím, který byl nanášen na dráhu 2, avšak podrobený působení dithiothreitolu k přeměně sulfonovaných Cys-thiolových skupin na Cys-thiolové skupiny.

Obrázek 46. Profil z gelové chromatografie (Size exclusion chromatography, SEC) purifikovaného E2-H6, exprimovaného v *H. polymorpha* v sulfonované formě, podrobeného působení PBS, 3% betain k posílení tvorby částic podobných viru záměnou Empigenu BB za betain. Smísené frakce obsahující VLPs, které byly použity pro další testy, jsou označeny „↔“. Osa Y uvádí absorbanci uvedenou v mAU (mili jednotky

absorbance). Osa X uvádí eluční objem v ml. Viz také příklad 20.

Obrázek 47. Profil z gelové chromatografie (Size exclusion chromatography, SEC) purifikovaného E2-H6, exprimovaného v *H polymorpha* v alkylované formě, podrobeného působení PBS, 3% betain k posílení tvorby částic podobných viru záměnou Empigenu BB za betain. Smísené frakce obsahující VLPs, které byly použity pro další testy, jsou označeny „↔“. Osa Y uvádí absorbanci uvedenou v mAU (mili jednotky absorbance). Osa X uvádí eluční objem v ml. Viz také příklad 20.

Obrázek 48. Profil z gelové chromatografie (Size exclusion chromatography, SEC) purifikovaného E1, exprimovaného v *H polymorpha* v sulfonované formě, podrobeného působení PBS, 3% betain k posílení tvorby částic podobných viru záměnou Empigenu BB za betain. Smísené frakce obsahující VLPs, které byly použity pro další testy, jsou označeny „↔“. Osa Y uvádí absorbanci uvedenou v mAU (mili jednotky absorbance). Osa X uvádí Eluční objem v ml. Viz také příklad 20.

Obrázek 49. Profil z gelové chromatografie (Size exclusion chromatography, SEC) purifikovaného E1, exprimovaného v *H polymorpha* v alkylované formě, podrobeného působení PBS, 3% betain k posílení tvorby částic podobných viru záměnou Empigenu BB za betain. Smísené frakce obsahující VLPs, které byly použity pro další testy, jsou označeny „↔“. Osa Y uvádí absorbanci uvedenou v mAU (mili jednotky absorbance). Osa X uvádí eluční objem v ml. Viz také příklad 20.

Obrázek 50. SDS-PAGE (za redukčních podmínek) a analýza Western blotting VLPs tak, jak byly izolovány po gelové chromatografii (size exclusion chromatography, (SEC)), popsané na Obrázcích 48 a 49. Levá část: barvení gelu SDS-PAGE stříbrem. Pravá část: Western blot s použitím specifické monoklonální protilátky namířené proti E1 (IGH201). Linie 1: marker molekulové hmotnosti (molekulové hmotnosti jsou uvedeny vlevo); linie 2: pool z VLPs obsahující sulfonovaný E1 (srovnej Obrázek 48); linie 3: pool z VLPs obsahující alkylovaný E1 (srovnej Obrázek 49). Viz také příklad 20.

Obrázek 51. E1 produkovaný v savčích buňkách („M“), nebo E1, produkovaný v *H. polymorpha* („H“), byly zachyceny na pevnou podložku ELISA ke stanovení konečných titrů (end point titer) protilátek přítomných v séru po vakcinaci myši s E1, produkovaném v savčích buňkách ((horní panel), nebo po vakcinaci myši s E1, produkovaném v *H. polymorpha* (dolní panel). Horizontální čára představuje střední titr protilátek. Konečné titry (v násobném ředění) jsou uvedeny na ose Y. Viz také Příklad 22.

Obrázek 52. E1 produkovaný v *Hansenula* („A“), nebo sulfonovaný E1 byly zachyceny na pevnou podložku ELISA ke stanovení konečných titrů (end point titer) protilátek přítomných v séru po vakcinaci myši s E1, produkovaném v *Hansenula*, který byl alkylován (horní panel), nebo po vakcinaci myši s E1, produkovaném v *Hansenula*, který byl sulfonován (dolní panel). Horizontální čára představuje střední titr protilátek. Konečné titry (v násobném ředění) jsou uvedeny na ose Y. Viz také Příklad 23.

Obrázek 53. HCV E1, produkováný v savčích buňkách infikovaných HCV-rekombinantním virem vaccinia, a HCV E1, produkováný v *H. polymorpha*, byly neneseny přímo na destičky ELISA. Konečné titry protilátek byly stanoveny v séru šimpanzů vakcinovaných s E1, produkováným v savčích buňkách (horní panel), a z myších monoklonálních protilátek, vyvolaných proti E1 produkovanému savčími buňkami (spodní panel). Šimpanzové Yoran a Marti byly profylakticky vakcinováni. Šimpanzové Ton, Phil, Marcel, Peggy a Femma byly vakcinováni terapeuticky. Černě vyplněné sloupce: ELISA plotna s navázaným E1, produkováným v savčích buňkách. Prázdné sloupce: ELISA plotna s navázaným E1, produkováným v *Hansenula*. Konečné titry (v násobném ředění) jsou uvedeny na ose Y. Viz také Příklad 24.

Obrázek 54. Gelová elektroforéza s fluorescenčním značením cukru (Fluorophore-assisted carbohydrate gel Electrophoresis) oligosacharidů uvolněných z E1, produkováného savčími buňkami infikovanými rekombinantním virem vaccinia, a z proteinu E1-H6, produkováného *Hansenula*.

Linie 1: Glukózová standardní stupnice uvádějící vlevo počet monosacharidů (3 až 10, označeno jako G3 až G10).

Linie 2: 25 µg N-vázaných oligosacharidů uvolněných z (alkylovaného) E1, produkováného v savčích buňkách.

Linie 3: 25 µg N-vázaných oligosacharidů uvolněných z (alkylovaného) E1, produkováného v *Hansenula*.

Linie 4: maltotetraóza 100 pmol.

Viz také Příklad 25.

Obrázek 55. Obrázek uvádí zjednodušené struktury referenčních oligomanóz Man-9 (Obrázek 55.A), Man-8.

(Obrázek 55.B), Man-7 (Obrázek 55.C), Man-6 (Obrázek 55.D) a Man-5 (Obrázek 55.E). „Man“ = manóza; „GlcNAc“ = N-acetylglukosamin; „ α “ = α -vazba mezi 2 manózami; „ β “ = β -vazba mezi 2 manózami; „(1-3)“, „(1-4)“ a „(1-6)“ = (1-3), (1-4) a (1-6) vazby mezi 2 manózami, v uvedeném pořadí. Závorky na Obrázku 55.B a 55.C znamenají, že v uvedeném pořadí jsou 2 a 1 zbytky (zbytek) manózy vlevo od závorky jsou spojeny (je spojen) vazbou (1-2) ke 2 a 1 ze 3 manózových zbytků uvedených vpravo od závorek. Viz také příklad 26.

Obrázek 56. Obrázek uvádí vyšší oligomanózu sestávající z 10 manózových molekul připojených k chitobióze. Každý koncový zbytek manózy je připojen vazbou α 1-3 k neterminálnímu zbytku manózy. Tenká šipka směřující vzhůru označuje oligosacharidové vazby, které jsou náchylné ke štěpení s α 1-2 manozidázou (pro tuto oligomanózu není žádná), tlustá šipka směřující vzhůru nebo vlevo označuje oligosacharidové vazby, které jsou náchylné ke štěpení s α manozidázou po odstranění 1-2-vázaných manóz (neplatí pro tuto oligomanózu) a prázdná dolu směřující šipka označuje oligosacharidové vazby, které jsou náchylné ke štěpení s β manozidázou po odstranění α -vázaných manóz. Viz také Příklad 26.

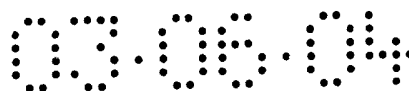
Obrázek 57. Obrázek zobrazuje vyšší oligomanózu sestávající z 9 manózových molekul připojených k chitobióze. V této oligomanóze je jeden koncový zbytek manózy připojen vazbou α 1-2 k neterminálnímu zbytku manózy. Tenká šipka směřující vzhůru označuje oligosacharidové vazby, které jsou náchylné ke štěpení s α 1-2 manozidázou, tlustá šipka směřující vzhůru nebo vlevo označuje oligosacharidové vazby, které jsou náchylné ke štěpení s α manozidázou po

odstranění α 1-2-vázaných manóz, a prázdná dolu směřující šipka označuje oligosacharidové vazby, které jsou náchylné ke štěpení s β manozidázou po odstranění α -vázaných manóz. Viz také Příklad 26.

Obrázek 58. Obrázek zobrazuje vyšší oligomanózu Man-9 sestávající z 9 manózových molekul připojených k chitobióze. V této oligomanóze jsou všechny koncové manózové zbytky připojeny vazbou α 1-2 k neterminálnímu zbytku manózy. Tenká šipka směřující vzhůru označuje oligosacharidové vazby, které jsou náchylné ke štěpení s α 1-2 manozidázou, tlustá šipka směřující vzhůru označuje oligosacharidové vazby, které jsou náchylné ke štěpení s α manozidázou po odstranění α 1-2-vázaných manóz, a prázdná dolu směřující šipka označuje oligosacharidové vazby, které jsou náchylné ke štěpení s β manozidázou po odstranění α -vázaných manóz. Viz také Příklad 26.

Obrázek 59. Obrázek zobrazuje vyšší oligomanózu Man-8 sestávající z 8 manózových molekul připojených k chitobióze. V této oligomanóze jsou všechny koncové manózové zbytky připojeny vazbou α 1-3 nebo α 1-6 k neterminálnímu zbytku manózy, což činí tuto strukturu zcela rezistentní ke štěpení s α 1-2 manozidázou. Tenká šipka směřující vzhůru označuje oligosacharidové vazby, které jsou náchylné ke štěpení s α manozidázou, a prázdná dolu směřující šipka označuje oligosacharidové vazby, které jsou náchylné ke štěpení s β manozidázou po odstranění α -vázaných manóz. Viz také Příklad 26.

Obrázek 60. Obrázek zobrazuje vyšší oligomanózu Man-7 sestávající ze 7 manózových molekul připojených k chitobióze. V této oligomanóze jsou všechny koncové



manóзовé zbytky připojeny vazbou α 1-3 k neterminálnímu zbytku manózy, což činí tuto strukturu zcEla rezistentní ke štěpení s α 1-2 manozidázou. Tenká šipka směřující vzhůru označuje oligosacharidové vazby, které jsou náchylné ke štěpení s α manozidázou, a prázdná dolu směřující šipka označuje oligosacharidové vazby, které jsou náchylné ke štěpení s β manozidázou po odstranění α -vázaných manóz. Viz také Příklad 26.

Obrázek 61. Obrázek zobrazuje vyšší oligomanózu sestávající z 9 manóзовých molekul připojených k chitobióze. V této oligomanóze je jeden manóзовý zbytek připojen vazbou α 1-2 k neterminálnímu zbytku. Tenká šipka směřující vzhůru označuje oligosacharidové vazby, které jsou náchylné ke štěpení s α 1-2 manozidázou, tlustá šipka směřující vzhůru nebo vlevo označuje oligosacharidové vazby, které jsou náchylné ke štěpení s α manozidázou po odstranění α 1-2-vázaných manóz, a prázdná dolu směřující šipka označuje oligosacharidové vazby, které jsou náchylné ke štěpení s β manozidázou po odstranění α -vázaných manóz. Viz také Příklad 26.

Obrázek 62. Obrázek zobrazuje domnělý oligosacharid obsahující glukózu sestávající z 1 nebo 2 glukózových molekul a z 8 manóзовých molekul připojených k chitobióze. V tomto oligosacharidu každý z koncových α 1-2 vázaných zbytků manózy v řetězci A nebo B („A $\rightarrow$ “ a „B $\rightarrow$ “ na Obrázku) nese jeden nebo dva glukózové zbytky tak, jak je vyznačeno s (Glc)Glc vlevo od závorky. Tenká šipka směřující vzhůru označuje oligosacharidové vazby, které jsou náchylné ke štěpení s α 1-2 manozidázou, za předpokladu, že ke koncovému manóзовému zbytku není připojena žádná glukóza. Tlustá vzhůru nebo vlevo směřující

šipka označuje oligosacharidové vazby, které jsou náchylné k štěpení s α manozidázou po odstranění α 1-2 vázaných manóz, a prázdná dolů směřující šipka označuje oligosacharidové vazby, které jsou náchylné ke štěpení s β manozidázou po odstranění α vázaných manóz. Přehled možných reakčních produktů uvádí Tabulka 10 v Příkladu 26.

Obrázek 63. Reakční produkty z inkubace Man-9 s nebo bez exoglykosidázy přes noc byly odděleny na sloupci TSK gel-Amide-80 (0,46 x 25 cm, Tosoh Biosep), připojeném k zařízení Waters Alliance HPLC. Oddělování oligosacharidů probíhalo za teploty prostředí při průtoku 1,0 ml/min. Rozpouštědlo A bylo složeno z 0,1% kyseliny octové v acetonitrilu a rozpouštědlo B bylo složeno z 0,2% kyselina octová-0,2% triethylamin ve vodě. Oddělování 2-AB značených oligosacharidů bylo prováděno s použitím izokratické eluce 28 % B na 5 objemů sloupce s následujícím lineárním zvýšením na 45 % B během patnácti objemů sloupce. Složení elučního rozpouštědla je uvedeno na pravé ose Y jako % rozpouštědla B v rozpouštědle A (objem/objem). Doba eluce je uvedena v minutách na ose X. Levá osa Y uvádí fluorescenci eluovaných oligosacharidů značených 2-aminobenzamidem (2-AB). Excitační vlnová délka 2-AB je 330 nm, emisní vlnová délka je 420 nm.

Signál 1 („1“) v chromatogramu označuje eluci Man-9 inkubovaného přes noc s exoglykosidázami. Signál 2 („2“) označuje eluci směsi Man-5 a Man-6 po inkubaci Man-9 s α 1-2 manozidázou přes noc. Signály 3 a 4 („3“ a „4“) označují eluci 4'- β -mannosyl chitobiózy po inkubaci Man-9 po dobu 1 hodiny nebo přes noc s α manozidázou, v uvedeném pořadí. Signál 5 („5“) označuje eluci chitobiózy po inkubaci Man-9 s α - a β -manozidázou přes noc. Signály 1-5

jsou uvedeny jako překrývající se, vzhledem k tomu, že jejich příslušné základní úrovně nejsou všechny na nulové úrovni. Signál 6 („6“) označuje použitý gradient rozpouštědla.

Píky, jestliže jsou přítomny, označené písmeny A až K v horní části obrázku, znamenají A, chitobióza; B, 4'- β -mannosyl-chitobióza; C, Man-2; D, Man-3; E, Man-4; F, Man-5; G, Man-6; H, Man-7; I, Man-7 ; J, Man-8; a K, Man-10. Viz také Příklad 26.

Obrázek 64. Reakční produkty oligosacharidů z Els, produkovaných v *Saccharomyces*, po inkubaci s nebo bez exoglykosidáz přes noc byly oddělovány na sloupci TSK gel-Amide-80 (0,46 x 25 cm, Tosoh Biosep), připojeném k zařízení Waters Alliance HPLC. Oddělování oligosacharidů probíhalo za teploty prostředí při průtoku 1,0 ml/min. Rozpouštědlo A bylo složeno z 0,1% kyseliny octové v acetonitrilu a rozpouštědlo B bylo složeno z 0,2% kyselina octová-0,2% triethylamin ve vodě. Oddělování 2-AB značených oligosacharidů bylo prováděno s použitím izokratické eluce 28 % B na 5 objemů sloupce s následujícím lineárním zvýšením na 45 % B během patnácti objemů sloupce. Složení elučního rozpouštědla je uvedeno na pravé ose Y jako % rozpouštědla B v rozpouštědle A (objem/objem). Doba eluce je uvedena v minutách na ose X. Levá osa Y uvádí fluorescenci eluovaných 2-aminobenzamidem (2-AB)-značených oligosacharidů. Excitační vlnová délka 2-AB je 330 nm, emisní vlnová délka je 420 nm.

Signál 1 („1“) v chromatogramu označuje eluci oligosacharidů odvozených z Els, produkovaných v *Saccharomyces*, inkubovaných přes noc bez exoglykosidáz. Signál 2 („2“) označuje eluci oligosacharidů odvozených

z Els produkovaných v *Saccharomyces*, po inkubaci Man-9 s α 1-2 manozidázou přes noc. Signály 3 a 4 („3“ a „4“) označují eluci oligosacharidů odvozených z Els, produkovaných v *Saccharomyces*, po inkubaci po dobu 1 hodiny nebo přes noc s α manozidázou, v uvedeném pořadí. Signál 5 („5“) označuje eluci oligosacharidů odvozených z Els, produkovaných v *Saccharomyces*, po inkubaci s α - a β -manozidázou přes noc. Signály 1-5 jsou uvedeny jako překrývající se, vzhledem k tomu, že jejich příslušné základní úrovně nejsou všechny na nulové úrovni. Signál 6 („6“) označuje použitý gradient rozpouštědla. Píky, jestliže jsou přítomny, označené písmeny A až K v horní části obrázku, znamenají A, chitobióza; B, 4'- β -mannosyl-chitobióza; C, Man-2; D, Man-3; E, Man-4; F, Man-5; G, Man-6; H, Man-7; I, Man-7 ; J, Man-8; a K, Man-10. Viz také Příklad 26.

Obrázek 65. Reakční produkty oligosacharidů z Els, produkovaných v savčích buňkách transfekovaných virem vaccinia, po inkubaci s nebo bez exoglykosidáz přes noc byly oddělovány na sloupci TSK gel-Amide-80 (0,46 x 25cm, Tosoh Biosep), připojeném k zařízení Waters Alliance HPLC. Oddělování oligosacharidů probíhalo za teploty prostředí při průtoku 1,0 ml/min. Rozpouštědlo A bylo složeno z 0,1% kyseliny octové v acetonitrilu a rozpouštědlo B bylo složeno z 0,2% kyselina octová-0,2% triethylamin ve vodě. Oddělování 2-AB značených oligosacharidů bylo prováděno s použitím izokratické eluce 28 % B na 5 objemů sloupce s následujícím lineárním zvýšením na 45 % B během patnácti objemů sloupce. Složení elučního rozpouštědla je uvedeno na pravé ose Y jako % rozpouštědla B v rozpouštědle A (objem/objem). Doba eluce je uvedena v minutách na ose X. Levá osa Y uvádí fluorescenci eluovaných 2-aminobenzamidem

(2-AB)-značených oligosacharidů. Excitační vlnová délka 2-AB je 330 nm, emisní vlnová délka je 420 nm.

Signál 1 („1“) v chromatogramu označuje eluci oligosacharidů odvozených z Els, produkovaných savčími buňkami transfekovanými virem vaccinia, inkubovaných přes noc bez exoglykosidáz. Signál 2 („2“) označuje eluci oligosacharidů odvozených z Els, produkovaných savčími buňkami transfekovanými virem vaccinia, po inkubaci Man-9 s α 1-2 manozidázou přes noc. Signály 3 a 4 („3“ a „4“) označují eluci oligosacharidů odvozených z Els, produkovaných savčími buňkami transfekovanými virem vaccinia, po inkubaci po dobu 1 hodiny nebo přes noc s α manozidázou, v uvedeném pořadí. Signál 5 („5“) označuje eluci oligosacharidů odvozených z Els, produkovaných savčími buňkami transfekovanými virem vaccinia, po inkubaci s α - a β -manozidázou přes noc. Signály 1-5 jsou uvedeny jako překrývající se, vzhledem k tomu, že jejich příslušné základní úrovně nejsou všechny na nulové úrovni. Signál 6 („6“) označuje použitý gradient rozpouštědla.

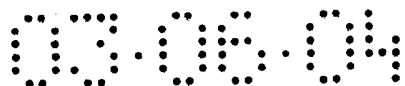
Píky, jestliže jsou přítomny, označené písmeny A až K v horní části obrázku, znamenají A, chitobióza; B, 4'- β -mannosyl-chitobióza; C, Man-2; D, Man-3; E, Man-4; F, Man-5; G, Man-6; H, Man-7; I, Man-7 ; J, Man-8; a K, Man-10. Viz také Příklad 26.

Obrázek 66. Reakční produkty oligosacharidů z Els, produkovaných v *Hansenula*, po inkubaci s nebo bez exoglykosidáz přes noc byly oddělovány na sloupci TSK gel-Amide-80 (0,46 x 25cm, Tosoh Biosep), připojeném k zařízení Waters Alliance HPLC. Oddělování oligosacharidů probíhalo za teploty prostředí při průtoku 1,0 ml/min. Rozpouštědlo A bylo složeno z 0,1% kyseliny octové v acetonitrilu a

rozpouštědlo B bylo složeno z 0,2% kyselina octová-0,2% triethylamin ve vodě. Oddělování 2-AB značených oligosacharidů bylo prováděno s použitím izokratické eluce 28 % B na 5 objemů sloupce s následujícím lineárním zvýšením na 45 % B během patnácti objemů sloupce. Složení elučního rozpouštědla je uvedeno na pravé ose Y jako % rozpouštědla B v rozpouštědle A (objem/objem). Doba eluce je uvedena v minutách na ose X. Levá osa Y uvádí fluorescenci eluovaných 2-aminobenzamidem (2-AB)-značených oligosacharidů. Excitační vlnová délka 2-AB je 330 nm, emisní vlnová délka je 420 nm.

Signál 1 („1“) v chromatogramu označuje eluci oligosacharidů odvozených z Els, produkovaných v *Hansenula*, inkubovaných přes noc bez exoglykosidáz. Signál 2 („2“) označuje eluci oligosacharidů odvozených z Els, produkovaných v *Hansenula*, po inkubaci Man-9 s α 1-2 manozidázou přes noc. Signály 3 a 4 („3“ a „4“) označují eluci oligosacharidů odvozených z Els, produkovaných v *Hansenula*, po inkubaci přes noc s α manozidázou. Signál 5 („5“) označuje eluci oligosacharidů odvozených z Els, produkovaných v *Hansenula*, po inkubaci s α - a β -manozidázou přes noc. Signály 1-5 jsou uvedeny jako překrývající se, vzhledem k tomu, že jejich příslušné základní úrovně nejsou všechny na nulové úrovni. Signál 6 („6“) označuje použitý gradient rozpouštědla.

Píky, jestliže jsou přítomny, označené písmeny A až K v horní části obrázku, znamenají A, chitobióza; B, 4'- β -mannosyl-chitobióza; C, Man-2; D, Man-3; E, Man-4; F, Man-5; G, Man-6; H, Man-7; I, Man-7 ; J, Man-8; a K, Man-10. Viz také Příklad 26.



Obrázek 67. Analýza SDS-PAGE a barvení proteinů E1, produkovaných v *Hansenula* a savčími buňkami infikovanými HCV-rekombinantním virem vaccinia, s modří Coomassie Brilliant Blue.

Linie 1: markery molekulových hmotn.ostí s uvedením molekulových hmotn.ostí vlevo;

Linie 2: alkylované Els, produkované v *Hansenula polymorpha* (10 µg);

Linie 3: alkylované Els, produkované v *Hansenula polymorpha* (5 µg);

Linie 4: alkylované Els, produkované v *Hansenula polymorpha* (2,5 µg);

Linie 5: alkylované Els, produkované v buňkách vero infikovaných HCV-rekombinantním virem vaccinia (10 µg);

Linie 6: alkylované Els, produkované v buňkách vero infikovaných HCV-rekombinantním virem vaccinia (5 µg);

Linie 7: alkylované Els, produkované v buňkách vero infikovaných HCV-rekombinantním virem vaccinia (2,5 µg).

Viz také Příklad 27.

Obrázek 68. Sekvence proteinu HCV E2-H6 (SEQ ID NO: 5) s vyznačením tryptických fragmentů (sekvence v rámečcích - boxed sequences) deglykosylovaného proteinu. Glykosylované zbytky Asn jsou přeměňovány na zbytky Asp enzymem PNGázou F a jsou vyznačeny „*“ pod sekvencí. Zbytky Asn jsou náchylné k proteolytickému štěpení s Asp-N endoproteázou. Možnými N-glykosylačními místy v E2-H6 (SEQ ID NO:5) jsou N₄₁₇, N₄₂₃, N₄₃₀, N₄₄₈, N₄₇₈, N₅₃₂, N₅₄₀, N₅₅₆, N₅₇₆, N₆₂₃ a N₆₄₅ podle číslování v polyproteinu HCV; na obrázku jsou polohy těchto míst označeny jako N₃₄, N₄₀, N₄₇, N₆₅, N₉₅, N₁₄₉, N₁₅₇, N₁₇₃, N₁₉₃, N₂₄₀ a N₂₆₂. Viz také Příklad 28.

PODROBNÝ POPIS VYNÁLEZU

Ve studiích, které vedly k tomuto vynálezu, bylo pozorováno, že exprese glykosylovaných obalových proteinů HCV v *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* a *Hansenula polymorpha* byla možná jako exprese uvedených obalových proteinů HCV obsahujících signální peptidovou sekvenci připojenou k uvedeným obalovým proteinům HCV. Nicméně, vzory glykosylace obalových proteinů HCV, exprimovaných v těchto třech kvasinkových druzích, jsou však velice odlišné (viz Příklady 6, 10, 13 a 25). Konkrétněji, obalové proteiny HCV, exprimované v *S. cerevisiae* (glykosylačně deficientní mutantě) a v *H. polymorpha* byly glykosylovány způsobem napodobujícím glykosylaci s jádrem glykosylace. Obalové proteiny HCV, exprimované v *Pichia pastoris*, byly hyperglykosylovány při uvádění protichůdných údajů v předchozích zprávách o tom, že proteiny exprimované v kvasinkách nejsou normálně hyperglykosylovány (Gellissen et al. 2000, Sugrue et al. 1997).

Po další analýze vzorů glykosylace u proteinů HCV, produkováných v *S. cerevisiae* (glykosylačně deficientním kmenu), *H. polymorpha* a v savčích buňkách infikovaných HCV-rekombinantním virem vaccinia, bylo překvapivě zjištěno, že obalové proteiny HCV produkované v *Hansenula* vykazovaly vzor glykosylace, který je velice příznivý pro diagnostické, profylaktické a terapeutické aplikace těchto obalových proteinů HCV (viz Příklady 21-24 a 26-29). Toto neočekávané zjištění se odráží v různých aspektech a v provedeních předkládaného vynálezu tak, jak je uvedeno níže.



První aspekt vynálezu se týká izolovaného obalového proteinu HCV nebo jeho fragmentu, který obsahuje alespoň jedno N-glykosylační místo, kde uvedený protein nebo jeho fragment je charakterizován tím, že je produktem exprese v eukaryontní buňce a dále tím, že průměrně až 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, nebo 80 % N-glykosylovaných míst jsou místa glykosylovaná s jádrem glykosylace. Konkrétněji, více než 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 % nebo 95 % N-glykosylovaných míst je glykosylováno s oligomanózou o struktuře definované jako Man(8 až 10)-GlcNAc(2). Konkrétněji, ke kterékoliv z výše uvedených N-glykosylačních charakteristik, je další charakteristikou to, že poměr míst glykosylovaných s jádrem s oligomanózou o struktuře Man(7)-GlcNAc(2) a počet míst glykosylovaných s jádrem s oligomanózou o struktuře Man(8)-GlcNAc(2) je menší než nebo roven 0,15, 0,2, 0,25, 0,30, 0,35, 0,40, 0,44, 0,45, nebo 0,50. Další, konkrétnější charakteristikou N-glykosylace k výše uvedeným charakteristikám je skutečnost, že uvedené oligomanózy obsahují méně než 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, nebo 5 % terminální α 1,3 manózy.

Výrazem „N-glykosylovaná místa glykosylovaná s oligomanózou o struktuře definované jako Man(8 až 10)-GlcNAc(2)“ je míněno, že uvedená N-glykosylovaná místa jsou glykosylována s kteroukoliv z Man(8)-GlcNAc(2), Man(9)-GlcNAc(2), nebo Man(10)-GlcNAc(2).

Je zřejmé, že shodná N-glykosylační místa ve dvou proteinech mohou být obsazena odlišnou oligomanózou.

Výraz „protein“ se týká polymeru z aminokyselin a nevztahuje se ke specifické délce produktu; proto jsou v definici proteinu zahrnuty peptidy, oligopeptidy a polypeptidy. Uvedený termín se netýká nebo nevylučuje modifikace proteinu po expresi (post-expression modifications), jakými jsou například glykosylace, acetylace, fosforylace a podobně. V definici jsou zahrnuty například polypeptidy obsahující jeden nebo více analogů aminokyselin (včetně, například nepřírodných aminokyselin, PNA, atd.), polypeptidy se substituovanými vazbami, stejně jako další modifikace známé v oboru, a to jak přirozeně, tak nepřirozeně se vyskytující.

Jestliže je zde použit výraz „pre-pro-protein“ nebo „pre-protein“, je míněn protein obsahující pre-pro-sekvenci připojenou k proteinu, který je předmětem zájmu, nebo protein obsahující pro-sekvenci připojenou k proteinu, který je předmětem zájmu, v uvedeném pořadí. Jako alternativní označení pro „pre-sekvenci“, jsou používány výrazy „signální sekvence“, „signální peptid“, „vedoucí peptid“, nebo „vedoucí sekvence“; všechny se vztahují k aminokyselinové sekvenci, která zavádí pre-protein do hrubého endoplasmatického retikula (rough endoplasmic reticulum, ER), což je nezbytnou podmínkou pro (N)-glykosylaci. „Signální sekvence“, „signální peptid“, „vedoucí peptid“, nebo „vedoucí sekvence“ je odštěpována, tj. je „odstraněna“ z proteinu obsahujícího signální sekvenci připojenou k proteinu, který je předmětem zájmu, na lumenální straně tohoto ER hostitelskými specifickými proteázami, které jsou označovány jako signální peptidázy.

Podobně je pre-pro-protein přeměňován na pro-protein po přemístění do lumen ER. V závislosti na podstatě této "pro"-aminokyselinové sekvence", může nebo nemusí být tato sekvence odstraněna hostitelskou buňkou, která exprimuje pre-pro-protein. Velmi dobře známou pre-pro-aminokyselinovou sekvencí je pre-pro-sekvence α párovacího faktoru ze *S. cerevisiae*.

Výrazem "obalové proteiny HCV" jsou míněny obalové proteiny HCV E1 nebo HCV E2, nebo jejich část, přičemž uvedené proteiny mohou být odvozeny z kmene HCV jakéhokoliv genotypu. Konkrétněji, je HCVENV vybrán ze skupiny aminokyselinových sekvencí sestávající ze sekvencí SEQ ID NO: 85 až 98, aminokyselinových sekvencí, které jsou alespoň z 90 % identické se sekvencemi SEQ ID NO: 85 až 98, a z fragmentů kterékoli z uvedených sekvencí. Za "identické" aminokyseliny jsou považovány skupiny konzervovaných aminokyselin tak, jak bylo popsáno výše, tj. skupiny sestávající z Met, Ile, Leu a Val; skupiny sestávající z Arg, Lys a His; skupiny sestávající z Phe, Trp a Tyr; skupiny sestávající z Asp a Glu; skupiny sestávající z Asn a Gln; skupiny sestávající z Cys, Ser a Thr; a skupiny sestávající z Ala a Gly.

Konkrétněji, výraz „obalový protein HCV“ se týká polypeptidu nebo jeho analogu (např. mimotopů), obsahujícího aminokyselinovou sekvenci (a/nebo aminokyselinový analogů), která představuje alespoň jeden epitop HCV buď z oblasti E1, nebo z oblasti E2, vedle glykosylačního místa. Tyto obalové proteiny mohou být jak monomerními, hetero-oligomerními, tak homo-oligomerními formami rekombinantně exprimovaných obalových proteinů. Sekvence definující epitop běžně odpovídá aminokyselinovým

sekvencím buďto oblasti HCV E1, nebo oblasti HCV E2 (buďto identicky nebo se substitucemi s analogy nativních aminokyselinových zbytků, které nenarušují epitop).

Je třeba rozumět, že epitop HCV může být ko-lokalizován s glykosylačním místem.

Obecně, sekvence definující epitop má délku 3 nebo 4 aminokyselin, běžněji má délku 5, 6, nebo 7 aminokyselin, častěji je délka 8 nebo 9 aminokyselin a nejtýpistiěji je délka epitopu 10 nebo více aminokyselin. Pokud se jedná o konformační epitopy, délka sekvence definující epitop může být ovlivněna různými rozsáhlými obměnami, neboť se předpokládá, že tyto epitopy jsou vytvářeny v trojrozměrném uspořádání epitopu (například skládání). A tak počet aminokyselin definujících epitop může být relativně malý, avšak tyto aminokyseliny mohou být obecně rozptýleny podél délky molekuly, přičemž do správné konformace epitopu jsou uspořádány prostřednictvím skládání molekuly. Části antigenu, které se nacházejí mezi zbytky definujícími epitop, nemusí být kritické pro konformační strukturu epitopu. Tak například, delece nebo substituce těchto intervenujících sekvencí nemusí mít vliv na konformaci epitopu, za předpokladu, že jsou zachovány sekvence, které jsou kritické pro konformační strukturu epitopu (například cysteiny zúčastněné v tvorbě disulfidových vazeb, glykosylační místa atd.). Konformační epitop mohou také tvořit 2 nebo více základních oblastí podjednotek homo-oligomeru nebo hetero-oligomeru.

Tak, jak je zde použito, „epitop jmenovaného polypeptidu“ znamená epitopy se shodnou aminokyselinovou sekvencí, jako má epitop jmenovaného polypeptidu, a jejich

imunologické ekvivalenty. Takové ekvivalenty rovněž zahrnují kmen, subtyp (=genotyp), nebo typově (skupinově) - specifické varianty, například v současné době známé sekvence nebo kmeny, které náleží ke genotypům 1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 1f, 2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2f, 2g, 2h, 2i, 3a, 3b, 3c, 3d, 3e, 3f, 3g, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 4f, 4g, 4h, 4i, 4j, 4k, 4l, 5a, 5b, 6a, 6b, 6c, 7a, 7b, 7c, 8a, 8b, 9a, 9b, 10a, 11 (a jeho sybtypů), 12 (a jeho subtypů) nebo 13 (a jeho subtypů), nebo dalších nově popsaných (sub)typů HCV. Je třeba rozumět, že aminokyseliny, které vytvářejí epitop, nemusí být částí lineární sekvence, ale mohou být rozptýleny v jakémkoliv počtu aminokyselin, a tak vytvářejí konformační epitop.

Antigeny HCV podle předkládaného vynálezu zahrnují konformační epitopy z E1 a/nebo E2 (obalových) domén HCV. Doména E1, o které se předpokládá, že odpovídá virovému obalovému proteinu, je v současnosti odhadována v rozsahu aminokyselin 192-383 v polyproteinu HCV (Hijikata et al., 1991). Předpokládá se, že po expresi v savčím systému (glykosylovaný) má E1 přibližnou molekulovou hmotnost 35 kDa při stanovení s SDS-PAGE. Předpokládá se, že protein E2, dříve nazývaný NS1, zahrnuje aminokyseliny 384-809 nebo 384-746 (Grakoui et al., 1993) v polyproteinu HCV a rovněž se jedná o obalový protein. Předpokládá se, že po expresi v systému vaccinia (glykosylovaný) má zjevnou molekulovou hmotnost stanovenou v gelu přibližně 72 kDa. Je třeba si uvědomit, že umístění konců těchto proteinů jsou odhadováno (například karboxykonec E2 může ležet někde v rozmezí oblasti aminokyselin 730-820, a tak končí například aminokyselinou 730, 735, 740, 742, 744, 745, výhodně aminokyselinou 746, 747, 748, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 809, 810, 820). Protein E2 může být rovněž exprimován

společně s E1, a/nebo s jaderným proteinem viru (aa 1-191), a/nebo P7 (aa 747-809), a/nebo NS2 (aa 810-1026), a/nebo NS3 (aa 1027-1657), a/nebo NS4A (aa 1658-1711), a/nebo NS4B (aa 1712-1972), a/nebo NS5A (aa 1973-2420), a/nebo NS5B (aa 2421-3011), a/nebo s částí z kteréhokoliv z těchto proteinů HCV, které jsou od E2 odlišné. Podobně, protein E1 může také být exprimován společně s proteinem E2, a/nebo s jaderným proteinem (aa 1-191), a/nebo P7 (aa 747-809), a/nebo NS2 (aa 810-1026), a/nebo NS3 (aa 1027-1657), a/nebo NS4A (aa 1658-1711), a/nebo NS4B (aa 1712-1972), a/nebo NS5A (aa 1973-2420), a/nebo NS5B (aa 2421-3011), a/nebo s částí z kteréhokoliv z těchto proteinů HCV, které jsou od E1 odlišné. Expres společně s těmito dalšími proteiny může být významná pro dosažení správného poskládání proteinu.

Výraz „E1“ tak, jak je zde použit, rovněž zahrnuje analogy a zkrácené formy, které jsou imunogenně křížově reaktivní s přirozeným E1, a zahrnuje proteiny E1 vybrané z genotypů 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 nebo 13, nebo jakýkoliv další nově identifikovaný typ HCV nebo subtyp. Výraz „E2“ tak, jak je zde použit, rovněž zahrnuje analogy a zkrácené formy, které jsou imunogenně křížově reaktivní s přirozeným E2, a zahrnuje proteiny E2 vybrané z genotypů 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 nebo 13, nebo jakýkoliv další nově identifikovaný typ HCV nebo subtyp. Tak například, Kato et al. (1992) popsal mnohonásobné inserce kodónu mezi kodón 383 a 384, stejně jako delece aminokyselin 384-387. Je třeba rozumět, že izoláty použité v části Příkladů provedení podle předkládaného vynálezu, nebyly zamýšleny jako omezující rozsah vynálezu, a že jakýkoliv izolát HCV vybraný z typů 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 nebo 13, nebo jakýkoliv z dalších nových genotypů HCV je vhodným zdrojem

sekvence E1 a/nebo E2 pro provedení předkládaného vynálezu. Podobně, tak jak bylo výše popsáno, proteiny HCV, které jsou ko-exprimovány s obalovými proteiny HCV podle předkládaného vynálezu mohou být odvozeny od jakéhokoli typu HCV, tedy i od shodného typu, jako jsou obalové proteiny HCV podle předkládaného vynálezu.

„E1/E2“, tak, jak je zde použito, se týká oligomerní formy obalových proteinů obsahující alespoň jednu složku E1 a alespoň jednu složku E2.

Výraz „specifický oligomerní“ E1 a/nebo E2 a/nebo E1/E2 obalové proteiny se týká všech možných oligomerních forem rekombinantně exprimovaných E1 a/nebo E2 obalových proteinů, které nejsou agregáty E1 a/nebo E2. Specifické oligomerní obalové proteiny se rovněž týkají homo-oligomerních E1 nebo E2 obalových proteinů (viz níže). Výraz „jednoduché nebo specifické oligomerní“ E1 a/nebo E2 a/nebo E1/E2 obalové proteiny se týká jednotlivých monomerních proteinů E1 nebo E2 (jednotlivý v přísném slova smyslu), stejně jako specifických oligomerních rekombinantně exprimovaných proteinů E1 a/nebo E2 a/nebo E1/E2. Tyto jednotlivé nebo specifické oligomerní obalové proteiny podle předkládaného vynálezu mohou být dále definovány následujícími vzorci $(E1)_x(E2)_y$, kde x může být číslo mezi 0 a 100, a y může být číslo mezi 0 a 100, za předpokladu, že x a y nejsou oba 0. Jestliže $x=1$ a $y=0$, pak řečené obalové proteiny představují monomerní E1.

Výraz „homo-oligomer“ tak, jak je zde použit se týká komplexního E1 nebo E2, obsahujícího více než jeden monomer E1 nebo E2, například E1/E1 dimery, E1/E1/E1 trimery nebo E1/E1/E1/E1 tetramery a E2/E2 dimery, E2/E2/E2 trimery nebo

E2/E2/E2/E2 tetramery, E1 pentamery a hexamery, E2 pentamery a hexamery, nebo jakékoliv vyšší homo-oligomery E1 nebo E2 jsou „homo-oligomery“ spadající do rozsahu definice. Oligomery mohou obsahovat jeden, dva nebo více odlišných monomerů E1 nebo E2, získaných z odlišných typů nebo subtypů viru hepatitidy C, včetně například těch, které byly popsány v Maertens et al. ve W094/25601 a ve W096/13590, tj. v přihláškách vynálezu, které jsou od shodných přihlašovatelů, jako je předkládaný vynález. Takové smíšené oligomery jsou pořád homo-oligomery spadající do rozsahu tohoto vynálezu a mohou umožnit univerzální diagnostiku, profylaxi nebo léčbu HCV.

Antigeny E1 a E2 , použité v předkládaném vynálezu, mohou být virové proteiny o úplné délce, jejich verze v podstatě o úplné délce, nebo jejich funkční fragmenty (například fragmenty obsahující alespoň jeden epitop a/nebo glykosylační místo). Kromě toho, antigeny HCV podle předkládaného vynálezu rovněž zahrnují další sekvence , které neblokují nebo nebrání tvorbě konformačního epitopu, který je předmětem zájmu. Přítomnost nebo nepřítomnost konformačního epitopu může být snadno stanovena pomocí screeningu předmětného antigenu s protilátkou (polyklonální sérová nebo monoklonální proti konformačnímu epitopu) a z porovnání reaktivity s reaktivitou denaturované verze antigenu, kterou si uchovávají pouze lineární epitopy (pokud vůbec nějakou mají). Ve screeningu, ve kterém jsou použity polyklonální protilátky, může být výhodné adsorbovat polyklonální sérum nejprve s denaturovaným antigenem a pozorovat, zda sérum obsahuje protilátky k antigenu, který je předmětem zájmu.

Proteiny podle předkládaného vynálezu mohou být glykosylovány. Glykosylovanými proteiny jsou míněny proteiny, které obsahují jednu nebo více uhlovodanových skupin, konkrétně zbytků cukrů. Všechny eukaryontní buňky jsou obecně schopny glykosylovat proteiny. Z porovnání sekvencí obalových proteinů odlišných genotypů HCV je možné odvodit, že nikoliv všech 6 glykosylačních míst v proteinu HCV E1 je nezbytných pro řádné skládání a reaktivitu proteinu. Dále je známo, že glykosylační místo v pozici 325 není N-glykosylací modifikováno (Fournillier-Jacob et al. 1996, Meunier et al. 1999). Kromě toho, subtyp proteinu 1b E1 obsahuje 6 glykosylačních míst, avšak některá z těchto glykosylačních míst nejsou v určitých jiných (sub)typech přítomna. Čtvrtý uhlovodanový motiv (na Asn250), který je přítomen u typů 1b, 6a, 7, 8, a 9 chybí ve všech dalších dnes známých typech. Tento adiční cukerný motiv může být mutován za poskytnutí proteinu typu 1b E1, který má zlepšenou reaktivitu. Sekvence typu 2b také vykazují další glykosylační místo v oblasti V5 (na Asn299). Izolát S83, který náleží ke genotypu 2c, dokonce postrádá první uhlovodanový motiv v oblasti V1 (na Asn), zatímco tento motiv je přítomen u všech dalších izolátů (Stuyver et al., 1994). Nicméně, i u kompletně konzervovaných adičních cukerných motivů nemusí být přítomnost uhlovodanů pro skládání požadována, ale může hrát roli v úniku před imunitním dozorem. Z tohoto důvodu může být identifikace role glykosylace dále testována mutagenezí motivů glykosylace. Mutageneze motivu glykosylace (NXS nebo NXT sekvencí) může být dosaženo buďto mutací v kodónech pro N, S, nebo T takovým způsobem, že tyto kodóny kódují aminokyseliny odlišné od N v případě N, a/nebo aminokyseliny odlišné od S nebo T, v případě S a v případě T. Nebo může být pozice X mutována na P, neboť je známo, že

NPS nebo NPT nejsou často modifikovány s uhlovodany. Po stanovení toho, které uhlovodanové adiční motivy jsou nezbytné pro skládání a/nebo reaktivitu proteinu, a které nikoliv, mohou být provedeny kombinace takových mutací. Takové pokusy byly popsány v Maertens et al. v Příkladu 8 ve W096/04385, který je zde zahrnut formou konkrétního odkazu.

Výraz glykosylace, použitý v předkládaném vynálezu, se týká N-glykosylace, pokud není specifikováno jinak.

Konkrétně se předkládaný vynález týká obalových proteinů HCV, nebo jejich částí, které jsou glykosylovány s jádrem glykosylace („core-glycosylated“). V tomto smyslu výraz „glykosylovaný s jádrem glykosylace“ se týká struktury „podobné“ struktuře, která je zobrazena na obrázku 3 s vyznačenými rámečky v práci Herscovics and Orlean (1993). Uváděná struktura cukru obsahuje 10 až 11 monosacharidů. Zejména je důležité poznamenat, že uvedená práce je zde zahrnuta formou odkazu. Výraz „podobný“ znamená, že ne více než 4 další monosacharidy mohou být přidány ke struktuře, nebo, že ne více než přibližně 3 monosacharidy byly ze struktury odstraněny. Proto uhlovodanová struktura glykosylačního jádra podle vynálezu obsahuje minimálně 7 a maximálně 15 monosacharidů a může obsahovat 8, 9, 10, 11, 12, 13 nebo 14 monosacharidů. Jako monosacharidy jsou míněny zejména glukóza, manóza nebo N-acetylglukosamin.

Podle dalšího aspektu se předkládaný vynález týká izolovaného obalového proteinu HCV nebo jeho fragmentu, který obsahuje alespoň jedno N-glykosylační místo, přičemž uvedený protein nebo fragment je charakterizován tím, že je

produktem exprese v eukaryontní buňce a dále je charakterizován tím, že více než 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 % nebo 95 % glykosylačních míst je glykosylováno s oligomanózou definovanou jako Man(8 až 10)-GlcNAc(2). Konkrétněji, k výše uvedeným glykosylačním charakteristikám je další charakteristikou poměr mezi počtem míst glykosylovaných s jádrem glykosylace s oligomanózou o struktuře Man(7)-GlcNAc(2) a počtem míst glykosylovaných s jádrem glykosylace s oligomanózou o struktuře Man(8)-GlcNAc(2), který je menší než nebo roven 0,15, 0,2, 0,25, 0,30, 0,35, 0,40, 0,44, 0,45, nebo 0,50. Další specifičtější charakteristikou k výše uvedeným N-glykosylačním charakteristikám je, že uvedené oligomanózy obsahují méně než 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, nebo 5 % terminální α 1,3 manózy.

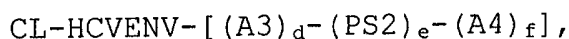
Další alternativní aspekt vynálezu se týká izolovaného obalového proteinu HCV nebo jeho fragmentu, který obsahuje alespoň jedno N-glykosylační místo, přičemž uvedený protein nebo fragment je produktem exprese v eukaryontní buňce a je dále charakterizován tím, že N-glykosylační místa jsou obsazena oligomanózami, kde poměr oligomanóz se strukturou Man(7)-GlcNAc(2) k oligomanózám se strukturou Man(8)-GlcNAc(2) je menší než nebo roven 0,15, 0,2, 0,25, 0,30, 0,35, 0,40, 0,44, 0,45, nebo 0,50. Další konkrétnější charakteristikou k výše uvedeným charakteristikám je, že uvedené oligomanózy obsahují méně než 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, nebo 5 % terminální α 1,3 manózy.

Podle dalšího alternativního aspektu se předkládaný vynález týká izolovaného obalového proteinu HCV nebo jeho fragmentu, který obsahuje alespoň jedno N-glykosylační místo, přičemž uvedený protein nebo fragment je charakterizován tím, že je produktem exprese v eukaryontní buňce a nikoliv savčí savčí buňky, a dále charakterizován tím, že počet N-glykosylačních míst je alespoň o 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, nebo 15 % menší, než je počet N-glykosylačních míst ve shodném proteinu nebo jeho fragmentu, který byl exprimován v eukaryontní buňce vystavené infekci viru vaccinia. Konkrétněji, vedle výše uvedených N-glykosylačních charakteristik je až 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, nebo 80 % uvedených N-glykosylačních míst glykosylováno s jádrem glykosylace. Konkrétněji, více než 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 % nebo 95 % N-glykosylačních míst je glykosylováno s oligomanózou o struktuře definované jako Man(8 až 10)GlcNAc(2). Ještě více konkrétně, k jakékoliv z výše uvedených N-glykosylačních charakteristik přistupuje další, tj. že poměr počtu míst glykosylovaných s jádrem glykosylace s oligomanózou o struktuře Man(7)-GlcNAc(2) k počtu míst glykosylovaných s jádrem glykosylace s oligomanózou o struktuře Man(8)-GlcNAc(2) je menší než nebo roven 0,15, 0,2, 0,25, 0,30, 0,35, 0,40, 0,45, nebo 0,50. Další, konkrétnější charakteristikou k jakékoliv z výše uvedených N-glykosylačních charakteristik, je že uvedené oligomanózy

obsahují méně než 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, nebo 5 % terminální α 1,3 manózy.

Podle dalšího aspektu vynálezu je izolovaný obalový protein HCV nebo jeho část podle vynálezu produktem exprese v buňce kvasinky. Konkrétněji, izolovaný obalový protein HCV nebo jeho část podle vynálezu je produktem exprese v buňce kmenů *Saccharomyces*, jako je *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces kluyveri*, nebo *Saccharomyces uvarum*, *Schizosaccharomyces*, jako je *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces*, jako je *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia*, jako je *Yarrowia lipolytica*, *Hansenula*, jako je *Hansenula polymorpha*, *Pichia*, jako je *Pichia pastoris*, *Aspergillus species*, *Neurospora*, jako je *Neurospora crassa*, nebo *Schwanniomyces*, jako je *Schwanniomyces occidentalis*, nebo mutantní buňka odvozená z kteréhokoliv výše uvedených kmenů. Konkrétněji, izolovaný obalový protein HCV nebo jeho část podle vynálezu je produktem exprese v buňce *Hansenula*. Ještě více specificky, izolovaný obalový protein HCV nebo jeho část podle vynálezu je produktem exprese v buňce kvasinky, například rodu *Hansenula*, v nepřítomnosti glykosylačních inhibitorů, jako je tunicamycin.

Podle dalšího aspektu vynálezu je izolovaný obalový protein HCV nebo jeho část podle vynálezu získán z proteinu, který obsahuje vedoucí peptid opičího lysozymu nebo jeho funkční variantu, připojený k řečenému obalovému proteinu HCV nebo jeho fragmentu. Konkrétněji, izolovaný obalový protein nebo jeho část podle vynálezu je získán z proteinu, který je charakterizovaný strukturou vzorce



kde:

CL vedoucí peptid opičího lysozymu nebo jeho funkční ekvivalent,

A1, A2, A3 a A4 jsou adaptorové peptidy , které mohou být odlišné nebo shodné,

PS1 a PS2 jsou místa úpravy, která mohou být odlišná nebo shodná,

HCVENV je obalový protein HCV nebo jeho část,

a, b, c, d, e a f je 0 nebo 1, a

kde jsou případně A1 a/nebo A2 částí PS1, a/nebo kde A3 a/nebo A4 jsou částí PS2.

„Opičím vedoucím peptidem nebo jeho částí, připojeným k obalovému proteinu HCV nebo jeho části“ je míněno, že C-koncová aminokyselina uvedeného vedoucího peptidu je kovalentně připojena prostřednictvím peptidové vazby k N-koncové aminokyselině uvedeného obalového proteinu HCV nebo k jeho části. V alternativním provedení je C-koncová aminokyselina uvedeného vedoucího peptidu oddělena od N-koncové aminokyseliny obalového proteinu HCV nebo jeho části peptidem nebo proteinem. Uvedený peptid nebo protein může mít strukturu $CL-HCVENV-[(A3)_d-(PS2)_e-(A4)_f]$ tak, jak je definována výše.

Odvození obalového proteinu HCV, který je předmětem zájmu, z proteinu obsahujícího vedoucí peptid opičího lysozymu nebo jeho funkční ekvivalent připojený k obalovému proteinu HCV nebo k jeho části, nebo z proteinu charakterizovaném strukturou $CL-HCVENV-[(A3)_d-(PS2)_e-(A4)_f]$ může být provedeno *in vivo* proteolytickým štěpením v buňkách, ve kterých je tento pre-protein exprimován. Konkrétněji, stupeň odstranění opičího vedoucího peptidu je

výhodně prováděn *in vivo* proteolytickým aparátem buněk, ve kterých je pre-protein exprimován. Nicméně, odvození může být také provedeno pouze *in vitro* po a/nebo během izolace a/nebo purifikace pre-proteinu, a/nebo proteinu z buněk exprimujících pre-protein, a/nebo z kultivační kapaliny, ve které byly pěstovány buňky exprimující pre-protein. Alternativně je uvedené odvození *in vivo* prováděno kombinací s uvedeným získáním *in vitro*. Odvození proteinu HCV, který je předmětem zájmu, z rekombinantně exprimovaného pre-proteinu může dále zahrnovat použití proteolytického enzymu (proteolytických enzymů) v čistícím stupni, kde všechny nebo většina kontaminujících proteinů, jež jsou společně přítomny s proteinem, který je předmětem zájmu, je degradována, a kde protein zájmu je rezistentní k čištění s proteolytickým enzymem (proteolytickými enzymy). Odvození a čištění nejsou vzájemně se vylučující procesy a může jich být dosaženo s použitím jediného proteolytického enzymu. Jako příklad se zde uvádí protein HCV E1s genotypu HCV 1b (SEQ ID NO: 2), který postrádá zbytky Lys. Při štěpení proteinového extraktu, který obsahuje uvedené E1 proteiny HCV, s endoproteázou Lys-C (endo-Lys), nejsou proteiny E1 degradovány, zatímco kontaminující proteiny obsahující jeden nebo více zbytků Lys jsou degradovány. Takový proces může významně zjednodušit izolaci/nebo nebo zvýšit účinnost purifikace proteinů HCV E1. Kromě toho lze dosáhnout další výhodné možnosti správného *in vitro* oddělení vedoucího peptidu z HCV E1 pre-proteinu tím, že je zaveden další zbytek lysinu, například mezi vedoucí peptid a protein HCV E1. Jiné proteiny HCV E1 mohou obsahovat zbytek Lys v jedné, nebo ve více z pozic 4, 40, 42, 44, 61, 65 nebo 179 (kde pozicí 1 je první N-koncová přirozená aminokyselina proteinu E1, tj. pozice 192 v polyproteinu HCV). Aby bylo

umožněno použití endo-lys C tak, jak je popsáno výše, mohou uvedené zbytky Lys být mutovány na jiné aminokyselinové zbytky, výhodně na zbytek Arg.

„Správně odstraněným“ vedoucím peptidem je míněno, že uvedený vedoucí peptid je z proteinu, obsahujícího signální sekvenci připojenou k proteinu zájmu, odstraněn s vysokou účinností, tj. velké množství pre-(pro-)proteinů je přeměněno na (pro-)proteiny, a s vysokou fidelitou, tj. že pouze pre-aminokyselinová sekvence je odstraněna a není odstraněna žádná z aminokyselin proteinu, který je předmětem zájmu a je připojen k uvedené pre-aminokyselinové sekvenci. „Odstraněním vedoucího peptidu s vysokou účinností“ je míněno, že alespoň přibližně 40 %, výhodněji přibližně 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % nebo dokonce 99 % pre-proteinů je přeměněno na protein, ze kterého je pre-sekvence odstraňována. Alternativně, jestliže část exprimovaných pre-proteinů není přeměněna na protein, ze kterého je pre-sekvence odstraňována, tyto pre-proteiny mohou i tak být purifikovány nebo mohou být odstraněny během purifikace.

Výrazem „funkční ekvivalent vedoucího peptidu opičího lysozymu (CL)“ je míněn vedoucí peptid CL, ve kterém jedna nebo více aminokyselin byla substituována za jinou aminokyselinu, přičemž uvedená substituce je konzervativní aminokyselinovou substitucí. Výrazem „konzervativní aminokyselinová substituce“ je míněna substituce aminokyselin příslušejících ke skupině konzervovaných aminokyselin za jinou aminokyselinu, která přísluší do stejné skupiny konzervovaných aminokyselin. Skupinami konzervovaných aminokyselin jsou míněny: skupina sestávající z Met, Ile, Leu a Val; skupina sestávající z

Arg, Lys a His; skupina sestávající z Phe, Trp a Tyr; skupina sestávající z Asp a Glu; skupina sestávající z Asn a Gln; skupina sestávající z Cys, Ser a Thr; a skupina sestávající z Ala a Gly. Příkladnou konzervativní aminokyselinovou substitucí ve vedoucím peptidu CL je přirozená variace v pozici 6, kde aminokyselinou v této pozici je buďto Val nebo Ile; další variace se objevuje v pozici 17, kde aminokyselinou v této pozici, mimo jiné, je Leu nebo Pro (viz SEQ ID NO:1). Rezultující vedoucí peptidy CL jsou tak považovány za funkční ekvivalenty. Jiné funkční ekvivalenty vedoucích peptidů CL zahrnují ty vedoucí peptidy, které vykazují shodné technické vlastnosti, jako mají vedoucí peptidy CL, tak, jak se popisují v předkládaném vynálezu, včetně delečních a inzerčních variant.

Označením „A“ nebo „adaptorový peptid“ je míněn peptid (například o 1 až 30 aminokyselinách), nebo protein, který může sloužit jako linker (spojovník) mezi například vedoucím peptidem a místem úpravy (processing site, PS), vedoucím peptidem a proteinem, který je předmětem zájmu, a PS a proteinem, který je předmětem zájmu, a/nebo proteinem, který je předmětem zájmu, a PS; a/nebo může sloužit jako linker na N- nebo C-konci, například vedoucího peptidu, PS nebo proteinu zájmu. Adaptorový peptid „A“ může mít určitou trojrozměrnou strukturu, například α -šroubovicovou nebo β -listovou strukturu, nebo jejich kombinaci. Alternativně není trojrozměrná struktura zcela definována, například se jedná strukturu svinuté smyčky „**coiled-coil**“. Adaptor A může být součástí například pre-sekvence, pro-sekvence, proteinu, který je předmětem zájmu, nebo místa úpravy. Adaptor může sloužit jako identifikátorová značka (tag), která zvyšuje nebo umožňuje detekci a/nebo purifikaci

a/nebo úpravu proteinu, jehož je A součástí. Jedním z příkladů peptidu A je peptid „his-tag“ (HHHHHH; SEQ ID NO: 63) Hn, kde n je obvykle rovno 6, ale může též být 7, 8, 9, 10, 11, nebo 12. Jiné z příkladů peptidů A zahrnují peptidy EEGEPK (Kjeldsen et al. ve W098/28429; SEQ ID NO: 64) nebo EEAEPK (Kjeldsen et al. ve W097/22706; SEQ ID NO: 65), o kterých je známo, že jestliže jsou přítomny na N-konci proteinu zájmu, zvyšují fermentační výtěžek, ale rovněž chrání N-konec proteinu zájmu proti úpravám s dipeptidyl aminopeptidázou, a tak vzniká homogenní N-konec polypeptidu. Současně může být zrání proteinu zájmu *in vitro*, například odstranění uvedených peptidů EEGEPK (SEQ ID NO: 64) a EEAEPK (SEQ ID NO: 65) z proteinu zájmu, dosaženo s použitím například endo-lys C, která štěpí C-konec zbytku Lys v uvedených peptidech. Uvedené peptidy tak mohou sloužit jako adaptorový peptid (A), stejně jako místo úpravy (PS) (viz níže). Adaptorové peptidy jsou popsány v sekvencích SEQ ID NO: 63 až 65, 70 až 72 a 74 až 82. Jiným příkladem adaptorového peptidu je imunologicky tichý (immunosilent) linker G4S. Jiné příklady adaptorových peptidů nebo adaptorových proteinů jsou uvedeny v Tabulce 2 práce Stevense (Stevens et al. 2000).

Označením „PS“ nebo „místo úpravy“ (processing site) je míněno místo specifické úpravy proteinu nebo upravitelné místo. Taková úprava může nastat enzymaticky nebo chemicky. Příklady míst úpravy náchylných ke specifické enzymatické úpravě zahrnují IEGR↓X (SEQ ID NO: 66), IDGR↓X (SEQ ID NO: 67), AEGR↓X (SEQ ID NO: 68), přičemž ve všech je proteázou hovězího faktoru Xa rozpoznáváno a štěpeno místo mezi zbytkem Arg a Xaa (jakákoliv aminokyselina) označená výše jako „↓“ (Nagai, K. and Thogersen, H. C. 1984). Jiným příkladem místa PS je dibazické místo, například Arg-Arg,

Lys-Lys, Arg-Lys nebo Lys-Arg, které je štěpitelné s kvasinkovou Kex2 proteázou (Julius, D. et al. 1984). Místem PS může rovněž být monobazické místo Lys. Uvedené monobazické místo Lys (Lys-PS-site) může být také obsaženo na C-konci peptidu A. Příklady adaptorových peptidů A, které obsahují na C-konci monobazické Lys-PS-místo, jsou uvedeny v sekvencích SEQ ID NO: 64 až 65 a 74 až 76. Exoproteolytické odstranění His-tag (HHHHHH; SEQ ID NO: 63) je možné s použitím dipeptidyl aminopeptidázy I (DAPase) samotné, nebo v kombinaci s glutamin cyklotransferázou (glutamine cyclotransferase, Qcyclase) a pyroglutamovou aminopeptidázou (pyroglutamic aminopeptidase, pGAPase) (Pedersen, J. et al. 1999). Uvedené exopeptidázy obsahující rekombinantní značku His-tag (která umožňuje odstranění peptidázy z reakční směsi pomocí afinitní chromatografie na imobilizovaných iontech kovů (immobilized metal ion affinity chromatography, IMAC) jsou komerčně dostupné, například jako TAGZyme System, Unizyme Laboratories (Hørsholm, DK). „Úpravou“ je tak obecně myšlena metoda nebo způsob, při kterém je protein specificky štěpen, nebo je protein štěpitelný v alespoň jednom místě úpravy, přičemž uvedené místo úpravy je přítomno v řečeném proteinu. PS může být náchylné k endoproteolytickému štěpení nebo může být náchylné k exoproteolytickému štěpení, v každém případě je štěpení specifické, například nezasahuje místa, která jsou odlišná od míst rozpoznávaných proteolytickými enzymy účastněnými v úpravě proteinu (processing proteolytic enzyme). Řada míst PS je uvedena v sekvencích SEQ ID NO: 66 až 68 a 83 až 84.

Všestrannost struktury $[(A1/3)_{a/d} - (PS1/2)_{b/e} - (A2/4)_{c/f}]$ tak, jak byla popsána výše, byla prokázána pomocí některých příkladů. V prvním příkladu je uvedená struktura

přítomna na C-terminálním konci proteinu zájmu, který je obsažen v pre-proteinu, a kde A3 je peptid „VIEGR“ (SEQ ID NO : 69), který se vzájemně přesahuje s PS místem faktoru Xa „IEGRX“ (SEQ ID NO: 66), a kde X=A4 je značka histidin-tag (SEQ ID NO: 63) (d, e a f jsou tak v daném případě všechny 1). Protein HCV, který je předmětem zájmu, může být (případně) purifikován s IMAC. Po úpravě s faktorem Xa, ponese protein zájmu HCV (případně purifikovaný) na svém C-konci místo úpravy PS, kterým je „IEGR“ (SEQ ID NO: 70). Jinou variantou místa úpravy upravovaného faktorem Xa může být IDGR (SEQ ID NO: 71) nebo AEGR (SEQ ID NO: 72). V dalším příkladu je struktura $[(A1/3)_{a/d} - (PS1/2)_{b/e} - (A2/4)_{c/f}]$ přítomna na N-konci proteinu zájmu HCV. Dále, A1 je histidin-tag (SEQ ID NO: 63), PS je rozpoznávací místo faktoru Xa (jakákoliv ze sekvencí SEQ ID NO: 66 až 68), přičemž X je protein zájmu, a $a=b=1$ a $c=0$. Po správném odstranění vedoucího peptidu, například hostitelskou buňkou, může být rezultující protein zájmu HCV purifikován s IMAC (případně). Po úpravě s faktorem Xa, postrádá protein zájmu strukturu $[(A1)_a - (PS1)_b - (A2)_c]$.

Dále je zřejmé, že kterýkoliv z A1, A2, A3, A4, PS1 a PS2, jestliže jsou přítomny, pak mohou být přítomny v opakované struktuře. Jestliže jsou přítomny takové opakující se struktury, jsou v tomto kontextu stále počítány jako 1, například a, b, c, d, e, nebo f jsou rovny 1, i když například A1 se vyskytuje například jako 2 opakování (A1-A1).

Další aspekt tohoto vynálezu se týká jakéhokoliv izolovaného obalového proteinu HCV nebo jeho fragmentu podle vynálezu, ve kterém thiolové skupiny cysteinu jsou chemicky modifikovány.

Další aspekt tohoto vynálezu se týká jakéhokoliv izolovaného obalového proteinu HCV nebo jeho fragmentu podle vynálezu, který je antigenní.

Další aspekt tohoto vynálezu se týká jakéhokoliv izolovaného obalového proteinu HCV nebo jeho fragmentu podle vynálezu, který je imunogenní.

Další aspekt tohoto vynálezu se týká jakéhokoliv izolovaného obalového proteinu HCV nebo jeho fragmentu podle vynálezu, který zahrnuje epitop stimulující T-buňky.

Další aspekt tohoto vynálezu se týká jakéhokoliv izolovaného obalového proteinu HCV nebo jeho fragmentu podle vynálezu, který je obsažen ve struktuře vybrané ze skupiny sestávající z monomerů, homodimerů, heterodimerů, homo-oligomerů a hetero-oligomerů.

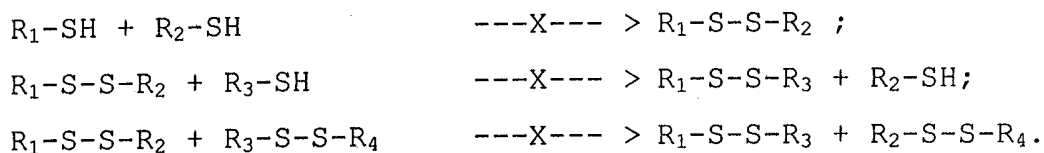
Další aspekt tohoto vynálezu se týká jakéhokoliv izolovaného obalového proteinu HCV nebo jeho fragmentu podle vynálezu, který je obsažen v částici podobné viru.

V obalových proteinech HCV nebo v jejich částech, tak jak jsou zde pospány, jež obsahují alespoň jeden zbytek cysteinu, výhodně však 2 a více zbytků cysteinu, mohou být thiolové skupiny cysteinu ireversibilně chráněny s chemickými nebo enzymatickými prostředky. Konkrétně, „ireversibilní ochrana“ nebo „ireversibilní blokování“ s chemickými prostředky se týkají alkylace, výhodně alkylace obalových proteinů HCV s použitím alkylačních činidel, jako jsou například aktivní halogeny, ethylenimin nebo

N-(jodethyl)trifluor-acetamid. Z tohoto hlediska je třeba alkylation thiolových skupin cysteinu chápat jako záměnu vodíku v thiolové skupině skupinou $(CH_2)_nR$, ve které n je 0, 1, 2, 3 nebo 4 a $R = H, COOH, NH_2, CONH_2$, fenyl, nebo jakýkoliv jejich derivát. Alkylation může být prováděna jakoukoliv metodou známou v oboru, jako například aktivními halogeny $X(CH_2)_nR$, ve kterých X je halogen jako I, Br, Cl nebo F. Příklady aktivních halogenů jsou methyljodid, jodoctová kyselina, jodacetamid a 2-bromethylamin. Jiné způsoby alkylation zahrnují použití NEM (N-ethylmaleimid) nebo Biotin-NEM, jejich směsi, nebo ethyleniminu nebo N-(jodethyl)trifluoroacetamidu, které oba vedou k substituci $-H$ za $-CH_2-CH_2-NH_2$ (Hermanson, G. T. 1996). Výraz „alkylační činidla“ tak, jak je zde použit, se týká sloučenin, které jsou schopné provádět zde popsanou alkylation. Takové alkylation vedou k modifikovanému cysteinu, který může napodobovat jiné aminokyseliny. Alkylation s ethyleniminem vede ke struktuře napodobující lysin takovým způsobem, že jsou zaváděna nová štěpící místa pro trypsin (Hermanson, G. T. 1996). Podobně, použití methyljodidu vede k aminokyselině napodobující methionin, zatímco použití jodacetátu a iodacetamidu vede k aminokyselinám napodobujícím kyselinu glutamovou a glutamin, v uvedeném pořadí. Analogicky jsou tyto aminokyseliny výhodně použity v přímé mutaci cysteinu. Z tohoto důvodu se předkládaný vynález týká obalových proteinů HCV tak, jak jsou zde popsány, ve kterých alespoň jeden zbytek cysteinu v obalových proteinech HCV tak, jak jsou zde popsány, je mutován na přirozenou aminokyselinu, výhodně na methionin, kyselinu glutamovou, glutamin nebo lysin. Termín „mutovaný“ se týká místně-řízené mutagenese nukleových kyselin kódujících tyto aminokyseliny, tj. velmi dobře známých metod v oboru, jako je například místně-

řízená mutagenese (site-directed mutagenesis) s použitím PCR nebo *via* mutagenese zprostředkované oligonukleotidy (oligonucleotide-mediated mutagenesis), jak jsou popsány v (Sambrook, J. et al. 1989). Je třeba uvést, že v příkladové části tohoto vynálezu se alkylace týká použití jodacetamidu jako alkylačního činidla, pokud není specifikováno jinak.

Dále je třeba uvést, že v purifikačním postupu mohou být thiolové skupiny cysteinu, obsažené v proteinech HCV nebo jejich částech podle předkládaného vynálezu, reversibilně chráněny. Účelem reversibilní ochrany je stabilizovat protein HCV nebo jeho část. Zejména, po reversibilní protekci je funkční skupina obsahující síru (například thioly a disulfidy) udržována v nereaktivních podmínkách. Funkční skupina obsahující síru je tak neschopna reagovat s jinými sloučeninami, které tak například ztratily svoji tendenci k tvorbě nebo záměně disulfidových vazeb, jako například



Popsané reakce mezi thioly a/nebo disulfidovými zbytky nejsou omezeny na intermolekulární procesy, ale mohou se objevovat též intramolekulárně.

Termín „reversibilní ochrana“ nebo „reversibilní blokování“ tak, jak je zde použit, předpokládá kovalentní vazbu modifikujících činidel na thiolové skupiny cysteinu, stejně jako úpravu prostředí obklopujícího protein HCV tak, že redoxní stav thiolových skupin cysteinu zůstává během následujících kroků purifikačního postupu nedotčen (stínění). Reversibilní ochrana thiolových skupin cysteinu může být provedena chemicky nebo enzymaticky.

Výraz „reversibilní ochrana s enzymatickými prostředky“ tak, jak je zde použit se týká reversibilní ochrany zprostředkované enzymy, jakými jsou acyltransferázy, např. acyltransferázy, které jsou zúčastněny v katalýze thioesterifikace, jako je palmitoyl acyltransferáza (viz níže).

Termín „reversibilní ochrana s chemickými prostředky“ tak, jak je zde použit se týká reversibilní ochrany:

1. s modifikačními činidly, které reversibilně modifikují cysteinyly, například sulfonací a thioesterifikací;

Sulfonace je reakce, ve které thioly nebo cysteiny zúčastněné v disulfidových můstcích jsou modifikovány na S-sulfonát: $\text{RSH} \rightarrow \text{RS-SO}_3^-$ (Darbre, A. 1986) nebo na $\text{RS-SR} \rightarrow 2 \text{RS-SO}_3^-$ (sulfitolýza; (Kumar, N. et al. 1986)). Reagenciemi pro sulfonaci jsou například Na_2SO_3 , nebo tetrathionát sodný. Druhý z činidel pro sulfonaci je používáno v koncentraci 10 až 200 mM, a výhodněji v koncentraci 50 až 200 mM. Případně může být sulfonace prováděna v přítomnosti katalyzátoru, jakým je například Cu^{2+} (100 μM až 1 mM) nebo cystein (1 až 10 mM).

Reakce může být prováděna za podmínek, které denaturují protein, stejně jako za přirozených podmínek (Kumar, N. et al. 1985, Kumar, N. et al. 1986).

Tvorba thioesterových vazeb, nebo thioesterifikace je charakterizována jako:

$\text{RSH} + \text{R}'\text{COX} \rightarrow \text{COR}'$, kde ve sloučenině je X je výhodně halogen.

2. s modifikačními činidly, které reversibilně modifikují cysteinyly podle předloženého vynálezu, jakými jsou například těžké kovy, konkrétně Zn^{2+} , Cd^{2+} , mono-, dithio- a disulfidové sloučeniny (např. aryl- a alkylmethanthiosulfonát, dithiopyridin, dithiomorfolin, dihydrolipoamid, Ellmann reagens, aldrothiolTM (Aldrich) (Rein, A. et al. 1996), dithiokarbamáty, nebo thiolační činidla (např. glutathion, N-acetyl cystein, cysteinamin). Dithiokarbamat zahrnuje širokou třídu molekul, které mají funkční skupinu $\text{R}_1\text{R}_2\text{NC}(\text{S})\text{SR}_3$, která jim poskytuje schopnost reagovat se sulfhydrylovými skupinami. Sloučeniny obsahující thiolovou skupinu jsou s výhodou používány v koncentracích 0,1 až 50 mM, výhodněji v koncentracích 1 až 50 mM, a nejvýhodněji v koncentracích 10 až 50 mM;

3. s přítomností modifikačních činidel, která zachovávají stav thiolu (stabilizují ho), konkrétně antioxidační látky, jako jsou například DTT, dihydroaskorbát, vitaminy a deriváty, manitol, aminokyseliny, peptidy a deriváty (např. histidin, ergothionein, carnosin, methionin), galláty, hydroxyanisol, hydroxytoluen, hydrochinon, hydroxymethylfenol a jejich deriváty v rozmezí koncentrací 10 μM až 10 mM; výhodněji v koncentraci 1 M až 10 mM;

4. za podmínek stabilizujících thiolové skupiny, jako jsou například (i) kofaktory, jako kovové ionty (Zn^{2+} , Mg^{2+}), ATP, (ii) řízení pH (např. pro proteiny ve většině případů pH ~5 nebo je pH výhodně thiol pK_a -2;

např. pro peptidy purifikované chromatografií na reverzní fázi při pH 2).

Kombinace reversibilní ochrany tak, jak je popsána v bodech (1), (2), (3) a (4) může vést k obdobně čistým a znovu poskládaným (refolded) proteinům HCV. V podstatě mohou být použity kombinované sloučeniny, jako například Z103 (Zn carnosin), výhodně v koncentraci 1 až 10 mM. Je třeba uvést, že reversibilní ochrana se mimo modifikace skupin a stínění, popsaných výše, také týká jakékoliv metody ochrany cysteinylu, která může být vrácena zpět enzymaticky nebo chemicky bez narušení páteře peptidu. V tomto smyslu se předkládaný vynález specificky týká peptidů, připravených klasickou chemickou syntézou (viz výše), ve které například thioesterové vazby jsou štěpeny thioesterázou, za bazických pufovacích podmínek Beekman, N. J. et al. 1997), nebo působením hydroxylaminu (Vingerhoeds, M. H. et al. 1996).

Proteiny HCV obsahující thiolové skupiny mohou být purifikovány například na pryskyřicích afinitní chromatografie, které jako imobilizovaný ligand obsahují (1) štěpitelné spojovací raménko obsahující disulfidovou vazbu (např. imobilizovaný 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoová kyselina) (Jayabaskaran, C. et al. 1987) a kovalentní chromatografie na aktivované thiol-Sepharose 4B (Pharmacia)), nebo (2) aminohexanoyl-4-aminofenylarsin. Druhá z afinitních matrix byla použita pro purifikaci proteinů, které jsou předmětem redoxní regulace a dithiolových proteinů, které jsou cíli pro oxidační stres (Kalef, E. et al. 1993).

Ke zvýšení rozpustnosti a extrakce peptidů může rovněž být použita reversibilní ochrana (Pomroy, N. C. and Deber, C. M. 1998).

Sloučeniny pro reversibilní ochranu a stabilizaci thiolových skupin mohou být v monomerní, polymerní formě, nebo ve formě liposomů.

Odstranění stavu reversibilní ochrany cysteinových zbytků může být dosaženo chemicky nebo enzymaticky s pomocí

- reduktans, konkrétně s DTT, DTE, 2-merkapt ethanolu, dithionitem, SnCl_2 , borohydridem sodným, hydroxylaminem, TCEP, a to konkrétně v koncentraci 1 - 200 mM, výhodněji v koncentraci 50 - 200 mM;

- odstranění podmínek stabilizujících thiolové skupiny nebo reagens stabilizujících thiolové skupiny, jako je např. zvýšení pH;

- enzymů, konkrétně thioesteráz, glutaredoxinu, thioredoxinu, konkrétně v koncentraci 0,01 - 5 μM , ještě konkrétněji v rozmezí koncentrací 0,1 - 5 μM ;

- kombinace výše popsaných chemických a/nebo enzymatických podmínek.

Odstranění stavu reversibilní ochrany cysteinových zbytků může být prováděno *in vitro* nebo *in vivo*, například v buňce nebo v živém jedinci.

Je třeba zdůraznit, že v postupu purifikace mohou nebo nemusí být cysteinové zbytky ireversibilně blokovány, nebo nahrazeny jakýmkoliv reversibilně modifikačním agens tak, jak je popsáno výše.

Reduktans podle předkládaného vynálezu je jakékoliv činidlo, které umožní redukci síry ve zbytcích cysteinu, např. „S-S“ disulfidových můstků, desulfonaci cysteinových zbytků ($\text{RS-SO}_3^- \rightarrow \text{RSH}$). Antioxidantem je jakékoliv činidlo, které chrání thiolový stavu, nebo minimalizuje tvorbu „S-S“ a/nebo jejich změn. Redukce „S-S“ disulfidových můstků je chemickou reakcí, při které jsou disulfidy redukovány na thiolové skupiny (-SH). Činidla, která štěpí disulfidové můstky a způsoby tohoto štěpení jsou popsány v Maertens et al. ve WO 96/04385, a jsou v předkládaném popise zahrnuty formou odkazu. Redukce „S-S“ může být dosaženo s (1) enzymatickou kaskádovou dráhou, nebo s (2) redukčními sloučeninami. Je známo, že enzymy, jako jsou thioredoxin a glutaredoxin, jsou zúčastněny v redukci disulfidů *in vivo*, a rovněž bylo prokázáno, že jsou účinné v redukci můstků „S-S“ *in vitro*. Disulfidové můstky jsou rychle štěpeny s redukovaným thioredoxinem při pH 7,0, s rychlostí druhého řádu, která je přibližně 10^4 krát vyšší, než je odpovídající rychlostní konstanta s DTT. Kinetika redukce může být dramaticky zvýšena preinkubací proteinového roztoku s 1 mM DTT nebo dihydrolipoamidu (Holmgren, A. 1979). Thiolovými sloučeninami, které jsou schopny redukovat disulfidové můstky, jsou například dithiothreitol (DTT), dithioerythritol (DTE), β -merkapt ethanol, thiokarbamáty, bis(2-merkapt ethyl)sulfon a N,N'-bis(merkapt acetyl)-hydrazin, a dithionit sodný. Rovněž mohou být pro redukci proteinů HCV použita redukční činidla bez thiolových skupin, jako je askorbát nebo chlorid ciničitý (SnCl_2), o kterých bylo prokázáno, že jsou velice vhodné pro redukci disulfidových můstků v monoklonálních protilátkách (Thakur, M. L. et al. 1991). Kromě toho mohou změny v hodnotách pH ovlivňovat redoxní stav proteinů HCV. Bylo prokázáno, že působení borohydridu sodného je účinné pro redukci

disulfidových můstků v peptidech (Gailit, J. 1993). Tris (2-karboxyethyl) fosfin (TCEP) je schopen redukovat disulfidy při nízkém pH (Burns, J. et al. 1991). Selenol katalyzuje redukci disulfidu na thioly, jestliže je DTT nebo borohydrid sodný použit jako reduktans. Selenocysteamin, komerčně dostupný diselenid, byl použit jako prekursor katalyzátoru (Singh, R. and Kats, L. 1995).

Výraz „imunogenní“ se týká schopnosti proteinu nebo látky vyvolat imunitní odpověď. Imunitní odpověď je celková odpověď těla na zavedení antigenu, která zahrnuje tvorbu protilátek, buněčnou imunitu, přecitlivělost (hypersensitivitu), nebo imunologickou toleranci. Buněčná imunita se týká odpovědi T-pomocných buněk a/nebo CTL-odpovědi.

Výraz „antigenní“ se týká schopnosti proteinu nebo látky způsobit tvorbu protilátky nebo vyvolat buněčnou odpověď.

Výraz "epitop stimulující T-buňky" podle předkládaného vynálezu se týká epitopu schopného stimulovat T-buňky nebo CTL-buňky, v uvedeném pořadí. Epitop stimulující T-pomocné buňky může být vybrán na základě monitorování lymfoproliferativní odpovědi k polypeptidům obsahujícím ve své aminokyselinové sekvenci (domnělý) epitop stimulující T-buňky. Uvedená lymfoproliferativní odpověď může být měřena zkouškou „T-helper assay“, která zahrnuje stimulaci *in vitro* mononukleárních buněk periferní krve (peripheral blood mononuclear cells, PMBCs) ze sér pacientů s různými koncentracemi peptidů, jež jsou testovány na aktivitu stimulace T-buněk, a stanovením množství příjmu radioaktivně značeného thymidinu. CTL-stimulující epitop

může být vybrán pomocí zkoušky CTL (cytotoxic T-cell assay), ve které se měří lytická aktivita cytotoxických buněk s použitím uvolňování ^{51}Cr . Proliferace je hodnocena jako pozitivní, jestliže index stimulace (průměr cpm kultur stimulovaných antigenem/průměr cpm kontrolních kultur) (cpm - impuls per minuta) je větší než 1, výhodně vyšší než 2, nejvýhodněji pak větší než 3.

Další aspekt vynálezu se pak týká kompozice obsahující izolovaný obalový protein HCV nebo jeho fragment podle vynálezu. Uvedená kompozice může dále obsahovat farmaceuticky přijatelný nosič a může být léčivem nebo vakcínou.

Další aspekt vynálezu zahrnuje léčivo nebo vakcínu obsahující obalový protein HCV nebo jeho část podle vynálezu.

Ještě další aspekt vynálezu zahrnuje farmaceutickou kompozici pro indukci imunitní odpovědi specifické k HCV u savce, která obsahuje účinné množství obalového proteinu HCV nebo jeho části podle vynálezu a případně farmaceuticky přijatelné adjuvans. Farmaceutická kompozice zahrnující účinné množství obalového proteinu HCV nebo jeho části podle vynálezu může být také schopna indukovat HCV-specifické protilátky u savce, nebo je schopna indukovat funkci T-buněk u savce. Farmaceutická kompozice zahrnující účinné množství obalového proteinu HCV nebo jeho části podle vynálezu může být profylaktickou kompozicí nebo terapeutickou kompozicí. V konkrétním provedení je uvedeným savcem člověk.

Výraz „savec“ je třeba chápat jako příslušníka třídy vyšší obratlovci. Savci, včetně člověka, jsou charakterizováni rozením živých mláďat, osrstěním těla, mléčnými žlázami u samic, které sekretují mléko pro výživu mláďat. Savci tak také zahrnují primáty jiné, než je člověk, a myši (Zauberman et al. 1999).

„Vakcínou“ nebo „léčivem“ je kompozice schopná vyvolat ochranu proti onemocnění, ať už částečnou nebo úplnou, jakož i proti akutnímu nebo chronickému onemocnění; v tomto případě je vakcína nebo léčivo profylaktickou vakcínou nebo profylaktickým léčivem. Vakcína nebo léčivo mohou být také vhodné pro léčbu již nemocných jedinců, v tomto případě jsou nazývány léčebnou vakcínou nebo léčivem. Podobně může být farmaceutická kompozice použita buďto pro profylaktické a/nebo terapeutické účely, v tomto případě se jedná o profylaktickou a/nebo terapeutickou kompozici, v uvedeném pořadí.

Obalové proteiny HCV podle předkládaného vynálezu mohou být použity jako takové, v biotinylované formě (jak je vysvětleno ve WO 93/18054) a/nebo komplexované s *Neutralite Avidin* (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA), avidinem nebo streptavidinem. Rovněž je třeba uvést, že „vakcína“ nebo „léčivo“ mohou kromě účinné látky obsahovat „farmaceuticky přijatelný nosič“ nebo „farmaceuticky přijatelné adjuvans“, kterým může být vhodný excipient, ředidlo, nosič a/nebo adjuvans, které samy o sobě neindukují tvorbu protilátek škodlivých pro jedince, jemuž byla kompozice podávána, ani nevyvolávají ochranu. Typickými vhodnými nosiči typicky obrovské pomalu metabolizované makromolekuly, jako například proteiny, polysacharidy, poly-mléčné kyseliny, poly-glykolové

kyseliny, poly-aminokyseliny, aminokyselinové kopolymery a inaktivní virové částice. Odborníkům v oboru jsou takové nosiče velmi dobře známy. Výhodná adjuvans pro zvýšení účinnosti kompozice zahrnují, bez omezení: hydroxid hlinitý, aluminium v kombinaci s 3-O-deacylovaným monofosforyl lipidem A tak, jak se popisuje ve WO 93/19780, aluminium fosfát tak, jak byl popsán ve WO 93/24148, N-acetylmuramyl-L-threonyl-D-isoglutamin tak, jak byl popsán v U.S. patentu č. 4 606 918, N-acetyl-normuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin, N-acetylmuramyl-L-alanyl-isoglutamyl-L-alanine-2-(1'2'dipalmitoyl-sn-glycero-3-hydroxyfosforyloxy)ethylamin, RIBI (ImmunoChem Research Inc., Hamilton, MT, USA), který obsahuje monofosforyl lipid A, detoxifikovaný endotoxin, trehalosa-6,6-dimykolát, a skelet buněčných stěn (MPL + TDM + CWS) v emulsi 2% skvalen/Tween 80. Jakákoliv ze tří složek MPL, TDM nebo CWS může také být použita samostatně nebo v kombinaci s druhou složkou. MPL může také být zaměněna svým syntetickým analogem, který je označován jako RC-529. Kromě toho mohou být použity adjuvans, jako například Stimulon (Cambridge Bioscience, Worcester, MA, USA), SAF-1 (Syntex) nebo adjuvans na bázi bakteriální DNA, jako je ISS (Dynavax) nebo CpG (Coley Pharmaceuticals), stejně jako adjuvans, kterými jsou například kombinace mezi QS21 a 3-O-deacetylovaným monofosforyl lipidem A (W094/00153), nebo MF-59 (Chiron), adjuvans na bázi poly[di(karboxylátfenoxy)fosfazenu] (Virus Research Institute), nebo adjuvans na bázi blokových polymerů, jako je Optivax (Vaxcel, Cythx), nebo adjuvans na bázi inulinu, jako je Algamulin a GammaInulin (Anutech), neúplné Freundovo adjuvans (Incomplete Freund's Adjuvant, IFA) nebo přípravky Gerbu (Gerbu Biotechnik). Je třeba uvést, že neúplné Freundovo adjuvans (CFA) může stejně dobře být

použito pro aplikace mimo člověka a pro výzkumné účely. „Kompozice vakcíny“ může dále obsahovat excipienty a ředidla, které jsou ve své podstatě netoxické a neterapeutické, jakými jsou například voda, fyziologický roztok, glycerol, ethanol, zvlhčující emulsifikační látky, látky pufrující pH, konzervační látky, a podobně. Typicky jsou vakcíny připravovány v injektovatelné formě buďto jako kapalné roztoky, nebo jako suspenze. Injekce mohou být subkutánní, intramuskulární, intravenózní, intraperitoneální, intrathekální, intradermální. Jiné způsoby podání zahrnují implantaci, čípky, orální polknutí, enterickou aplikaci, inhalaci, aerosoly nebo nosní sprej, nebo kapky. Rovněž mohou být připraveny pevné formy vhodné pro přípravu roztoků nebo suspenzí v kapalných nosičích před vlastní injekční aplikací. Přípravek může být také emulsifikován nebo uzavřen do liposomů pro zvýšení adjuvantního účinku. Polypeptidy mohou také být včleněny do „Immune Stimulating Complexes“ společně se saponiny, například s Quil A (ISCOMS). Kompozice vakcín obsahují účinné množství aktivní látky, stejně jako jakoukoliv z výše uvedených složek. „Účinné množství“ aktivní látky znamená, že podání tohoto množství jedinci buďto v jednotlivé dávce, nebo jako součásti řady podání, je účinné pro zabránění nebo léčbu onemocnění, nebo pro vyvolání požadovaného účinku. Toto množství je proměnlivé v závislosti na zdraví a fyzické kondici jedince, který má být ošetřen, v závislosti na taxonomické skupině jedinců, kteří mají být ošetřeni (např. člověk, primáti mimo člověka, primáti atd.), v závislosti na kapacitě imunitního systému jedince k dosažení imunitní odpovědi, na stupni požadované ochrany, na složení vakcíny, posouzení ošetřujícího lékaře, kmenu infekčního patogenu a jiných relevantních faktorech. Předpokládá se, že toto účinné

množství bude spadat do relativně širokého rozmezí, které může být stanoveno na základě rutinních pokusů. Zpravidla, se účinné množství mění od 0,01 do 1000 µg/dávka, konkrétněji od 0,1 do 100 µg/dávka. Dávkovací režim může být režimem jednotlivých dávek, nebo režimem opakovaných dávek. Vakcína může být podávána ve spojení s dalšími imunoregulačními agens.

Další aspekt předkládaného vynálezu se týká způsobu přípravy izolovaného obalového proteinu HCV nebo jeho části podle vynálezu.

Způsob přípravy izolovaného obalového proteinu HCV nebo jeho části podle vynálezu zahrnuje například transformaci hostitelské buňky s rekombinantní nukleovou kyselinou nebo s vektorem, který obsahuje otevřený čtecí rámec kódující uvedený obalový protein HCV nebo jeho část, přičemž hostitelská buňka je schopna exprimovat uvedený obalový protein HCV nebo jeho část. Způsob dále zahrnuje kultivaci hostitelských buněk ve vhodném médiu tak, aby bylo dosaženo exprese uvedeného proteinu, izolaci exprimovaného proteinu z kultury hostitelských buněk, nebo izolaci z vlastních hostitelských buněk. Postup izolace může zahrnovat jeden nebo více z kroků (i) lyze hostitelských buněk v přítomnosti chaotropního agens, (ii) chemické modifikace thiolových skupin cysteinu v izolovaných proteinech, přičemž uvedené chemické modifikace mohou být reversibilní nebo ireversibilní a (iii) heparinové afinitní chromatografie.

Příkladnými „chaotropními činidly“ jsou guanidinium chlorid a močovina. Obecně je chaotropním agens chemická látka, která může rušit strukturu vazeb vodíku ve vodě.

V koncentrovaných roztocích mohou tato činidla denaturovat proteiny, neboť snižují hydrofobní účinek.

Výrazem „rekombinantní nukleová kyselina“ je míněna nukleová kyselina přirozeného nebo syntetického původu, která byla podrobena alespoň jedné úpravě technikou rekombinace DNA, jako je štěpení restriktivním enzymem, PCR, ligace, defosforylace, fosforylace, mutageneze, úpravy kodónů pro expresi v heterologní buňce atd. Obecně je rekombinantní nukleovou kyselinou přirozeně se vyskytující fragment nukleové kyseliny, nebo rekombinantní nukleová kyselina obsahuje alespoň dva fragmenty nukleové kyseliny vzájemně propojené, nebo se jedná úplně syntetickou nukleovou kyselinu.

Jestliže jsou použity výrazy „polynukleotid“, „polynukleová kyselina“, „sekvence nukleové kyseliny“, „nukleotidová sekvence“, „molekula nukleové kyseliny“, „oligonukleotid“, „sonda“ nebo „primer“, týkají se nukleotidů, buďto ribonukleotidů, deoxyribonukleotidů, nebo peptidových nukleotidů nebo uzamčených (locked) nukleotidů, nebo jejich kombinací, v polymerní formě o jakékoliv délce nebo tvaru (např. rozvětvená DNA). Uvedené termíny dále zahrnují dvouřetězcové (double-stranded, ds) a jednořetězcové (single stranded, ss) polynukleotidy, stejně jako trojřetězcové polynukleotidy. Rovněž zahrnují známé modifikace nukleotidů, jako je methylace, cyklizace, a vytváření čepiček („caps“) a substituce jednoho nebo více přirozeně se vyskytujícího nukleotidu za analog, jakým je například inosin, nebo modifikace s neamplifikovatelnými monomery, jako je například HEG (hexaethylen glykol). Ribonukleotidy jsou označovány jako NTPs,

deoxyribonukleotidy jako dNTPs a dideoxyribonukleotidy jako ddNTPs.

Nukleotidy mohou být obecně značeny radioaktivně, chemiluminiscenčně, fluorescenčně, fosforescenčně nebo s infračervenými barvivý, nebo s povrchem-zesílenou Ramanovou značkou nebo plasmonovou rezonanční částicí (plasmon resonant particle, PRP).

Uvedené termíny „polynukleotid“, „polynukleová kyselina“ „sekvence nukleové kyseliny“, „nukleotidová sekvence“, „molekula nukleové kyseliny“, „oligonukleotid“, „sonda“ nebo „primer“ rovněž zahrnují peptidové nukleové kyseliny (peptide nucleic acids, PNAs), DNA analogy, ve kterých je páteří pseudopeptid, sestávající spíše z N-(2-aminoethyl)-glycinových jednotek než z cukru. PNAs napodobují chování DNA a vážou komplementární řetězce nukleových kyselin. Neutrální páteř PNA vede k silnější vazbě a k větší specifičnosti, než jaké je běžně dosahováno. Kromě toho byly jedinečné chemické, fyzikální a biologické vlastnosti PNA využity pro přípravu mocných biomolekulárních prostředků, antisense a antigenních agens, molekulárních sond a biosensorů. PNA sondy mohou obecně být kratší než sondy DNA a obecně mají délku od 6 do 20 bazí, výhodněji pak od 12 do 18 bazí (Nielsen, P. E. 2001). Uvedené termíny dále zahrnují uzamčené nukleové kyseliny (locked nucleic acids, LNAs), kterými jsou deriváty RNA, v nichž je ribózový kruh fixován methylenovou vazbou mezi 2'-kyslíkem a 4'-uhlíkem. LNAs vykazují mimořádnou vazebnou afinitu k cílovým sekvencím DNA nebo RNA. Nukleotidy LNA mohou být oligomerizovány a mohou být včleněny do chimérických nebo smíšeně-chimérických molekul LNA/DNA nebo LNA/RNA. Jeví se, že LNAs nejsou toxické pro kultivované

buňky (Orum, H. and Wengel, J. 2001, Wahlestedt, C. et al. 2000). Obecně jsou míněny chiméry nebo smíšené-chiméry jakýchkoliv DNA, RNA, PNA a LNA, stejně jako jakékoliv z nich, ve kterých je thymin zaměněn uracilem.

Z výše uvedeného je zřejmé, že předkládaný vynález se rovněž týká použití obalových proteinů HCV glykosylovaných s jádrem glykosylace, nebo kompozic podle vynálezu pro přípravu kompozice vakcíny proti HCV. Konkrétně, předkládaný vynález se týká použití obalového proteinu HCV glykosylovaného s jádrem glykosylace podle vynálezu k indukci imunity proti HCV u chronických přenašečů HCV. Konkrétněji, předkládaný vynález se týká použití obalových proteinů HCV glykosylovaných s jádrem glykosylace tak, jak zde byly definovány, pro indukci imunity proti HCV u chronických přenašečů HCV, a to před, simultánně nebo po jakékoliv jiné terapii, jakou je například velmi dobře známá léčba s interferonem v kombinaci nebo bez kombinace s podáváním malých sloučenin k léčbě HCV, jakou je například ribavirin. Takovéto kompozice mohou být použity před a nebo po transplantaci jater, nebo po předpokládané infekci, jako je například infekce jehlou injekční stříkačky.

Další aspekt vynálezu se týká způsobu detekce přítomnosti anti-HCV protilátek ve vzorku, o kterém se předpokládá, že tyto anti-HCV protilátky obsahuje, přičemž uvedený způsob zahrnuje:

- (i) kontaktování obalového proteinu HCV nebo jeho části podle vynálezu s uvedeným vzorkem za podmínek, které umožňují komplexaci obalového proteinu HCV nebo jeho části s anti-HCV protilátkami,

- (ii) (ii) detekci komplexu vytvořeného v bodě (i),
a
- (iii) (iii) dedukci na základě výsledku podle (ii)
přítomnosti uvedených anti-HCV protilátek ve
vzorku.

V konkrétním provedení se kontaktování v kroku (i) uvedeného postupu provádí za kompetitivních podmínek. V jiném specifickém provedení uvedeného způsobu je obalový protein HCV nebo jeho část připojena k pevnému nosiči. V dalším provedení je uvedeným vzorkem, o kterém se předpokládá, že obsahuje anti-HCV protilátky, biologický vzorek.

Další aspekt vynálezu se týká diagnostické soupravy (kitu) pro detekci přítomnosti anti-HCV protilátek ve vzorku, o kterém se předpokládá, že obsahuje anti-HCV protilátky, přičemž uvedený kit obsahuje obalový protein HCV nebo jeho část podle vynálezu. V konkrétním provedení je obalový protein HCV nebo jeho část připojen k pevnému nosiči. V jiném provedení je vzorek, o kterém se předpokládá, že obsahuje anti-HCV protilátky, biologickým vzorkem.

Výraz „biologický vzorek“, tak jak je zde používán, se týká vzorku tkáně nebo tekutiny izolované z jedince, který je vybrán, bez omezení, například ze séra, plasmy, lymfatické tekutiny, externích částí kůže, respiračních, střevních nebo genitálně-urinálních traktů, oocytů, slz, slin, mléka, krevních buněk, nádorů, orgánů, sekretů žaludku, slizu, míšního moku, externích výměšků, jakými jsou například exkrementy, moč, sperma, a podobně.

Obalové protein HCV podle předkládaného vynálezu , nebo jejich části, jsou obzvláště vhodné pro použití v metodách, kterými jsou imuno zkoušky pro detekci HCV, a/nebo genotypizace HCV pro prognózu/monitorování onemocnění způsobené HCV, nebo jako terapeutické látky.

V postupech, jakými jsou imuno zkoušky podle předkládaného vynálezu, jsou používány obalové proteiny HCV podle vynálezu, které mají lineární (v případě peptidů) a konformační epitopy, jež jsou rozpoznávány protilátkami v sérech jedinců, infikovaných s HCV. Antigeny HCV E1 a E2 podle předkládaného vynálezu mohou být fakticky použity v jakékoliv zkoušce, která používá známý antigen pro detekci protilátek. Samozřejmě, forma, ve kterém je HCV konformační epitop denaturován, není použitelná, nebo je třeba ji přizpůsobit. Obecným znakem všech těchto zkoušek je, že antigen je kontaktován se složkou těla, o které se předpokládá, že obsahuje HCV protilátky, za podmínek, jež umožňují vazbu antigenu k jakékoliv takové protilátce, přítomné ve složce. Takovými podmínkami jsou typicky fyziologická teplota, pH a iontová síla s použitím nadbytku antigenu. Inkubace antigenu se vzorkem je následována detekcí imunitních komplexů, jež obsahují antigen.

Způsob provedení imuno zkoušek je předmětem mnoha způsobů obměn, a řada provedení je v oboru známá. Postupy mohou například používat pevné nosiče, nebo imunoprecipitaci. Většina postupů používá značené protilátky nebo značený polypeptid; jako značky mohou být například použity enzymatické, fluorescenční, chemiluminiscenční a radioaktivní molekuly, nebo molekuly barviv. Rovněž jsou známy zkoušky, ve kterých je zesilován signál imunitního komplexu; příklady takových zkoušek jsou

testy, ve kterých je použit avidin nebo streptavidin, a imuno zkoušky s enzymatickým značením a zprostředkování, jakými jsou zkoušky ELISA a RIA.

Imunozkouška může být, bez omezení, prováděna v heterogenním nebo homogenním a ve standardním nebo kompetitivním uspořádání. V heterogenním provedení je polypeptid běžně navázán na pevnou matrix nebo nosič tak, aby po inkubaci byla usnadněna separace vzorku od polypeptidu. Příklady pevných nosičů, které mohou být použity, jsou nitrocelulóza (např. nanesená na membránu nebo na jamky mikrotitračních destiček), polyvinylchlorid (např. v podobě folií nebo na jamkách mikrotitračních destiček), polystyrenový latex (např. v perličkách nebo na mikrotitračních destičkách), polyvinylidinfluorid (známý jako ImmunolonTM), diazotizovaný papír, nylonové membrány, aktivované kuličky a kuličky s navázaným Proteinem A. Tak například, v heterogenním provedení mohou být použity mikrotitrační destičky Dynatech ImmunolonTM 1 nebo ImmunolonTM 2. Pevný nosič, obsahující antigenní polypeptidy, je běžně po oddělení od testovaného vzorku promyt před detekcí navázaných protilátek. Jak standardní, tak kompetitivní provedení zkoušky je v oboru dobře známo.

V homogenním provedení je testovaný vzorek inkubován s kombinací antigenů v roztoku. Tak například, je možné provedení za podmínek, při kterých dochází k precipitaci jakýchkoliv vytvářených komplexů antigen-protilátka. Jak standardní, tak kompetitivní provedení těchto zkoušek jsou v oboru známa.

Ve standardním provedení je v komplexech protilátka-antigen přímo monitorováno množství protilátek, kterými

jsou například anti-HCV protilátky. Toto může být provedeno stanovením, zda se značené anti-xenogenní (například protilidské) protilátky, které rozpoznávají epitop k uvedeným protilátkám, tj. předmětné anti-HCV protilátky, budou vázat díky tvorbě komplexu. V kompetitivním provedení je ve vzorku množství protilátek, jakými jsou anti-HCV protilátky, stanoveno monitorováním kompetičního účinku na vazbu známého množství (značené) protilátky (nebo jiného soutěžícího ligandu), nebo antigenu v komplexu.

Komplexy antigen-protilátka mohou být detekovány jakoukoliv z řady metod známých v oboru, v závislosti na způsobu provedení. Tak například, neznačené protilátky, jako jsou například anti-HCV protilátky v komplexu, mohou být detekovány s použitím konjugátu anti-xenogenní Ig komplexovaném se značkou (například enzymatickou značkou).

V provedení zkoušky jako imunoprecipitační nebo aglutinační vytváří reakce mezi antigenem a protilátkou proteinový shluk (cluster), který precipituje v roztoku nebo v suspenzi a tvoří viditelnou vrstvu nebo film precipitátu. Jestliže v testovaném vzorku žádná protilátka není přítomna, žádný takový precipitát se nevytváří.

Obalové proteiny HCV nebo jejich specifické části podle vynálezu obsahující konformační epitopy jsou běžně baleny do soupravy pro použití v těchto imunozkouškách. Souprava normálně obsahuje v oddělených nádobkách přirozený antigen HCV, preparáty kontrolních protilátek (pozitivních a/nebo negativních), značenou protilátku, jestliže provedení zkoušky vyžaduje shodné a signál vytvářející reagensie (například enzymový substrát), pokud značka negeneruje signál přímo. Přirozený antigen HCV může již být

navázán k pevnému nosiči, nebo je od látek vytvářejících vazbu k nosiči oddělen. Zpravidla jsou instrukce pro provedení zkoušky (např. v písemné formě, nebo jako záznam na pásce, CD-ROMu atd.) v soupravě přiloženy.

Vybraná pevná fáze může zahrnovat polymerní nebo skleněné kuličky, nitrocelulózu, mikročástice, mikrojamky reakční destičky, testovací zkumavky a magnetické kuličky. Sloučenina vytvářející signál může být vybrána ze skupiny zahrnující enzym, luminiscenční sloučeninu, chromogen, radioaktivní prvek a chemiluminiscenční sloučeninu. Příklady enzymů zahrnují alkalickou fosfatázu, křenovou peroxidázu, a beta galaktosidázu. Příklady zesilujících sloučenin zahrnují biotin, anti-biotin a avidin. Příklady látek vázajících zesilující sloučeniny zahrnují biotin, anti-biotin a avidin. Pro blokování účinků látek podobných revmatoidnímu faktoru, je testovaný vzorek podroben podmínkám, které jsou dostatečné pro blokování účinku látek podobných revmatoidnímu faktoru. Tyto podmínky zahrnují kontaktování testovaného vzorku s množstvím anti-lidského IgG za vytváření směsi, a inkubaci směsi po dobu a za podmínek, které jsou dostatečné pro vytvoření produktu reakční směsi, jenž je v podstatě prostý od látek podobných revmatoidnímu faktoru.

Konkrétně, předkládaný vynález se týká obalového proteinu HCV nebo jeho části podle vynálezu pro přípravu diagnostické soupravy (kitu).

Vzhledem k tomu, že obalové proteiny HCV glykosylované s jádrem glykosylace podle předkládaného vynálezu jsou vysoce imunogenní a stimulují jak humorální, tak buněčnou odpověď, týká se předkládaný vynález rovněž soupravy pro

detekci T-buněčné odpovědi na HCV, přičemž souprava obsahuje oligomerní částice nebo purifikovaný jednotlivý obalový protein HCV podle předmětného vynálezu. T-buněčná odpověď na HCV může například být měřena tak, jak je popsáno v Leroux-Roels et al. ve W095/12677.

Podle dalšího aspektu se vynález týká způsobu indukce HCV-specifické imunitní odpovědi u savce, kde uvedená metoda zahrnuje podání účinného množství obalového Protein HCV nebo jeho části podle vynálezu savci, případně s obsahem farmaceuticky přijatelného adjuvans. Uvedená metoda zahrnující podání účinného množství obalového Protein HCV nebo jeho části podle vynálezu savci může být rovněž použita pro indukci HCV-specifických protilátek u savce, nebo pro indukci specifických T-buněčných funkcí u savce. V uvedených způsobech může být podání určeno pro profylaktické účely, například jako profylaktické podání, nebo pro terapeutické účely, například jako terapeutické podání.

Další aspekt vynálezu se týká způsobu imunizace savce, který zahrnuje podání účinného množství obalového proteinu HCV nebo jeho části podle vynálezu savci, případně s obsahem farmaceuticky přijatelného adjuvans.

Předmětný vynález se také týká způsobu léčby savce infikovaného s HCV, kde uvedený způsob zahrnuje podání účinného množství obalového proteinu HCV nebo jeho části podle vynálezu savci, případně s obsahem farmaceuticky přijatelného adjuvans.

Jakýkoliv z výše popsaných aspektů vynálezu, nebo z jeho provedení specifických pro uvedené aspekty, je

rovněž aplikovatelný obecně na předmětné proteiny, které jsou produkty exprese v eukaryontních buňkách, a které jsou dále charakterizovány shodnými glykosylačními vlastnostmi, jaké byly výše popsány pro dva odlišné obalové proteiny HCV.

Konkrétněji, vynález se tak týká izolovaného proteinu, který je předmětem zájmu, nebo jeho fragmentu, jenž obsahuje alespoň jedno N-glykosylační místo, přičemž uvedený protein nebo jeho fragment je charakterizován tím, že je produktem exprese v eukaryontní buňce, a dále je charakterizován tím, že v průměru až 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, nebo 80 % N-glykosylovaných míst je glykosylováno s glykosylačním jádrem. Ještě konkrétněji, více než 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 % nebo 95 % N-glykosylovaných míst je glykosylováno s oligomanózou o struktuře definované jako Man(8 až 10)-GlcNAc(2). Konkrétněji, vedle jakékoliv z výše uvedených N-glykosylačních charakteristik, platí, že poměr počtu míst glykosylovaných s glykosylačním jádrem s oligomanózou o struktuře Man(7)-GlcNAc(2) k počtu míst glykosylovaných s jádrem glykosylace s oligomanózou o struktuře Man(8)-GlcNAc(2) je menší než nebo roven 0,15, 0,2, 0,25, 0,30, 0,35, 0,40, 0,45, nebo 0,50. Kromě toho další specifitější charakteristikou, vedle jakékoliv z výše uvedených charakteristik, je, že uvedené oligomanózy obsahují méně než 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11

%, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, nebo 5 % terminální α 1,3 manózy.

Další alternativní aspekt vynálezu se týká izolovaného proteinu zájmu nebo jeho fragmentu, který obsahuje alespoň jedno N-glykosylační místo, přičemž uvedený protein nebo jeho fragment je charakterizován tím, že je produktem exprese v eukaryontní buňce a dále tím, že N-glykosylační místa jsou obsazena oligomanózami, přičemž poměr oligomanóz o struktuře Man(7)-GlcNAc(2) k oligomanózám o struktuře Man(8)-GlcNAc(2) je menší nebo roven 0,15, 0,2, 0,25, 0,30, 0,35, 0,40, 0,44, 0,45, nebo 0,50. Další, specifitější charakteristikou vedle výše uvedených N-glykosylačních charakteristik je, že uvedené oligomanózy obsahují méně než 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, nebo 5 % terminální α 1,3 manózy.

Konkrétně, uvedený izolovaný protein zájmu nebo jeho fragment je produktem exprese v buňce kvasinky, jakou je například buňka *Hansenula*. Takovým izolovaným proteinem zájmu nebo jeho fragmentem může být například virový obalový protein nebo jeho fragment, jakým je obalový protein HCV nebo obalový protein HBV (hepatitis B), nebo jeho fragmenty. Další příkladné obalové proteiny virů zahrnují obalový protein HIV (human immunodeficiency virus) gp120 a virové obalové proteiny virů, které přísluší k rodu Flaviridae. Obecně, uvedeným izolovaným proteinem zájmu nebo jeho fragmenty může být jakýkoliv protein, který má N-glykosylační charakteristiky podle předkládaného vynálezu.

Výrazem „HCV-rekombinantní vaccinia virus“ je míněn virus vaccinia obsahující sekvenci nukleové kyseliny kódující protein HCV nebo jeho část.

Termíny „částice podobná viru HCV tvořená z obalového proteinu HCV“ a „oligomerní částice tvořené obalovými proteiny HCV“ jsou zde definovány jako struktury specifické podstaty a tvaru, obsahující několik základních jednotek obalových proteinů HCV E1 a/nebo E2, o kterých se předpokládá, že nezávisle sestávají z jednoho nebo dvou E1 a/nebo E2 monomerů, v uvedeném pořadí. Je třeba uvést, že částice podle předkládaného vynálezu jsou definovány tak, že neobsahují infekční HCV RNA genomy. Částicí podle předkládaného vynálezu mohou být částice vyššího řádu sférické povahy, které mohou být prázdné, sestávající z proteinů vnějšího obalu, ve kterém mohou být uzavřeny lipidy, detergenty, jaderný protein HCV, nebo molekuly adjuvans. Tyto částice mohou být opouzdřeny s liposomy nebo apolipoproteiny, jakými jsou například apolipoprotein B nebo lipoproteiny o nízké hustotě, nebo s jakýmkoliv prostředky, které zacilují uvedené částice ke specifickému orgánu nebo tkáni. V tomto případě jsou takovéto prázdné sférické částice často nazývány jako „částice podobné viru“ (virus-like particles, VLPs). V jiném provedení mohou částicemi vyššího řádu být pevné sférické struktury, ve kterých úplný obal sestává z oligomerů obalových proteinů HCV E1 nebo E2 oligomerů, do kterých mohou být dodatečně vneseny lipidy, detergenty, jaderný protein HCV, nebo molekuly adjuvans, nebo které naopak samy o sobě mohou být zapouzdřeny v liposomech nebo apolipoproteinech, jakými jsou například apolipoprotein B, lipoproteiny o nízké hustotě, nebo v jakýchkoliv prostředcích, které zacilují uvedené částice ke specifickému orgánu nebo tkáni, např.

asialoglykoproteiny. Částice mohou rovněž sestávat z menších struktur (v porovnání s prázdnými nebo pevnými sférickými strukturami popsanými výše), které jsou zaobleného tvaru (viz dále) a zpravidla neobsahují více než jednu vrstvu obalových proteinů HCV. Typickým příkladem menší částice jsou struktury podobné rosetám, které jsou tvořeny menším počtem obalových proteinů HCV, obvykle mezi 4 a 16. Specifický příklad takové částice zahrnuje menší částice získané z proteinů E1 (E1s) v 0,2% CHAPS tak, jak je zde doloženo příkladem, které zjevně obsahují 8 až 10 monomerů E1s. Takové rosetám podobné struktury jsou obvykle organizovány v rovině a mají zaoblený tvar, například ve formě kola. Opětovně mohou být lipidy, detergenty, jaderný protein HCV, nebo molekuly adjuvans dodatečně inkorporovány do takovýchto částic, nebo mohou být menší částice opouzdřeny v liposomech nebo s apolipoproteiny, jakými jsou například apolipoprotein B nebo lipoproteiny o nízké hustotě, nebo v jakýchkoliv prostředcích, které zacilují uvedené částice ke specifickému orgánu nebo tkáni. Menší částice mohou také vytvářet malé sférické nebo globulární struktury sestávající z podobně menšího počtu obalových proteinů HCV E1 nebo E2, ve kterých mohou být dodatečně uzavřeny lipidy, detergenty, jaderný protein HCV, nebo molekuly adjuvans, nebo které naopak mohou být opouzdřeny v liposomech nebo s apolipoproteiny, jakými jsou například apolipoprotein B nebo lipoproteiny o nízké hustotě, nebo v jakýchkoliv prostředcích, které zacilují uvedené částice ke specifickému orgánu nebo tkáni. Velikost (tj. průměr) výše definovaných částic, měřená v oboru dobře známou technikou dynamického rozptylu světla (dynamic light scattering), (viz dále v části Příklady provedení) je zpravidla mezi 1 až 100 nm, výhodněji mezi 2 až 70 nm,

nejvýhodněji mezi 2 a 40 nm, mezi 3 až 20 nm, mezi 5 až 16 nm, mezi 7 až 14 nm nebo mezi 8 až 12 nm.

Předkládaný vynález se konkrétně dále týká způsobu purifikace obalových proteinů viru hepatitidy C (HCV) glykosylovaných s jádrem glykosylace, nebo jakékoliv jejich části, které jsou vhodné pro použití v imunozkoušce nebo ve vakcíně, přičemž tento způsob zahrnuje:

- (i) pěstování glykosylačně negativních kmenů *Hansenula* nebo *Saccharomyces* transformovaných s genem kódujícím obalový protein HCV E1 a/nebo HCV E2, nebo jakoukoliv jeho část, ve vhodném kultivačním médiu;
- (ii) vyvolání exprese uvedeného genu pro HCV E1 a/nebo HCV E2, nebo jeho část; a
- (iii) purifikaci uvedeného proteinu HCV E1 a/nebo HCV E2 glykosylovaného s jádrem glykosylace, nebo jakékoliv jeho části z uvedené buněčné kultury.

Vynález se dále týká způsobu purifikace obalových proteinů viru hepatitidy C (HCV) glykosylovaných s jádrem glykosylace, nebo jakékoliv jejich části, které jsou vhodné pro použití v imunozkoušce nebo ve vakcíně, přičemž tento způsob zahrnuje:

- (i) pěstování glykosylačně negativních kmenů *Hansenula* nebo *Saccharomyces* transformovaných s genem kódujícím obalový protein HCV E1 a/nebo HCV E2, nebo jakoukoliv jeho část, ve vhodném kultivačním médiu;
- (ii) vyvolání exprese uvedeného genu pro HCV E1 a/nebo HCV E2, nebo jejich část; a

- (iii) purifikaci uvedeného intracelulárně exprimovaného proteinu HCV E1 a/nebo HCV E2 glykosylovaného s jádrem glykosylace, nebo jakékoliv jeho části, po lyzi transformované hostitelské buňky.

Vynález se dále týká způsobu purifikace obalových proteinů viru hepatitidy C (HCV) glykosylovaných s jádrem glykosylace, nebo jakékoliv jejich části, které jsou vhodné pro použití v imunozkoušce nebo ve vakcíně, přičemž tento způsob zahrnuje:

- (i) pěstování glykosylačně negativních kmenů *Hansenula* nebo *Saccharomyces* transformovaných s genem kódujícím obalový protein HCV E1 a/nebo HCV E2, nebo jakoukoliv jeho část, ve vhodném kultivačním médiu, kde uvedený protein HCV E1 a/nebo HCV E2, nebo jakákoliv jeho část, obsahuje alespoň dvě aminokyseliny Cys;
- (ii) vyvolání exprese uvedeného genu pro HCV E1 a/nebo HCV E2, nebo jejich část; a
- (iii) purifikaci uvedeného proteinu HCV E1 a/nebo HCV E2 glykosylovaného s jádrem glykosylace, nebo jakékoliv jeho části, z kultury, přičemž uvedené aminokyseliny Cys jsou reversibilně chráněny chemickými a/nebo enzymatickými prostředky.

Vynález se dále týká způsobu purifikace obalových proteinů viru hepatitidy C (HCV) glykosylovaných s jádrem glykosylace, nebo jakékoliv jejich části, které jsou vhodné pro použití v imunozkoušce nebo ve vakcíně, přičemž tento způsob zahrnuje:

- (i) pěstování glykosylačně negativních kmenů *Hansenula* nebo *Saccharomyces* transformovaných s genem kódujícím obalový protein HCV E1 a/nebo HCV E2, nebo jakoukoliv jeho část, ve vhodném kultivačním médiu, kde uvedený protein HCV E1 a/nebo HCV E2, nebo jakákoliv jeho část, obsahuje alespoň dvě aminokyseliny Cys;
- (ii) vyvolání exprese uvedeného genu pro HCV E1 a/nebo HCV E2, nebo jejich část; a
- (iii) purifikaci uvedeného intracelulárně exprimovaného proteinu HCV E1 a/nebo HCV E2 glykosylovaného s jádrem glykosylace, nebo jakékoliv jeho části, po lyzi transformované hostitelské buňky, přičemž uvedené aminokyseliny Cys jsou reversibilně chráněny chemickými a/nebo enzymatickými prostředky.

Předkládaný vynález se specificky týká způsobu purifikace rekombinantních proteinů HCV z kvasinek, nebo jakýchkoliv jejich částí, tak, jak jsou zde popsány, ve kterém uvedená purifikace zahrnuje použití afinitní chromatografii s heparinem.

Stejně tak se předkládaný vynález specificky týká způsobu purifikace rekombinantních proteinů HCV z kvasinek, nebo jakýchkoliv jejich částí, tak, jak jsou zde popsány, ve kterém chemickým prostředkem je sulfonace.

Stejně tak se předkládaný vynález specificky týká způsobu purifikace rekombinantních proteinů HCV z kvasinek, nebo jakýchkoliv jejich částí, tak, jak jsou zde popsány, ve kterém reversibilní ochrana aminokyselin Cys je zaměněna

za ireversibilní ochranu chemickými a/nebo enzymatickými prostředky.

Stejně tak se předkládaný vynález specifický týká způsobu purifikace rekombinantních proteinů HCV z kvasinek, nebo jakýchkoliv jejich částí, tak, jak jsou zde popsány, ve kterém ireversibilní ochrana chemickými prostředky je provedena s jodacetamidem.

Stejně tak se předkládaný vynález specifický týká způsobu purifikace rekombinantních proteinů HCV z kvasinek, nebo jakýchkoliv jejich částí, tak, jak jsou zde popsány, ve kterém ireversibilní ochrana chemickými prostředky je provedena s NEM nebo Biotin-NEM, nebo s jejich směsí.

Předkládaný vynález se rovněž týká kompozice tak, jak byla definována výše, která rovněž obsahuje jaderný protein HCV, E1, E2, P7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A a/nebo NS5B protein, nebo jeho částí. Proteiny E1, E2, a/nebo E1/E2 glykosylované s jádrem glykosylace podle předkládaného vynálezu mohou být například kombinovány s jinými antigeny HCV, jakými jsou například jaderný protein, P7, NS3, NS4A, NS4B, NS5A a/nebo NS5B protein. Purifikace těchto proteinů NS3 výhodně zahrnuje reversibilní modifikace zbytků cysteinu, a ještě výhodněji sulfonaci cysteinu. Způsoby, jak dosáhnout takovýchto reversibilních modifikací, byly pro proteiny NS3 popsány v Maertens et al. (PCT/EP99/02547). Je třeba zdůraznit, že celý obsah včetně všech definic, uvedených v tomto dokumentu, je v předkládané přihlášce vynálezu zahrnut formou odkazu.

Předkládaný vynález se rovněž týká použití obalového proteinu glykosylovaného s jádrem glykosylace tak, jak byl

zde popsán, pro indukci imunity proti HCV, která se vyznačuje tím, že obalový protein glykosylovaný s jádrem glykosylace je použit jako součást podání sloučenin v časovém sledu. V tomto smyslu je třeba výraz „podání sloučenin v časovém sledu“ chápat jako podání sloučenin jedinci v časových intervalech, které vyvolává imunitní odpověď. Tyto sloučeniny mohou zahrnovat kteroukoliv z následujících komponent: obalový protein glykosylovaný s jádrem glykosylace, kompozici vakcíny obsahující DNA HCV, polypeptidy HCV. V tomto smyslu časový sled zhrnuje podání buďto:

- (i) antigenu HCV, jakým je například obalový protein glykosylovaný s jádrem glykosylace v časových intervalech, nebo
- (ii) antigenu HCV, jakým je například obalový protein glykosylovaný s jádrem glykosylace, v kombinaci s kompozicí vakcíny obsahující HCV DNA, kde oligomerní částice uvedeného proteinu glykosylovaného s jádrem glykosylace a uvedená kompozice vakcíny s DNA HCV mohou být podávány simultánně, nebo v různých časových intervalech, včetně měnících se časových intervalů, nebo
- (iii) podle bodu (i) nebo (ii), případně v kombinaci s dalšími peptidy HCV v časových intervalech.

V tomto smyslu je třeba uvést, že kompozice vakcíny obsahující DNA HCV obsahuje nukleové kyseliny kódující obalový peptid HCV, zahrnující E1-, E2-, E1/E2-peptidy, NS3 peptid, jiné peptidy HCV, nebo části uvedených peptidů. Kromě toho je třeba chápat, že uvedené peptidy HCV zahrnují obalové peptidy HCV, včetně E1-, E2-, E1/E2-peptidů, NS3

peptidu, jiné peptidy HCV, nebo části uvedených peptidů. Výraz „jiné peptidy HCV“ se týká jakéhokoliv peptidu HCV nebo jeho fragmentu. V bodě (ii) výše uvedeného postupu obsahuje kompozice vakcíny s DNA HCV výhodně nukleové kyseliny kódující obalové peptidy HCV. Podle bodu (ii) výše uvedeného postupu sestává kompozice vakcíny s DNA HCV ještě výhodněji z nukleových kyselin kódujících obalové peptidy HCV, případně v kombinaci s kompozicí vakcíny obsahující HCV-NS3 DNA. V tomto smyslu je třeba uvést, že kompozice vakcíny s DNA HCV obsahuje plasmidový vektor zahrnující polynukleotidovou sekvenci kódující peptid HCV tak, jak byl popsán výše, operabilně spojenou s regulačními prvky transkripce. Zde používaný výraz „plasmidový vektor“ se týká molekuly nukleové kyseliny schopné přenášet jinou nukleovou kyselinu, ke které je tato připojena. Výhodnými vektory jsou ty, které jsou schopny autonomní replikace a/nebo exprese nukleových kyselin, k nimž jsou připojeny. Bez jakéhokoliv omezení lze obecně uvést, že plasmidovými vektory jsou cirkulární dvouřetězcové smyčky DNA, které ve formě vektoru nejsou připojeny k chromosomu. Tak, jak je zde použit, znamená výraz „polynukleotidová sekvence“ polynukleotidy, jakými jsou například deoxyribonukleová kyselina (DNA), a tam, kde je to vhodné, též ribonukleovou kyselinu (RNA). Tento výraz by měl být rovněž chápán tak, že zahrnuje analogy buďto RNA, nebo DNA, jako ekvivalenty, které byly připraveny z analogů nukleotidů, a jednořetězcové (sense nebo antisense) a dvouřetězcové polynukleotidy. Tak, jak je zde výraz „regulační prvky transkripce“ použit, týká se nukleotidové sekvence, která obsahuje základní regulační prvky, a to takové, které po zavedení do živé buňky obratlovců jsou schopny řídit buněčný aparát k produkci translačních produktů kódovaných polynukleotidem. Výraz „operabilně připojený“ se týká

juxtapozice ve které jsou složky konfigurovány tak, že umožňují svoji běžnou funkci. Proto jsou regulačními prvky transkripce operabilně připojené nukleotidové sekvence, schopné provádět expresi uvedené nukleotidové sekvence. Pro odborníka v oboru je pro úspěšnému provedení zcela zřejmé použití různých transkripčních promotorů, terminátorů, vektorů nebo specifických genových sekvencí

Alternativně může být DNA vakcína podána prostřednictvím živého vektoru, jakým je například adenovirus, virus neštovic kanárů (canary pox virus), MVA, a podobně.

Předkládaný vynález je ilustrován Příklady provedení tak, jak jsou uvedeny níže. Příklady jsou pouze ilustrativní a nejsou žádným způsobem zamýšleny jako omezující pro rozsah vynálezu.

PŘÍKLADY PROVEDENÍ

PŘÍKLAD 1

KONSTRUKCE KYVADLOVÉHO VEKTORU pFPMT-MF α -E1-H6

Plasmidy pro transformaci *Hansenula polymorpha* byly zkonstruovány následujícím způsobem. Kyvadlový vektor pFPMT-MF α -E1-H6 byl zkonstruován ve vícestupňovém postupu. Nejprve byla sekvence nukleové kyseliny kódující protein HCV E1s (SEQ ID NO: 2) klonována za vedoucí sekvenci CHH (CHH = *Carcinus maenas* hyperglykemický hormon), která byla následně zaměněna za vedoucí sekvenci MF α (MF α = *Saccharomyces cerevisiae* α -mating (párovací) faktor).

Nejprve byl zkonstruován derivát pUC18, nesoucí jednotku CHH-E1-H6 jako *EcoRI/BamHI* fragment, s nepřerušovanou metodou klonování (Padgett, K. A. and Sorge, J. A. 1996). Navíc byly fragment DNA kódující E1s-H6 a od pCHH-Hir odvozený akceptorový plasmid připraveny s PCR tak, jak je popsáno níže.

Příprava fragmentu DNA kódujícího E1s-H6.

Fragment DNA E1-H6 (kódující protein HCV typu 1b E1s sestávající z aminokyselin E1s 192 až 326, prodloužený o 6 zbytků His; SEQ ID NO:5) byl izolován s PCR z plasmidu pGEMTE1sH6 (SEQ ID NO: 6; Obrázek 1). K tomu byly použity následující primery :

- CHHE1-F: 5'-agttactcttca.**agg**tatgaggtgcgcaacgtgtccg-3'
(SEQ ID NO: 7);

Místo Eam1104I je podtrženo, tečka označuje místo štěpení. Tučně vytištěné baze jsou komplementární k bazím primeru CHH-links. Neoznačené baze se připojují v sense směru uvnitř oblasti start E1 (192-326); a

- CHHE1-R:
5'-gttactcttca.**cagg**gatcctccttaatggtgatggtggtggtgcc-3'
(SEQ ID NO: 8);

Místo Eam1104I je podtrženo, tečka označuje místo štěpení. Tučně vytištěné baze jsou komplementární k bazím primeru MF30-rechts. Baze tvořící místo pro *BamHI* vhodné pro další klonovací postupy jsou vytištěny kurzívou. Neoznačené baze se připojují v antisense směru uvnitř konce jednotky E1-H6, který obsahuje stop kodón a tři další baze mezi stop kodónem a místem *BamHI*.

Reakční směs sestávala z následujících složek: celkový objem 50 μ l obsahující 20 ng *Eco311*-linearizovaného

pGEMTE1sH6, po 0,2 μ M každého z primerů CHHE1-F a CHHE1-R, dNTP's (každý v množství 0,2 μ M), 1 x pufr 2 (Expand Long Template PCR System; Boehringer; Cat No 1681 834), 2,5 U polymerázové směsi (polymerase mix, Expand Long Template PCR System; Boehringer ; Cat No 1681 834).

Byl použit Program 1, který sestával z následujících kroků:

1. denaturace: 5 min 95° C ;
2. 10 cyklů denaturace 30 s při 95° C, 30 s nasedání při 65° C a 130 s prodlužování při 68° C;
3. terminace při 4° C.

Pak bylo ke vzorku získaného podle Programu 1 přidáno 5 μ l 10 x pufru 2 (Expand Long Template PCR System; Boehringer; Cat No 1681 834), 40 μ l H₂O a 5 μ l [dATP, dGTP a dTTP (každý 2mM); 10 mM 5-methyl-dCTP] a byla prováděna další amplifikace podle Programu 2 sestávajícího z následujících stupňů:

1. denaturace: 5 min při 95° C;
2. 5 cyklů 45 s denaturace při 95° C, 30 s nasedání při 65° C a 130 s při 68° C;
3. terminace při 4° C.

Příprava akceptorového plasmidu odvozeného od pCHH-Hir

Akceptorový fragment byl připraven s PCR z plasmidu pCHH-Hir (SEQ ID NO: 9; Obrázek 2) a sestává z téměř úplného plasmidu pCHH-Hir, s tou výjimkou, že sekvence kódující Hir není v produktu PCR přítomna. Pro tuto PCR byly použity následující primery:

1. CHH-links: 5-agttacttcttca. cctcttttccaacgggtgtgtag-3' (SEQ ID NO: 10);

Místo Eam1104I je podtrženo, tečka označuje místo štěpení. Tučně vytištěné baze jsou komplementární k bazím primeru CHHE1-F. Neoznačené baze se připojují v antisense směru uvnitř konce sekvence CHH; a

2. MF30-rechts: 5-agtcactcttca.**ctg**caggcatgcaagcttggcg-3' (SEQ ID NO:11);

Místo Eam1104I je podtrženo, tečka označuje místo štěpení. Tučně vytištěné baze jsou komplementární k bazím primeru CHHE1-R. Neoznačené baze se připojují uvnitř sekvencí pUC18 za klonovaný CHH-Hirudin HL20 plasmidu pCHH-Hir, vně od inzertu.

Reakční směs sestávala z následujících složek: celkový objem 50 μ l obsahující 20 ng Asp718I-linearizovaného pCHH-Hir, po 0,2 μ M každého z primerů CHH-links a MF30-rechts, dNTP's (každý v množství 0,2 μ M), 1 x pufr 2 (Expand Long Template PCR System; Boehringer; Cat No 1681 834), 2,5 U polymerázové směsi (polymerase mix, Expand Long Template PCR System; Boehringer ; Cat No 1681 834).

Byl použit Program 1 tak, jak je popsán výše.

Pak bylo ke vzorku získaného podle Programu 1 přidáno 5 μ l 10 x pufru 2 (Expand Long Template PCR System; Boehringer; Cat No 1681 834), 40 μ l H₂O a 5 μ l [dATP, dGTP a dTTP (každý 2mM); 10 mM 5-methyl-dCTP] a byla prováděna další amplifikace podle Programu 2 tak, jak je popsán výše.

Příprava vektoru pCHHE1

Fragment DNA kódující Els-H6 a akceptorový plasmid odvozený z pCHH-Hir, který byl připraven s PCR tak, jak je popsáno výše, byly purifikovány s použitím purifikační soupravy PCR (PCR product purification kit, Qiagen) podle

doporučení výrobce. Následně byly purifikované fragmenty odděleně štěpeny s *Eam1104I*. Poté byl fragment DNA *E1s-H6* ligován do akceptorového plasmidu odvozeného z *pCHH-Hir* s použitím T4 ligázy (Boehringer) podle instrukcí výrobce.

Buňky *E. coli* XL-Gold byly transformovány s ligační směsí a byla analyzována plasmidová DNA z několika kolonií rezistentních k ampicilinu štěpením s *EcoRI* a *BamHI*. Pozitivní klony byly vybrány a označeny jako *pCHHE1*.

Příprava vektoru *pFPMT-CHH-E1H6*

Fragment *pCHHE1*, získaný působením *EcoRI/BamHI* byl ligován s vektorem *pFPMT121*, který byl štěpen s *EcoRI/BamHI* (SEQ ID NO: 12; Obrázek 3). Byla použita T4 ligáza (Boehringer) podle instrukcí výrobce. Ligační směs byla použita k transformaci buněk *E. coli* DH5 α F'.

U řady transformantů byla provedena analýza restrikních vzorků z plasmidové DNA a pozitivní klon byl odebrán a pojmenován *pFPMT-CHH-E1H6* (SEQ ID NO: 13; Obrázek 4).

Příprava *pFPMT-MF α -E1-H6*

Nakonec byl připraven kyvadlový vektor *pFPMT-MF α -E1-H6* ligací třech fragmentů, kde uvedenými fragmenty byly:

1. 6961kb z *pFPMT121*, štěpeného s *EcoRI/BamHI* (SEQ ID NO: 12; Obrázek 3),
2. 0,245 *EcoRI/HindIII* fragment z *pUC18-MF α* (SEQ ID NO: 62; Obrázek 36), a
3. 0,442kb fragment z 0,454kb produktu PCR, odvozeného z *pFPM CHH-E1H6* a štěpeného s *HindIII/BamHI*

Produkt PCR o 0,454 kb, který poskytl fragment, byl získán s PCR s použitím následujících primerů:

1. primer MFa-E1 f-Hi:

5-aggggtaagcttggataaaaggtatgaggtgcgcaacgtgtccgggatgt-3'
(SEQ ID NO: 14); a

2. primer E1 back-Bam:

5'-agttacggatccttaatggtgatgggtggtggtgccagttcat-3'
(SEQ ID NO: 15).

Reakční směs měla následující složení: Objem reakční směsi 50 μ l, pFPMT-CHH-E1-H6 (*Eco*RI-linearizovaný; 15 ng/ μ l), 0,5 μ l; primer MFa-E1 f-Hi (50 μ M), 0,25 μ l; primer E1 back-Bam (50 μ M), 0,25 μ l; dNTP's (všechny 2mM), 5 μ l; DMSO, 5 μ l; H₂O, 33,5 μ l; Expand Long Template PCR System (Boehringer Mannheim; Cat No 1681 834) pufr 2 (10 x koncentrovaný), 5 μ l; Expand Long Template PCR System Polymerase mixture (1 U/ μ l), 0,5 μ l.

Byl použit program PCR sestávající z následujících stupňů:

1. denaturace: 5 min při 95° C
2. 29 cyklů denaturace 45 s při 95° C, 45 s nasedání při 55° C, a 40 s elongace při 68° C
3. terminace při 4° C.

Na základě použitých primerů obsahoval výsledný 0,454kb produkt PCR kodóny z E1 (192-326), následovanými šesti histidinovými kodóny a stop kodónem „taa“, lemovanými proti směru s 22 3'-terminálními páry bazí z MF α pre-pro sekvence (obsahující relevantní klonovací místo *Hind*III plus šest vyčnívajících párů bazí) a po směru lemovanými s (pro klonování relevantním) místem *Bam*HI a šesti vyčnívajícími páry bazí.

Pro ligační reakci byla použita T4 DNA ligáza (Boehringer Mannheim) podle doporučení výrobce (objem vzorku 20 μ l).

Buňky *E. coli* HB101 byly transformovány s ligační směsí a pozitivní klony byly odebrány po restriktivní analýze plasmidů, izolovaných z několika transformantů. Byl vyselektován pozitivní plasmid a pojmenován jako pFPMT-MF α -E1-H6 (SEQ ID NO: 16; Obrázek 5).

PŘÍKLAD 2

KONSTRUKCE KYVADLOVÉHO VEKTORU pFPMT-CL-E1-H6

Plasmidy pro transformaci *Hansenula polymorpha* byly zkonstruovány následovně. Kyvadlový vektor pFPMT-CL-E1-H6 byl zkonstruována během tří kroků z výchozího pFPMT-MF α -E1-H6 (SEQ ID NO: 16, Obrázek 5).

V prvním kroku byl čtecí rámec MF α -E1-H6 z pFPMT-MF α -E1-H6 subklonován do vektoru pUC18. Proto byl 1,798kb *Sal*I/*Bam*HI fragment z pFPMT-MF α -E1-H6 (obsahující promotor FMD plus MF α -E1-H6) ligován do vektorového *Sal*I/*Bam*HI fragmentu z pUC18 s ligázou T4 (Boehringer) podle doporučení výrobce. Výsledkem byl plasmid, který je zobrazen na Obrázku 6 (SEQ ID NO: 17), a který je dále označován jako pMal2-1 (pUC18-FMD-MF α -E1-H6).

K transformaci buněk *E. coli* DH5 α F' byla použita ligační směs. Bylo odpíchnuto několik kolonií rezistentních k ampicilinu a plasmidová DNA z izolovaných klonů byla analyzována restriktivním štěpením. Pozitivní klony byly dále analyzovány stanovením sekvence DNA pro kódující sekvenci MF α -E1-H6. Správný klon byl použit pro řízenou PCR

mutagenezi k záměně pre-pro-sekvence MF α za kodóny pre-sekvence opičího lysozymu („CL“; odpovídající aminokyselinám 1 až 18 opičího lysozymu; SEQ ID NO: 1). Princip aplikované PCR-řízené mutageneze je založen na amplifikaci celého plasmidu s požadovanými změnami umístěnými na 5'-koncích primerů. V krocích po směru jsou pak lineární produkty PCR modifikovány před vlastní ligací, což vede k požadovanému pozměněnému plasmidu.

Pro reakci PCR byly použity následující primery:

1. primer CL hin :

5'-tgcttcctaccactagcagcactaggatatgaggtgcgcaacgtgtccggg-3'
(SEQ ID NO: 18);

2. primer CL her neu:

5'-tagtactagtattagtaggcttcgcatgaattcccgatgaaggcagagagcg-3'
(SEQ ID NO: 19).

Podtržené 5'oblasti primerů obsahují kodóny, které pocházejí přibližně z jedné poloviny z pre-sekvence opičího lysozymu. Primer CL her neu obsahuje restrikční místo *SpeI* (kurzíva). Nepodtržené oblasti primerů se připojují ke kodónům pro aminokyselinové zbytky 192 až 199 z E1 (CL hin), nebo ke start kodónu „atg“ promotoru FMD za místo *EcoRI* až k pozici -19 (počítáno od místa *EcoRI*). Záměna kodónů pre-pro-sekvence MF α za kodóny pre-sekvence opičího lysozymu byla provedena proto, že primery jsou určeny k amplifikaci úplného pMa12-1.

Reakční směs měla následující složení: pUC18-FMD-Mf α -E1-H6 (pMa12-1; 1,3 ng/ μ l), 1 μ l; primer CL hin (100 μ M), 2 μ l; primer CL her neu (100 μ M), 2 μ l; dNTP's (každý 2,5mM), 8 μ l; H₂O, 76 μ l; Expand Long Template PCR System (Boehringer; Cat No 1681 834) Pufr 2 (10 x koncentrovaný),

10 μ l; Expand Long Template PCR System Polymerase mixture (polymerázová směs, 1 U/ μ l), 0,75 μ l.

Byl použit program PCR sestávající z následujících stupňů:

1. denaturace: 15 min při 95° C
2. 35 cyklů denaturace 30 s při 95° C, 1 min nasedání při 60° C, a 1 min elongace při 72° C
3. terminace při 4° C.

Správná velikost výsledného produktu PCR byla kontrolována elektroforézou v agarózovém gelu (3,5 kb). Poté byly vyčnívající konce 3'-A odstraněny z produktu PCR reakcí s T4 polymerázou tak, aby měly zarovnané konce 3'- a 5'-OH skupiny. Proto bylo na produkt PCR působeno s T4 polymerázou (Boehringer; 1 U/ μ l): ke zbývajícím 95 μ l reakční směsi PCR byly přidány 1 μ l T4 polymerázy a 4 μ l dNTP's (každý 2,5 mM). Vzorek byl inkubován po dobu 20 minut při 37° C. Následně byla DNA precipitována s ethanolem a převedena do 16 μ l H₂O.

Následně byly přidány 5'-fosfáty k produktu PCR pro zarovnání konců kinázovou reakcí. Proto byl k 16 μ l produktu PCR se zarovnanými konci přidány 1 μ l T4 polynukleotid kinázy (Boehringer; 1U/ μ l), 2 μ l 10krát koncentrovaného reakčního pufru pro T4 polynukleotid kinázu (T4 polynucleotide kinase reaction buffer, Boehringer), a 1 μ l ATP (10mM). Vzorek byl inkubován po dobu 30 minut při 37° C. Poté byla DNA nanesena na 1% agarózový gel, pruh s odpovídajícím produktem byl izolován pomocí gelové extrakční soupravy (gel extraction kit, Qiagen) podle doporučení výrobce. Padesát (50) ng purifikovaného produktu bylo samoligováno s použitím T4 ligázy (Boehringer) za

podmínek podle doporučení výrobce. Po inkubaci 72 hodin při 16° C byla DNA v ligační směsi precipitována s ethanolem a rozpuštěna ve 20 µl vody.

Následně byly buňky *E. coli* DH5α-F' transformovány s 10 µl ligačního vzorku. Plasmidová DNA z několika klonů rezistentních na ampicilin byla kontrolována s použitím štěpení s restriktčními enzymy. Pozitivní klon byl izolován a pojmenován jako p27d-3 (pUC18-FMD-CL-E1-H6, SEQ ID NO: 20, Obrázek 7). Poté byl ověřen čtecí rámec pro CL-E1-H6 sekvenováním DNA.

V posledním kroku byl zkonstruován kyvadlový vektor pFPMT-CL-E1-H6 tak, jak je popsáno níže. Fragment *EcoRI/BamHI* o 0,486 kb z p27d-3 (obsahující CL-E1 (192-326)-H6) byl ligován s pFPMT121 (SEQ ID NO: 12, Obrázek 3), štěpeným s *EcoRI/BamHI*. Pro reakci byla použita T4 ligáza (Boehringer) podle doporučení výrobce. DNA v ligačním vzorku byla precipitována s ethanolem a rozpuštěna v 10 µl H₂O. Buňky *E. coli* DH5α'-F' byly transformovány s 10 µl ligačního vzorku a plasmidová DNA z několika kolonií rezistentních k ampicilinu byla analyzována štěpením s *EcoRI* a *BamHI*. Plasmidový klon p37-5 (pFPMT-CL-E1-H6; SEQ ID NO: 21, Obrázek 8) vykazoval požadované velikosti fragmentů o 0,486 kb a 9,961 kb. Správnost sekvence CL-E1-H6 v p37-5 byla ověřena sekvenováním.

PŘÍKLAD 3

KONSTRUKCE KYVADLOVÝCH VEKTORŮ pFPMT-MFα-E2-H6 a pMPT-MFα-E2-H6

Plasmidy pro transformaci *Hansenula polymorpha* byly zkonstruovány následujícím způsobem. Sekvence DNA kódující

MF α -E2s((aminokyseliny 384-673 z HCV E2)-VIEGR-His6 (SEQ ID NO: 5) byla izolována jako 1,331kb *EcoRI/BglIII*-fragment z plasmidu pSP72E2H6 (SEQ ID NO: 22, Obrázek 9). Tento fragment byl ligován buďto s *EcoRI/BglIII*-štěpeným vektorem pFPMT121 (SEQ ID NO: 12, Obrázek C+2), nebo s *EcoRI/BglIII*-štěpeným vektorem pMPT121 (SEQ ID NO: 23, Obrázek 10) s použitím T4 DNA ligázy (Boehringer Mannheim) podle doporučení výrobce. Po transformaci *E.coli* a kontrole plasmidové DNA izolované z různých transformantů pomocí štěpení s restriktčními enzymy, byly pozitivní klony odebrány a výsledné kyvadlové vektory byly pojmenovány a jako pFPMT-MF α -E2-H6 (SEQ ID NO: 22, Obrázek 11) a pMPT-MF α -E2-E6 (SEQ ID NO: 23, Obrázek 12) v uvedeném pořadí.

PŘÍKLAD 4

KONSTRUKCE KYVADLOVÉHO VEKTORU pFPMT-CL-E2-H6

Kyvadlový vektor pFPMT-CL-E2-H6 byl sestaven ve trojstupňovém postupu. Byl připraven meziproductový konstrukt, ve kterém byla sekvence kódující E2 klonována za signální sekvenci α -amylázy z *Schwanniomyces occidentalis*. Toto bylo provedeno nepřerušovanou metodou klonování (Padgett, K. A. and Sorge, J. A. 1996).

Příprava DNA fragmentu kódujícího E2s-H6

Nejprve byla sekvence DNA kódující E2-H6 (aminokyseliny 384 až 673 z E2 HCV s prodloužením o linkerový peptid „VIEGR“ a 6 zbytků His, SEQ ID NO: 5) amplifikována z plasmidu pSP72E2H6 (SEQ ID NO: 24, Obrázek 11) metodou PCR. Použité primery byly označeny MF30E2/F a MF30E2/R a měly následující sekvence:

- primer MF30E2/F:

5'-agtcactcttca.**agg**catacccgcgtgtcaggaggg-3' (SEQ ID NO. 26; místo *Eam*1104I je podtrženo, tečka označuje místo enzymatického štěpení; poslední kodón signální sekvence ze *S. occidentalis* je vytištěn tučně; nepodtržené baze se připojují ke kodónům z E2 (aminokyseliny 384-390 z E2 HCV); - primer MF30E2/R:

5'-agtcactcttca.**caggg**atccttagtgatgggtggatg-3' (SEQ ID NO: 27; místo *Eam*1104I je podtrženo, tečka označuje místo enzymatického štěpení; tučně vytištěné baze jsou komplementární k tučně vytištěným bazím primeru MF30-Rechts (viz níže); místo *Bam*HI, které má být zavedeno do konstruktu, je vytištěno kurzívou; neoznačené sekvence se připojují ke stop kodónu a ke kodónům pro šest terminálních His z E2 (384-673)-VIEGR-H6 (SEQ ID NO: 5).

Reakční směs měla následující složení: v celkovém objemu 50 μ l bylo obsaženo 20 ng 1,33kb *Eco*RI/*Bgl*II fragmentu z pSPO72E2H6, 0,2 μ M každého z primerů MF30E2/F a MF30E2/R, dNTP's (všechny 0,2 μ M), 1x Pufr 2 (Expand Long Template PCR System; Boehringer; Cat No 1681 834), 2,5 U polymerázové směsi (Expand Long Template PCR System; Boehringer; Cat No 1681 834).

Byl použit program PCR 3 sestávající z následujících stupňů:

1. denaturace: 5 min při 95° C
2. 10 cyklů denaturace 30 s při 95° C, 30 s nasedání při 65° C, a 1 min elongace při 68° C
3. terminace při 4° C.

Pak bylo ke vzorku získaného podle Programu 3 přidáno 10 μ l 10 x pufru 2 (Expand Long Template PCR System; Boehringer; Cat No 1681 834), 40 μ l H₂O a 5 μ l [dATP, dGTP a dTTP

(každý 2mM); 10 mM 5-methyl-dCTP] a bylo pokračováno s programem PCR 4, sestávajícím z následujících stupňů:

1. denaturace: 5 min při 95° C;
2. 5 cyklů 45 s denaturace při 95° C, 30 s nasedání při 65° C a 1 min elongace při 68° C;
3. terminace při 4° C.

Příprava akceptorového plasmidu odvozeného z pMF30

Druhý fragment pochází z plasmidu pMF30 (SEQ ID NO: 28, Obrázek 13), amplikonem byl téměř kompletní plasmid pMF30 s výjimkou kodónů pro zralou α -amylázu ze *S. occidentalis*, modifikace, významné pro klonování, byly zavedeny pomocí úpravy primerů. Byla použita následující sada primerů:

- primer MF30-Links:

5'-agtcactcttca.**cct**cttgtcaaaaataatcggttgag-3' (SEQ ID NO: 29; ; místo *Eam1104I* je podtrženo, tečka označuje místo enzymatického štěpení; tučně vytištěné „cct“ je komplementární k tučně vytištěnému „aag“ v primeru MF30E2/F (viz výše); neoznačené baze se připojují k 26 koncovým bazím z kodónů α -amylázy ze *S. occidentalis* v pMF30;

-primer MF30-Rechts:

5'-agtcactcttca.**ctg**caggcatgcaagcttggcg-3' (SEQ ID NO: 11; místo *Eam1104I* je podtrženo, tečka označuje místo enzymatického štěpení; tučně vytištěné „ctg“ je komplementární k tučně vytištěnému „cag“ v primeru MF30E2/R (viz výše); neoznačené baze se připojují k sekvencím pUC18 po směru od stop kodónu α -amylázy ze *S. occidentalis* v pMF30).

Reakční směs měla následující složení: v celkovém objemu 50 μ l bylo obsaženo 20 ng *Bgl*III-linearizovaného

pMF30, 0,2 μ M každého z primerů MF30-Links a MF30-Rechts, dNTP's (všechny 0,2 μ M), 1x Pufr 1 (Expand Long Template PCR System; Boehringer; Cat No 1681 834), 2,5 U polymerázové směsi (Expand Long Template PCR System; Boehringer; Cat No 1681 834). Byly použity shodné programy (Program 3 a 4) tak, jak jsou popsány výše, s výjimkou doby elongace, která byla v obou programech prodloužena z 1 minuty na 4 minuty.

Příprava vektoru pAMY-E2

Fragment DNA kódující E2s-H6 a z PCR získaný akceptorový plasmid odvozený z pMF30 byly z hlediska jejich velikostí zkontrolovány pomocí gelové elektroforézy na 1% agarózovém gelu. Produkty PCR byly purifikovány s purifikační soupravou pro produkty PCR (Qiagen) podle doporučení výrobce. Poté byly purifikované fragmenty odděleně štěpeny s *Eam* 1104I. Ligace fragmentu E2s-H6 s akceptorovým plasmidem odvozeným z pMF30 byla prováděna s použitím T4 ligázy (Boehringer) podle doporučení výrobce. Ligační směs byla použita k transformaci buněk *E. coli* DH5 α F' a plasmidová DNA z několika klonů byly analyzována *Eco*RI/*Bam*HI štěpením. Byl vybrán pozitivní klon, jeho plasmid byly dále pojmenován jako pAMY-E2, a byl použit pro další modifikace tak, jak je popsáno níže.

Příprava vektoru pUC18-CL-E2-H6

Plasmid pAMY-E2 byl podroben PCR-řízené mutagenézi tak, aby byly kodóny pro signální sekvenci α -amylázy zaměněny s kodóny pro pre-sekvenci opičího lysozymu. Tato je dále označována jako „CL“, a odpovídá prvním 15

aminokyselinám opičího lysozymového ORF (SEQ ID NO: 1). Pro mutagenezi byly použity následující primery:

- primer CL2 hin:

5'-tgcttcctaccactagcagcactaggacataacccgcgtgtcaggaggggcag-3'
(SEQ ID NO: 30); a

- primer CL2 her:

5'-tagtactagtattagtaggcttcgcatggaattcactggccgctcgtttta-
caacgtc-3' (SEQ ID NO: 31).

Podtržené 5'-oblasti primerů obsahují sekvence DNA přibližně z jedné poloviny pre-sekvence opičího lysozymu. Primer CL2 her obsahuje restrikční místa *SpeI* (kurzíva) a *EcoRI* (tučně vytištěná kurzíva). Nepodtržené oblasti primerů se připojují ke kodónům aminokyselinových zbytků 384 až 392 z E2 (CL2 hin) nebo k „atg“ start kodónu za místo *EcoRI* až do pozice -19 (počítáno od místa *EcoRI*) promotoru *FMD*. Primery byly navrženy tak, aby byl amplifikován celý vektor pAMY-E2, a proto byly zaměněny kodóny signální sekvence α -amylázy za kodóny pre-sekvence opičího lysozymu.

Reakce PCR byla prováděna podle následujícího programu:

1. denaturace: 15 min při 95° C;
2. 35 cyklů 35 s denaturace při 95° C, 1 min nasedání při 60° C a 1 min elongace při 72° C;
3. terminace při 4° C.

Byla použita následující reakční směs: pAMY-E2 (1 ng/ μ l), 1 μ l; primer CL2 hin (100 μ M), 2 μ l; primer CL2 her (100 μ M) 2 μ l; dNTP's (všechny 0,2 μ M), 8 μ l; H₂O , 76 μ l; Pufr 2 (Expand Long Template PCR System; Boehringer; Cat No 1681 834) (10 x koncentrovaný), 10 μ l; polymerázová směs Expand Long Template PCR System (1 U/ μ l), 0,75 μ l.

Výsledný produkt PCR byl kontrolován gelovou elektroforézou na 1% agarózovém gelu. Před ligací byl PCR fragment modifikován následovně. Vyčnívající konce 3'-A byly odstraněny s T4 polymerázou, což vedlo k zarovnání konců se 3'- a 5'-OH skupinami. Proto byl 1 μ l polymerázy T4 (Boehringer, 1 U/ μ l) přidán ke zbývajícím 95 μ l PCR reakční směsi společně se 4 μ l dNTP's (každý 2,5 mM). Vzorek byl inkubován po dobu 20 minut při 37° C. Následně byla DNA precipitována s ethanolem a rozpuštěna v 16 μ l deionizované vody. Poté následovalo působení kinázy tak, aby byly připojeny 5'-fosfáty k produktu PCR se zarovnanými konci. K 16 μ l rozpuštěného produktu PCR se zarovnanými konci byly přidány 1 μ l T4 polynukleotid kinázy (Boehringer, 1 U/ μ l), 2 μ l 10krát koncentrovaného reakčního pufru pro polynukleotid kinázu (Boehringer) a 1 μ l ATP (10 mM). Vzorek byl inkubován po dobu 30 minut při 37° C.

Vzorek podrobený působení kinázy byl následně oddělen na 1% agarózovém gelu. Pruh produktu byl izolován. DNA byla extrahována z agarózových řezů pomocí gelové extrakční soupravy (Gel Extraction kit Qiagen) podle doporučení výrobce. Padesát (50) ng purifikovaného produktu bylo samoligováno s použitím T4 ligázy (Boehringer) podle doporučení výrobce. Po inkubaci 16 hodin při 16° C byla DNA v ligační směsi precipitována s ethanolem a rozpuštěna ve 20 μ l H₂O (ligační vzorek).

Buňky *E. coli* DH5 α F' byly transformovány s 10 μ l ligačního vzorku. Několik klonů rezistentních k ampicilinu bylo dále charakterizováno s restriční analýzou izolované plasmidové DNA. Pozitivní klon byl označen jako pUC18-CL-

E2-H6 a byl použit pro další modifikace tak, jak je popsáno níže.

Příprava kyvadlového vektoru pFPMT-CL-E2-H6

Fragment *EcoRI/BamHI* o 0,966 kb byl izolován z pUC18-CL-E2-H6 (nesoucí CL-E2(384-673)-VIEGR-H6) a byl ligován do plasmidu pFPMT121 (SEQ ID NO: 12, Obrázek 3) štěpeného s *EcoRI/BamHI*. Pro reakci byla použita ligáza T4 (Boehringer) podle doporučení výrobce. Ligační vzorek byl precipitován s ethanolem a rozpuštěn v 10 µl vody. Takto připravený vzorek byl použit k transformaci buněk *E. coli* DH5αF', pozitivní klony byly odebrány po restriční analýze a příslušný plasmid byl označen jako pFPMT-CL-E2-H6 (SEQ ID NO: 32, Obrázek 14).

PŘÍKLAD 5

KONSTRUKCE KYVADLOVÉHO VEKTORU pFPMT-CL-K-H6-E1

Konstrukce tohoto kyvadlového vektoru sestávala ze dvou stupňů.

V prvním stupni byl konstrukt pUC18-FMD-CL-H6-K-E1-H6 sestaven místně řízenou mutagenezí. Plasmid pUC18-FMD-CL-E1-H6 byl použit jako templát (SEQ ID NO: 20, Obrázek 7). Byly použity následující primery:

-Primer H6KRK hin neu:

5'-catcacaaatatgaggtgcgcaacgtgtccgggatgtac-3' (SEQ ID NO: 37).

-Primer H6KRK her neu:

5'-gtgatggtggtgtcctagtgtctgtagtggttaggaagcatag-3' (SEQ ID NO: 38).

(Baze poskytující přidavné kodóny jsou podtrženy).

Reakční směs měla následující složení: pUC18-FMD-CL-E1-H6 (2 ng/ μ l), 1 μ l; primer HCK hin neu (100 μ M), 2 μ l; primer H6KRK her neu (100 μ M), 2 μ l; dNTP's (každý 2,5mM), 8 μ l; H₂O, 76 μ l; Expand Long Template PCR System (Boehringer; Cat No 1681 834) Pufr 2 (10 x koncentrovaný), 10 μ l; Expand Long Template PCR System Polymerase mixture (polymerázová směs, 1 U/ μ l), 0,75 μ l.

Byl použit program PCR sestávající z následujících stupňů:

1. denaturace: 15 min při 95° C
2. 35 cyklů denaturace 30 s při 95° C, 1 min nasedání při 60° C, a 1 min elongace při 72° C
3. terminace při 4° C.

Alikvot vzorku z PCR byl analyzován na 1% agarózovém gelu ke kontrole velikosti, která byla správná (~ 4,2 kb).

Poté byly z produktu PCR odštěpeny přečnívající konce 3'-A reakcí s T4 polymerázou, což vedlo k zarovnání konců se skupinami 3'- a 5'- OH. Proto byl 1 μ l polymerázy T4 (Boehringer, 1 U/ μ l) přidán ke zbývajícím 95 μ l PCR reakční směsi společně se 4 μ l dNTP's (každý 2,5 mM). Vzorek byl inkubován po dobu 20 minut při 37° C. Následně byla DNA precipitována s ethanolem a rozpuštěna v 16 μ l H₂O. Poté následovalo působení kinázy tak, aby byly připojeny 5'-fosfáty k produktu PCR se zarovnanými konci. K 16 μ l rozpuštěného produktu PCR se zarovnanými konci byly přidány 1 μ l T4 polynukleotid kinázy (Boehringer, 1 U/ μ l), 2 μ l 10krát koncentrovaného reakčního pufru pro polynukleotid kinázu (Boehringer) a 1 μ l ATP (10 mM). Vzorek byl inkubován po dobu 30 minut při 37° C.

Vzorek byl následně nanesen na 1% agarózový gel a správný pruh produktu byl izolován pomocí gelové extrakční soupravy (Qiagen) podle doporučení výrobce. Padesát (50) ng purifikovaného produktu bylo samoligováno s použitím T4 ligázy (Boehringer) podle doporučení výrobce. Po inkubaci 72 hodin při 16° C byla DNA v ligační směsi precipitována s ethanolem a rozpuštěna v 10 µl vody.

Buňky *E. coli* DH5αF' byly transformovány s 5 µl ligačního vzorku. Plasmidová DNA z několika kolonií rezistentních k ampicilinu byly analyzována štěpením s restriktčními enzymy a pozitivní klon byl odebrán a odpovídající plasmid byl pojmenován jako pUC18.FMD.CL-H6-E1-K-H6 (SEQ ID NO: 39, Obrázek 17).

Ve druhém kroku byl zkonstruován přenosový vektor pomocí dvoufragmentové ligace. V následujícím způsobu konstrukce byly použity fragmenty s *Bcl*I kohezivními konci. Vzhledem k tomu, že *Bcl*I může štěpit svoje místo pouze na nemethylované DNA, byl kmen *E. coli* *dam*⁻ transformován s plasmidy pUC18-FMD-CL-H6-K-E1-H6 (SEQ ID NO: 39, Obrázek 17) a pFPMT-CL-E1 (SEQ ID NO: 36, Obrázek 16). Z každé transformace byly odpíchnuty kolonie rezistentní na ampicilin, pěstovány v tekuté kultuře a nemethylované plasmidové DNAs byly připraveny pro další použití. Byly připraveny fragment *Bcl*I/*Hind*III o 1,273 kb z nemethylovaného plasmidu pUC18-FMD-CL-H6-K-E1-H6 (nesoucí promotor *FMD*, kodóny z jednotky CL-H6-K a start z E1) a fragment *Bcl*I/*Hind*III o 6,057 kb z plasmidu pFPMT-CL-E1 (nesoucí chybějící část čtecího rámce E1 začínající od místa *Bcl*I, bez C-koncové identifikátorové značky (tag) His, stejně tak, jako prvky umístěné v pFPMT121 s výjimkou promotoru *FMD*), které byly společně ligovány po dobu 72

hodin při 16° C s použitím ligázy T4 (Boehringer) v celkovém objemu 20 µl podle doporučení výrobce. Následně byla ligační směs nanesena na kousek nitrocelulózové membrány plovoucí na sterilní deionizované vodě tak, aby došlo k odsolení ligační směsi (inkubace po dobu 30 minut při teplotě místnosti). Buňky *E.coli* TOP10 byly transformovány elektroporací 5 µl odsoleného vzorku. Plasmidová DNA z několika výsledných kolonií rezistentních k ampicilinu byla analyzována štěpením s restričními enzymy. Pozitivní klon byl odebrán a pojmenován jako pFPMT-CL-H6-K-E1 (SEQ ID NO: 40, Obrázek 18).

PŘÍKLAD 6

TRANSFORMACE *HANSENULA POLYMORPHA* A SELEKCE TRANSFORMANT

Kmen *H. polymorpha* RB11 byl transformován (postupem „PEG-Mediated DNA uptake protocol“ v podstatě tak, jak je popsán v Klebe, R J. et al. 1983, s modifikací podle Roggenkamp, R. et al. 1986) s odlišnými základními vektory, které jsou popsány v Příkladech 1 až 5. Pro každou transformaci bylo vybráno 72 uracil-prototrofních kolonií a použito pro přípravu kmene následujícím postupem. Každá kolonie byla inokulována do 2 ml tekuté kultury a pěstována v testovacích zkumavkách po dobu 48 hodin (37° C; 160 otáček za minutu, úhel 45°) v selekčním médiu (YNB/glukóza, Difco). Tento stupeň je označen jako první stupeň pasážování. Alikvoty kultur o 150 µl z prvního stupně pasážování byly použity k inokulaci 2 ml čerstvého YNB/glukózového média. Opětovně byly kultury inkubovány tak, jak je popsáno výše (druhý stupeň pasážování). Celkem bylo provedeno osm takových stupňů pasážování. Alikvoty kultur po třetím a osmém stupni pasážování byly použity k inokulaci 2 ml neselektivního média YPD (Difco). Po

inkubaci 48 hodin při 37° C (160 otáček za minutu; úhel 45°; takzvaný první stabilizační krok) byly 150µl alikvoty těchto YPD kultur použity pro inokulaci čerstvých 2ml YPD kultur, které byly inkubovány tak, jak je popsáno výše (druhý stabilizační krok). Alikvoty kultur z druhého stabilizačního kroku byly pak rozetřeny na plotny obsahující selekční YNB/agar. Plotny byly inkubovány po dobu čtyř dnů, dokud nebyly pozorovatelné makroskopické kolonie. Jednotlivé kolonie z každé separace, přenesené do jamek kultivačních destiček, byly označeny jako kmen a použity pro další analýzu exprese.

Analýza exprese byla provedena v kulturách pěstovaných v třepáných, maloobjemových nádobách. Byla odpíchnutá kolonie z výše uvedených YNB/agarových ploten a inokulována do 2 ml YPD a inkubována po dobu 48 hodin tak, jak je popsáno výše. Tento 2ml alikvot byl použit jako inokulační kultura do 20ml třepané lahvové kultury. YPGlycerol (1%) byl použit jako médium a třepané láhve byly inkubovány na rotační třepačce (200 otáček za minutu, 37° C). Po 48hodinovém růstu bylo ke kultuře přidáno 1 % MeOH pro indukci expresní kazety. V různých časových intervalech byly odebírány buněčné pelety z 1ml alikvotů a tyto pak byly uchovávány při -20° C do další analýzy. Specifická exprese proteinů byly analyzována s SDS-PAGE/Western blottingem. K tomu byly buněčné pelety rozpuštěny ve vzorkovém pufru (TrisHCl-SDS) a inkubovány po dobu > 15 minut při 95° C. Proteiny byly separovány na 15% polyakrylamidovém gelu a přeneseny (blotovány) (wet-blot; bikarbonátový pufr) na nitrocelulózové membrány. Bloty byly vyhodnoceny s použitím specifických myších anti-E1 (IGH 201) nebo myších anti-E2 (IGH 216, popsáných v Maertens et al. ve W096/04385) protilátek, jako první protilátkou, a

králiči anti-myši AP byla použita jako druhá protilátka. Barvení bylo provedeno s NBT-BCIP. Pozitivní kmeny byly odebrány pro další pokusy.

Pět z těchto pozitivních klonů bylo použito v pokusu vyhodnocujícím expresi v třepaných lahvových kulturách. Kolonie příslušného kmene byla odpíchnuta z plotny YNB a byla použita k inokulaci 2 ml YPD. Takovéto kultury byly inkubovány tak, jak je popsáno výše. Buněčné suspenze byly použity k inokulaci druhé zdrojové kultury, která byla v 500 ml třepaných lahvích s obsahem 100 ml média YPD. Třepané láhve byly inkubovány na rotační třepačce po dobu 48 hodin při 37° C a 200 otáčkách za minutu. Alikvoty o objemu 25 ml z této druhé zdrojové kultury byly použity k inokulaci 250 ml YPGlycerolového (1%) média a byly inkubovány ve dvoulitrových třepaných lahvích za výše popsaných podmínek. 48 hodin po inokulaci bylo přidáno 1 % MeOH (k indukci promotoru) a třepané láhve byly dále inkubovány za výše popsaných podmínek. 24 h po indukci byl pokus zastaven a buněčné pelety byly shromážděny centrifugací. Hladina exprese v pěti odlišných klonech byla analyzována s SDS-PAGE/Western blottingem (za výše uvedených podmínek). Titrační řady z každého klonu byly nanесeny na gel a nejproduktivnější klon byl vybrán pro další fermentační a purifikační zkoušky.

Bylo s překvapením zjištěno, že *H. polymorpha*, kvasinkový kmen velice blízce příbuzný s *Pichia pastoris* (Gellissen, G. 2000), je schopen exprimovat proteiny HCV v podstatě bez hyperglykosylace, tedy se sloučeninami cukrů o srovnatelnému rozsahu, jaký mají obalové proteiny HCV, exprimované savčími buňkami infikovanými s HCV rekombinantním virem vaccinia.

Kmen *Hansenula polymorpha* RB 11 byl uložen 19. dubna 2002 za podmínek Budapeštské smlouvy v Mycothèque de l'UCL (MUCL), Université Catholique de Louvain, Laboratoire de mycologie, Place Croix du Sud 3 bte 6, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium, a má MUCL přírůstkové číslo MUCL43805.

PŘÍKLAD 7

KONSTRUKCE VEKTORU pSY1aMFE1sH6a

Plasmid pro expresi v *S. cerevisiae* byl zkonstruován následovně. Sekvence kódující El byla izolována jako *NsiI*/*Eco52I* fragment z plasmidu pGEMT-E1sH6 (SEQ ID NO: 6, Obrázek 1), u kterého bylo provedeno zarovnání konců (s použitím T4 DNA polymerázy) a byl klonován do vektoru pYIG5 (SEQ ID NO: 41, Obrázek 19) s použitím T4 DNA ligázy (Boehringer) podle doporučení výrobce. Klonování bylo provedeno tak, že fragment kódující Els-H6 byl připojen přímo a ve čtecím rámci sekvence kódující α MF. Ligační směsí byly transformovány buňky *E. coli* DH5 α F'. Následně byla plasmidová DNA z několika klonů rezistentních na ampicilin analyzována s restriční štěpením a pozitivní klony byly odebrány a pojmenovány jako pYIG5E1H6 (ICCG3470; SEQ ID NO: 42, Obrázek 20).

Expresní kazeta (obsahující α MF-sekvenci a oblast kódující Els s His-identifikátorovou značkou) byla přenesena jako *Bam*HI fragment (2790 bp) z pYIG5E1H6 do kyvadlového vektoru pSY1 pro *E. coli*/*S. cerevisiae* štěpeného s *Bam*HI (SEQ ID NO: 21, Obrázek 43). Ligace byla prováděna s T4 DNA ligázou (Boehringer) podle doporučení výrobce. Buňky *E. coli* DH5 α F' byly transformovány s ligační směsí a plasmidová DNA z několika kolonií

rezistentních na ampicilin byla analyzována štěpením s restričními enzymy. Pozitivní klon byl odebrán a pojmenován jako pSY1aMFE1sH6a (ICCG3479; SEQ ID NO: 44, Obrázek 22).

PŘÍKLAD 8

KONSTRUKCE VEKTORU pSYIGSE2H6

Plasmid pro expresi v *S. cerevisiae* pSYIGSE2H6 byl zkonstruován následovně. Sekvence kódující E2 byla izolována jako *SalI*/*KpnI* fragment z pBSK-E2sH6 (SEQ ID NO: 45, Obrázek 23), který byl připraven jako fragment se zarovnanými konci (s použitím T4 DNA polymerázy) a následně byl klonován do vektoru pYIG5 (SEQ ID NO: 41, Obrázek 19) s použitím T4 DNA ligázy (Boehringer) podle doporučení výrobce. Vlastní klonování bylo provedeno tak, že fragment kódující E2-H6 byl připojen přímo a do čtecího rámce α MF-kódující sekvence. Buňky *E. coli* DH5 α F' byly pak transformovány s ligační směsí, plasmidová DNA z několika kolonií rezistentních na ampicilin byla analyzována s restričním štěpením a pozitivní klon byl odebrán a pojmenován jako pYIG5HCCL-22aH6 (ICCG2424; SEQ ID NO: 46, Obrázek 24).

Kazeta pro expresi (obsahující α MF-sekvenci a oblast kódující E2 (384-673) s identifikátorovou značkou His) byla přenesena jako *Bam*HI fragment (3281 bp) z pYIG5HCCL-22aH6 do kyvadlového vektoru pSY1 pro *E. coli*/*S. cerevisiae*, otevřeného s *Bam*HI (SEQ ID NO: 43, Obrázek 21). Ligace byla provedena s T4 DNA ligázou (Boehringer) podle doporučení výrobce. Buňky *E. coli* DH5 α F' byly pak transformovány s ligační směsí, plasmidová DNA z několika kolonií rezistentních na ampicilin byla analyzována s restričním

štěpením a pozitivní klon byl odebrán a pojmenován jako pSY1YIGSE2H6 (ICCG2466; SEQ ID NO: 47, Obrázek 25).

PŘÍKLAD 9

KONSTRUKCE VEKTORU pSY1YIG7E1s

Plasmid pSY1YIG7E1s pro expresi v *S. cerevisiae* byl zkonstruován následujícím způsobem. Sekvence kódující E1 byla izolována jako *NsiI*/*Eco52I* fragment z pGEMT-E1s (SEQ ID NO: 6, Obrázek 1), který byl připraven jako fragment se zarovnanými konci, a byl klonován do vektoru pYIG7 (SEQ ID NO: 48, Obrázek 26) s použitím T4 DNA ligázy (Boehringer) podle doporučení výrobce. Vlastní klonování bylo provedeno tak, že fragment kódující E1 byl připojen přímo a do čtecího rámce α MF-kódující sekvence. Buňky *E. coli* DH5 α F' byly pak transformovány s ligační směsí, plasmidová DNA z několika kolonií rezistentních na ampicilin byla analyzována s restriční štěpením a pozitivní klon byl odebrán a pojmenován jako pYIG7E1 (SEQ ID NO: 49, Obrázek 27).

Kazeta pro expresi (obsahující vedoucí sekvenci CL a oblast kódující E1 (192-326) byla přenesena jako *Bam*HI fragment (2790 bp) z pYIG7E1 do kyvadlového vektoru pSY1 pro *E. coli*/*S. cerevisiae*, štěpeného s *Bam*HI (SEQ ID NO: 43, Obrázek 21). Ligace byla provedena s T4 DNA ligázou (Boehringer) podle doporučení výrobce. Buňky *E. coli* DH5 α F' byly pak transformovány s ligační směsí, plasmidová DNA z několika kolonií rezistentních na ampicilin byla analyzována s restriční štěpením. Pozitivní klon byl odebrán a pojmenován jako pSY1YIG7E1s (SEQ ID NO: 50, Obrázek 28).

PŘÍKLAD 10**TRANSFORMACE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* A SELEKCE****TRANSFORMANT**

Proto, aby byly překonány problémy hyperglykosylace, které jsou často popisovány pro proteiny zvýšeně exprimované v *Saccharomyces cerevisiae*, byl použit screening mutant. Tento screening vycházel z metody popsané Ballou (Ballou, L. et al. 1991), ve které jsou selektovány spontánní recesivní mutanty rezistentní k orthovanadičnanu. Počáteční selekce kmenů byla provedena na základě glykosylačního vzoru po působení invertázy tak, jak byl pozorován po základní gelové elektroforéze. Pro další pokusy pro expresi rekombinantních proteinů byl odebrán kmen, který měl sníženou schopnost glykosylace a který byl pojmenován jako IYCC155. Podstata mutace nebyla dále zkoumána.

Uvedený glykosylačně-deficientní kmen IYCC155 byl transformován s plasmidy, tak jak je popsáno v Příkladech 7 až 9, konkrétně metodou s lithium acetátem popsanou Elble (Elble, R. 1992). Několik Ura-komplementovaných kmenů bylo odpíchnuo ze selektivní plotny obsahující YNB + 2% agar (Difco) a použito k inokulaci 2 ml YNB + 2 % glukózy. Kultury byly inkubovány po dobu 72 hodin při 37° C, 200 otáčkách za minutu na kruhové třepačce, a supernatanty z kultury a vnitrobuněčné frakce byly analyzovány z hlediska exprese El Western blottingem, prováděným se specifickou myší anti-El monoklonální protilátkou (IGH 201). Pro další pokusy byl odebrán klon o nejvyšší produkci.

Expresi proteinů ve zde použité glykosylačně deficientní mutantě *S cerevisiae* omezují suboptimální růstové charakteristiky takovýchto kmenů, což vede k nižšímu výtěžku biomasy a tím k nižšímu výtěžku požadovaných proteinů ve srovnání s divokými typy kmenů *S. cerevisiae*. Přesto výtěžek požadovaných proteinů byl podstatně vyšší než v savčích buňkách.

PŘÍKLAD 11

KONSTRUKCE VEKTORU pPICZalphaD'E1sH6 A pPICZalphaE'E1sH6

Kyvadlový vektor pPICZalphaE'E1sH6 byl zkonstruován z výchozího vektoru pPICZalphaA (Invitrogen; SEQ ID NO: 51, Obrázek 29). V prvním kroku byl uvedený vektor upraven tak, aby umožnil klonování sekvence kódující E1 přímo za štěpící místo KEX2 nebo STE13 proteáz (posttranslační úpravové proteázy), v uvedeném pořadí. Proto byl pPICZalphaA štěpen s XhoI a NotI. Produkt štěpení byl separován na 1% agarózovém gelu a fragment o 3519 kb (větší část vektoru) byl izolován a purifikován s použitím soupravy pro gelovou extrakci (gel extraction kit, Qiagen). Poté byl fragment ligován s použitím T4 polymerázy (Boehringer) podle doporučení výrobce, a to v přítomnosti specifických oligonukleotidů poskytujících pPICZalphaD' (SEQ ID NO: 52, Obrázek 30) nebo pPICZalphaE' (SEQ ID NO: 53, Obrázek 31).

Byly použity následující oligonukleotidy:

- pro konstrukci pPICZalphaD':

8822: 5'-TCGAGAAAAGGGGCCCCGAATTCGCATGC-3' (SEQ ID NO: 54); a

8823: 5'-GGCCGCATGCGAATTCGGGCCCCCTTTTC-3' (SEQ ID NO: 55),

které po připojení poskytují linkerový oligonukleotid:

TCGAGAAAAGGGGCCCCGAATTCGCATGC (SEQ ID NO: 54)

CTTTTCCCCGGGCTTAAGCGTACGCCGG (SEQ ID NO: 55)

- pro konstrukci pPICZalphaE':

8649: 5'-TCGAGAAAAGAGAGGGCTGAAGCCTGCAGCATATGC-3' (SEQ ID NO:56)

8650: 5'-GGCCGCATATGCTGCAGGCTTCAGCCTCTCTTTTC-3' (SEQ ID NO: 57), které po připojení poskytují linkerový oligonukleotid:

TCGAGAAAAGAGAGGGCTGAAGCCTGCAGCATATGC (SEQ ID NO:56)

CTTTTCTCTCCGACTTCGGACGTCGTATACGCCGG (SEQ ID NO: 57).

Uvedené kyvadlové vektory pPICZalphaD' a pPICZalphaE' mají nově zavedená klonovací místa za štěpícím místem příslušných úpravových proteáz KEX2 a STE13. Sekvence kódující E1-H6 byly izolovány jako *NsiI*/*Eco52I* fragment z plasmidu pGEMT-E1sH6 (SEQ ID NO: 6, Obrázek 1). Fragment byl purifikován s použitím soupravy pro gelovou extrakci (Qiagen) po separaci produktu štěpení na 1% agarózovém gelu. Výsledný fragment byl připraven se zarovnanými konci (použitím T4 DNA polymerázy) a byl ligován buďto do pPICZalphaD' nebo do pPICZalphaE' přímo za příslušné místo štěpení úpravové proteázy.

Buňky *E. coli* TOP10F' byly transformovány s ligačními směsmi a plasmidová DNA z několika kolonií rezistentních k zeocinu byla analyzována štěpením s restrikními enzymy. Pozitivní klony byly odebrány a pojmenovány jako pPICZalphaD'E1sH6 (ICCG3694; SEQ ID NO: 58, Obrázek 32) a pPICZalphaE'E1sH6 (ICCG3475; SEQ ID NO: 59, Obrázek 33), v uvedeném pořadí.

PŘÍKLAD 12**KONSTRUKCE VEKTORU pPICZalphaD'E2sH6 A pPICZalphaE'E2sH6**

Kyvadlové vektory pPICZalphaD' a pPICZalphaE' byly zkonstruovány způsobem popsáným v Příkladu 11.

Sekvence kódující E2-H6 byla izolována jako *SalI/KpnI* fragment z plasmidu pBSK-E2sH6 (SEQ ID NO: 45, Obrázek 23). Fragment byl purifikován s použitím soupravy pro gelovou extrakci (Qiagen) po separaci produktu štěpení na 1% agarózovém gelu. Výsledný fragment byl připraven se zarovnanými konci (použitím T4 DNA polymerázy) a ligován do buďto pPICZalphaD' nebo do pPICZalphaE' přímo za příslušné štěpící místo úpravové proteázy.

Buňky *E. coli* TOP10F' byly transformovány s ligační směsí a plasmidová DNA z několika kolonií rezistentních k zeocinu byla analyzována štěpením s restrikcčními enzymy. Pozitivní klony byly odebrány a pojmenovány jako pPICZalphaD'E2sH6 (ICCG3692; SEQ ID NO: 60, Obrázek 34) a pPICZalphaE'E2sH6 (ICGG3476; SEQ ID NO: 61, Obrázek 35), v uvedeném pořadí.

PŘÍKLAD 13**TRANSFORMATICE *PICHA PASTORIS* A SELEKCE TRANSFORMANT**

Kyvadlové plasmidy pro *P. pastoris*, popsané v Příkladech 11 a 12, byly transformovány do buněk *P. pastoris* podle doporučení výrobce (Invitrogen). Kmeny produkující E1 a E2 byly odebrány pro další charakterizaci.

Obalové proteiny HCV byly exprimovány v *P. pastoris*, což je kvasinkový kmen, o kterém je dobře známo, že u něho je normálně hyperglykosylace nepřítomna (Gellissen, G.

2000) a již dříve byl použit pro expresi proteinu E z viru tropické horečky v podobě fúzního proteinu GST (Sugrue, R. J. et al. 1997). Obalové proteiny HCV, rezultující z exprese v *P. pastoris*, pozoruhodně vykazovaly srovnatelnou glykosylaci, jaká je pozorována u divokých typů kmenů *Saccharomyces*. Konkrétněji, obalové proteiny HCV, produkované v *P. pastoris*, jsou hyperglykosylované (podle molekulové hmotnosti produktů exprese stanovené ve Western-blottingu proteinů izolovaných z transformovaných buněk *P. pastoris*).

PŘÍKLAD 14

PODMÍNKY KULTIVACE PRO *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*, *HANSENULA POLYMORPHA* A *PICHIA PASTORIS*

Saccharomyces cerevisiae

Příprava buněčné banky

Z vybraného rekombinantního klonu byla připravena základní buněčná banka a pracovní buněčná banka. Zmražené vzorky ve fiólách byly připraveny ze střední exponenciální fáze růstu kultury, pěstované v třepaných lahvích (podmínky inkubace byly shodné jako u inokulačních kultur, viz níže). Jako kryoprotektivní látka byl přidán glycerol (na konečnou 50% koncentraci).

Fermentace

Inokulační kultury byly získány z lahviček se zmraženými buňkami z pracovní banky a byly pěstovány v 500 ml média (YNB doplněné s 2 % sacharózy, Difco) ve 2litrových Erlenmeyerových třepaných baňkách při 37° C, 200 otáčkách za minutu a po dobu 48 hodin.

Fermentace byly běžně prováděny ve fermentorech Biostat C s pracovním objemem 15 litrů (B. Braun Int., Melsungen, Germany). Fermentační médium obsahovalo 1 % kvasničného extraktu (Yeast Extract), 2 % Peptonu a 2 % sacharózy jako zdroje uhlíku. Jako protipěnicí činidlo byl použit polyethylenglykol.

Teplota, pH a rozpuštěný kyslík byly běžně během fermentace kontrolovány a řízeny, použitelné parametry jsou souhrnně uvedeny v Tabulce 1. Rozpuštěný kyslík byl kaskádovitě řízen pomocí míchání/provzdušnění. Hodnota pH byla řízena přidavky NaOH (0,5M) nebo roztoku H_3PO_4 (8,5%).

Tabulka 1. Specifické parametry pro fermentace *S. cerevisiae*

Parametr	Rozmezí
teplota	33 - 37° C
pH	4,2 - 5,0
DO (fáze růstu)	10 - 40 % nasycení vzduchem
DO (indukce)	0 - 5 %
aerace	0,5 - 1,8 vvm*
míchání	150 - 900 rpm

* výměna objemu za minutu

rpm - otáčky za minutu

Fermentace byla zahájena přidáním 10 % inokulační kultury. Během fáze růstu byla sledována koncentrace sacharózy analýzou HPLC off-line (Polysphere Column OAKC Merck).

Během fáze růstu byl obsah rozpuštěného kyslíku řízen kaskádovým řízením (míchání/provzdušnění). Po úplném

zmetabolizování sacharózy byla produkce heterologních proteinů řízena endogenně produkovaným ethanollem doplněným s postupně přidávaným EtOH tak, aby byla koncentrace udržována přibližně na hodnotě 0,5 % (HPLC analýza off-line, sloupec „polyshper OAKC“) Během této indukční fáze byl rozpuštěný kyslík kontrolován a udržován pod 5% nasycením vzduchem, ruční úpravou nebo úpravou rychlosti provzdušňování a rychlosti míchání.

Fermentační produkty byly typicky sklíženy 48 až 72 hodin po indukci zakoncentrováním s tangenciální průtokovou filtrací, následovanou centrifugací zakoncentrovaných buněčných suspenzí tak, aby byly získány buněčné pelety. Pokud nebyly buněčné pelety analyzovány bezprostředně, byly uchovávány při -70°C .

Hansenula polymorpha

Příprava buněčné banky

Z vybraného rekombinantního klonu byla připravena základní buněčná banka a pracovní buněčná banka.

Zmražené vzorky ve fiólách byly připraveny ze střední exponenciální fáze růstu kultury, pěstované v třepaných lahvích (podmínky inkubace byly shodné jako u inokulačních kultur, viz níže). Jako kryoprotektivní látka byl přidán glycerol (na konečnou 50% koncentraci).

Fermentace

Inokulační kultury byly získány z lahviček se zmraženými buňkami (-70°C) z pracovní banky a byly pěstovány v 500 ml média (YNB, Difco) ve 2litrových Erlenmeyerových třepaných baňkách při 37°C , 200 otáčkách za minutu a po dobu 48 hodin.

Fermentace byly běžně prováděny ve fermentorech Biostat C s pracovním objemem 15 litrů (B. Braun Int., Melsungen, Germany). Fermentační médium obsahovalo 1 % kvasničného extraktu (Yeast Extract), 2 % Peptonu a 1 % glycerolu jako zdroje uhlíku. Jako protipěnicí činidlo byl použit polyethylenglykol.

Teplota, pH, přívod vzduchu a rozpuštěný kyslík byly běžně během fermentace kontrolovány a řízeny, použitelné parametry jsou souhrnně uvedeny v Tabulce 2. Rozpuštěný kyslík byl řízen mícháním. Hodnota pH byla řízena přidávkou NaOH (0,5M) nebo roztoku H_3PO_4 (8,5%).

Tabulka 2. Specifické parametry pro fermentace *H. polymorpha*

Parametr	Rozmezí
teplota	30 - 40° C
pH	4,2 - 5,0
DO (fáze růstu)	10 - 40 % nasycení vzduchem
aerace	0,5 - 1,8 vvm*
míchání	150 - 900 rpm

* výměna objemu za minutu

rpm - otáčky za minutu

Fermentace byla zahájena přidáním 10 % inokulační kultury. Během fáze růstu byla sledována koncentrace glycerolu off-line (Polysphere Column OAKC Merck) a 24 hodin po úplném spotřebování glycerolu bylo přidáno 1 % methanolu, aby byla indukována exprese heterologních proteinů. Fermentační produkty byly sklizeny 24 hodin po indukci zakoncentrováním s tangenciální průtokovou filtrací, následovanou

centrifugací zakoncentrovaných buněčných suspenzí tak, aby byly získány buněčné pelety. Pokud nebyly buněčné pelety analyzovány bezprostředně, byly uchovávány při -70°C .

Pichia pastoris

Pokusy s produkcí proteinů v rekombinantní *Pichia pastoris* byly v malém měřítku prováděny v kulturách ve třepaných lahvích. Inokulační kultury byly pěstovány přes noc v médiu YPD (Difco). Výchozí pH média bylo upraveno na 4,5. Třepané láhve byly inkubovány na rotační třepačce při 200 - 250 otáčkách za minutu a 37°C .

Produkce v malém měřítku byla typicky prováděna v objemu 500 ml ve 2litrových baňkách a byla zahájena s 10% inokulací do média pro expresi, obsahujícím 1 % kvasničného extraktu (Yeast extract), 2 % Peptonu (oba Difco) a 2 % glycerolu jako zdroje uhlíku. Podmínky pro inkubaci byly shodné jako pro inokulační kulturu. Indukce byla zahájena přidáním 1 % MeOH přibližně 72 hodin po inokulaci. Buňky byly sklizeny 24 hodin po indukci pomocí centrifugace. Pokud nebyly buněčné pelety analyzovány bezprostředně, byly uchovávány při -70°C .

PŘÍKLAD 15

ODSTRANĚNÍ VEDOUcíHO PEPTIDU Z PROTEINŮ MF α -E1-H6 A MF α -E2-H6, EXPRIMOVANÝCH VE VYBRANÝCH KMENECH KVASINEK

Dále byly analyzovány produkty exprese proteinových konstruktů HCV E1 a E2 s vedoucí sekvencí α -párovacího faktoru (α MF) ze *S. cerevisiae* v *Hansenula polymorpha* a v glykosylačně negativním kmenu *Saccharomyces cerevisiae*. Protože jak genotyp 1b HCV E1s (aminokyseliny 192-326), tak

HCV E2s (aminokyseliny 383-673, prodloužený se sekvencí VIEGR (SEQ ID NO: 69)) byly exprimovány s „his“ identifikátorovou značkou na C-konci (H6, HHHHHH, SEQ ID NO: 63 - tyto proteiny jsou dále v tomto Příkladu označovány jako α MF-E1-H6 a α MF-E2-H6), rychlá a účinná purifikace produktů exprese po solubilizaci buněk kvasinek s guanidinium chloridem (GuHCl) byla prováděna na Ni-IDA (Ni-iminodioctová kyselina). Stručně řečeno, buněčné pelety byly resuspendovány v 50 mM fosfátu, 6 M GuHCl, pH 7,4 (9 objemů/g buněk). Proteiny byly sulfonovány přes noc při teplotě místnosti (room temperature, RT) v přítomnosti 320 mM (4% hmotn./objem) siřičitanu sodného a 65 mM (2% hmotn./objem) tetrathionátu sodného. Lyzát byl po jednom cyklu zmražení-roztátí vyčištěn centrifugací (10 000 g, 30 min, 4° C) a k supernatantu byly přidány Empigen (Albright & Wilson, UK) a imidazol na konečnou koncentraci 1 % (hmotn./objem) a 20 mM, v uvedeném pořadí. Vzorek byl filtrován (0,22 μ M) a nanesen na sloupec Ni-IDA Sepharose FF, který byl ekvilibrován s 50 mM fosfátem, 6 M GuHCl, 1% Empigen (pufr A) doplněným s 20 mM imidazolu. Sloupec byl postupně promyt s pufr A obsahujícím 20 mM a 50 mM imidazolu, v uvedeném pořadí, dokud absorbance při 280 nm nedosáhla základní úrovně. Produkty s His-značkou byly eluovány působením pufru D, 50 mM fosfát, 6M GuHCl, 0,2 % (pro E1) nebo 1 % (pro E2) Empigen, 200 mM imidazol. Eluované materiály byly analyzovány s SDS-PAGE a Western-blottingem s použitím specifických monoklonálních protilátek namířených proti E1 (IGH201), nebo E2 (IGH212).

Produkty E1 byly bezprostředně analyzovány Edmanovým odbouráváním.

Vzhledem k tomu, že SDS-PAGE odhalila už velice komplexní obraz proteinových pruhů pro E2, byla prováděna další frakcionace s gelovou chromatografií (size exclusion chromatography). Eluát Ni-IDA byl zkoncentrován ultrafiltrací (MWCO 10 kDa, centriplus, Amicon, Millipore) a nanesen na Superdex G200 (10/30 nebo 16/60; Pharmacia) v PBS, 1% Empigen nebo PBS, 3 % Empigen. Eluční frakce, obsahující produkty E2, s molekulovou hmotností M_r mezi ~80 kDa a ~45 kDa, například frakce 17-23 z elučního profilu podle Obrázku 37 vzniklé migrací na SDS-PAGE (Obrázek 38), byly spojeny a alkylovány (inkubací s 10 mM DTT, 3 hodiny při teplotě místnosti, následovanou inkubací s 30 mM jódacetamidem po dobu 3 hodin při teplotě místnosti). Vzorky pro aminoterminální sekvenování byly podrobeny působení Endo H (Roche Biochemicals), nebo byly ponechány bez jejího působení. Glykosylované a deglykosylované produkty E2 byly nanesený na PVDF-membrány pro aminoterminální sekvenování. Blot glykosylovaného a deglykosylovaného E2 obarvený amidovou černí je znázorněn na Obrázku 39.

Sekvenování obou purifikovaných produktů E1 a E2 vedlo k překvapujícímu zjištění, že odstranění signální sekvence z obalových proteinů HCV se objevuje pouze částečně (viz Tabulka 3). Kromě toho je většina vedlejších produktů (produkty degradace a produkty dosud obsahující vedoucí sekvenci nebo její část) glykosylovaných. Tato glykosylace je dokonce i v části na neodštěpeném fragmentu signální sekvence, která též obsahuje N-glykosylační místo. Glykosylační místa mohou být mutována tak, aby bylo dosaženo méně glykosylovaných vedlejších produktů. Nicméně, mnohem více závažným je zjištění, že některé alternativně štěpené produkty mají odlišnost pouze v 1 až 4 aminokyselinách ve srovnání s požadovaným intaktním

obalovým proteinem. Z tohoto důvodu je purifikace správně upravených produktů fakticky nemožná vzhledem k tomu, že neexistují dostatečné rozlišovací biochemické charakteristiky mezi různými produkty exprese. Několik z degradačních produktů může být výsledkem štěpení podobnému Kex-2 (například štěpení pozorované za aminokyselinou 196 v E1, což je štěpení za argininem), které je rovněž požadováno pro odštěpení vedoucího peptidu α -párovacího faktoru a které tak nemůže být blokováno, aniž by byl narušen tento nepostradatelný proces.

Byl porovnáván klon o vysoké produkci E1, získaný transformací *S. cerevisiae* IYCC155 s pSY1YIG7E1s (SEQ ID NO: 50; Obrázek 28) s klonem o vysoké produkci, který byl získán transformací *S. cerevisiae* IYCC155 s pSY1aMFE1sH6aYIG1E1s (SEQ ID NO: 44; Obrázek 22). Vnitrobuněčná exprese proteinu E1 byla hodnocena 2 až 7 dnů po indukci, to znamená, že byl použit Western-blotting se specifickou monoklonální protilátkou proti E1 (IGH 201). Jak lze usuzovat z Obrázku 40, maximální exprese byla pozorována u obou kmenů po 2 dnech, avšak vzory exprese pro oba kmeny jsou úplně odlišné. Exprese s vedoucím peptidem α -párovacího faktoru vede k velice komplexnímu vzoru pruhů, který je důsledkem skutečnosti, že úprava (odštěpení) vedoucího proteinu není účinná. Tato skutečnost vede k několika produktům exprese s odlišnými aminokonci, z nichž některé jsou modifikovány s 1 až 5 N-glykosylacemi. Nicméně, pro E1, exprimovaný s vedoucím peptidem CL, je pozorovatelný omezený počet odlišných pruhů, což reflektuje vysokou úroveň správného odstranění vedoucího peptidu a skutečnost, že pouze takto správně upravený materiál může být modifikován s N-glykosylací (1 až 5 řetězců) tak, jak

bylo pozorováno u proteinu E1, exprimovaném v *Hansenula* se stejným vedoucím peptidem CL (viz Příklad 16).

Hybridomová buněčná linie produkující monoklonální protilátku namířenou proti E1 (IGH201) byla uložena 12. března 1998 podle podmínek Budapeštské dohody v European Collection of Cell Cultures, Centre for Applied Microbiology & Research, Salisbury, Wiltshire SP4 OJG, UK, a má přírůstkové číslo ECACC 98031216. Monoklonální protilátka namířená proti E2 (IGH212) byla popsána jako protilátka 12D11F2 v Příkladu 7.4 v Maertens et al. ve W096/04385.

Tabulka 3. Identifikace N-konců proteinů α MF-E1-H6 a α MF-E2-H6, exprimovaných v *S. cerevisiae* nebo *H. polymorpha*. Na základě N-terminálního sekvenování bylo možné odhadnout množství N-konců ve zralých proteinech E1-H6 a E2-H6 („zralost“ indikuje správné odstranění signální sekvence α MF). Celkové množství proteinových produktů bylo vypočteno jako pmol proteinu na základě intenzity píků získaných Edmanovým odbouráváním. Následně bylo pro každý specifický protein (tj. pro každý „detekovaný N-konec“) stanoveno % mol versus celkové množství.

Kvasinka	α MF-E1-H6	α MF-E2-VIEGR-H6
<i>S. cerevisiae</i>	<u>Pokus 1:</u> - 16% proteinů stále obsahujících sekvence αMF - 18 % proteinů štěpených mezi aa 195 a 196 proteinu E1 - 66 % proteinů se správně odstraněnou sekvencí α MF <u>Pokus 2</u> - 18 % proteinů stále obsahujících sekvence αMF - 33 % proteinů štěpených mezi aa 195 a 196 proteinu E1 - 8 % jiných proteinů jiných produktů štěpení E1 - 44 % proteinů se správně odstraněnou sekvencí α MF	/
<i>H. polymorpha</i>	- 64 % proteinů stále obsahujících sekvence αMF - 6 % proteinů štěpených mezi aa 192 a 193 proteinu E1 - 30 % proteinů se správně odstraněnou sekvencí α MF	- 75 % proteinů stále obsahujících sekvence α MF - 30 % proteinů se správně odstraněnou sekvencí α MF

PŘÍKLAD 16**EXPRESSE KONSTRUKTU E1 V KVASINKÁCH, VHODNÝCH PRO PRODUKCI A PURIFIKACI VE VELKÉM MĚŘÍTKU**

Bylo použito několik dalších vedoucích sekvencí k záměně vedoucího peptidu α MF ze *S. cerevisiae* za sekvenci vybranou ze skupiny zahrnující CHH (vedoucí sekvence hyperglykemického hormonu z *Carcinus maenas*), Amyl (vedoucí sekvence amylázy ze *S. occidentalis*), Gam 1 (vedoucí sekvence glukooamylázy ze *S. occidentalis*), Phy5 (vedoucí sekvence houbové fytázy), pho1 (vedoucí sekvence kyselé fosfatázy z *Pichia pastoris*) a CL (vedoucí sekvence opičího lysozymu C, 1,4-beta-N-acetylmuramidáza C), které byly připojeny k E1-H6 (např. E1 s C-koncovým his-tag). Všechny konstrukty byly exprimovány v *Hansenula polymorpha* a každý z výsledných buněčných lyzátů byl podroben analýze Western blot. Na základě výsledků bylo možné uzavřít, že rozsah odstranění vedoucí nebo signální sekvence nebo peptidu byl extrémně nízký s výjimkou konstruktu, ve kterém je použit jako vedoucí peptid CL. Toto zjištění bylo potvrzeno pro konstrukt CHH-E1-H6 Edmanovým odbouráváním materiálu purifikovaného na Ni-IDA: nebylo možné detekovat žádný správně štěpený produkt, ačkoliv bylo získáno několik odlišných sekvencí (viz Tabulka 4).

Tabulka 4. Identifikace N-konců proteinů CHH-E1-H6, exprimovaných v *H. polymorpha*, na základě sekvenování aminokyselin od N-konce u různých proteinových pruhů po separaci s SDS-PAGE a nanesení na PVDF membráně

Molekulová hmotnost	Identifikovaný N-konec
45 kD	začíná u aminokyseliny 37 vedoucího peptidu

	CHH = pouze pre-sekvence je odštěpena, pro-sekvence je stále připojena
26 kD	- částečně začíná u aminokyseliny 1 vedoucího peptidu CHH = nebyla odstraněna pre-pro-sekvence - částečně začíná u aminokyseliny 9 vedoucího peptidu CHH = produkt alternativní translace začínající u druhého kodónu AUG
24 kD	- částečně začíná u aminokyseliny 1 vedoucího peptidu CHH = nebyla odstraněna pre-pro-sekvence - částečně začíná u aminokyseliny 9 vedoucího peptidu CHH = produkt alternativní translace začínající u druhého kodónu AUG

Jak již bylo výše uvedeno, Western-bloty z buněčných lyzátů odhalily vzory E1 specifických proteinových pruhů, naznačující, že byl proveden vysoký stupeň správného odstranění vedoucího peptidu CL. Toto je překvapující, neboť vedoucí peptid není odvozen z kvasinek. Sekvenování aminokyselin Edmanovým odbouráváním materiálu, který byl solubilizován s GuHCl a purifikován na Ni-IDA, vskutku potvrdilo, že 84 % proteinů E1 je správně štěpeno a materiál je v podstatě prostý od degradačních produktů. Ještě 16 % neupraveného materiálu je přítomno, avšak vzhledem k tomu, že tento materiál není glykosylován, může být snadno ze směsi odstraněn, čímž je umožněno specifické obohacení správně štěpeného a glykosylovaného E1. Metodou takového obohacení může být afinitní chromatografie na

lektinu, jiné alternativy jsou rovněž uvedeny v Příkladu 19. V jiném provedení může být použito materiálu o vyšší hydrofobicitě pro výběr a optimalizaci jiných obohacovacích postupů. Správné odstranění vedoucího peptidu CL z proteinu CL-E1-H6 bylo dále potvrzeno hmotovou spektroskopií, která také potvrdila, že až 4 z 5 N-glykosylačních míst genotypu 1b Els může být obsazeno, zatímco sekvence NNSS (aminokyseliny 233 až 236; SEQ ID NO: 73) je považována za osamělé N-glykosylační místo.

PŘÍKLAD 17

PURIFIKACE A BIOCHEMICKÁ CHARAKTERIZACE PROTEINU HCV E2, EXPRIMOVANÉM V *HANSENULA POLYMORPHA* Z KONSTRUKTU KÓDUJÍCÍM CL-E2-H6

Byla analyzována účinnost odstranění vedoucího peptidu CL z proteinu CL-E2-VIEGR-H6 (dále v tomto příkladu označován jako „CL-E2-H6“), exprimovaného v *Hansenula polymorpha*. Vzhledem k tomu, že HCV E2s (aminokyseliny 383-673) byl exprimován jako his-značený (his-tagged) protein, byla prováděna rychlá a účinná purifikace exprimovaného proteinu na Ni-IDA po GuHCl solubilizaci sebraných buněk. Stručně řečeno, buněčné pelety byly resuspendovány ve 30 mM fosfátu, 6 M GuHCl, pH 7,2 (9 ml pufru/g buněk). Protein byl sulfonován přes noc při teplotě místnosti v přítomnosti 320 mM (4 % hmotn./objem) siřičitanu sodného a 65 mM (2 % hmotn./objem) tetrathionátu sodného. Lyzát byl po jednom cyklu zmražení-roztátí vyčištěn centrifugací (10 000 g, 30 minut, 4°C). Byly přidány Empigen BB (Albright & Wilson) a imidazol na konečnou koncentraci 1 % (hmotn./objem) a 20 mM, v uvedeném pořadí. Všechny další chromatografické kroky byly prováděny na zařízení Akta FPLC workstation (Pharmacia). Vzorek byl filtrován přes membránu o velikosti

pórů 0,22 μm (celulózo acetát) a nanesen na sloupec Ni-IDA (chelatační Sepharosa FF nasycená s Ni^{2+} , Pharmacia), který byl ekvilibrován s 50 mM fosfátu, 6 M GuHCl , 1 % Empigen BB, pH 7,2 (pufr A) s doplňkem 20 mM imidazolu. Sloupec byl postupně promyt s pufrům A obsahujícím 20 mM a 50 mM imidazolu, v uvedeném pořadí, dokud nedosáhla absorbance při 280 nm základní úrovně. His-značené produkty byly eluovány aplikací pufru D, 50 mM fosfát, 6 M GuHCl , 0,2 % Empigen BB (pH 7,2), 200 mM imidazolu. Purifikované materiály byly analyzovány s SDS-PAGE a Western blottingem s použitím specifické monoklonální protilátky namířené proti E2(IGH212) (Obrázek 41). Protein E2-H6 purifikovaný přes IMAC byl rovněž podroben N-terminálnímu sekvenování Edmanovým odbouráváním. Proto bylo na proteiny působeno N-glykosidázou F (Roche) (0,2 U/ μg E2, 1 hodina inkubace při 37° C v PBS/3 % Empigen BB), nebo byly ponechány bez jakéhokoliv působení. Glykosylované a deglykosylované proteiny E2-H6 byly podrobeny SDS-PAGE a naneseny (blotovány) na membránu PVDF pro stanovení sekvence aminokyselin (analýza byla prováděna na proteinovém sekvenátoru PROCISE™ 492, Applied Biosystems). Vzhledem k tomu, že v tomto stupni byly metodou SDS-PAGE zjištěny nějaké produkty degradace, byla prováděna další frakcionace pomocí gelové chromatografie. K tomu byl Ni-IDA eluát koncentrován ultrafiltrací (MWCO 10 kDa, centriplus, Amicon, Millipore) a nanesen na Superdex G200 (Pharmacia) v PBS, 1 % Empigen BB. Eluční frakce, obsahující zejména intaktní produkty příbuzné s E2s se zjevnou molekulovou hmotností M_r mezi ~30 kD a ~70 kDa, stanovenou migrací na SDS-PAGE, byly spojeny a případně alkylovány (inkubací s 5 mM DTT po dobu 30 minut při 37° C, následovanou inkubací s 20 mM jodacetamidem po dobu 30 minut při 37° C). Možná přítomnost degradačních produktů po purifikaci IMAC může

tak být překonána další frakcionací intaktního produktu s použitím gelové chromatografie. Bylo dosaženo neočekávaně dobrého výsledku. S využitím N-terminálního sekvenování je možné stanovit množství produktu E2, ze kterého byl odstraněn vedoucí peptid CL. Celkové množství proteinových produktů je počítáno v pmol proteinu podle intenzity píků získaných v Edmanově odbourávání. Následně je pro každý specifický protein (např. pro každý „detekovaný N-konec“) stanoveno % mol versus celkové množství. V tomto pokuse byl detekován pouze správný N-konec proteinu E2-H6 a jiné varianty E2-H6 postrádající aminokyseliny z proteinu E2, nebo obsahující N-terminální aminokyseliny, jež nejsou součástí proteinu E2, nebyly přítomny. Lze shrnout, že protein E2-H6, exprimovaný v *H. polymorpha* jako protein CL-E2-H6, byl izolován bez jakékoliv další úpravy *in vitro* jako z > 95 % správně štěpený protein. Toto zjištění je v příkrém protikladu s přesností odstranění vedoucího peptidu s *H. polymorpha* při úpravě proteinu α MF-E2-H6 na protein E2-H6, u které bylo stanoveno, že se vyskytuje u 25 % izolovaných proteinů (viz Tabulka 3).

PŘÍKLAD 18

PURIFIKACE A BIOCHEMICKÁ CHARAKTERIZACE PROTEINU HCV E1, EXPRIMOVANÉM V *HANSENULA POLYMORPHA* Z KONSTRUKTU KÓDUJÍCÍM CL-H6-K-E1 A *IN VITRO* ÚPRAVA PROTEINŮ OBSAHUJÍCÍCH H6

Byla analyzována účinnost odstranění vedoucího peptidu CL z proteinu CL-H6-K-E1, exprimovaného v *Hansenula polymorpha*, stejně jako účinnost následné úpravy *in vitro* tak, aby byl odstraněn H6 (his-tag)-adaptorový peptid a místo úpravy Endo Lys-C. Vzhledem k tomu, že HCV E1s (aminokyseliny 192-326) byl exprimován jako protein značený s his-K značkou na N-konci (his-K-tagged), tj. CL-H6-K-E1,

mohla být provedena rychlá a účinná purifikace tak, jak je popsáno v Příkladu 17. Eluční profil z IMAC-chromatografické purifikace proteinů H6-K-E1 (a případných residuálních CL-H6-K-E1 proteinů) je znázorněn na Obrázku 42. Po SDS-PAGE a barvení gelu stříbrem a analýze Western-blotting, používající monoklonální protilátku namířenou proti E1 (IGH201) (Obrázek 43), byly eluční frakce (63-69) obsahující rekombinantní produkty Els, spojeny („IMAC pool“) a podrobeny přes noc působení endoproteinázy Lys-C (Roche) (poměr enzym/substrát 1/50 (hmotn./hmotn.), 37° C)) tak, aby bylo odstraněno fúzované prodloužení H6-K. Odstranění neupravených fúzních produktů bylo provedeno krokem negativní IMAC chromatografie na sloupci Ni-IDA, ve které jsou proteiny upravené s endo-Lys-C sbírány do protékající frakce. K tomu byl vzorek proteinu štěpený s endoproteinázou Lys-C nanesen na sloupec Ni-IDA po 10násobném ředění s 10 mM NaH₂PO₄·3H₂O, 1 % (objem/objem), Empigen B, pH 7,2 (pufr B), s následným promýváním s pufr B, dokud absorbance při 280 nm nedosáhla základní úrovně. Protékající proud byl odebírán do různých frakcí (1-40), které byly screenovány na přítomnost produktů Els (Obrázek 44). Frakce (7-28), obsahující intaktní E1, ze kterého bylo N-koncové prodloužení H6-K (a eventuálně residuální CL-H6-K) odstraněno (se zjevnou molekulovou hmotností Mr mezi ~ 15 kDa a ~ 30 kDa, stanovenou SDS-PAGE po barvení stříbrem nebo analýzou Western blotting s použitím specifické monoklonální protilátky namířené proti E1 (IGH201)), byly spojeny a případně alkylovány (inkubací s 5 mM DTT po dobu 30 minut při 37° C, s následnou inkubací s 20 mM jodacetamidem po dobu 30 minut při 37° C).

Tento materiál byl podroben N-terminálnímu sekvenování (Edmanovo odbourávání). Proto bylo na proteinové vzorky

působeno N-glykosidázou F (Roche) (0,2 U/ μ g E1, 1 hodina inkubace při 37° C v PBS/3 % Empigen BB), nebo byly ponechány bez jakéhokoliv působení. Glykosylované a deglykosylované proteiny E1 byly odděleny s SDS-PAGE a naneseny (blotovány) na membránu PVDF pro další analýzu Edmanovým odbouráváním (analýza byla prováděna na proteinovém sekvenátoru PROCISE™ 492, Applied Biosystems). Na základě N-terminálního sekvenování mohlo být stanoveno množství správně upraveného produktu E1 (úprava zahrnuje správné odštěpení sekvence H6-K). Celkové množství proteinových produktů je vypočteno v pmol proteinu podle intenzity píků získaných v Edmanově odbourávání. Následně je pro každý specifický protein (např. pro každý „detekovaný N-konec“) stanoveno % mol versus celkové množství. V tomto pokuse byl detekován pouze správný N-konec proteinu E1 a nikoliv N-konce jiných variant H6-K-E1. Pak bylo stanoveno, že úprava proteinu H6-K-E1 (případně residuálního CL-H6-K-E1) *in vitro* s Endo-Lys-C na protein E1 se vyskytuje s přesností větší než 95 %.

PŘÍKLAD 19

SPECIFICKÉ ODSTRANĚNÍ FOREM HCV E1 S „LOW-GLYKOSYLACÍ“ POMOCÍ HEPARINU

K nalezení specifických purifikačních kroků pro obalové proteiny HCV z buněk kvasinek byla stanovena jejich vazba s heparinem. Je známo, že heparin se váže s řadou virů, a proto již bylo doporučeno stanovení vazby obalu HCV (Garson, J. A. et al. 1999). Aby mohla být analyzována tato potenciální vazba, byl heparin biotinylován a byla analyzována interakce s HCV E1 na mikrotitračních destičkách potažených s buďto sulfonovaným HCV E1 z *H. polymorpha*, alkylovaným HCV E1 z *H. polymorpha* (oba

produkované tak, jak je popsáno v Příkladu 16), nebo s alkylovaným HCV E1 z kultury savčích buněk, transfekovaných s vektorem pro expresi ve viru vaccinia. Překvapivě silná vazba mohla být pozorována pouze se sulfonovaným HCV E1 z *H. polymorpha*, zatímco vazba s HCV E1 z kultury savčích buněk byla zcela nepřítomna. S použitím metody Western-blotting bylo možné prokázat, že tato vazba byla specifická pro pruhy s nižší molekulovou hmotností v proteinové směsi HCV E1 (Obrázek 45), což koresponduje s nízkou glykosylovanou podstatou HCV E1s. Obrázek 45 rovněž ukazuje, že sulfonace není nezbytná pro vazbu s heparinem, neboť po odstranění této sulfonace je stále pozorována vazba u E1 s nízkou molekulovou hmotností (linie 4). Jinak řečeno, alkylace podstatně redukuje tuto vazbu, nicméně, toto může být způsobeno specifickým alkylačním činidlem (jodacetamidem), použitým v daném příkladu. Tento náález dále demonstroval průmyslovou využitelnost obalových expresivních kazet pro kvasinky CL-HCV, neboť je možné specificky obohatit preparáty HCV E1 ve smyslu získání preparátů s proteiny HCV E1 s vyšším stupněm glykosylace (například tím, že je obsazeno více glykosylačních míst).

PŘÍKLAD 20

TVORBA A ANALÝZA ČÁSTIC PODOBNÝCH VIRU (VIRUS-LIKE PARTICLES, VLPs)

Přeměna obalových proteinů HCV E1 a E2, exprimovaných v *H. polymorpha* (Příklady 16 až 18) na VLPs byla prováděna v podstatě tak, jak popisují Depla et al. ve W099/67285 a Bosman et al. ve W001/30815. Stručně řečeno, po kultivaci transformovaných buněk *H. polymorpha*, během které jsou exprimovány obalové proteiny HCV, byly buňky sklizeny, lyzovány v GuHCl a sulfonovány tak, jak je popsáno

v Příkladu 17. Proteiny značené His-tag byly následně purifikovány s IMAC a koncentrovány s ultrafiltrací tak, jak je popsáno v Příkladu 17.

Tvorba VLP z obalových proteinů HCV se sulfonovanými Cys-thiolovými skupinami

Koncentrované obalové proteiny HCV sulfonované během izolačního postupu nebyly podrobeny redukci a byly naneseny na sloupec gelové chromatografie (Superdex G200, Pharmacia) ekvilibrovaný s PBS, 1 % (objem/objem) Empigen. Eluované frakce byly analyzovány s SDS-PAGE a Western blottingem. Frakce s relativní molekulovou hmotností $M_r \sim 29-15$ kD (stanovenou na základě migrace v SDS-PAGE) byly spojeny, zakoncentrovány a naneseny na Superdex G200, ekvilibrovaný s PBS, 3 % (hmotn./objem) betain, k posílení tvorby částic podobných viru (virus like particle, VLP). Frakce byly spojeny, zakoncentrovány a odsoleny do PBS, 0,5% (hmotn./objem) betain.

Tvorba VLP z obalových proteinů HCV s ireversibilně modifikovanými Cys-thiolovými skupinami

Koncentrované obalové proteiny HCV sulfonované během izolačního postupu byly podrobeny redukčnímu působení (inkubace v přítomnosti 5 mM DTT v PBS) k přeměně sulfonovaných Cys-thiolových skupin na volné Cys-thiolové skupiny. Ireversibilní modifikace Cys-thiolových skupin byla provedena (i) inkubací po dobu 30 minut v přítomnosti 20 mM jodacetamidu, nebo (ii) inkubací po dobu 30 minut v přítomnosti 5 mM N-ethylmaleimidu (NEM) a 15 mM biotin-N-ethylmaleimidu. Následně byly proteiny naneseny na sloupec gelové chromatografie (Superdex G200, Pharmacia)

ekvilibrovaný s PBS, 1 % (objem/objem) Empigen v případě blokování s jodacetamidem, nebo s PBS, 0,2 % CHAPS v případě blokování s NEM a biotin-NEM. Eluované frakce byly analyzovány s SDS-PAGE a Western blottingem. Frakce s relativní molekulovou hmotností $M_r \sim 29 - \sim 15$ kD (stanovenou na základě migrace v SDS-PAGE) byly spojeny, zakoncentrovány a pro posílení tvorby částic podobných viru byly nanесeny na sloupec Superdex G200 ekvilibrovaný s PBS, 3% (hmotn./objem) betain. Frakce byly spojeny, zakoncentrovány a odsoleny do PBS, 0,5% (hmotn./objem) betain v případě blokování s jodacetamidem, nebo s PBS, 0,05 % CHAPS v případě blokování s NEM a biotin-NEM.

Tvorba VLP z obalových proteinů HCV s reversibilně modifikovanými Cys-thiolovými skupinami

Koncentrované obalové proteiny HCV sulfonované během izolačního postupu byly podrobeny redukčnímu působení (inkubace v přítomnosti 5 mM DTT v PBS) k přeměně sulfonovaných Cys-thiolových skupin na volné Cys-thiolové skupiny. Reversibilní modifikace Cys-thiolových skupin byla provedena inkubací po dobu 30 minut v přítomnosti dithiodipyridinu (DTDP), dithiokarbamátu (DTC) nebo cysteinu. Následně byly proteiny neneseny na sloupec gelové chromatografie (Superdex G200, Pharmacia) ekvilibrovaný s PBS, 1 % (objem/objem) Empigen. Eluované frakce byly analyzovány s SDS-PAGE a Western blottingem. Frakce s relativní molekulovou hmotností $\sim 29 - \sim 15$ kD (stanovenou na základě migrace v SDS-PAGE) byly spojeny, zakoncentrovány a neneseny na Superdex G200, ekvilibrovaný s PBS, 3 % (hmotn./objem) betain, k posílení tvorby částic podobných viru (VLP). Frakce byly spojeny, zakoncentrovány a odsoleny do PBS, 0,5% (hmotn./objem) betain.

Eluční profily z gelové chromatografie v PBS, 3 % (hmotn./objem) betain pro VLPs získané z E2-H6, exprimovaného v *H. polymorpha* jsou uvedeny na Obrázku 46 (sulfonovaný protein) a Obrázku 47 (z protein alkylovaného s jodacetamidem).

Eluční profily z gelové chromatografie v PBS, 3 % (hmotn./objem) betain pro VLPs získané z E1, exprimovaného v *H. polymorpha*, jsou uvedeny na Obrázku 48 (sulfonovaný protein) a Obrázku 49 (z proteinu alkylovaného s jodacetamidem). Výsledné VLPs byly analyzovány s SDS-PAGE a Western blottingem tak, jak uvádí Obrázek 50.

Analýza velikosti VLPs, vytvořených z obalových protein HCV exprimovaných v *H. polymorpha*

Velikost částice VLP byla stanovena metodou Dynamic Light Scattering. V těchto pokusech s použitím rozptylu světla, byl použit analyzátor velikosti částic (Particle-size analyzer, Model Zetasizer 1000 HS, Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcester UK), který byl řízen softwarem pro fotonovou korelační spektroskopií (photon correlation spectroscopy, PCS). Fotonová korelační spektroskopie nebo dynamický rozptyl světla (dynamic light scattering, DLS) je optická metoda, která měří Brownův pohyb a uvádí ho do vztahu k velikosti částic. Světlo u kontinuálního, viditelného laserového paprsku směřuje přes soubor makromolekul nebo částic v suspenzi, které se pohybují Brownovým pohybem. Některý z laserových světelných paprsků je částicemi rozptýlen a tento rozptýlený světelný paprsek je měřen s fotonásobičem. Fluktuace v intenzitě rozptýleného světla jsou přeměňovány na elektrické impulsy,

které jsou vkládány do korelátoru. Korelátor generuje autokorelační funkci, která se přenáší na počítač, ve kterém je prováděna příslušná analýza dat. Použitý laser byl 10 mW monochromatický koherentní He-Ne laser s fixovanou vlnovou délkou 633 nm. Pro každý vzorek bylo provedeno tři až šest následných měření. Výsledky těchto pokusů jsou shrnuty v Tabulce 5.

Tabulka 5. Výsledky analýzy dynamického světelného rozptylu uvedených kompozic VLP, které byly připraveny z obalových Protein HCV exprimovaných v *H. polymorpha*. Velikost částic VLP je uvedena jako střední hodnota průměru částic.

Modifikace Cys-thiolových skupin	E1-H6	E2-VIEGR-H6	E1
sulfonace	25 - 45 nm	20 nm	20 - 26 nm
alkylace (jodacetamidem)	23 - 56 nm	20 - 56 nm	21 - 25 nm

Zjištění, že sulfonovaný HCV E1, odvozený z *H. polymorpha*, ještě vytváří částice o velikosti ve shodném rozmezí velikostí, jako alkylovaný HCV E1 z *Hansenula*, je překvapující. Takovýto účinek nebyl očekáván, neboť bohatá síť zvýšení negativních nábojů (až 8 Cys-thiolových skupin může být modifikováno v HCV E1), jako důsledek sulfonace, může indukovat iontové odpuzování mezi podjednotkami. Jiná činidla reversibilně modifikující cystein, která byla testována, rovněž umožnila tvorbu částic z HCV E1 připraveného tímto způsobem, nicméně, bylo prokázáno, že jsou tyto částice méně stabilní než částice ze sulfonovaného materiálu, který vzniká z agregace na základě disulfidových můstků v HCV E1. Pro použití těchto jiných

reversibilních blokátorů je nezbytná další optimalizace podmínek.

PŘÍKLAD 21

ANTIGENNÍ EKVIVALENCE HCV E1-H6, PRODUKOVANÉHO V *HANSENULA*, A HCV E1, PRODUKOVANÉHO V SAVČÍCH BUŇKÁCH INFIKOVANÝCH VIREM VACCINIA

Reaktivita HCV E1-H6, produkovaného v *Hansenula*, se sérem chronických přenašečů HCV byla porovnána s reaktivitou HCV E1, produkovaného savčími buňkami infikovanými s HCV-rekombinantním virem vaccinia tak, jak bylo popsáno v Depla et al. ve WO99/67285. Oba testované preparáty HCV-E1 sestávaly z VLPs, ve kterých byly proteiny HCV E1 alkylovány s NEM a biotin-NEM. Reaktivita obou preparátů VLP s HCV E1 se sérem od chronických přenašečů HCV byla stanovována metodou ELISA. Výsledky jsou souhrnně uvedeny v Tabulce 6. Jak lze odvodit z Tabulky 6, nebyly zaznamenány žádné rozdíly v reaktivitě mezi HCV E1, exprimovaným v savčích buňkách infikovaných HCV-rekombinantním virem vaccinia, a HCV E1, exprimovaným v *H. polymorpha*.

Tabulka 6. Antigenita E1, produkovaného v savčí buněčné kultuře, nebo produkovaného v *H. polymorpha*, byla hodnocena na panelu sér z lidských chronických přenašečů HCV. Pro tento účel byl biotinylovaný E1 navázán na destičky ELISA potažené streptavidinem. Pak byla přidána lidská séra ve zředění 1/20 a byly detekována imunoglobuliny ze sér navázané k E1 s pomocí králičí specifické sekundární protilátky proti lidskému IgG-Fc značené peroxidázou. Výsledky jsou vyjádřeny jako hodnoty OD. Průměrné hodnoty jsou průměry hodnot OD ze všech testovaných vzorků sér.

Sérum	<i>Hansenula</i>	savčí	Sérum	<i>Hansenula</i>	Savčí
17766	1,218	1,159	55337	1,591	1,416
17767	1,513	1,363	55348	1,392	1,261
17777	0,806	0,626	55340	1,202	0,959
17784	1,592	1,527	55342	1,599	1,477
17785	1,508	1,439	55345	1,266	1,428
17794	1,724	1,597	55349	1,329	1,137
17798	1,132	0,989	55350	1,486	1,422
17801	1,636	1,504	55352	0,722	1,329
17805	1,053	0,944	55353	1,065	1,157
17810	1,134	0,999	55354	1,118	1,092
17819	1,404	1,24	55355	0,754	0,677
17820	1,308	1,4	55362	1,43	1,349
17826	1,163	1,009	55365	1,612	1,608
17827	1,668	1,652	55368	0,972	0,959
17849	1,595	1,317	55369	1,506	1,377
55333	1,217	1,168	průměr	1,313	1,245

PŘÍKLAD 22

IMUNOGENNÍ EKVIVALENCE HCV E1-H6, PRODUKOVANÉHO

V *HANSENULA*, A HCV E1, PRODUKOVANÉHO V SAVČÍCH BUŇKÁCH
INFIKOVANÝCH VIREM VACCINIA

Imunogenita HCV E1-H6, produkovaného v *Hansenula*, byla porovnána s imunogenitou HCV E1, produkovaného v savčích buňkách infikovaných HCV-rekombinantním virem vaccinia tak, jak popsali Depla et al. ve W099/67285. Oba testované preparáty HCV-E1 sestávaly z VLPs, přičemž proteiny HCV E1 byly alkylovány s jodacetamidem. Oba preparáty VLP byly upraveny s kamencem a injikovány myším Balb/c (3 intramuskulární/subkutánní injekce s třítýdenním intervalem mezi každou z injekcí a každá z injekcí obsahovala 5 µg E1

ve 125 μ l obsahujících 0,13% Alhydrogel, Superfos, Denmark). Krev byla myším odebrána (vykrvácením) 10 dnů po třetí imunizaci.

Výsledky těchto pokusů jsou znázorněny na Obrázku 51. V horní části Obrázku 51 byly stanovovány protilátky vzniklé po imunizaci s VLPs z E1, produkovaného v savčích buňkách. Titry protilátek byly stanovovány metodou ELISA (viz Příklad 21), přičemž jak E1, produkovaný v savčích buňkách („M“), tak E1, produkovaný v *Hansenula* („H“), byly přímo nanесeny na pevný nosič ELISA a destičky ELISA byly blokovány s kaseinem. V dolní části Obrázku 51 byly stanovovány protilátky vzniklé po imunizaci s VLPs z E1, produkovaného v *Hansenula*. Titry protilátek byly stanovovány metodou ELISA (viz Příklad 21), přičemž jak E1, produkovaný v savčích buňkách („M“), tak E1, produkovaný v *Hansenula* („H“), byly přímo nanесeny na pevný nosič ELISA a destičky ELISA byly blokovány s kaseinem.

Titry protilátek byly stanovovány jako konečné titry (end point titers). Konečný titr je určen jako ředění séra vedoucí k OD (stanovené s ELISA) rovné dvojnásobku průměrné hodnoty pozadí v dané zkoušce.

Obrázek 51 uvádí, že nebyly pozorovány žádné signifikantní rozdíly mezi imunogenními vlastnostmi obou kompozic obsahujících E1 a to, že stanovené titry protilátek jsou nezávislé na antigenu, použitém v ELISA zkoušce k provedení titrace ke konečným titrům.

HCV E1 získaný z kvasínek indukoval po vakcinaci obrannou odpověď podobnou obranné reakci, které bylo dosaženo po vakcinaci s alkylovaným HCV E1, získaným ze

savčí buněčné kultury. Posledně jmenovaná odpověď byla schopna zabránit chronickému vývoji HCV po akutní infekci.

PŘÍKLAD 23

ANTIGENNÍ A IMUNOGENNÍ PROFIL HCV E1-H6, PRODUKOVANÉHO V *HANSENULA*, KTERÝ JE SULFONOVÁN

Reaktivita HCV E1-H6, produkovaného v *Hansenula*, se sérem od chronických přenašečů HCV byla porovnávána s reaktivitou HCV E1, produkovaného v savčích buňkách infikovaných s HCV-rekombinantním virem vaccinia tak, jak popsali Depla et al. ve W099/67285. Oba testované preparáty HCV-E1 sestávaly z VLPs, přičemž proteiny HCV-E1, produkované v *Hansenula*, byly sulfonovány a proteiny HCV E1, produkované v savčích buňkách, byly alkylovány. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 7. Ačkoliv celková (průměrná) reaktivita byla identická, u jednotlivých sér byly zjištěny určité významné rozdíly. Toto vede k závěru, že sulfonovaný materiál poskytuje alespoň některé ze svých epitopů způsobem odlišným od alkylovaného HCV E1.

Imunogenita HCV E1-H6, produkovaného v *Hansenula*, který byl sulfonován, byla porovnávána s imunogenitou HCV E1-H6, produkovaného v *Hansenula*, který byl alkylován. Oba testované preparáty HCV-E1 obsahovaly VLPs. Oba preparáty VLP byly upraveny s kamencem a injikovány myším Balb/c (3 intramuskulární/subkutánní injekce s třítýdenním intervalem mezi každou z injekcí a každá z injekcí obsahovala 5 µg E1 ve 125 µl obsahujících 0,13% Alhydrogel, Superfos, Denmark). Krev byla myším odebrána (vykrvácením) 10 dnů po třetí imunizaci.

Titry protilátek byly stanovovány podobně, jak je popsáno v Příkladu 22. Imunizace se sulfonovaným materiálem vedla překvapivě k vyšším titrům protilátek, bez ohledu na antigen, který byl použit ve zkoušce ELISA k určení těchto titrů (Obrázek 51; horní panel: titrace protilátek vyvolaných proti alkylovanému E1 ; dolní panel: titrace protilátek vyvolaných proti sulfonovanému E1; „A”: alkylovaný E1 nanesený na destičku ELISA; „S”: sulfonovaný E1 nanesený na destičku ELISA). Nicméně jsou v tomto pokuse jednotlivé titry odlišné v závislosti na použitém antigenu, což potvrzuje zjištění uvedená pro séra od pacientů s HCV. Proto HCV E1, ve kterém jsou thiolové skupiny cysteinu modifikovány reversibilním způsobem, mohou být více imunogenní, a tak mají vyšší účinnost jako vakcína chránící proti HCV (chronické infekci). Kromě toho se s menší pravděpodobností objevuje indukce odpovědi k neo-epitopům, vyvolaná ireversibilním blokováním.

Tabulka 7. Antigenita alkylovaného E1 (produkovaného v savčí buněčné kultuře) nebo sulfonovaného E1-H6 (produkovaného v *H. polymorpha*) byla určena na panelu sér od lidských chronických přenašečů HCV („séra pacientů“) a na panelu kontrolních sér („krevní donorová séra“) Pro tento účel byl E1 navázán na destičky ELISA a poté byly destičky dále saturovány s kaseinem. Byla přidána lidská séra v ředění 1/20 a navázané imunoglobuliny byly detekovány se sekundární králičí protilátkou proti lidskému IgG-Fc, značenou s peroxidázou. Výsledky jsou vyjádřeny jako hodnoty OD. Průměrné hodnoty jsou průměry hodnot OD ze všech testovaných vzorků sér.

séra pacientů			krevní donorová séra		
Číslo séra	Hansenula	savčí	Číslo séra	Hansenula	savčí
17766	0,646	0,333	F500	0,055	0,054
17777	0,46	0,447	F504	0,05	0,05
17785	0,74	0,417	F508	0,05	0,054
17794	1,446	1,487	F510	0,05	0,058
17801	0,71	0,902	F511	0,05	0,051
17819	0,312	0,539	F512	0,051	0,057
17827	1,596	1,576	F513	0,051	0,052
17849	0,586	0,964	F527	0,057	0,054
55333	0,69	0,534	průměr	0,052	0,054
55338	0,461	0,233			
55340	0,106	0,084			
55345	1,474	1,258			
55352	1,008	0,68			
55355	0,453	0,444			
55362	0,362	0,717			
55369	0,24	0,452			
průměr	0,706	0,691			

PŘÍKLAD 24

IDENTICKÁ ANTIGENNÍ REAKTIVITA HCV E1-H6, PRODUKOVANÉHO V HANSENULA, A HCV E1, PRODUKOVANÉHO V SAVČÍCH BUŇKÁCH INFIKOVANÝCH VIREM VACCINIA, SE SÉRY OD VAKCINOVANÝCH ŠIMPANZŮ

Byla porovnávána reaktivita E1, produkovaného savčími buňkami infikovanými HCV-rekombinantním virem vaccinia, a E1-H6, produkovaného v Hansenula, (oba alkylované) se sérem z vakcinovaných šimpanzů a s monoklonálními protilátkami. Proto byly uvedené proteiny E1 naneseny přímo na destičky ELISA a následovala saturace destiček s kaseinem. Konečné

titry protilátek vázajících se s proteiny E1 navázanými na destičky ELISA byly stanoveny pro sérum šimpanzů a pro specifické myší monoklonální protilátky, přičemž všechny byly získány imunizací s E1, produkovaným v savčích buňkách. Stanovení konečných titrů bylo provedeno tak, jak je popsáno v Příkladu 22. Použitými myšími monoklonálními látkami byly IGH201 (viz Příklad 15), IGH198 (IGH198 = 23C12 v Maertens et al. ve W096/04385), IGH203 (IGH203 = 15G6 v Maertens et al. ve W096/04385) a IGH202 (IGH202 = 3F3 v Maertens et al. ve W099/50301).

Jak je možné odvodit z Obrázku 53, reaktivity 7 odlišných šimpanzích sér jsou identické, jestliže jsou testovány s proteinem E1, produkovaným jak v *Hansenula*, tak v savčích buňkách. Reaktivity monoklonálních protilátek proti HCV E1 jsou rovněž téměř shodné. Dva ze šimpanzů (Yoran a Marti) byli zahrnuti v profylaktické vakcinační studii a byli schopni vyloučit akutní infekci po imunizaci, zatímco kontrolní zvíře infekci nevyloučilo. Pět dalších šimpanzů (Ton, Phil, Marcel, Peggy, Femma) bylo zahrnuto do terapeutické vakcinační studie a po imunizacích s HCV E1 vykázalo snížení poškození jater, měřené s ALT v séru a/nebo indexem histologické aktivity jaterní biopsie.

Výsledky získané v tomto pokuse jsou zřetelně odlišné od nálezů Mustilliho a spolupracovníků (Mustilli, A. C. et al. 1999), kteří exprimovali protein HCV E2 jak v *Saccharomyces cerevisiae*, tak v *Kluyveromyces lactis*. Purifikovaný E2, produkovaný v kvasince, byl nicméně odlišný od HCV E2, produkovaného v savčích (CHO) buňkách v tom, že u něho byla pozorována nižší reaktivita se sérem šimpanzů imunizovaných s HCV E2, produkovaným savčími

buňkami, zatímco reaktivita s monoklonálními protilátkami byla vyšší u HCV E2 produkovaného kvasinkami.

PŘÍKLAD 25

STANOVENÍ GLYKOSYLAČNÍHO PROFILU HCV E1 ELEKTROFORÉZOU S FLUORESCENČNÍM ZNAČENÍM CUKRU (FLUOROPHORE-ASSISTED CARBOHYDRATE ELECTROPHORESIS, FACE)

Byly porovnávány glykosylační profily pro HCV E1, produkovaný v *Hansenula*, a pro HCV E1, produkovaný savčími buňkami infikovanými HCV-rekombinantním virem vaccinia. tak, jak bylo popsáno v Depla et al. ve W099/67285. Porovnání bylo provedeno metodou elektroforézou s fluorescenčním značením cukrů (fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis, FACE). Za tímto účelem byly oligosacharidy uvolněny z E1s, produkovaných v savčích buňkách nebo v *Hansenula*, s peptid-N-glykosidázou (PNGázou) (peptide-N-glycosidase, PNGase F) a značeny s ANTS (proteiny E1 byly před štěpením s PNGázou alkylovány s jodacetamidem). Oligosacharidy značené s ANTS byly separovány metodou PAGE na 21% polyakrylamidovém gelu při proudu 15 mA, 4° C po dobu 2-3 hodin. Z Obrázku 54 bylo dovozeno, že oligosacharidy na E1, produkovaném savčími buňkami, a oligosacharidy na E1-H6, produkovaném v *Hansenula*, migrují podobně jako oligomaltóza se stupněm polymerizace mezi 7 a 11 monosacharidy. Toto potvrzuje, že *Hansenula* expresivní systém překvapivě vede k proteinu E1, který není hyperglykosylován a který má řetězce cukrů o délce podobné řetězcům cukrů, jež jsou připojeny k proteinům E1, produkovaným v savčích buňkách.

PŘÍKLAD 26

STANOVENÍ SEKVENCE N-VÁZANÉHO OLIGOSACHARIDU, KTERÝ BYL ZÍSKÁN Z E1s, PRODUKOVANÝCH V *SACCHAROMYCES* A V *HANSENULA*, A Z E1s, PRODUKOVANÝCH SAVČÍMI BUŇKAMI INFIKOVANÝMI S HCV-REKOMBINANTNÍM VIREM *VACCINIA*

Proteiny E1s (225 µg), purifikované z kultury *Saccharomyces* nebo *Hansenula* (viz Příklady 15-16), nebo z kultury buněk RK13 infikovaných s HCV-rekombinantním virem *vaccinia* (viz Maertens et al. ve W096/04385) a přítomné v PBS, 0,5% betainu byly zředěny s inkubačním pufrem pro deglykosylaci (50 mM Na₂HPO₄, 0,75 % Nonidet P-40) na konečnou koncentraci 140 µg/ml. Hodnota pH roztoku byla upravena na pH 5,5 s koncentrovanou H₃PO₄. K uvedenému roztoku byly přidány 2 U PNGázy F (Peptid-N4-(acetyl-beta-glukosaminy)-asparagin amidáza z *Flavobacterium meningosepticum*; EC 3.5.1.52; získaná od Roche) a vzorek byl přes noc inkubován při 37° C. Po inkubaci přes noc bylo pH roztoku upraveno na pH 5,5 s koncentrovanou H₃PO₄. Proteiny a oligosacharidy byl následně precipitovány přidáním 4 objemů acetonu (při -20° C) a směsi byly inkubovány při -20° C po dobu 15 minut. Vzorky byly centrifugovány při 4° C, 13 000 otáčkách za minutu, po dobu 5 minut. Acetonový supernatant byl odstraněn a pelet byl po přidání 150 µl ledově chladného 60% methanolu inkubován při -20° C po dobu 1 hodiny. Methanolový supernatant obsahující uvolněné oligosacharidy byl odebrán a vysušen na rotační odparce (SpeedVac).

Vysušené glykany z E1, stejně jako referenční oligosacharidy (všechny od Glyko, Bicester, UK; viz Obrázek 55) Man-9 (11 monosacharidových jednotek), Man-8 (10 monosacharidových jednotek), Man-7 (9 monosacharidových

jednotek), Man-6 (8 monosacharidových jednotek) a Man-5 (7 monosacharidových jednotek) byly rozpuštěny v 5 μ l 2-aminobenzamidu (2-AB), jako značicímu reagens ($\pm$ 0,35 M 2-AB $\pm$ 1 M NaCNBH₃ ve 30 % HOAc/70 % DMSO) tak, že byly získány konečné koncentrace glykanů mezi 5 a 100 μ M. Roztok glykanů byl poté inkubován po dobu 2 hodin při 65° C. Po 30 minutách byl vzorek promíchán míchadlem Vortex. Po navázání byl přebytek 2-AB odstraněn následovně. Vzorek byl zředěn se 16 μ l purifikované vody (MilliQ) a nanesen na sloupec Sephadex G-10 (o průměru 1 cm, výšce 1,2cm, Amersham Biosciences; propojený se systémem VacElut system, Varian), který byl vysušen.

Značené oligosacharidy byly eluovány nanesením 2 x 100 μ l purifikované vody (MilliQ) na sloupec. Eluáty referenčních cukrů (Man-9, Man-8, Man-7 a Man-6) byly vysušeny a do analýzy HPLC uchovávány při -70° C. Eluáty ze vzorků Els, stejně jako referenční glykan Man-9, byly rozděleny do 4 očíslovaných zkumavek PCR a vysušeny. Byly provedeny reakce tak, jak jsou popsány v Tabulce 4, přičemž všechny reakce probíhaly přes noc při 37° C s výjimkou reakce ve zkumavce 3, která byla ukončena po 1 hodině. Použité koncentrace exoglykosidázových enzymů (všechny byly získány od Glyko, Bicester, UK) byly následující: α 1-2 manozidáza (*Aspergillus saitoi*): 2 mU/ml; α -manozidáza (Jack Bean): 50 U/ml; a β -manozidáza (*Helix pomatia*): 4 U/ml.

Tabulka 8. Přehled reakčních směsí pro stanovení sekvence oligosacharidů.

	Zkumavka 1	Zkumavka 2	Zkumavka 3	Zkumavka 4	Zkumavka 5
Els (pmol)	400	400	400	400	400
α 1-2 mano- zidáza (μ l)	-	4	-	-	-
α -mano- zidáza (μ l)	-	-	5	5	5
β -mano- zidáza (μ l)	-	-	-	-	4
inkubační pufr 4x (μ l)	5	5	5	5	5
MilliQ H ₂ O (μ l)	15	11	10	10	6

Obrázek 56 uvádí vyšší oligomanózu sestávající z 10 molekul manózy připojených k chitobióze. Každý terminální zbytek manózy je propojen vazbou α 1-3 k neterminálnímu zbytku manózy. Oligomanóza z Obrázku 56 je zcela rezistentní ke štěpení s exoglykosidázou α 1-2 manozidázou. Dlouhodobá inkubace (přes noc) oligomanózy podle Obrázku 56 s exoglykosidázou α -manozidázou vede ke štěpení všech α -vazeb (α 1-2, α 1-3, α 1-6), nikoliv však β -vazeb. Výsledným oligosacharidem je tak 4'- β -manosyl chitobióza. Tato molekula 4'- β -manosyl chitobiózy může být přeměněna na manózu a chitobiózu působením exoglykosidázy β -manozidázy. Podle specifikace dodavatele (Glyko) α -manozidáza zcela přeměňuje referenční oligosacharid Man-6 (viz Obrázek 55. D) na 4'- β -manosyl chitobiózu , jejíž další konverze na

manózu a chitobiózu s β -manozidázou byla rovněž popsána jako kompletní.

Obrázek 57 uvádí vyšší oligomanózu sestávající z 9 molekul manózy připojených k chitobióze. V této oligomanóze je jeden terminální zbytek manózy propojen α 1-2 vazbou s neterminálním zbytkem manózy. Po působení exoglykosidázy α 1-2 manozidázy je uvedená 1-2-vázaná manóza odstraněna. Po následném působení α manozidázy a β manozidázy je získán reakční produkt popsáný pro oligomanózu z Obrázku 56. Podle specifikace dodavatele (Glyko) je α 1-2 manozidáza schopna přeměnit referenční oligosacharidy Man-9 a Man-6 na Man-5 (viz Obrázek 55) s účinností $> 90 \%$.

Obrázek 58 uvádí referenční vyšší oligomanózu Man-9 sestávající z 9 molekul manózy připojených k chitobióze. V této oligomanóze jsou všechny terminální manózové zbytky připojeny vazbou α 1-2 k neterminálnímu zbytku manózy. Po působení exoglykosidázy α 1-2 manozidázy je tak Man-9 přeměněn na Man-5, a to podle specifikace výrobce z $> 90 \%$. Následné štěpení s α -manozidázou konvertuje Man-5 na 4'- β -mannosyl chitobiózu.

Obsahy odlišných reakčních zkumavek, jak jsou uvedeny v Tabulce 8, byly vysušeny v odstředivé vakuové odparce nebo v lyofilizačním zařízení a uchovávány při -70°C do analýzy HPLC. Před nanesením na sloupec byl každý vzorek (Els a referenční vzorek) rozpuštěn ve 25 μl vody a nanesen na sloupec TSK gel-Amide-80 (0,46 x 25 cm, Tosoh Biosep) propojený se zařízením Waters Alliance HPLC station.

Separace oligosacharidů byla prováděna při teplotě prostředí při průtoku 1,0 ml/min. Rozpouštědlo A sestávalo

z 0,1 % kyseliny octové v acetonitrilu a rozpouštědlo B sestávalo z 0,2 % kyselina octová-triethylamin ve vodě. Separace oligosacharidů značených s 2-AB byla prováděna s použitím izokratické eluce 28 % B na 5 objemů sloupce s následujícím lineárním zvýšením na 45 % B během patnácti objemů sloupce.

Referenční oligosacharid Man-6 je eluován v 53 ± 1 min, Man-7 je eluován v 59 ± 1 min, Man-8 v 67 ± 2 min a Man-9 v 70 ± 1 min; 4'- β -mannosyl chitobióza se eluuje v 10 ± 1 min a chitobióza v 6 ± 1 min (neznázorněno). Výsledky jsou ilustrovány pro reakční produkty z Man-9 po inkubaci přes noc bez exoglykosidáz (stopa 1 na chromatogramu uvedeném na Obrázku 63; pouze Man-9), po inkubaci přes noc s α 1-2 manozidázou (stopa 2 na chromatogramu uvedeném na Obrázku 63 ; směs Man-5 a Man-6) po 1 hodinové inkubaci, nebo po inkubaci přes noc s α manozidázou (stopy 3 a 4, v uvedeném pořadí, znázorněné na chromatogramu uvedeném na Obrázku 63; pouze 4'- β - mannosyl chitobióza), a po inkubaci přes noc s α - a β -manozidázou (stopa 5 chromatogramu na Obrázku 63; pouze chitobióza). Stopa 6 chromatogramu uvedeném na Obrázku 63 zobrazuje gradient použitého rozpouštědla.

Oligosacharidovými produkty z reakce Els, produkovaných v *Saccharomyces*, (získané po působení PNGázy F) bez působení exoglykosidáz byly převážně čtyři cukry, přítomné v eluátu z 59 ± 1 min (15%), 67 ± 1 min (45%), 70 ± 1 min (25%) a 75 ± 1 min (15%). Celkový obsah Man(8)GlcNAc(2) a Man(9)GlcNAc(2) v Els, produkovaných v *Saccharomyces*, byl ~ 65 %. V reakci s α 1-2 manozidázou vymizely pouze karbohydráty s retenčním časem 70 ± 1 min. Intenzita cukru s retenčním časem 75 ± 1 min zůstávala

stejná a intenzita cukru s retenčním časem 67 ± 1 min byla zvýšena. To znamená, že ne všechny terminální manózoové jednotky mají konfiguraci $\alpha(1-2)$. Po inkubaci přes noc s α manozidázou byly všechny řetězce cukrů redukovány na sloučeninu 4'- β -mannosyl chitobiózy. To znamená, že cukrem je vyšší manóza a všechny zbytky manózy, s výjimkou jediného, mají konfiguraci α . Redukce této 4'- β -mannosyl chitobiózoové sloučeniny na chitobiózu byla zřejmá po inkubaci přes noc s β manozidázou. Výsledné chromatogramy, znázorněné na Obrázku 64, byly získány za shodných podmínek, jaké byly popsány pro chromatogramy z Obrázku 63. Výsledky souhrnně uvádí Tabulka 9.

Shodné pokusy byly opakovány s Els, produkovanými v buňkách infikovaných virem vaccinia, a překvapivě ukázaly zcela odlišný výsledek. V reakci bez enzymů byla přítomna komplexní směs cukrů (viz Obrázek 65 a Tabulka 9). Celkový obsah monosacharidu (8)-GlcNAc(2) a monosacharidu (9)-GlcNAc(2) byl 37 %. Po reakci s α 1-2 manozidázou vymizely cukry s retenčními časy 70 ± 1 a 59 ± 1 min. Po inkubaci přes noc s α manozidázou přetrvávalo významné množství monosacharidu(6)-GlcNAc(2) vedle 4'- β -mannosyl chitobiózoového produktu. Toto je důkazem pro to, že jedna z oligosacharidových větví je k degradaci s α manozidázou rezistentní. Lze to vysvětlit přítomností 1 nebo 2 zbytků glukózy připojených k Man $\alpha(1-2)$ -ukončené větvi N-vázaného oligosacharidu. Domnělá struktura takovýchto oligosacharidů obsahujících glukózu je uvedena na Obrázku 62. Možné produkty reakce z oligosacharidů obsahujících glukózu jsou uvedeny v Tabulce 10. Vzhledem k tomu, že žádný oligosacharid ekvivalentní k Man-7 (např. oligosacharid sestávající z 9 monosacharidů) nepřetrvává po reakci s

α 1-2 manozidázou, jsou tyto glukózové zbytky s největší pravděpodobností připojen k B-větvi oligosacharidové struktury uvedené na Obrázku 62. Nicméně, nelze vyloučit, že jak A-, tak B-větev oligosacharidu na Obrázku 62 nejsou částečně ukončeny glukózou.

Redukce 4'- β -mannosyl chitobiózové sloučeniny na chitobiózu byla zřejmá po inkubaci přes noc s β manozidázou. Výsledné chromatogramy, znázorněné na Obrázku 65, byly získány za shodných podmínek, jaké byly popsány pro chromatogramy z Obrázku 63. Výsledky souhrnně uvádí Tabulka 9.

Shodné pokusy byly provedeny s Els, produkovanými v *Hansenula*, a překvapivě bylo zjištěno, že byl získán zcela odlišný výsledek. V reakci bez enzymů byly převážně přítomny dva cukry s retenčními časy 67 ± 2 min a 70 ± 1 min, které odpovídají Man-8 a Man-9, v uvedeném pořadí. Celkový obsah Man(8)-GlcNAc(2) a Man(9)-GlcNAc(2) v Els, produkovaných v *Hansenula*, byl ~ 90 %. Po reakci s α 1-2 manozidázou byly cukry redukovány převážně na Man-5 s retenčním časem 45 ± 1 min a na Man-6 s retenčním časem 53 ± 1 min. Po inkubaci přes noc Po inkubaci přes noc s α manozidázou byly všechny řetězce cukrů redukovány na sloučeninu 4'- β -mannosyl chitobiózy. To znamená, že cukrem je vyšší manóza a všechny zbytky manózy, s výjimkou jediného, mají konfiguraci α . Redukce této 4'- β -mannosyl chitobiózové sloučeniny na chitobiózu byla zřejmá po inkubaci přes noc s β manozidázou. Výsledné chromatogramy, znázorněné na Obrázku 66, byly získány za shodných podmínek, jaké byly popsány pro chromatogramy z Obrázků 63-65. Výsledky souhrnně uvádí Tabulka 9.

Tabulka 9. Oligomanózy vznikající ze štěpení oligomanóz získaných z Els, produkovaných v *Saccharomyces* („Sc“) a *Hansenula* („Hp“), stejně jako z Els, produkovaných savčími buňkami infikovanými HCV-rekombinantním virem vaccinia („Vac“). Jsou uvedeny odlišné oligomanózy s jejich chromatografickými retenčními časy („Rt“, v minutách) a procento dané oligomanózy vzhledem k celkovému obsahu oligomanóz (horní řádky), jakož i nejpravděpodobnější struktura pro každou zjištěnou oligomanózu, uvedená odkazem na některý z Obrázků 55-62. Oligomanózy s terminálními α 1-3 manózami jsou označeny symbolem „^o“. Oligomanózy s terminálními glukózami jsou označeny symbolem „*“, u některých odkazů poznámka „od 62*“ znamená, že tato struktura může být odvozena ze struktury uvedené na Obrázku 62. Číslo „1“ znamená reakci bez exoglykosidáz, číslo „2“ znamená reakci s α 1-2 manozidázou. Předpokládá se, že oligomanóza s retenčním časem 45 ± 1 min je oligomanózou, která obsahuje 5 zbytků manózy připojených k chitobióze. Předpokládá se, že oligomanóza s retenčním časem 75 ± 1 min je oligomanózou, která obsahuje 10 zbytků manózy připojených k chitobióze.

	(Man-5 Rt: 5 $\pm$ 1	Man-6 Rt: 53 $\pm$ 1	Man-7 Rt: 5 $\pm$ 1	Man-8 Rt: 67 $\pm$ 1	Man-9 Rt: 70 $\pm$ 1	(Man-10) Rt: 75 $\pm$ 1
Sc 1 struk- tura	/	1 % 55.D	14 % 55.C	42 % 59°	23 % 57° 61°	18 % 56°
Sc 2 struk- tura	17 % 55.E	/	8 % 60°	50 % 59°	6 % 57° 61°	16 % 56°
Vac 1	3 %	32 %	20	23 %	14 %	5 %

struk- tura	55.E	od 62* & Tabulka 10	55.C	od 62* & Tabulka 10	od 62* & Tabulka 10	od 62* & Tabulka 10
Vac 1 struk- tura	74 % 55.E	2 % od 62* & Tabulka 10	/	20 % od 62* & Tabulka 10	4 % od 62* & Tabulka 10	/ od 62* & Tabulka 10
Hp 1 struk- tura	/	2 % 55.D	7 % 55.C	54 % 55.B	36 % 58	/
Hp 2 struk- tura	80 % 55.E	20 % 55.D	/	/	/	/

Tabulka 10. Produkty z N-vázaných oligosacharidů obsahujících glukózu po reakci s α 1-2 manozidázou, nebo s α 1-2 manozidázou a α manozidázou.

	Man- ekvivalent	Produkt α 1-2 manozidázy (1)	Produkt α manozidázy (po (1)).
Větev A + 2 Glc	Man-10	Man-8	Man-6
Větev A + 1 Glc	Man-9	Man-7	Man-6
Větev A + žádný Glc	Man-8	Man-5	4'- β -manosyl chitobióza
Větev B + 2 Glc	Man-10	Man-9	Man-6
Větev B + 1 Glc	Man-9	Man-8	Man-6

Větev B + žádný Glc	Man-8	Man-5	4'- β -manosyl chitobióza

PŘÍKLAD 27**OBSAZENOST N-GLYKOSYLAČNÍCH MÍST V REKOMBINANTNÍM HCV E1**

V závislosti na množství obsazených N-glykosylačních míst vykazují Els odlišné migrační chování v analýze SDS-PAGE. Na základě této vlastnosti je možné stanovit průměrné množství obsazených N-glykosylačních míst v produktu E1. Za tímto účelem byly vzorky purifikovaného produktu E1 podrobeny SDS-PAGE a barvení s modří Coomassie Brilliant Blue (Obrázek 67), a dále byly analyzovány s použitím softwaru ImageMaster 1D Prime Software packet (Pharmacia). Stručně řečeno, gel byl skenován a pro každý proteinový pruh bylo stanoveno % výskytu (jeho intenzita v porovnání s celkovou intenzitou odlišných pruhů, zatímco součet všech pruhů je 100 %) (Tabulka 11). Je třeba uvést, že každý specifický proteinový pruh představuje molekuly Els se stejným počtem obsazených N-glykosylačních míst.

Získané výsledky potvrzují, že hlavní podíl (> 90 %) produktu E1, produkovaného v *Hansenula*, má 1 nebo více N-glykosylačních míst méně obsazených, než Els, získaný z vaccinia expresivního systému (jaký popsal Maertens et al. ve W096/04385). Za předpokladu, že v produktu E1 z vaccinia jsou všechna N-glykosylační místa obsazena (přičemž v E1 je sekvence „NNSS“ (SEQ ID NO: 73) v pozici 233-236 považována za jedno glykosylační místo), lze téměř s jistotou usuzovat, že průměrný počet obsazených N-glykosylačních míst v proteinu E1, exprimovaném v *Hansenula*, nepřesahuje 80 % všech dostupných N-glykosylačních míst.

Tabulka 11. Stanovení průměrného počtu obsazených N-glykosylačních míst v proteinech E1, získaných z *Hansenula polymorpha* a vaccinia/vero expresivních systémů, s SDS-PAGE a analýzou intenzity barvení s modří Coomassie Brilliant Blue. Proteinové pruhy jsou označeny molekulovou hmotností. Viz Obrázek 67.

Alkylované E1s	% výskytu (relativní intenzita)	
	Pokus 1	Pokus 2
<i>Hansenula polymorpha</i>		
MW 29	9	8
MW 25	25	27
MW 21	38	42
MW 18	27	22
MW 14-15	nestanovováno	nestanovováno
<i>Vaccinia/Vero</i>		
MW 29	100	100

PŘÍKLAD 28

OBSAZENOST N-GLYKOSYLAČNÍCH MÍST V REKOMBINANTNÍM HCV E2

Dvě sta (200) µg proteinu E2-H6, produkovaného v *Hansenula*, bylo deglykosylováno s PNGázou F. Deglykosylované proteiny E2-H6 byly naneseny na mini-gel (10 µg/dráha). Proteinové pruhy byly štěpeny s trypsinem a endo Asp-N. Hmotnost výsledných proteinů byla stanovena metodou Maldi-MS (dried droplet and thin layer method).

Tato metoda může být použita ke stanovení stupně N-glykosylace: během deglykosylace s enzymem PNGázou F je úplný řetězec cukrů odštěpen a současně je asparagin (N) hydrolyzován na kyselinu asparagovou (D). Hmotnostní rozdíl

mezi těmito dvěma aminokyselinami je 1 Da, který může být stanoven hmotnostní spektrofotometrií. Kromě toho hydrolýza N na D vytváří nové štěpící místo pro enzym Asp-N.

Možnými místy glykosylace v E2 jsou N₄₁₇, N₄₂₃, N₄₃₀, N₄₄₈, N₄₇₈, N₅₃₂, N₅₄₀, N₅₅₆, N₅₇₆, N₆₂₃ a N₆₄₅ (viz Obrázek 68). Analýza Maldí-MS prokázala, že v každém z těchto glykosylačních míst nebyla N-glykosylace úplná, protože po deglykosylaci s PNGázou F byly nalézány peptidy buďto s N nebo D glykosylačním místem (s hmotnostním rozdílem 1 Da). Poměr počtu zbytků D a počtu zbytků N uvádí průměrné obsazení jednoho N-glykosylačního místa řetězcem cukrů ve všech proteinech E2, exprimovaných v *Hansenula*, a přítomných v analyzovaném vzorku. Uvedené výsledky jsou sumarizovány v Tabulkách 12 až 14.

Z výsledků bylo vypočteno, že v průměru každé glykosylační místo bylo glykosylováno přibližně z 54 %.

Tabulka 12. Procento glykosylace stanovené v peptidu štěpeném trypsinem a obsahujícím jedno N-glykosylační místo.

N-glykosylační místo	Glykosylováno	Neglykosylováno
N430	60 %	40 %
N448	50 %	50 %
N556	80 %	20 %
N576	90 %	10 %
N623	20 %	80 %
N645	10 %	90 %

Tabulka 13. Procento glykosylace stanovené v peptidu štěpeném trypsinem a obsahujícím dvě N-glykosylační místa.

N-glykosylační místo	Obě místa glykosylována	1 ze 2 míst glykosylováno	Žádné místo glykosylováno	Vypočteno pro jednotlivé N
N417 a N423	70 %	25 %	5 %	85 %
N532 A n540	0 %	80 %	20 %	40 %

Tabulka 14. Procento glykosylace stanovené pro N478 v produktu štěpení s Asp-N.

N-glykosylační místo	Glykosylováno	Neglykosylováno
N478	35 %	65 %

PŘÍKLAD 29

REAKTIVITA DÁRCOVSKÝCH KREVNÍCH SÉR S HCV E1, PRODUKOVANÝCH V *SACCHAROMYCES* NEBO V *HANSENULA*

Els-H6, produkované v *Saccharomyces* (exprimovaných s α -MF vedoucí sekvencí) a Els-H6, produkovaných v *Hansenula* (exprimovaných s vedoucí sekvencí CL) byly oba purifikovány tak, jak bylo popsáno v Příkladech 15 a 16, a na závěr byly podrobeny alkylaci a tvorbě VLP, tak jak bylo popsáno v Příkladu 20. Oba proteiny byly přímo adsorbovány na mikrotitrační destičky v množství 0,5 μ g/ml (1 hodina, 37° C), a po blokování destičky (PBS-0,1 % kasein, 1 hodinu, 37° C) byla séra testovaná na HCV a séra z negativních dárcovských kreví inkubována ve zředění 1/20 (PBS-0,5 % kasein, 10 % (hmotn./objem) sacharóza, 0,2% (objem/objem) Triton X-705, 1 hodinu, 37° C). Nakonec bylo detekováno navázání s použitím sekundárního králičího antiséra se specifickými protilátkami proti lidskému IgG-Fc, spojeným s

peroxidázou (Dako, Denmark) ve zředění 1/50 000 (PBS-0,1 % kasein, 1 hodina, při teplotě místnosti), a následovalo barvení. Mezi všemi stupni byly destičky 3krát promyty s PBS-0,05% (hmotn./objem) Tweenem-20. Pro srovnání byla také stejným způsobem analyzována séra s Els, získanými ze savčích buněk, které byly připraveny a purifikovány tak, jak popsal Depla et al. ve W099/67285.

Mezní hodnoty pro tuto zkoušku ELISA byly stanoveny jako dvojnásobek průměru pozadí (např. reaktivita všech sér ve shodném provedení, avšak se streptavidinem navázaným na jamky).

Z Tabulky 15 je možné usuzovat, že mnohé ze sér (75 %) vykazují reaktivitu nad mezní hodnotou vůči E1, produkovaným v *Saccharomyces*, zatímco pouze několik sér (6 %) vykazuje nějakou reaktivitu nad mezní hodnotu vůči E1, produkovaným v *Hansenula*. Uvedený rozdíl v reaktivitě je přičítán přítomnosti terminálních α 1-3 manóz spojených s α 1-2 manózami na E1, produkovaném v *Saccharomyces*, jak bylo zaznamenáno v Příkladu 26. Young et al. (1998) již dříve naznačili, že tento typ manóz je také zodpovědný za reaktivitu lidských sér s mananem, získaným ze *Saccharomyces*. Aby bylo dále potvrzeno, že reaktivita E1, získaného ze *Saccharomyces*, může být přičítána tomuto typu manózy, byla opakována zkouška ELISA na E1, produkovaném v *Saccharomyces*, se zředěním dárcovských krevních sér preinkubovaných (1 hodinu při 37° C) s 1 nebo 5 mg/ml mananu (Sigma), který byl přidán do ředícího pufru. Jak lze usoudit z Tabulky 16, preinkubace s mananem redukovala aktivitu tohoto E1 s dárcovskými krevními séry, a to způsobem závislým na koncentraci k hodnotám pozadí ke všem sérům (s výjimkou jediného (F556) analyzovaného séra)

Průměrná hodnota je snížena z 0,24 bez kompetice s mananem na 0,06 při použití 5 mg mananu/ml).

Tabulka 15. Reaktivita E1, produkovaného v *Hansenula*, *Saccharomyces* a v savčích buňkách. Reaktivity nad mezní hodnotu jsou uvedeny ve zvýrazněných polích.

Číslo séra	Hanse- nula E1	Saccharo- myces E1	Savčí E1	Slepý vzorek
F552	0,18	0,224	0,056	0,05
F553	0,062	0,449	0,056	0,052
F555	0,06	0,079	0,054	0,051
F556	0,073	0,679	0,054	0,051
F557	0,059	0,173	0,053	0,05
F558	0,066	0,232	0,06	0,058
F559	0,084	0,309	0,056	0,053
F560	0,062	0,338	0,052	0,052
F562	0,056	0,128	0,053	0,053
F563	0,064	0,181	0,059	0,056
F570	0,056	0,135	0,054	0,055
F571	0,06	0,209	0,054	0,055
F572	0,061	0,427	0,055	0,056
F575	0,079	0,104	0,062	0,056
F576	0,061	0,144	0,058	0,057
F577	0,063	0,224	0,055	0,058
F578	0,089	0,131	0,057	0,061
F581	0,064	0,098	0,061	0,057
F594	0,055	0,116	0,056	0,057
F595	0,059	0,539	0,057	0,058
F598	0,076	0,311	0,056	0,059
F450	0,205	0,078	0,099	0,059
F453	0,059	0,128	0,057	0,06
F456	0,058	0,121	0,056	0,06

F458	0,055	0,088	0,054	0,054
F459	0,054	0,069	0,056	0,054
F463	0,055	0,083	0,054	0,056
F466	0,086	0,208	0,071	0,094
F467	0,066	0,344	0,055	0,055
F469	0,059	0,074	0,057	0,057
F470	0,074	0,222	0,056	0,056
F473	0,094	0,807	0,054	0,057
F479	0,06	0,075	0,06	0,051
F480	0,053	0,305	0,056	0,053
F481	0,059	0,395	0,071	0,052
F488	0,063	0,467	0,059	0,053
průměr	0,072	0,242	0,058	mezní hodnota 0,113
# sér nad mezní hodnotou	2/36	27/36		
% sér nad mezní hodnotou	6	75		

Tabulka 16. Reaktivita E1, produkovaného v buňkách *Saccharomyces*, tak jako v Tabulce 15, avšak v přítomnosti 5 mg mananu/ml. Reaktivity nad mezní hodnotu jsou uvedeny ve zvýrazněných polích.

Číslo séřa	Koncentrace mananu		
	0 mg/ml	1 mg/ml	5 mg/ml
F552	0,207	0,128	0,103
F553	0,487	0,098	0,050
F555	0,066	0,044	0,041
F556	0,769	0,540	0,372

F557	0,158	0,094	0,088
F558	0,250	0,076	0,046
F559	0,300	0,077	0,066
F560	0,356	0,088	0,044
F562	0,122	0,106	0,089
F563	0,164	0,091	0,049
F570	0,110	0,043	0,040
F571	0,212	0,057	0,042
F572	0,464	0,087	0,043
F575	0,095	0,081	0,062
F576	0,138	0,042	0,043
F577	0,216	0,042	0,041
F578	0,125	0,100	0,093
F581	0,083	0,064	0,042
F594	0,102	0,044	0,041
F595	0,520	0,088	0,044
F598	0,340	0,054	0,042
F450	0,053	0,060	0,053
F453	0,116	0,049	0,044
F456	0,112	0,050	0,043
F458	0,086	0,051	0,042
F459	0,054	0,044	0,042
F463	0,078	0,043	0,041
F466	0,172	0,111	0,085
F467	0,420	0,117	0,049
F469	0,053	0,043	0,041
F470	0,220	0,070	0,061
F473	0,924	0,183	0,063
F479	0,059	0,049	0,043
F480	0,281	0,155	0,054
F481	0,355	0,042	0,046
F488	0,474	0,090	0,046
průměr	0,243	0,089	0,062

SEZNAM ODKAZŮ

Agaphonov, M. O., Beburov, M. Y., Ter Avanesyan, M. D., and Smirnov, V. N. (1995) A disruption-replacement approach for the targeted integration of foreign genes in *Hansenula polymorpha*. *Yeast* 11: 1241-1247.

Agaphonov, M. O., Trushkina, P. M., Sohn, J.H., Choi, E. S., Rhee, S. K., and Ter Avanesyan, M. D. (1999) Vectors for rapid selection of integrants with different plasmid copy numbers in the yeast *Hansenula polymorpha* DL1. *Yeast* 15: 541-551.

Alber, T. and Kawasaki, G. (1982) Nucleotide sequence of the triose phosphate isomerase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol Appl. Genet* 1: 419-434.

Ammerer, G. (1983) Expression of genes in yeast using the ADCl promoter. *Methods Enzymol.* 101: 192-201.

Ballou, L., Hitzeman, R. A., Lewis, M. S., and Ballou, C. E. (1991) Vanadate-resistant yeast mutants are defective in protein glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 88: 3209-3212.

Beekman, N. J., Schaaper, W. M., Tesser, G. I., Dalsgaard, K., Kamstrup, S., Langeveld, J. P., Boshuizen, R. S., and Meloen, R. H. (1997) Synthetic peptide vaccines: palmitoylation of peptide antigens by a thioester bond increases immunogenicity. *J. Pept. Res.* 50: 357-364.

- Burns, J., Butler, J., and Whitesides, G.** (1991) Selective reduction of disulfides by Tris (2carboxyethyl) phosphine. *J. Org. Chem.* 56: 2648-2650.
- Cox, H., Mead, D., Sudbery, P., Eland, R. M., Mannazzu, I., and Evans, L.** (2000) Constitutive expression of recombinant proteins in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* using the PMA1 promoter. *Yeast* 16: 1191-1203.
- Cregg, J. M.** (1999) Expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. In *Gene expression systems: using nature for the art of expression*, J. M. Fernandez and J. P. Hoeffler, eds (San Diego: Academic Press), pp. 157-191.
- Darbre, A.** (1986) *Practical protein chemistry: a handbook*. Wiley & Sons Ltd.
- Diminsky, D., Schirmbeck, R., Reimann, J., and Barenholz, Y.** (1997) Comparison between hepatitis B surface antigen (HBsAg) particles derived from mammalian cells (CHO) and yeast cells (*Hansenula polymorpha*): composition, structure and immunogenicity. *Vaccine* 15: 637-647.
- Doms, R. W., Lamb, R. A., Rose, J. K., and Helenius, A.** (1993) Folding and assembly of viral membrane proteins. *Virology* 193: 545-562.
- Elble, R.** (1992) A simple and efficient procedure for transformation of yeasts. *Biotechniques* 13: 18-20.
- Fellinger, A. J., Verbakel, J. M., Veale, R. A., Sudbery, P. E., Bom, I. J., Overbeeke, N., and Verrips, C. T.** (1991) Expression of the alpha-galactosidase from *Cyamopsis*

tetragonoloba (guar) by Hansenula polymorpha. Yeast 7: 463-473.

Fournier, J. A., Cahour, A., Escriou, N., Girad, M., and Wychowski, C. (1996) Processing of the E1 glycoprotein of hepatitis C virus expressed in mammalian cells. J. Gen Virol. 77 (Pt 5): 1055-1064.

Gailit, J. (1993) Restoring free sulfhydryl groups in synthetic peptides. Anal. Biochem. 214: 334-335.

Garson, J. A., Lubach, D., Passas, J., Whitby, K., and Grant, P. R. (1999) Suramin blocks hepatitis C binding to human hepatoma cells in vitro. J. Med. Virol. 57: 238-242.

Gatzke, R., Weydemann, U., Janowicz, Z. A., and Hollenberg, C. P. (1995) Stable multicopy integration of vector sequences in Hansenula polymorpha. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43:844-849.

GELlissen, G. (2000) Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. Appl. Microbiol. Biotechnol. 54: 741-750.

Grakoui, A., Wychowski, C., Lin, C., Feinstone, S. M., and Rice, C. M. (1993) Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. J. Virol. 67: 1385-1395.

Grinna, L. S. and Tschopp, J. F. (1989) Size distribution and general structural features of N-linked oligosaccharides from the methylotrophic yeast, Pichia pastoris. Yeast 5: 107-115.

Heile, J. M., Fong, Y. L., Rosa, D., Berger, K., Saletti, G., Campagnoli, S., Bensi, G., Capo, S., Coates, S., Crawford, K., Dong, C., Wininger, M., Baker, G., Cousens, L., Chien, D., Ng, P., Archangel, P., Grandi, G., Houghton, M., and Abrignani, S. (2000) Evaluation of hepatitis C virus glycoprotein E2 for vaccine design: an endoplasmic reticulum-retained recombinant protein is superior to secreted recombinant protein and DNA-based vaccine candidates. *J. Virol.* 74: 6885-6892.

Helenius, A. (1994) How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol Biol. Cell* 5: 253-265.

Hermanson, G. T. (1996) *Bioconjugate techniques*. San Diego: Academic Press.

Herscovics, A. and Orlean, P. (1993) Glycoprotein biosynthesis in yeast. *FASEB J.* 7: 540-550.

Hijikata, M., Kato, N., Ootsuyama, Y., Nakagawa, M., and Shimotohno, K. (1991) Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by in vitro processing analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 88: 5547-5551.

Hitzeman, R. A., Clarke, L., and Carbon, J. (1980) Isolation and characterization of the yeast 3-phosphoglycerokinase gene (PGK) by an immunological screening technique. *J. Biol. Chem.* 255: 12073-12080.

- Hollenberg, C. P. and GELLissen, G.** (1997) Production of recombinant proteins by methylotrophic yeasts. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8: 554-560.
- Holmgren, A.** (1979) Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide. *J. Biol. Chem.* 254: 9627-9632.
- Janowicz, Z. A., Melber, K., Merckelbach, A., Jacobs, E., Harford, N., Comberbach, M., and Hollenberg, C.P.** (1991) Simultaneous expression of the S and L surface antigens of hepatitis B, and formation of mixed particles in the methylotrophic yeast, *Hansenula polymorpha*. *Yeast* 7: 431-443.
- Jayabaskaran, C., Davison, P. F., and Paulus, H.** (1987) Facile preparation and some applications of an affinity matrix with a cleavable connector arm containing a disulfide bond. *Prep. Biochem.* 17: 121-141.
- Jenkins, N., Parekh, R. B., and James, D. C.** (1996) Getting the glycosylation right: implications for the biotechnology industry. *Nat. Biotechnol.* 14:975-981.
- Julius, D., Brake, A., Blair, L., Kunisawa, R., and Thorner, J.** (1984) Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro-alpha-factor. *Cell* 37: 1075-1089.
- Kalef, E., Walfish, P. G., and Gitler, C.** (1993) Arsenical-based affinity chromatography of vicinal dithiol-containing proteins: purification of L1210 leukemia cytoplasmic

proteins and the recombinant rat c-erb A beta 1 T3 receptor. Anal. Biochem. 212: 325-334.

Kalidas, C., Joshi, L., and Batt, C. (2001) Characterization of glycosylated variants of betalactoglobulin expressed in *Pichia pastoris*. Protein Eng 14: 201-207.

Kato, N., Ootsuyama, Y., Tanaka, T., Nakagawa, M., Nakazawa, T., Muraiso, K., Ohkoshi, S., Hijikata, M., and Shimotohno, K. (1992) Marked sequence diversity in the putative envelope proteins of hepatitis C viruses. Virus Res. 22: 107-123.

Kawasaki, G. and Fraenkel, D. G. (1982) Cloning of yeast glycolysis genes by complementation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 108: 1107-1122.

Klebe, R. J., Harriss, J.V., Sharp, Z. D., and Douglas, M. G. (1983) A general method for polyethylene-glycol-induced genetic transformation of bacteria and yeast. Gene 25: 333-341.

Kumar, N., Kella, D., and Kinsella, J. E. (1985) A method for the controlled cleavage of disulfide bonds in proteins in the absence of denaturants. J. Biochem. Biophys. Methods 11: 251-263.

Kumar, N., Kella, D., and Kinsella, J. E. (1986) Anomalous effects of denaturants on sulfitolysis of protein disulfide bonds. Int. J. Peptide Prot. Res. 28: 586-592.

- Maertens, G. and Stuyver, L.** (1997) Genotypes and genetic variation of hepatitis C virus. In *The molecular medicine of viral hepatitis*, T. J. Harrison and A. J. Zuckerman, eds (John Wiley & Sons), pp. 183-233.
- Major, M. E. and Feinstone, S. M. (1997) The molecular virology of hepatitis C. *Hepatology* 25: 1527-1538.
- Miele, R. G., Nilsen, S. L., Brito, T., Bretthauer, R. K., and Castellino, F. J.** (1997) Glycosylation properties of the *Pichia pastoris*-expressed recombinant kringle 2 domain of tissue-type plasminogen activator. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 25 (Pt 2): 151-157.
- Meunier, J. C., Fournillier, A., Choukhi, A., Cahour, A., Cocquerel, L., Dubuisson, J., and Wychowski, C.** (1999) Analysis of the glycosylation sites of hepatitis C virus (HCV) glycoprotein E1 and the influence of E1 glycans on the formation of the HCV glycoprotein complex. *J. Gen Virol.* 80 (Pt 4): 887-896.
- Montesino, R., Garcia, R., Quintero, O., and Cremata, J. A.** (1998) Variation in N-linked oligosaccharide structures on heterologous proteins secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 14: 197-207.
- Mustilli, A. C., Izzo, E., Houghton, M., and Galeotti, C. L.** (1999) Comparison of secretion of a hepatitis C virus glycoprotein in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*. *Res. Microbiol.* 150: 179-187.

Nagai, K. and Thogersen, H. C. (1984) Generation of beta-globin by sequence-specific proteolysis of a hybrid protein produced in *Escherichia coli*. *Nature* 309: 810-812.

Nielsen, P. E. (2001) Targeting double stranded DNA with peptide nucleic acid (PNA). *Curr. Med. Chem.* 8: 545-550.

Okabayashi, K., Nakagawa, Y., Hayasuke, N., Ohi, H., Miura, M., Ishida, Y., Shimizu, M., Murakami, K., Hirabayashi, K., Minamino, H., and (1991) Secretory expression of the human serum albumin gene in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biochem. (Tokyo)* 110: 103-110.

Orum, H. and Wengel, J. (2001) Locked nucleic acids: a promising molecular family for gene-function analysis and antisense drug development. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 3: 239-243.

Padgett, K. A. and Sorge, J. A. (1996) Creating seamless junctions independent of restriction sites in PCR cloning. *Gene* 168: 31-35.

Panchal, T. and Wodzinski, R. J. (1998) Comparison of glycosylation patterns of phytase from *Aspergillus niger* (A. ficum) NRRL 3135 and recombinant phytase. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 28: 201-217.

Pedersen, J., Lauritzen, C., Madsen, M. T., and Weis, D. S. (1999) Removal of N-terminal polyhistidine tags from recombinant proteins using engineered aminopeptidases. *Protein Expr. Purif.* 15: 389-400.

- Pomroy, N. C. and Deber, C. M.** (1998) Solubilization of hydrophobic peptides by reversible cysteine PEGylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245: 618-621.
- Raymond, C. K.** (1999) Recombinant protein expression in *Pichia methanolica*. In *Gene expression systems: using nature for the art of expression*, J. M. Fernandez and J. P. Hoeffler, eds (San Diego: Academic Press), pp. 193-209.
- Rein, A., Ott, D. E., Mirro, J., Arthur, L. O., Rice, W., and Henderson, L. E.** (1996) Inactivation of murine leukemia virus by compounds that react with the zinc finger in the viral nucleocapsid protein. *J. Virol.* 70: 4966-4972.
- Roggenkamp, R., Hansen, H., Eckart, M., Janowicz, Z., and Hollenberg, C. P.** (1986) Transformation of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* by autonomous replication and integration vectors. *Mol. Gen. Genet.* 202: 302-308.
- Rosa, D., Campagnoli, S., Moretto, C., Guenzi, E., Cousens, L., Chin, M., Dong, C., Weiner, A. J., Lau, J. Y., Choo, Q. L., Chien, D., Pileri, P., Houghton, M., and Abrignani, S.** (1996) A quantitative test to estimate neutralizing antibodies to the hepatitis C virus: cytofluorimetric assessment of envelope glycoprotein 2 binding to target cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 93: 1759-1763.
- Rose, J. K and Doms, R. W.** (1988) Regulation of protein export from the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 4: 257-288.

- Russell, D. W., Smith, M., Williamson, V. M., and Young, E. T.** (1983) Nucleotide sequence of the yeast alcohol dehydrogenase II gene. *J. Biol. Chem.* 258: 2674-2682.
- Russell, P. R.** (1983) Evolutionary divergence of the mRNA transcription initiation mechanism in yeast. *Nature* 301: 167-169.
- Russell, P. R.** (1985) Transcription of the triose-phosphate-isomerase gene of *Schizosaccharomyces pombe* initiates from a start point different from that in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 40: 125-130.
- Russell, P. R. and Hall, B. D.** (1983) The primary structure of the alcohol dehydrogenase gene from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* 258: 143-149.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T.** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Scorer, C. A., Clare, J. J., McCombie, W. R., Romans, M. A., and Sreekrishna, K.** (1994) Rapid selection using G418 of high copy number transformants of *Pichia pastoris* for high level foreign gene expression. *Biotechnology (N. Y.)* 12: 181-184.
- Singh, R. and Kats, L.** (1995) Catalysis of reduction of disulfide by selenol. *Anal. Biochem.* 232: 86-91.
- Sohn, J.H., Choi, E. S., Kang, H. A., Rhee, J. S., and Rhee, S. K.** (1999) A family of telomere-associated autonomously replicating sequences and their functions in

targeted recombination in *Hansenula polymorpha* DL-1. J. Bacteriol. 181: 1005-1013.

Stuyver, L., van Arnhem, W., Wyseur, A., Hernandez, F., Delaporte, E., and Maertens, G. (1994) Classification of hepatitis C viruses based on phylogenetic analysis of the envelope 1 and nonstructural 5B regions and identification of five additional subtypes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 91: 10134-10138.

Sugrue, R. J., Cui, T., Xu, Q., Fu, J., and Chan, Y. C. (1997) The production of recombinant dengue virus E protein using *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. J. Virol. Methods 69: 159-169.

Thakur, M. L., DeFulvio, J., Richard, M. D., and Park, C.H. (1991) Technetium-99m labeled monoclonal antibodies: evaluation of reducing agents. Int. J. Rad. Appl. Instrum.B 18: 227-233.

Trimble, R. B., Atkinson, P.H., Tschopp, J.F., Townsend, R. R., and Maley, F. (1991) Structure of oligosaccharides on *Saccharomyces* SUC2 invertase secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. J. Biol. Chem. 266: 22807-22817.

Vingerhoeds, M.H., Haisma, H. J., Belliot, S. O., Smit, R. H., CrommElin, D. J., and Storm, G. (1996) Immunoliposomes as enzyme-carriers (immuno-enzymosomes) for antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT): optimization of prodrug activating capacity. Pharm. Res. 13: 604-610.

Wahlestedt, C., Salmi, P., Good, L., Kela, J., Johnsson, T., Hokfelt, T., Broberger, C., Porreca, F., Lai, J., Ren,

K., Ossipov, M., Koshkin, A., Jakobsen, N., Skouv, J., Oerum, H., Jacobsen, M. H., and Wengel, J. (2000) Potent and nontoxic antisense oligonucleotides containing locked nucleic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 97: 5633-5638.

Weydemann, U., Keup, P., Piontek, M., Strasser, A. W., Schweden, J., Gellissen, G., and Janowicz, Z. A. (1995) High-level secretion of hirudin by *Hansenula polymorpha*-authentic processing of three different preprohirudins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44: 377-385.

Young, M., Davies, M. J., Bailey, D., Gradwell, M. J., Smestad-Paulsen, B., Wold, J. K., Barnes, R. M. R., Hounsell, E. (1998) Characterization of oligosaccharides from an antigenic mannan of *Saccharomyces cerevisiae*. *Glycoconjugate Journal* 15: 815-822.

Zauberman, A., Nussbaum, O., Ilan, E., Eren, R., Ben-Moshe, O., Arazi, Y., Berre, S., Lubin, I., Shouval, D., Galun, E., Reisner, Y., and Dagan, S. (1999) The trimera mouse system: a mouse model for hepatitis C infection and evaluation of therapeutic agents. 6th International Symposium on hepatitis C and related viruses. Bethesda 6-9 June, 1999.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Izolovaný obalový protein HCV nebo jeho fragment zahrnující alespoň jedno N-glykosylační místo, přičemž uvedený protein nebo jeho fragment je produktem exprese v eukaryontní buňce a dále je charakterizován tím, že v průměru až 80 % jeho N-glykosylačních míst je glykosylováno s jádrem glykosylace.

2. Izolovaný obalový protein HCV nebo jeho fragment podle nároku 1, ve kterém je více než 70 % míst glykosylovaných s jádrem glykosylace s oligomanózou obsahující 8 až 10 manóz.

3. Izolovaný obalový protein HCV nebo jeho fragment podle kteréhokoliv z nároků 1 nebo 2, ve kterém poměr míst glykosylovaných s jádrem glykosylace obsahujícím oligomanózu o struktuře definované jako Man(7)-GlcNAc(2) počtu míst glykosylovaných s jádrem glykosylace obsahujícím oligomanózu o struktuře definované jako Man(8)-GlcNAc(2) je menší nebo roven 0,45.

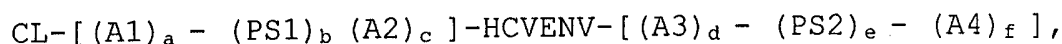
4. Izolovaný obalový protein HCV nebo jeho fragment podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, ve kterém uvedené oligomanózy obsahují méně než 10 % terminální α 1,3 manózy.

5. Izolovaný obalový protein HCV nebo jeho část podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4, který je produktem exprese v buňce kvasinky.

6. Izolovaný obalový protein HCV nebo jeho část podle nároku 5, kde uvedenou buňkou kvasinky je buňka *Hansenula*.

7. Izolovaný obalový protein HCV nebo jeho část podle kteréhokoli z nároků 1 až 6, který byl získán z proteinu obsahujícího vedoucí peptid opičího lysozymu nebo jeho funkční variantu, které jsou připojeny k obalovému proteinu HCV nebo jeho fragmentu.

8. Izolovaný obalový protein HCV nebo jeho část podle nároku 7, který byl získán z proteinu charakterizovaného vzorcem



kde:

CL je vedoucí peptid opičího lysozymu nebo jeho funkční ekvivalent,

A1, A2, A3 a A4 jsou adaptorové peptidy, které mohou být odlišné nebo stejné,

PS1 a PS2 jsou místa úprav, která mohou být odlišná nebo stejná,

HCVENV je obalový protein HCV nebo jeho část,

a, b, c, d, e, f jsou 0 nebo 1,

a kde případně jsou A1 a/nebo A2 částí PS1, a/nebo kde A3 a/nebo A4 jsou částí PS2.

9. Izolovaný obalový protein HCV nebo jeho část podle nároku 8, kde uvedený vedoucí peptid opičího lysozymu CL má aminokyselinovou sekvenci definovanou v SEQ ID NO: 1.

10. Izolovaný obalový protein HCV nebo jeho část podle nároku 8, ve kterém A má aminokyselinovou sekvenci vybranou ze sekvencí SEQ ID NO: 63 - 65, 70 - 72 a 74 - 82, PS má aminokyselinovou sekvenci vybranou ze sekvencí SEQ ID NO:

66 - 68 a 83 - 84, nebo je PS dibazickým místem, jakým je Lys-Lys, Arg-Arg, Lys-Arg a Arg-Lys, nebo monobazickým místem, jakým je Lys, a ve kterém je HCVENV vybrán ze sekvencí SEQ ID NO: 85 - 98 a jeho fragmentů.

11. Izolovaný obalový protein HCV nebo jeho část podle kteréhokoliv z nároků 1 až 10, který je obsažen ve struktuře vybrané ze skupiny sestávající z monomerů, homodimerů, heterodimerů, homo-oligomerů a hetero-oligomerů.

12. Izolovaný obalový protein HCV nebo jeho část podle kteréhokoliv z nároků 1 až 10, který je obsažen v částici podobné viru.

13. Izolovaný obalový protein HCV nebo jeho část podle kteréhokoliv z nároků 1 až 12, ve kterém jsou thiolové skupiny cysteinu chemicky modifikovány.

14. Izolovaný obalový protein HCV nebo jeho část podle kteréhokoliv z nároků 1 až 13, který je antigenní.

15. Izolovaný obalový protein HCV nebo jeho část podle kteréhokoliv z nároků 1 až 13, který je imunogenní.

16. Izolovaný obalový protein HCV nebo jeho část podle kteréhokoliv z nároků 1 až 13, který obsahuje epitop pro T-buňky.

17. Kompozice, vyznačující se tím, že obsahuje izolovaný obalový protein HCV nebo jeho část podle kteréhokoliv z nároků 1 až 16.

18. Kompozice podle nároku 17, vyznačující se tím, že dále obsahuje farmaceuticky přijatelný nosič, a která je léčivem.

19. Kompozice podle nároku 17, vyznačující se tím, že dále obsahuje farmaceuticky přijatelný nosič, a která je vakcínou.

20. Způsob přípravy izolovaného obalového proteinu HCV nebo jeho fragmentu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 16.

21. Způsob detekce přítomnosti protilátek proti HCV ve vzorku, o němž se předpokládá, že obsahuje protilátky anti-HCV, vyznačující se tím, že sestává z:

- (i) kontaktování obalového proteinu HCV nebo jeho části podle kteréhokoliv z nároků 1 až 16 se vzorkem za podmínek dovolujících komplexaci obalového proteinu HCV nebo jeho části s uvedenými anti-HCV protilátkami
- (ii) detekci komplexu vytvořeného v (i), a
- (iii) vyvození závěru z (ii) o přítomnosti anti-HCV protilátek v uvedeném vzorku.

22. Způsob podle nároku 21, vyznačující se tím, že uvedený stupeň kontaktování (i) probíhá za kompetitivních podmínek.

23. Způsob podle nároku 21, vyznačující se tím, že uvedený obalový protein HCV nebo jeho část jsou navázány na pevný nosič.

24. Diagnostickou souprava pro detekci přítomnosti protilátek anti-HCV ve vzorku, o němž se předpokládá, že

obsahuje protilátky anti-HCV, vyznačující se tím, že obsahuje obalový protein HCV nebo jeho část podle kteréhokoliv z nároků 1 až 16.

25. Diagnostická souprava podle nároku, vyznačující se tím, že obalový protein HCV nebo jeho část jsou navázány na pevný nosič.

26. Léčivo, vyznačující se tím, že obsahuje obalový protein HCV nebo jeho část podle kteréhokoliv z nároků 1 až 16.

27. Vakcína, vyznačující se tím, že obsahuje obalový protein HCV nebo jeho část podle kteréhokoliv z nároků 1 až 16.

28. Farmaceutická kompozice pro indukci HCV-specifické imunitní odpovědi u savce, vyznačující se tím, že obsahuje účinné množství obalového proteinu HCV nebo jeho části podle kteréhokoliv z nároků 1 až 16 a případně farmaceuticky přijatelné adjuvans.

29. Farmaceutická kompozice pro vyvolání HCV-specifických protilátek u savce, vyznačující se tím, že obsahuje účinné množství obalového proteinu HCV nebo jeho části podle kteréhokoliv z nároků 1 až 16 a případně farmaceuticky přijatelné adjuvans.

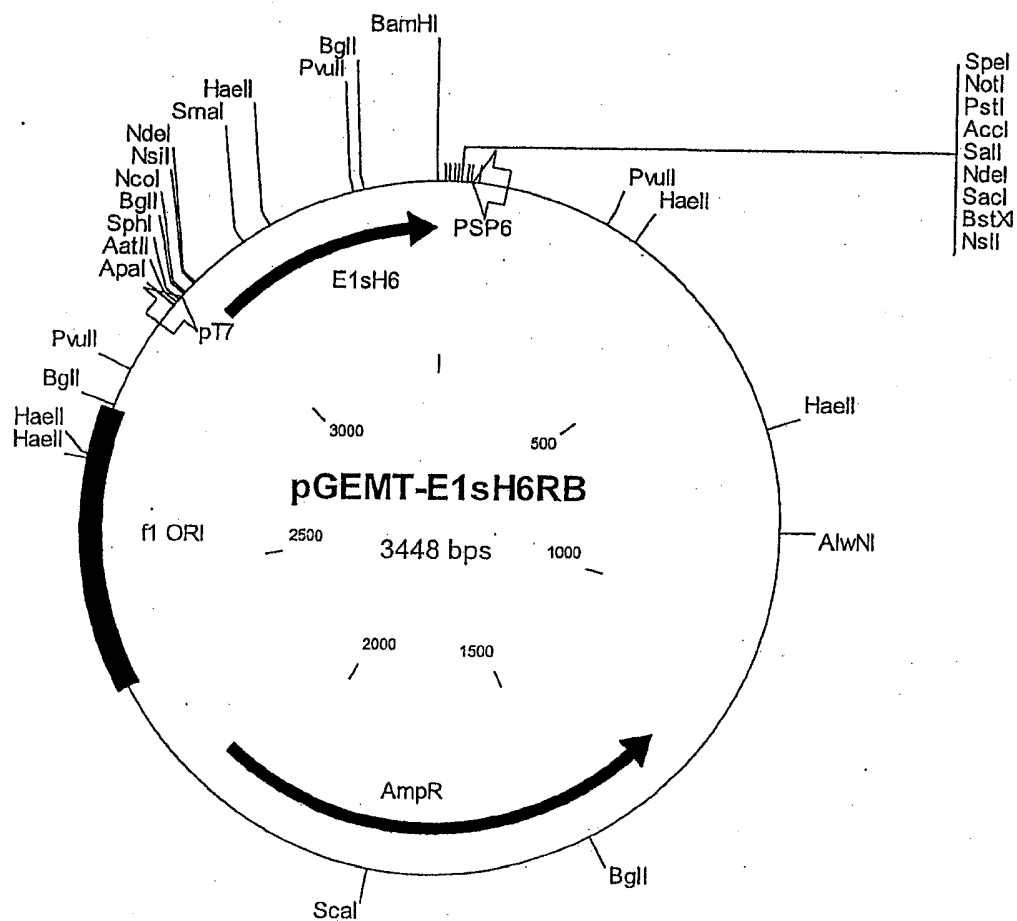
30. Farmaceutická kompozice pro indukci funkce T-buněk u savce, vyznačující se tím, že obsahuje účinné množství obalového proteinu HCV nebo jeho části podle kteréhokoliv z nároků 1 až 16 a případně farmaceuticky přijatelné adjuvans.

31. Farmaceutická kompozice podle kteréhokoliv z nároků 28 až 30, která je profylaktickou kompozicí.

32. Farmaceutická kompozice podle kteréhokoliv z nároků 28 až 30, která je terapeutickou kompozicí.

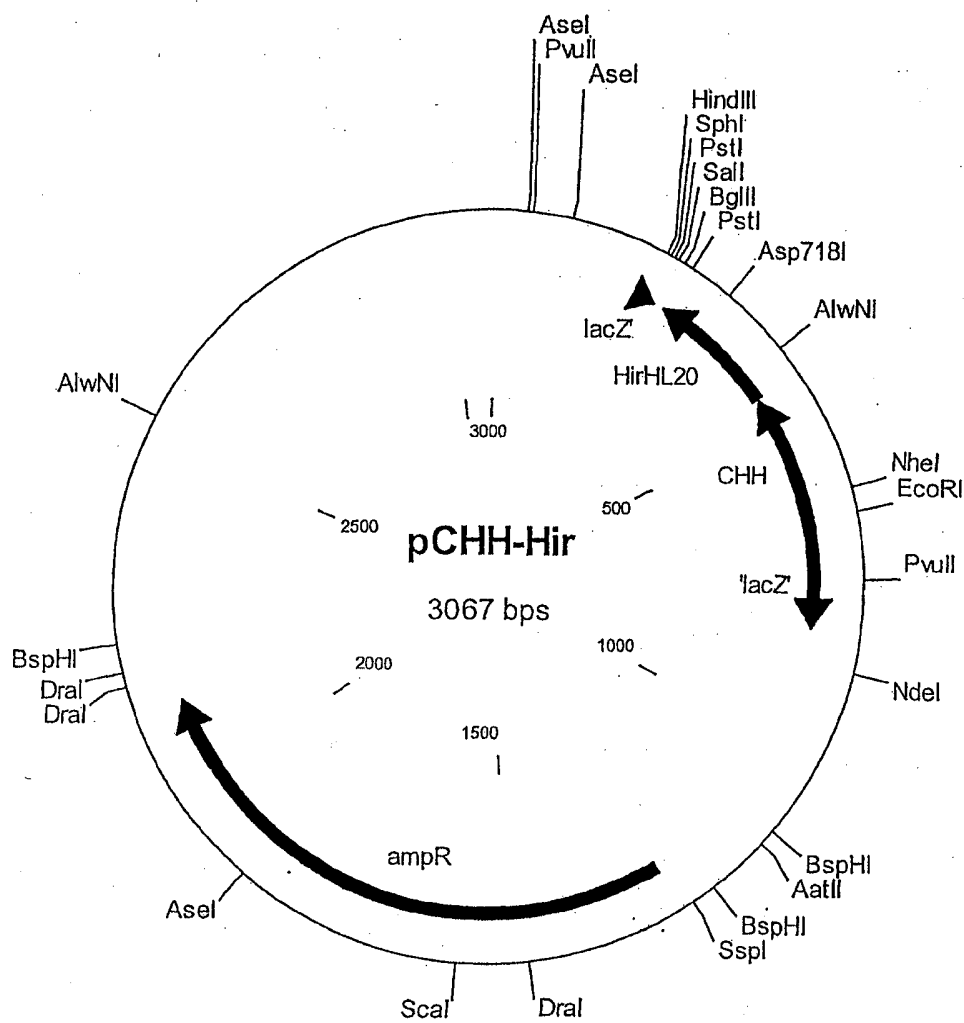
33. Farmaceutická kompozice podle kteréhokoliv z nároků 28 až 32, kde uvedeným savcem je člověk.

1/70



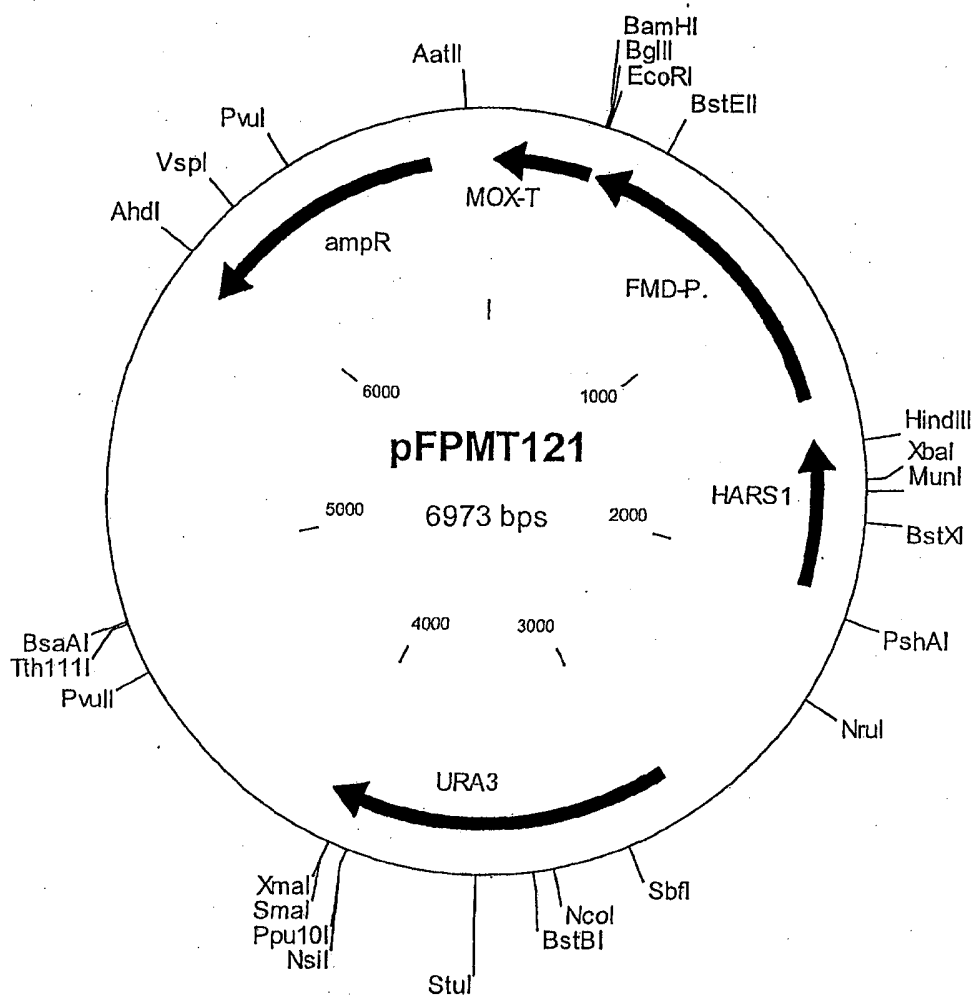
Obr.1

2/70



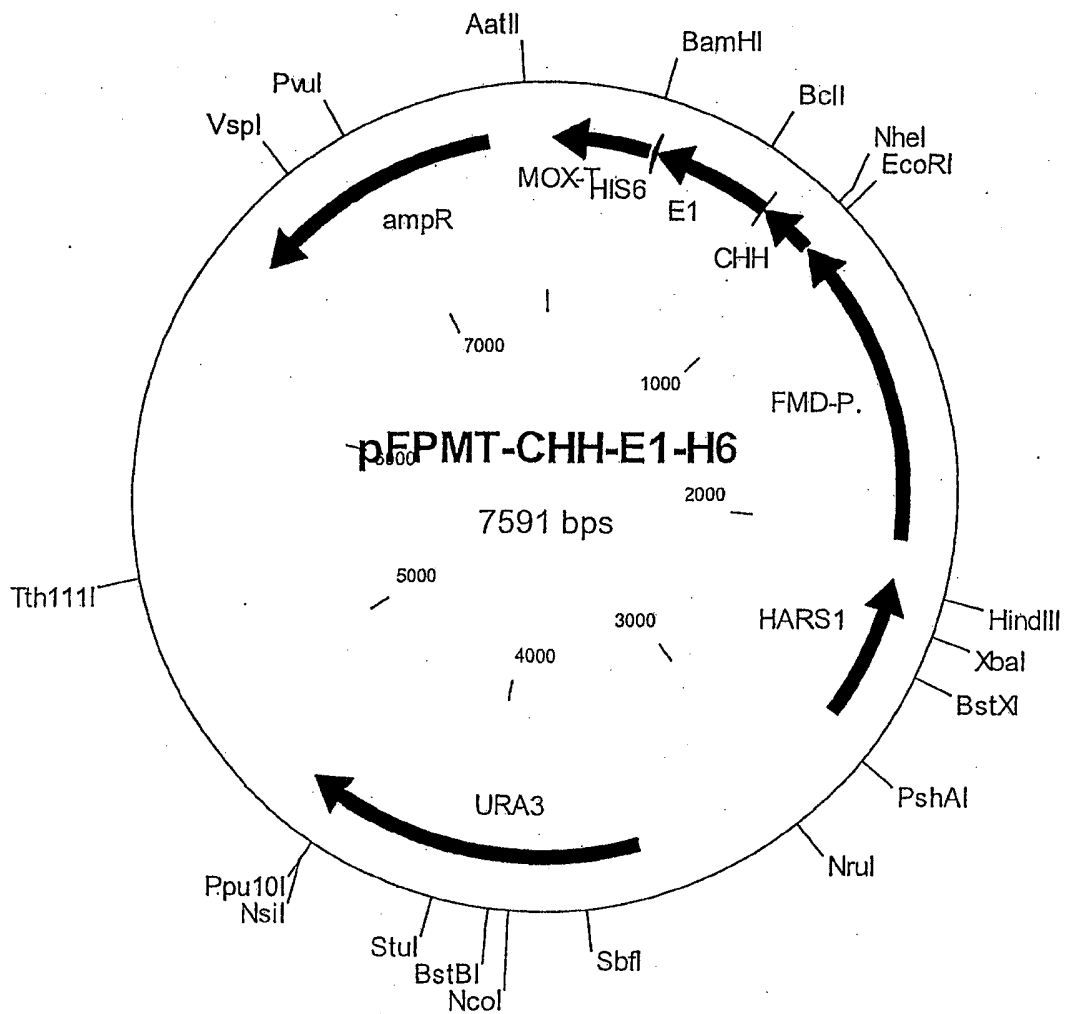
Obr.2

3/70



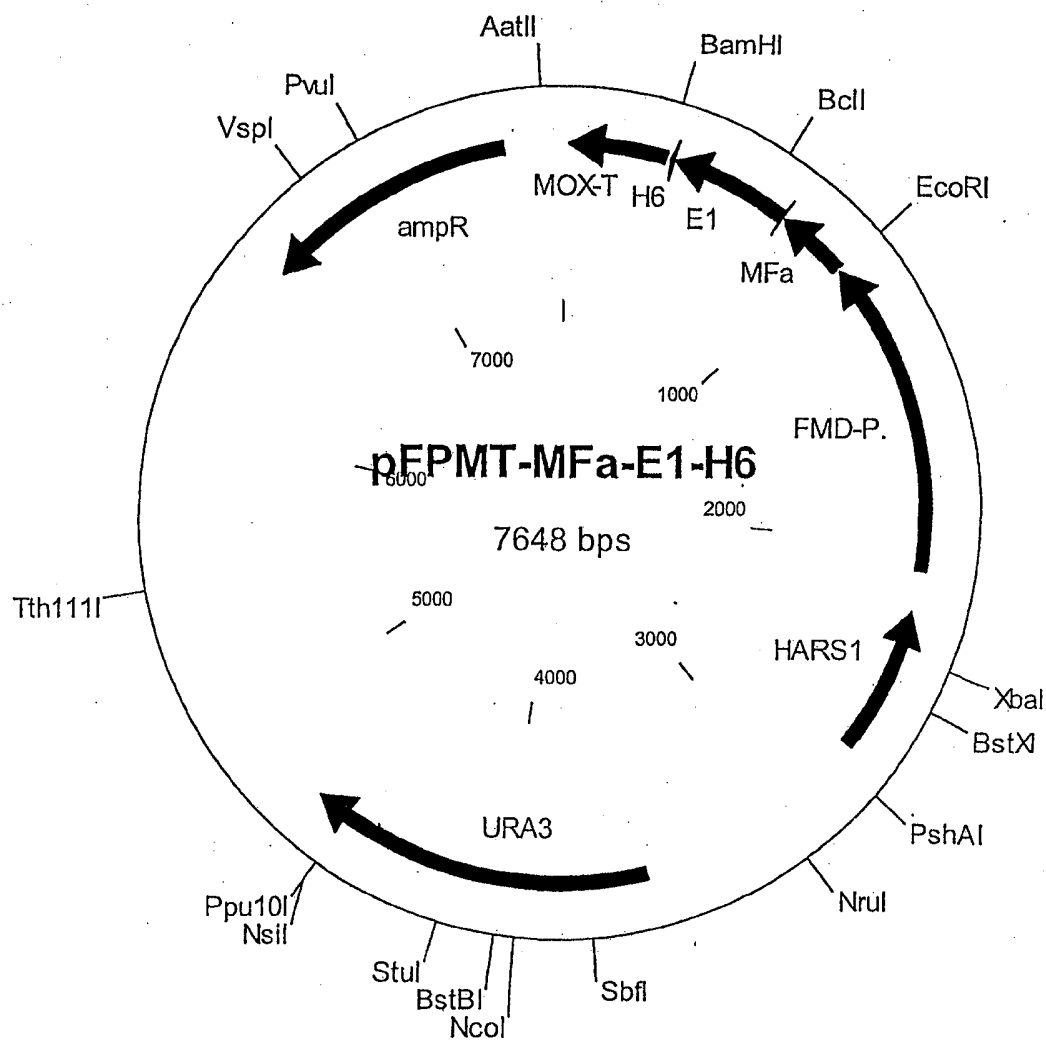
Obr.3

4/70



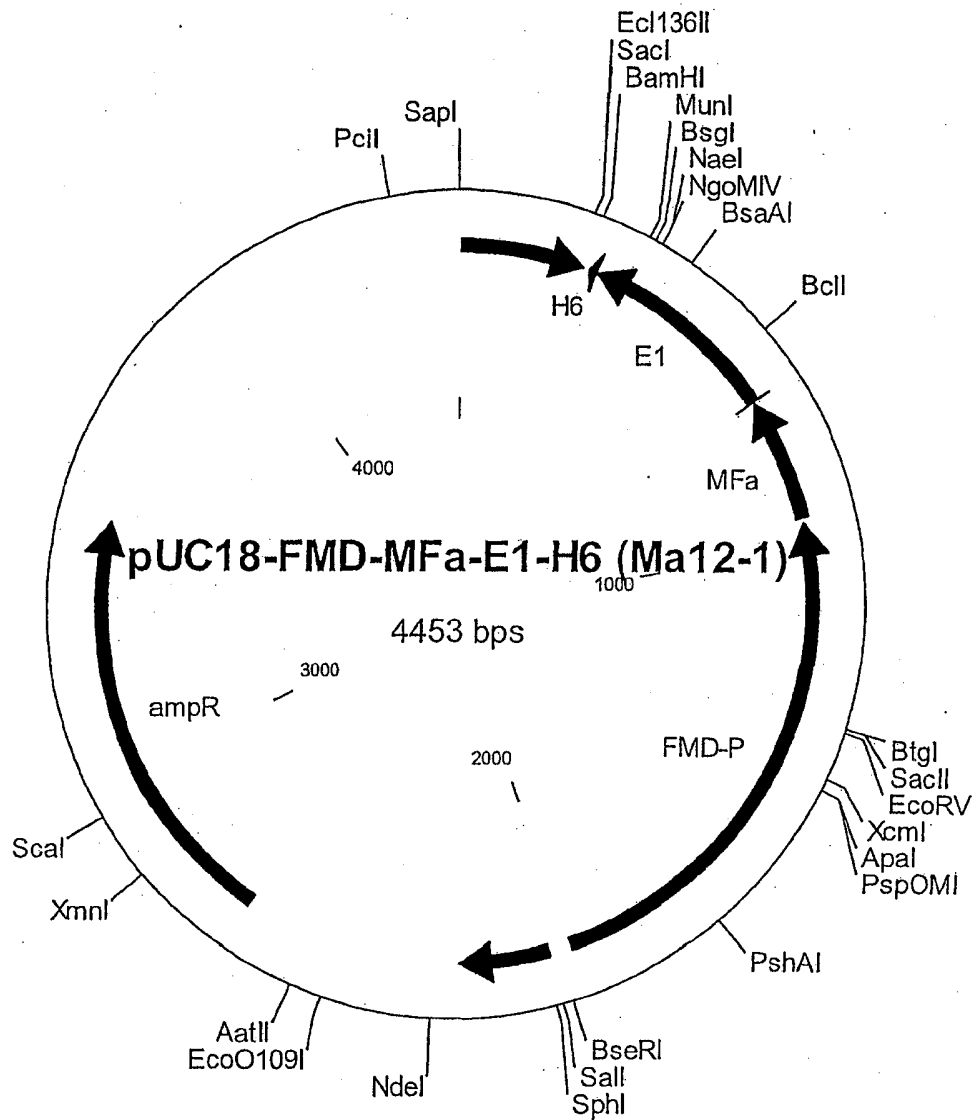
Obr.4

5/70



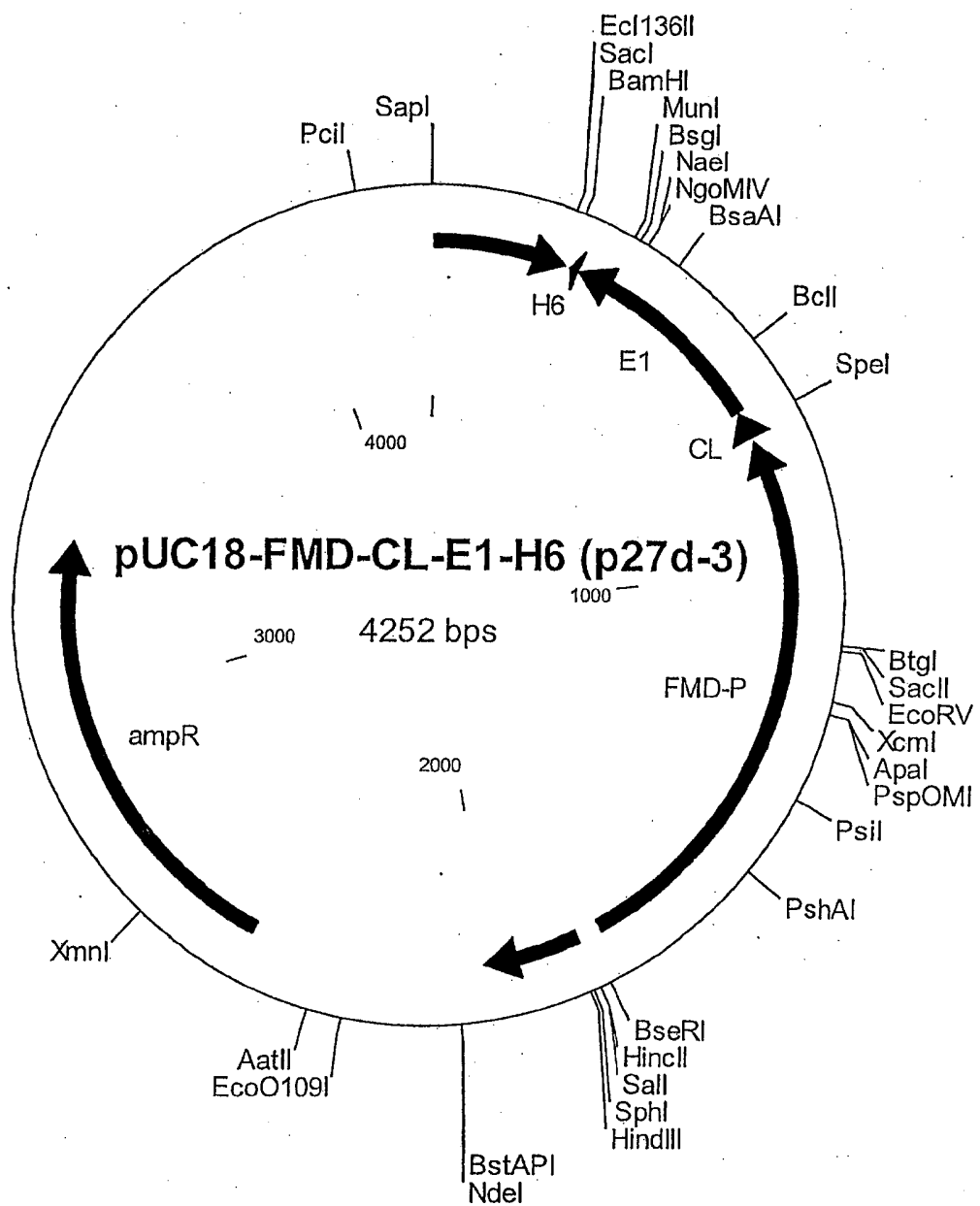
Obr.5

6/70



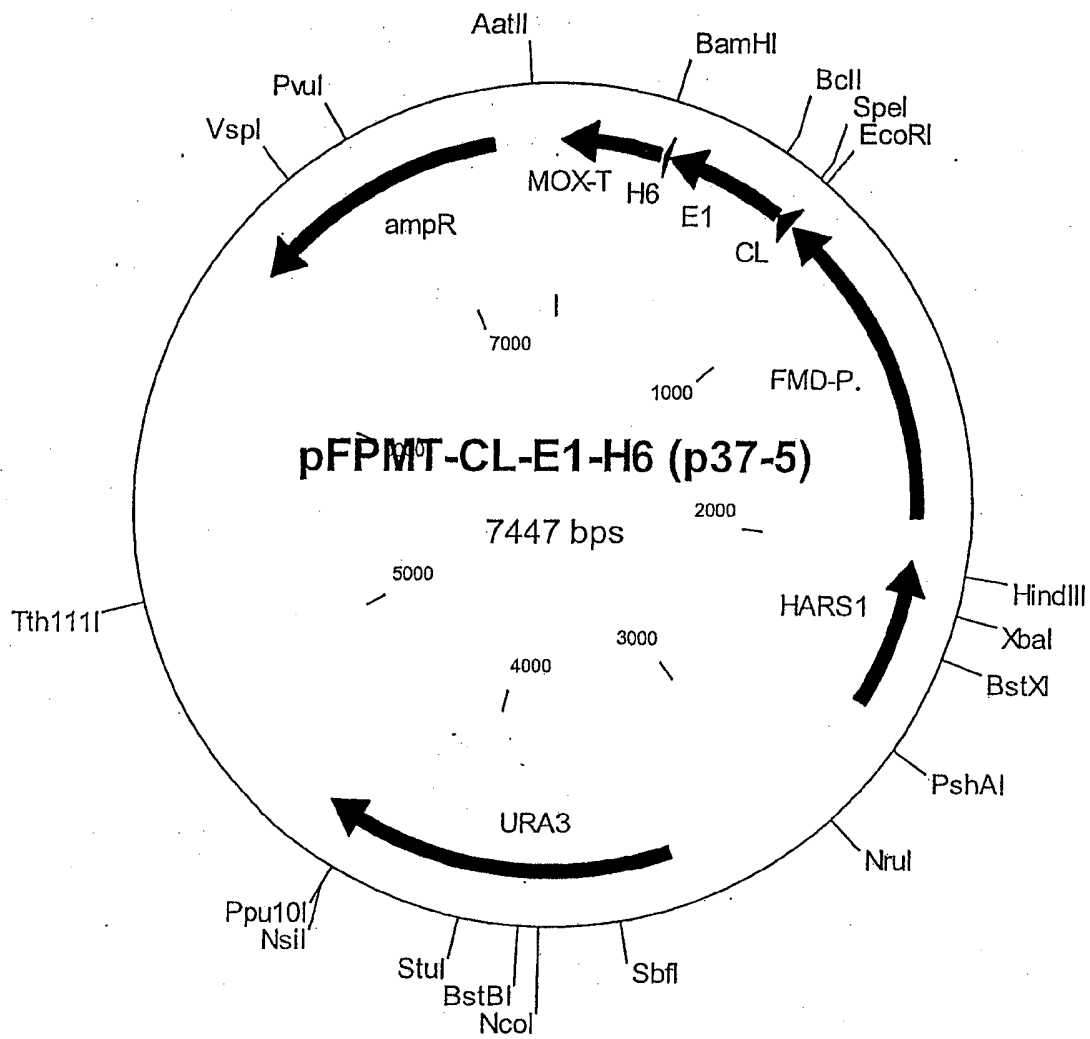
Obr.6

7/70



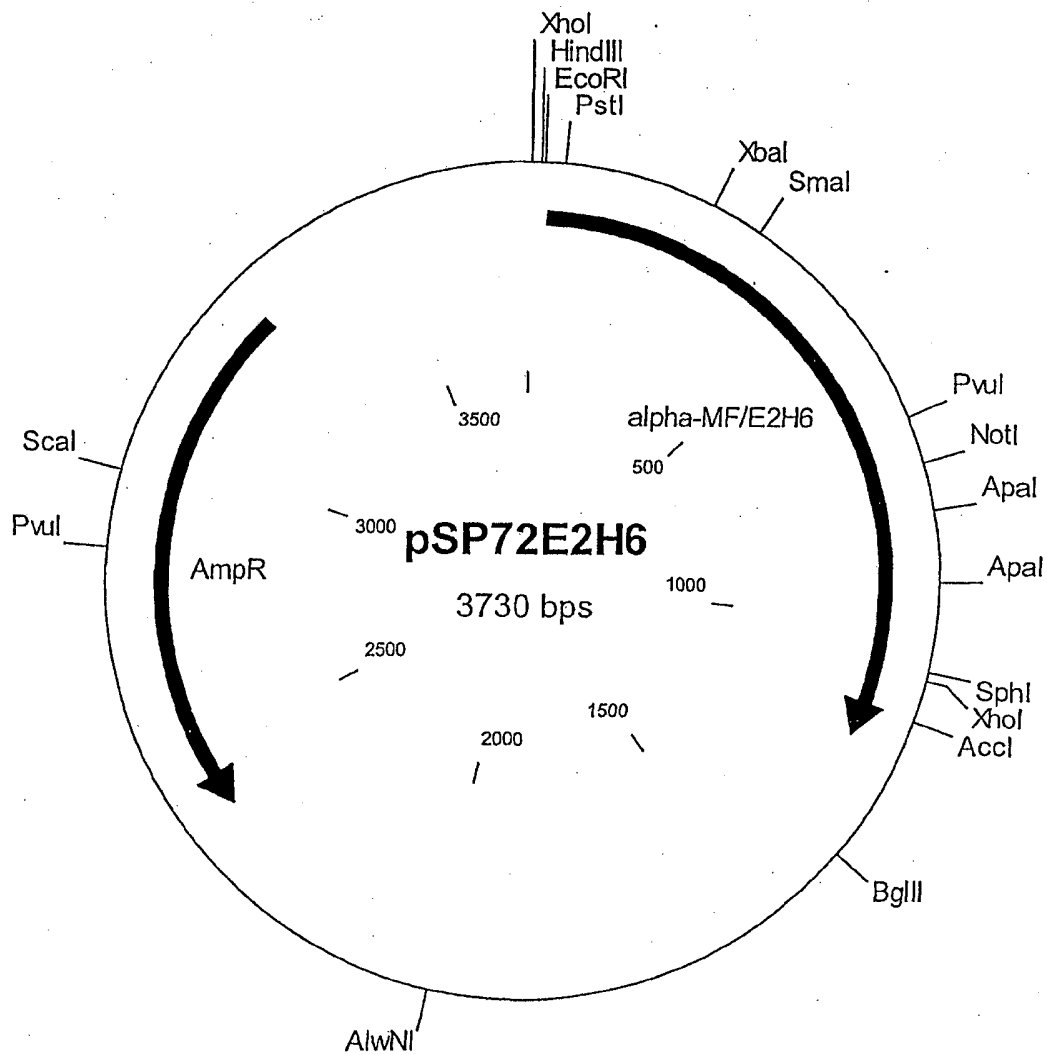
Obr.7

8/70



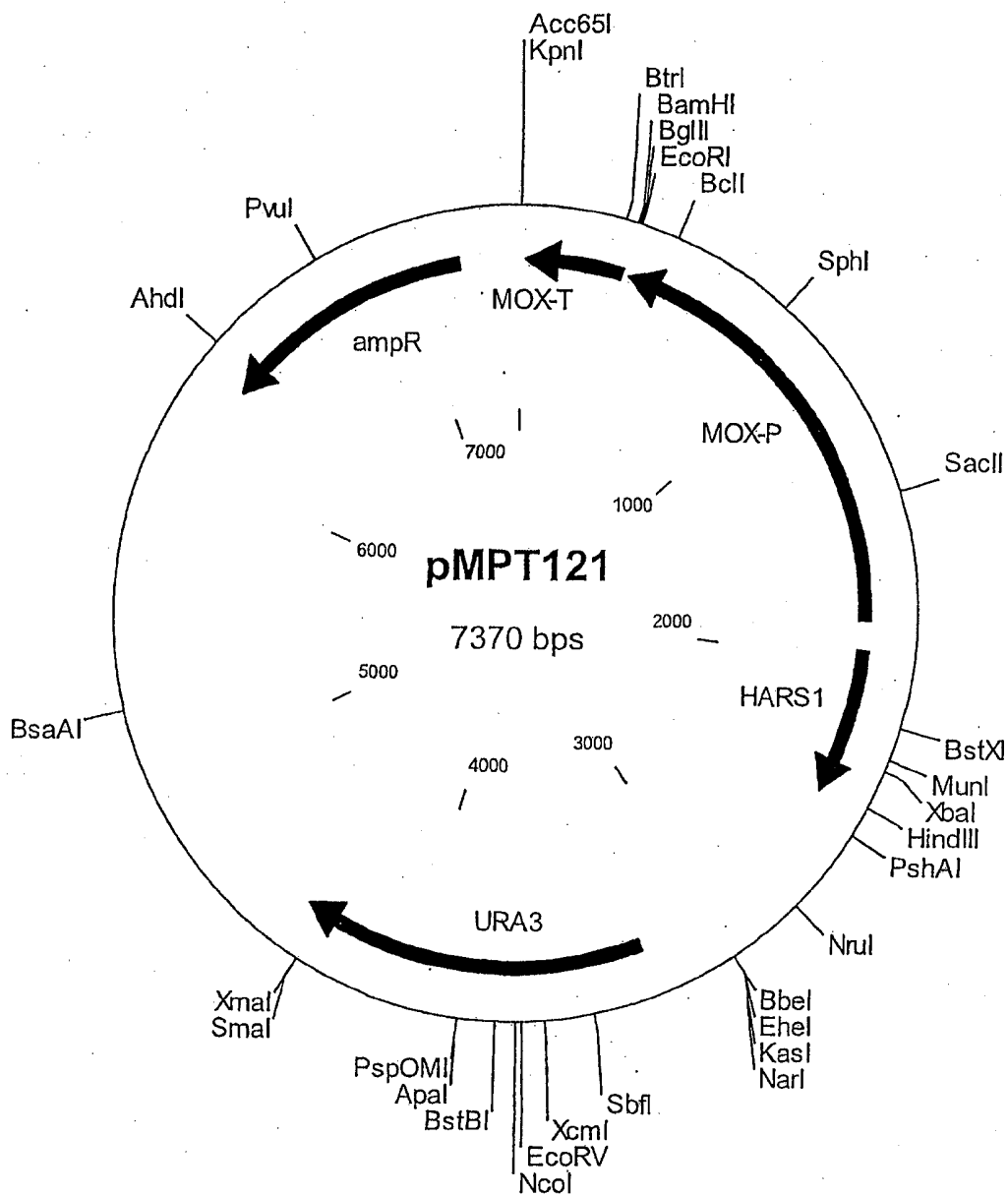
Obr.8

9/70



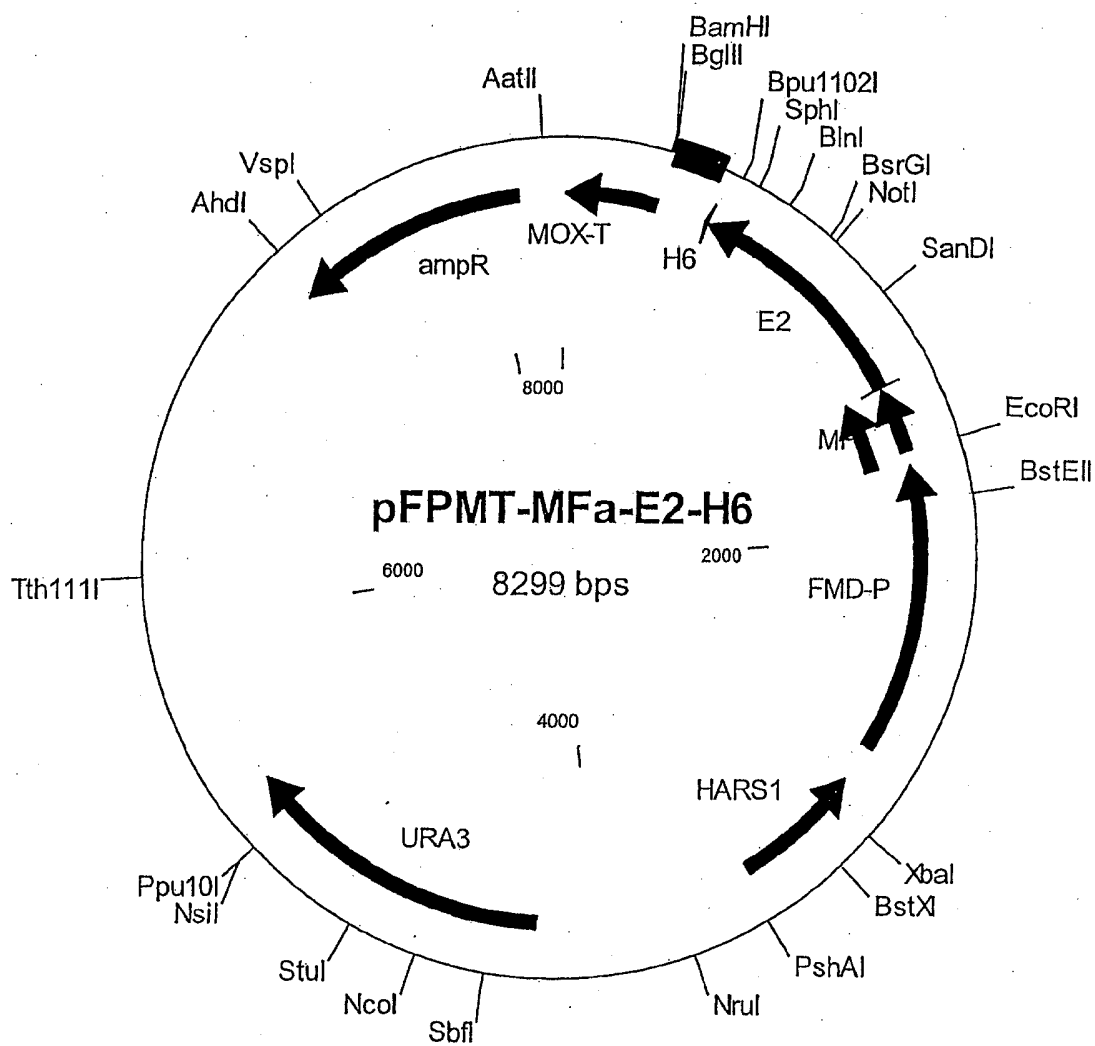
Obr.9

10/70



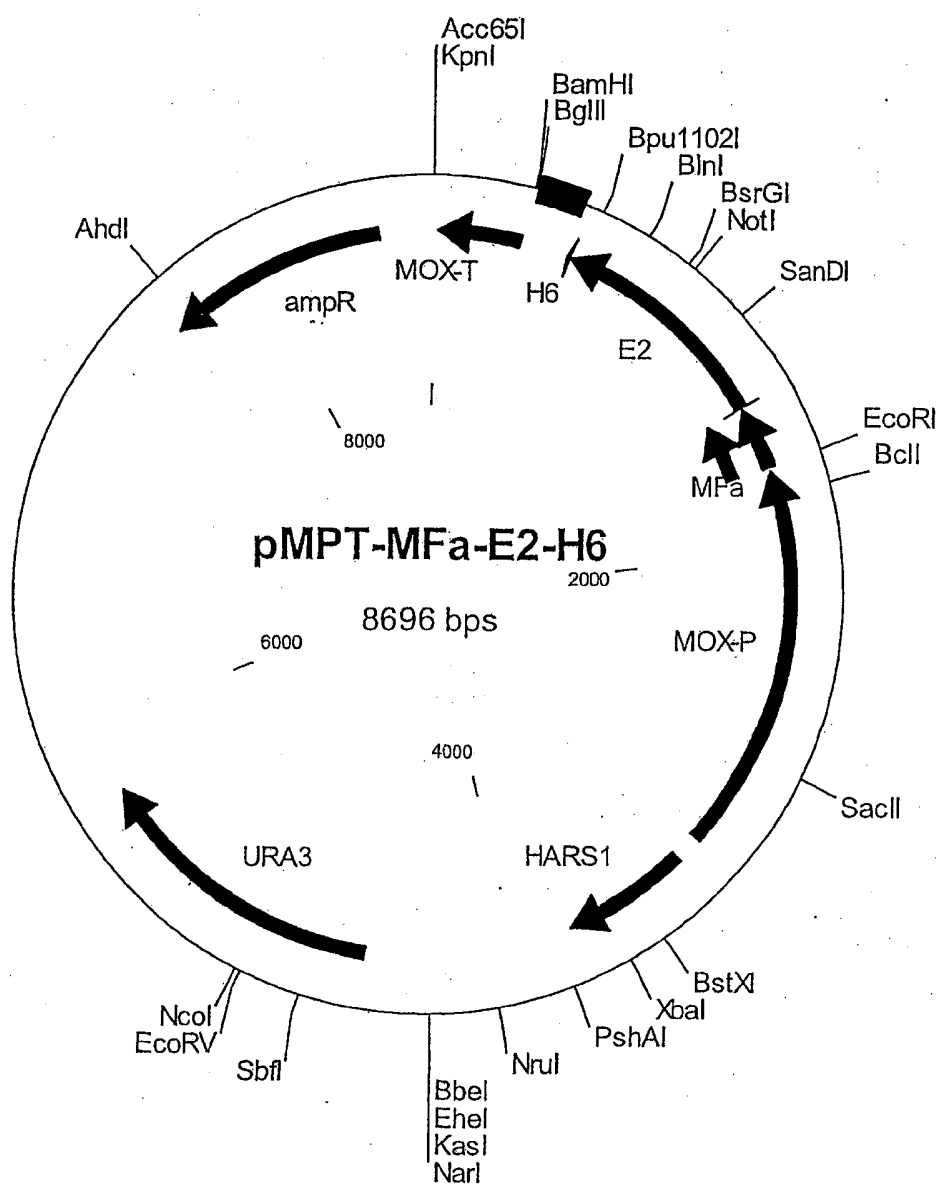
Obr.10

11/70



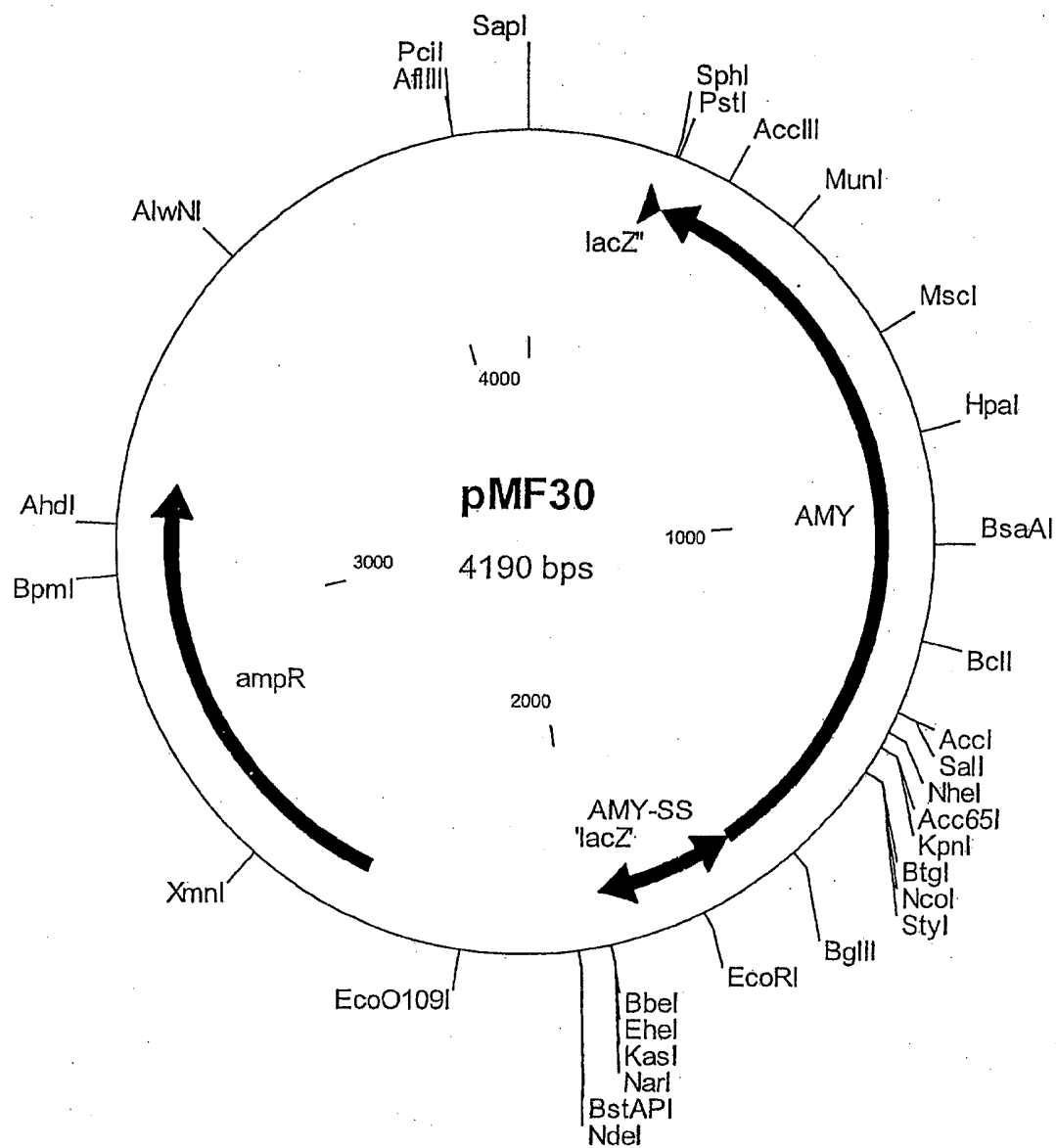
Obr.11

12/70



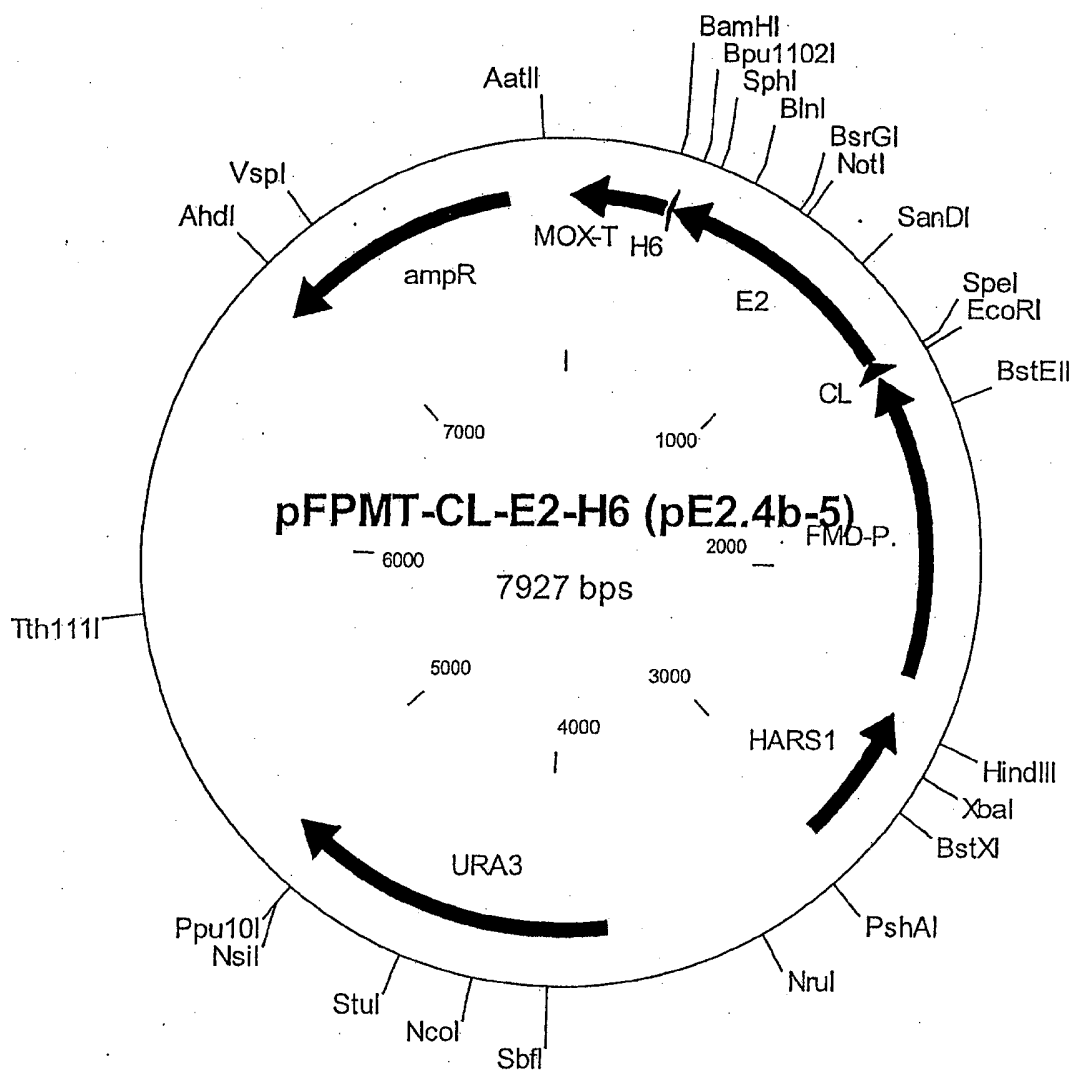
Obr.12

13/70



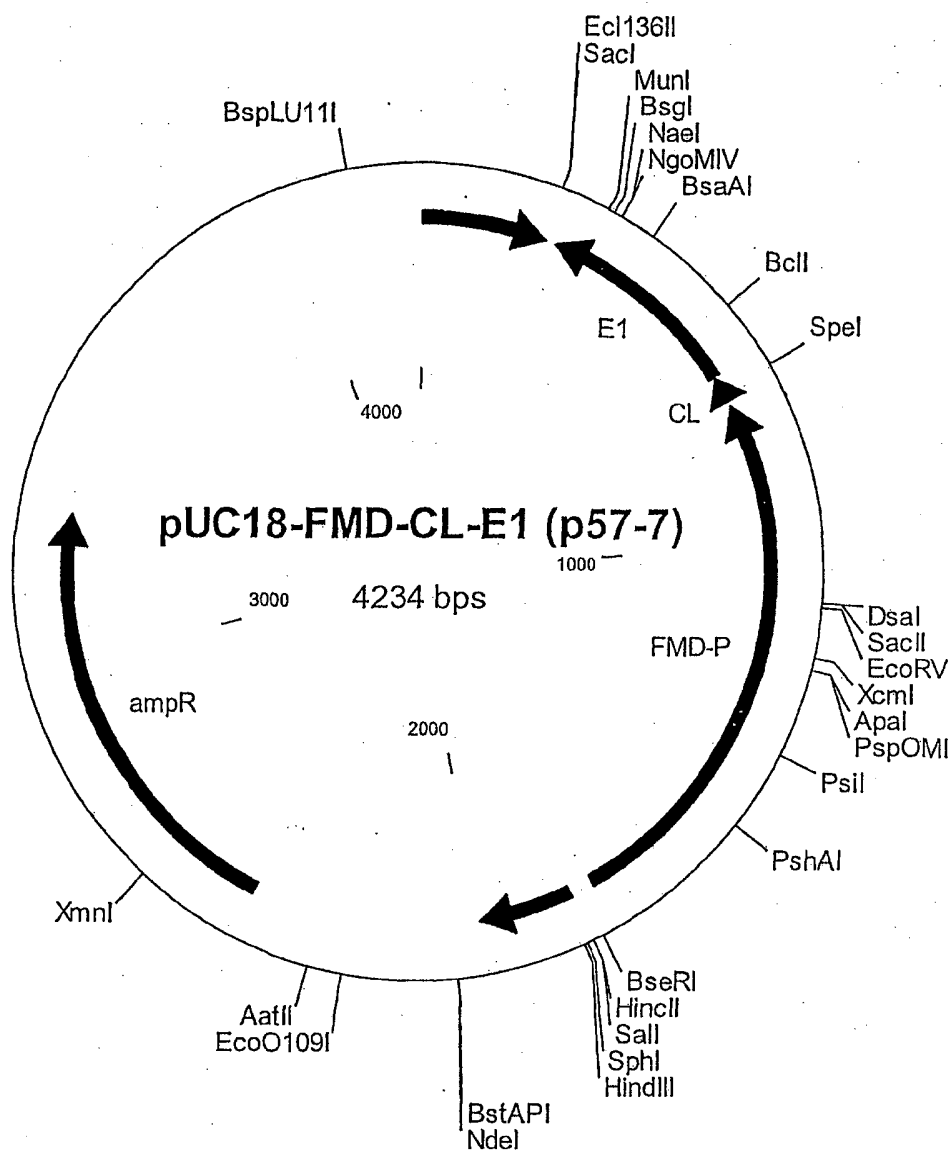
Obr.13

14/70



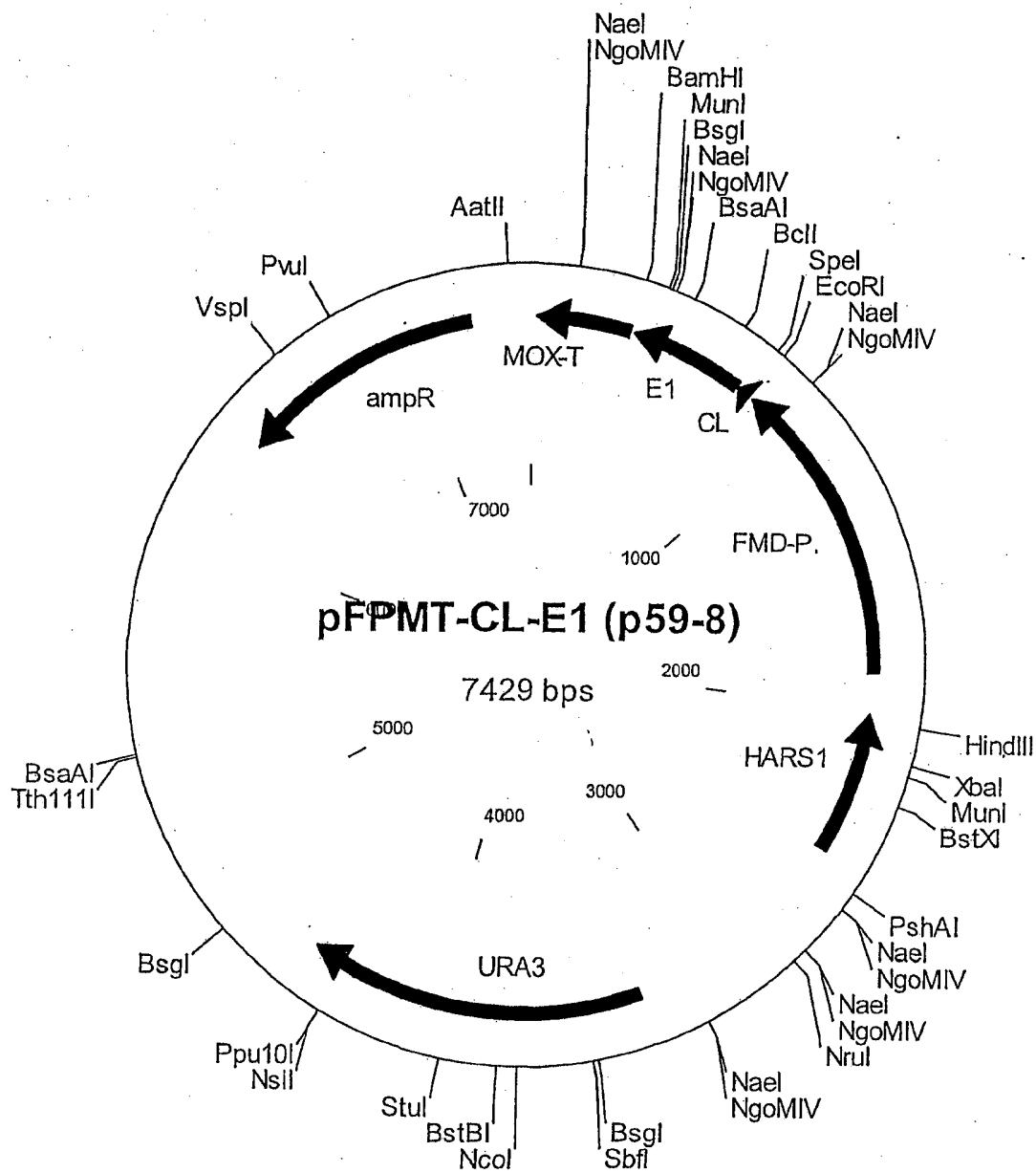
Obr.14

15/70



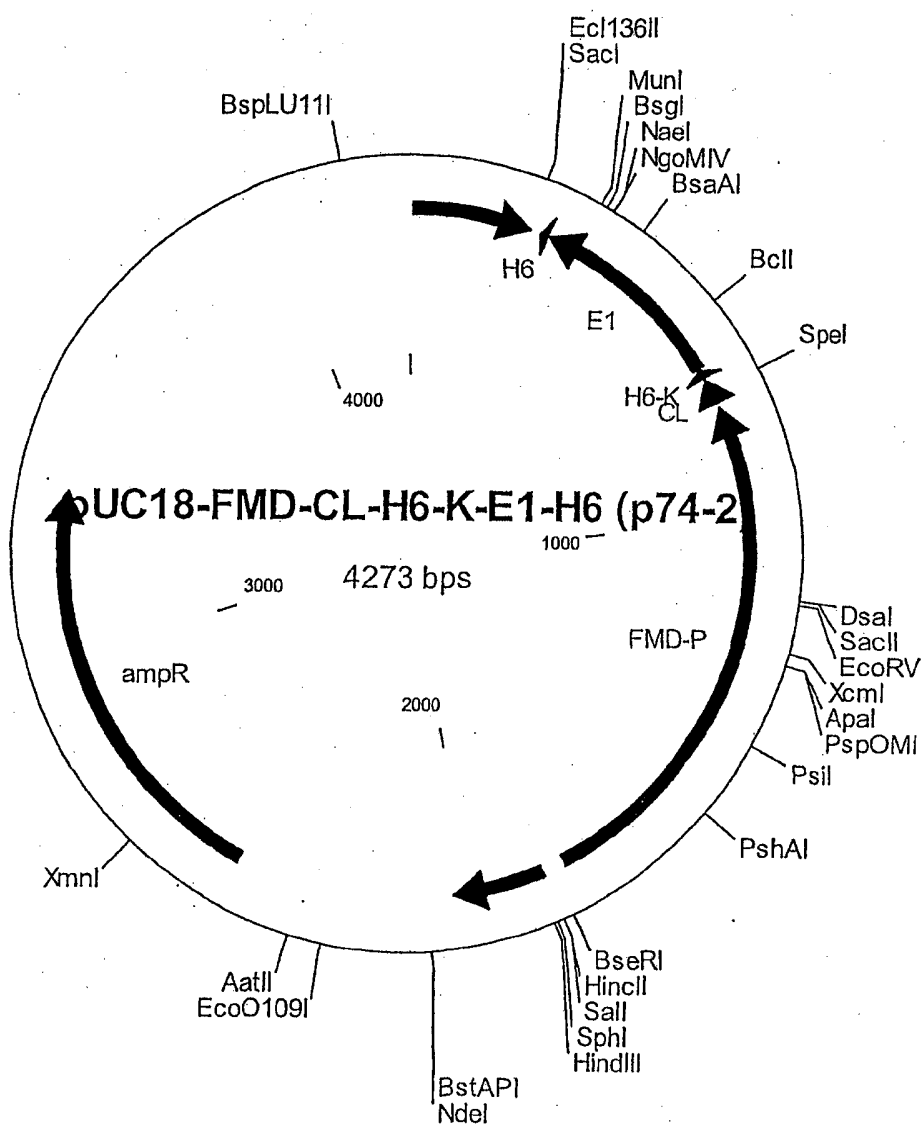
Obr.15

16/70



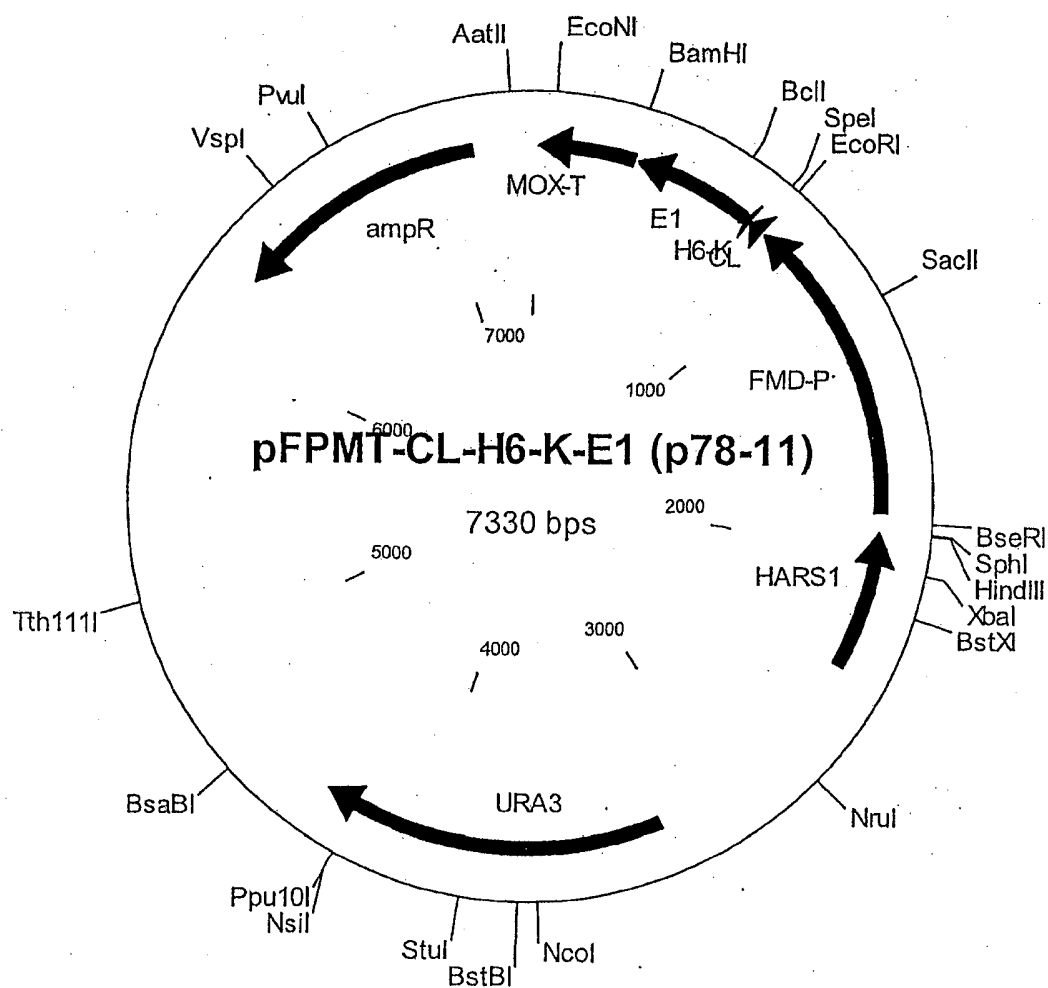
Obr.16

17/70



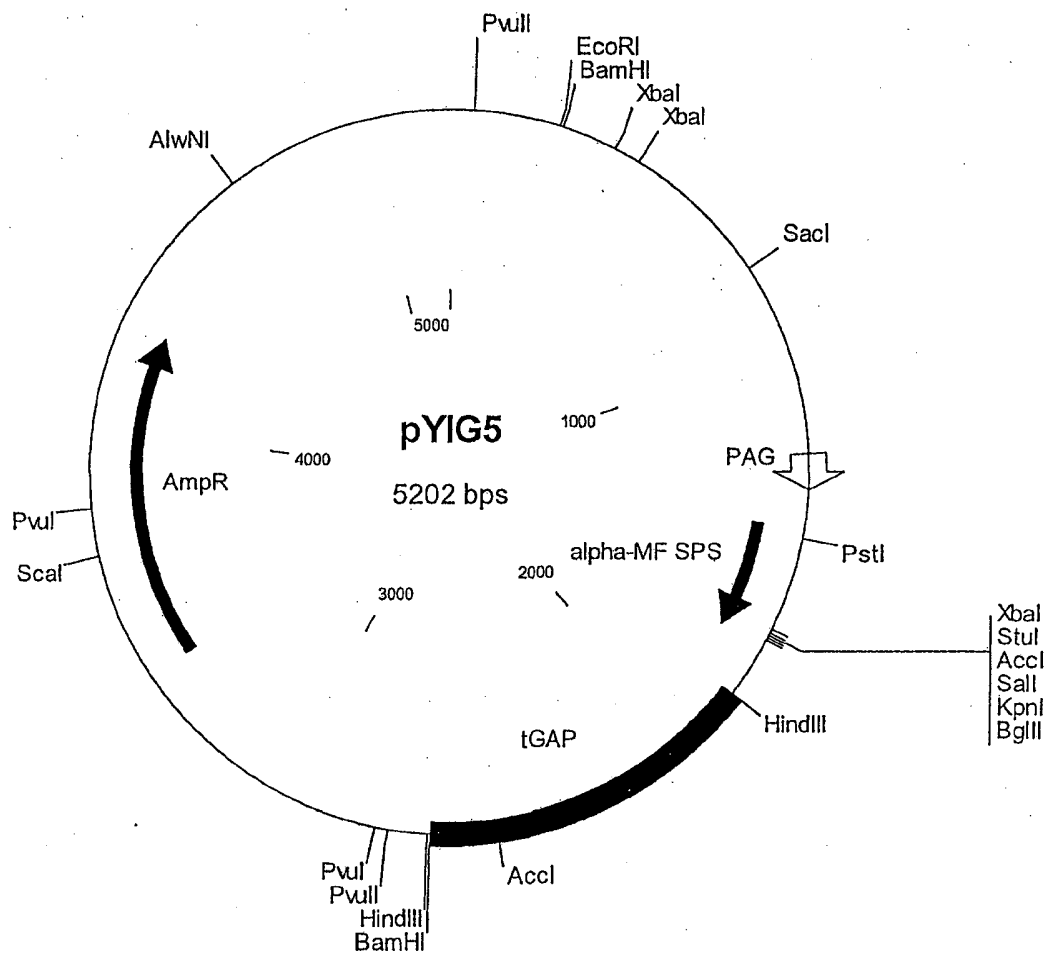
Obr.17

18/70



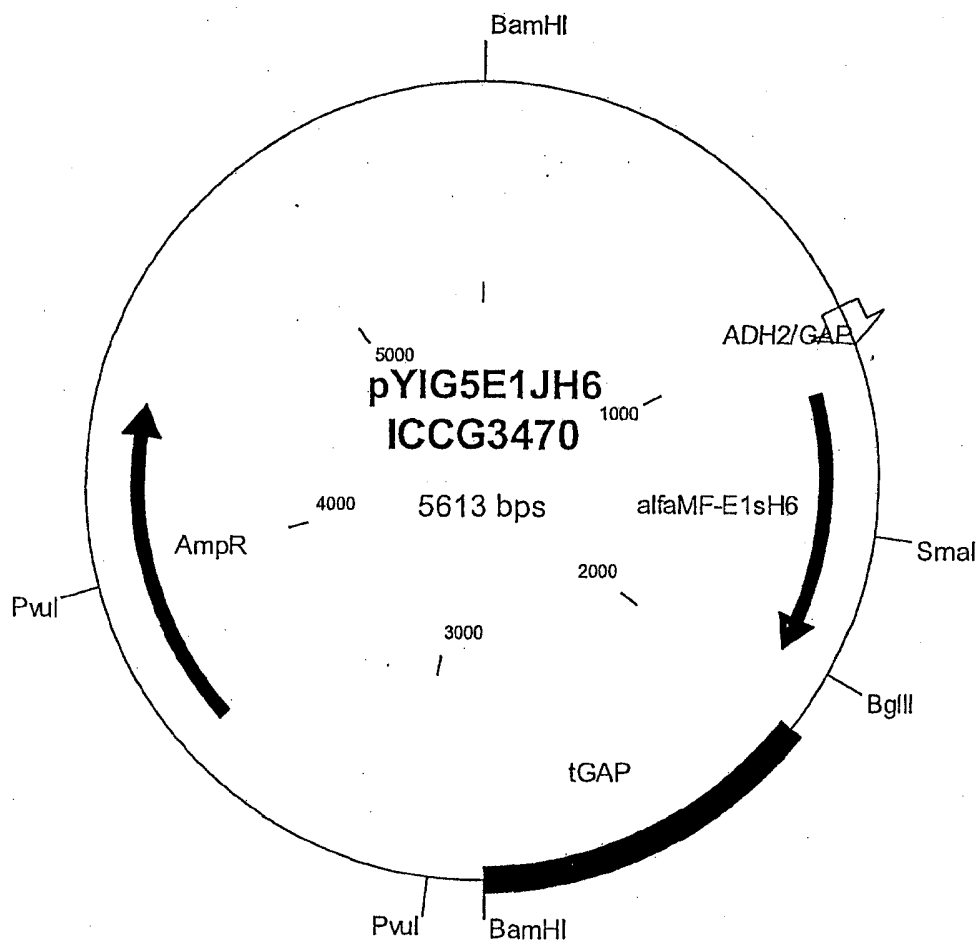
Obr.18

19/70



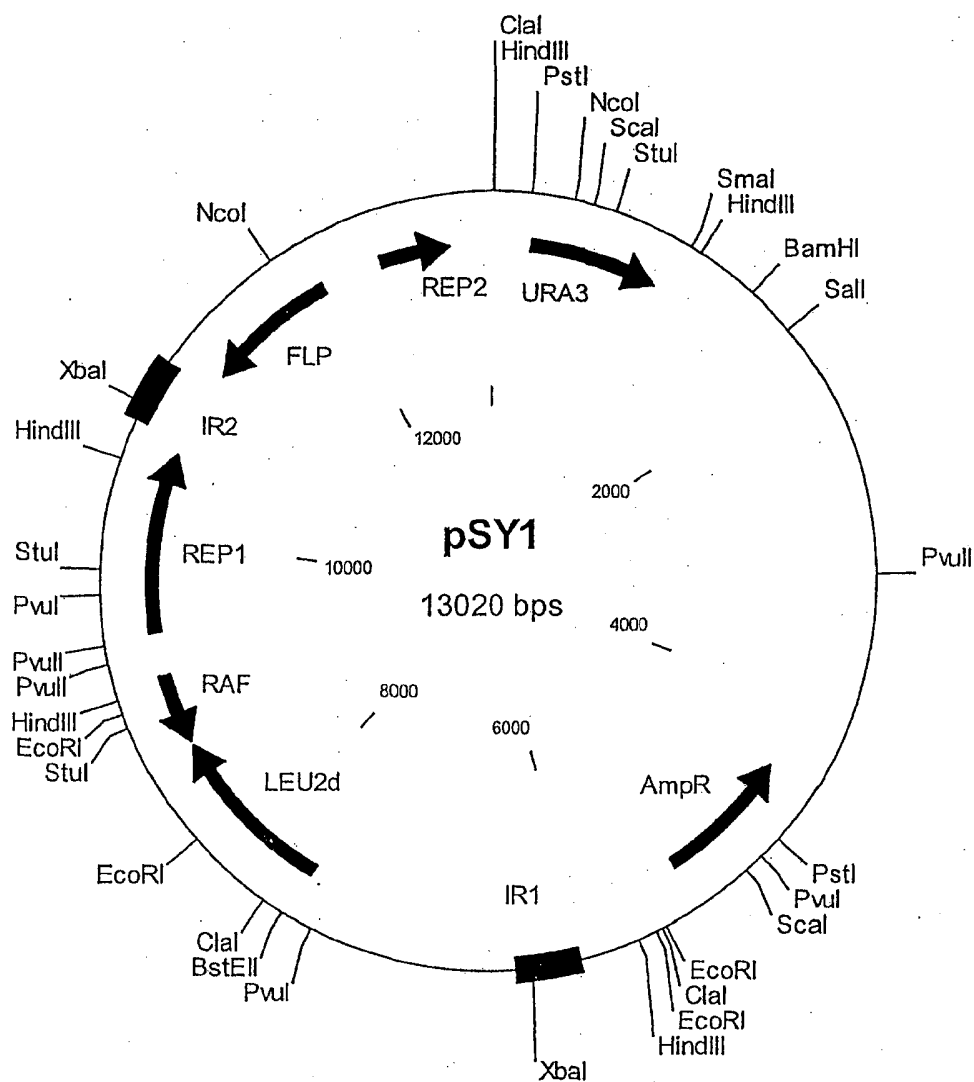
Obr.19

20/70



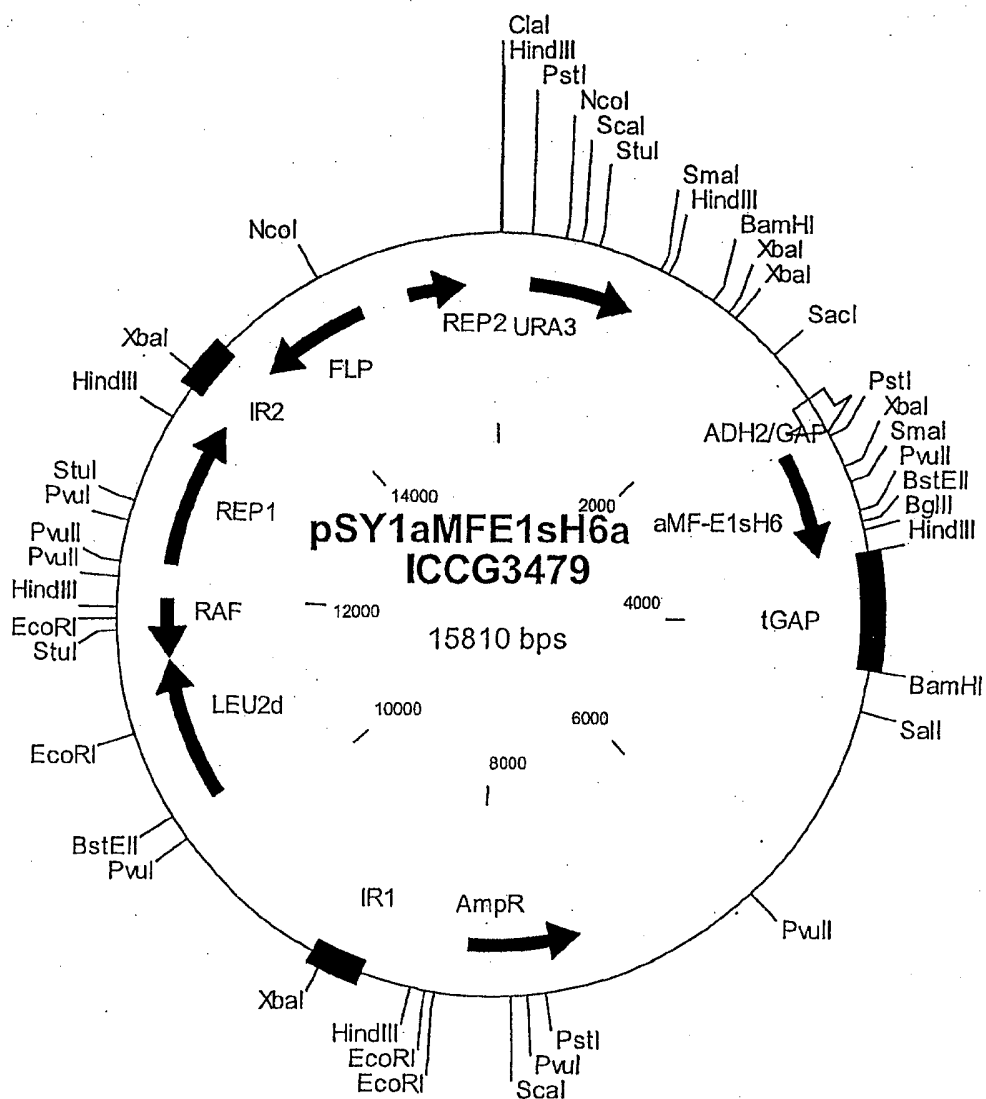
Obr.20

21/70



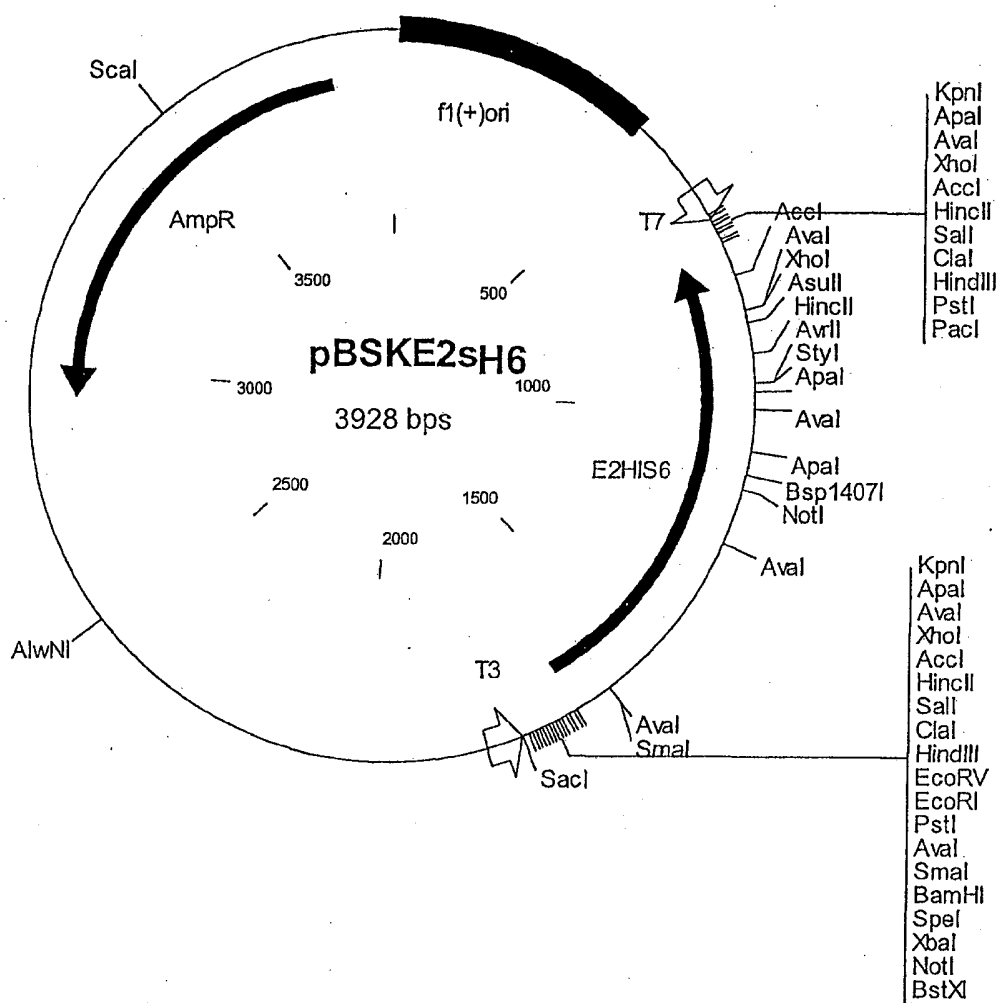
Obr.21

22/70



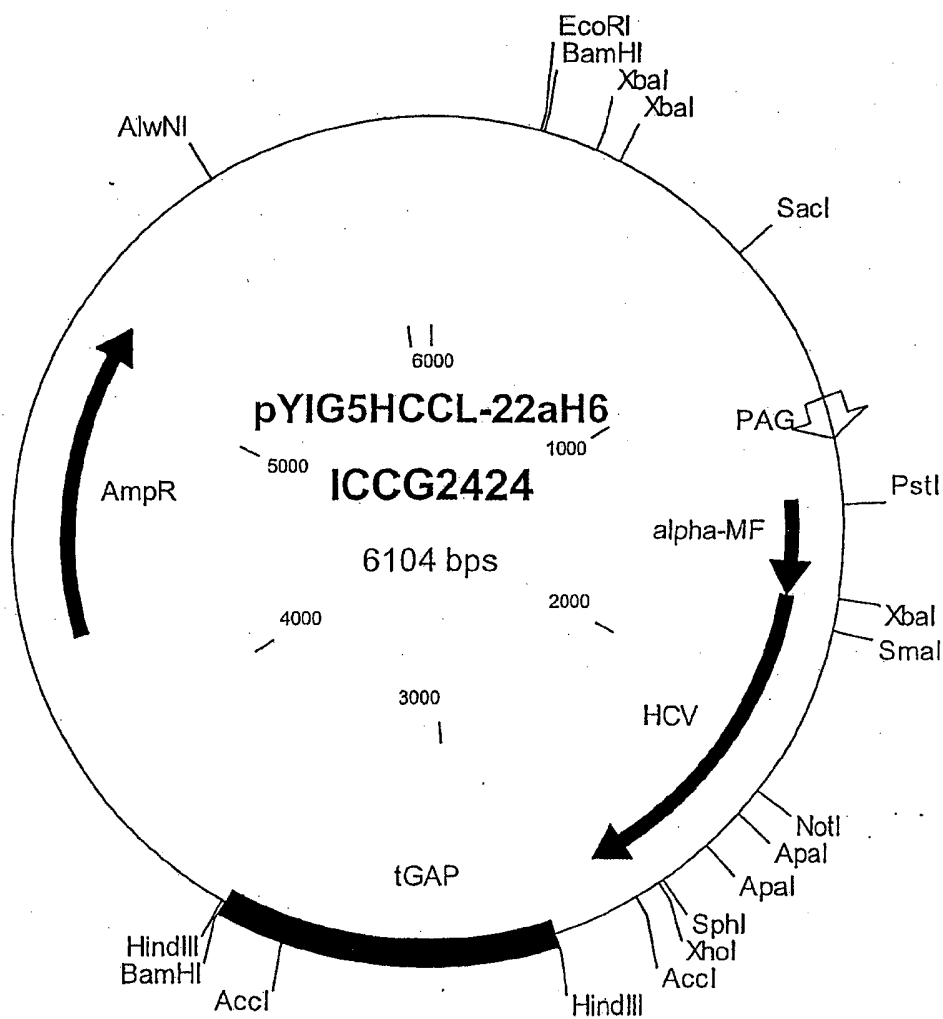
Obr.22

23/70



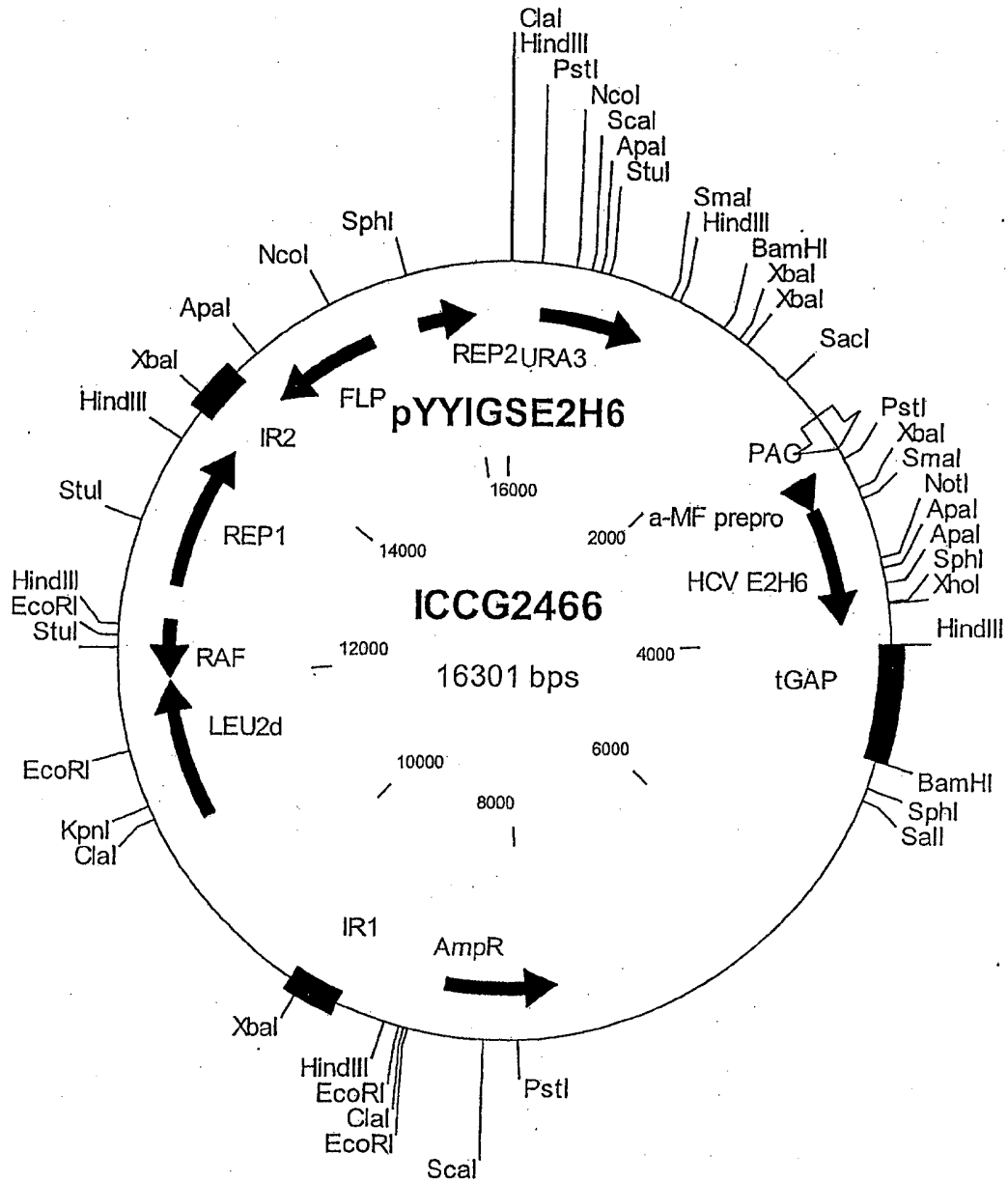
Obr.23

24/70



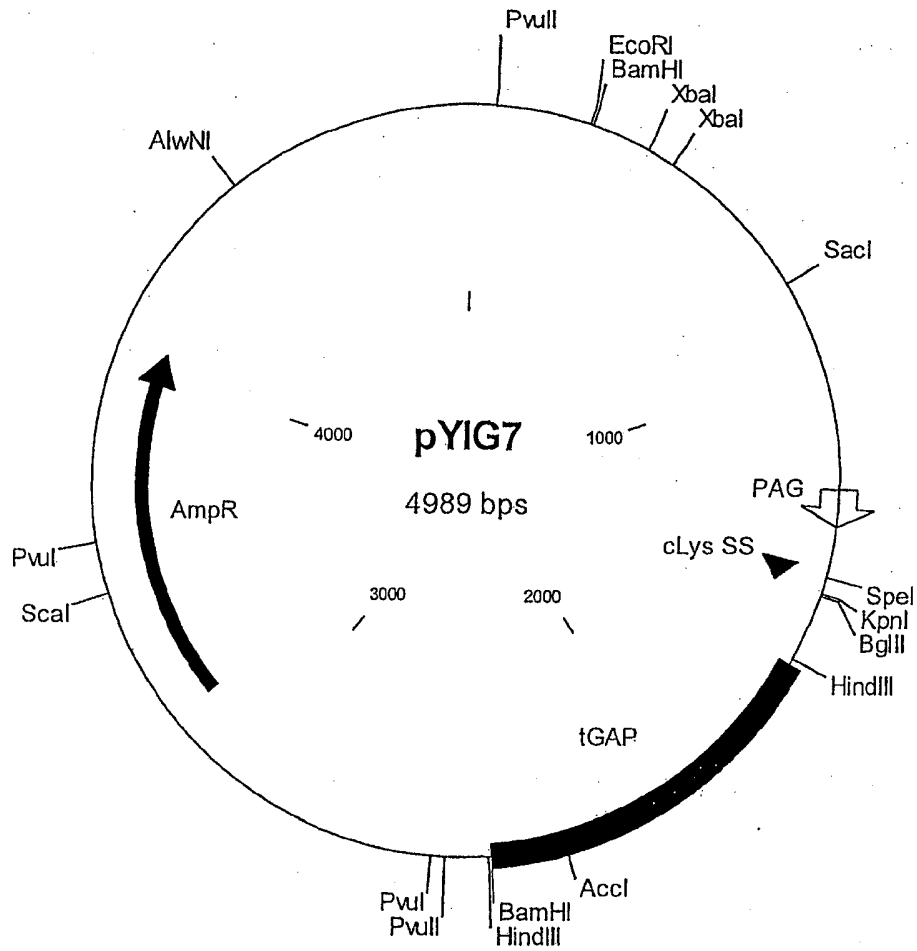
Obr.24

25/70



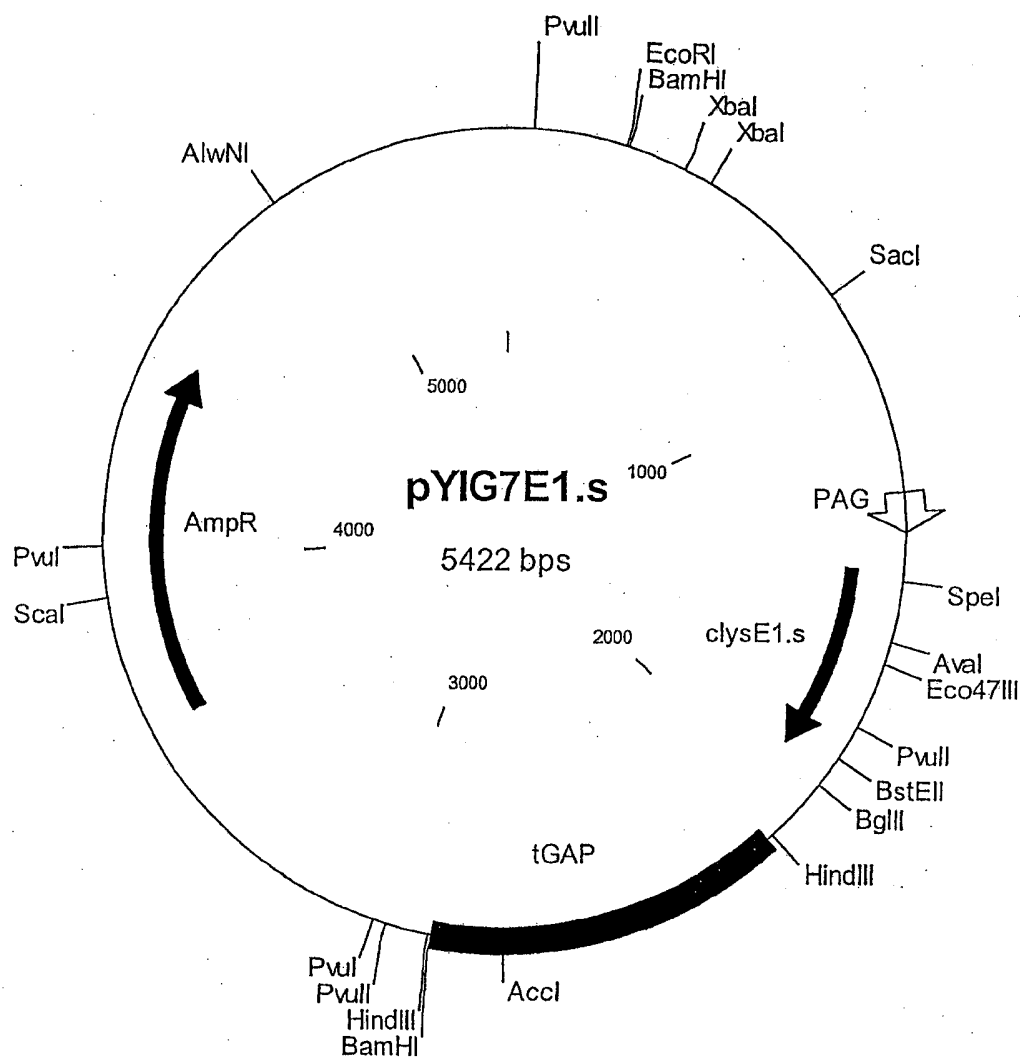
Obr.25

26/70



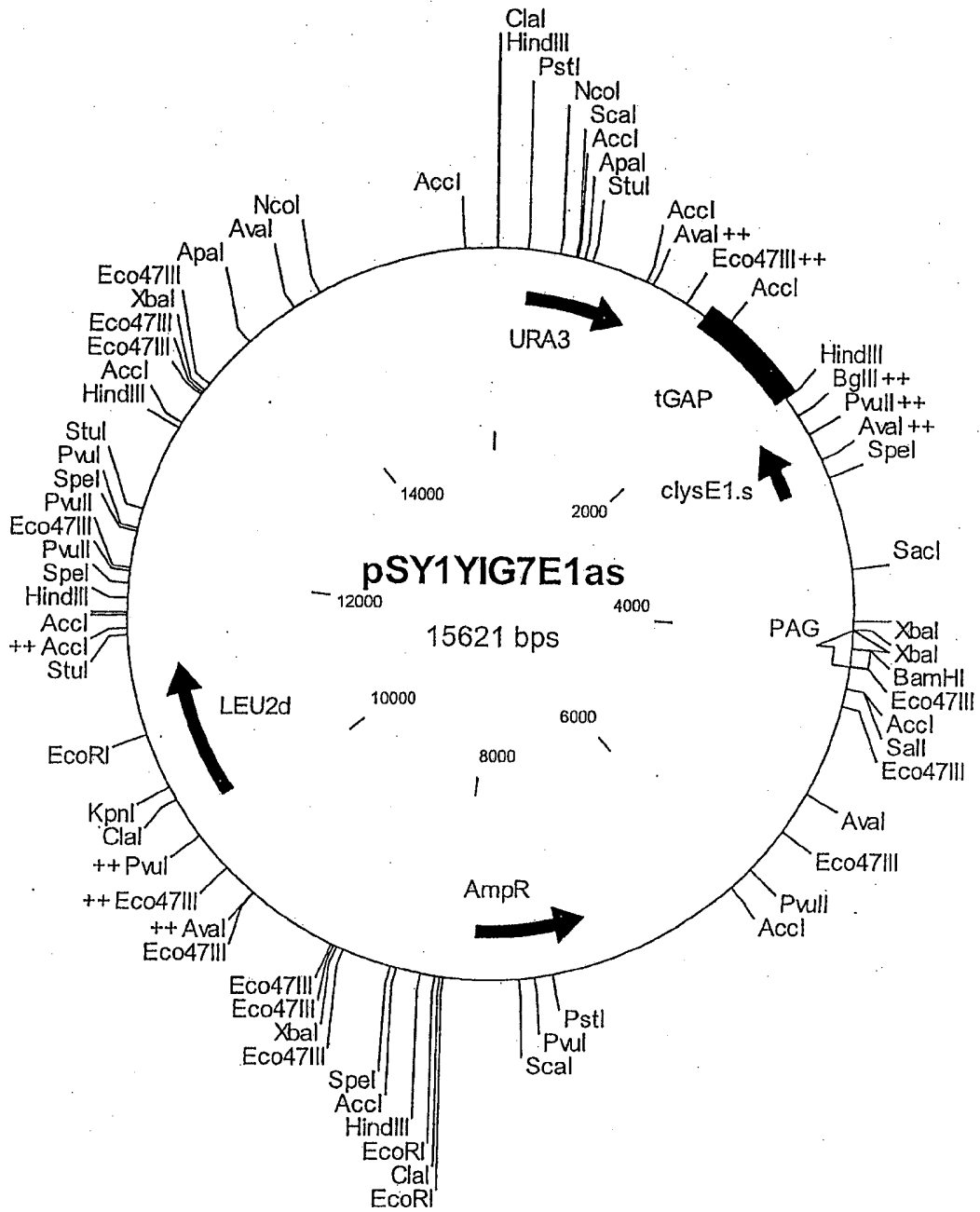
Obr.26

27/70



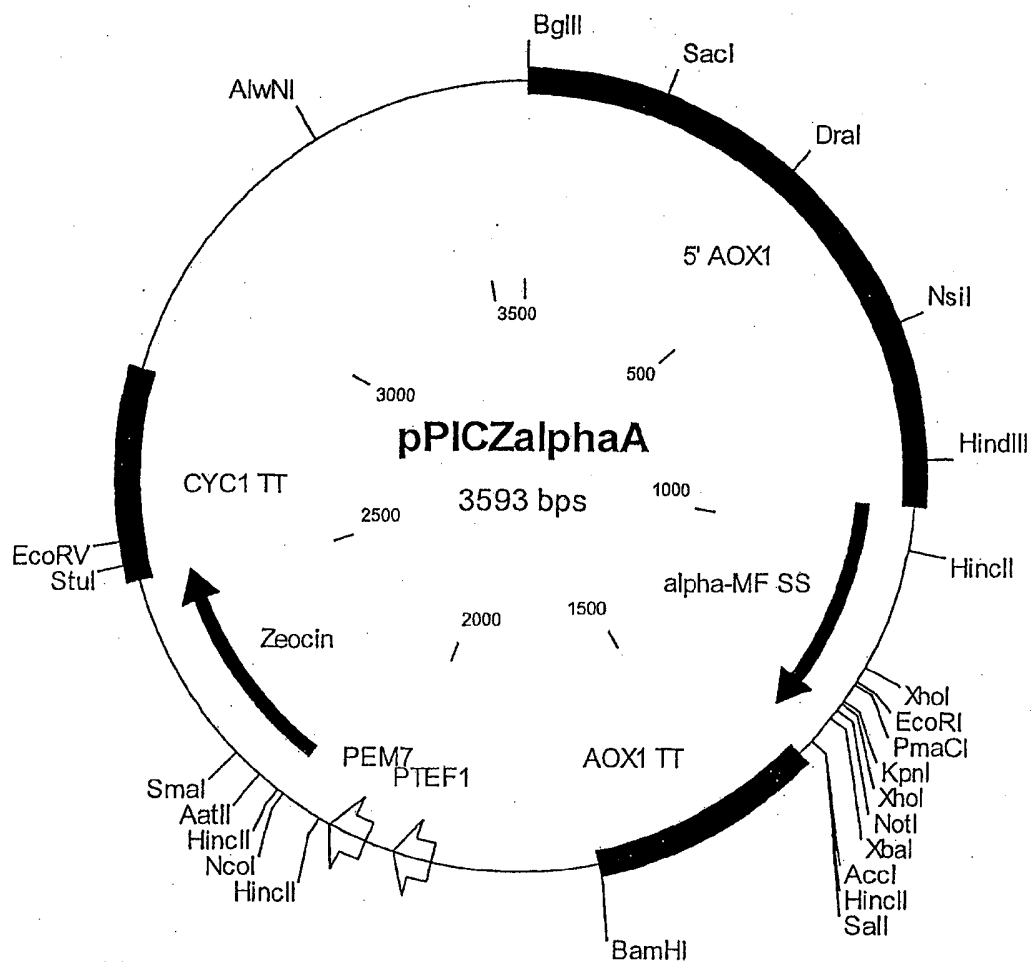
Obr.27

28/70



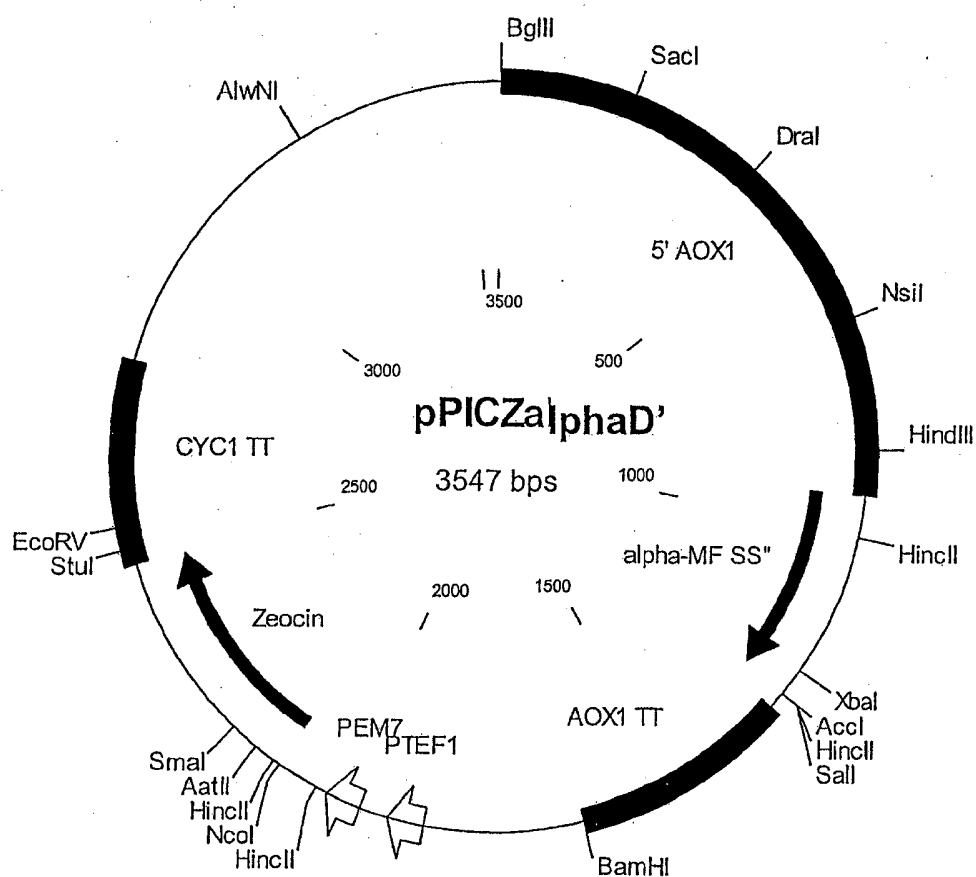
Obr.28

29/70



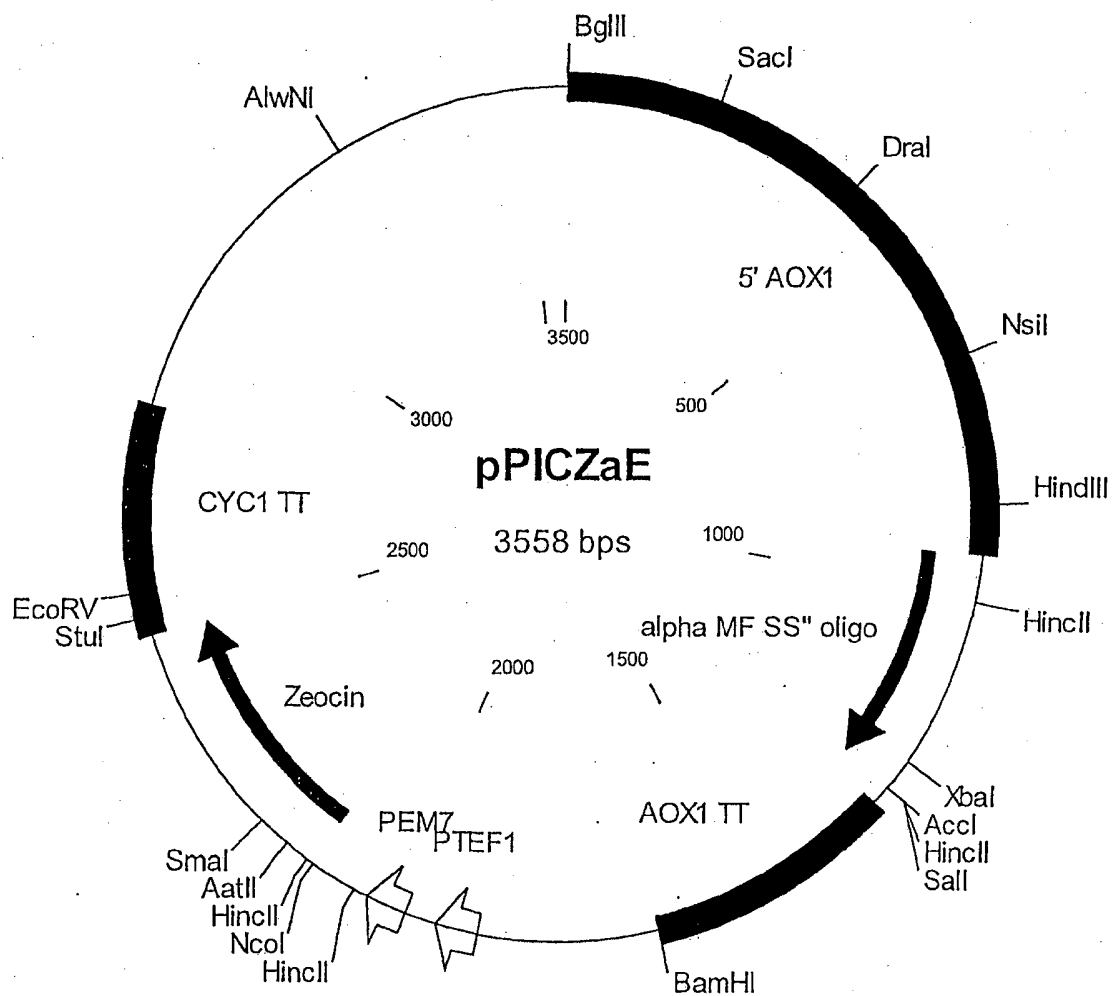
Obr.29

30/70



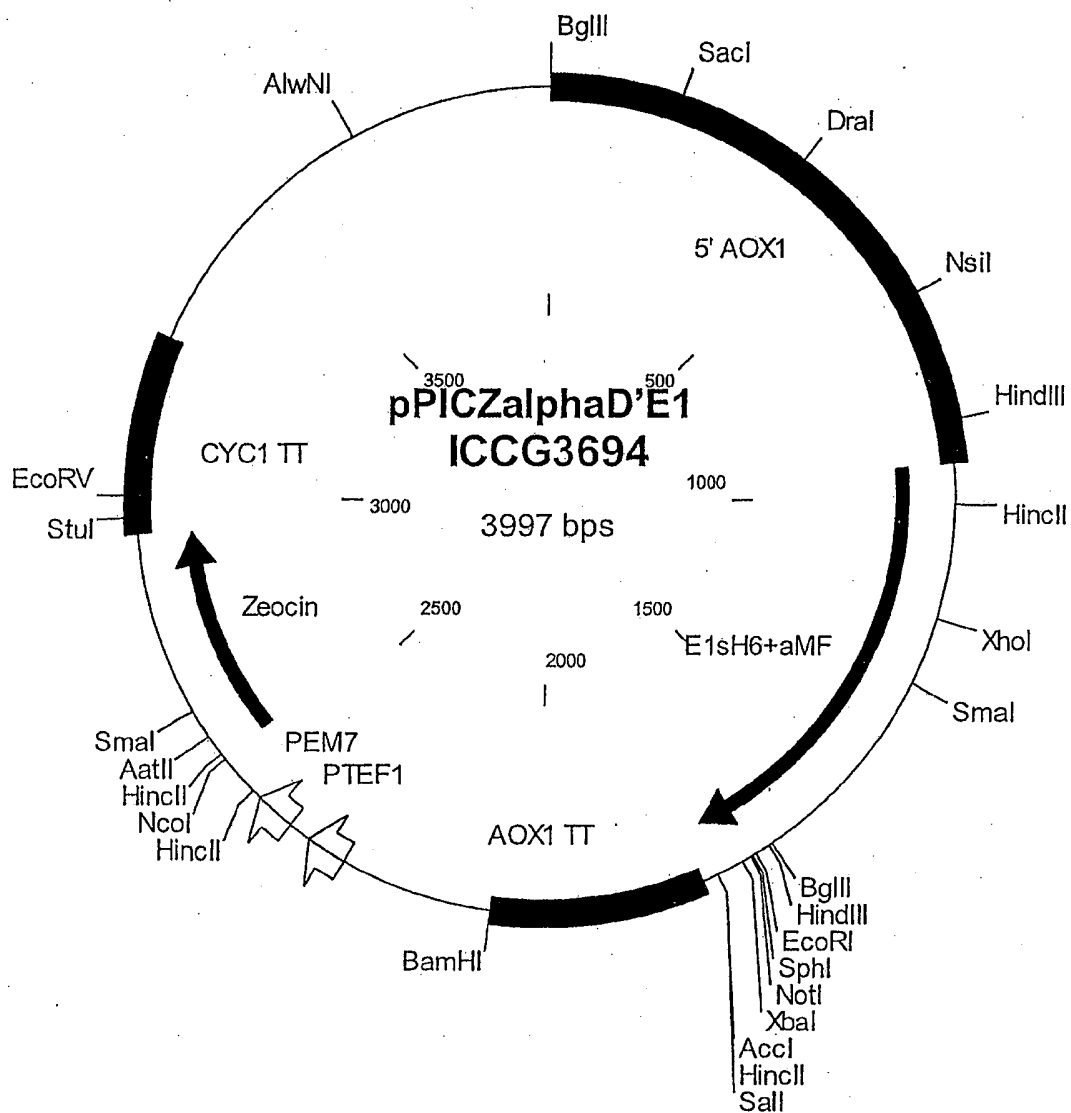
Obr.30

31/70



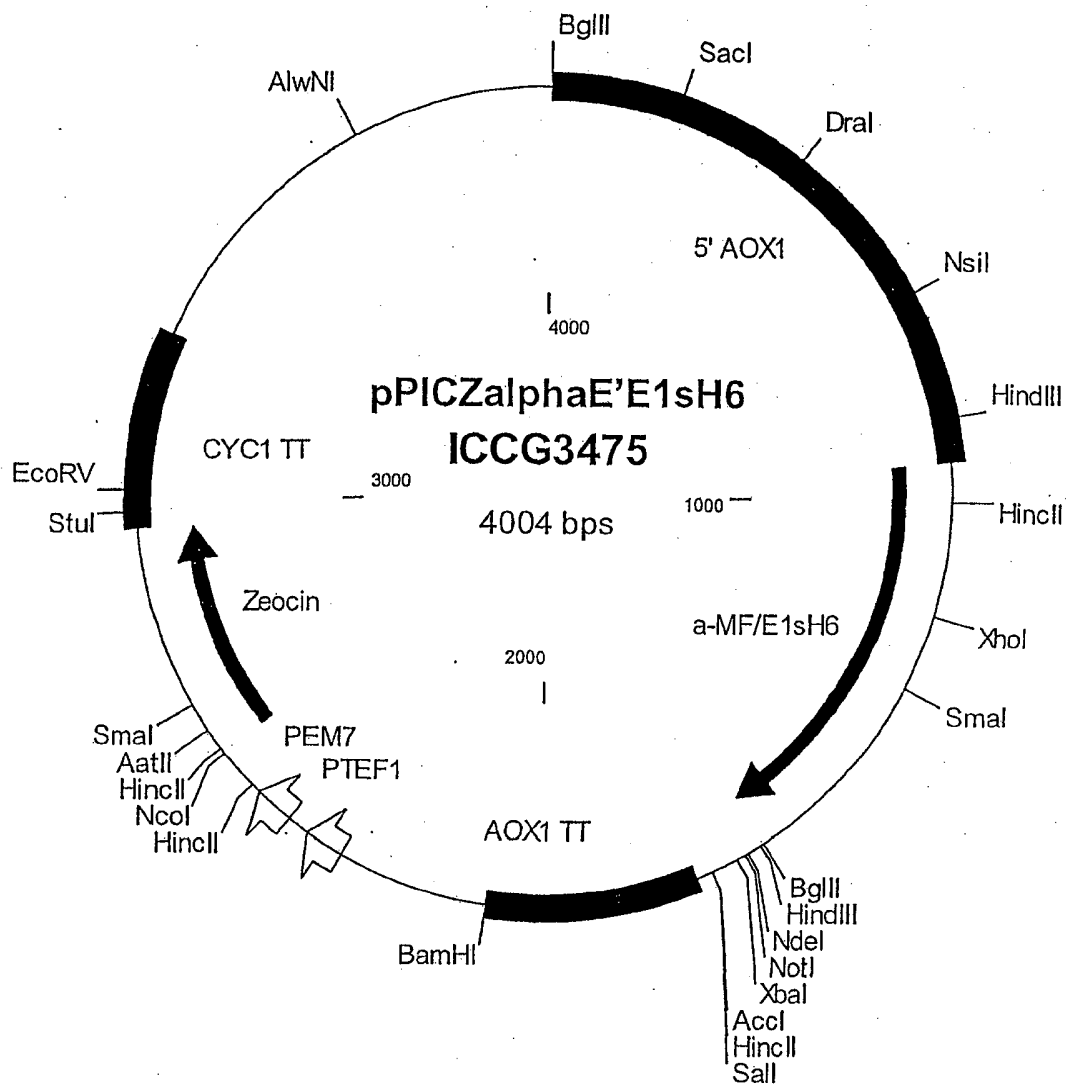
Obr.31

32/70



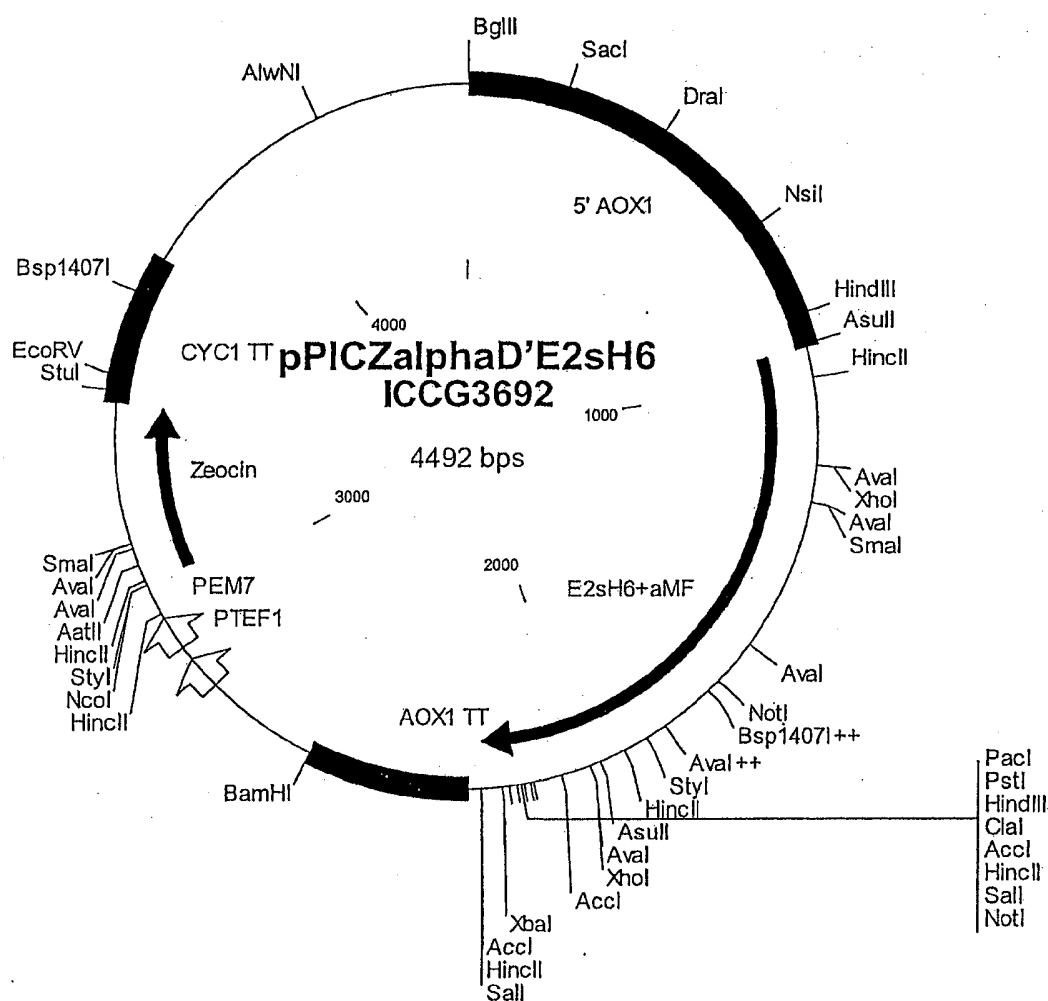
Obr.32

33/70



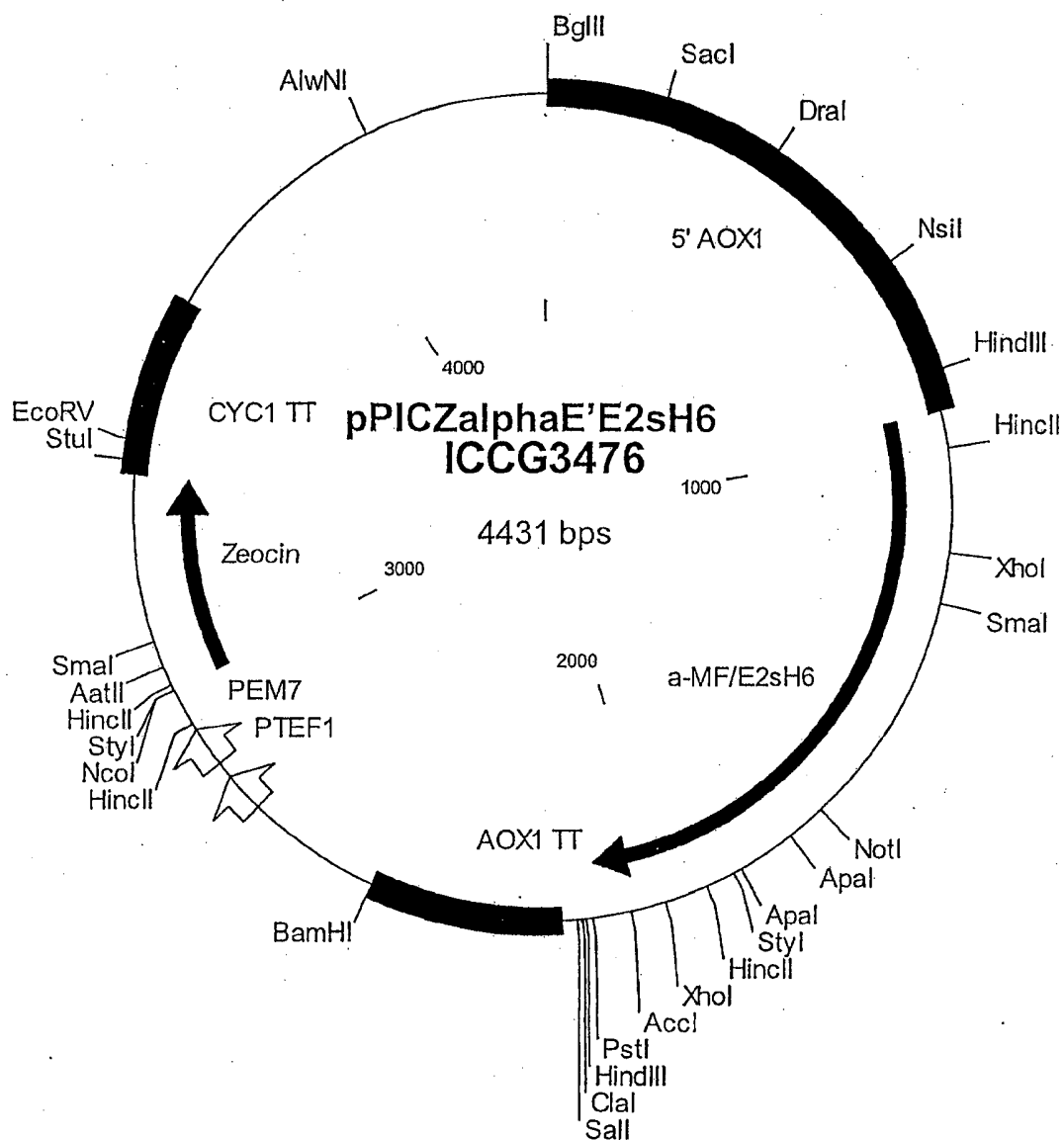
Obr.33

34/70



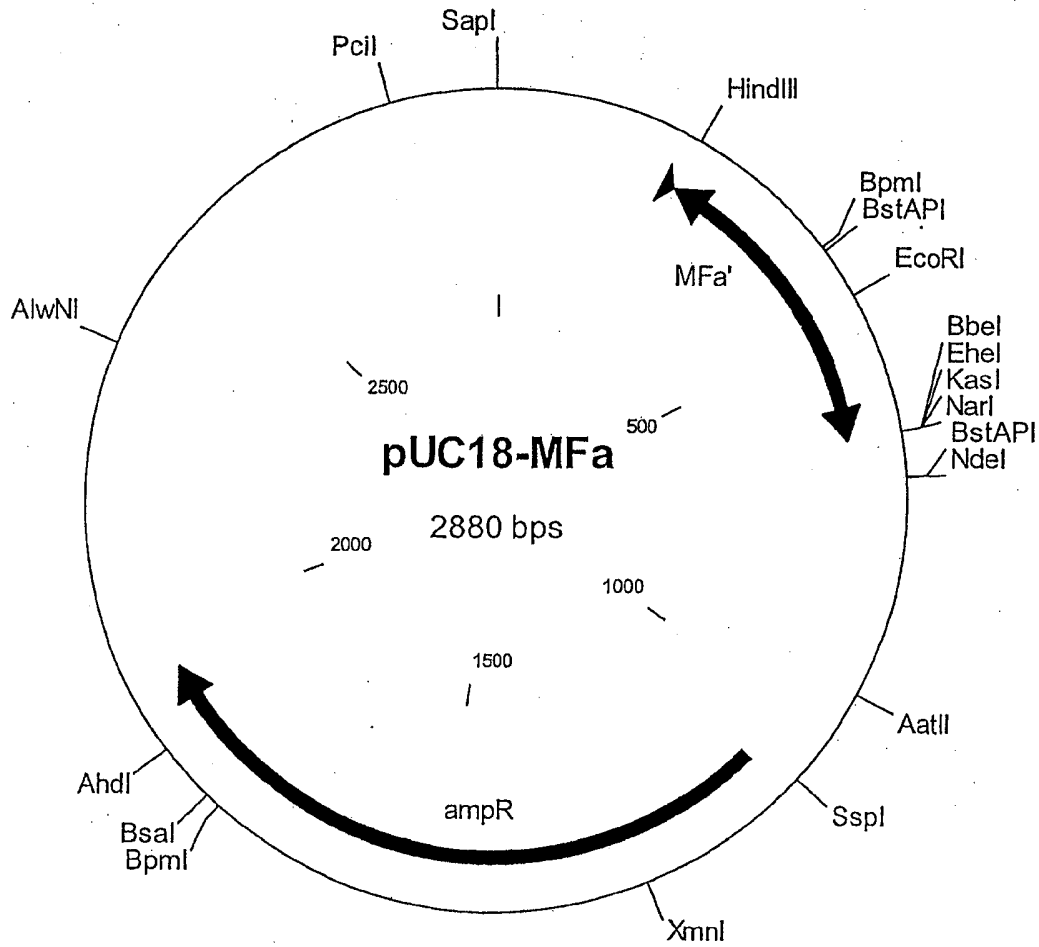
Obr.34

35/70



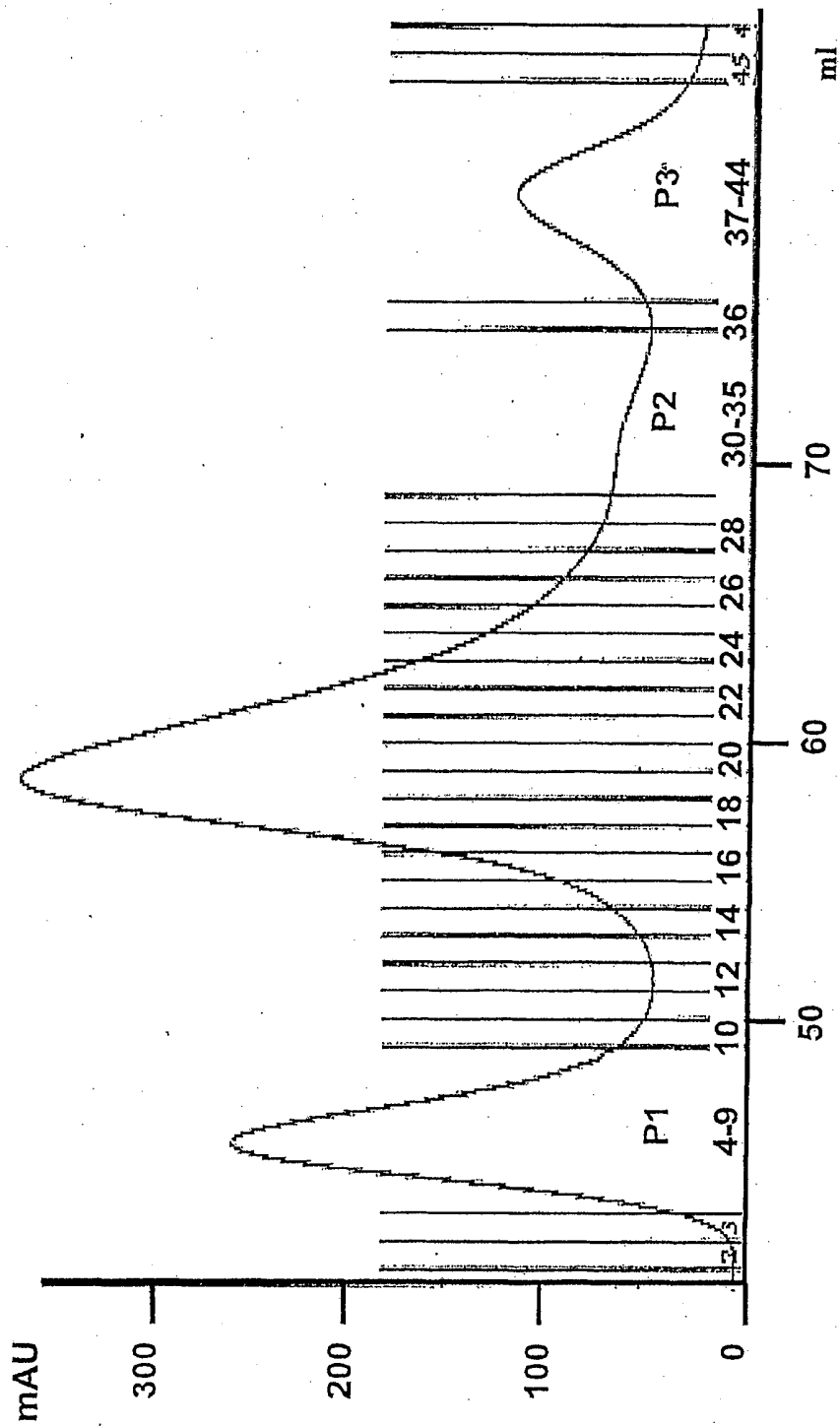
Obr.35

36/70



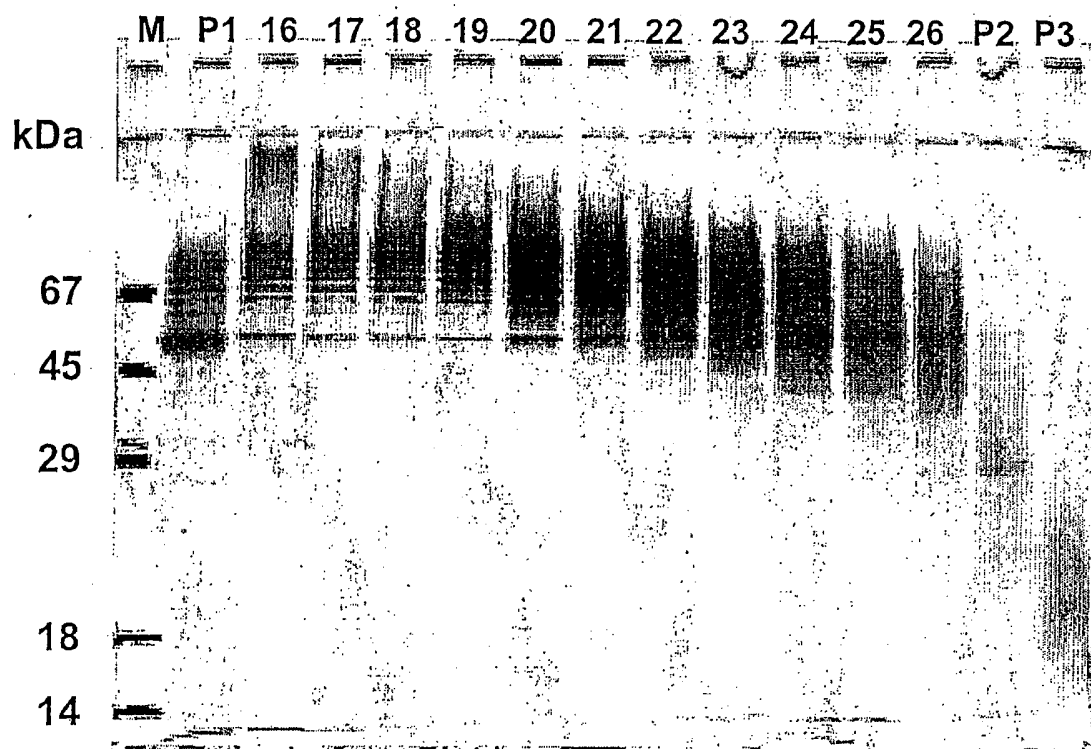
Obr.36

37/70



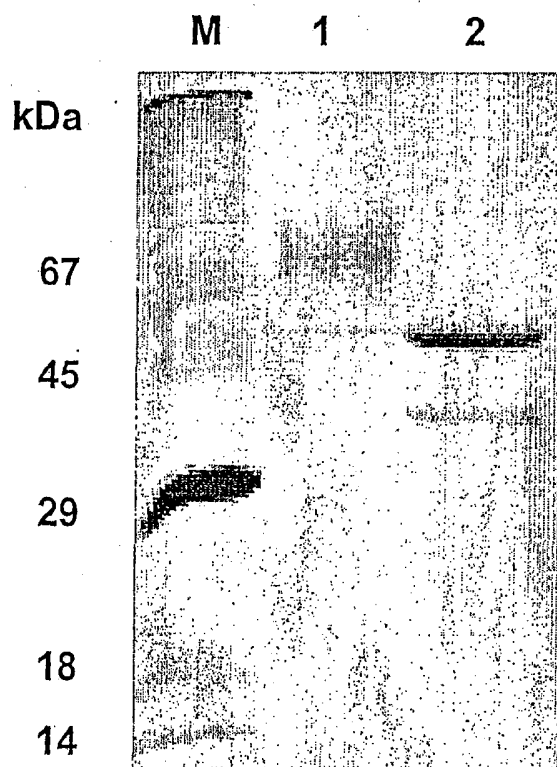
Obr.37

38/70



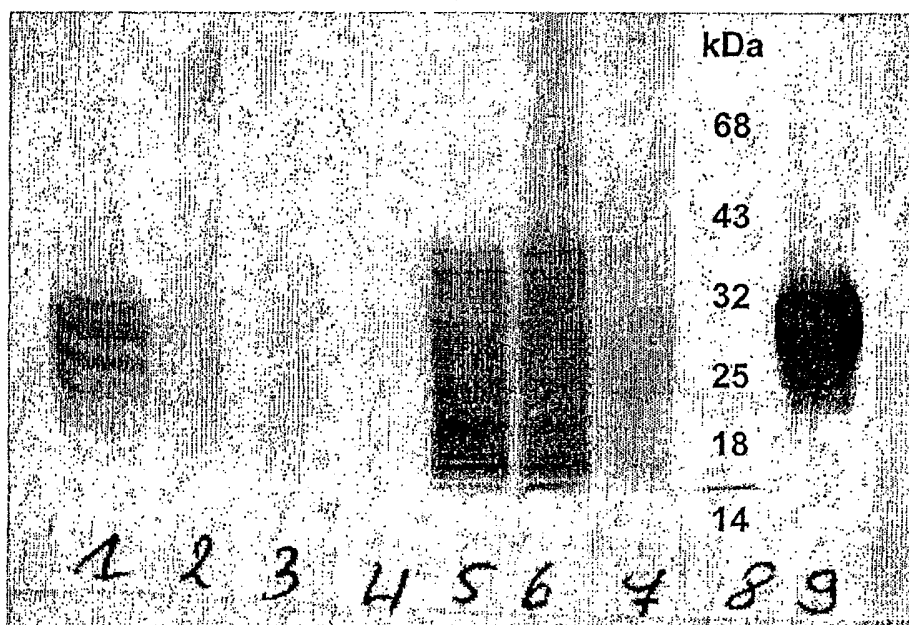
Obr.38

39/70



Obr.39

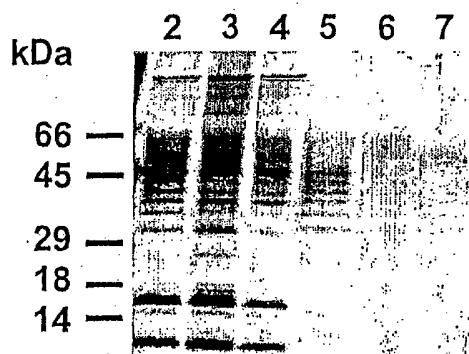
40/70



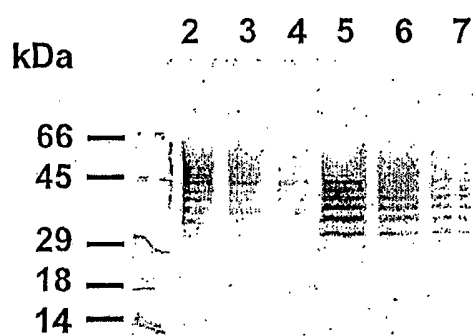
Obr.40

41/70

A

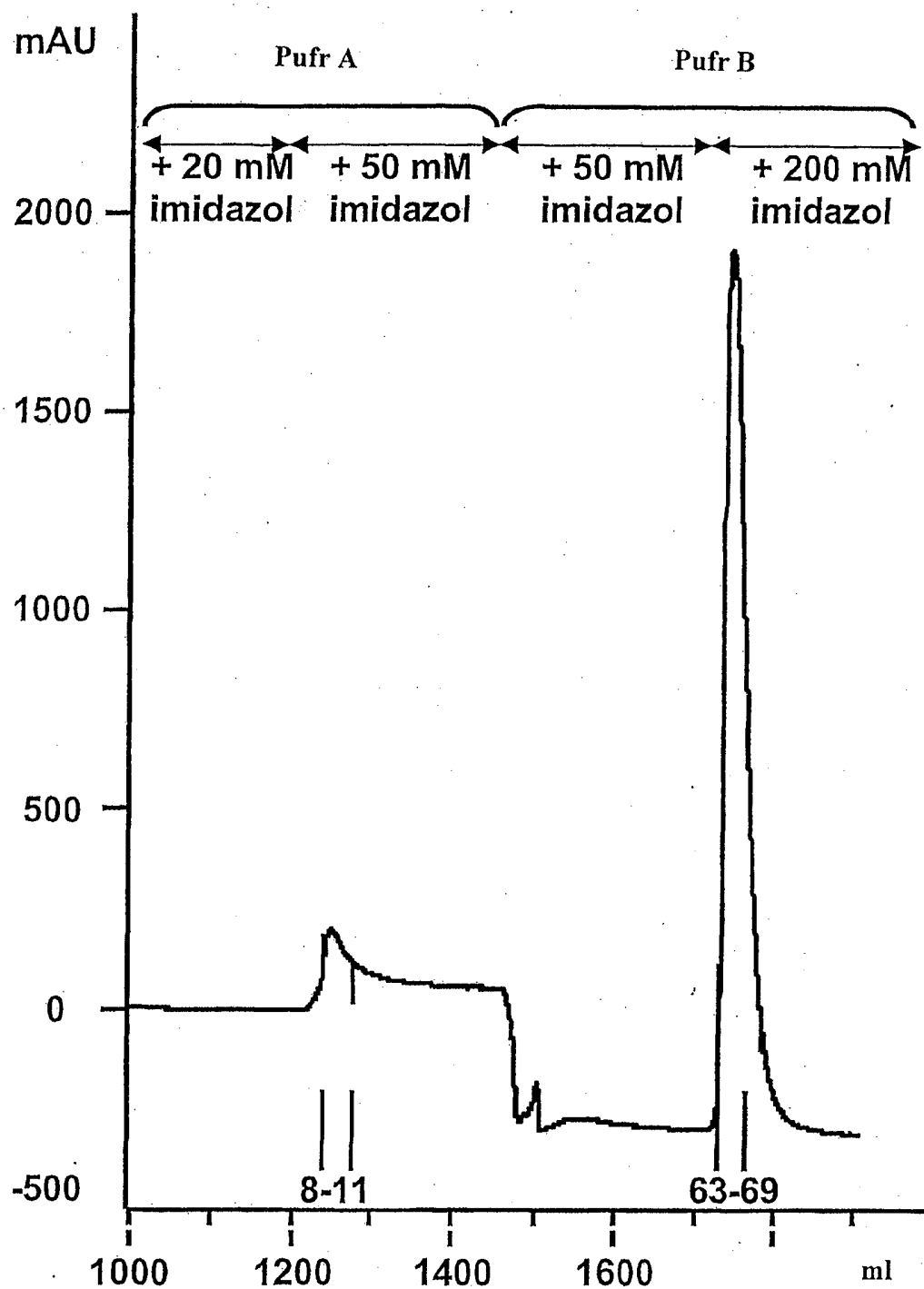


B



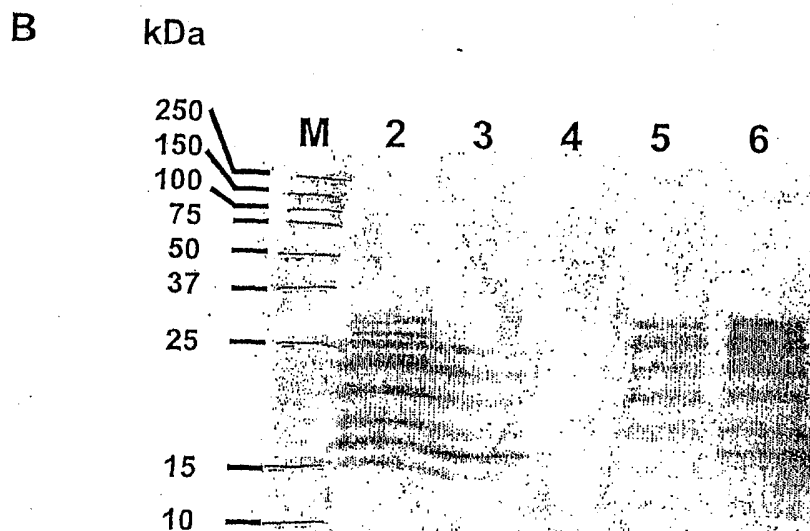
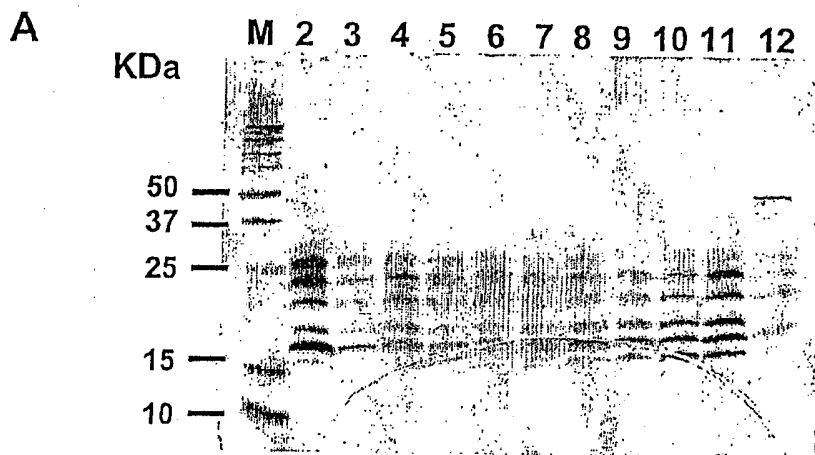
Obr.41

42/70



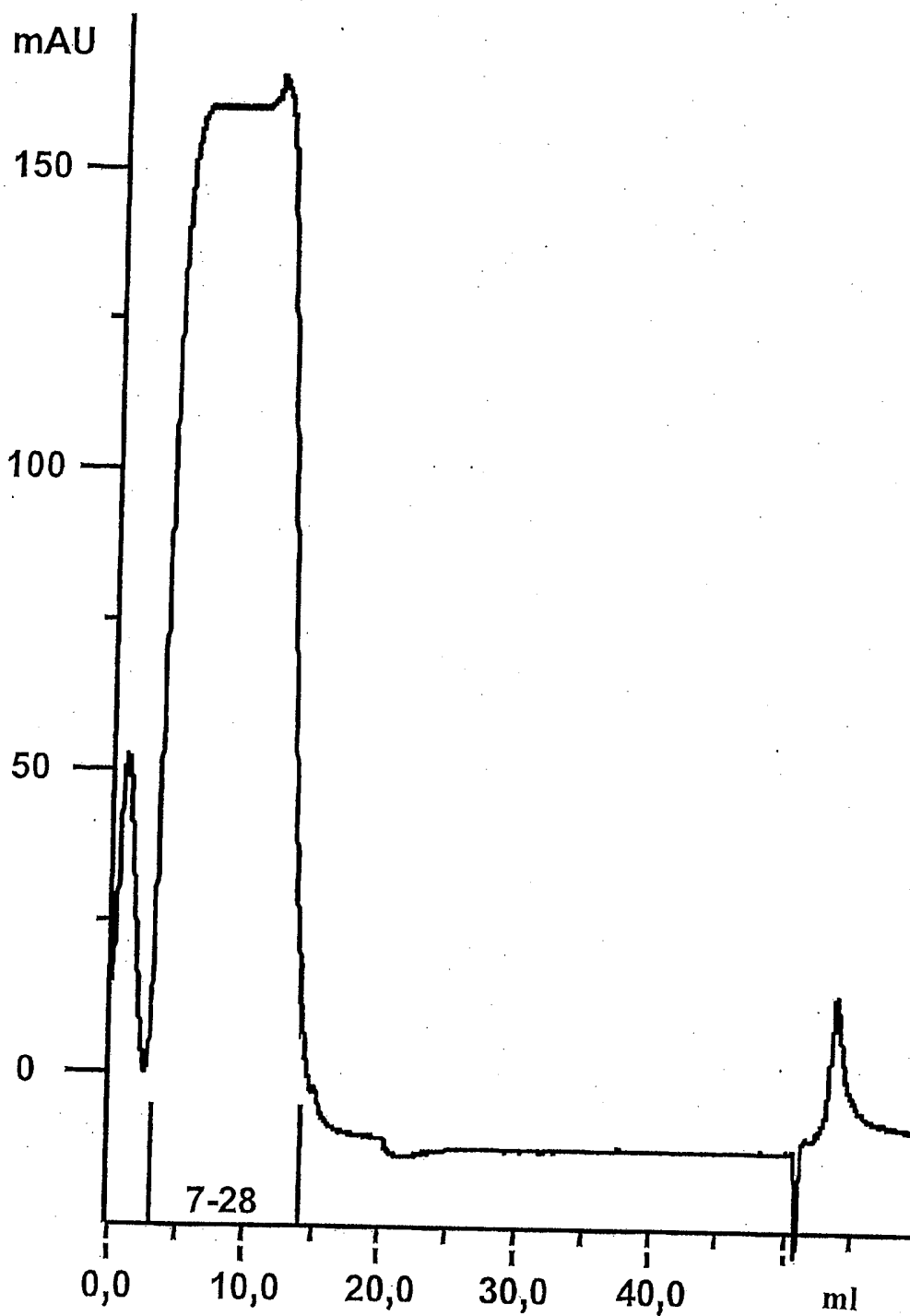
Obr.42

43/70



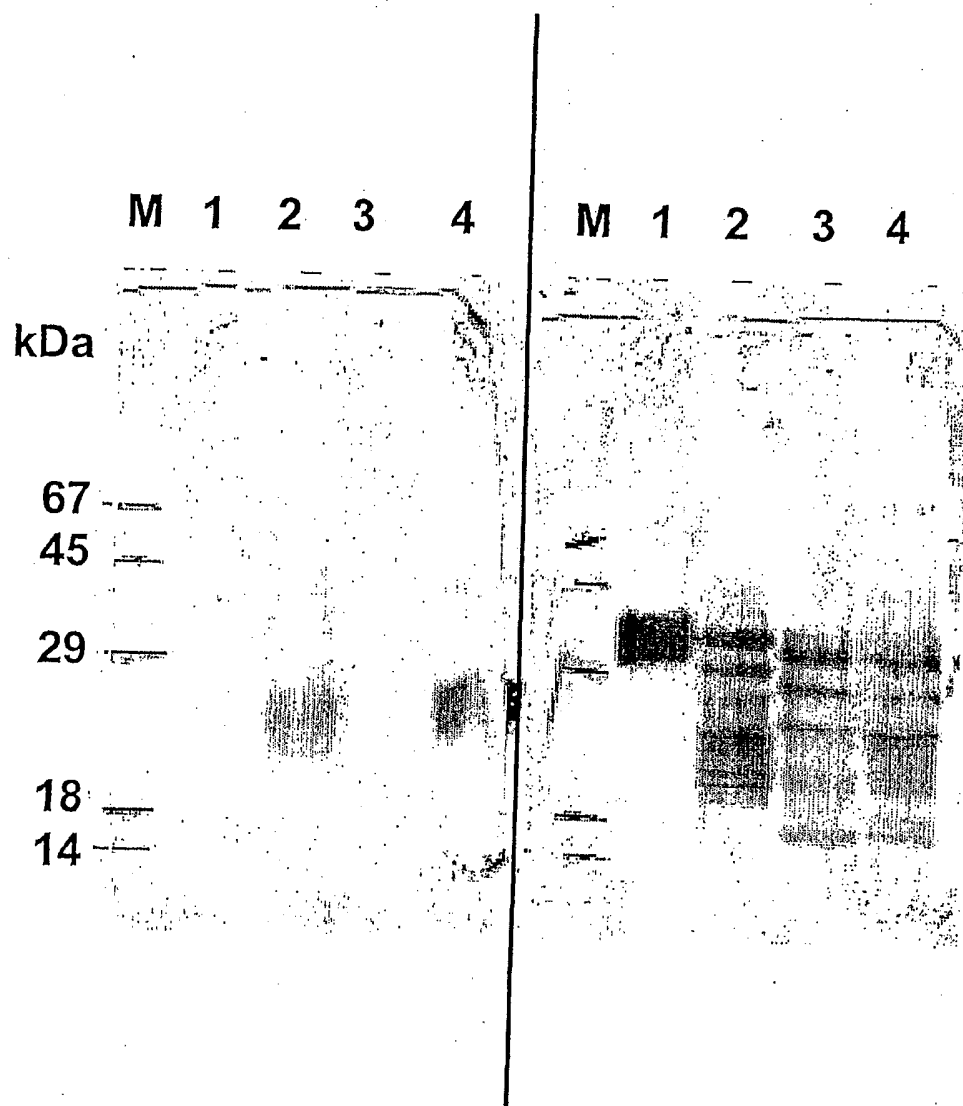
Obr.43

44/70



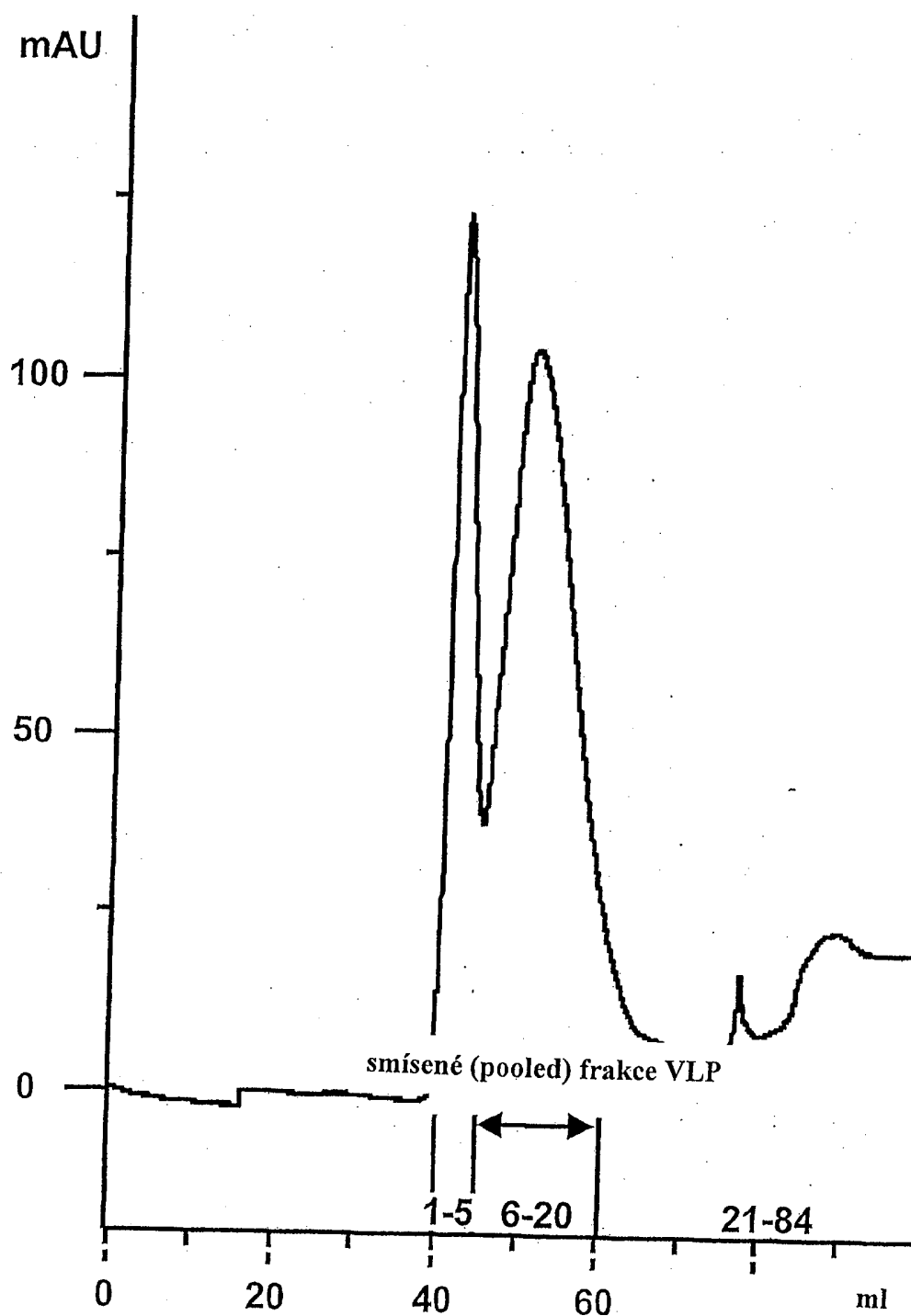
Obr.44

45/70



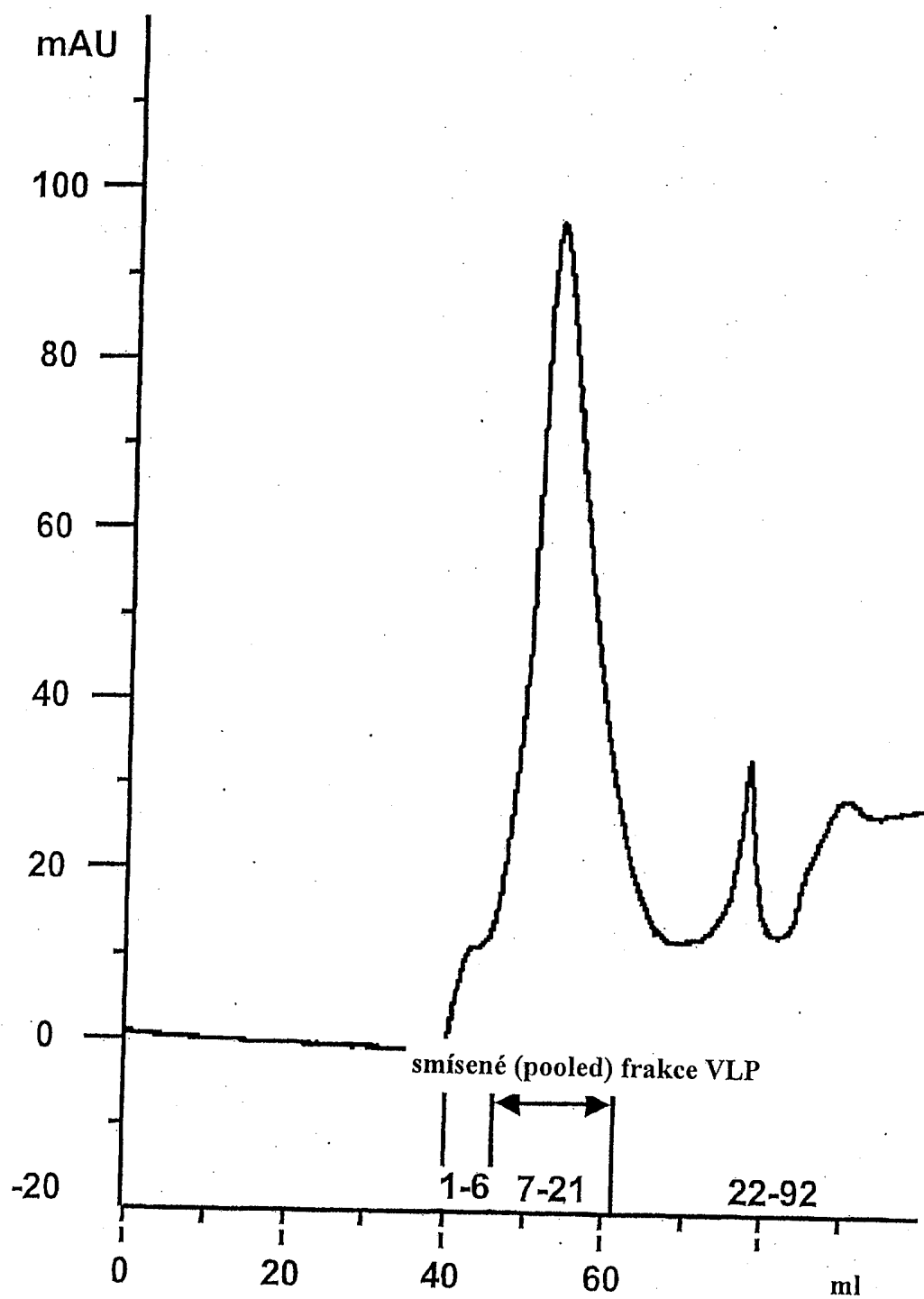
Obr.45

46/70



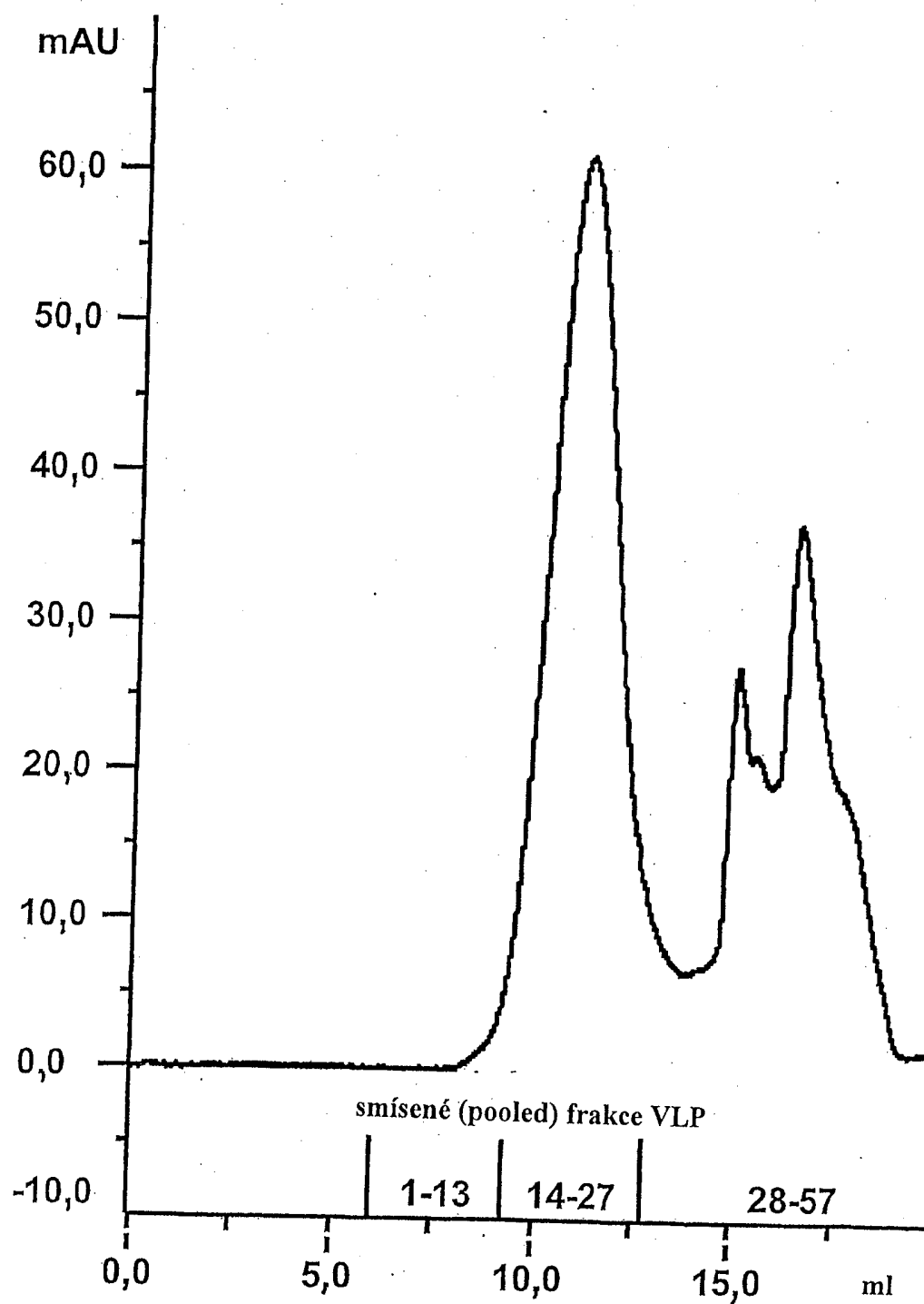
Obr.46

47/70



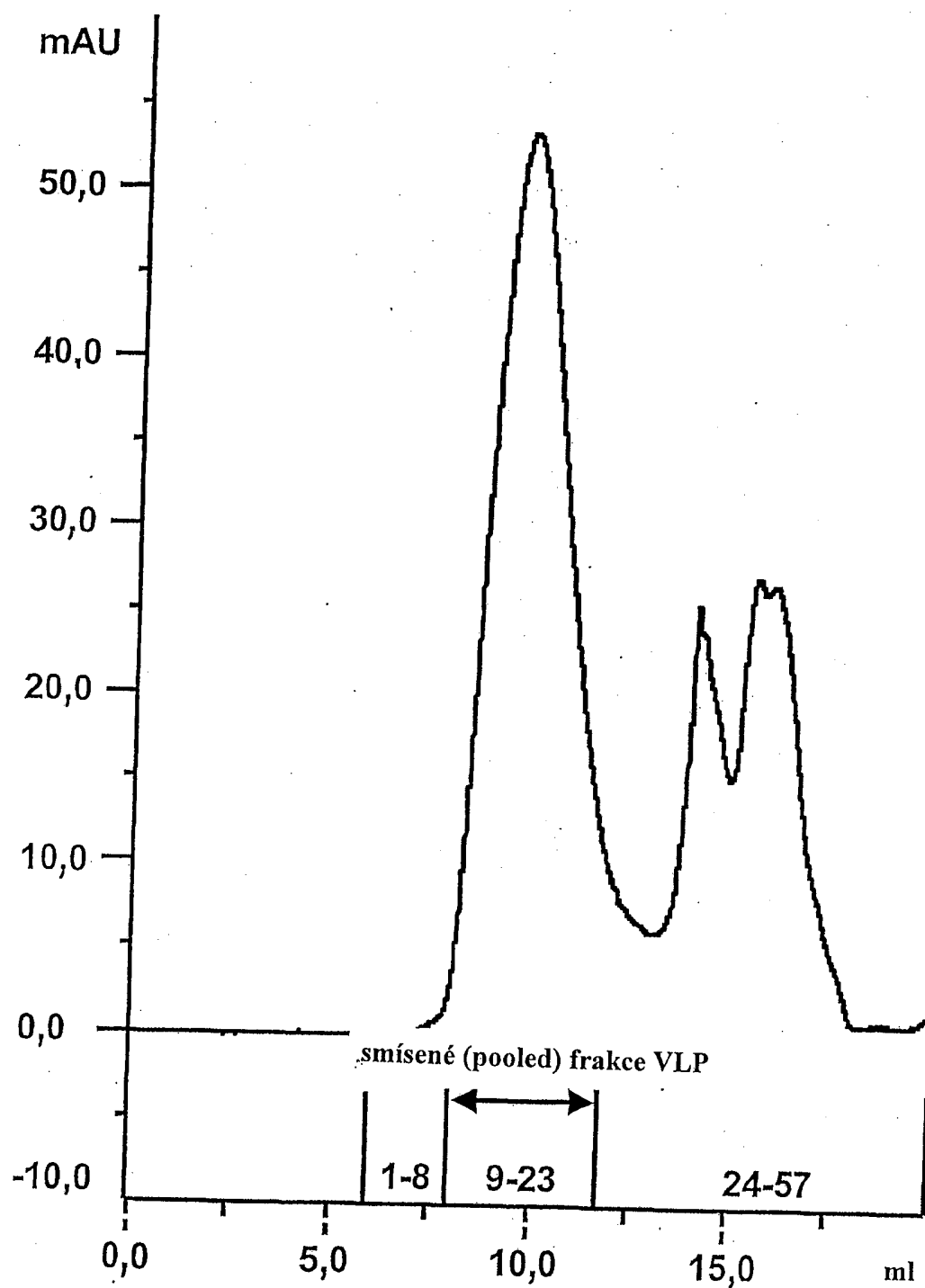
Obr.47

48/70



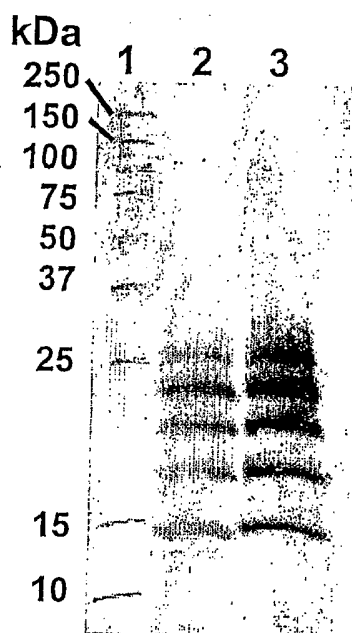
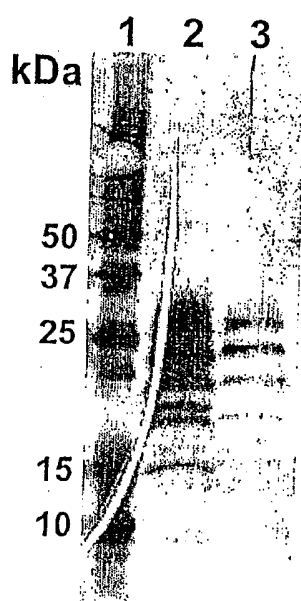
Obr.48

49/70



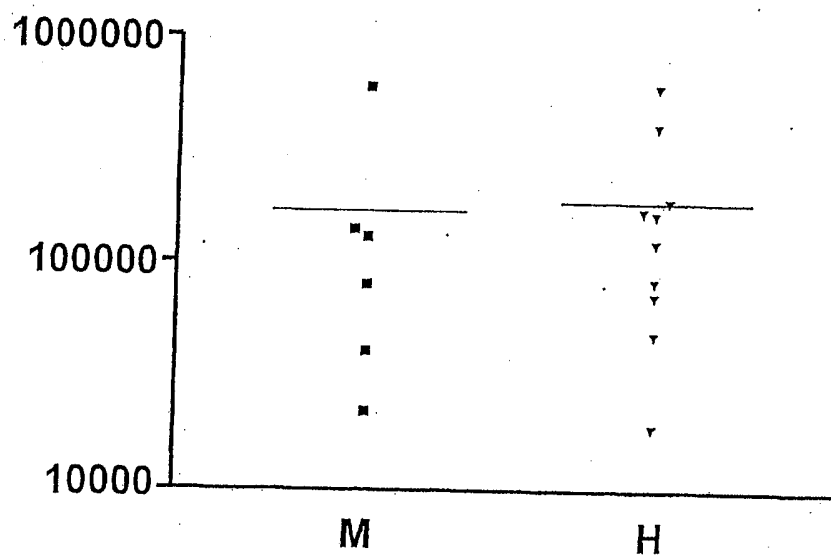
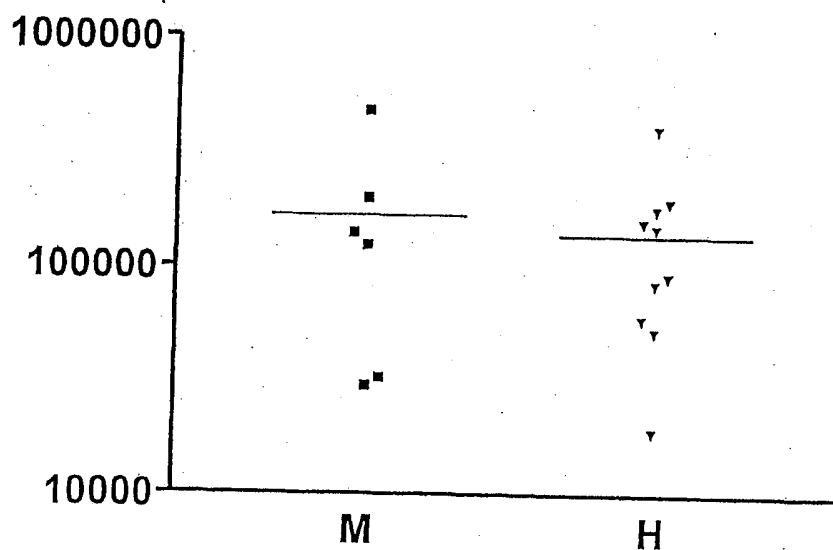
Obr.49

50/70



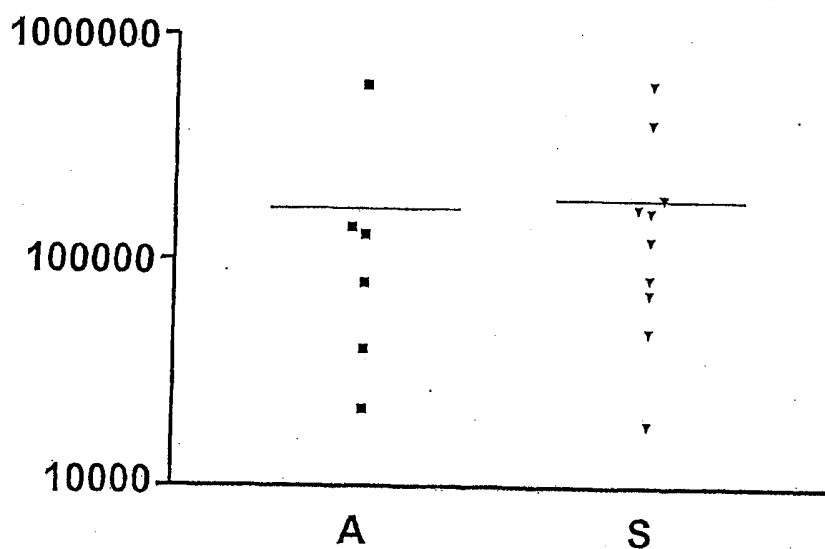
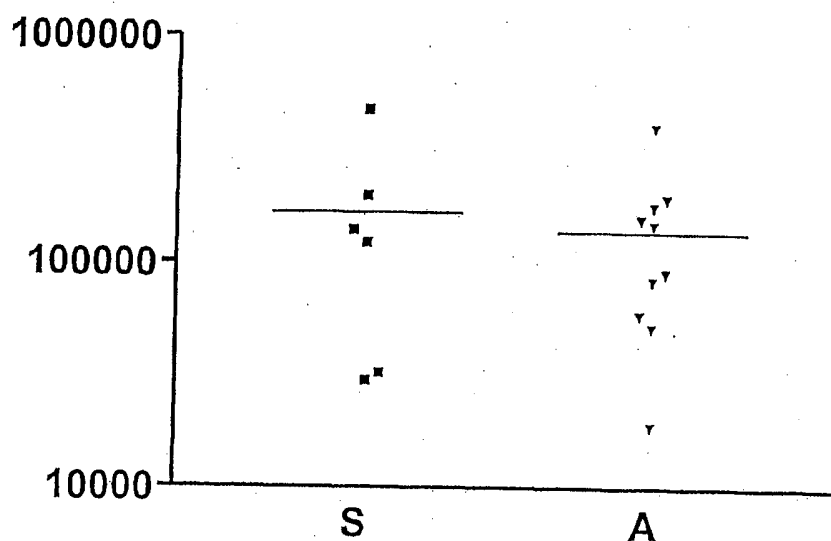
Obr.50

51/70



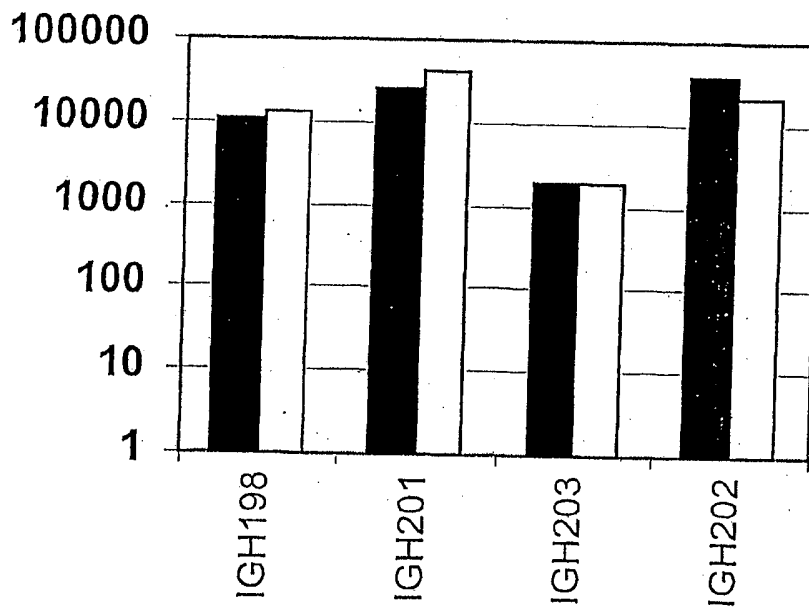
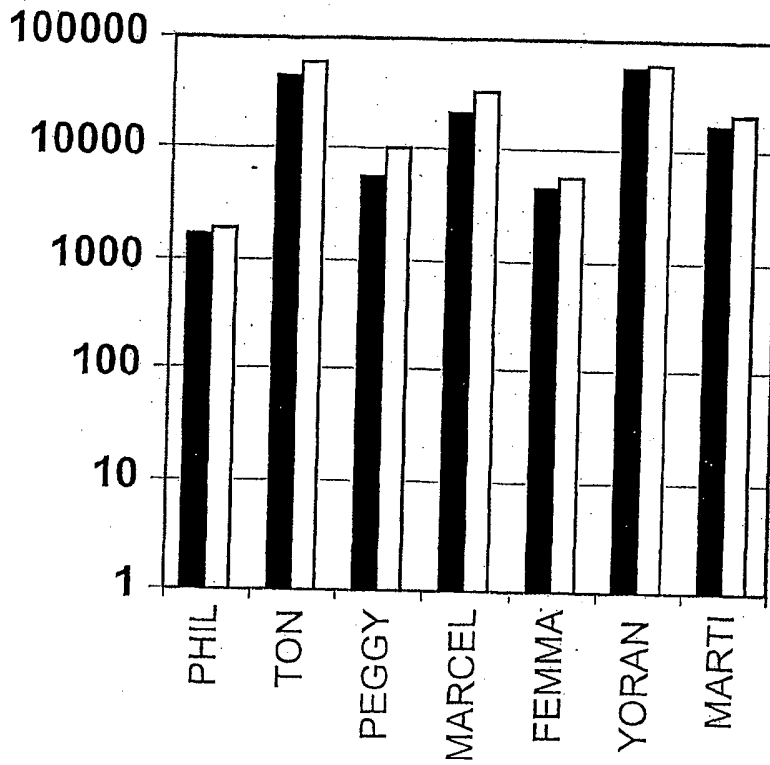
Obr.51

52/70



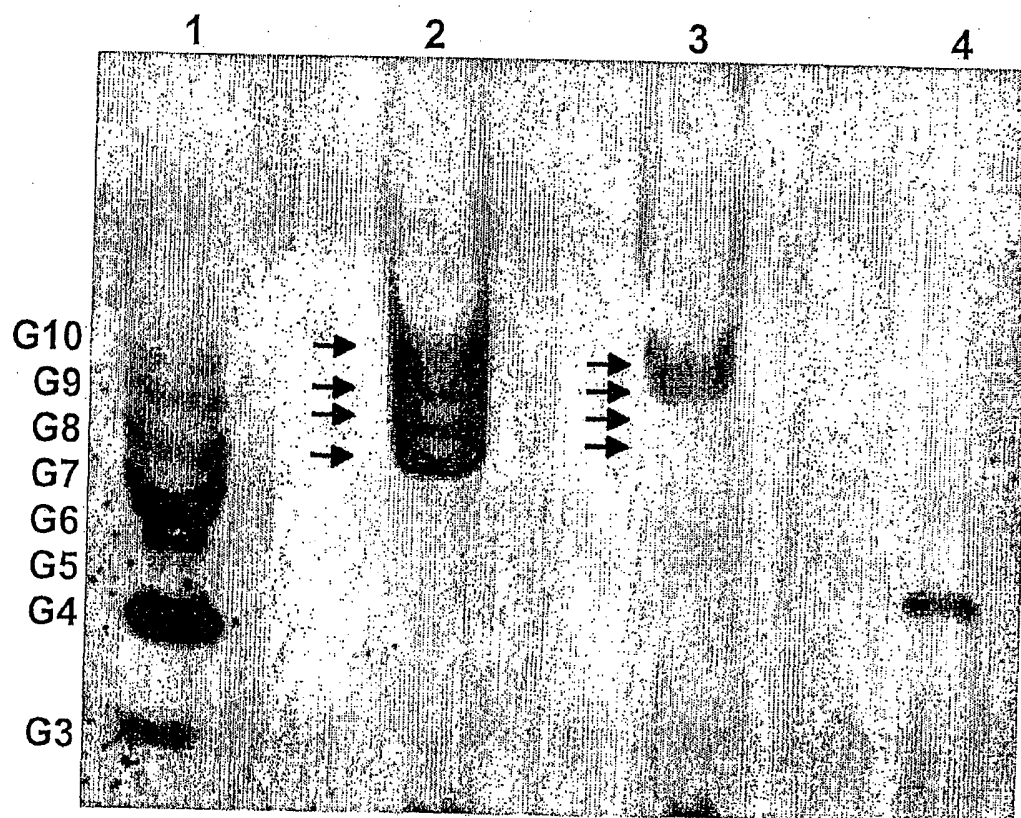
Obr.52

53/70



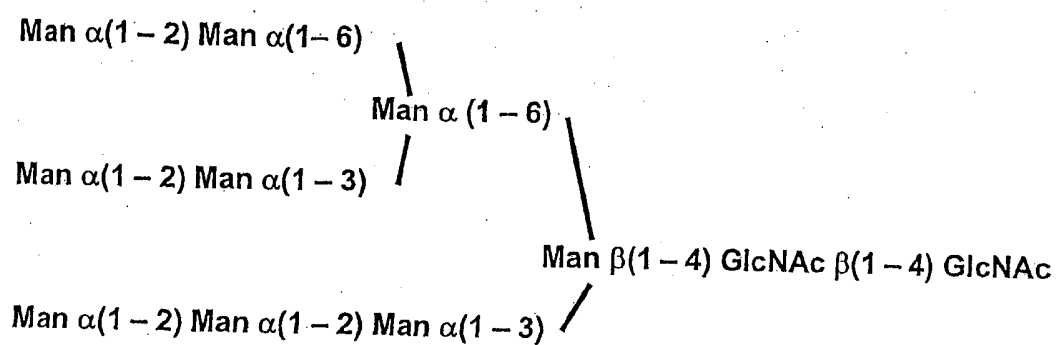
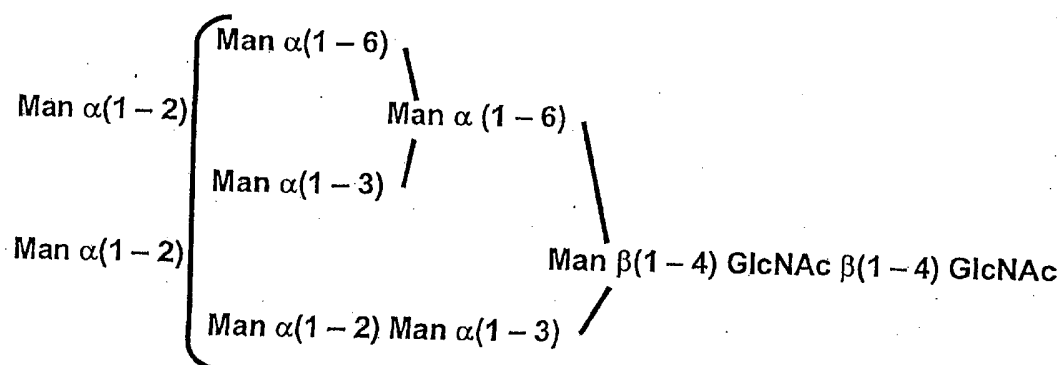
Obr.53

54/70



Obr.54

55/70

A. MAN-9**B. MAN-8**

Obr.55

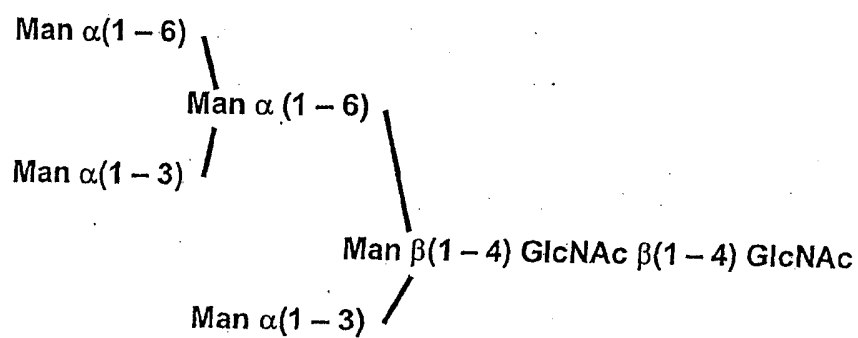
Diagram illustrating the structure of a branched oligosaccharide (likely a glycoprotein):

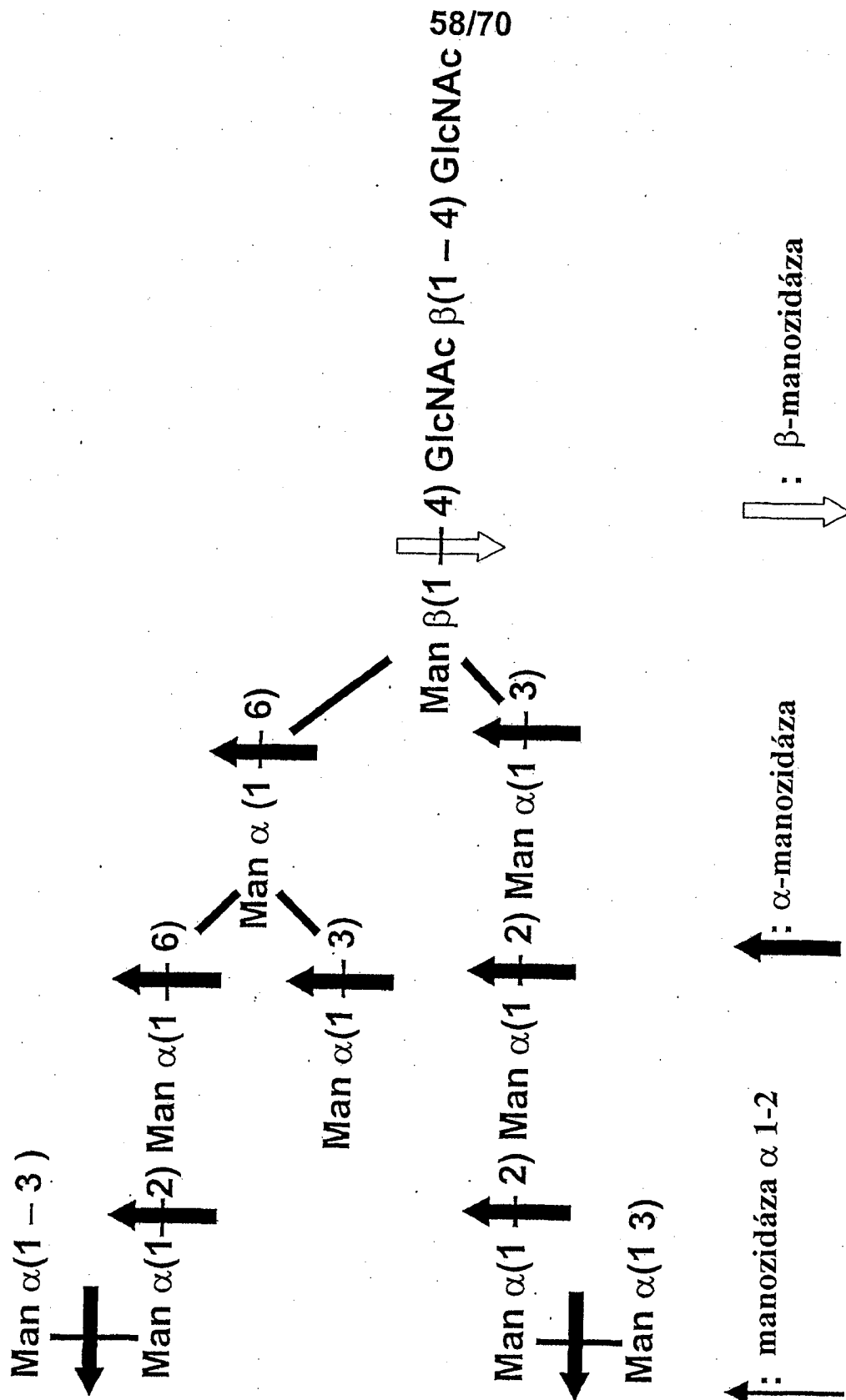
- The structure shows a central core of mannose (Man) residues linked by $\alpha(1-6)$ and $\alpha(1-3)$ linkages.
- Branches are formed by $\alpha(1-2)$ and $\alpha(1-3)$ linkages connecting to additional mannose residues.
- The terminal residues are linked via $\beta(1-4)$ linkages to GlcNAc (N-acetylglucosamine) residues.

Man $\alpha(1-6)$
Man $\alpha(1-6)$
Man $\alpha(1-3)$
Man $\beta(1-4)$ GlcNAc $\beta(1-4)$ GlcNAc
Man $\alpha(1-2)$ Man $\alpha(1-3)$

Obr.55 (pokračování)

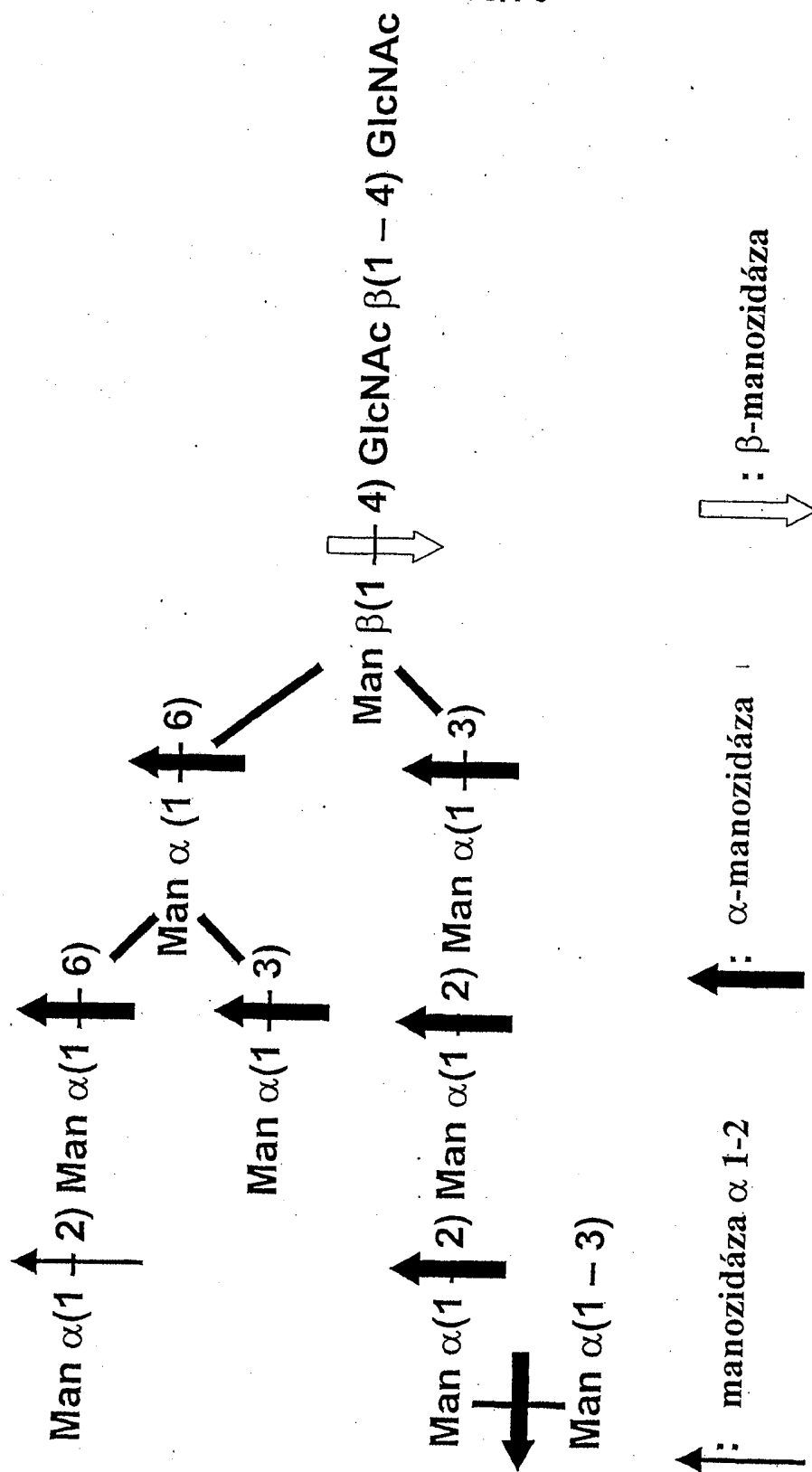
57/70

E. MAN-5**Obr.55 (pokračování)**

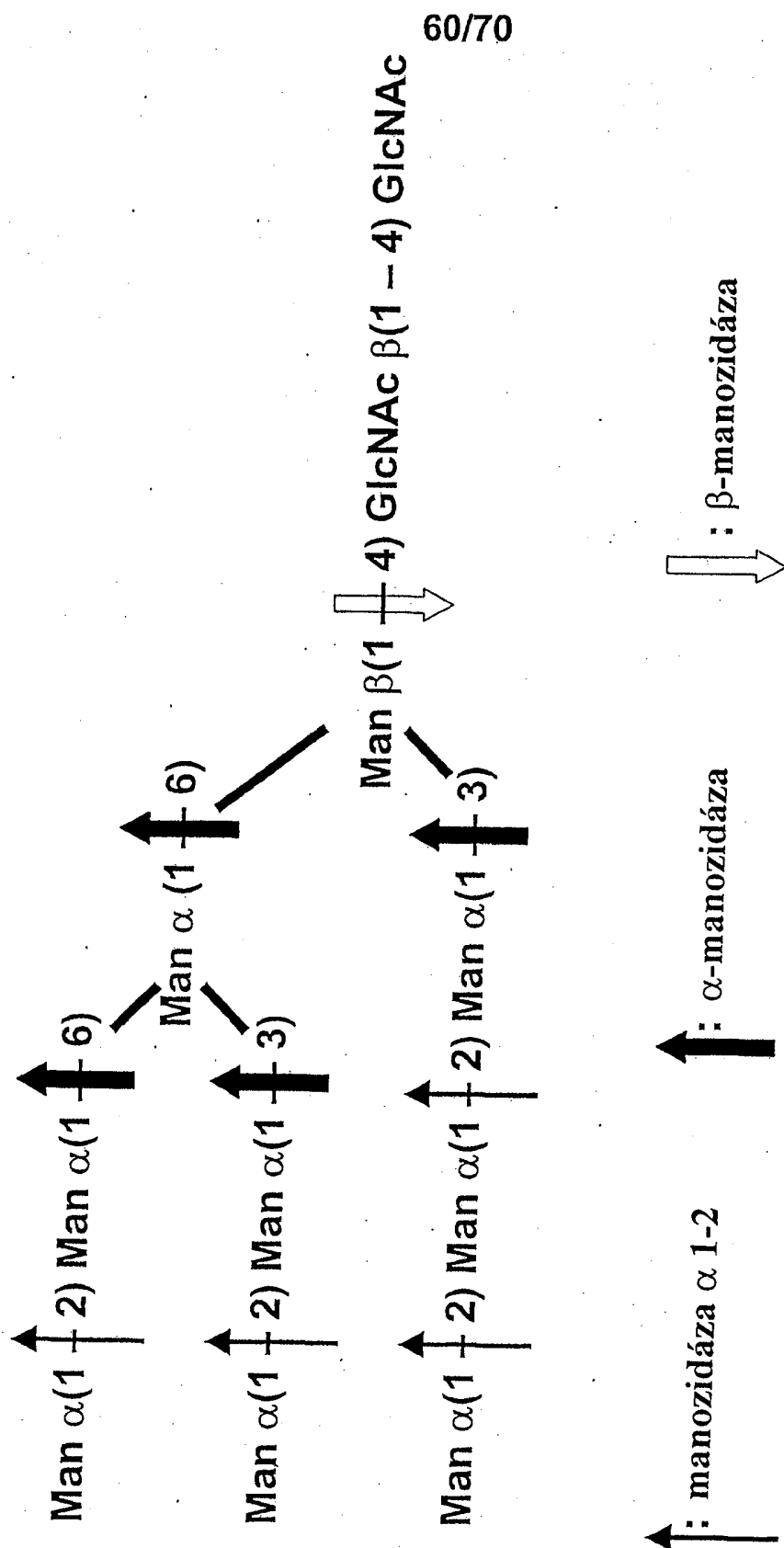


Obr.56

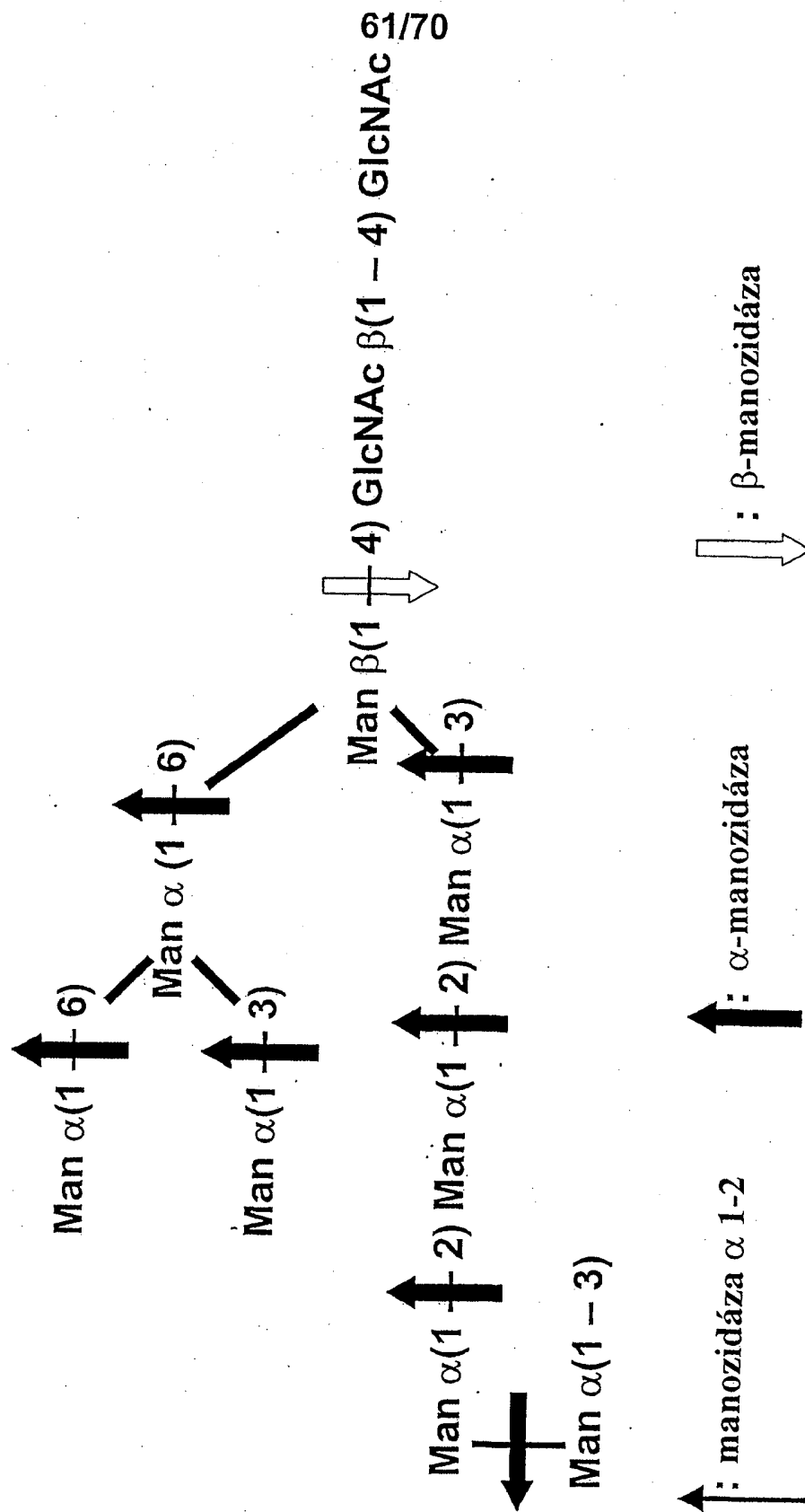
59/70



Obr.57

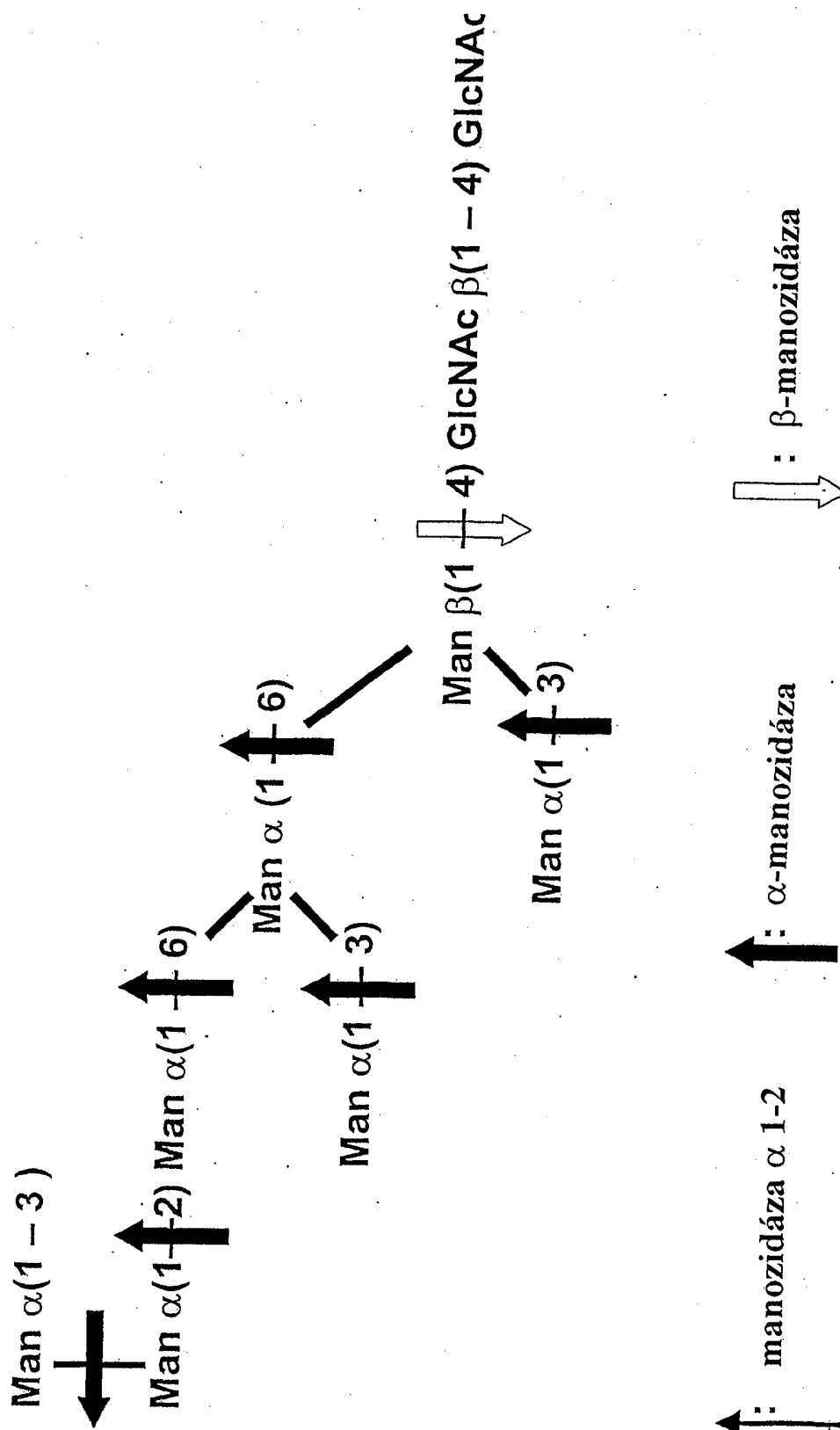


Obr.58

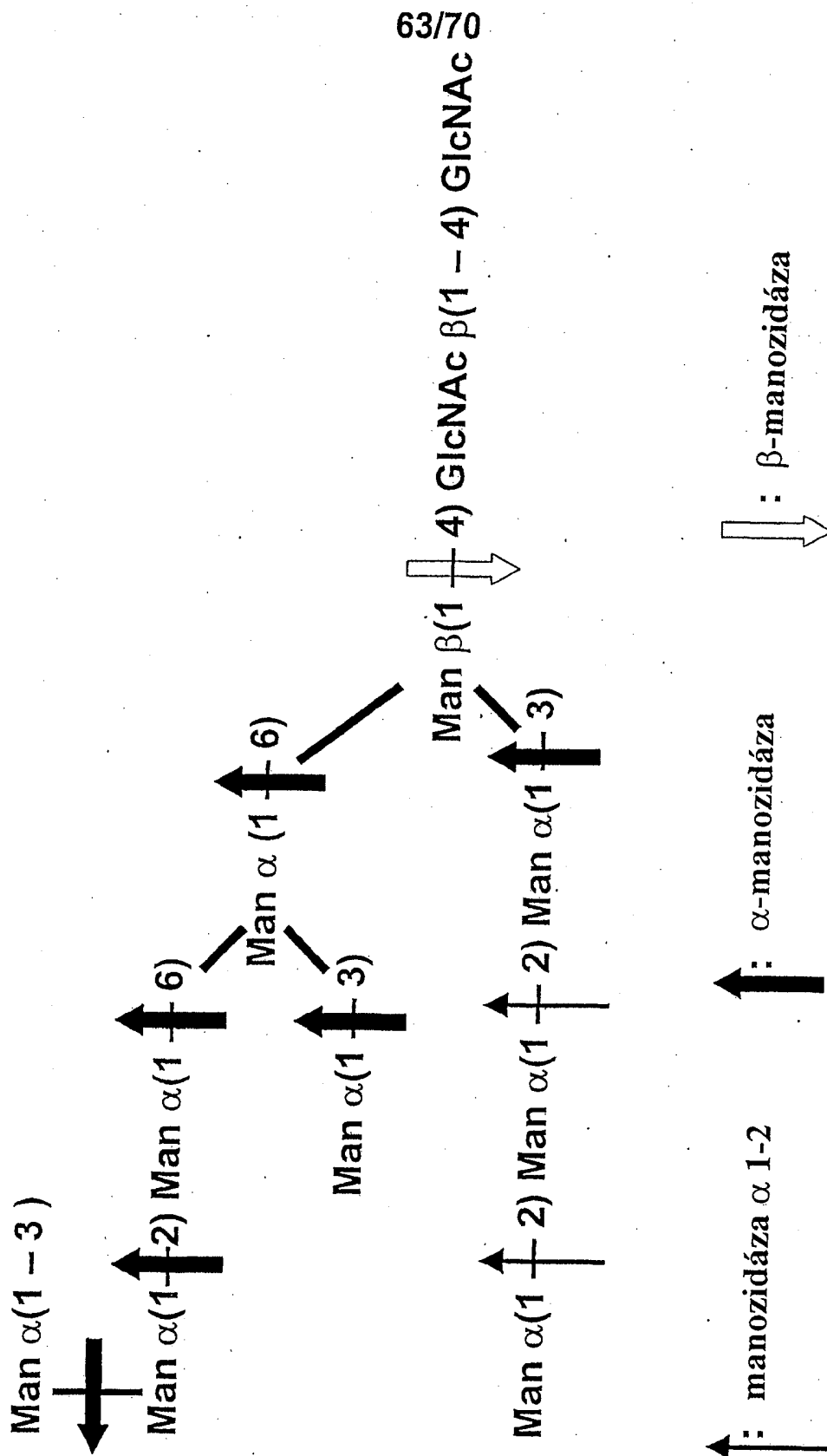


Obr.59

62/70

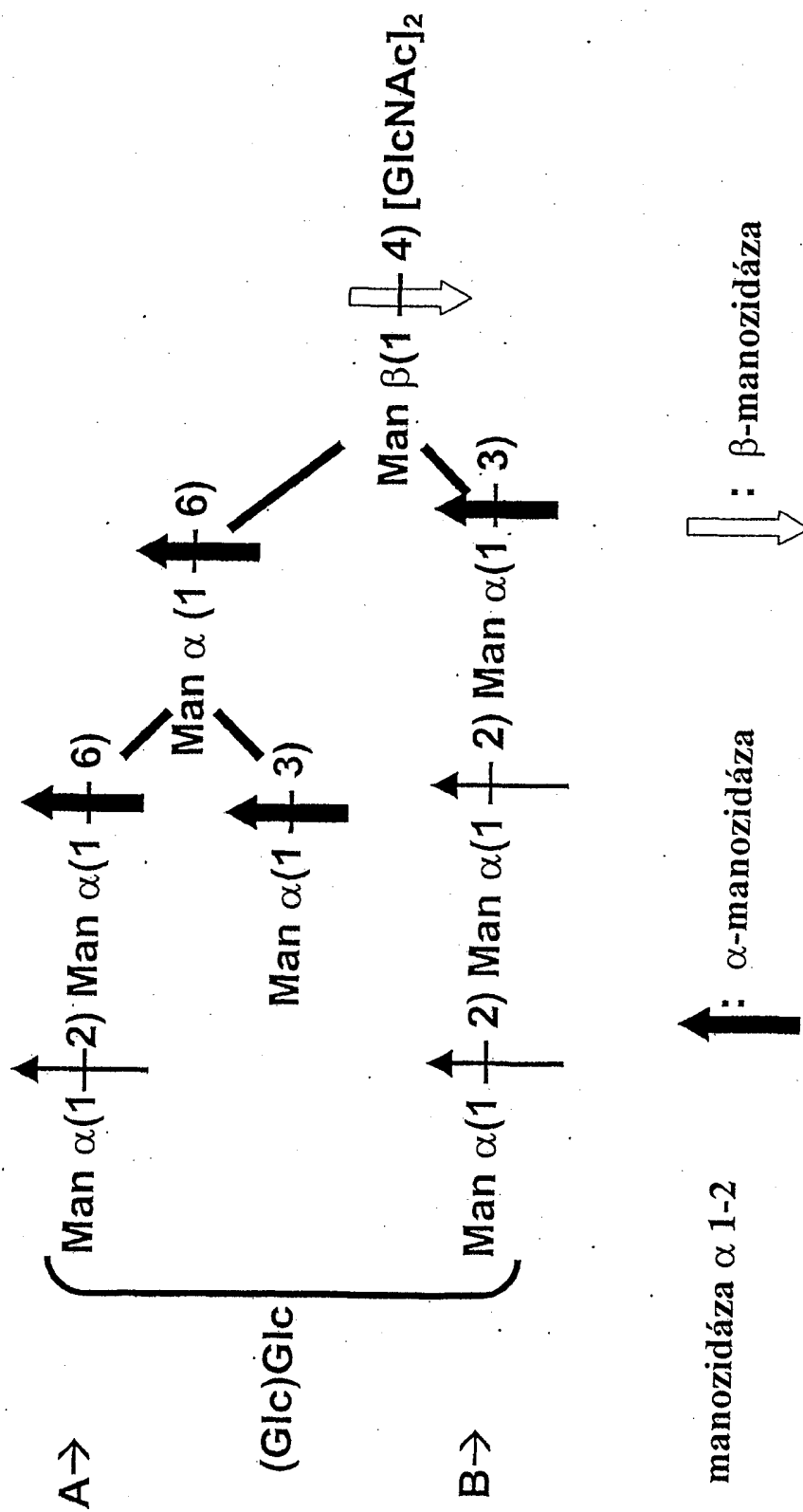


Obr.60



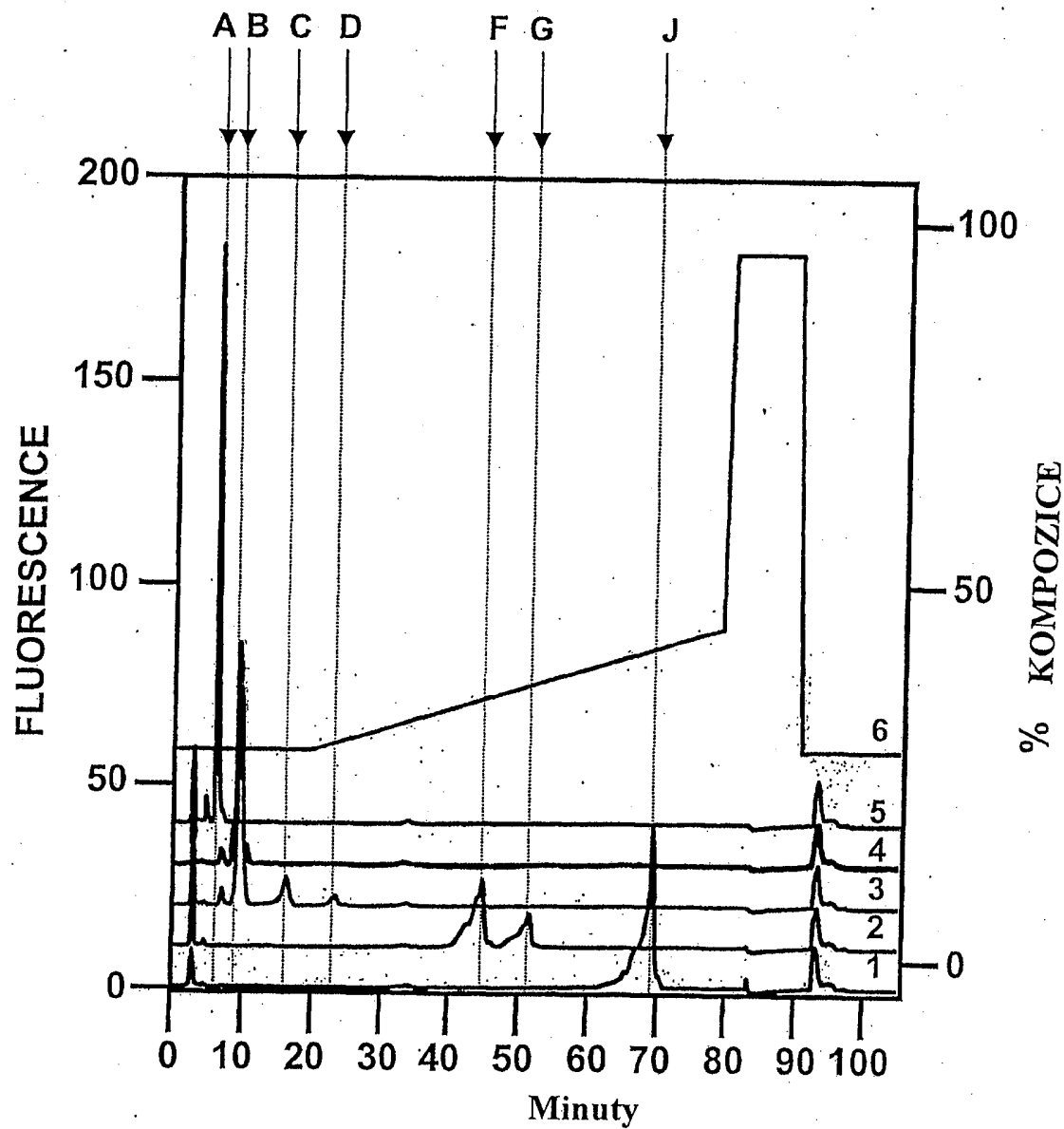
Obr.61

64/70



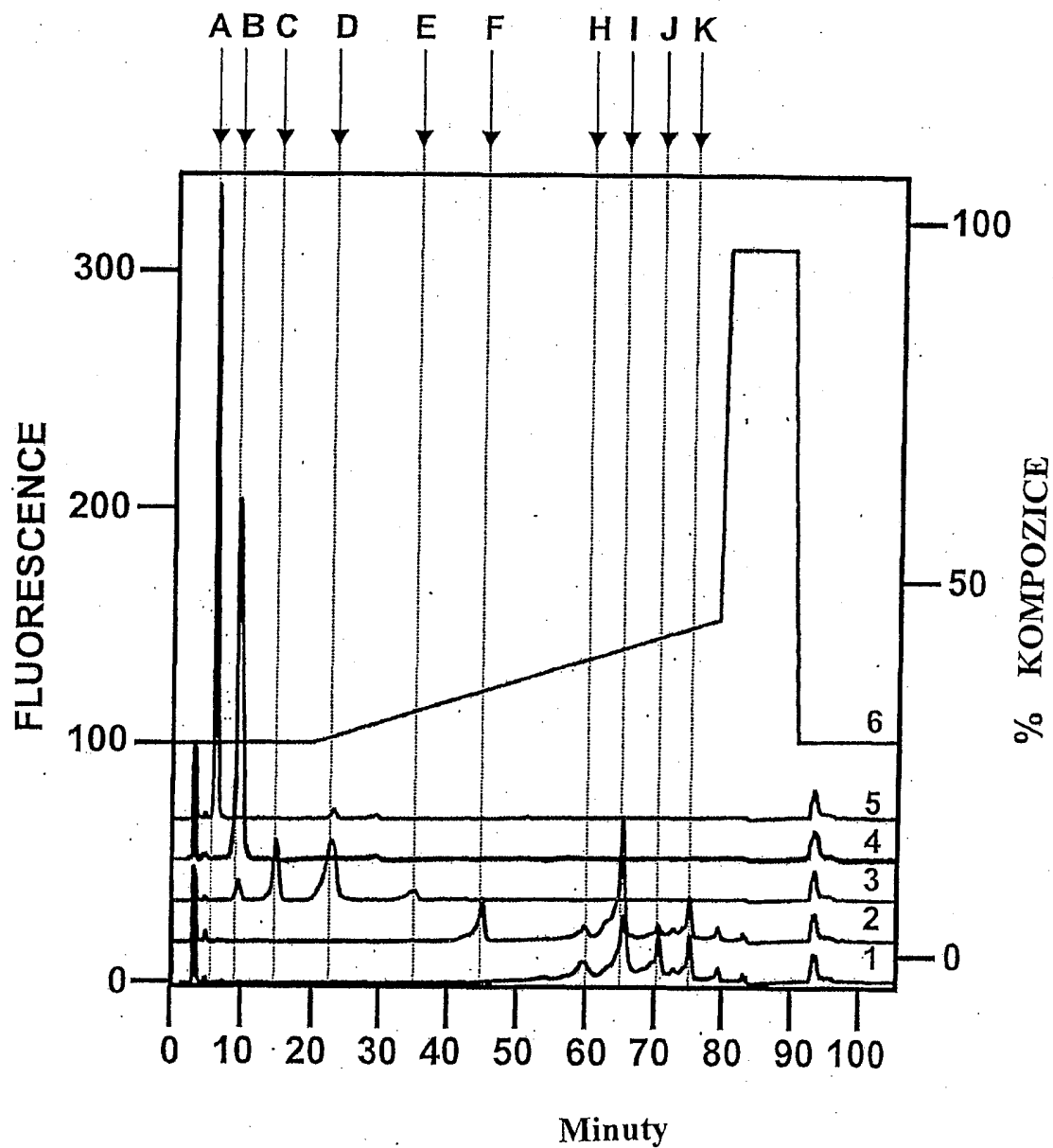
Obr.62

65/70



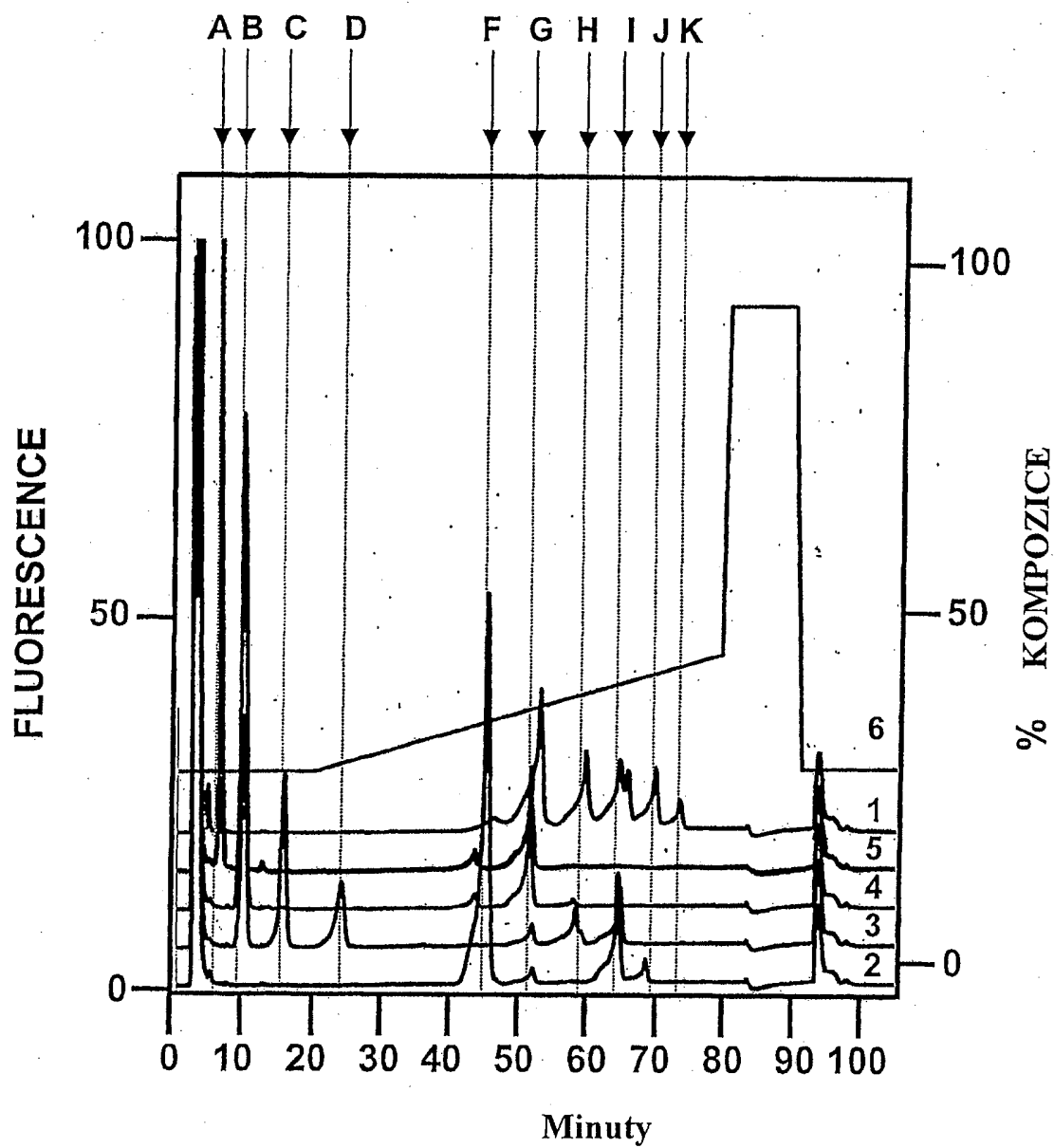
Obr.63

66/70



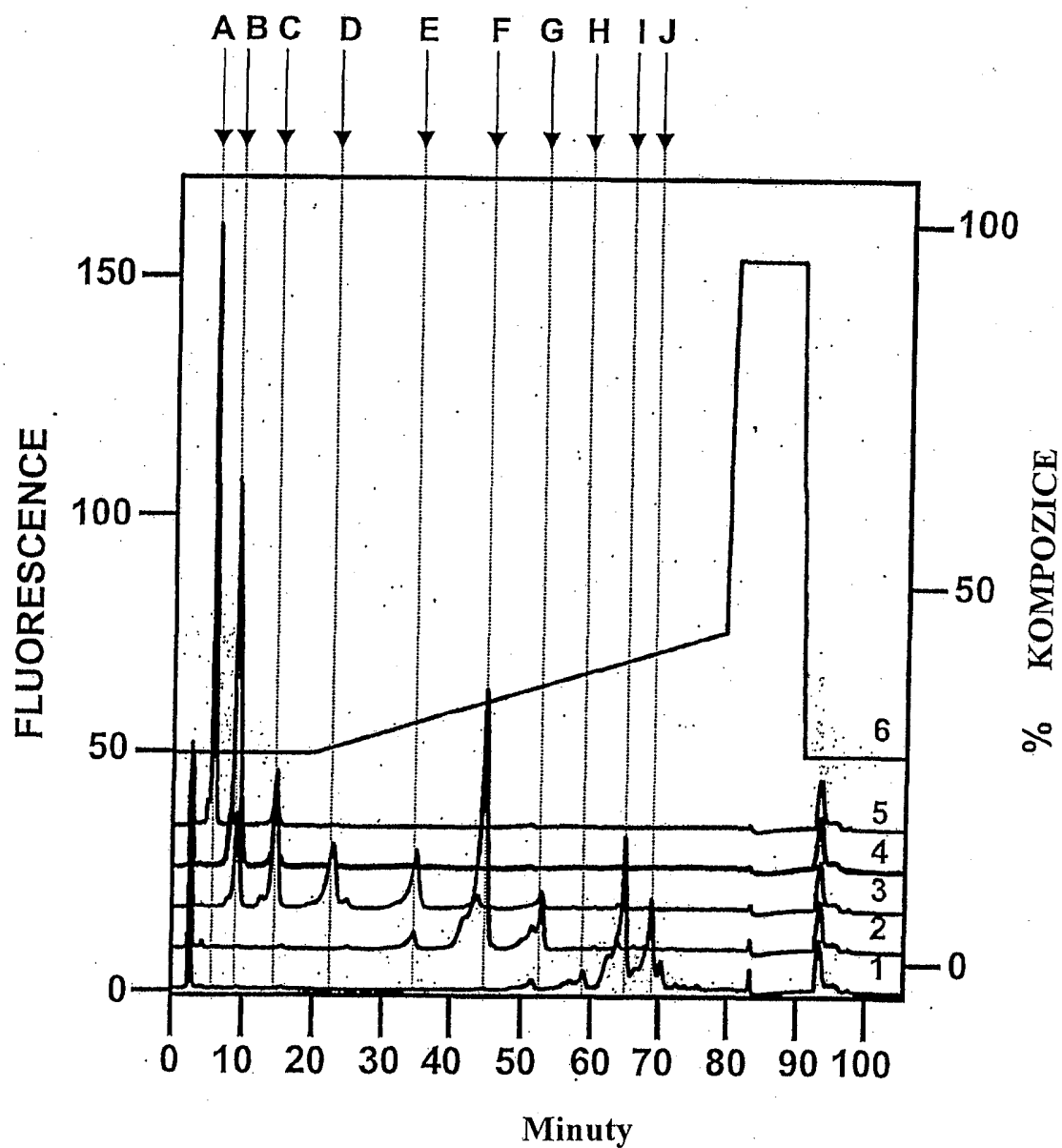
Obr.64

67/70



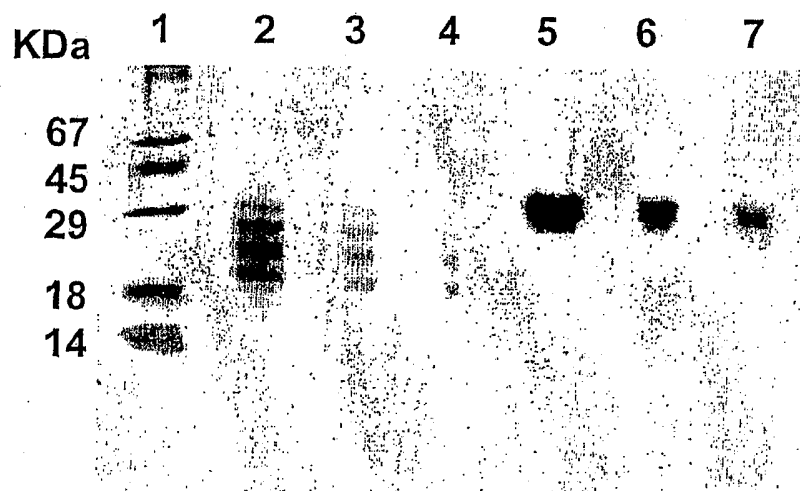
Obr.65

68/70



Obr.66

69/70



Obr.67

70/70

1	6	11	16	21	26	31	36	41	46
HTRVSGGAAASDTRGLVSLFSPGSAQKIQLVNTDGSWHIDRTALNB									
51	56	61	66	71	76	81	86	91	
DDSLQTGFFAALFYKHKFDSSGGBPERLASBRSIDKFAQGWGPLYT									
96	101	106	111	116	121	126	131	136	
EPDSSDQRPYBWHYAPRPBGIVPASQVBGPVYBFTPSPVVVGTTDR									
141	146	151	156	161	166	171	176	181	
FGVPTYNWGADDSDVLILDNTRPPRGNWFGBTWMDGTGFTKTBGGP									
186	191	196	201	206	211	216	221	226	
PBNIGGAGDNTLTBPTDBFRKHPEATYARBGS GPWLTPRBMVHYPY									
231	236	241	246	251	256	261	266	271	276
RLWHYPBTVDFTTIFKVRMYVGGVEHRRFEAABDWTGRERBDLEDRDR									
281	286	291	296						
SELSPLLSTTEWQVIEGRHHHHHH									

Obr.68

SEZNAM SEKVENCÍ

- <110> Innogenetics N.V.
- <120> Obalové proteiny HCV glykosylované s jádrem glykosylace
- <130> 135 PCT
- <160> 98
- <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1
- <211> 18
- <212> PRT
- <213> signální peptid opičího lysozymu
- <220>
- <221> alternativní znak
- <222> (2)..(2)
- <223> Xaa is Arg, Lys or Val
- <220>
- <221> alternativní znak
- <222> (3)..(3)
- <223> Xaa is Ser, Ala, Val, Arg or Met
- <220>
- <221> alternativní znak
- <222> (4)..(4)
- <223> Xaa is Leu or Phe
- <220>
- <221> alternativní znak
- <222> (5)..(5)
- <223> Xaa is Leu or Ala
- <220>
- <221> alternativní znak
- <222> (6)..(6)
- <223> Xaa is Ile, Thr, Phe or Val
- <220>
- <221> alternativní znak
- <222> (7)..(7)
- <223> Xaa is Leu, Phe or Ala
- <220>
- <221> alternativní znak
- <222> (8)..(8)
- <223> Xaa is Val, Ile, Ala, Leu or Cys
- <220>
- <221> alternativní znak

<222> (9)..(9)
 <223> Xaa is Leu, Phe, Ala or Ile

<220>
 <221> alternativní znak
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa is Cys, Phe, Ser or Leu

<220>
 <221> alternativní znak
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa is Phe, Leu, Ser or Pro

<220>
 <221> alternativní znak
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa is Leu, Ala or Met

<220>
 <221> alternativní znak
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa is Pro, Ala or Ile

<220>
 <221> alternativní znak
 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa is Leu or Ala

<220>
 <221> alternativní znak
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa is Ala, Val, Ser or Met

<220>
 <221> alternativní znak
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa is Ala, Lys or Ser

<220>
 <221> alternativní znak
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa is Leu, Pro, Gln or Ile

<400> 1

Met Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

Xaa Gly

<210> 2
 <211> 135
 <212> PRT
 <213> virus hepatitidy C

<400> 2

Tyr Glu Val Arg Asn Val Ser Gly Met Tyr His Val Thr Asn Asp Cys
 1 5 10 15

Ser Asn Ser Ser Ile Val Tyr Glu Ala Ala Asp Met Ile Met His Thr
 20 25 30

Pro Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu Asn Asn Ser Ser Arg Cys Trp
 35 40 45

Val Ala Leu Thr Pro Thr Leu Ala Ala Arg Asn Ala Ser Val Pro Thr
 50 55 60

Thr Thr Ile Arg Arg His Val Asp Leu Leu Val Gly Ala Ala Ala Phe
 65 70 75 80

Cys Ser Ala Met Tyr Val Gly Asp Leu Cys Gly Ser Val Phe Leu Val
 85 90 95

Ser Gln Leu Phe Thr Ile Ser Pro Arg Arg His Glu Thr Val Gln Asp
 100 105 110

Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg Met Ala
 115 120 125

Trp Asp Met Met Met Asn Trp
 130 135

<210> 3
 <211> 290
 <212> PRT
 <213> virus hepatitidy C

<400> 3

His Thr Arg Val Ser Gly Gly Ala Ala Ala Ser Asp Thr Arg Gly Leu
 1 5 10 15

Val Ser Leu Phe Ser Pro Gly Ser Ala Gln Lys Ile Gln Leu Val Asn
 20 25 30

Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Arg Thr Ala Leu Asn Cys Asn Asp
 35 40 45

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

Asn Ser Ser Gly Cys Pro Glu Arg Leu Ala Ser Cys Arg Ser Ile Asp
65 70 75 80

Lys Phe Ala Gln Gly Trp Gly Pro Leu Thr Tyr Thr Glu Pro Asn Ser
85 90 95

Ser Asp Gln Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Ala Pro Arg Pro Cys Gly
100 105 110

Ile Val Pro Ala Ser Gln Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro
115 120 125

Ser Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Phe Gly Val Pro Thr Tyr
130 135 140

Asn Trp Gly Ala Asn Asp Ser Asp Val Leu Ile Leu Asn Asn Thr Arg
145 150 155 160

Pro Pro Arg Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn Gly Thr Gly
165 170 175

Phe Thr Lys Thr Cys Gly Gly Pro Pro Cys Asn Ile Gly Gly Ala Gly
180 185 190

Asn Asn Thr Leu Thr Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro Glu
195 200 205

Ala Thr Tyr Ala Arg Cys Gly Ser Gly Pro Trp Leu Thr Pro Arg Cys
210 215 220

Met Val His Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Val Asn
225 230 235 240

Phe Thr Ile Phe Lys Val Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg
245 250 255

Phe Glu Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg Cys Asp Leu Glu
260 265 270

Asp Arg Asp Arg Ser Glu Leu Ser Pro Leu Leu Leu Ser Thr Thr Glu
275 280 285

Trp Gln
290

<210> 4
<211> 141
<212> PRT
<213> virus hepatitidy C

<400> 4

Tyr Glu Val Arg Asn Val Ser Gly Met Tyr His Val Thr Asn Asp Cys
1 5 10 15

Ser Asn Ser Ser Ile Val Tyr Glu Ala Ala Asp Met Ile Met His Thr
20 25 30

Pro Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu Asn Asn Ser Ser Arg Cys Trp
35 40 45

Val Ala Leu Thr Pro Thr Leu Ala Ala Arg Asn Ala Ser Val Pro Thr
50 55 60

Thr Thr Ile Arg Arg His Val Asp Leu Leu Val Gly Ala Ala Ala Phe
65 70 75 80

Cys Ser Ala Met Tyr Val Gly Asp Leu Cys Gly Ser Val Phe Leu Val
85 90 95

Ser Gln Leu Phe Thr Ile Ser Pro Arg Arg His Glu Thr Val Gln Asp
100 105 110

Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg Met Ala
115 120 125

Trp Asp Met Met Met Asn Trp His His His His His His
130 135 140

<210> 5
<211> 301
<212> PRT
<213> virus hepatitidy C

<400> 5

His Thr Arg Val Ser Gly Gly Ala Ala Ala Ser Asp Thr Arg Gly Leu
1 5 10 15

Val Ser Leu Phe Ser Pro Gly Ser Ala Gln Lys Ile Gln Leu Val Asn
20 25 30

Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Arg Thr Ala Leu Asn Cys Asn Asp
 35 40 45

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

Asn Ser Ser Gly Cys Pro Glu Arg Leu Ala Ser Cys Arg Ser Ile Asp
 65 70 75 80

Lys Phe Ala Gln Gly Trp Gly Pro Leu Thr Tyr Thr Glu Pro Asn Ser
 85 90 95

Ser Asp Gln Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Ala Pro Arg Pro Cys Gly
 100 105 110

Ile Val Pro Ala Ser Gln Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro
 115 120 125

Ser Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Phe Gly Val Pro Thr Tyr
 130 135 140

Asn Trp Gly Ala Asn Asp Ser Asp Val Leu Ile Leu Asn Asn Thr Arg
 145 150 155 160

Pro Pro Arg Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn Gly Thr Gly
 165 170 175

Phe Thr Lys Thr Cys Gly Gly Pro Pro Cys Asn Ile Gly Gly Ala Gly
 180 185 190

Asn Asn Thr Leu Thr Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro Glu
 195 200 205

Ala Thr Tyr Ala Arg Cys Gly Ser Gly Pro Trp Leu Thr Pro Arg Cys
 210 215 220

Met Val His Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Val Asn
 225 230 235 240

Phe Thr Ile Phe Lys Val Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg
 245 250 255

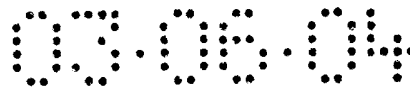
Phe Glu Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg Cys Asp Leu Glu
 260 265 270

Asp Arg Asp Arg Ser Glu Leu Ser Pro Leu Leu Leu Ser Thr Thr Glu
 275 280 285

Trp Gln Val Ile Glu Gly Arg His His His His His His
 290 295 300

<210> 6
 <211> 3448
 <212> DNA
 <213> vektor pGEMTE1sH6

<400> 6
 aatcactagt gggcgccgct gcaggctcgac catatgggag agctcccaac gcgttggatg 60
 catagcttga gtattctata gtgtcaccta aatagcttgg cgtaatcatg gtcatactg 120
 tttcctgtgt gaaattgtta tccgctcaca attccacaca acatacgagc cggaagcata 180
 aagtgtaaag cctgggggtgc ctaatgagtg agctaactca cattaattgc gttgcgctca 240
 ctgcccgtt tccagtcggg aaacctgtcg tgccagctgc attaatgaat cggccaacgc 300
 gcggggagag gcggtttgcg tattggggcg tcttcgctt cctcgctcac tgactcgctg 360
 cgctcggtcg ttcggtcg gcgagcggta tcagctcact caaaggcggg aatacggtta 420
 tccacagaat caggggataa cgcaggaaag aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc 480
 aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg tttttcgata ggctccgccc cctgacgag 540
 catcacaata atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac 600
 caggcgtttc cccctggaag ctccctcgct cgctctctctg ttccgaccct gccgcttacc 660
 ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga agcgtggcg tttctcatag ctacgctgt 720
 aggtatctca gttcgggtga ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc 780
 gttcagccc accgctgcgc cttatccggt aactatcgtc ttgagtcaca cccggtaga 840
 cagcacttat cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta 900
 ggcggtgcta cagagttctt gaagtgggtg cctaactacg gctacactag aaggacagta 960
 tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa aaagagttgg tagctcttga 1020
 tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg 1080
 cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag 1140
 tggaacgaaa actcacgta agggattttg gtcagagat tatcaaaaag gatcttcacc 1200
 tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata tgagtaaaact 1260
 tgggtctgaca gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat ctgtctatct 1320
 cgttcaccca tagttgcctg actccccgct gtgtagataa ctacgatacg ggagggtta 1380



ccattctggcc ccagtgtctgc aatgataccg cgagaccac gctcacggc tccagattta 1440
 tcagcaataa accagccagc cggaaggcc gagcgagaa gtggtcctgc aactttatcc 1500
 gcctccatcc agtctattaa ttgttgccgg gaagctagag taagtagttc gccagttaat 1560
 agtttgcgca acgttggttg cattgtaca ggcacgttg tgtcacgctc gtcgtttggt 1620
 atggcttcat tcagctccgg ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgac cccatgttg 1680
 tgcaaaaaag cggtagctc cttcggtcct ccgacgttg tcagaagtaa gttggccgca 1740
 gtgttatcac tcatggttat ggcagcaactg cataattctc ttactgtcat gccatccgta 1800
 agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca accaagtcac tctgagaata ccgcgccgg 1860
 cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtcaata cgggataata gtgtatgaca tagcagaact 1920
 ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg 1980
 ctgttgagat ccagttcgat gtaaccact cgtgcacca actgatcttc agcatctttt 2040
 actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga 2100
 ataaggcgca caggaagtg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc 2160
 atttatcagg gttattgtct catgagcgga tacatatctg aatgtattta gaaaaataaa 2220
 caaatagggg ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctgtatgagg tgtgaaatac 2280
 cgcacagatg cgttaaggaga aaataccgca tcaggcgaaa ttgtaaactg taatatcttg 2340
 ttaaaattcg cgttaaatat ttgttaaact agctcatttt ttaaccaata ggccgaaatc 2400
 ggcaaaatcc cttataaatc aaaagaatag accgagatag ggttgagtgt tgttccagtt 2460
 tggaacaaga gtccactatt aaagaactg gactccaacg tcaaaggcg aaaaaccgtc 2520
 tatcaggggc atggccact acgtgaacca tcacccaaat caagtttttt gcggtcgagg 2580
 tgccgtaaa gctataaatc gaaccctaaa gggagcccc gatttagagc ttgacgggga 2640
 aagccggcga acgtggcgag aaaggaaggg aagaaagcga aaggagcggg cgtagggcg 2700
 ctggcaagtg tagcgggtcac gctgcgcta accaccacac ccgcgcgct taatgcgcg 2760
 ctacagggcg cgtccattcg ccattcaggc tgcgcaactg ttgggaaggg cgatcgggtc 2820
 gggcctcttc gctattacgc cagctggcga aagggggatg tgctgcaagg cgattaagtt 2880
 gggtaacgcc agggttttcc cagtcacgac gttgtaaaac gacggccagt gaattgtaat 2940
 acgactcact atagggcgaa ttggggccga cgtcgcatgc tcccgccgc catggccgcg 3000
 ggattccaat gcatatgagg tgcgcaactg gtccgggatg taccatgtca cgaacgactg 3060
 ctccaactca agcattgtgt atgaggcagc ggacatgac atgcacacc ccgggtgctg 3120
 gcctgcgtt cgggagaaca actcttccc cgtctgggta gcgtcaccc ccacgctcg 3180
 agctaggaac gccagcgtcc ccactacgac aatacgacg cagctcgatt tgctcgttg 3240

ggcggctgct ttctgttccg ctatgtacgt gggggatctc tgcggatctg tcttcctcgt 3300
 ctcccagctg ttcaccatct cgcctcgccg gcatgagacg gtgcaggact gcaattgctc 3360
 aatctatccc ggccacataa caggtcaccc tatggcttgg gatatgatga tgaactggca 3420
 ccaccaccat caccattaag gatccaag 3448

<210> 7
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> syntetická sonda nebo primer

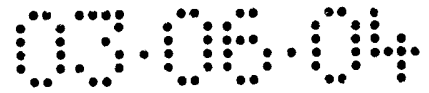
<400> 7
 agttactctt caaggtatga ggtgcgcaac gtgtccg 37

<210> 8
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> syntetická sonda nebo primer

<400> 8
 agttactctt cacagggatc ctccctaatg gtgatgggtg tggtgcc 47

<210> 9
 <211> 3067
 <212> DNA
 <213> vektor pCHH-Hir

<400> 9
 gcgccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca 60
 cgacagggtt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaatg tgagttagct 120
 cactcattag gcacccagc ctttacactt tatgcttccg gctcgtatgt tgtgtggaat 180
 tgtgagcgga taacaatttc acacaggaaa cagctatgac catgattacg ccaagcttgc 240
 atgcctgcag gtgcacccta gatctctatt actgcaggta ttcttccggg atttcttcga 300
 agtcgccgct gttgtgagac tgcggacgcg gggtagcttc gccagtaacg cactggttac 360
 gttcgccctt agagcccagg atgcatttgt tgccctggcc gcaaaccgta gaccttcgc 420
 acaggcacag gttctgaccg gattcagtgc agtcagtgt aacaaccctc tttccaacg 480
 ggtgtgtagt tccattctcc accgctaggg ctgcgctggg ctccattggc gaggttttca 540
 aggcgcgtag gatgcgatcc atgcgtccgt agccttgctg ggagcgtgcg tgtgcgtgcg 600
 ggagtgcgca taggtaggct acggtgatga ttgctagcat ggcggaata gttttgctat 660
 acatgaattc actggccgct gttttacaac gtcgtgactg ggaaaaccct ggcgttaccc 720
 aacttaatcg ccttgcagca catccccctt tcgccagctg gcgtaatagc gaagaggccc 780
 gcaccgatcg cccttcccaa cagttgcgca gcctgaatgg cgaatggcgc ctgatgcggt 840



```

atcttctcct tacgcatctg tgcggtatct cacaccgcat atggtgcaact ctgagtacaa      900
tctgctctga tgccgcatag ttaagccagc cccgacaccc gccaacaccc gctgacgcgc      960
cctgacgggc ttgtctgctc ccggcatccg cttacagaca agctgtgacc gtctccggga      1020
gctgcatgtg tcagagggtt tcaccgtcat caccgaaacg cgcgagacga aagggcctcg      1080
tgatacgctt atttttatag gttaatgtca tgataataat ggtttcttag acgtcagggt      1140
gcacttttct gggaaatgtg cgcggaaccc ctatttgttt atttttctaa atacattcaa      1200
atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga      1260
agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc cttttttgcg gcattttgcc      1320
ttcctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg      1380
gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt gagagttttc      1440
gccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaaagt tctgctatgt ggcgcggtat      1500
tatcccgat tgacgcgggg caagagcaac tcggtcgccc catacactat tctcagaatg      1560
acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac ggatggcatg acagtaagag      1620
aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataacactgc ggccaactta cttctgacaa      1680
cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgcaaa catgggggat catgtaactc      1740
gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca      1800
cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt aactggcgaa ctacttactc      1860
tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga taaagttgca ggaccacttc      1920
tgcgctcggc ccttccggct ggctggttta ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg      1980
ggtctcgcg tgatcttga gcaactgggc cagatggtaa gccctccgt atcgtagtta      2040
tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag      2100
gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt ttactcatat atactttaga      2160
ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt gaagatcctt tttgataatc      2220
tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa      2280
agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaacaa      2340
aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttggt tgccggatca agagctacca actctttttc      2400
cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac tgccttcta gtgtagccgt      2460
agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac atacctcgct ctgctaatac      2520
tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac      2580
gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca      2640

```

gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg 2700
 ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag 2760
 gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt 2820
 ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat 2880
 ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc cttttgctgg ccttttgctc 2940
 acatgttctt tcctgcgtta tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt 3000
 gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgag cgagtcagtg agcgaggaag 3060
 cggaaga 3067

<210> 10
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> syntetická sonda nebo primer

<400> 10
 agttactctt cacctctttt ccaacgggtg tgtag 35

<210> 11
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> syntetická sonda nebo primer

<400> 11
 agtcactctt cactgcaggc atgcaagctt ggcg 34

<210> 12
 <211> 6973
 <212> DNA
 <213> vektor pFPMT121

<400> 12
 ggtaccctgc tcaatctcgc gaatggtgat ctgatcgttc ctgaaaacct cgacattggc 60
 tccctcctga cacaggctact cgtacagggt ccaggtaaag gagtcgtagt tgcgatcat 120
 gacaacgttc ttagaagcgg ccggcatttt gaagggtgact aatagcctaa gaaaatattt 180
 aatttaattt tcattaaatt ttcctatact cgctatttca gcttttcac tcatcacttc 240
 ataaacgata taaaccagaa aaagaactat tttcaaacac gcttctcaaa agcggtagt 300
 ccttcacgt ctcccttagaa tctggcaagt ccgaggggg gatccagatc tgaattcccg 360
 atgaagcaga gagcgcagga ggcggtatct atagtgccat tccctctct gagagaccg 420
 gatggtagtc gagtgtatcg gagacagctt gatgtagact ccgtgcctgc cggctcctct 480
 tattggcgga caccagttag acaccccgga acttgctgtt tttctgcaaa atccgggggtg 540
 accagtggga gcctatttgc acacacgagc gggacacccc actctgggtga agagtgc 600

agtcattctt tttcccgttg cggggcagcc gattgcatgt tttaggaaaa tattaccttt 660
 gctacaccct gtcagattta cctccacac atatataatc cgtcacctcc agggactatt 720
 attcgtcgtt ggcgcgcag cggaagatat ccagaagctg ttttccgaga gactcgggtt 780
 gcgcctggta tatttgatgg atgtcgcgt gcctcacgtc ccggtacca ggaacgcggt 840
 gggatctcgg gccatcgaa gactgtgctc cagactgctc gccagcagg tgtttcttga 900
 tcgcccctc taaattgtcc gcgcacgtc ggtaacattt ttccagctcg gagtttgcgt 960
 ttagatacag tttctcgat gccaaaggag cctgcagatt ataacctcg atgtgtcat 1020
 tcagcgcttt taatttgacc tccagatagt tgctgtattt ctgttcccat tggctgctgc 1080
 gcagcttcgt ataactcgag ttattgttgc gctctgcctc gggtactgg ctcatgatct 1140
 ggatcttgtc cgtgtcgtt ttcttcgagt gtttctcgca aacgatgtgc acggcctgca 1200
 gtgtccaatc ggagtcgagc tggcgcgaa actggcggtat ctgagcctcc acactgccct 1260
 gtttctctat ccacggcgga accgcctcct gccgtttcag aatgttggtc aagtgggtact 1320
 ctgtgcggtc aatgaaggcg ttattgccgg tgaaatcttt gggaagcggg tttcctcggg 1380
 gaagattacg aaattccccg cgtcgttgcg ctctctggat ctcgaggaga tcgttctccg 1440
 cgtcgaggag atcgttctcc gcgtcgacac cattccttgc ggcggcgggt ctcaacggcc 1500
 tcaacctact actgggctgc ttcctaatgc aggagtcgca taaggagag cgtcgacaaa 1560
 ccgcggttg agaacttgct caagcttctg gtaaacgttg tagtactctg aaacaaggcc 1620
 ctagcactct gatctgttct tcttgggtag cgggtgagtgg tttattggag ttactgggt 1680
 tcagcacatc tgcatctag acaatattgt tactaaattt ttttgaacta caattgttog 1740
 taattcatct attattatac atcctcgta gcaatttctg gcagacggag tttactaacg 1800
 tcttgagtat gaggccgaga atccagctct gtggccatac tcagtcttga cagcctgctg 1860
 atgtggctgc gttcaacgca ataagcgtgt cctccgactc cgagttgtgc tcgttatcgt 1920
 cgttctcatc ctcgaaaaa tcacacgaaa gaacatactc accagtaggc tttctgggtc 1980
 ctggggcacg gctgttctg acgtattccg gcgttgataa tagctcgaaa gtgaacgccg 2040
 agtcgcggga gtcacgat gcccttgaga gccttcaacc cagtcagctc ctccgggtg 2100
 gcgcggggca tgactatcgt cgcgcactt atgactgtct tctttatcat gcaactcgta 2160
 ggacagggtc cggcagcgt ctgggtcatt ttcggcgagg accgcttctg ctggagcgcg 2220
 acgatgatcg gcctgtcgt tgcggtattc ggaatcttgc acgcctcgc tcaagccttc 2280
 gtcactggtc ccgccacaa acgtttcggc gagaagcagg ccattatcgc cggcatggcg 2340
 gccgacgcgc tgggctacgt cttgctggcg ttgcgcagc gaggetggat ggccttccc 2400
 attatgattc ttctcgcttc cggcggcatc gggatgcccg cgttcaggc catgctgtcc 2460

aggcaggtag atgacgacca tcagggacag cttcaaggat cgctcgcggc tcttaccagc 2520
 ctaacttcga tcactggacc gctgacgctc acggcgattt atgccgcctc ggcgagcaca 2580
 tggaacgggt tggcatggat tgtaggcgcc gccctatacc ttgtctgect ccccgcgttg 2640
 cgctcgcggtg catggagccg ggccacctcg acctgaatgg aagccggcgg cacctcgcta 2700
 acggattcac cactccaaga attggagcca atcaattctt gcggagaact gtgaatgcgc 2760
 aaaccaaccc ttggcagaac atatccatcg cgctcgccat ctccagcagc cgcacgcggc 2820
 gcatcggggg gggggggggg gggggggggc aaacaattca tcattttttt tttattcttt 2880
 tttttgattt cggtttcttt gaaattttt tgattcggtt atctccgaac agaaggaaga 2940
 acgaaggaag gagcacagac ttagattggt atatatacgc atatgtagtg ttgaagaaac 3000
 atgaaattgc ccagtattct taaccctaact gcacagaaca aaaacctgca ggaaacgaag 3060
 ataaatcatg tcgaaagcta catataagga acgtgctgct actcatccta gtctgtttgc 3120
 tgccaagcta tttaatatca tgcacgaaaa gcaaacaac ttgtgtgctt cattggatgt 3180
 tcgtaccacc aaggaattac tggagttagt tgaagcatta ggtcccaaaa tttgtttact 3240
 aaaaacacat gtggatatct tgactgattt ttccatggag ggcacagtta agccgctaaa 3300
 ggcattatcc gccaaagtaca attttttact cttcgaagac agaaaatttg ctgacattgg 3360
 taatacagtc aaattgcagt actctgcggg tgtatacaga atagcagaat gggcagacat 3420
 tacgaatgca cacggtgtgg tgggcccagg tattgttagc ggtttgaagc aggcggcaga 3480
 agaagtaaca aaggaaccta gaggcctttt gatgttagca gaattgtcat gcaagggctc 3540
 cctatctact ggagaatata ctaagggtag tgttgacatt gcgaagagcg acaaagattt 3600
 tgttatcggc tttattgctc aaagagacat gggtggaaga gatgaagggtt acgattgggt 3660
 gattatgaca cccggtgtgg gtttagatga caagggagac gcattgggtc aacagtatag 3720
 aaccgtggat gatgtggtct ctacaggatc tgacattatt attgttgga gaggactatt 3780
 tgcaaaggga agggatgcta aggtagaggg tgaacgttac agaaaagcag gctgggaagc 3840
 atatttgaga agatgcggcc agcaaaacta aaaaactgta ttataagtaa atgcatgtat 3900
 actaaactca caaattagag cttcaattta attatatcag ttattacccg ggaatctcgg 3960
 tcgtaatgat ttttataatg acgaaaaaaaa aaaaattgga aagaaaagcc cccccccccc 4020
 cccccccccc cccccccccc ccgcagcgtt gggtcctggc cacgggtgcg catgatcgtg 4080
 ctctgtcgt tgaggaccgg gctaggctgg cggggttgcc ttactgggtta gcagaatgaa 4140
 tcaccgatac gcgagcgaac gtgaagcgac tgctgctgca aaacgtctgc gacctgagca 4200
 acaacatgaa tggctctcgg ttccgtgtt tcgtaaagtc tggaaacgcg gaagtcagcg 4260

cactgcacca ttatgttccg gatctgcacg gcaggatgct gctggctacc ctgtggaaca 4320
cctacatctg tattaacgaa gcgctggcat tgaccctgag tgatttttct ctgggtccgc 4380
cgcatccata cgcgcagttg tttaccctca caacgttcca gtaaccgggc atgttcatca 4440
tcagtaaccc gtatcgtgag catcctctct cgtttcatcg gtatcattac ccccatgaac 4500
agaaattccc ccttacacgg aggcatacaag tgaccaaaaca ggaaaaaacc gcccttaaca 4560
tggcccgctt tatcagaagc cagacattaa cgcttctgga gaaactcaac gagctggacg 4620
cggatgaaca ggcagacatc tgtgaatcgc ttcacgacca cgctgatgag ctttaccgca 4680
gctgcctcgc gcgtttcggg gatgacgggtg aaaacctctg acacatgcag ctcccggaga 4740
cggtcacagc ttgtctgtaa gcggatgccg ggagcagaca agcccgtcag ggcgcgtcag 4800
cgggtgttgg cgggtgtcgg ggcgcagcca tgaccagtc acgtagcgat agcggagtgt 4860
atactggctt aactatgcgg catcagagca gattgtactg agagtgcacc atatgcgggtg 4920
tgaaataccg cacagatgcg taaggagaaa atacgcacg aggcgctctt ccgcttctc 4980
gctcactgac tcgctgcgct cggctcgttcg gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaa 5040
ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa 5100
aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggcgcggttg ctggcgtttt tccataggct 5160
ccgccccct gacgagcatc aaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac 5220
aggactataa agataaccagg cgtttccccc tggaagctcc ctctgctgct ctctgttcc 5280
gacctgccc cttaccggat acctgtccc ctttctccct tcgggaagcg tggcgcttcc 5340
tcatagctca cgctgtagggt atctcagttc ggtgtaggtc gtctgctcca agctgggctg 5400
tgtgcacgaa cccccgttc agcccgaccg ctgcgcctta tccggtaact atcgtcttga 5460
gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag 5520
cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag tgggtggcta actacggcta 5580
cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag 5640
agttggtagc tcttgatccg gcaacaaac caccgctggg agcgggtggt tttttgtttg 5700
caagcagcag attacgcgca gaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga tcttttctac 5760
ggggtctgac gctcagtga acgaaaactc acgttaaggg attttggta tgagattatc 5820
aaaaaggatc ttcacctaga tccttttaaa ttaaaaatga agttttaaat caatctaaag 5880
tatatatgag taaacttggg ctgacagtta ccaatgctta atcagtgagg cacctatctc 5940
agcgatctgt ctatttcggt catccatagt tgccctgactc cccgtcgtgt agataactac 6000
gatacgggag ggcttaccat ctggccccag tgctgcaatg ataccgcgag acccacgctc 6060
accggctcca gatttatcag caataaacca gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg 6120

tcctgcaact ttatccgcct ccatccagtc tattaattgt tgccgggaag ctagagtaag 6180
 tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaacgt tgttgccatt gctgcaggca tcgtggtgtc 6240
 acgctcgtcg tttggtatgg cttcattcag ctccggttcc caacgatcaa ggcgagttac 6300
 atgatcccc atgttgtgca aaaaagcggg tagctccttc ggtcctccga tcgttgtcag 6360
 aagtaagttg gccgcagtgt tatcactcat ggttatggca gcaactgcata attctcttac 6420
 tgtcatgcca tccgtaagat gcttttctgt gactggtgag tactcaacca agtcattctg 6480
 agaatagtgt atgcccgcac cgagttgtct ttgcccggcg tcaacacggg ataataccgc 6540
 gccacatagc agaactttaa aagtgtcat cattggaaaa cgttcttcgg ggcgaaaact 6600
 ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag ttcatgtaa cccactcgtg caccctaactg 6660
 atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa 6720
 tgccgcaaaa aagggaataa gggcgacacg gaaatgttga atactcatac tcttcctttt 6780
 tcaatattat tgaagcattt atcagggtta ttgtctcatg agcggatata tatttgaatg 6840
 tatttagaaa aataacaaa taggggttcc gcgcacattt ccccgaaaag tgccacctga 6900
 cgtctaagaa accattatta tcatgacatt aacctataaa aataggcgta tcacgaggcc 6960
 ctttcgtctt caa 6973

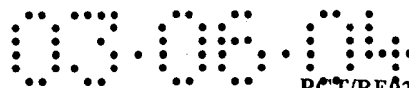
<210> 13
 <211> 7591
 <212> DNA
 <213> vektor pFPMT-CHH-E1H6

<400> 13
 ggtacctgc tcaatctccg gaatggtgat ctgacgttc ctgaaaacct cgacattggc 60
 tccctctga cacagggtact cgtacagggt ccaggtaaac gagtcgtagt tgcgatcat 120
 gacaacgttc ttagaagcgg ccggcatttt gaagggtgact aatagcctaa gaaaatattt 180
 aatttaattt tcattaaatt ttcctatact cgctatttca gcttttcac tcactcctc 240
 ataaacgata taaaccagaa aaagaactat tttcaaacac gcttctcaa agcggtatgt 300
 ccttcacgt ctcccttagaa tctggcaagt ccgcgagggg gatccttaat ggtgatggtg 360
 gtggtgccag ttcacatca tatcccaagc catacgggtga cctgttatgt ggcggggata 420
 gattgagcaa ttgcagtcct gcaccgtctc atgcccgcga ggcgagatgg tgaacagctg 480
 ggagacgagg aagacagatc cgcagagatc cccacgtac atagcggaa agaaagcagc 540
 cgccccaacc agcaaactga cgtggcgtcg tattgtcgta gtggggacgc tggcgttctc 600
 agctgcgagc gtgggggtga gcgctacca gcagcgggaa gagttgttct cccgaacgca 660
 gggcacgcac ccgggggtgt gcatgatcat gtccgctgcc tcatacacia tgcttgagtt 720

ggagcagtcg ttcgtgacat ggtacatccc ggacacgttg cgcacctcat acctcttttc 780
 caacgggtgt gtagttccat tctccaccgc tagggctgcg ctgggctcca ttggcgaggt 840
 tttcaaggcc gctaggatgc gatccatgcg tccgtagcct tgcgtggagc gtgcgtgtgc 900
 gtgcgggagt gcgcataaggt aggtacgggt gatgattgct agcatggcgg gaatagtttt 960
 gctatacatg aattcccgat gaagcagaga gcgcaggagg cggatatttat agtgccattc 1020
 ccctctctga gagacccgga tggtagtcga gtgtatcgga gacagcttga tgtagactcc 1080
 gtgcctgcgc gctcctctta ttggcggaca ccagtgcgac accccggaac ttgctgtttt 1140
 tctgcaaaat cgggggtgac cagtgggagc ctatttgcac acacgagcgg gacacccac 1200
 tctggtgaag agtgccaaag tcattctttt tccggttgcg gggcagccga ttgcatgttt 1260
 taggaaaata ttacctttgc tacacctgt cagatttacc ctccacacat atatattccg 1320
 tcacctccag ggactatttat tcgtcgttgc gccgccagcg gaagatatcc agaagctgtt 1380
 ttccgagaga ctgcgttggc gcctggtata ttgatggat gtgcgctgc ctcacgtccc 1440
 ggtaccagcgg aacgcggtgg gatctcgggc ccatcgaaga ctgtgctcca gactgctcgc 1500
 ccagcaggtg tttcttgatc gccgcctcta aattgtccgc gcacgcggg taacattttt 1560
 ccagctcgga gtttgcgttt agatacagtt tctgcgatgc caaaggagcc tgcagattat 1620
 aacctcggtat gctgtcatte agcgccttta atttgacctc cagatagttg ctgtatttct 1680
 gttccattg gctgctgcgc agcttcgtat aactcgagtt attgttgcgc tctgcctcgg 1740
 cgtactggct catgatctgg atcttgtccg tgtcgtttt cttagagtgt ttctcgcaa 1800
 cgatgtgcac ggctgcagt gtccaatcgg agtcgagctg gcgccgaaac tggcggatct 1860
 gagcctccac actgcctgt ttctctatcc acggcggaaac cgcctcctgc cgtttcagaa 1920
 tgttgttcaa gtggtactct gtgcggtcaa tgaaggcgtt attgccggtg aaatctttgg 1980
 gaagcggttt tctcgggga agattacgaa attccccgcg tcgttgcgct tcttggatct 2040
 cgaggagatc gttctccgcg tcgaggagat cgttctccgc gtcgacacca ttcttgcgg 2100
 cggcgggtgt caacggcctc aacctactac tgggctgctt cctaatagcag gagtcgcata 2160
 agggagagcg tcgacaaacc cgcgtttgag aacttgcctc agcttctggt aaacgttgta 2220
 gtactctgaa acaaggccct agcactctga tctgtttctc ttgggtagcg gtgagtgggt 2280
 tattggagtt cactggtttc agcacatctg tcatctagac aatattgtta ctaaattttt 2340
 ttgaactaca attgttcgta attcatctat tattatacat cctcgtcagc aatttctggc 2400
 agacggagtt tactaacgtc ttgagtatga ggccgagaat ccagctctgt ggccatactc 2460
 agtcttgaca gcctgctgat gtggctgcgt tcaacgcaat aagcgtgtcc tccgactccg 2520

agttgtgctc gttatcgctc ttctcatcct cggaaaaatc acacgaaaga acatactcac 2580
 cagtaggctt tctgggtccct ggggcacggc tgtttctgac gtattccggc gttgataata 2640
 gctcgaaagt gaacgccgag tcgcgggagt cgaccgatgc ccttgagagc cttcaaccca 2700
 gtcagctcct tccgggtgggc gcggggcatg actatcgctc ccgcacttat gactgtcttc 2760
 tttatcatgc aactcgtagg acaggtgccg gcagcgctct gggtcatttt cggcgaggac 2820
 cgctttcgct ggagcgcgac gatgatcggc ctgtcgcttg cggtattcgg aatcttgcaac 2880
 gccctcgctc aagccttcgt cactgggtccc gccaccaaac gtttcggcga gaagcaggcc 2940
 attatcgccg gcatggcggc cgacgcgctg ggctacgtct tgctggcggt cgcgacgga 3000
 ggctggatgg ccttcccat tatgattott ctgccttcg gcggcatcgg gatgcccgcg 3060
 ttgcaggcca tgctgtccag gcaggtagat gacgaccatc agggacagct tcaaggatcg 3120
 ctgcggctc ttaccagcct aacttcgatc actggaccgc tgatcgtcac ggcgatttat 3180
 gcgcctcgg cgagcacatg gaacggggtg gcatggattg taggcgccgc cctatacctt 3240
 gtctgcctcc ccgcgttgcg tcggggtgca tggagccggg ccacctcgac ctgaatggaa 3300
 gccggcggca cctcgtaac ggattcacca ctccaagaat tggagccaat caattcttgc 3360
 ggagaactgt gaatgcgcaa accaaccctt ggcagaacat atccatcgcg tccgccatct 3420
 ccagcagccg cacgcggcgc atcggggggg gggggggggg gggggggcaa acaattcatc 3480
 attttttttt tattcttttt tttgatttcg gtttctttga aatttttttg attcggtaat 3540
 ctccgaacag aaggaagaac gaaggaagga gcacagactt agattggtat atatacgcat 3600
 atgtagtgtt gaagaaacat gaaattgcc agtattctta acccaactgc acagaacaaa 3660
 aacctgcagg aaacgaagat aatcatgtc gaaagctaca tataaggaac gtgtgtctac 3720
 tcatcctagt cctgttgctg ccaagctatt taatatcatg cacgaaaagc aaacaaactt 3780
 gtgtgcttca ttggatgttc gtaccaccaa ggaattactg gagttagtgt aagcattagg 3840
 tcccaaaatt tgtttactaa aaacacatgt ggatatcttg actgattttt ccatggaggg 3900
 cacagttaag ccgctaaagg cattatccgc caagtacaat tttttactct tcgaagacag 3960
 aaaatttgct gacattggta atacagtcaa attgcagtac tctgcgggtg tatacagaat 4020
 agcagaatgg gcagacatta cgaatgcaca cgggtgtggtg ggcccaggta ttgttagcgg 4080
 tttgaagcag gcggcagaag aagtaacaaa ggaacctaga ggccttttga tgtagcaga 4140
 attgtcatgc aagggtccc tatctactgg agaataact aagggtactg ttgacattgc 4200
 gaagagcgac aaagattttg ttatcggtt tattgtcaa agagacatgg gtggaagaga 4260
 tgaaggttac gattggttga ttatgacacc cgggtgtgggt ttagatgaca agggagacgc 4320
 attgggtcaa cagtatagaa ccgtggatga tgtggtctct acaggatctg acattattat 4380

tgttggaaga ggactatattg caaaggggaag ggatgctaag gtagaggggtg aacgttacag 4440
 aaaagcaggc tgggaagcat atttgagaag atgcggccag caaaactaaa aaactgtatt 4500
 ataagtaaata gcatgtatac taaactcaca aattagagct tcaatttaata tataatcagtt 4560
 attaccgggg aatctcggtc gtaatgattt ttataatgac gaaaaaaaaa aaattggaaa 4620
 gaaaagcccc cccccccccc cccccccccc cccccccccc gcagcgttgg gtcttgcca 4680
 cgggtgcgca tgatcgtgct cctgtcgttg aggaccggc taggctggcg gggttgcctt 4740
 actggttagc agaataaat accgatacgc gagcgaacgt gaagcgactg ctgctgcaaa 4800
 acgtctcgca cctgagcaac aacatgaatg gtcttcgggt tccgtgtttc gtaaagtctg 4860
 gaaacgcgga agtcagcgcc ctgcaccatt atgttcggga tctgcacgc aggatgctgc 4920
 tggctaccct gtggaacacc tacatctgta ttaacgaagc gctggcattg accctgagt 4980
 atttttctct ggtcccgccg catccatacc gccagttgtt taccctcaca acgttccagt 5040
 aaccgggcat gttcatcatc agtaaccgt atcgtgagca tctctctctg tttcatcgg 5100
 atcattaccc ccatgaacag aaattcccc ttacacggag gcatcaagt accaaacagg 5160
 aaaaaaccgc ccttaacatg gcccgcttta tcagaagcca gacattaacg cttctggaga 5220
 aactcaacga gctggacgcg gatgaacagg cagacatctg tgaatcgctt cagaccacg 5280
 ctgatgagct ttaccgcagc tgctcgcgc gtttcgggtga tgacggtgaa aacctctgac 5340
 acatgcagct cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc ggatgccggg agcagacaag 5400
 cccgtcaggg cgcgtcagcg ggtgttggcg ggtgtcgggg cgcagccatg acccagtcac 5460
 gtagcgatag cggagtgtat actggcttaa ctatgcggca tcagagcaga ttgtactgag 5520
 agtgcaccat atgcgggtgtg aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat accgcatcag 5580
 gcgctcttcc gcttctctgc tcaactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc 5640
 ggtatcagct cactcaaagg cggtaatagc gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg 5700
 aaagaacatg tgagcaaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct 5760
 ggcgtttttc cataggctcc gccccttga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca 5820
 gaggtggcga aaccgcagag gactataaag ataccaggcg ttccccctg gaagctccct 5880
 cgtgcgctct cctgttccga cctgcgctt taccggatac ctgtcgcctt ttctcccttc 5940
 gggaaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctgagttcgg ttaggtcgt 6000
 tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc cccgcttcag cccgaccgt gcgccttctc 6060
 cggtaaactat cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc 6120
 cactggtaac aggattagca gagcgaggta ttaggcgggt gctacagagt tcttgaagt 6180



gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggg atctgcgctc tgctgaagcc 6240
 agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag 6300
 cgggtggtttt ttgttttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga 6360
 tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtgaac gaaaactcac gttaagggat 6420
 tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag 6480
 ttttaaatac atctaaagta tatatgagta aacttgggtc gacagttacc aatgcttaat 6540
 cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc 6600
 cgtcgtgtag ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat 6660
 accgcgagac ccacgctcac cggtccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag 6720
 ggccgagcgc agaagtggc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg 6780
 ccgggaagct agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc 6840
 tgcaggcatc gtggtgtcac gctcgtcgtt tggtaggct tcattcagct ccggttccca 6900
 acgatcaagg cgagttacat gatccccat gttgtgcaaa aaagcgggta gtccttcgg 6960
 tcctccgacg gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtgtta tcaactcatg ttatggcagc 7020
 actgcataat tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta 7080
 ctcaaccaag tcattctgag aatagtgtat gggcgaccg agttgctctt gcccggcgctc 7140
 aacacgggat aataccgcgc cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg 7200
 ttcttcgggg cgaaaactct caaggatctt accgctgttg agatccagtt cgatgtaacc 7260
 cactcgtgca cccaactgat cttcagcatc ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc 7320
 aaaaacagga aggcaaatg ccgcaaaaaa gggaataagg gcgacacgga aatgttgaat 7380
 actcactc ttcctttttc aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag 7440
 cggatacata ttgaaatgta tttagaaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc 7500
 ccgaaaagtg ccacctgacg tctaagaaac cattattatc atgacattaa cctataaaaa 7560
 taggcgtatc acgaggccct ttcgtcttca a 7591

<210> 14
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> syntetická sonda nebo primer

<400> 14
 aggggtaagc ttggataaaa ggtatgaggt gcgcaacgtg tccgggatgt 50

<210> 15
 <211> 42
 <212> DNA



<213> syntetická sonda nebo primer

<400> 15

agttacggat ccttaatggt gatggtggtg gtgccagttc at

42

<210> 16

<211> 7648

<212> DNA

<213> vektor pFPMT-Mfalfa-B1-H6

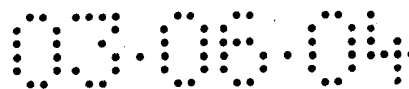
<400> 16

ggtaacctgc tcaatctccg gaatggtgat ctgacgttc ctgaaaacct cgacattggc	60
tccctcctga cadaggtact cgtacaggtt ccaggtaaac gagtcgtagt tgtcgatcat	120
gacaacgttc ttagaagcgg ccggcatttt gaaggtgact aatagcctaa gaaaatattt	180
aatttaattt tcattaaatt ttctataact cgctatttca gcttttcatc tcatcaacttc	240
ataaacgata taaaccagaa aaagaactat tttcaaacac gcttttcaaa agcggtatgt	300
ccttccacgt ctcttagaa tctggcaagt ccgcgagggg gatccttaat ggtgatggtg	360
gtggtgccag ttcatcatca tatcccaagc catacgggtga cctgttatgt ggccgggata	420
gattgagcaa ttgcagtcct gcaccgtctc atgccggcga ggcgagatgg tgaacagctg	480
ggagacgagg aagacagatc cgcagagatc cccacgtac atagcggaac agaaagcagc	540
cgccccaacg agcaaatcga cgtggcgctg tattgtcgta gtggggacgc tggcgttcct	600
agctgcgagc gtgggggtga gcgctacca gcagcgggaa gagttgttct cccgaacgca	660
gggcacgcac ccgggggtgt gcatgatcat gtccgctgcc tcatacacia tgcttgagtt	720
ggagcagtcg ttcttgacat ggtacatccc ggacacgttg cgcacctcat accttttctc	780
caagcttacc ccttcttctt tagcagcaat gctggcaata gtagtattta taaacaataa	840
cccgttattt gtgctgttgg aaaatggcaa aacagcaaca tcgaaatccc cttctaaatc	900
tgagtaaccg atgacagctt cagccggaat ttgtgccgtt tcattctctg ttgtagtggt	960
gactggagca gctaatacgg aggatgctgc gaataaaact gcagtaaaaa ttgaaggaaa	1020
tctcatgaat tcccgatgaa gcagagagcg caggaggcgg tatttatagt gccattcccc	1080
tctctgagag acccggtatg tagtcgagtg tatcgagac agcttgatgt agactccgtg	1140
cctgccggt cctcttattg gcggacacca gtgagacacc ccggaacttg ctgtttttct	1200
gcaaaatccg gggtgaccag tgggagccta ttgcacaca cgagcgggac accccactct	1260
ggtgaagagt gccaaagtca ttctttttcc cgttgcgggg cagccgattg catgttttag	1320
gaaaatatta cctttgctac accctgtcag atttaccctc cacacatata tattccgtca	1380
cctccaggga ctattattcg tcgttgccgc gccagcggaa gatatccaga agctgttttc	1440
cgagagactc ggttgccgcc tggatatatt gatggatgtc gcgctgcctc acgtcccggt	1500

acccaggaac gcggtgggat ctcgggccca tcgaagactg tgctccagac tgctcgccca 1560
 gcaggtgttt cttgatcgcc gcctctaaat tgtccgcgca tcgccggtaa cttttttcca 1620
 gctcggagtt tgcgtttaga tacagtttct gcgatgccaa aggagcctgc agattataac 1680
 ctcggatgct gtcattcagc gcttttaatt tgacctccag atagtgtctg tattttctgtt 1740
 cccattggct gctgcgcagc ttctgtataac tcgagttatt gttgcgctct gcctcggcgt 1800
 actggctcat gatctggatc ttgtccgtgt cgcttttctt cgagtgtttc tcgcaaacga 1860
 tgtgcacggc ctgcagtgtc caatcggagt cgagctggcg ccgaaactgg cggatctgag 1920
 cctccacact gccctgtttc tctatccacg gcggaaccgc ctcttgccgt ttcagaatgt 1980
 tgttcaagtg gtactctgtg cgggtcaatga aggcgttatt gccggtgaaa tctttgggaa 2040
 gcggttttcc tcggggaaga ttacgaaatt ccccgcgctg ttgcgcttcc tggatctoga 2100
 ggagatcgtt ctcccgctcg aggagatcgt tctccgcgtc gacaccattc cttgcggcgg 2160
 cgggtgtcaa cggcctcaac ctactactgg gctgcttctt aatgcaggag tcgcataagg 2220
 gagagcgtcg acaaaccgc gtttgagaac ttgtcaagc ttctggtaaa cgttgtagta 2280
 ctctgaaaca aggccttagc actctgatct gtttctcttg ggtagcggtg agtggtttat 2340
 tggagtccac tggtttcagc acatctgtca tctagacaat attgttacta aatttttttg 2400
 aactacaatt gttcgttaatt catctattat tatacatcct cgtcagcaat ttctggcaga 2460
 cggagtttac taacgtcttg agtatgaggc cgagaatcca gctctgtggc catactcagt 2520
 cttgacagcc tgctgatgtg gctgcgttca acgcaataag cgtgtcctcc gactccgagt 2580
 tgtgctcgtt atcgtcgttc tcatcctcgg aaaaatcaca cgaaagaaca tactcaccag 2640
 taggctttct ggtccctggg gcacggctgt ttctgacgta ttccggcgtt gataatagct 2700
 cgaaagtga cgcagagtcg cgggagtcga ccgatgccct tgagagcctt caaccagtc 2760
 agctccttcc ggtgggcgcg gggcatgact atcgtcgccg cacttatgac tgtcttcttt 2820
 atcatgcaac tcgtaggaca ggtgccggca gcgctctggg tcattttcgg cgaggaccgc 2880
 tttcgtgga gcgcgacgat gatcggcctg tcgcttgcgg tattcggaat cttgcacgcc 2940
 ctcgctcaag ccttcgtcac tgggtccgcc accaaacgtt tcggcgagaa gcaggccatt 3000
 atcgccggca tggcggccga cgcgctgggc tacgtcttgc tggcgttcgc gacgcgaggc 3060
 tggatggcct tccccattat gattcttctc gcttccggcg gcacgggat gcccgcgctg 3120
 caggccatgc tgtccaggca ggtagatgac gaccatcagg gacagcttca aggatcgctc 3180
 gcggtcttta ccagcctaac ttcgatcact ggaccgctga tcgtcacggc gatttatgcc 3240
 gcctcggcga gcacatggaa cgggttgga tggattgtag gcgcgcctt ataccttgtc 3300

tgcctccccg cgttgcgctg cgggtgcatgg agccggggcca cctcgacctg aatggaagcc 3360
 ggcggcacct cgotaacgga ttcaccactc caagaattgg agccaatcaa ttcttgcgga 3420
 gaactgtgaa tgcgcaaacc aacccttggc agaacatatc catcgcgctcc gccatctcca 3480
 gcagccgcac ggggcgcacg gggggggggg gggggggggg ggggcaaaca attcatcatt 3540
 ttttttttat tctttttttt gatttcgggtt tctttgaaat ttttttgatt cggtaatctc 3600
 cgaacagaag gaagaacgaa ggaaggagca cagacttaga ttggtatata tacgcatacg 3660
 tagtggtgaa gaaacatgaa attgcccagt attcttaacc caactgcaca gaacaaaaac 3720
 ctgcaggaaa cgaagataaa tcatgtcgaa agctacatat aaggaacgtg ctgctactca 3780
 tcctagtctt gttgctgcca agctatttaa tatcatgcac gaaaagcaaa caaacttggtg 3840
 tgcttcattg gatgttcgta ccaccaagga attactggag ttagttgaag cattaggtcc 3900
 caaaatttgt ttactaaaaa cacatgtgga tatcttgact gatttttcca tggagggcac 3960
 agttaagccg ctaaaggcat tatccgcaa gtacaatttt ttactcttcg aagacagaaa 4020
 atttgctgac attggttaata cagtcaaatt gcagtactct gcgggtgtat acagaatagc 4080
 agaatgggca gacattacga atgcacacgg tgtggtgggc ccagggtattg ttagcggttt 4140
 gaagcaggcg gcagaagaag taacaaagga acctagaggc cttttgatgt tagcagaatt 4200
 gtcatgcaag ggctccctat ctactggaga atatactaag ggtactgttg acattgcgaa 4260
 gagcgacaaa gattttgtta tcggctttat tgctcaaaga gacatgggtg gaagagatga 4320
 aggttacgat tggttgatta tgacaccggg tgtgggttta gatgacaagg gagacgcatt 4380
 gggccaacag tatagaaccg tggatgatgt ggtctctaca ggatctgaca ttattattgt 4440
 tggaagagga ctatttgcaa agggaagggg tgctaaggta gaggggtgaac gttacagaaa 4500
 agcaggctgg gaagcatatt tgagaagatg cggccagcaa aactaaaaaa ctgtattata 4560
 agtaaagca tgtatactaa actcacaat tagagcttca atttaattat atcagttatt 4620
 acccggaat ctcggtcgta atgattttta taatgacgaa aaaaaaaaaa ttggaaagaa 4680
 aagccccccc ccccccccc ccccccccc ccccccgca gcgttgggtc ctggccacgg 4740
 gtgcgcacga tcgtgctcct gtcgttgagg acccggtag gctggcggg ttgccttact 4800
 ggttagcaga atgaatcacc gatacgcgag cgaacgtgaa gcgactgctg ctgcaaaacg 4860
 tctgcgacct gagcaacaac atgaatggtc ttcggtttcc gtgtttcgta aagtctggaa 4920
 acgcggaagt cagcgccctg caccattatg ttccggatct gcacgcagg atgctgctgg 4980
 ctaccctgtg gaacacctac atctgtatta acgaagcgtt ggcattgacc ctgagtgtatt 5040
 tttctctggt ccgcgcgcat ccataccgcc agttgtttac cctcacaacg ttccagtaac 5100
 cgggcattgt catcatcagt aaccggtatc gtgagcatcc tctctcgttt catcggatc 5160

attacccccca tgaacagaaa ttccccctta cacggaggca tcaagtgacc aaacaggaaa 5220
aaaccgccct taacatggcc cgctttatca gaagccagac attaacgctt ctggagaaac 5280
tcaacgagct ggacgcggat gaacaggcag acatctgtga atcgcttcac gaccacgctg 5340
atgagcttta cgcagctgc ctgcgcgctt tcggtgatga cgggtgaaaac ctctgacaca 5400
tgcagctccc ggagacggtc acagcttgct tgtaagcgga tgccgggagc agacaagccc 5460
gtcagggcgc gtcagcgggt gttggcgggt gtcggggcgc agccatgacc cagtcacgta 5520
gcgatagcgg agtgtatact ggcttaacta tgcggcatca gagcagattg tactgagagt 5580
gcaccatatg cgggtgtgaaa taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc gcatcaggcg 5640
ctcttcgct tctctgctca ctgactcgt gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcgg 5700
atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa 5760
gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc 5820
gtttttccat aggtccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag 5880
gtggcgaaac cgcacaggac tataaagata ccaggcgttt cccctggaa gctccctcgt 5940
gcgctctct gttccgaccc tgccgcttac cggatacctg tccgctttc tccctcggg 6000
aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg 6060
ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccg 6120
taactatcgt cttgagtcca acccggtag acacgactta tcgccactgg cagcagccac 6180
tggtaacagg attagcagag cgaggatgt aggcgggtgt acagagttct tgaagtgggtg 6240
gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt 6300
taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg 6360
tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc 6420
tttgatcttt tctacgggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggtttt 6480
ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaaa aatgaagttt 6540
taaatacaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag 6600
tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcaccc atagttgcct gactccccgt 6660
cgtgtagata actacgatac gggagggtt accatctggc ccagtgctg caatgatacc 6720
gcgagacca cgctcacgg ctccagattt atcagcaata aaccagccag ccggaagggc 6780
cgagcgcaga agtggtcctg caactttatc cgcctccatc cagtctatta attggtgcg 6840
ggaagctaga gtaagtagtt cgcagttaa tagtttgcgc aacgttggtt ccattgctgc 6900
aggcatcgtg gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg gttcccaacg 6960



atcaaggcga gttacatgat ccccatgtt gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcgggtcc 7020
 tccgatcggt gtcagaagta agttggccgc agtggttatca ctcatgggta tggcagcact 7080
 gcataattct cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc 7140
 aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc cggcgtcaac 7200
 acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgttc 7260
 ttoggggcca aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tgtaaccac 7320
 tcgtgcaccc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa 7380
 aacaggaagg caaatgccg caaaaaaggg aataaggcg acacggaaat gttgaatact 7440
 catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag ggttattgtc tcatgagcgg 7500
 atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca catttcccgc 7560
 aaaagtcca cctgacgtct aagaaacct tattatcatg acattaacct ataaaaatag 7620
 gcgtatcacg aggccttttc gtcttcaa 7648

<210> 17
 <211> 4453
 <212> DNA
 <213> vektor pUC18-FMD-MFalfa-E1-H6

<220>
 <221> alternativní znak
 <222> (1207)..(1208)
 <223> N je jakýkoliv nukleotid

<220>
 <221> alternativní znak
 <222> (1386)..(1387)
 <223> N je jakýkoliv nukleotid

<400> 17
 gcgccaata cgcaaacgc ctctccccgc gcgttgccg attcattaat gcagctggca 60
 cgacaggttt ccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaatg tgagttagct 120
 cactcattag gcacccagc ctttacactt tatgcttcgc gctcgtatgt tgtgtggaat 180
 tgtgagcgga taacaatttc acacaggaaa cagctatgac catgattacg aattcgagct 240
 cggtagccgc ggatccttaa tggatgagg ggtgggtgcca gttcatcatc atatccaag 300
 ccatacgggt acctgttatg tggccgggat agattgagca attgcagtcc tgcacgtct 360
 catgccggcg aggcgagatg gtgaacagct gggagacgag gaagacagat ccgcagagat 420
 cccccacgta catagcggaa cagaaagcag ccgccccaac gagcaaatcg acgtggcgctc 480
 gtattgtcgt agtggggacg ctggcggttc tagctgcgag cgtgggggtg agcgtaccc 540

agcagcgggga agagtgtgttc tcccgaacgc agggcacgca cccgggggtg tgcattgatca 600
 tgtccgctgc ctcatcacaca atgcttgagt tggagcagtc gttcgtgaca tggtagatcc 660
 cggacacggtt ggcacacctca taccttttat ccaagcttac cccttcttct ttagcagcaa 720
 tgctggcaat agtagtattt ataaacaata acccgttatt tgtgctgttg gaaaatggca 780
 aaacagcaac atcgaaatcc ccttctaaat ctgagtaacc gatgacagct tcagccggaa 840
 tttgtgcgtt ttcattcttct gttgtagtgt tgactggagc agctaattgcg gaggatgctg 900
 cgaataaaac tgcagtaaaa attgaaggaa atctcatgaa ttcccgatga aggcagagag 960
 cgcaaggagg cggattttat agtgccattc ccctctctga gagaccgga tggtagtoga 1020
 gtgttatcgg agacagcttg atgtagactc cgtgcctgcc ggtcctctta ttggcggaca 1080
 ccagtggagc accccggaac ttgctgtttt tctgcaaaat ccgggggtgac cagtgggagc 1140
 ctatttgcac acacgagcgg gacacccac tctgggtgaag agtgccaaag tcattctttt 1200
 tcccgtnncg gggcagcoga ttgcatgttt taggaaaata ttaccttgc tacacctgt 1260
 cagatttacc ctccacacat atatattccg tcacctccag ggactattct tggctcgttg 1320
 cgccgcgcg gaagatatcc agaagctgtg tttccgaga gactcggttg gcgcctggta 1380
 tatttnnagg atgtcgcgtt gcctcacgtc ccggtacca ggaacgcggt gggatctcgg 1440
 gcccatcgaa gactgtgctc cagactgctc gccagcagg tgtttcttga ttgcgcctc 1500
 taaatagtc gcgcctcgc ggtaacattt ttccagctcg gagtttgcgt ttagatacat 1560
 ttctgcgatg ccaaaggagc ctgcagatta taacctcgga tgcgtcatt cagcgctttt 1620
 aatttgacct ccagatagtt gctgtatttc tgttcattg gctgctggac gttcgtataa 1680
 ctgagattat tgttgcgctc tgccctggcg tactggctca tgactgactg cggctcgttc 1740
 tcgagtgttc tcgcaacagg acgcctgcag gtcactcagc cgagctggcg ccgaaactgg 1800
 cggatctgac ctccacactg ccctgtatct ctatccaccg ggaaccgcct cctgccgttc 1860
 cagaatgttg ttcaagtgg agctctgtgc ggtcaatgaa ggcgttattg ccggtgaaat 1920
 ctttgggaag cggtttatcc tcggggaaga ttacgaaatt ccgcgcgctc gttgcgcttc 1980
 ctggatctcg aggaagatcg ttctccgctg cgaggagatc gttctccgcg tcgacctgca 2040
 ggcattgcaag cttggcactg gccgtcgttt tacaacgtcg tgactgggaa aacctggcg 2100
 ttacccaact taatcgctt gcagcacatc ccccttctgc cagctggcgt aatagcgaag 2160
 aggccgcac cgatcgccct tcccaacagt tgccgagcct gaatggcgaa tggcgctga 2220
 tgccgtattt tctccttaag catctgtgcg gtatttcaca ccgcatttg tgcactctca 2280
 gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa gccagccccg acaccgcga acaccgctg 2340
 acgcgcctg acgggcttgt ctgctcccg catccgctta cagacaagct gtgacctct 2400

ccgggagctg catgtgtcag aggtttttcac cgtcatcacc gaaacgcgcg agacgaaagg 2460
 gcctcgtgat acgcctatatt ttatagggtta atgtcatgat aataatgggt tcttagacgt 2520
 cagggtggcac ttttcgggga aatgtgcgcg gaacccttat ttgtttatatt ttctaaatac 2580
 attcaaatat gtatccgctc atgagacaat aaccctgata aatgcttcaa taatattgaa 2640
 aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgccct tattcccttt tttgcggcat 2700
 tttgccttcc tgtttttgct caccagaaa cgctggtgaa agtaaaagat gctgaagatc 2760
 agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga 2820
 gttttcgccc cgaagaacgt tttccaatga tgagcacttt taaagttctg ctatgtggcg 2880
 cgttattatc ccgtattgac gccgggcaag agcaactcgg tcgccgcata cactattctc 2940
 agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat ggcattgacag 3000
 taagagaatt atgcagtgtt gccataacca tgagtgataa cactgcggcc aacttacttc 3060
 tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa ccgctttttt gcacaacatg ggggatcatg 3120
 taactcgctt tgatcggttg gaaccggagc tgaatgaagc cataccaaac gacgagcgtg 3180
 acaccacgat gcctgtagca atggcaacaa cgttgcgcaa actattaact ggcgaaactac 3240
 ttactctagc tttccggcaa caattaatag actggatgga ggcggataaa gttgcaggac 3300
 cacttctgcg ctcgccctt ccggtgtggt ggtttattgc tgataaatct ggagccggtg 3360
 agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga tggttaagccc tcccgtatcg 3420
 tagttatcta cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga cagatcgctg 3480
 agataggtgc ctactgatt aagcattggt aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac 3540
 tttagattga tttaaaactt catttttaat ttaaaaggat ctagggtgaag atcctttttg 3600
 ataatctcat gaccaaaatc ccttaacgtg agttttcgtt ccactgagcg tcagaccccg 3660
 tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc ctttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc 3720
 aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc 3780
 tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtc cttctagtgt 3840
 agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctcgctctgc 3900
 taatcctggt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact 3960
 caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg aacgggggggt tcgtgcacac 4020
 agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag 4080
 aaagcggcac gcttcccgaa gggagaaagg cggacaggta tccggtaagc ggcagggtcg 4140
 gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg 4200

tcggggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gattttttgtg atgctcgtca ggggggcgga 4260
gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacgggtt cctggccttt tgctggcctt 4320
ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt attaccgcct 4380
ttgagtgagc tgataccgct cgccgcagcc gaacgaccga gcgcagcgag tcagtgcgcg 4440
aggaagcgga aga 4453

<210> 18
<211> 51
<212> DNA
<213> syntetická sonda nebo primer

<400> 18
tgcttcctac cactagcagc actaggatat gaggtgcgca acgtgtccgg g 51

<210> 19
<211> 52
<212> DNA
<213> syntetická sonda nebo primer

<400> 19
tagtactagt attagtaggc ttgcgatgaa ttcccgatga aggcagagag cg 52

<210> 20
<211> 4252
<212> DNA
<213> vektor pUC18-FMD-CL-E1-H6

<220>
<221> alternativní znak
<222> (1006)..(1007)
<223> N je jakýkoliv nukleotid

<220>
<221> alternativní znak
<222> (1185)..(1186)
<223> N je jakýkoliv nukleotid

<400> 20
gcgcccaata cgcaaaccgc ctctcccgc gcgttgccg attcattaat gcagctggca 60
cgacagggtt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaatg tgagttagct 120
cactcattag gcaccccagg ctttacactt tatgcttccg gctcgtatgt tgtgtggaat 180
tgtgagcgga taacaatttc acacaggaaa cagctatgac catgattacg aattcgagct 240
cgggtacccg ggatccttaa tggatgatggg ggtggtgccg gttcatcacc atatcccaag 300
ccatacgggtg acctgttatg tggccgggat agattgagca attgcagtcc tgcaccgtct 360
catgccggcg aggcgagatg gtgaacagct gggagacgag gaagacagat ccgcagagat 420

cccccacgta catagcggaa cagaaagcag ccgccccaac gagcaaatcg acgtggcgtc 480
 gtattgtcgt agtggggacg ctggcggtcc tagctgcgag cgtgggggtg agcgctaccc 540
 agcagcggga agagtgttc tcccgaacgc agggcacgca cccgggggtg tgcataatca 600
 tgtccgctgc ctcatacaca atgcttgagt tggagcagtc gttcgtgaca tggtagatcc 660
 cggacacgtt ggcacacctca tatcctagtg ctgctagtgg taggaagcat agtactagta 720
 ttagtaggct tgcataaat tcccgaatgaa ggcagagagc gcaaggaggc ggtatttata 780
 gtgccattcc cctctctgag agaccggat ggtagtcgag tgttatcgga gacagcttga 840
 tgtagactcc gtgcctgccg gtcctcttat tggcgacac cagtgcagca ccccggaact 900
 tgctgttttt ctgcaaaatc cgggggtgacc agtgggagcc tatttgcaca cagagcggg 960
 acacccact ctggtgaaga gtgcaaagt cattcttttt cccgtnnccg ggcagccgat 1020
 tgcattgttt aggaaaatat tacctttgct acaccctgtc agatttacc tccacacata 1080
 tatattccgt cacctccagg gactattctt ggctcgttgc gccgcgcgg aagatatcca 1140
 gaagctgtgt tttccgagag actcgggttg cgcctggtat atttnnagga tgcgcgctg 1200
 cctcagctcc cgttaccag gaacgcggtg ggtctcggg cccatcgaag actgtgctcc 1260
 agactgctcg cccagcaggt gtttcttgat tgccgcctct aaatagtcgg cgcctcggg 1320
 gtaacatttt tccagctcgg agtttgctt tagatacatt tctgcgatgc caaaggagcc 1380
 tgcagattat aacctcggat gctgtcattc agcgttttta atttgacctc cagatagttg 1440
 ctgtatttct gttccattgg ctgctggacg ttctgataac tgcagttatt gttgcgctct 1500
 gcctcggcgt actggctcat gactgactgc ggtcgttct cgagtgttct cgcaacagga 1560
 cgcctgcagg tcatcgatgc gagctggcgc gaaaactggc ggtctgacc tccacactgc 1620
 cctgtatctc tatccaccgg gaaccgcctc ctgccgttcc agaattgtgt tcaagtggta 1680
 gctctgtgcy gtcaatgaag gcgttattgc cgttgaaatc tttgggaagc ggtttatcct 1740
 cggggaagat tacgaaattc ccgcgcgtcg ttgcgcttcc tggatctcga ggaagatcgt 1800
 tctcgcgtc gaggagatcg ttctccgctg cgacctgcag gcatgcaagc ttggcactgg 1860
 ccgtcgtttt acaacgtcgt gactgggaaa accctggcgt taccacactt aatcgcttg 1920
 cagcacatcc ccttttcgcc agctggcgta atagcgaaga ggcccgacc gatcgccctt 1980
 cccaacagtt gcgcagcctg aatggcgaat ggccgctgat gcggtatttt ctcttacgc 2040
 atctgtgagg tatttcacac cgcataatgt gactctcag tacaatctgc tctgatgccg 2100
 catagttaag ccagccccga caccgcgcaa caccgctga cgcgcctga cgggcttgc 2160
 tgctccggc atccgcttac agacaagctg tgaccgtctc cgggagctgc atgtgtcaga 2220
 ggttttcacc gtcacaccg aaacgcgcga gacgaaagg cctcgtgata cgcctatttt 2280

tataggttaa tgtcatgata ataatgggtt cttagacgtc aggtggcact tttcggggaa 2340
 atgtgcgcgg aaccttatt tgtttatatt tctaaatata ttcaaataatg tatccgctca 2400
 tgagacaata acctgataa atgcttcaat aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc 2460
 aacatttcog tgtgcgcctt attccctttt ttgcggcatt ttgccttcct gtttttgctc 2520
 acccagaaac gctgggtgaaa gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt 2580
 acatcgaaat ggatctcaac agcggtaaga tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt 2640
 ttccaatgat gagcactttt aaagttctgc tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg 2700
 ccgggcaaga gcaactcggg cgcgcatac actattctca gaatgacttg gttgagtact 2760
 caccagtcac agaaaagcat cttacggatg gcatgacagt aagagaatta tgcagtgcgt 2820
 ccataaccat gagtgataac actgcggcca acttacttct gacaacgac ggaggaccga 2880
 aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg gggatcatgt aactcgctt gatcggtggg 2940
 aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa 3000
 tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg gcgaactact tactctagct tcccggcaac 3060
 aattaataga ctggatggag gcggataaag ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc 3120
 cggctggctg gtttattgct gataaatctg gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca 3180
 ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct cccgtatcgt agttatctac acgacgggga 3240
 gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac agatcgctga gataggtgcc tcaactgatta 3300
 agcattggta actgtcagac caagtttact catatatact ttagattgat ttaaaacttc 3360
 atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga tcctttttga taatctcatg accaaaatcc 3420
 cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt cagaccccggt agaaaagatc aaaggatctt 3480
 cttgagatcc tttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaaa ccaccgctac 3540
 cagcgggtgt ttgtttgccc gatcaagagc taccaactct tttccgaag gtaactggct 3600
 tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact 3660
 tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg 3720
 ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg ggttggtact aagacgatag ttaccggata 3780
 aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggt cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga 3840
 cctacaccga actgagatac ctacagcgtg agctatgaga aagcgccacg cttcccgaag 3900
 ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaagcg gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg 3960
 agcttccagg gggaaacgcc tggtatcttt atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac 4020
 ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa aacgccagca 4080

acgcggcctt ttacagggtc ctggcctttt gctggccttt tgcacacatg ttctttcctg 4140
 cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta ttaccgcctt tgagttagct gataccgctc 4200
 gccgcagccg aacgaccgag cgcagcgagt cagtgagega ggaagcggaa ga 4252

<210> 21
 <211> 7447
 <212> DNA
 <213> vektor pFPMT-CL-E1-H6

<400> 21
 ggtaccctgc tcaatctccg gaatggatgat ctgatcgttc ctgaaaacct cgacattggc 60
 tccctcctga cacaggactt cgtacagggt ccaggtaaag gagtcgtagt tgcgatcat 120
 gacaacgttc ttagaagcgg ccggcatttt gaagggtgact aatagcctaa gaaaatattt 180
 aatttaattt tcattaaatt ttctataact cgtattttca gcttttcac tcactacttc 240
 ataaacgata taaaccagaa aaagaactat ttcaaacac gcttctcaa agcggtagtg 300
 ccttccacgt ctcttagaa tctggcaagt ccgcgagggg gatccttaat ggtgatggg 360
 gtgggtgccag ttcatcatca tatcccaagc catacgggtga cctgttatgt ggccgggata 420
 gattgagcaa ttgcagtcct gcaccgtctc atgccggcga ggcgagatgg tgaacagctg 480
 ggagacgagg aagacagatc cgcagagatc cccacgtac atagcggaac agaaagcagc 540
 cgccccaacg agcaaatcga cgtggcgctg tattgtcgtg gtggggacgc tggcgttcct 600
 agctgcgagc gtgggggtga gcgctacca gcagcgggaa gagttgttct ccgaacgca 660
 gggcacgcac ccgggggtgt gcatgatcat gtccgctgcc tcatacaca tgcctgagtt 720
 ggagcagtcg ttcgtgacat ggtacatccc ggacacgttg cgcacctcat atcctagtgc 780
 tgctagtggg aggaagcata gtactagtat tagtaggctt cgcaggaatt cccgatgaag 840
 cagagagcgc aggaggcgtt atttatagtg ccattccctt ctctgagaga cccggatggg 900
 agtcgagtgt atcggagaca gcttgatgta gactccgtgc ctgccggctc ctcttattgg 960
 cggacaccag tgagacacc ccgaacttgc tgtttttctg caaatccgg ggtgaccagt 1020
 gggagcctat ttgcacacac gagcgggaca cccactctg gtgaagagt ccaaagtc 1080
 tctttttccc gttgcggggc agccgattgc atgttttagg aaaatattac ctttgctaca 1140
 cctgtcaga ttaccctcc acacatatat attcgtcac ctccaggac tattattcgt 1200
 cgttgcgcgc ccagcggaa ataccagaa gctgttttcc gagagactcg gttggcgct 1260
 ggtatatttg atggatgtcg cgctgcctca cgtcccggt cccaggaac cggtgggac 1320
 tcgggcccac cgaagactgt gctccagact gctcggccag cagggtgttc ttgatcgcc 1380
 cctctaaatt gtccgcgcac cgcgggtaac atttttccag ctgggagttt gcgttttagat 1440

acagttttctg cgatgccaaa ggagcctgca gattataacc tcggatgctg tcattcagcg 1500
 cttttaattt gacctccaga tagttgctgt atttctgttc ccattggctg ctgcgagct 1560
 tcgtataact cgagttattg ttgcgctctg cctcggcgta ctggctcatg atctggatct 1620
 tgtccgtgtc gctttttctt gagtgtttct cgaaaacgat gtgcacggcc tgcagtgtcc 1680
 aatcggagtc gagctggcgc cgaaactggc ggatctgagc ctccacactg ccctgtttct 1740
 ctatccacgg cggaaccgcc tctgcccgtt tcagaatggt gttcaagtgg tactctgtgc 1800
 ggtcaatgaa ggcgttattg ccggtgaaat ctttggaag cggttttcct cggggaagat 1860
 tacgaaattc cccgcgtcgt tgcgcttctt ggatctcgag gagatcgttc tccgcgtcga 1920
 ggagatcgtt ctccgcgtcg acaccattcc ttggggcggc ggtgctcaac ggcctcaacc 1980
 tactactggg ctgcttccta atgcaggagt cgcataaggg agagcgtcga caaaccgcg 2040
 tttgagaact tgcacaagct tctggtaaac gttgtagtac tctgaaacaa ggcctagca 2100
 ctctgatctg tttctcttgg gtagcgtga gtggtttatt ggagttcact ggtttcagca 2160
 catctgtcat ctagacaata ttgttaacta atttttttga actacaattg ttcgtaattc 2220
 atctattatt atacatcttc gtcagcaatt tctggcagac ggagtttact aacgtcttga 2280
 gtatgaggcc gagaatccag ctctgtggcc atactcagtc ttgacagcct gctgatgtgg 2340
 ctgcgttcaa cgcaataagc gtgtcctccg actccgagtt gtgctcgta tcgtcgttct 2400
 catcctcgga aaaatcacac gaaagaacat actcaccagt aggccttctg gtccctgggg 2460
 cacggctgtt totgacgtat tccggcggtg ataatagctc gaaagtgaac gccgagtcgc 2520
 gggagtcgac cgatgccctt gagagccttc aaccagtcga gctccttccg gtgggcgcgg 2580
 ggcataacta tcgtcgccgc acttatgact gtcttcttta tcatgcaact cgtaggacag 2640
 gtgcggcgag cgctctgggt cattttcggc gaggaccgct ttcgctggag cgcgacgatg 2700
 atcggcctgt cgcttgcggt attcggaatc ttgcacgccc tcgctcaagc ctctgtcact 2760
 ggtcccgcga ccaaactgtt cggcgagaag caggccatta tcgccggcat ggcggccgac 2820
 gcgctgggct acgtcttgct ggcgttcgcy acgcgaggct ggatggcctt cccattatg 2880
 attcttctcg ctcccgccgg catcgggatg cccgcgttgc aggccatgct gtccaggcag 2940
 gtagatgacg accatcaggg acagcttcaa ggatcgctcg cggctcttac cagcctaact 3000
 tcgatcactg gaccgctgat cgtcacggcg atttatgccg cctcggcgag cacatggaac 3060
 gggttggcat ggattgtagg cgccgcccta taccttgtct gcctccccgc gttgcgtcgc 3120
 ggtgcatgga gccggggccac ctcgacctga atggaagccg gcggcacctc gctaaccgat 3180
 tcaccactcc aagaattgga gccaatcaat tcttgccgag aactgtgaat gcgcaaacca 3240
 acccttggca gaacatatcc atcgcgtccg ccatctccag cagccgcacg cggcgcatcg 3300

ggggggggggg ggggggggggg gggcaaacaa ttcatcattt tttttttatt cttttttttg 3360
atttcgggtt ctttgaaatt tttttgattc ggtaatctcc gaacagaagg aagaacgaag 3420
gaaggagcac agacttagat tggatatat acgcatatgt agtggtgaag aaacatgaaa 3480
ttgccagta ttcttaaccc aactgcacag aacaaaaacc tgcaggaaac gaagataaat 3540
catgtcgaaa gctacatata aggaacgtgc tgctactcat cctagtcttg ttgctgcaa 3600
gctatttaat atcatgcacg aaaagcaaac aaacttggtg gcttcattgg atgttcgtac 3660
caccaaggaa ttactggagt tagttgaagc attaggtccc aaaatttggt tactaaaaac 3720
acatgtggat atcttgactg atttttccat ggagggcaca gtaagccgc taaaggcatt 3780
atccgccaaag tacaattttt tactcttcga agacagaaaa tttgctgaca ttggtaatat 3840
agtcaaattg cagtactctg cgggtgtata cagaatagca gaatgggcag acattacgaa 3900
tgcacacggt gtggtgggcc caggtattgt tagcggtttg aagcaggcgg cagaagaagt 3960
aacaaggaa cctagaggcc ttttgatgtt agcagaattg tcatgcaagg gctccctatc 4020
tactggagaa tatactaagg gtactgttga cattgcgaag agcgacaaag attttgttat 4080
cggctttatt gctcaaagag acatgggtgg aagagatgaa ggttacgatt gggtgattat 4140
gacaccggt gtgggttttag atgacaaggg agacgcattg ggtcaacagt atagaaccgt 4200
ggatgatgtg gtctctacag gatctgacat tattattgtt ggaagaggac tatttgcaaa 4260
gggaagggat gctaaggtag aggggtgaacg ttacagaaaa gcaggctggg aagcatattt 4320
gagaagatgc ggccagcaaa actaaaaaac tgtattataa gtaaatgcat gtatactaaa 4380
ctcacaatt agagcttcaa tttaattata tcagttatta cccgggaatc tcggtcgtaa 4440
tgatttttat aatgacgaaa aaaaaaaaaat tggaaagaaa agcccccccc ccccccccc 4500
cccccccccc cccccgcag cgttggttcc tggccacggg tgcgcatgat cgtgctcctg 4560
tcgttgagga cccggctagg ctggcgggtg tgccttactg gttagcagaa tgaatcaccg 4620
atacgcgagc gaacgtgaag cgactgctgc tgcaaacgt ctgcgacctg agcaacaaca 4680
tgaatggtct tcggtttccg tgtttcgtaa agtctggaaa cgcggaagtc agcgccctgc 4740
accattatgt tccggatctg catcgagga tgctgctggc taccctgtgg aacacctaca 4800
tctgtattaa cgaagcgtg gcattgaacc tgagtgtttt ttctctggtc ccgcgcacac 4860
cataccgcca gttgtttacc ctcaaacgt tccagtaacc gggcatgttc atcatcagta 4920
accgatatcg tgagcatcct ctctcgtttc atcggtatca ttaccccat gaacagaaat 4980
tcccccttac acggaggcat caagtgacca aacaggaaaa aaccgccctt aacatggccc 5040
gctttatcag aagccagaca ttaacgcttc tggagaaact caacgagctg gacgcggatg 5100

aacaggcaga catctgtgaa tcgcttcacg accacgctga tgagctttac cgcagctgcc 5160
 tcgcgcggtt cgggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca 5220
 cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 5280
 ttggcgggtg tcggggcgca gccatgaccc agtcacgtag cgatagcgga gtgtatactg 5340
 gcttaactat gcggcatcag agcagattgt actgagagtg caccatatgc ggtgtgaaat 5400
 accgcacaga tcgtaagga gaaaataccg catcaggcgc tcttccgctt cctcgctcac 5460
 tgactcgctg cgctcggtcg ttcggctgcg gcgagcggtg tcagctcact caaaggcggt 5520
 aatacggtta tccacagaat caggggataa cgcaggaaag aacatgtgag caaaaggcca 5580
 gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggcgc gttgctggcg tttttccata ggctccgccc 5640
 cctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact 5700
 ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg ttccgacct 5760
 gccgttacc ggatacctgt cgcctttct ccttcggga agcgtggcgc tttctcatag 5820
 ctacgctgt aggtatctca gttcggtgta ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca 5880
 cgaaccccc gttcagcccg accgctgcgc cttatccggt aactatcgtc ttgagtccaa 5940
 cccggtaga cacgacttat cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc 6000
 gaggtatgta ggcggtgcta cagagttctt gaagtgttg cctaactacg gctacactag 6060
 aaggacagta tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt accttcgga aaagagttgg 6120
 tagctcttga tcgggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttg tttgcaagca 6180
 gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacggggtc 6240
 tgacgctcag tggaacgaaa actcagctta agggattttg gtcatgagat tatcaaaaag 6300
 gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata 6360
 tgagtaaact tggctgaca gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat 6420
 ctgtctatth cgttcaccca tagttgcctg actccccgtc gtgtagataa ctacgatacg 6480
 ggagggtta ccatctggcc ccagtgtgc aatgataccg cgagaccac gctcaccggc 6540
 tccagattta tcagcaataa accagccagc cggaaggggc gagcgagaa gtggtcctgc 6600
 aactttatcc gctccatcc agtctattaa ttgttgccgg gaagctagag taagtagttc 6660
 gccagttaat agtttgcgca acgttggtgc cattgctgca ggcacgtgg tgtcacgctc 6720
 gtcgtttggt atggcttcat tcagctccgg ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgac 6780
 ccccatgttg tgcaaaaaag cggtagctc cttcggctct ccgacgttg tcagaagtaa 6840
 gttggcgca gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg cataattctc ttactgtcat 6900
 gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca accaagtcac tctgagaata 6960

gtgtatgcgg cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtcaaca cgggataata ccgcgccaca 7020
 tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag 7080
 gatcttaccg ctgttgagat ccagttcgat gtaacccact cgtgcaccca actgatcttc 7140
 agcatctttt actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc 7200
 aaaaaaggga ataagggcga caccgaaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata 7260
 ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcgga tacatatttg aatgtattta 7320
 gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctgacgtcta 7380
 agaaaccatt attatcatga cattaaccta taaaaatagg cgtatcacga ggccctttcg 7440
 tottcaa 7447

<210> 22
 <211> 3730
 <212> DNA
 <213> vektor pSP72E2H6

<400> 22
 gaactcgagc agctgaagct tgaattcatg agatttcctt caatttttac tgcagtttta 60
 ttccgcagcat cctccgcatt agctgtccca gtcaacacta caacagaaga tgaaacggca 120
 caaattccgg ctgaagctgt catcggttac tcagatttag aaggggattt cgatgttgct 180
 gttttgccat tttccaacag cacaataaac gggttattgt ttataaatac tactattgcc 240
 agcattgctg ctaaagaaga aggggtatct ctagataaaa ggcatacccg cgtgtcagga 300
 ggggcagcag cctccgatac caggggcctt gtgtccctct ttagccccgg gtccggctcag 360
 aaaatccagc tcgtaaacac caacggcagt tggcacatca acaggactgc cctgaactgc 420
 aacgactccc tccaaacagg gttctttgcc gcactattct acaaacacaa attcaactcg 480
 tctggatgcc cagagcgctt ggccagctgt cgctccatcg acaagttcgc tcaggggtgg 540
 ggtccctca cttacactga gcctaacagc tcggaccaga ggccctactg ctggcactac 600
 gcgcctcgac cgtgtgggtat tgtaccgcgc tctcaggtgt gcggtccagt gtattgcttc 660
 accccgagcc ctgttggtgt ggggacgacc gatcggtttg gtgtccccac gtataactgg 720
 ggggcgaacg actcggtatg gctgattctc aacaacacgc ggccgcgcgc aggcaactgg 780
 ttccggctgta catggatgaa tggcactggg ttaccaaga cgtgtggggg cccccgtgc 840
 aacatcgggg gggccggcaa caacaacttg acctgccccca ctgactgttt tcggaagcac 900
 cccgaggcca cttacgccag atgcggttct gggccctggc tgacacctag gtgtatggtt 960
 cattacccat ataggctctg gcactacccc tgcactgtca acttcacat cttcaaggtt 1020
 aggatgtacg tggggggcgt ggagcacagg ttccaagccg catgcaattg gactcgagga 1080

gagcgttgtg acttggagga cagggataga tcagagctta gctcgtgct gctgtctaca 1140
 acagagtggc aggtgatcga gggcagacac catcaccacc atcactaata gttaattaac 1200
 gatctcgact tggttgaaca cgttgccaaag gcttaagtga atttacttta aagtcttgca 1260
 tttaaataaa ttttcttttt atagctttat gacttagttt caatttatat actattttaa 1320
 tgacattttc gattcattga ttgaaagcta tcagatctgc cggctctcct atagtgaagtc 1380
 gtattaattt cgataagcca ggtaaacctg cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga 1440
 ggcggtttgc gtattgggcg ctcttcgct tctcgtcga ctgactcgt gcgctcggtc 1500
 gttcggctgc ggcgagcgg atcagctcac tcaaaggcgg taatacggtt atccacagaa 1560
 tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt 1620
 aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat aggtccgcc cccctgacga gcatcaciaa 1680
 aatcgacgct caagtcaag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt 1740
 cccctggaa gctccctcgt gcgctctcct gttccgacc tgccgcttac cggatacctg 1800
 tccgcctttc tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcaat gctcacgctg taggtatctc 1860
 agttcgggtg aggtcgttcg ctccaagctg ggtgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc 1920
 gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggttaag acacgactta 1980
 tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggatatgt aggcgggtgct 2040
 acagagtctt tgaagtgggt gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttgggtatc 2100
 tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa 2160
 caaaccaccg ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa 2220
 aaaggatctc aagaagatcc ttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa 2280
 aactcacgtt aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt 2340
 ttaaattaaa aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac 2400
 agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcaccc 2460
 atagttgcct gactccccgt cgtgtagata actacgatac gggagggctt accatctggc 2520
 ccagtgctg caatgatacc gcgagaccga cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata 2580
 aaccagccag ccggaaggcg cgagcgcgaga agtggctctg caactttatc cgcctccatc 2640
 cagtctatta attggtgccc ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgccg 2700
 aacgttggtg ccattgctac aggcacgtg gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca 2760
 ttcagctccg gtcccaacg atcaaggcga gttacatgat ccccatggt gtgcaaaaaa 2820
 ggggttagct ccttcgggtc tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtggtatca 2880



WO 02/086101

PCT/BE02/00064

ctcatgggta tggcagcact gcataattct ctactgtca tgccatccgt aagatgcttt 2940
tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt 3000
tgctcttgcc eggcgtaaat acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg 3060
ctcatcattg gaaaacgttc ttggggcgga aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga 3120
tccagttcga tgtaaccac tcgtgcaccc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc 3180
agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg caaaatgccg caaaaaaggg aataaggcg 3240
acacggaaat gttgaatact catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag 3300
ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg 3360
gttcgcgca catttccccg aaaagtgcc cctgacgtct aagaaacct tattatcatg 3420
acattaacct ataaaaatag gcgtatcacg aggcctttc gtctcgcgcg ttctgggtgat 3480
gacggtgaaa acctctgaca catgcagctc ccggagacgg tcacagcttg tctgtaagcg 3540
gatgccggga gcagacaagc ccgtcagggc gcgtcagcgg gtgttgggcg gtgtcggggc 3600
tggcttaact atgcggcatc agagcagatt gtactgagag tgcaccatat ggacatattg 3660
tcggttagaac gcggctacaa ttaatacata accttatgta tcatacacat acgatttagg 3720
tgacactata 3730

<210> 23
<211> 7370
<212> DNA
<213> vektor pMPT121

<220>
<221> alternativní znak
<222> (778)..(778)
<223> N je jakýkoliv nukleotid

<400> 23
ggtaacctgc tcaatctccg gaatggtgat ctgatcgttc ctgaaaacct cgacattggc 60
tccctcctga cacaggtact cgtacaggtt ccaggtaaac gagtcgtagt tgcgatcat 120
gacaacgttc ttagaagcgg ccggcatttt gaagggtgact aatagcctaa gaaaatattt 180
aatttaattt tcattaaatt ttctataact cgctatttca gcttttcatc tcatcacttc 240
ataaacgata taaaccagaa aaagaactat ttccaacac gcttctcaaa agcggtatgt 300
ccttcacgt ctcccttagaa tctggcaagt ccgcgagggg gatocagatc tgaattcggt 360
tttgtacttt agattgatgt caccaccgtg cactggcagc agtatttata gatggaccgt 420
gtggggacgg ttgggtacac ttagcggcag cgctgacccc atctgtgatc aagtagggca 480
aaaactgggg atgtcggagt cgctgcacgg tagcataaga atttactttc tggccgggttc 540

accgcattt gcactgtgga gaaacagcct gtccgacacc ccaccagttg ccacatcggc 600
 cctctgctgc tctggtgatt ttctggtagc aggcacagac agcagtgggt agcgccgtcc 660
 ggtaggcaa ggtcacgttg taggctaccc cagcaaacag agcctcacat gacaccatcc 720
 agctgcgtcc tcgaagcgaa aagttcgggt gcggtgcag aacccctca gttgccanat 780
 tcacaagttt tacgcgacgg ctaaagcgag tgggttttaa aaacttgagg tgcaaggatg 840
 catgcggcaa caattaattg gtgcatccag cacagcaagc ccagtctcga gatgtccagt 900
 cgctacagag tggagtacgc actcaaggaa caccgtcgag atggcctcat agaatggatc 960
 aagggcctgc tggccacgoc gttcgtcctg tacgcggtga agagcaacgg catctctgca 1020
 gtggacgacc tcatggtaaa ctctgaggca aaacgcccgt acgcggaaat cttccacgac 1080
 ctggaactcc tcatcgacga caacattgaa atgaccaaag ccggcacccc cgaattgtct 1140
 cggctcgtgc agctgggtcc gagcgttggc agcttcttca cgagactgcc tctggaaaag 1200
 gccttctaca tcgaggacga gcgcgcgccc atcagcaaac gccggcttgt ggccccctcg 1260
 ttcaacgacg tccggctcat tctcaacacg gccagctgt tggagatgtc gcggttcttc 1320
 cattccaaaa ccattcgaga tcgcaagctg cagctcatta cattcgatgg tgacatcaca 1380
 ctgtadgacg acggcaaaaa ttctgatgcc gagtcgccc tctgcccc cctcatcaaa 1440
 ctaatggcca aggacctcta tgtgggtatc gtcaccgcgg ccggctacag cgacggaaca 1500
 agtactacga gcgcctcaag ggcctcatcg acgcgtcca gacgtccccg ctgctcacag 1560
 gccaccagaa agagaacctg ttcatatgg gcggcgaggc aaactacctc ttccggtaca 1620
 gtaacgagga gcagagatta cgcttctact ccaaagacag atggctgctc gagaacatgc 1680
 tgaattggtc cgaggaggac attcatctga cactggactt tgcgaggac gttctaaacg 1740
 acctcgttca caaactgggc tcgccagcca ccgtggtcgg caaggagcgt cgcgtcggcc 1800
 tggttccatt accgggccac aagctgatcc gcgagcagct cgaggagatc gttctccgcy 1860
 tcgacaccat tccttgcggc ggcggtgctc aacggcctca acctactact gggctgcttc 1920
 ctaatgcagg agtcgcataa gggagagcgt cgactccgc gactcggcgt tcaacttcga 1980
 gctattatca acgccgaat acgtcagaaa cagccgtgcc ccagggacca gaaagcctac 2040
 tggtagtat gttctttcgt gtgatttttc cgaggatgag aacgacgata acgagcacia 2100
 ctggagtcg gaggacacgc ttattgcgtt gaacgcagcc acatcagcag gctgtcaaga 2160
 ctgagtatgg ccacagagct ggattctcgg cctcactctc aagacgttag taaactccgt 2220
 ctgccagaaa ttgctgacga ggatgtataa taatagatga attacgaaca attgtagttc 2280
 aaaaaattt agtaacaata ttgtctagat gacagatgtg ctgaaaccag tgaactccaa 2340
 taaaccactc accgctaccc aagagaaaca gatcagagtg ctagggcctt gtttcagagt 2400

actacaacgt ttaccagaag cttgagcaag ttctcaaacy cgggtttgtc gaccgatgcc 2460
 cttgagagcc ttcaaccag tcagctcctt cgggtgggcy cggggcatga ctatcgtcgc 2520
 cgcacttatg actgtcttct ttatcatgca actcgttagga cagggtgccg cagcgcctctg 2580
 ggtcattttc ggcgaggacc gctttcgtg gagcgcgacg atgatcggcc tgcgcttgc 2640
 ggtattcgga atcttgcaag ccctcgtca agccttcgtc actggccccg ccaccaaacy 2700
 tttcggcgag aagcaggcca ttatcgccg catggcgcc gacgcgctgg gctacgtctt 2760
 gctggcgctt gcgacgcgag gctggatggc cttccccatt atgattcttc tcgcttcgg 2820
 cggcatcggy atgcccgcgt tgcaggccat gctgtccagg caggtagatg acgaccatca 2880
 gggacagctt caaggatcgc tcgcgctct taccagccta acttcgatca ctggaccgct 2940
 gatcgtcacg gcgatttatg ccgcctcggc gagcacatgg aacgggttg catggattgt 3000
 aggcgcgcgc ctataccttg tctgcctccc cgcgttgct cgcggtgcat ggagccgggc 3060
 cacctcgacc tgaatggaag ccggcgccac ctgcctaacy gattcaccac tccaagaatt 3120
 ggagccaatc aattcttgcy gagaactgtg aatgcgcaaa ccaacccttg gcagaacata 3180
 tccatcgctt ccgccatctc cagcagccgc acgcggcgca tcgggggggg gggggggggg 3240
 ggggggcaaa caattcatca tttttttttt attctttttt ttgatttcgg tttctttgaa 3300
 atttttttga ttcggtaatc tccgaacaga aggaagaacy aaggaaggag cacagactta 3360
 gattggtata tatacgcata tgtagtgttg aagaacatg aaattgcccc gtattcttaa 3420
 cccaactgca cagaacaaaa acctgcagga aacgaagata aatcatgtcg aaagctacat 3480
 ataaggaacy tgctgctact catcctagtc ctgttgctgc caagctattt aatatcatgc 3540
 acgaaaagca aacaaacttg tgtgcttcat tggatgttcg taccaccaag gaattactgg 3600
 agttagtga agcattaggt cccaaaattt gtttactaaa aacacatgtg gatattctga 3660
 ctgatttttc catggagggc acagttaagc cgctaaaggc attatccgcc aagtacaatt 3720
 ttttactctt cgaagacaga aaatttgctg acattggtaa tacagtcaaa ttgcagtact 3780
 ctgcgggtgt atacagaata gcagaatggg cagacattac gaatgcacac ggtgtgggtg 3840
 gccaggtat tgtagcggt ttgaagcagg cggcagaaga agtaacaaag gaacctagag 3900
 gccttttgat gtagcagaa ttgtcatgca agggctccct atctactgga gaatatacta 3960
 aggtactgt tgacattgcg aagagcgaca aagattttgt tatcggttt attgctcaaa 4020
 gagacatggg tggaagagat gaaggttacg attggttgat tatgacaccc ggtgtgggtt 4080
 tagatgacaa gggagacgca ttgggtcaac agtatagaac cgtggatgat gtggtctcta 4140
 caggatctga cattattatt gttggaagag gactatttgc aaagggaagg gatgctaagg 4200

tagaggggtga acgttacaga aaagcaggct gggaagcata tttgagaaga tgcggccagc 4260
 aaaactaaaa aactgtatta taagtaaagtg catgtatact aaactcacia attagagctt 4320
 caatttaatt atatcagtta ttacccggga atctcggtcg taatgatattt tataatgacg 4380
 aaaaaaaaaa aattggaaag aaaagcccc ccccccccc ccccccccc ccccccccc 4440
 cagcgttggg tcctggccac ggggtgcgcat gatcgtgctc ctgctcgttga ggaccggct 4500
 aggctggcgg ggttgccctta ctggttagca gaatgaatca ccgatacggc agcgaacgtg 4560
 aagcgactgc tgctgcaaaa cgtctgcgac ctgagcaaca acatgaatgg tcttcggttt 4620
 ccgtgtttcg taaagtctgg aaacgcggaa gtcagcgccc tgcaccatta tgttcgggat 4680
 ctgcatcgca ggatgctgct ggctaccctg tggaacacct acatctgtat taacgaagcg 4740
 ctggcattga ccctgagtga tttttctctg gtcccgccgc atccataccg ccagttgttt 4800
 accctcacia cgttccagta accgggcatg ttcatcatca gtaaccgta tcgtgagcat 4860
 cctctctcgt ttcatcgga tcattacccc catgaacaga aattccccct tacacggagg 4920
 catcaagtga ccaaacagga aaaaaccgcc cttaacatgg ccgcctttat cagaagccag 4980
 acattaacgc ttctggagaa actcaacgag ctggacggcg atgaacaggc agacatctgt 5040
 gaatcgcttc acgaccagc tgatgagctt taccgcagct gcctcgcgcg tttcgggtgat 5100
 gacggtgaaa acctctgaca catgcagctc ccggagacgg tcacagcttg tctgtaagcg 5160
 gatgccggga gcagacaagc ccgtcagggc gcgtcagcgg gtgttggcgg gtgtcggggc 5220
 gcagccatga ccagtcacg tagcgatagc ggagtgtata ctggcttaac tatgcggcat 5280
 cagagcagat tgaactgaga gtgcaccata tgcgggtgtga aataccgcac agatgcgtaa 5340
 ggagaaaata ccgcatcagg cgctcttccg ctctctcgt cactgactcg ctgcgctcgg 5400
 tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc ggtaatacgg ttatccacag 5460
 aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc 5520
 gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg cccctctgac gagcatcaca 5580
 aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcgt 5640
 ttccccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac cctgccgctt accggatacc 5700
 tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca tagctcacgc ttaggtatc 5760
 tcagttcggg ttaggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaaccc ccggttcagc 5820
 ccgaccgctg cgcttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta agacacgact 5880
 tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgaggat gtaggcggtg 5940
 ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaaggaca gtatttggtg 6000
 tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaagagt tggtagctct tgatccggca 6060

aacaaaccac cgctggtagc ggtgggttttt ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa 6120
 aaaaaggatc tcaagaagat cttttgatct tttctacggg gtctgacgct cagtgggaacg 6180
 aaaactcacg ttaagggatt ttggtcatga gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc 6240
 ttttaaatta aaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat atatgagtaa acttggtctg 6300
 acagttacca atgcttaatc agtgaggcac ctatctcagc gatctgtcta tttcgttcat 6360
 ccatagttgc ctgactcccc gtcgtgtaga taactacgat acgggagggc ttaccatctg 6420
 gccccagtgc tgcaatgata ccgcgagacc cacgctcacc ggctccagat ttatcagcaa 6480
 taaaccagcc agccggaagg gccgagcgca gaagtgggtcc tgcaacttta tccgcctcca 6540
 tccagtctat taattgttgc cggaagcta gagtaagtag ttcgccagtt aatagtttgc 6600
 gcaacgttgt tgccattgct gcaggcatcg tgggtgtcagc ctcgctgttt ggtatggctt 6660
 cattcagctc cggttcocaa cgatcaaggc gagttacatg atcccccatg ttgtgcaaaa 6720
 aagcggttag ctcttcgggt cctccgatcg ttgtcagaag taagttggcc gcagtgttat 6780
 cactcatggt tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt catgccatcc gtaagatgct 6840
 tttctgtgac tggtgagtac tcaaccaagt cattctgaga atagtgtatg cggcgaccga 6900
 gttgctcttg cccggcgtca acacgggata ataccgcgcc acatagcaga actttaaaag 6960
 tgctcatcat tggaaaacgt tcttcggggc gaaaactctc aaggatctta ccgctgttga 7020
 gatccagttc gatgtaacct actcgtgcac ccaactgatc ttcagcatct tttactttca 7080
 ccagcgtttc tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaaatgc cgcaaaaaag ggaataaggg 7140
 cgacacggaa atgttgaata ctcatactct tcctttttca atattattga agcatttatc 7200
 agggttattg tctcatgagc ggatacatat ttgaatgtat ttagaaaaat aaacaaatag 7260
 gggttccgcy cacatttccc cgaaaagtgc cacctgacgt ctaagaaacc attattatca 7320
 tgacattaac ctataaaaat aggcgtatca cgaggccctt tcgtcttcaa 7370

<210> 24
 <211> 8298
 <212> DNA
 <213> vektor pFMPT-MFalfa-E2-H6

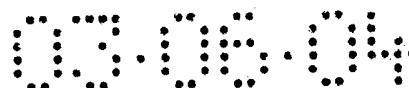
<400> 24
 ggtaccctgc tcaatctccg gaatggtgat ctgatcgttc ctgaaaacct cgacattggc 60
 tcctctctga cacaggactc cgtacagggt ccaggtaaac gagtcgtagt tgtcgatcat 120
 gacaacgttc ttagaagcgg ccggcatttt gaagggtgact aatagcctaa gaaaatattt 180
 aatttaattt tcattaaatt ttcctatact cgctattttca gcttttcatc tcatcacttc 240
 ataaacgata taaaccagaa aaagaactat tttcaaacac gctttctcaa agcggtatgt 300

ccttccacgt ctcccttagaa tctggcaagt ccgcgagggg gatccagatc tgatagcttt 360
 caatcaatga atcgaaaatg tcattaaaat agtatataaa ttgaaactaa gtcataaagc 420
 tataaaaaga aaattttattt aaatgcaaga ctttaaagta aattcactta agccttggca 480
 acgtgttcaa ccaagtcgag atcgttaatt aactattagt gatggtggtg atggtgtctg 540
 ccctcgatca cctgccactc tgttgtagac agcagcagcg agctaagctc tgatctatcc 600
 ctgtcctcca agtcacaacg ctctcctcga gtccaattgc atgcggcttc gaacctgtgc 660
 tccacgcccc ccacgtacat cctaacccttg aagatggtga agttgacagt gcaggggtag 720
 tgccagagcc tatatgggta atgaaccata cacctaggtg tcagccaggg ccagaaccg 780
 catctggcgt aagtggcctc ggggtgcttc cgaaaacagt cagtggggca ggtcaagggtg 840
 ttgttgccgg ccccccgat gttgcacggg gggccccccac acgtcttggg gaacccagtg 900
 ccattcatcc atgtacagcc gaaccagttg cctcgcggcg gccgcgtgtt gttgagaatc 960
 agcacatccg agtcgttcgc cccccagtta tacgtgggga caccaaaccg atcggtcgtc 1020
 cccaccacaa cagggctcgg ggtgaagcaa tacactggac cgcacacctg agacgogggt 1080
 acaataccac acggtcgagg cgcgtagtgc cagcagtagg gcctctggtc cgagctgtta 1140
 ggctcagttt aagtgagggg accccacccc tgagcgaact tgtcgatgga gcgacagctg 1200
 gccaaagcgt ctgggcatcc agacgagttg aatttgtgtt tgtagaatag tgcggcaaag 1260
 aacctgttt ggagggagtc gttgcagttc agggcagttc tgttgatgtg ccaactgccg 1320
 ttggtgttta cgagctggat tttctgagcc gacccggggc taaagaggga cacaaggccc 1380
 ctggtatcgg aggtctgctgc cctcctgac acgcgggtat gccttttctc tagagatacc 1440
 ccttcttctt tagcagcaat gctggcaata gtagtattta taaacaataa cccgttattt 1500
 gtgctgttgg aaaatggcaa aacagcaaca tcgaaatccc cttctaaatc tgagtaaccg 1560
 atgacagctt cagccggaat ttgtgccgtt tcattctctg ttgtagtggt gactggagca 1620
 gctaatacgg aggatgctgc gaataaaact gcagtaaaaa ttgaaggaaa tctcatgaat 1680
 tcccgatgaa gcagagagcg caggaggcgg tatttatagt gccattcccc tctctgagag 1740
 acccggatgg tagtcgagtg tatcggagac agcttgatgt agactccgtg cctgccggct 1800
 cctcttattg gcggacacca gtgagacacc ccggaacttg ctgtttttct gcaaaatccg 1860
 ggggtgaccag tgggagccta tttgcacaca cgagcgggac acccactct ggtgaagagt 1920
 gccaaagtca ttctttttcc cgttgccggg cagccgattg catgttttag gaaaatatta 1980
 cctttgctac accctgtcag atttaccctc cacacatata tattccgtca cctccagga 2040
 ctattattcg tcgttgccg gccagcgga gatatccaga agctgttttc cgagagactc 2100

ggttggcgcc tggatatatt gatggatgtc gcgctgcctc acgtcccggg acccaggaac 2160
 gcggtgggat ctcgggccca tcgaagactg tgctccagac tgctcgccca gcaggtgttt 2220
 cttgatcgcc gcctctaaat tgtccgcgca tcgcccgtta catttttcca gctcggagtt 2280
 tgcgtttaga tacagttttc gcgatgccaa aggagcctgc agattataac ctcgatgct 2340
 gtcattcagc gcttttaatt tgacctccag atagttgctg tattttctgtt cccattggct 2400
 gctgcgcagc ttcgtataac tcgagttatt gttgcgctct gcctcggcgt actggctcat 2460
 gatctggatc ttgtccgtgt cgtttttctt cgagtgtttc tcgcaaacga tgtgcacggc 2520
 ctgcagtgtc caatcggagt cgagctggcg ccgaaactgg cggatctgag cctccacact 2580
 gccctgtttc tctatccacg gcggaaccgc ctcttgcctt ttcagaatgt tgttcaagtg 2640
 gtactctgtg cgggtcaatga aggcgttatt gccggtgaaa tctttgggaa gcggttttcc 2700
 tcggggaaga ttacgaaatt ccccgcgctg ttgcgcttcc tggatctcga ggagatcgtt 2760
 ctccgcgtcg aggagatcgt tctccgcgtc gacaccattc cttgcggcgg cgggtgctcaa 2820
 cggcctcaac ctactactgg gctgcttctt aatgcaggag tcgcataagg gagagcgtcg 2880
 acaaaccgc gtttgagaac ttgtcaagc ttctggtaaa cgtttagta ctctgaaaca 2940
 aggccttagc actctgatct gtttctcttg ggtagcggtg agtggtttat tggagttcac 3000
 tggtttcagc acatctgtca tctagacaat attgttacta aatttttttg aactacaatt 3060
 gttcgtaatt catctattat tatacatcct cgtcagcaat ttctggcaga cggagtttac 3120
 taacgtcttg agtatgagc cgagaatcca gctctgtggc catactcagt cttgacagcc 3180
 tgctgatgtg gctgcgttca acgcaataag cgtgtcctcc gactccgagt tgtgctcgtt 3240
 atcgtcgttc tcatcctcgg aaaaatcaca cgaaagaaca tactcaccag taggctttct 3300
 ggtccctggg gcacggctgt ttctgacgta ttccggcgtt gataatagct cgaaagtga 3360
 cgcgagtcg cgggagtcga ccgatgccct tgagagcctt caaccagtc agctccttcc 3420
 ggtgggcgcg gggcatgact atcgtcgccg cacttatgac tgtcttcttt atcatgcaac 3480
 tcgtaggaca ggtgcggca gcgctctggg tcattttcgg cgaggaccgc tttcgttgga 3540
 gcgcgacgat gatcggcctg tcgcttgcgg tattcggaat cttgcacgcc ctgctcaag 3600
 ccttcgtcac tggccccgc accaaacgtt tcggcgagaa gcaggccatt atcgccggca 3660
 tggcgccga cgcgctgggc tacgtcttgc tggcgctcgc gacgcgaggc tggatggcct 3720
 tccccattat gattcttctc gcttccggcg gcacgggat gcccgcttg caggccatgc 3780
 tgtccaggca ggtagatgac gaccatcagg gacagcttca aggatcgctc gcggctctta 3840
 ccagcctaac ttcgatcact ggaccgctga tcgtcacggc gatttatgcc gcctcggcga 3900
 gcacatggaa cgggttgga tggattgtag gcgcgcctt ataccttgc tgctcccg 3960

cgttgcgtcg cgggtgcatgg agccggggcca cctcgacctg aatggaagcc ggccggcacct 4020
 cgctaacgga ttcaccactc caagaattgg agccaatcaa ttcttgcgga gaactgtgaa 4080
 tgcgcaaacc aacccttggc agaacatata catcgcgctc gccatctcca gcagccgcac 4140
 gcggcgcatc gggggggggg gggggggggg ggggcaaaca attcatcatt ttttttttat 4200
 tctttttttt gatttcgggt tctttgaaat ttttttgatt cggtaatctc cgaacagaag 4260
 gaagaacgaa ggaaggagca cagacttaga ttggtatata tacgcatatg tagtggtgaa 4320
 gaaacatgaa attgccaggt attcttaacc caactgcaca gaacaaaaac ctgcaggaaa 4380
 cgaagataaa tcatgtcgaa agctacatat aaggaacgtg ctgctactca tcctagtcct 4440
 gttgctgcca agctatttaa tatcatgcac gaaaagcaaa caaacttgtg tgcttcattg 4500
 gatgttcgta ccaccaagga attactggag ttagttgaag cattaggtcc caaaatttgt 4560
 ttactaaaaa cacatgtgga tatcttgact gatttttcca tggagggcac agttaagccg 4620
 ctaaaggcat tatccgcaa gtacaatttt ttactcttcg aagacagaaa atttgctgac 4680
 attggttaata cagtcaaatt gcagtactct gcgggtgtat acagaatagc agaatgggca 4740
 gacattacga atgcacacgg tgtggtgggc ccagggtattg ttagcggttt gaagcaggcg 4800
 gcagaagaag taacaaagga acctagaggc cttttgatgt tagcagaatt gtcatgcaag 4860
 ggctccctat ctactggaga atatactaag ggtactgttg acattgcgaa gagcgacaaa 4920
 gattttgtta tcggctttat tgcctaaaga gacatgggtg gaagagatga aggttacgat 4980
 tggttgatta tgacaccggg tgtgggttta gatgacaagg gagacgcatt gggccaacag 5040
 tatagaaccg tggatgatgt ggtctctaca ggatctgaca ttattattgt tggaagagga 5100
 ctatttgcaa agggaaggga tgctaaggta gaggggtgaac gttacagaaa agcaggctgg 5160
 gaagcatatt tgagaagatg cggccagcaa aactaaaaaa ctgtattata agtaaatgca 5220
 tgtatactaa actcacaat tagagcttca atttaattat acagttatt acccggaat 5280
 ctcggtcgta atgattttta taatgacgaa aaaaaaaaaa ttggaaagaa aagccccccc 5340
 ccccccccc ccccccccc ccccccgca gcgttgggtc ctggccacgg gtgcgcatga 5400
 tcgtgctcct gtggttgagg acccggtag gctggcgggg ttgccttact ggtagcaga 5460
 atgaatcacc gatacgcgag cgaacgtgaa gcgactgctg ctgcaaaacg tctgcgacct 5520
 gagcaacaac atgaatggtc ttcggtttcc gtgtttcgta aagtctggaa acgcggaagt 5580
 cagcgccctg caccattatg ttccggatct gcctgcagg atgctgctgg ctaccctgtg 5640
 gaacacctac atctgtatta acgaagcgct ggcattgacc ctgagtgatt tttctctggt 5700
 cccgcgcat ccataccgcc agttgtttac cctcacaacg ttccagtaac cgggcatggt 5760

catcatcagt aacccgtatc gtgagcatcc tctctcgttt catcggtatc attacccccca 5820
 tgaacagaaa ttccccctta cacggaggca tcaagtgacc aaacaggaaa aaaccgccct 5880
 taacatggcc cgctttatca gaagccagac attaacgctt ctggagaaac tcaacgagct 5940
 ggacgcggat gaacaggcag acatctgtga atcgcttcac gaccacgctg atgagcttta 6000
 ccgcagctgc ctgcgcggtt tcggtgatga cggtgaaaac ctctgacaca tgcagctccc 6060
 ggagacggtc acagcttgtc tgtaagcgga tgccgggagc agacaagccc gtcagggcgc 6120
 gtcagcgggt gttggcgggt gtcggggcgc agccatgacc cagtcacgta gcgatagcgg 6180
 agtgtatact ggcttaacta tgcggcatca gacgagattg tactgagagt gcaccatatg 6240
 cgggtgtgaaa taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc gcatcaggcg ctcttcgct 6300
 tcctcgctca ctgactcgct gcgctcggtc gttcggtcgc ggcgagcggg atcagctcac 6360
 tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga 6420
 gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat 6480
 aggtccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac 6540
 ccgacaggac tataaagata ccaggcggtt cccctggaa gctccctcgt gcgctctcct 6600
 gttccgaccc tgccgcttac cggatacctg tccgccttcc tcccttcggg aagcgtggcg 6660
 ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcggtgt aggtcgttcg ctccaagctg 6720
 ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt 6780
 cttgagtcca acccggtag acacgactta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg 6840
 attagcagag cgaggtatgt aggcgggtgct acagagttct tgaagtgggt gcctaactac 6900
 ggctacacta gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga 6960
 aaaagagttg gtatctcttg atccggcaaa caaaccacog ctggtagcgg tggttttttt 7020
 gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt 7080
 tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggatttt ggtcatgaga 7140
 ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaaa aatgaagttt taaatcaatc 7200
 taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct 7260
 atctcagcga tctgtctatt tcgttcaccc atagttgcct gactccccgt cgtgtagata 7320
 actacgatac gggagggctt accatctggc cccagtgcgt caatgatacc gcgagacca 7380
 cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata aaccagccag ccggaagggc cgagcgaga 7440
 agtggctctg caactttatc cgctccatc cagtctatta attgttgccg ggaagctaga 7500
 gtaagtagtt cgcagttaa tagtttgcgc aacgttggtt ccattgctgc aggcacgtg 7560
 gtgtcacgct cgtcgttttg tatggcttca ttcagctccg gttcccaacg atcaaggcga 7620



gttacatgat ccccatggtt gtgcaaaaaa ggggttagct ccttcgggtcc tccgatcggtt 7680
 gtcagaagta agttggccgc agtggttatca ctcatgggtta tggcagcact gcataattct 7740
 cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtca 7800
 ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc cggcgtcaac acgggataat 7860
 accgcgcac atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgttc ttcggggcga 7920
 aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tgtaaccac tctgacccc 7980
 aactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg 8040
 caaatgccc caaaaaagg aataaggcg acacggaaat gttgaatact catactcttc 8100
 ctttttcaat attattgaag catttatcag ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt 8160
 gaatgtattt agaaaaataa acaaatagg gttccgcga catttccccg aaaagtgcga 8220
 cctgacgtct aagaaacct tattatcatg acattaacct ataaaaatag gcgtatcacg 8280
 aggcctttc gtcttcaa 8298

<210> 25
 <211> 8695
 <212> DNA
 <213> vektor pMPT-Mfalfa-E2-H6

<220>
 <221> alternativní znak
 <222> (2103)..(2103)
 <223> N je jakýkoliv nukleotid

<400> 25
 ggtaccctgc tcaatctccg gaatgggtgat ctgatcggtc ctgaaaacct cgacattggc 60
 tccctctga cacagggtact cgtacagggt ccaggtaaac ggtcgtagt tgcgatcat 120
 gacaacgttc ttagaagcgg ccggcatttt gaagggtgact aatagcctaa gaaaatattt 180
 aatttaattt tcattaaatt ttcctatact cgctatttca gcttttcac tcatcacttc 240
 ataaacgata taaaccagaa aaagaactat tttcaaacac gcttctcaa agcgggtatgt 300
 ccttccacgt ctcccttagaa tctggcaagt ccgcgagggg gatccagatc tgatagcttt 360
 caatcaatga atcgaaaatg tcattaaaat agtatataaa ttgaaactaa gtcataaagc 420
 tataaaaaga aaattttattt aaatgcaaga ctttaaagta aattcactta agccttggca 480
 acgtgttcaa ccaagtcgag atcggttaatt aactattagt gatgggtgtg atgggtgtctg 540
 cctcgatca cctgccactc tgttgtagac agcagcagcg agctaagctc tgatctatcc 600
 ctgtctcca agtcacaacg ctctctctga gtccaattgc atgcggcttc gaacctgtgc 660
 tccacgcccc ccacgtacat cctaaccttg aagatgggtga agttgacagt gcaggggtag 720

tgccagagcc tatatgggta atgaaccata cacctaggtg tcagccaggg ccagaaccg 780
 catctggcgt aagtggcctc ggggtgcttc cgaaaacagt cagtggggca ggtcaaggtg 840
 ttgttgccgg cccccccgat gttgcacggg gggccccac acgtcttggg gaaccagtg 900
 ccattcatcc atgtacagcc gaaccagttg cctcgcgggc gccgcgtgtt gttgagaatc 960
 agcacatccg agtcgttcgc ccccagtta tacgtgggga caccaaaccg atcggtcgtc 1020
 cccaccacaa cagggctcgg ggtgaagcaa tacactggac cgcacacctg agacgcgggt 1080
 acaataccac acggtcgagg cgcgtagtgc cagcagtagg gcctctggtc cgagctgtta 1140
 ggctcagtg aagtgagggg accccacccc tgagcgaact tgtcgatgga gcgacagctg 1200
 gccaaagcgt ctgggcatcc agacgagttg aatttgtgtt tgtagaatag tgcggcaaag 1260
 aaccctgttt ggagggagtc gttgcagttc agggcagtc tgttgatgtg ccaactgccg 1320
 ttggtgttta cgagctggat tttctgagcc gaccggggc taaagaggga cacaaggccc 1380
 ctggtatcgg aggctgctgc cctcctgac acgcggtat gccttttatc tagagatacc 1440
 ccttcttctt tagcagcaat gctggcaata gtagtattta taaacaataa cccgttattt 1500
 gtgctgttg aaaatggcaa aacagcaaca tcgaaatccc cttctaaatc tgagtaaccg 1560
 atgacagctt cagccggaat ttgtgccgtt tcatcttctg ttgtagtgtt gactggagca 1620
 gctaatacgg aggatgctgc gaataaaact gcagtaaaaa ttgaaggaaa tctcatgaat 1680
 tcgtttttgt acttttagatt gatgtcacca ccgtgcactg gcagcagtat ttatagatgg 1740
 accgtgtggg gacggttggg tacacttagc ggcagcgtg accccatctg tgatcaagta 1800
 gggcaaaaac tggggatgtc ggagtcgctg cacggtagca taagaattta ctttctggcc 1860
 ggttcaccgg catttgact gtggagaaac agcctgtccg acaccacc agttgccaca 1920
 tcggccctct gctgctctgg tgattttctg gtagcaggca cagacagcag tgggtagcgc 1980
 cgtccggtta ggcaaggta cgtttaggc taccacagca aacagagcct cacatgacac 2040
 catccagctg cgtcctcgaa gcgaaaagtt cggttgcggc tgcagaacc cctcagttgc 2100
 canattcaca agttttacgc gacggctaaa gcgagtgggt tttaaaaact tgcggtgcaa 2160
 ggatgcatgc ggcaacaatt aattggtgca tccagcacag caagcccagt ctcgagatgt 2220
 ccagtcgcta cagagtggag tacgcactca aggaacaccg tcgagatggc ctcatagaat 2280
 ggatcaaggg cctgctggcc acgccgttcg tctgtacgc ggtgaagagc aacggcatct 2340
 ctgcagtga cgacctcatg gtaaacctc aggcaaacg ccgctacgc gaaatcttcc 2400
 acgacctga actcctcatc gacgacaaca ttgaaatgac caaagccggc acccccgaa 2460
 tgtctcggct cgtgcagctg gttccgagcg ttggcagctt cttcacgaga ctgcctctg 2520

aaaaggcctt ctacatcgag gacgagcgcc gcgccatcag caaacgccgg cttgtggccc 2580
 cctcgttcaa cgacgtccgg ctcatctca acacggccca gctgttgag atgtcgcggt 2640
 tcttccattc caaaaccatc cgagatcgca agctgcagct cttacattc gatggtgaca 2700
 tcacactgta cgacgacggc aaaaatttcg atgccgagtc gcccatcctg cccacactca 2760
 tcaaactaat ggccaaggac ctctatgtgg gtatcgtcac cgcgccggc tacagcgagc 2820
 gaacaagtac tacgagcgcc tcaagggcct catcgacgcc gtccagacgt ccccgctgct 2880
 cacaggccac cagaaagaga acctgttcatt tatggcgggc gaggcaaact acctcttcgg 2940
 gtacagtaac gaggagcaga gattacgctt ctactccaaa gacagatggc tgctcgagaa 3000
 catgctgaat tgggtccgag aggacattca tctgacactg gactttgcgc aggacgttct 3060
 aaacgacctc gttcacaaac tgggctcgcc agccaccgtg gtccgcaagg agcgtcgcggt 3120
 cggcctgggt ccattaccgg gccacaagct gatccgcgag cagctcgagg agatcgttct 3180
 ccgctcgac accattcctt gcggcgccgg tgctcaacgg cctcaaccta ctactgggct 3240
 gcttccctaat gcaggagtcg cataaggag agcgtcgact ccgcgactc ggcgttccact 3300
 ttcgagctat tatcaacgcc ggaatacgtc agaaacagcc gtgcccagg gaccagaaag 3360
 cctactgggt agtatgttct ttcgtgtgat ttttccgagg atgagaacga cgataacgag 3420
 cacaactcgg agtcggagga cagcttatt gcgttgacg cagccacatc agcaggctgt 3480
 caagactgag tatggccaca gagctggatt ctgcgcctca tactcaagac gttagtaaag 3540
 tcgctctgcc agaaattgct gacgaggatg tataataata gatgaattac gaacaattgt 3600
 agttcaaaaa aatttagtaa caatattgtc tagatgacag atgtgctgaa accagtgaac 3660
 tccaataaac cactcaccgc taccoagag aaacagatca gaggctagg gccttgtttc 3720
 agagtactac aacgtttacc agaagcttga gcaagttctc aaacgcgggt ttgtcgaccg 3780
 atgcccttga gagccttcaa ccagtcagc tccttcgggt gggcgccggg catgactatc 3840
 gtgcgcgcac ttatgactgt cttctttatc atgcaactcg taggacagg gccggcagcg 3900
 ctctgggtca ttttcggcga ggaccgctt cgctggagcg cgacgatgat cggcctgtcg 3960
 cttgcggtat tcggaatctt gcacgcctc gctcaagcct tcgtcactgg tcccgcacc 4020
 aaacgtttcg gcgagaagca ggccattatc gccggcatgg cggccgacgc gctgggctac 4080
 gtcttgctgg cgttcgcgac gcgaggctgg atggccttc ccattatgat tcttctcgt 4140
 tccggcggca tcgggatgcc cgcgttgac gccatgctgt ccaggcagg agatgacgac 4200
 catcagggac agcttcaagg atcgctcgc gctcttacca gcctaactc gatcactgga 4260
 ccgctgatcg tcacggcgat ttatgccgc tcggcgagca catggaacgg gttggcatgg 4320
 attgtaggcg ccgccctata ccttgtctgc ctcccccggt tcgctcgcg tgcatggagc 4380

cggggccacct cgacctgaat ggaagccggc ggcacctcgc taacggattc accactccaa 4440
 gaattggagc caatcaattc ttgcggagaa ctgtgaatgc gcaaaccaac ccttggcaga 4500
 acatatccat cgcgtccgcc atctccagca gccgcacgcg gcgcacggg gggggggggg 4560
 gggggggggg gcaaacaatt catcattttt tttttattct tttttttgat ttcggtttct 4620
 ttgaaatttt ttgattcgg taatctccga acagaaggaa gaacgaagga aggagcacag 4680
 acttagattg gtatatatac gcatatgtag tgttgaagaa acatgaaatt gcccgattt 4740
 cttaacccaa ctgcacagaa caaaaacctg caggaaacga agataaatca tgtcgaaagc 4800
 tacatataag gaacgtgctg ctactcatcc tagtcctgtt gctgccaagc tatttaatat 4860
 catgcacgaa aagcaaacaa acttgtgtgc ttcattggat gttcgtacca ccaaggaatt 4920
 actggagtta gttgaagcat taggtcccaa aatttgttta ctaaaaacac atgtggatat 4980
 cttgactgat tttccatgg agggcacagt taagccgcta aaggcattat ccgccaagta 5040
 caatttttta ctcttcgaag acagaaaatt tgcgtacatt ggtaatacag tcaaattgca 5100
 gtactctgcg ggtgtatata gaatagcaga atgggcagac attacgaatg cacacgggtg 5160
 ggtgggcccc ggtattgtta gcggtttgaa gcaggcggca gaagaagtaa caaaggaacc 5220
 tagaggcctt ttgatgttag cagaattgtc atgcaagggc tccctatcta ctggagaata 5280
 tactaaggtt actgttgaca ttgcgaagag cgacaaagat tttgttatcg gctttattgc 5340
 tcaaagagac atgggtggaa gagatgaagg ttacgattgg ttgattatga caccgggtgt 5400
 gggtttagat gacaaggag acgcattggg tcaacagtat agaaccgtgg atgatgtggt 5460
 ctctacagga tctgacatta ttattgttgg aagaggacta tttgcaaagg gaagggatgc 5520
 taaggtagag ggtgaacgtt acagaaaagc aggcgtggaa gcatatttga gaagatgcgg 5580
 ccagcaaac taaaaaactg tattataagt aaatgcatgt atactaaact cacaaattag 5640
 agcttcaatt taattatata agttattacc cggaatctc ggtcgtaatg atttttataa 5700
 tgacgaaaaa aaaaaaattg gaaagaaaag ccccccccc ccccccccc ccccccccc 5760
 cccgcagcg ttgggtcctg gccacgggtg cgcattgatg tgcctctgtc gttgaggacc 5820
 cggctaggct ggcgggggtg ccttactggt tagcagaatg aatcaccgat acgcgagcga 5880
 acgtgaagcg actgctgctg caaacgtct gcgacctgag caacaacatg aatggctctc 5940
 ggtttcctg tttcgtaaag tctggaaacg cggaagtcag cgcctgcac cattatgttc 6000
 cggatctgca tcgcaggatg ctgctggcta cctgtggaa cacctacatc tgtattaacg 6060
 aagcgtggc attgacctg agtgattttt ctctggtccc gccgcacca taccgccagt 6120
 tgtttaccct cacaacgttc cagtaaccgg gcatgttcat catcagtaac ccgtatcgtg 6180

agcatcctct ctcgtttcat cggatatcatt acccccatga acagaaattc ccccttacac 6240
 ggaggcatca agtgaccaaa caggaaaaaa ccgcccttaa catggcccg cttatcagaa 6300
 gccagacatt aacgcttctg gagaaactca acgagctgga cgcggatgaa caggcagaca 6360
 tctgtgaatc gcttcacgac cagcgtgatg agctttaccg cagctgcctc gcgcgtttcg 6420
 gtgatgacgg tgaaaacctc tgacacatgc agctcccga gacggtcaca gcttgtctgt 6480
 aagcggatgc cgggagcaga caagcccgtc agggcgcgctc agcgggtgtt ggcgggtgtc 6540
 ggggogcagc catgaccag tcacgtagcg atagcggagt gtatactggc ttaactatgc 6600
 ggcacagag cagattgtac tgagagtga ccatatgcgg tgtgaaatac cgcacagatg 6660
 cgtaaggaga aaataaccga tcaggcgctc ttccgcttcc tcgctcactg actcgctcg 6720
 ctcggtcggt cggctgcggc gagcggatc agctcactca aaggcggtaa tacggttacc 6780
 cacagaatca ggggataacg caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag 6840
 gaaccgtaaa aaggccgctg tgcgtggcgtt ttcccatagg ctccgcccc ctgacgagca 6900
 tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagaggtg gcgaaacccg acaggactat aaagatacca 6960
 ggcgtttccc cctggaagct ccctcgctgc ctctcctgtt ccgaccctgc cgcttaccgg 7020
 atacctgtcc gcctttctcc cttcgggaag cgtggcgctt tctcatagct cagcgtgtag 7080
 gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt 7140
 tcagcccgac cgctgcgctt tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca 7200
 cgacttatcg cactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg 7260
 cggtgctaca gagttcttga agtggtggcc taactacggc tacactagaa ggacagtatt 7320
 tggatatctg gctctgctga agccagttac cttcggaaaa agagttggta gctcttgatc 7380
 cggcaaacaa accaccgctg gtagcggtag tttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg 7440
 cagaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt gatcttttct acggggtctg acgctcagtg 7500
 gaacgaaaac tcacgttaag ggattttgtt catgagatta tcaaaaagga tcttcacctc 7560
 gatcctttta aattaaaaat gaagttttta atcaatctaa agtatatatg agtaaaactg 7620
 gtctgacagt taccaatgct taatcagtga ggcacctatc tcagcgatct gtctatttcg 7680
 ttcatccata gttgcctgac tcccgcgtg gtagataact acgatacggg agggcttacc 7740
 atctggcccc agtgctgcaa tgataccgcg agaccacgc tcaccggctc cagatttacc 7800
 agcaataaac cagccagccg gaaggccga gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc 7860
 ctccatccag tctattaatt gttgccggga agctagagta agtagttcgc cagttaatag 7920
 ttgcgcaac gttgttgcca ttgctgcagg catcgtggtg tcacgctcgt cgtttggtat 7980
 ggcttcattc agctccggtt cccaacgata aaggcgagtt acatgatccc ccatgttgtg 8040

caaaaaagcg gttagctcct tcggctcctcc gatcggtgtc agaagtaagt tggccgcagt 8100
 gttatcactc atgggttatgg cagcactgca taattctctt actgtcatgc catccgtaag 8160
 atgcttttct gtgactggtg agtactcaac caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg 8220
 accgagttgc tcttgcccg cgtcaacacg ggataatacc gcgcacata gcagaacttt 8280
 aaaagtgtc atcattggaa aacgttcttc ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaaccgt 8340
 gttgagatcc agttcgatgt aaccactcg tgcaccaac tgatcttcag catcttttac 8400
 tttaccagc gtttctgggt gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggaat 8460
 aagggcgaca cggaaatggt gaatactcat actcttctt tttcaatatt attgaagcat 8520
 ttatcagggg tattgtctca tgagcggata catatttgaa tgtatttaga aaaataaaca 8580
 aataggggtt ccgcgcacat tccccgaaa agtgccacct gacgtctaag aaaccattat 8640
 tatcatgaca ttaacctata aaaataggcg tatcacgagg ccctttcgtc ttcaa 8695

<210> 26
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> syntetická sonda nebo primer

<400> 26
 agtcactctt caaggcatac ccgcgtgtca ggaggg 36

<210> 27
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> syntetická sonda nebo primer

<400> 27
 agtcactctt cacagggatc cttagtgatg gtgggtgatg 39

<210> 28
 <211> 4190
 <212> DNA
 <213> vektor pMF30

<400> 28
 gcgccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca 60
 cgacaggttt ccgactgga aagcgggag tgagcgcaac gcaattaatg tgagttagct 120
 cactcattag gcaccccagg ctttacactt tatgcttccg gctcgtatgt tgtgtggaat 180
 tgtgagcgga taacaatttc acacaggaaa cagctatgac catgattacg ccaagcttgc 240
 atgcctgcag ttgattgcag atgccagatc ccgaaagaac agaggacgga gcgtaaactt 300
 gtggcattcc accagaaatt gatacagata agcttccgga gtcaccagct aaaacggaat 360
 tgcaagaaat aatatcgata actttatcac cactagaata gccggtgttg ctgacagtaa 420

tatcctgtga cccgtttgaa cctaaattat taaaaatgga aatcaattga ttagcatcgc 480
 tacccttcct agtggctata tagtggctcg aagaagaaac aactgaggat ttgtaagttg 540
 aataggcaga atccttctta atagcttgat ttcttatttg atttagttta ctgattagct 600
 cgtagtattc tgaatcggtg ttatatccac ttaaccataa agcttctcta ttggcaggat 660
 cggaaccacc attgagacct tgttcttggc cataataaat aattgggata ccatcaccga 720
 aaattataaa agccatgtca ttcttaatca aggatgtgtc tgaggtaact gatggaaatc 780
 taacttggtc atgggttttca ataaagtctt ccaacaaaga gacgtccgaa caagatgact 840
 gtaacgtgga gatcattgaa gttaactcac tggaagtcgc cgaagtatca ctgaagaatc 900
 tatatactgg atagtataat ggatagttgg taactccttt catataattc tgatatggac 960
 aagtataagt tggatctcct tgataaactt cacctaagtt ataaacacca gaagcgtcct 1020
 caaacttcgt taatgaagcg gtatctacgt gctttgcact atcaattctt aaaccatcga 1080
 ttgaatagtt ttgaacaaaa tctgacccc aagtttgaaa tactcctata acttcattat 1140
 cctcggtact taaatctgga agggagactt cagtatcacc ttccaacaa tcttcaacat 1200
 tggtttgatc attataattt gtaatcaaac aataatcgtg gaagtaagat tgttgattga 1260
 atggagtga actagaataa tctacgcttg aaccatctcc gttccaagca taatggttgt 1320
 aaacaacgct gaccatcaat aacatgcttc tggaatgcaa ttcgctagct aattgtttca 1380
 attcatcagc ggtacaaaa ttagtggttca attcatcaat atttttcctc caataaccat 1440
 ggtaagcata accataagca gtattgtcag gaatttgctc aacaactggg gagatccaga 1500
 tcgcagtga acccatacct tgaatataat ccaacttgct gataatccct ttataagatc 1560
 caccacagta cttgcgatca ctactaaac agtcagctgt ggtcgagcca tcagatctgg 1620
 caaacctatc agtaacgatt tgataaatcg attgggtctt ccattttatca gctgacgagc 1680
 taacatccct cttgtcaaaa ataatcgggt gagcagatac caatcttgag aatgctaaaa 1740
 ttgctgcaac aactttactt gtaaactcct cagttgaaaa tctcattgaa ttcactggcc 1800
 gtcgttttac aacgtcgtga ctgggaaaac cctggcgta cccaacttaa tcgecttgca 1860
 gcacatcccc ctttcgccag ctggcgtaat agcgaagagg ccgcaccca tcgcccttcc 1920
 caacagttgc gcagcctgaa tggcgaatgg cgcctgatgc ggtattttct ccttaacgcat 1980
 ctgtgcggta tttcacaccg catatgggtc actctcagta caatctgctc tgatgccgca 2040
 tagttaagcc agccccgaca ccgccaaca ccgctgacg cgcctgacg ggcttgtctg 2100
 ctcccggcat ccgcttacag acaagctgtg accgtctccg ggagctgcat gtgtcagagg 2160
 ttttcaccgt catcaccgaa acgcgcgaga cgaaagggcc tcgtgatacg cctattttta 2220

taggttaatg tcatgataat aatggtttct tagacgtcag gtggcacttt tcggggaaat 2280
 gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg 2340
 agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa 2400
 catttcctg tgcccttat tccctttttt gcggcatttt gccttcctgt ttttgctcac 2460
 ccagaaacgc tgggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac 2520
 atcgaactgg atctcaacag cggtaagatc cttgagagtt ttcgccccga agaacgtttt 2580
 ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcgg tattatcccg tattgacgcc 2640
 gggcaagagc aactcggctg ccgcatacac tattctcaga atgacttggg tgagtactca 2700
 ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg cagtgcgtcc 2760
 ataaccatga gtgataacac tgcggccaac ttactttctga caacgatcgg aggaccgaag 2820
 gagctaaccg cttttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctgccttga tcgttgggaa 2880
 ccggagctga atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc ttagcaatg 2940
 gcaacaacgt tgcgcaaact attaactggc gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa 3000
 ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgtc gcccttccg 3060
 gctggctggg ttattgctga taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg cggtatcatt 3120
 gcagcactgg gccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac gadggggagt 3180
 caggcaacta tggatgaacg aaatagacag atcgtgaga taggtgcctc actgattaag 3240
 cattggtaac tgcagacca agtttactca tatatacttt agattgattt aaaacttcat 3300
 ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac caaaatccct 3360
 taacgtgagt ttctgttcca ctgagcgtca gacccgtag aaaagatcaa aggatcttct 3420
 tgagatcctt tttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaac accgctacca 3480
 gcggtggttt gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggc aactggcttc 3540
 agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc 3600
 aagaactctg tagcaccgcc tacatactc gctctgctaa tctgttacc agtggctgct 3660
 gccagtggcg ataagtcgtg tottaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag 3720
 gcgcagcggc cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttga gcgaacgacc 3780
 tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgt tccgaaggg 3840
 agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc agggctcgaa caggagagcg cacgaggag 3900
 ctccagggg gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt 3960
 gagcgtcgat ttttgtgatg ctgctcaggg gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac 4020
 gcggcctttt tacggttcct ggccttttgc tggccttttg ctacatggt ctttctgcy 4080

ttatccccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga taccgctcgc 4140

cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcgggaaga 4190

<210> 29

<211> 38

<212> DNA

<213> syntetická sonda nebo primer

<400> 29

agtcactctt cacctcttgt caaaaataat cggttgag 38

<210> 30

<211> 52

<212> DNA

<213> syntetická sonda nebo primer

<400> 30

tgcttctctac cactagcagc actaggacat accgcgctgt caggaggggc ag 52

<210> 31

<211> 57

<212> DNA

<213> syntetická sonda nebo primer

<400> 31

tagtactagt attagtaggc ttgcgatgga attcactggc cgtcgtttta caacgtc 57

<210> 32

<211> 7927

<212> DNA

<213> vektor pFMPT-CL-E2-H6

<400> 32

ggtaccctgc tcaatctccg gaatggtgat ctgatcgttc ctgaaaacct cgacattggc 60

tcctctctga cacaggtact cgtacagggt ccaggtaaac ggtcgtagt tgtcgatcat 120

gacaacgttc ttagaagcgg ccggcatttt gaagggtgact aatagcctaa gaaaatattt 180

aatttaattt tcattaaatt ttctatact cgctatttca gcttttcatc tcatcacttc 240

ataaacgata taaaccagaa aaagaactat tttcaaacac gcttctcaaa agcggtatgt 300

ccttcacagt ctcttagaa tctggcaagt ccgcgagggg gatccttagt gatggtggtg 360

atggtgtctg ccctcgatca cctgccactc tgtttagac agcagcagcg agctaagctc 420

tgatctatcc ctgtctcca agtcacaacg ctctctcga gtccaattgc atgcggcttc 480

gaacctgtgc tccacgcccc ccacgtacat cctaaccttg aagatggtga agttgacagt 540

gcaggggtag tgccagagcc tatatgggta atgaaccata cacctagggt tcagccaggg 600

cccagaaccg catctggcgt aagtggcctc ggggtgcttc cgaaaacagt cagtggggca 660

ggtcaagggtg ttgttgccgg cccccccgat gttgcacggg gggccccccac acgtcttggt 720
 gaacccagtg ccattcatcc atgtacagcc gaaccagttg cctcgcggcg gccgcgtgtt 780
 gttgagaatc agcacatccg agtcgttcgc cccccagtta tacgtgggga caccaaaccg 840
 atcgggtcgtc cccaccacaa cagggctcgg ggtgaagcaa tacactggac cgcacacctg 900
 agacgcgggt acaataccac acggtcgagg cgcgtagtgc cagcagtagg gcctctggtc 960
 cgagctgtta ggctcagtgt aagtgagggg accccacccc tgagcgaact tgcgatgga 1020
 gcgacagctg gccaaagcgt ctgggcatcc agacgagttg aatttgtgtt tgtagaatag 1080
 tgcggcaaag aacctgttt ggaggagtc gttgcagttc agggcagtc tggtgatgtg 1140
 ccaactgccc ttggtgttta cgagctggat tttctgagcc gaccggggc taaagaggga 1200
 cacaaggccc ctggtatcgg aggtgctgc cctcctgac acgcgggtat gtcctagtgc 1260
 tgctagtggg aggaagcata gtactagtat tagtaggctg cgcataaatt cccgatgaag 1320
 cagagagcgc aggaggcggg atttatagtg ccattcccct ctctgagaga cccgatggg 1380
 agtcgagtg atcggagaca gcttgatgta gactccgtgc ctgccggctc ctcttattgg 1440
 cggacaccag tgagacacc cggaacttgc tgttttctg caaaatccgg ggtgaccagt 1500
 gggagcctat ttgcacacac gagcgggaca cccactctg gtgaagagt ccaaagtc 1560
 tctttttccc gttgcggggc agccgattgc atgttttagg aaaatattac ctttctaca 1620
 cctgtcaga ttaccctcc acacatatat attccgtcac ctccaggac tattattcgt 1680
 cgttgcccg ccagcggaag atatccagaa gctgttttcc gagagactcg gttggcgct 1740
 ggtatatttg atggatgtcg cgtgcctca cgtccggta cccaggaacg cgggtgggac 1800
 tcgggcccat cgaagactgt gctccagact gctcgcccag caggtgttcc ttgatcgccg 1860
 cctctaaatt gtccgcgcgt ccgcggtaac atttttccag ctccggagttt gcgttttagat 1920
 acagtttctg cgatgccaaa ggagcctgca gattataacc tcggatgctg tcattcagcg 1980
 cttttaattt gacctccaga tagttgctgt atttctgttc ccattggtg ctgcgcagct 2040
 tcgtataact cgagttattg ttgcgctctg cctcggcgta ctggctcatg atctggatct 2100
 tgtccgtgtc gcttttcttc gagtgttct cgcaaagat gtgcacggcc tgcagtgtcc 2160
 aatcggagtc gagctggcgc cgaaactggc ggatctgagc ctccacactg cctgtttct 2220
 ctatccacgg cggaaccgcc tctgcggtt tcagaatgtt gttcaagtgg tactctgtgc 2280
 ggtcaatgaa ggcgttattg ccggtgaaat ctttggaag cggttttcct cggggaagat 2340
 tacgaaatc cccgcgtcgt tgcgttctt ggatctcgag gagatcgttc tccgcgtcga 2400
 ggagatcgtt ctccgcgtcg acaccattcc ttgcggcggc ggtgctcaac ggcctcaacc 2460
 tactactggg ctgcttccta atgcaggagt cgcataaggg agagcgtcga caaaccgcg 2520

tttgagaact tgctcaagct tctggtaaac gttgtagtac tctgaaacaa ggccctagca 2580
 ctctgatctg tttctcttgg gtagcgggtga gtggtttatt ggagttcact ggtttcagca 2640
 catctgtcat ctagacaata ttgttactaa atttttttga actacaattg ttcgtaattc 2700
 atctattatt atacatcctc gtcagcaatt tctggcagac ggagtttact aacgtcttga 2760
 gtatgaggcc gagaatccag ctctgtggcc atactcagtc ttgacagcct gctgatgtgg 2820
 ctgcgttcaa cgcaataagc gtgtcctcog actccgagtt gtgctcgta tcgtcgttct 2880
 catcctcgga aaaatcacac gaaagaacat actcaccagt aggccttctg gtccctgggg 2940
 cacggctgtt totgacgtat tccggcgttg ataatagctc gaaagtgaac gccgagtcgc 3000
 gggagtcgac cgatgccctt gagagccttc aaccagtcga gctccttccg gtgggcgcgg 3060
 ggcattgacta tcgtcgccgc acttatgact gtcttcttta tcatgcaact cgtaggacag 3120
 gtgcggcag cgctctgggt cattttcggc gaggaccgct ttcgctggag cgcgacgatg 3180
 atcggcctgt cgcttgcgtt attcggaaac ttgcacgccc tcgtcaagc cttcgtcact 3240
 ggtcccgcca ccaaacgttt cggcgagaag caggccatta tcgcggcat ggcgccgac 3300
 gcgctgggt acgtcttget ggcgttcgcg acgcgaggct ggatggcctt cccattatg 3360
 attcttctcg cttccggcgg catcgggatg cccgcgttg caggccatgct gtccaggcag 3420
 gtagatgacg accatcaggg acagcttcaa ggatcgtcgc cggctcttac cagcctaact 3480
 tcgatcactg gaccgctgat cgtcacggcg atttatgccg cctcggcgag cacatggaac 3540
 gggttggcat ggattgtagg gcgcgcctta taccttgtct gctccccgc gttgcgtcgc 3600
 ggtgcatgga gccgggccac ctgcacctga atggaagccg gcggcacctc gctaacggat 3660
 tcaccactcc aagaattgga gccaatcaat tcttgccgag aactgtgaat gcgcaaacca 3720
 acccttgcca gaacatatcc atcgcgtccg ccatctccag cagccgcacg cggcgcatcg 3780
 gggggggggg gggggggggg gggcaacaa ttcattcattt tttttttatt ctttttttg 3840
 atttcggttt ctttgaaatt tttttgatc ggtaatctcc gaacagaagg aagaacgaag 3900
 gaaggagcac agacttagat tggatatat acgcataatgt agtggtgaag aaacatgaaa 3960
 ttgccagta ttcttaacc aactgcacag aacaaaaacc tgcaggaaac gaagataaat 4020
 catgtcgaaa gctacatata aggaacgtgc tgctactcat cctagtcctg ttgctgcaa 4080
 gctatttaat atcatgcacg aaaagcaaac aaacttgtgt gcttcattgg atgttcgtac 4140
 caccaaggaa ttactggagt tagttgaagc attaggtccc aaaatttggt tactaaaaac 4200
 acatgtggat atcttgactg atttttccat ggagggcaca gttaagccgc taaaggcatt 4260
 atccgccaag tacaattttt tactcttcga agacagaaaa ttgctgaca ttggtaatc 4320

agtcaaattg cagtactctg cgggtgtata cagaatagca gaatgggcag acattacgaa 4380
 tgcacacggg gtggtgggccc caggatttgt tagcggtttg aagcaggcgg cagaagaagt 4440
 aacaaaggaa cctagaggcc ttttgatgtt agcagaattg tcatgcaagg gctccctatc 4500
 tactggagaa tatactaagg gtactgttga cattgccaag agcgacaaag attttgttat 4560
 cggcttttatt gctcaaagag acatgggtgg aagagatgaa ggttacgatt ggttgattat 4620
 gacaccgggt gtgggttttag atgacaaggg agacgcattg ggtcaacagt atagaaccgt 4680
 ggatgatgtg gtctctacag gatctgacat tattattgtt ggaagaggac tatttgcaaa 4740
 gggaagggat gctaaggtag aggggtgaacg ttacagaaaa gcaggctggg aagcatatct 4800
 gagaagatgc ggccagcaaa actaaaaaac tgtattataa gtaaattgcat gtatactaaa 4860
 ctcacaaatt agagcttcaa ttttaattata tcagttatta cccgggaatc tcggtcgtaa 4920
 tgatttttat aatgaogaaa aaaaaaaaaat tggaaagaaa agcccccccc ccccccccc 4980
 ccccccccc cccccgcag cgttgggtcc tggccaaggg tgcgcattgat cgtgctcctg 5040
 tcgttgagga cccggctagg ctggcggggg tgccttactg gttagcagaa tgaatcaccg 5100
 atacgcgagc gaacgtgaag cgactgctgc tgcaaacgt ctgcgacctg agcaacaaca 5160
 tgaatggtct tcggtttccg tgtttcgtaa agtctggaaa cgcggaagtc agcgccctgc 5220
 accattatgt tccggatctg catcgcagga tgctgctggc taccctgtgg aacacctaca 5280
 tctgtattaa cgaagcctg gcattgacct tgagtattt ttctctggtc ccgccgcatc 5340
 cataccgcca gttgtttacc ctcacaacgt tccagtaacc gggcatgttc atcatcagta 5400
 acccgatcgc tgagcatcct ctctcgtttc atcggtatca ttacccccat gaacagaaat 5460
 tcccccttac acggaggcat caagtgaaca aacaggaaaa aaccgccctt aacatggccc 5520
 gctttatcag aagccagaca ttaacgcttc tggagaaaact caacgagctg gacgcggatg 5580
 aacaggcaga catctgtgaa tcgcttcacg accacgctga tgagctttac cgcagctgcc 5640
 tcgcgcgttt cgggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacggtca 5700
 cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 5760
 ttggcgggtg tcggggcgca gccatgacct agtcacgtag cgatagcgga gtgtatactg 5820
 gcttaactat gccgcatcag agcagattgt actgagagtg caccatatgc ggtgtgaaat 5880
 accgcacaga tgcgtaagga gaaaataccg catcaggcgc tcttcgctt cctcgctcac 5940
 tgactcgctg cgctcggtcg ttcggetgcg gcgagcggta tcagctcact caaaggcggg 6000
 aatacggtta tccacagaat caggggataa cgcaggaaag aacatgtgag caaaaggcca 6060
 gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata ggctccgccc 6120
 ccctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact 6180

ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg ttccgaccct 6240
 gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga agcgtggcgc tttctcatag 6300
 ctcacgctgt aggtatctca gttcgggtgta ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca 6360
 cgaaccccc gttcagcccg accgctgcgc cttatccggg aactatcgtc ttgagtccaa 6420
 cccggtaaga cagcacttat cggcactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc 6480
 gaggtatgta ggcggtgcta cagagttctt gaagtgggtg cctaactacg gctacactag 6540
 aaggacagta tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa aaagagttgg 6600
 tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttg tttgcaagca 6660
 gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacgggggc 6720
 tgacgctcag tggaacgaaa actcacgtta agggattttg gtcacgagat tatcaaaaag 6780
 gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata 6840
 tgagtaaaact tggctcgaca gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat 6900
 ctgtctatct cgttcatcca tagttgctg actccccgtc gtgtagataa ctacgatacg 6960
 ggagggctta ccatctggcc ccagtgcgtc aatgataccg cgagaccac gctcaccggc 7020
 tccagattta tcagcaataa accagccagc cggaagggcc gagcgagaa gtggctcctg 7080
 aactttatcc gcctccatcc agtctattaa ttgttgccgg gaagctagag taagtagttc 7140
 gccagttaat agtttgcgca acgttggtgc cattgctgca ggcacgtgg tgtcacgctc 7200
 gtcgtttggt atggcttcat tcagctccgg tccccacga tcaaggcgag ttacatgatc 7260
 ccccatggtg tgcaaaaaag cggtagctc cttcggctct ccgatcgttg tcagaagtaa 7320
 gttggccgca gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg cataattctc ttactgtcat 7380
 gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca accaagtcac tctgagaata 7440
 gtgtatgcgg cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtcaaca cgggataata ccgcgccaca 7500
 tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag 7560
 gatcttaccg ctgttgagat ccagttcgat gtaaccact cgtgcacca actgatcttc 7620
 agcatctttt actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgcgc 7680
 aaaaaagga ataagggcga caggaaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata 7740
 ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcgga tacatatttg aatgtattta 7800
 gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga aaagtgcac ctgacgtcta 7860
 agaaaccatt attatcatga cattaaccta taaaaatagg cgtatcacga ggccctttcg 7920
 tcttcaa 7927

<210> 33
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> syntetická sonda nebo primer

<400> 33
 taaggatccc cgggtaccga gctc

24

<210> 34
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> syntetická sonda nebo primer

<400> 34
 ccagttcatc atcatatccc aagcc

25

<210> 35
 <211> 4234
 <212> DNA
 <213> vektor pUC18-FMD-CL-E1

<220>
 <221> alternativní znak
 <222> (988)..(989)
 <223> N je jakýkoliv nukleotid

<220>
 <221> alternativní znak
 <222> (1167)..(1168)
 <223> N je jakýkoliv nukleotid

<400> 35
 gcgccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gōgttgccg attcattaat gcagctggca 60
 cgacaggttt cccgactgga aagcgggag tgagcgcaac gcaattaatg tgagttagct 120
 cactcattag gcacccacagg ctttacactt tatgcttcg gctcgatgt tgtgtggaat 180
 tgtgagcgga taacaatttc acacaggaaa cagctatgac catgattacg aattcgagct 240
 cggtagccgg ggatccttac cagttcatca tcatatccca agccatcagg tgacctgtta 300
 tgtggccggg atagattgag caattgcagt cctgcaccgt ctcatgccgg cgaggcgaga 360
 tgggtgaacag ctgggagacg aggaagacag atccgcagag atccccacg tacatagcgg 420
 aacagaaagc agccgcccc aagagcaaat cgacgtggcg tcgtattgtc gtagtgggga 480
 cgctggcggt cctagctgag agcgtggggg tgagcgctac ccagcagcgg gaagagttgt 540
 tctccgaac gcagggcacg caacggggg tgtgcatgat catgtccgct gcctcataca 600
 caatgcttga gttggagcag tcgttcgtga catggtacat cccggacacg ttgcgcacct 660
 catatcctag tgctgctagt ggtaggaagc atagtactag tattagtagg cttcgcatga 720

attccccgatg aaggcagaga gcgcaaggag gcggtattta tagtgccatt cccctctctg 780
 agagaccccg atggtagtcg agtggtatcg gagacagctt gatgtagact ccgtgcctgc 840
 cggtcctctt attggcggac accagtgaga caccocggaa ctgctgttt ttctgcaaaa 900
 tcoggggtga ccagtgggag cctatttgca cacacgagcg ggacacocca ctctggtgaa 960
 gagtgcacaa gtcattcttt ttcccgtmnc ggggcagccg attgcatgtt ttaggaaaat 1020
 attacctttg ctacaccctg tcagatttac cctccacaca tatatatcc gtcacctcca 1080
 gggactattc ttggctcgtt gcgccgccgc ggaagatata cagaagctgt gttttccgag 1140
 agactcgggtt ggccgctggt atatttnnag gatgtcgcgc tgcctcacgt ccgggtaccc 1200
 aggaacgcgg tgggatctcg ggcccatcga agactgtgct ccagactgct cggccagcag 1260
 gtgtttcttg attgccgcct ctaaatagtc cgcgcacgc cggtaacatt ttccagctc 1320
 ggagtttgcg ttagataca ttctgcgat gccaaaggag cctgcagatt ataacctcgg 1380
 atgctgtcat tcagcgttt taatttgacc tcagatagt tgcgtatatt ctgttccatt 1440
 ggctgctgga cgttcgtata actcgagtta ttgttgcgct ctgcctcggc gtactggctc 1500
 atgactgact gcggtcgtt ctcgagtgtt ctgcacacag gacgcctgca ggtcatcgag 1560
 tcgagctggc gccgaaactg gcggatctga cctccacact gcctgtatc tctatccacc 1620
 gggaaaccgc tcctgccgtt ccagaatgtt gttcaagtgg tagctctgtg cggtaaatga 1680
 aggcgttatt gccggtgaaa tctttgggaa gcggtttatc ctcggggaa attacgaaat 1740
 tccgcgcgt cgttcgcgtt cctggatctc gaggaagatc gttctccgcg tcgaggagat 1800
 cgttctccgc gtcgacctgc aggcattgcaa gcttggcact ggccgtcgtt ttacaacgtc 1860
 gtgactggga aaacctcggc gttacccaac ttaatgcct tgcagcacat cccctttctg 1920
 ccagctggcg taatagcgaa gaggccgcga ccgatcgccc ttcccaacag ttgcgcagcc 1980
 tgaatggcga atggcgctg atgcggtatt ttctccttac gcatctgtgc ggtattttac 2040
 accgcatatg gtgcactctc agtacaatct gctctgatgc cgcatagtta agccagcccc 2100
 gacaccgcgc aacaccgcgt gacgcgccct gacgggcttg tctgctcccg gcatccgctt 2160
 acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct gcatgtgtca gaggttttca ccgtcatcac 2220
 cgaaaocgcg gagacgaaag ggcctcgtga tacgcctatt ttataggtt aatgtcatga 2280
 taataatggt ttcttagacg tcaggtggca cttttcgggg aaatgtgcgc ggaacccta 2340
 tttgtttatt ttctaaata cattcaaata tgtatccgct catgagacaa taacctgat 2400
 aaatgcttca ataatttga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc cgtgtcgcgc 2460
 ttattccctt ttttgccga ttttgcttc ctgtttttgc tcaccagaa acgtggtga 2520
 aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cagcagtggt ttacatcgaa ctggatctca 2580

acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg ttttccaatg atgagcactt 2640
 ttaaagttct gctatgtggc gcggtattat cccgtattga cgccgggcaa gagcaactcg 2700
 gtcgccgcat aactattct cagaatgact tgggtgagta ctaccagtc acagaaaagc 2760
 atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc atgagtata 2820
 aactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta accgcttttt 2880
 tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg ggaaccggag ctgaatgaag 2940
 ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga tgctgtagc aatggcaaca acgttgcgca 3000
 aactattaac tggcgaacta cttactctag cttcccgga acaattaata gactggatgg 3060
 aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gctcgccct tccggctggc tggtttattg 3120
 ctgataaatc tggagccggt gacgtgggt ctgcggtat cattgcagca ctggggccag 3180
 atggtaagcc ctcccgatc gtagttatct acacgacggg gagtcaggca actatggatg 3240
 aacgaaatag acagatcgct gagataggtg cctcactgat taagcattgg taactgtcag 3300
 accaagttta ctcatatata ctttagattg atttaaaact tcatttttaa tttaaaagga 3360
 tctaggtgaa gatccttttt gataatctca tgacaaaat cccttaacgt gagttttcgt 3420
 tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat cttttttttc 3480
 tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccacgct accagcggtg gtttgtttgc 3540
 cggatcaaga gctaccaact ctttttcga aggtaactgg cttcagcaga gcgcagatac 3600
 caaatactgt ccttctagt tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac 3660
 cgcctacata cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt 3720
 cgtgtcttac cgggttgac tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag cggtcgggct 3780
 gaacgggggg ttctgcaca cagccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat 3840
 acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgcttccga agggagaaag gcggacaggt 3900
 atccggtaag cggcagggc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca ggggaaacg 3960
 cctggatatc ttatagtcct gtcgggttc gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt 4020
 gatgctctc agggggcgag agcctatgga aaaacgcag caacgcggcc tttttacggt 4080
 tctggcctt ttgtggcct tttgtcaca tgttctttcc tgogttatcc cctgattctg 4140
 tggataaccg tattaccgcc tttgagttag ctgataccgc tcgccgcagc cgaacgaccg 4200
 agcgcagcga gtcagtgagc gaggaagcgg aaga 4234

<210> 36
 <211> 7429
 <212> DNA

<213> vektor pFPMT-CL-E1

<400> 36

```

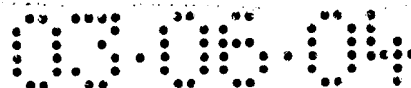
ggtagccctgc tcaatctccg gaatggtgat ctgatcggtc ctgaaaacct cgacattggc      60
tccctcctga cacaggtact cgtacaggtt ccaggtaaac gagtcgtagt tgtcgatcat      120
gacaacgttc ttagaagcgg ccggcatttt gaaggtagact aatagcctaa gaaaatattt      180
aatttaattt tcattaaatt ttctataact cgctatttca gcttttcatc tcatcaacttc      240
ataaacgata taaaccagaa aaagaactat tttcaaacac gctttctcaa agcggtatgt      300
ccttccacgt ctcttagaa tctggcaagt ccgcgagggg gatccttacc agttcatcat      360
catatcccaa gccatacggg gacctgttat gtggccggga tagattgagc aattgcagtc      420
ctgcacgcgc tcatgccggc gaggcgagat ggtgaacagc tgggagacga ggaagacaga      480
tccgcagaga tccccacgt acatagcgga acagaaagca gccgccccaa cgagcaaate      540
gacgtggcgt cgtattgtcg tagtggggac gctggcggtc ctagctgcga gcgtgggggt      600
gagcgetacc cagcagcggg aagagttgtt ctccgaacg cagggcacgc acccggggggt      660
gtgcatgac atgtccgctg cctcatacac aatgcttgag ttggagcagt cgttcgtgac      720
atggtacatc ccggacacgt tgcgcacctc atatcctagt gctgctagt gtaggaagca      780
tagtactagt attagtaggc ttgcgatgaa ttccgatga agcagagagc gcaggaggcg      840
gtatttatag tgccattccc ctctctgaga gaccgggatg gtagtcgagt gtatcggaga      900
cagcttgatg tagactccgt gcctgccggc tcctcttatt ggcgacacc agtgagacac      960
cccgaactt gctgtttttc tgcaaaatcc ggggtgacca gtgggagcct atttgacac      1020
acgagcggga cccccactc tggtaagag tgccaaagtc attctttttc ccgttgccgg      1080
gcagccgatt gcatgtttta ggaaaatatt acctttgcta caccctgtca gatttaccc      1140
ccacacatat atattccgtc acctccaggg actattattc gtcgttgccg cgcagcggga      1200
agatatccag aagctgtttt ccgagagact cggttggcgc ctggtatatt tgatggatgt      1260
cgcgctgcct cagctcccg taccagga cgcggtggga tctcgggcc atcgaagact      1320
gtgctccaga ctgctcgccc agcaggtgtt tcttgatgc cgcctctaaa ttgtccgcgc      1380
atgcgcggtg acatttttcc agctcggagt ttgcgttttag atacagtttc tgcgatgcca      1440
aaggagcctg cagattataa cctcgatgc tgcattcag cgcttttaatt ttgacctcca      1500
gatagttgct gtatttctgt tccattggc tgctgcgcag cttcgtataa ctcgagttat      1560
tgttgccgct tgctcggcg tactggctca tgatctggat cttgtccgtg tcgcttttct      1620
tcgagtgttt ctgcaaacg atgtgcacgg cctgcagtgt ccaatcggag tcgagctggc      1680
gccgaaactg gcgatctga gcctccacac tgccctgttt ctctatccac ggcggaaccg      1740

```

cctcctgccg tttcagaatg ttgttcaagt ggtactctgt gcggtcaatg aaggcgttat 1800
tgccggtgaa atctttggga agcggttttc ctcggggaag attacgaaat tccccgcgtc 1860
gttgcgcttc ctggatctcg aggagatcgt tctccgcgtc gaggagatcg ttctccgcgt 1920
cgacaccatt ccttgccggc gcggtgctca acggcctcaa cctactactg ggctgcttcc 1980
taatgcagga gtcgcataag ggagagcgtc gacaaacccg cgtttgagaa cttgctcaag 2040
cttctggtaa acgttgtagt actctgaaac aaggccctag cactctgac tgtttctctt 2100
gggtagcggg gagtggttta ttggagttca ctggtttcag cacatctgtc atctagacaa 2160
tattgttact aaatTTTTTT gaactacaat tgttcgtaat tcatctatta ttatacatcc 2220
tcgtcagcaa tttctggcag acggagttaa ctaacgtctt gagtatgagg ccgagaatcc 2280
agctctgtgg ccatactcag tcttgacagc ctgctgatgt ggctgcgttc aacgcaataa 2340
gcgtgtcctc cgactccgag ttgtgctcgt tatcgtcgtt ctcatcctcg gaaaaatcac 2400
acgaaagaac atactcacca gtaggctttc tggccccggg ggcacggctg tttctgacgt 2460
attccggcgt tgataatagc tcgaaagtga acgcgcagtc gcgggagtcg accgatgccc 2520
ttgagagcct tcaaccagc cagctccttc cggtgggcgc ggggcatgac tatcgtcgc 2580
gcacttatga ctgtcttctt tatcatgcaa ctcgtaggac aggtgccggc agcgtctctg 2640
gtcattttcg gcgaggaccg ctttcgctgg agcgcgacga tgatcgccct gtcgcttgcg 2700
gtattcgga tcttgacgc cctcgtcaa gccttcgtca ctggtccgc caccaaacgt 2760
ttcggcgaga agcaggccat tatcgccggc atggcgcccg acgcgtggg ctacgtcttg 2820
ctggcgctcg cgacgcgagg ctggatggcc tccccatta tgattcttct cgttccggc 2880
ggcatcgga tgcccgctt gcaggccatg ctgtccaggc aggtagatga cgaccatcag 2940
ggacagcttc aaggatcgt cgcgctctt accagcctaa cttcgatcac tggaccgctg 3000
atcgtcacgg cgatttatgc cgcctcggcg agcacatgga acgggttggc atggattgta 3060
ggcgccgcc tataccttgt ctgcctcccc gcgttgctc gcggtgcatg gagccgggcc 3120
acctcgacct gaatggaagc cggcggcacc tcgctaacgg attcaccact ccaagaattg 3180
gagccaatca attcttgcg agaactgtga atgcgcaaac caacccttg cagaacatat 3240
ccatcgctc cgcatctcc agcagccgca cgcggcgcat cggggggggg gggggggggg 3300
gggggcaaac aattcatcat ttttttttta ttctttttt tgatttcggt ttctttgaaa 3360
tttttttgat tcggtaatct ccgaacagaa ggaagaacga aggaaggagc acagacttag 3420
attggtatat atacgcatat gtagtggtga agaaacatga aattgcccag tattcttaac 3480
ccaactgcac agaacaaaaa cctgcaggaa acgaagataa atcatgtcga aagctacata 3540
taaggaaagt gctgtactc atcctagtcc tgttgctgcc aagctattta atatcatgca 3600

cgaaaagcaa acaaacttgt gtgcttcatt ggatgttcgt accaccaagg aattactgga 3660
 gttagttgaa gcattagggtc ccaaaatttg ttactaaaa acacatgtgg atatcttgac 3720
 tgatttttcc atggagggca cagttaagcc gctaaaggca ttatccgccca agtacaatth 3780
 ttactcttcc gaagacagaa aatttgctga cattggtaat acagtcaaht tgagttactc 3840
 tgcgggtgta tacagaatag cagaatgggc agacattacg aatgcacacg gtgtgggtggg 3900
 cccaggtatt gttagcgggt tgaagcaggc ggcagaagaa gtaacaaagg aacctagagg 3960
 ccttttgatg ttagcagaat tgtcatgcaa gggctcccta tctactggag aatatactaa 4020
 gggttactgtt gacattgcga agagcgacaa agattttgtt atcggtttta ttgctcaaag 4080
 agacatgggt ggaagagatg aaggttacga ttggttgatt atgacacccg gtgtgggttt 4140
 agatgacaag ggagacgcat tgggtcaaca gtatagaacc gtggatgatg tgggtctctac 4200
 aggatctgac attattattg ttggaagagg actatttgca aagggaaggg atgctaagggt 4260
 agaggggtgaa cgttacagaa aagcaggctg ggaagcatat ttgagaagat gcggccagca 4320
 aaactaaaaa actgtattat aagtaahtg atgtatacta aactcacaaa ttagagcttc 4380
 aatttaatta tatcagttat taccgggaa tctcggtcgt aatgattttt atahtgacga 4440
 aaaaaaaaa attggaaaga aaagcccccc ccccccccc ccccccccc cccccccgc 4500
 agcgttgggt cctggccacg ggtgcgcag atcgtgtcc tgtcgttgag gacccggcta 4560
 ggctggcggg gttgccttac tggttagcag aatgaatcac cgatacgca gcaaacgtga 4620
 agcgactgct gctgcaaaac gtctgcgacc tgagcaacaa catgaatgggt cttcggtttc 4680
 cgtgtttcgt aaagtctgga aacgcggaag tcagcgccct gcaccattat gttccggatc 4740
 tgcacgcgag gatgctgctg gctaccctgt ggaacaccta catctgtatt aacgaagcgc 4800
 tggcattgac cctgagtgat ttttctctgg tcccgccgca tccataccgc cagttgttta 4860
 cctcacaac gttccagtaa ccgggcatgt tcatcatcag taaccggtat cgtgagcatc 4920
 ctctctcgtt tcatcggtat cattaccccc atgaacagaa attccccctt acacggaggc 4980
 atcaagtgac caaacaggaa aaaaccgccc ttaacatggc ccgctttatc agaagccaga 5040
 cattaaogct tctggagaaa ctcaacgagc tggacgcgga tgaacaggca gacatctgtg 5100
 aatcgcttca cgaccacgct gatgagcttt accgcagctg cctcgcgctg ttcggtgatg 5160
 acggtgaaaa cctctgacac atgcagctcc cggagacggt cacagcttgt ctgtaagcgg 5220
 atgcggggag cagacaagcc cgtcagggcg cgtcagcggg tgttgggggg tgtcggggcg 5280
 cagccatgac ccagtcacgt agcgatagcg gagtgtatac tggcttaact atgcggcatc 5340
 agagcagatt gtactgagag tgcaccatat gcggtgtgaa ataccgcaca gatgcgtaag 5400

gagaaaatac cgcatacaggc gctcttccgc ttctctcgctc actgactcgc tgcgctcggt 5460
 cgttcgggtg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggg tatccacaga 5520
 atcaggggat aacgcaggaa agaacaatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg 5580
 taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc cccctgacg agcatcacia 5640
 aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcggtt 5700
 tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta ccggatacct 5760
 gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct 5820
 cagttcgggtg taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc 5880
 cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aacccggtaa gacacgactt 5940
 atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcgggtgc 6000
 tacagagttc ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact agaaggacag tatttggtat 6060
 ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa 6120
 acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa 6180
 aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacggg tctgacgctc agtggaaacga 6240
 aaactcacgt taagggatth ttggtcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct 6300
 tttaaattaa aaatgaagtt ttaaataaat cttaaagtata tatgagtaaa cttggtctga 6360
 cagttaccaa tgcttaatac gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttcgttcac 6420
 catagttgcc tgactccccg tctgttagat aactacgata cgggagggct taccatctgg 6480
 cccagtgct gcaatgatac cgcgagaccc acgctcaccc gctccagatt tatcagcaat 6540
 aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgcag aagtgtcct gcaactttat ccgcctccat 6600
 ccagtctatt aattgttgcc gggaagctag agtaagtagt tgcaggtta atagtttgcg 6660
 caacgttggt gccattgctg caggcatcgt ggtgtcacgc tctcgtttg gtatggcttc 6720
 attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa 6780
 agcgttagc tccttcggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgttatc 6840
 actcatggtt atggcagcac tgcataatc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt 6900
 ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag 6960
 ttgtctttgc cggcgctcaa caggggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt 7020
 gctcatcatt ggaaaacgtt cttcggggcg aaaactctca aggatcttac cgctgttgag 7080
 atccagttcg atgtaaccca ctctgcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac 7140
 cagcgtttct ggggtgagcaa aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc 7200
 gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt cttttttcaa tattattgaa gcatttatca 7260



gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg 7320
 gggtccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc acctgacgtc taagaaacca ttattatcat 7380
 gacattaacc tataaaaaata ggcgatcac gaggcccttt cgtottcaa 7429

<210> 37
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> syntetická sonda nebo primer

<400> 37
 catcacaat atgaggtgcg caacgtgtcc gggatgtac 39

<210> 38
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> syntetická sonda nebo primer

<400> 38
 gtgatggtgg tgtcctagtg ctgctagtgg taggaagcat ag 42

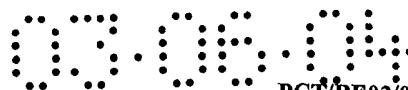
<210> 39
 <211> 4273
 <212> DNA
 <213> vektor pUC18-FMD-CL-E1-H-K6

<220>
 <221> alternativní znak
 <222> (1027)..(1028)
 <223> N je jakýkoliv nukleotid

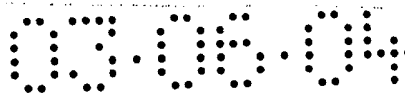
<220>
 <221> alternativní znak
 <222> (1206)..(1207)
 <223> N je jakýkoliv nukleotid

<400> 39
 gcgccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggcgc attcattaat gcagctggca 60
 cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaatg tgagttagct 120
 cactcattag gcaccccagg ctttacactt tatgcttcgc gctcgtatgt tgtgtggaat 180
 tgtgagcgga taacaatttc acacaggaaa cagctatgac catgattacg aattcgagct 240
 cggtagccgg ggatccttaa tggatgatgt ggtggtgcca gttcatcatc atatcccaag 300
 ccatacgggtg acctgttatg tggccgggat agattgagca attgcagtcc tgcaccgtct 360
 catgccggcg aggcgagatg gtgaacagct gggagacgag gaagacagat ccgcagagat 420
 cccccagta catagcggaa cagaaagcag ccgcccacac gagcaaatcg acgtggcgctc 480
 gtattgtcgt agtggggacg ctggcggtcc tagctgcgag cgtgggggtg agcgctaccc 540

agcagcggga agagtgttc tcccgaacgc agggcacgca cccgggggtg tgcattgatca 600
 tgtccgctgc ctcatcacaca atgcttgagt tggagcagtc gttcgtgaca tggtagatcc 660
 cggacacggt gcgcacctca tatttgtgat ggtgatggtg gtgtcctagt gctgctagtg 720
 gtaggaagca tagtactagt attagtaggc ttccgatgaa ttcccgatga aggcagagag 780
 cgcaaggagg cgttatttat agtgccattc cctctctga gagaccgga tggtagtcga 840
 gtgttatcgg agacagcttg atgtagactc cgtgcctgcc ggtcctotta ttggcggaca 900
 ccagtgagac accccggaac ttgctgtttt tctgcaaaat cccgggtgac cagtgggagc 960
 ctatttgcac acacgagcgg gacacccac tctggtgaag agtgccaaag tcattctttt 1020
 tcccgtnncg gggcagccga ttgcatgttt taggaaaata ttacctttgc tacaccctgt 1080
 cagatttacc ctccacacat atattattccg tcacctccag ggactattct tggctcgttg 1140
 cgccgcccgc gaagatatcc agaagctgtg ttttccgaga gactcgggtg gcgcctggta 1200
 tatttnnagg atgtcgcgt gcctcacgtc ccggtacca ggaacgcggt gggatctcgg 1260
 gcccatcgaa gactgtgctc cagactgctc gccagcagg tgtttcttga ttgcgcctc 1320
 taaatagtcc gcgcacgccc ggtaacattt ttccagctcg gagtttgctg ttagatacat 1380
 ttctgcgatg ccaaaggagc ctgcagatta taacctcgga tgctgtcatt cagcgctttt 1440
 aatttgacct ccagatagtt gctgtatttc tgttcattg gctgctggac gttcgtataa 1500
 ctgagttat tgttgcgctc tgccctggcg tactggctca tgactgactg cggctcgttc 1560
 tcgagtgttc tcgcaacagg acgcctgcag gtcacgagt cgagctggcg ccgaaactgg 1620
 cggatctgac ctccacactg cctgtatct ctatccaccg ggaaccgcct cctgccgttc 1680
 cagaatgttg ttcaagtgg agctctgtgc ggtcaatgaa ggcgttattg ccggtgaaat 1740
 ctttgggaag cgttttatcc tcggggaaga ttacgaaatt cccgcgcgctc gttgcgcttc 1800
 ctggatctcg aggaagatcg ttctccgct cgaggagatc gttctccgcg tcgacctgca 1860
 ggcatgcaag cttggcactg gccgtcgttt tacaacgctg tgactgggaa aaccctggcg 1920
 ttaccact taatcgctt gcagcacatc ccccttctgc cagctggcgt aatagcgaag 1980
 aggccgcac cgatcgccct tccaacagt tgcgcagct gaatggcgaa tggcgctga 2040
 tgcggtattt tctccttacg catctgtgog gtatttcaca ccgcatatgg tgcactctca 2100
 gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa gccagccccg acaccgcca acaccgctg 2160
 acgcgcctg acgggcttgt ctgctcccg catccgtta cagacaagct gtgacctct 2220
 cgggagctg catgtgtcag aggttttcac cgtcatcacc gaaacgcgcg agacgaaagg 2280
 gcctcgtgat acgcctattt ttataggta atgtcatgat aataatggtt tcttagacgt 2340



caggtggcac ttttcgggga aatgtgcgog gaacccttat ttgtttatatt ttctaaatac 2400
 attcaaatat gtatccgctc atgagacaat aaccctgata aatgcttcaa taatattgaa 2460
 aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgccct tattcccttt ttgcgggcat 2520
 ttgacctcc tgtttttgct caccagaaa cgctggtgaa agtaaaagat gctgaagatc 2580
 agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga 2640
 gttttcgccc cgaagaacgt ttccaatga tgagcacttt taaagtctctg ctatgtggcg 2700
 cggattatc ccgtattgac gccgggcaag agcaactcgg tcgccgcata cactattctc 2760
 agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat ggcatgacag 2820
 taagagaatt atgcagtgtc gccataacca tgagtataa cactgcggcc aacttacttc 2880
 tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa ccgctttttt gcacaacatg ggggatcatg 2940
 taactcgct tgatcgttg gaaccggagc tgaatgaagc cataccaaac gacgagcgtg 3000
 acaccacgat gcctgtagca atggcaacaa cgttgcgcaa actattaact ggcgaactac 3060
 ttactctagc ttcccgga caattaatag actggatgga ggcggataaa gttgcaggac 3120
 cacttctgog ctcgccctt ccggttggt ggtttattgc tgataaatct ggagccggtg 3180
 agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga tggtaagccc tccggtatcg 3240
 tagttatcta cagcagggg agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga cagatcgctg 3300
 agataggtgc ctactgatt aagcattggt aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac 3360
 tttagattga tttaaaactt catttttaat taaaaggat ctagggtgaag atcctttttg 3420
 ataatctcat gaccaaatac ccttaacgtg agttttcggt ccactgagcg tcagaccccg 3480
 tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc ctttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc 3540
 aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc ggtcaagag ctaccaactc 3600
 tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtc cttctagtgt 3660
 agccgtagt aggcaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctcgctctgc 3720
 taatcctgt accagtggct gctgccagt gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact 3780
 caagacgata gttaccgat aaggcgcagc ggtcgggctg aacggggggt tcgtgcacac 3840
 agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag 3900
 aaagcgccac gtttcccgaa gggagaaagg cggacaggta tccggtaagc ggcagggtcg 3960
 gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg 4020
 tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gatttttgtg atgctcgtca ggggggcgga 4080
 gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt cctggccttt tgctggcctt 4140
 ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt attaccgct 4200



ttgagtgagc tgataccgct cgccgcagcc gaacgaccga gcgcagcgag tcagtgagcg 4260

aggaagcggg aga 4273

<210> 40

<211> 7330

<212> DNA

<213> vektor pFPMT-CL-H6-K-E1

<220>

<221> alternativní znak

<222> (1098)..(1099)

<223> N je jakýkoliv nukleotid

<220>

<221> alternativní znak

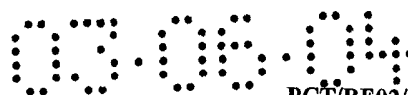
<222> (1277)..(1278)

<223> N je jakýkoliv nukleotid

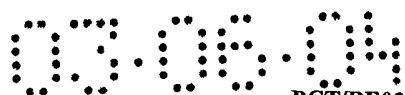
<400> 40

ggtaccctgc tcaatctccg gaatggtgat ctgacgttcc ctgaaaacct cgacattggc 60
 tccctcctga cacaggtact cgtacaggtt ccaggtaaac gagtcgtagt tgtcgatcat 120
 gacaacgttc ttagaagcgg ccggcatttt gaaggtgact aatagcctaa gaaaatattt 180
 aatttaattt tcattaaatt ttctatact cgctatttca gcttttcac tcatcacttc 240
 ataaacgata taaaccagaa aaagaactat tttaaacaac gcttctcaa agcggtatgt 300
 ccttccacgt ctccctagaa tctggcaagt ccgcgagggg gatccctacc agttcatcat 360
 catatcccaa gccatacggg gacctgttat gtggccggga tagattgagc aattgcagtc 420
 ctgcaccgtc tcatgccggc gaggcgagat ggtgaacagc tgggagacga ggaagacaga 480
 tccgcagaga tccccacgt acatagcggg acagaaagca gccgccccaa cgagcaaato 540
 gacgtggcgt cgtattgtcg tagtggggac gctggcggtc ctagctgaga gcgtgggggt 600
 gagcgctacc cagcagcggg aagagttggt ctcccgaacg cagggcacgc acccgggggt 660
 gtgcattgat atgtccgctg cctcatacac aatgcttgag ttggagcagt cgttcgtgac 720
 atggtacatc ccggacacgt tgcgcacctc atatttgtga tggatgatgt ggtgtcctag 780
 tgctgctagt ggtaggaagc atagtactag tattagtagg cttcgcatga attccgatg 840
 aaggcagaga gcgcaaggag gcggtattta tagtgccatt cccctctctg agagaccgg 900
 atggtagtcg agtggtatcg gagacagctt gatgtagact ccgtgcctgc cggtcctctt 960
 attggcggac accagtgaga cccccggaa cttgctgttt ttctgcaaaa tccgggggtga 1020
 ccagtgggag cctattttgca cacacgagcg ggacacccca ctctggtgaa gaggccaaa 1080
 gtcattcttt ttcccgtnnc ggggcagccg attgcatgtt ttaggaaaat attacctttg 1140

ctacaccctg tcagatttac cctccacaca tatatatcc gtcacctcca gggactatcc 1200
 ttggctcggt gcgcccgc ggaagatata cagaagctgt gttttccgag agactcggtt 1260
 ggcgctggt atatttnnag gatgtcgcgc tgcctcacgt cccggtaccc aggaacgcgg 1320
 tgggatctcg ggcccatcga agactgtgct ccagactgct cgcgccagcag gtgtttcttg 1380
 attgcgcct ctaaatagtc cgcgcacgc cggtaacatt tttccagctc ggagtttgcg 1440
 tttagatata tttctcgat gccaaaggag cctgcagatt ataacctcg atgctgtcat 1500
 tcagcgcttt taatttgacc tccagatagt tgctgtattt ctgttccatt ggctgctgga 1560
 cgttcgtata actcgagtta ttgttgcgt ctgcctcggc gtactggctc atgactgact 1620
 gcggtcgcct ctcgagtgtt ctgcacacag gacgcctgca ggtcatcgag tcgagctggc 1680
 gccgaaactg gcggatctga cctccacact gccctgtatc tctatccacc gggaaaccgcc 1740
 tctgcggtt ccagaatgtt gttcaagtgg tagctctgtg cgggtcaatga aggcgttatt 1800
 gccggtgaaa tctttgggaa gcggtttatc ctgcgggaag attacgaaat tccgcgcgt 1860
 cgttgcgctt cctggatctc gaggaagatc gttctccgcg tcgaggagat cgttctccgc 1920
 gtcgacctgc aggcattgca gcttctggta aacgtttag tactctgaaa caaggcccta 1980
 gcactctgat ctgtttctct tgggtagcgg tgagtggttt attggagtcc actggtttca 2040
 gcacatctgt catctagaca atattgttac taaatTTTT tgaactacaa ttgttcgtaa 2100
 ttcacttatt attatacatc ctgcacgca atttctggca gacggagttt actaacgtct 2160
 tgagtatgag gccgagaatc cagctctgtg gccatactca gtcttgacag cctgctgatg 2220
 tggctcggtt caacgcaata agcgtgtcct ccgactccga gttgtgctcg ttatcgtcgt 2280
 tctcatcctc ggaaaaatca cagaaaagaa catactcacc agtaggcttt ctgggtccctg 2340
 gggcacggct gtttctgacg tattccggcg ttgataatag ctgaaagtg aacgccgagt 2400
 cgcgggagtc gaccgatgcc cttgagagcc ttcaaccag tcagctcctt ccggtgggcg 2460
 cggggcatga ctatcgtcgc cgcacttatg actgtcttct ttatcatgca actcgttaga 2520
 cagggtgccg cagcgtctct ggtcattttc ggcgaggacc gctttcgtg gagcgcgacg 2580
 atgatcgcc tgctgcttgc ggtattcgga atcttgacg ccctcgtca agccttcgtc 2640
 actgggtccc ccaccaaacy tttcggcgag aagcaggcca ttatcgccg catggcggcc 2700
 gacgcgctgg gctacgtctt gctggcggtc gcgacgcgag gctggatggc cttccccatt 2760
 atgattcttc tcgttccgg cggcatcggg atgcccgct tgcaggccat gctgtccagg 2820
 caggtagatg acgaccatca gggacagctt caaggatcgc tcgcggctct taccagccta 2880
 acttcgatca ctggaccgct gatcgtcacg gcgatttatg ccgcctcggc gagcacatgg 2940



aacgggttg catggattgt aggcgcggcc ctataccttg tctgcctccc cgcgttgctg 3000
 cgcggtgcat ggagccgggc cacctcgacc tgaatggaag ccggcggcac ctcgctaacg 3060
 gattcaccac tccaagaatt ggagccaatc aattcttgcg gagaactgtg aatgcgcaaa 3120
 ccaacccttg gcagaacata tccatcgct cgcctatctc cagcagccgc acgcggcgca 3180
 tcggggggggg gggggggggg gggggggcaaa caattcatca tttttttttt attctttttt 3240
 ttgatttcgg tttctttgaa atttttttga ttcggtaatc tccgaacaga aggaagaacg 3300
 aaggaaggag cacagactta gattggtata tatacgcata tgtagtgttg aagaaacatg 3360
 aaattgcccc gtattcttaa cccaactgca cagaacaaaa acctgcagga aacgaagata 3420
 aatcatgtcg aaagctacat ataaggaacg tgctgctact catcctagtc ctggtgctgc 3480
 caagctatctt aatatcatgc acgaaaagca aacaaacttg tgtgcttcat tggatgttcg 3540
 taccaccaag gaattactgg agttagtga agcattaggt cccaaaattt gtttactaaa 3600
 aacacatgtg gatattctga ctgatttttc catggagggc acagttaagc cgctaaaggc 3660
 attatccgcc aagtacaatt ttttactctt cgaagacaga aaatttgctg acattggtaa 3720
 tacagtcaaa ttgcagtact ctgcgggtgt atacagaata gcagaatggg cagacattac 3780
 gaatgcacac ggtgtggtgg gcccggtat tgttagcggg ttgaagcagg cggcagaaga 3840
 agtaacaaag gaacctagag gccttttgat gttagcagaa ttgtcatgca agggctccct 3900
 atctactgga gaatatacta agggctactgt tgacattgcg aagagcgaca aagattttgt 3960
 tatcggtctt attgctcaaa gagacatggg tggaagagat gaaggttacg attggttgat 4020
 tatgaccccc ggtgtgggtt tagatgacaa gggagacgca ttgggtcaac agtatagaac 4080
 cgtggatgat gtggtctcta caggatctga cattattatt gttggaagag gactatttgc 4140
 aaaggaagg gatgctaagg tagagggtga acgttacaga aaagcaggct gggaagcata 4200
 ttgagaaga tgcggccagc aaaactaaaa aactgtatta taagtaaag catgtatact 4260
 aaactcaca attagagctt caatttaatt atatcagta ttaccggga atctcggtcg 4320
 taatgatttt tataatgacg aaaaaaaaa aattggaaag aaaagcccc ccccccccc 4380
 ccccccccc ccccccccg cagcgttggg tctggccac gggcgcgcat gatcgtgctc 4440
 ctgctggtga ggaccggct aggcggcg ggttgctta ctggttagca gaatgaatca 4500
 ccgatacgc agcgaacgtg aagcgactgc tgctgcaaaa cgtctgcgac ctgagcaaca 4560
 acatgaatgg tottcggttt ccgtgtttcg taaagtctgg aaacgcggaa gtcagcgccc 4620
 tgcaccatta tgttccggat ctgcacgca ggatgctgct ggctaccctg tggaacacct 4680
 acatctgtat taacgaagcg ctggcattga cctgagtga ttttctctg gtcccgccgc 4740
 atccataccg ccagttgttt accctcaca cgttcagta accgggcatg ttcacatca 4800

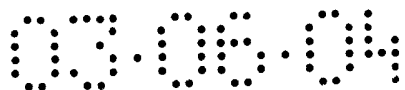


gtaacccgta tcgtgagcat cctctctcgt ttcacggta tcattacccc catgaacaga 4860
 aattccccct tacacggagg catcaagtga ccaaacagga aaaaaccgcc cttaacatgg 4920
 cccgctttat cagaagccag acattaacgc ttctggagaa actcaacgag ctggacgcgg 4980
 atgaacagggc agacatctgt gaatcgcttc acgaccacgc tgatgagctt taccgcagct 5040
 gcctcgcgcg ttctgggtgat gacgggtgaaa acctctgaca catgcagctc ccggagacgg 5100
 tcacagcttg tctgtaagcg gatgccggga gcagacaagc ccgtcagggc gcgtcagcgg 5160
 gtgttgggcg gtgtcggggc gcagccatga cccagtcacg tagcgatagc ggagtgtata 5220
 ctggcttaac tatgcggcat cagagcagat tgtactgaga gtgcaccata tgcgggtgtga 5280
 aataccgcac agatgcgtaa ggagaaaata ccgcatcagg cgctcttcgc cttcctcgct 5340
 cactgactcg ctgcgctcgg tctgtcgggt gcggcgagcg gtatcagctc actcaaagcg 5400
 ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg 5460
 ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg 5520
 cccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg 5580
 actataaaga taccaggcgt tccccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttcgcac 5640
 cctgcgcctt accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca 5700
 tagctcacgc tgtaggtatc tcagttcggg ttaggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt 5760
 gcacgaaccc cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc 5820
 caaccggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag 5880
 agcgaggatg ttaggcgggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac 5940
 tagaaggaca gtatttggtg tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt 6000
 tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgtcggtagc ggtgggtttt ttgtttgcaa 6060
 gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct tttctacggg 6120
 gtctgacgct cagtggaaacg aaaactcacg ttaagggatt ttggtcatga gattatcaaa 6180
 aaggatcttc acctagatcc ttttaaatta aaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat 6240
 atatgagtaa acttggtctg acagttacca atgcttaatc agtgaggcac ctatctcagc 6300
 gatctgtcta ttctgttcat ccatagttgc ctgactcccc gtctgttaga taactacgat 6360
 acgggagggc ttaccatctg gcccagtg gcgaatgata ccgcgagacc cagctcacc 6420
 ggctccagat ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg gccgagcgca gaagtggctc 6480
 tgcaacttta tccgcctcca tccagtctat taattgttgc cgggaagcta gagtaagtag 6540
 ttcgccagtt aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct gcaggcatcg tgggtgcacg 6600

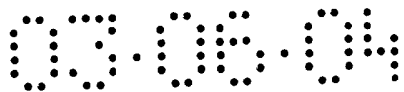
ctcgtcgttt ggtatggctt cattcagctc cggttcccaa cgatcaaggc gagttacatg 6660
 atcccccatg ttgtgcaaaa aagcgggttag ctcttcgggt cctccgatcg ttgtcagaag 6720
 taagttggcc gcagtggttat cactcatggt tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt 6780
 catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac tggtgagtac tcaaccaagt cattctgaga 6840
 atagtgtatg cggcgaccga gttgctcttg ccggcgctca acacgggata ataccgcgcc 6900
 acatagcaga actttaaaag tgctcatcat tggaaaacgt tcttcggggc gaaaactctc 6960
 aaggatctta ccgctgttga gatccagttc gatgtaaccc actcgtgcac ccaactgac 7020
 ttcagcatct tttactttca ccagcgtttc tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaaatgc 7080
 cgcaaaaaag ggaataaggg cgacacggaa atgttgaata ctcatactct tcctttttca 7140
 atattattga agcatttatc agggttattg tctcatgagc ggatacatat ttgaatgtat 7200
 ttagaaaaat aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc cgaaaagtgc cacctgacgt 7260
 ctaagaaacc attattatca tgacattaac ctataaaaaat aggcgtatca cgaggccctt 7320
 tcgtcttcaa 7330

<210> 41
 <211> 5202
 <212> DNA
 <213> vektor pYIG5

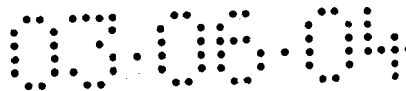
<400> 41
 agcgcccaat acgcaaaccg cctctcccgc cgcgttgccc gattcattaa tgcagctggc 60
 acgacagggt tcccgactgg aaagcgggca gtgagcgcaa cgcaattaat gtgagttagc 120
 tcactcatta ggcaccccag gctttacact ttatgcttcc ggctcgtatg ttgtgtggaa 180
 ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac gaatttaata 240
 cgactcacta tagggaattc gaggatcctt caatatgcgc acatacgtg ttatgttcaa 300
 ggtcccttcg tttagaacg aaagcggctt tccttttgag ggatgtttca agttgttcaa 360
 atctatcaaa ttgcaaacc cccagtctgt atctagagcg ttgaatcggg gatgcgattt 420
 gttaattaaa ttgatgggtg caccattacc aggtctagat ataccaatgg caaactgagc 480
 acaacaatac cagtccggat caactggcac catctctccc gtagtctcat ctaatttttc 540
 ttccggatga ggttccagat ataccgcaac acctttatta tggtttcctt gagggataaa 600
 tagaatgtcc cattcgaaat caccaattct aaacctgggc gaattgtatt tcgggtttgt 660
 taactcgttc cagtcaggaa tgttccacgt gaagctatct tccagcaaag tctccacttc 720
 ttcataaat tgtggagaat actcccaatg ctcttatcta tgggacttcc gggaaacaca 780
 gtaccgatac ttccaattc gtcttcagag ctcatgtttt gtttgaagag actaatcaaa 840



gaatcgtttt ctcaaaaaaa ttaatatctt aactgatagt ttgatcaaag gggcaaaacg 900
 taggggcaaa caaacggaaa aatcgtttct caaatcttct gatgccaga actctaacca 960
 gtcttatcta aaaattgcct tatgatccgt ctctccggtt acagcctgtg taactgatta 1020
 atcctgcctt tctaatacacc attctaagt ttttaattaag ggattttgtc ttcattaacg 1080
 gctttcgctc ataaaaaatgt tatgacgttt tgcccgagg cgaggaaacca tccacttcac 1140
 gagactgac tcctctgccg gaacaccggg catctccaac ttataagttg gagaaataag 1200
 agaatttcag attgagagaa tgaaaaaaaa aaaccctgaa aaaaaagggt gaaaccagtt 1260
 cctgaaatt attccctac ttgactaata agtatataaa gacggtaggt attgattgta 1320
 attctgtaaa tctatttctt aaacttctta aattctactt ttatagttag tctttttttt 1380
 agttttaaaa caccaagaac ttagtttcga ataaacacac ataaacaaac accatgagat 1440
 ttccctcaat ttttactgca gttttattcg cagcatctc cgcattagct gctccagtc 1500
 aactacaac agaagatgaa acggcacaaa ttccggtga agctgtcatc ggttactcag 1560
 atttagaagg ggatttcgat gttgctgttt tgccattttc caacagcaca aataacgggt 1620
 tattgtttat aaatactact attgccagca ttgctgctaa agaagaagggt gtatctctag 1680
 ataaaaggcc tgtcgacggt accagatctc gacttggttg aacacgttgc caaggcttaa 1740
 gtgaatttac tttaaagtct tgcatttaaa taaatttct ttttatagct ttatgactta 1800
 gtttcaattt atatactatt ttaatgacat ttctgattca ttgattgaaa gctttgtgtt 1860
 tttcttgat gcgctattgc attgttcttg tctttttcgc cacatgtaat atctgtagta 1920
 gatacctgat acattgtgga tgctgagtga aatttttagtt aataatggag gcgctcttaa 1980
 taattttggg gatattggct ttttttttta aagtttacia atgaattttt tccgccagga 2040
 taacgattct gaagttactc ttagcgttcc tatcggtaca gccatcaaat catgcctata 2100
 aatcatgcct atatttgctg gcagtcagta tcatctacat gaaaaaaact cccgcaattt 2160
 cttatagaat acgttgaaaa ttaaatgtac gcgccaagat aagataacat atatctagct 2220
 agatgcagta atatacacag attcccgcgg acgtgggaag gaaaaaatta gataacaaaa 2280
 tctgagtgat atggaaattc cgtgtatag ctcatatctt tcccttcaac accagaaatg 2340
 taaaaatctt gttacgaagg atctttttgc taatgtttct cgtcaatcc tcatttcttc 2400
 cctacgaaga gtcaaatcta cttgttttct gccggtatca agatccatat cttctagttt 2460
 caccatcaaa gtccaatttc tagtatacag tttatgtccc aacgtaacag acaatcaaaa 2520
 ttggaaagga taagtatcct tcaaagaatg attctgcgct ggtcctgaa ccgcctaagt 2580
 ggaacagaga agtccaaaac gatgctataa gaaccagaaa taaaacgata aaaccatacc 2640
 aggatccaag cttggcactg gccgtcgttt tacaacgtcg tgactgggaa aaccctggcg 2700



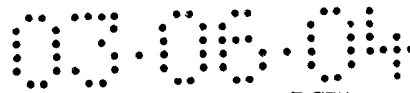
ttacccaact taatcgccct gcagcacatc cccctttcgc cagctggcgt aatagcgaag 2760
 agggccgcac cgatcgccct tcccaacagt tgcgcagcct gaatggcgaa tgggaaattg 2820
 taaacgttaa tattttgtta aaattcgcgt taaatttttg ttaaatacgc tcatttttta 2880
 accaataggc cgaaatcggc aaaatccctt ataaatcaaa agaatagacc gagatagggg 2940
 tgagtgttg tccagtttgg aacaagagtc cactattaaa gaacgtggac tccaacgtca 3000
 aagggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gccactacg tgaaccatca ccctaataca 3060
 gttttttggg gtcgaggtgc cgtaaagcac taaatcggaa ccctaaaggg agccccgat 3120
 ttagagcttg acggggaaaag cgggcgaacg tggcgagaaa ggaagggaag aaagcgaaag 3180
 gagcgggggc tagggcgctg gcaagtgtag cggtcacgct gcgcgtaacc accacacccg 3240
 ccgcgcttaa tgcgcgcta cagggcgctg caggtggcac ttttcgggga aatgtgcgcg 3300
 gaacccctat ttgtttattt ttctaaatac attcaaatac gtatccgctc atgagacaat 3360
 aacctgata aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc 3420
 gtgtcgccct tattcccttt tttgcggcat tttgccttcc tgtttttgct caccagaaa 3480
 cgctgggtgaa agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac 3540
 tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga gttttcgccc cgaagaacgt tttccaatga 3600
 tgagcacttt taaagttctg ctatgtggcg cggattatc ccgtattgac gccgggcaag 3660
 agcaactcgg tcgcgcata cactattctc agaatagactt ggttgagtac tcaccagtca 3720
 cagaaaagca tcttacggat ggcatacag taagagaatt atgcagtgc gccataacca 3780
 tgagtataa cactgcggcc aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa 3840
 ccgctttttt gcacaacatg ggggatcatg taactcgccct tgatcgttgg gaaccggagc 3900
 tgaatgaagc cataccaaac gacgagcgtg acaccacgat gcctgtagca atggcaacaa 3960
 cgttgcgcaa actattaact ggcgaactac ttactctagc ttcccgcaa caattaatag 4020
 actggatgga ggcgataaa gttgcaggac cacttctgcg ctcgccctt ccggtgggt 4080
 ggtttattgc tgataaatct ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac 4140
 tggggccaga tggtaagccc tcccgtatcg tagttatcta cagcagggg agtcaggcaa 4200
 ctatggatga acgaaataga cagatcgctg agataggtgc ctactgatt aagcattggg 4260
 aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac tttagattga tttaaaactt catttttaat 4320
 ttaaaaggat ctaggatgaag atcctttttg ataattctcat gacaaaaac ccttaacgtg 4380
 agttttcgtt cactgagcg tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc 4440
 ctttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg 4500



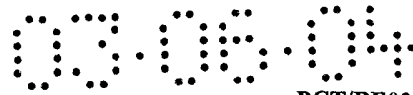
tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag 4560
 cgcagatacc aaatactgtc cttctagtgt agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact 4620
 ctgtagcacc gcctacatac ctcgctctgc taatcctggt accagtggct gctgccagtg 4680
 gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc 4740
 ggtcgggctg aacgggggggt tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg 4800
 aactgagata cctacagcgt gagcattgag aaagcgccac gcttcccga gggagaaagg 4860
 cggacaggta tccggtaagc ggcagggtcg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag 4920
 ggggaaacgc ctggtatctt tatagtctcg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc 4980
 gatttttgtg atgctcgtca ggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacggggcct 5040
 ttttaagggt cctggccttt tgctggcctt ttgtcacat gttcttttct gcgttatecc 5100
 ctgattctgt ggataaccgt attaccgcct ttgagtgagc tgataccgct cgcgcagcc 5160
 gaacgaccga gcgcagcgag tcagtgagcg aggaagcgga ag 5202

<210> 42
 <211> 5613
 <212> DNA
 <213> vektor pYIG5E1H6

<400> 42
 ggatccttca atatgogcac atacgtgtt atgttcaagg tcccttcggt taagaacgaa 60
 agcgggtcttc cttttgaggg atgtttcaag ttgttcaaat ctatcaaatt tgcaaatccc 120
 cagtctgtat ctagagcggt gaatcggtga tgcgatttgt taattaaatt gatggtgtca 180
 ccattaccag gtctagatat accaatggca aactgagcac aacaatacca gtccggatca 240
 actggcacca tctctcccggt agtctcatct aatttttctt ccggatgagg ttccagatat 300
 accgcaacac ctttattatg gtttccctga gggaaataata gaatgtccca ttcgaaatca 360
 ccaattctaa acctgggcga attgtatttc gggtttggtta actcgttcca gtcaggaatg 420
 ttccacgtga agctatcttc cagcaaagtc tccacttctt catcaaattg tggagaatac 480
 tcccaatgct cttatctatg ggacttccgg gaaacacagt accgatactt cccaattcgt 540
 cttcagagct cattgtttgt ttgaagagac taatcaaaga atcgttttct caaaaaaatt 600
 aatatcttaa ctgatagttt gatcaaaggg gcaaaacgta ggggcaaaca aacggaaaaa 660
 tcgtttctca aattttctga tgccaagaac tctaaccagt cttatctaaa aattgcctta 720
 tgatccgtct ctccggttac agcctgtgta actgattaat cctgccttct taatcaccat 780
 tctaattgtt taattaaggg attttgtctt cattaacggc tttcgctcat aaaaatgtta 840
 tgacgttttg cccgcaggcg ggaaaccatc cacttcacga gactgatctc ctctgccgga 900



acaccgggca tctccaactt ataagttgga gaaataagag aatttcagat tgagagaatg 960
 aaaaaaaaaa accctgaaaa aaaagggtga aaccagttcc ctgaaattat tccctactt 1020
 gactaataag tatataaaga cggtaggtat tgattgtaat tctgtaaatc tatttcttaa 1080
 acttcttaaa ttctactttt atagttagtc ttttttttag ttttaaaaca ccaagaactt 1140
 agtttogaat aaacacacat aaacaaacac catgagattt ccttcaattt ttactgcagt 1200
 tttattogca gcatcctccg cattagctgc tccagtcaac actacaacag aagatgaaac 1260
 ggcacaaatt cgggtgaag ctgtcatcgg ttacttagat ttagaagggg atttcgatgt 1320
 tgctgttttg ccattttcca acagcacaaa taacgggtta ttgtttataa atactactat 1380
 tgccagcatt gctgctaaag aagaaggggt atctctagat aaaaggtagt aggtgcgcaa 1440
 cgtgtccggg atgtaccatg tcacgaacga ctgtccaac tcaagcattg tgtatgaggc 1500
 agcggacatg atcatgcaca ccccgggtg cgtgccctgc gttcgggaga acaactcttc 1560
 ccgctgctgg gtagcgctca ccccacgct cgcagctagg aacgccagcg tccccactac 1620
 gacaatacga cgccacgtcg atttgctcgt tggggcggct gctttctgtt ccgctatgta 1680
 cgtgggggat ctctgcggat ctgtcttctt cgtctccag ctgttcacca tctgcctcg 1740
 ccggcatgag acggtgcagg actgcaattg ctcaatctat cccggccaca taacagggtca 1800
 ccgtatggct tgggatatga tgatgaactg gcaccaccac catcaccatt aaagatctcg 1860
 acttggttga acacgttgcc aaggcttaag tgaatttact ttaaagtctt gcatttaaatt 1920
 aaattttctt ttatagctt tatgacttag tttcaattta tatactattt taatgacatt 1980
 ttcgattcat tgattgaaag ctttgtgttt tttcttgatg cgctattgca ttgttcttgt 2040
 ctttttcgcc acatgtaata tctgtagtag ataactgata cattgtggat gctgagtga 2100
 attttagtta ataatggagg cgctcttaatt aattttgggg atattggctt ttttttttaa 2160
 agtttacaaa tgaatttttt ccgccaggat aacgattctg aagttactct tagcgttctt 2220
 atcggtagag ccatcaaact atgcctataa atcatgccta tatttgctg cagtcagtat 2280
 catctacatg aaaaaaactc ccgcaatttc ttatagaata cgttgaaaat taaatgtacg 2340
 cgccaagata agataacata tatctagcta gatgcagtaa tatacacaga ttcccgcgga 2400
 cgtgggaagg aaaaaattag ataacaaaat ctgagtgata tggaaattcc gctgtatagc 2460
 tcatatcttt cccttcaaca ccagaaatgt aaaaatcttg ttacgaagga tctttttgct 2520
 aatgtttctc gctcaatcct catttcttcc ctacgaagag tcaaactctac ttgttttctg 2580
 ccggtatcaa gatccatctt ttctagtttc accatcaaag tccaatttct agtatacagt 2640
 ttatgtccca acgtaacaga caatcaaaat tggaaaggat aagtatcctt caaagaatga 2700
 ttctgcgctg gctcctgaac cgcctaattg gaacagagaa gtccaaaacg atgctataag 2760

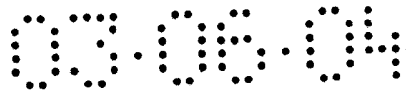


aaccagaaat aaaacgataa aaccatacca ggatccaagc ttggcactgg ccgtcgtttt 2820
acaacgtcgt gactgggaaa accctggcgt tacccaactt aatcgccctg cagcacatcc 2880
ccctttcgcc agctggcgta atagcgaaga ggcccgacc gatcgccctt cccaacagtt 2940
gcgcagcctg aatggcgaat gggaaattgt aaacgttaat attttgtaa aattcgctt 3000
aaatttttgt taaatcagct ctttttttaa ccaataggcc gaaatcgga aaatccctta 3060
taaataaaaa gaatagaccg agatagggtt gagtggtgtt ccagtttgga acaagagtcc 3120
actattaaag aacgtggact ccaacgtcaa agggcgaaaa accgtctatc agggcgatgg 3180
ccactacgt gaaccatcac cctaataag ttttttggg tcgaggtgcc gtaaagcact 3240
aaatcggaac cctaaagga gccccgatt tagagcttga cggggaagc cggcgaacgt 3300
ggcgagaaag gaaggggaaga aagcgaagg agcggcgct agggcgctgg caagtgtagc 3360
ggtcacgctg cgcgtaacca ccacaccgc cgcgcttaat gcgcgctac agggcgctc 3420
aggtggcact tttcgggaa atgtgcgcg aaccttatt tgtttattt tctaaataca 3480
ttcaaatacg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat aatattgaaa 3540
aaggaagagt atgagtatc aacatttcg tgcgcctt attcccttt ttgcggcatt 3600
ttgccttcct gtttttgct acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg ctgaagatca 3660
gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga tccttgagag 3720
tttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgat gagcactttt aaagttctgc tatgtggcg 3780
ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcgt cgccgcatac actattctca 3840
gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg gcatgacagt 3900
aagagaatta tgcagtgtg ccataaccat gagtgataac actgcggcca acttacttct 3960
gacaacgac ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg gggatcatgt 4020
aactcgctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagc ataccaaacg acgagcgtga 4080
caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaa ctattaactg gcgaactact 4140
tactctagct tcccgcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag ttgcaggacc 4200
actctgcgc tcggcccttc cggctggtg gtttattgct gataaatctg gagccgtga 4260
gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggcagat ggtaagcct cccgtatcgt 4320
agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac agatcgctga 4380
gatagggtgcc tactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact catatatact 4440
ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga tcctttttga 4500
taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gtttcgttc cactgagcgt cagacccgt 4560

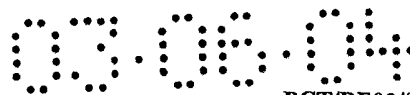
agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc tttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca 4620
 aacaaaaaaaa ccaccgctac cagcgggtgg ttgtttgccg gatcaagagc taccaactct 4680
 ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc ttctagtgtg 4740
 gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct 4800
 aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg ggttggaactc 4860
 aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggtt cgtgcacaca 4920
 gccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg agcattgaga 4980
 aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggttaagcg gcagggtcgg 5040
 aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggatatctt atagtctgt 5100
 cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgcctcgtcag ggggcccggag 5160
 cctatggaaa aacgcacgca acgcggcctt ttacggttc ctggcctttt gctggccttt 5220
 tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta ttaccgcctt 5280
 tgagttagct gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcagat cagttagcga 5340
 ggaagcggaa gagcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc cgattcatta 5400
 atgcagctgg cagcagaggt ttcccgactg gaaagcgggc agtgagcgca acgcaattaa 5460
 tgtgagttag ctcactcatt aggcacccca ggctttacac tttatgcttc cggctcgtat 5520
 gttgtgtgga attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagctatg accatgatta 5580
 cgaatttaac acgactcact atagggaatt cga 5613

<210> 43
 <211> 13020
 <212> DNA
 <213> vektor pSY1

<400> 43
 atcgataagc ttttcaattc aattcatcat ttttttttta ttcttttttt tgatttcggt 60
 ttctttgaaa tttttttgat tcggtaatct ccgaacagaa ggaagaacga aggaaggagc 120
 acagacttag attggtatat atacgcatat gtagtggtga agaaacatga aattgccag 180
 tattcttaac ccaactgcac agaacaaaaa cctgcaggaa acgaagataa atcatgtcga 240
 aagctacata taaggaacgt gctgctactc atcctagtcc tgttgetgcc aagctattta 300
 atatcatgca cgaaaagcaa acaaacttgt gtgcttcatt ggatgttcgt accaccaagg 360
 aattactgga gttagttgaa gcattaggtc ccaaaatttg ttactaaaa acacatgtgg 420
 atatcttgac tgatttttcc atggagggca cagttaagcc gctaaaggca ttatccgcc 480
 agtacaattt ttactcttc gaagacagaa aatttgctga cattggtaat acagtcaaat 540



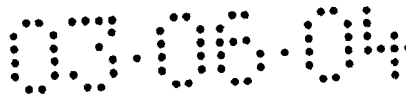
tgcagtactc tgcgggtgta tacagaatag cagaatgggc agacattacg aatgcacacg 600
 gtgtgggtggg cccaggtatt gttagcgggt tgaagcaggc ggcagaagaa gtaacaaagg 660
 aacctagagg ccttttgatg ttagcagaat tgtcatgcaa gggctcccta tctactggag 720
 aatataactaa ggggtactgtt gacattgcga agagcgacaa agattttgtt atcggcttta 780
 ttgctcaaag agacatgggt ggaagagatg aaggttacga ttggttgatt atgacacccg 840
 gtgtgggttt agatgacaag ggagacgcat tgggtcaaca gtatagaacc gtggatgatg 900
 tgggtctctac aggatctgac attattattg ttggaagagg actatttgca aagggaaggg 960
 atgctaaggt agagggtgaa cgttacagaa aagcaggctg ggaagcatat ttgagaagat 1020
 gcggccagca aaactaaaaa actgtattat aagtaaagtc atgtatacta aactcacaaa 1080
 ttagagcttc aatttaatta tatcagttat taccgggaa tctcggctgt aatgattttt 1140
 ataatgacga aaaaaaaaaa attggaaga aaaagcttta atgcggtagt ttatcacagt 1200
 taaattgcta acgcagtcag gcaccgtgta tgaaatctaa caatgcgctc atcgtcatcc 1260
 tcggcacctg caccctggat gctgtaggca taggcttggg tatgccggta ctgccggggc 1320
 tcttgcgga tatcgtccat tccgacagca tcgccagtca ctatggcgtg ctgctagcgc 1380
 tatatgcgtt gatgcaattt ctatgcgcac ccgttctcgg agcactgtcc gaccgctttg 1440
 gccgcgccc agtcctgctc gcttcgctac ttggagccac tatcgactac gcgatcatgg 1500
 cgaccacacc cgtcctgtgg atcctctacg ccggacgcat cgtggccggc atcacggcg 1560
 ccacaggtgc ggttgctggc ccctatatcg ccgacatcac cgatggggaa gatcgggctc 1620
 gccacttcgg gctcatgagc gcttgtttcg gcgtgggtat ggtggcaggc cccgtggccg 1680
 ggggactgtt gggcgccatc tccttgcatg caccattcct tgcggcgcg gtgctcaacg 1740
 gcctcaacct actactgggc tgcttcctaa tgcaggagtc gcataagggg gagcgtcgac 1800
 cgatgccctt gagagccttc aaccagtcga gctccttcgg gtggcgcggg ggcattgacta 1860
 tcgtcgccgc acttatgact gtcttcttta tcatgcaact cgtaggacag gtgccggcag 1920
 cgctctgggt catttttcggc gaggaccgct ttcgctggag cgcgacgatg atcggcctgt 1980
 cgcttgcggt attcggaatc ttgcacgcc tcgctcaagc cttcgtcact ggtcccgcca 2040
 ccaaacgttt cggcgagaag caggccatta tcgccggcat ggcggccgac gcgctgggct 2100
 acgtcttgct ggcgttcgag acgcgaggct ggtggcctt cccattatg attcttctcg 2160
 ctccggcgcg catcgggatg ccgcggttgc aggccatgct gtccaggcag gtagatgacg 2220
 accatcaggg acagcttcaa ggatcgctcg cggctcttac cagcctaact tcgatcactg 2280
 gaccgtgat cgtcacggcg atttatgcc cctcggcgag cacatggaac gggttggcat 2340
 ggattgtagg cgccgccta taccttgtct gcctccccgc gttgcgtcgc ggtgcatgga 2400



gccggggccac ctcgacctga atggaagccg gcggcacctc gctaaccgat tcaccactcc 2460
 aagaattgga gccaatcaat tcttgccggag aactgtgaat gcgcaaacca acccttggca 2520
 gaacatatcc atcgcgtccg ccactctccag cagccgcacg cggcgcacat cgggcagcgt 2580
 tgggtcctgg ccacgggtgc gcatgatcgt gctcctgtcg ttgaggaccc ggctaggctg 2640
 gcgggggttg cttactgggt agcagaatga atcaccgata cgcgagcgaa cgtgaagcga 2700
 ctgctgctgc aaaacgtctg cgacctgagc aacaacatga atggctctcg gtttccgtgt 2760
 ttcgtaaagt ctggaaaacgc ggaagtcagc gccctgcacc attatgttcc ggatctgcat 2820
 cgcaggatgc tgctggctac cctgtggaac acctacatct gtattaacga agcgtggca 2880
 ttgacctga gtgatttttc tctggtcccg ccgcatccat accgccagtt gtttaccctc 2940
 acaacgttcc agtaaccggg catgttcac ctcagtaacc cgtatcgtga gcacccctc 3000
 tcgtttcatc ggtatcatta ccccatgaa cagaaattcc cccttacacg gaggcacaa 3060
 gtgaccaaac aggaaaaaac gcgccctaac atggcccgct ttatcagaag ccagacatta 3120
 acgcttctgg agaaactcaa cgagctggac gcggatgaac aggcagacat ctgtgaatcg 3180
 cttcacgacc acgctgatga gctttaccgc agctgcctcg cgcgtttcgg tgatgacggt 3240
 gaaaacctct gacacatgca gctcccgag acggtcacag cttgtctgta agcggtgccg 3300
 ggagcagaca agcccgctcag ggcgcgtcag cgggtgttgg cgggtgtcgg ggcgcagcca 3360
 tgaccagtc acgtagcgt agcggagtg atactggctt aactatgcgg catcagagca 3420
 gattgtactg agagtgacc atatgcggtg tgaaataccg cacagatgcg taaggagaaa 3480
 atacgcac caggcgtctt ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct cggctcgttcg 3540
 gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaa ggoggttaata cggttatcca cagaatcagg 3600
 ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa 3660
 ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct ccgccccct gacgagcatc aaaaaatcg 3720
 acgtcaagt cagaggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg cgtttcccc 3780
 tggaagctcc ctcgtgcgct ctctgttcc gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc 3840
 ctttctccct tcgggaagcg tggcgcttcc tcatagctca cgctgtagg atctcagttc 3900
 ggtgtaggtc gttegtcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgttc agcccgaccg 3960
 ctgcgcctta tccggtaact atcgtcttga gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc 4020
 actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga 4080
 gttcttgaag tgggtggccta actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc 4140
 tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaacaaac 4200

caccgctggt agcgggtggt tttttgtttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaagg 4260
 atctcaagaa gatcctttga tcttttctac ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc 4320
 acgttaaggg attttggcca tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tccttttaaa 4380
 ttaaaaatga agtttttaaat caatctaaaag tataatagag taaacttggt ctgacagtta 4440
 ccaatgctta atcagtgagg cacctatctc agcgatctgt ctatttcgtt catccatagt 4500
 tgcttgactc cccgtcgtgt agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag 4560
 tgctgcaatg ataccgcgag acccacgctc accggctcca gatttatcag caataaacca 4620
 gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg tcctgcaact ttatccgcct ccatccagtc 4680
 tattaattgt tgccgggaag cttagagtaag tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaacgt 4740
 tgttgccatt gctgcaggca tcgtgggtgtc acgctcgtcg tttgggtatgg cttcattcag 4800
 ctccggttcc caacgatcaa ggcgagttac atgatcccc atgttggtgca aaaaagcgg 4860
 tagctccttc ggtcctccga tcgttggtcag aagtaagttg gccgcagtgt tatcactcat 4920
 ggttatggca gcactgcata attctcttac tgtcatgcca tccgtaagat gcttttctgt 4980
 gactgggtgag tactcaacca agtcattctg agaatagtgt atgcggcgac cgagttgtc 5040
 ttgcccggcg tcaacacggg ataataccgc gccacatagc agaactttta aagtgtcat 5100
 cattggaaaa cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag 5160
 ttcgatgtaa cccactcgtg caccctactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt 5220
 ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggaataa gggcgacacg 5280
 gaaatgttga atactcatac tcttcctttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta 5340
 ttgtctcatg agcggataca tatttgaatg tatttagaaa aataaaciaa taggggttcc 5400
 gcgcacattt ccccgaaaag tgccacctga cgtctaagaa accattatta tcatgacatt 5460
 aacctataaa aaataggcgt atcacgaggc ctttctgtct tcaagaattc tcatgtttga 5520
 cagcttatca tcgatccact tgtatatttg gatgaatttt tgaggaattc tgaaccagtc 5580
 ctaaaacgag taaataggac cggcaattct tcaagcaata aacaggaata ccaattatta 5640
 aaagataact tagtcagatc gtacaataaa gctttgaaga aaaatgcgcc ttattcaatc 5700
 tttgcataaa aaaatggccc aaaatctcac attggaagac atttgatgac ctcatttctt 5760
 tcaatgaagg gcctaacgga gttgactaat gttgtgggaa attggaccga taagcgtgct 5820
 tctgcgtgg ccaggacaac gtatactcat cagataacag caatacctga tcactacttc 5880
 gcactagttt ctccgtacta tgcataatgat ccaatatcaa aggaaatgat agcattgaag 5940
 gatgagacta atccaattga ggagtggcag catatagaac agctaaaggg tagtgctgaa 6000
 ggaagcatac gatccccgc atggaatggg ataatatcac aggaggtact agactacctt 6060

tcacccctaca taaatagacg catataagta cgcattttaag cataaacacg cactatgccg 6120
 ttctttctcat gtatatatat atacaggcaa cagcgagata taggtgcgac gtgaacagtg 6180
 agctgtatgt ggcagctcg cgttgcattt tcggaagcgc tcgttttcgg aaacgctttg 6240
 aagttcctat tccgaagttc ctattctcta gaaagtatag gaacttcaga gcgcttttga 6300
 aaacccaaaag cgctctgaag acgcactttc aaaaaaccaa aaacgcaccg gactgtaacg 6360
 agctactaaa atattgcgaa tacgccttc acaaacattg ctcaaaagta tctctttgct 6420
 atatatctct gtgctatata cctatataac catcccatcc acctttcgct ccttgaactt 6480
 gcatctaaac tcgacctcta ctttttttat gtttatctct agtattacct cttagacaaa 6540
 aaaattgtag taagaactat tcatagagtt aatcgaaaac aatacgaaaa tgtaaacatt 6600
 tcctatacgt agtatataga gacaaaatag aagaaaccgt tcataatttt ctgaccaatg 6660
 aagaatcatc aacgctatca ctttctgttc acaaagtatg cgcaatccac atcggtatag 6720
 aatataatcg gggatgcctt tatcttgaaa aatgcacccc gcagcttcgc tagtaatcag 6780
 taaacgcggg aagtggagtc aggttttttt tatggaagag aaaatagaca ccaaagtagc 6840
 cttcttctaa ccttaacgga cctacagtgc aaaaagttat caagagactg cattatagag 6900
 cgcacaaaag agaaaaaag taatctaaga tgctttgtta gaaaaatagc gctctcggga 6960
 tgcatttttg tagaacaaaa aagaagtata gattcttggt ggtaaaatag cgctctcgcg 7020
 ttgcattttct gttctgtaaa aatgcagctc agattctttg tttgaaaaat tagcgctctc 7080
 gcgttgcaatt tttgttttac aaaaatgaag cacagattct tcgttggtta aatagcgctt 7140
 tcgcgttgca tttctgttct gtaaaaatgc agctcagatt ctttgtttga aaaattagcg 7200
 ctctcgcgtt gcatttttgt tctacaaaat gaagcacaga tgcttcgtta acaaagatat 7260
 gctattgaag tgcaagatgg aaacgcagaa aatgaaccgg ggatgcgacg tgcaagatta 7320
 cctatgcaat agatgcaata gtttctccag gaaccgaaat acatacattg tcttccgtaa 7380
 agcgctagac tatatattat tatacagggt caaatatact atctgtttca gggaaaactc 7440
 ccagggttcg atgttcaaaa ttcaatgatg ggtaacaagt acgatcgtaa atctgtaaaa 7500
 cagtttgcg gatattagc tgatatctc caaagcgat tcgaatatca ttgagaagct 7560
 gcattttttt tttttttttt tttttttttt tttttatata tatttcaagg atataccatt 7620
 gtaatgtctg cccctaagaa gatcgctcgt ttgccagggt accacgttgg tcaagaaatc 7680
 acagccgaag ccattaaggt tcttaaagct atttctgatg ttcgttccaa tgtcaagttc 7740
 gatctcgaaa atcatttaaat tgggtggtgct gctatcgatg ctacagggtg cccacttcca 7800
 gatgaggcgc tggaagcctc caagaagggt gatgccgttt tgttaggtgc tgtgggtggt 7860



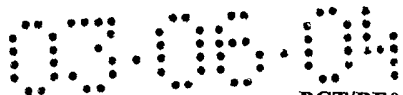
cctaaatggg gtaccggtag tgtagacct gaacaagggt tactaaaaat ccgtaaagaa 7920
 cttcaattgt acgccaactt aagaccatgt aactttgcat ccgactctct tttagactta 7980
 tctccaatca agccacaatt tgctaaagggt actgacttcg ttgttgtagc agaattagt 8040
 ggagggtatct acttttgtaa gagaaaggaa gacgatgggt atgggtgtagc ttgggtagt 8100
 gaacaatata ccgttccaga agtgcaaaga atcacaagaa tggccgcttt catggcccta 8160
 caacatgagc caccattgcc tatttggtcc ttggataaag ctaatgtttt ggctcttca 8220
 agattatgga gaaaaactgt ggaggaaacc atcaagaacg aattccctac attgaagggt 8280
 caacatcaat tgattgattc tgccgccatg atcctagtta agaaccacaac ccacctaaat 8340
 ggtattataa tcaccagcaa catgtttggt gatatcatct ccgatgaagc ctccgttctc 8400
 ccagggtcct tgggtttggt gccatctgag tccttggcct ctttgccaga caagaacacc 8460
 gcatttggtt tgtacgaacc atgccacgggt tctgctccag atttgccaaa gaataagggt 8520
 gacctatcg ccactatctt gtctgctgca atgatgttg aattgtcatt gaacttgcct 8580
 gaagaaggta aggccattga agatgcagtt aaaaagggtt tggatgcagg tatcagaact 8640
 ggtgatittag gtggttccaa cagtaccacc gaagtcgggtg atgctgtagc cgaagaagggt 8700
 aagaaaatcc ttgcttaaaa agattctctt tttttatgat atttgtacaa aaaaaaaaaa 8760
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaatgcagc gtcacatcgg ataataatga 8820
 tggcagccat tgtagaagtg ctttttgcat ttctagtctc tttctcggtc tagctagttt 8880
 tactacatcg cgaagataga atcttagatc aactgcctt tgctgagctg gatcatatga 8940
 gtaacaaaag agtggttaagg cctcgttaaa ggacaaggac ctgagcggaa gtgtatcgta 9000
 aagtagacgg agtatactag tatagtctat agtccgtgga attctaagtg ccagctttat 9060
 aatgtcattc tccttactac agaccgcct gaaagtagac acatcatcat cagtaagctt 9120
 tgacaaaag cattgagtag ctaactcttc tatgcaatct atagctgttt tataaggcat 9180
 tcaatggaca gattgaggtt ttgaaacat actagtgaat ttagccttaa tcccttctcg 9240
 aagttaatca tgcattatgg tgtaaaaaat gcaactcgcg ttgctctact ttttccgaa 9300
 tttccaaata cgcagctggg gtgattgctc gatttcgtaa cgaaagtttt gtttataaaa 9360
 accgcgaaaa cttctgttaa cagatagatt ttacagcgc tgatatacaa tgacatcagc 9420
 tgtaatggaa aataactgaa atatgaatgg cgagagactg cttgcttgta ttaagcaatg 9480
 tattatgcag cacttccaac ctatggtgta cgatgaaagt aggtgtgtaa tcgagacgac 9540
 aagggggact tttccagttc ctgatcatta taagaaatac aaaacgtag catttgcat 9600
 tgttggacat gtactgaata cagacgacac accggtaatt gaaaaagaac tggattggcc 9660
 tgatcctgca ctagtgtaca atacaattgt cgatcgaatc ataaatcacc cagaattatc 9720

acagtttata tcggttgcac ttattagtca gttaaaggcc accatcggag agggttttaga 9780
 tattaatgta aaaggcacgc taaaccgcag gggaaagggt atcagaaggc ctaaaggcgt 9840
 atttttttaga tacatggaat ctccatttgt caatacaaaag gtcactgcat tcttctctta 9900
 tcttcgagat tataataaaa ttgcctcaga atatcacaat aataactaaat tcattctcac 9960
 gttttcatgt caagcatatt gggcatctgg cccaaaacttc tccgccttga agaattgtat 10020
 ttggtgctcc ataattcatg aatacatttc taagtttgtg gaaagagaac aggataaagg 10080
 tcatatagga gatcaggagc taccgcctga agaggaccct tctcgtgaac taaacaatgt 10140
 acaacatgaa gtcaatagtt taacggaaca agatgcggag gcggatgaag gattgtgggg 10200
 tgaaatagat tcattatgtg aaaaatggca gtctgaagcg gagagtcaaa ctgaggcgga 10260
 gataatagcc gacaggataa ttggaaatag ccagaggatg gcgaacctca aaattcgtcg 10320
 taaaaagttc aaaagtgtct tgtatcatat actaaaggaa ctaattcaat ctgagggaac 10380
 cgtaaagggt tatcgcggtg gtagtttttc acacgattcg ataaagataa gcttacatta 10440
 tgaagagcag catattacag ccgtatgggt ctacttgata gtaaaatttg aagagcattg 10500
 gaagcctgtt gatgtagagg tcgagtttag atgcaagttc aaggagcgaa aggtggatgg 10560
 gtaggttata tagggatata gcacagagat atatagcaaa gagatacttt tgaggcaatg 10620
 tttgtggaag cggatttcgc aatattttag tagctcgta cagtccggtg cgtttttgggt 10680
 tttttgaaag tgcgtcttca gagcgctttt ggttttcaaa agcgctctga agttcctata 10740
 ctttctagag aataggaact tcggaatagg aacttcaaag cgtttccgaa aacgagcgct 10800
 tccgaaaatg caacgcgagc tgcgcacata cagctcactg ttcacgtcgc acctatatct 10860
 gcgtgttgcc tgtatatata tatacatgag aagaacggca tagtgcggtt ttatgcttaa 10920
 atgcgtactt atatgcgtct atttatgtag gatgaaagggt agtctagtac ctctgtgat 10980
 attatcccat tccatgcggg gtatcgtatg ctcccttcag cactaccctt tagctgttct 11040
 atatgctgcc actcctcaat tggattagtc tcaccttca atgcattcat ttcctttgat 11100
 attggatcat accctagaag tattacgtga ttttctgccc cttaccctcg ttgctactct 11160
 cttttttttc gtgggaaccg ctttagggcc ctcaagtatg gtgttttgta atttatatgc 11220
 tctcttgca tttgtgtctc tacttcttgt tcgctggag ggaacttctt catttgtatt 11280
 agcatgggtc acttcagtcc ttccttcaa ctcaactctt ttttgctgta aacgattctc 11340
 tgccgccagt tcattgaaac tattgaatat atcctttaga gattccggga tgaataaatc 11400
 acctattaaa gcagcttgac gatctggtgg aactaaagta agcaattggg taacgacgct 11460
 tacgagcttc ataacatctt ctccggttg agctggtggg actaataact gtgtacaatc 11520

catttttctc atgagcattt cggtagctct cttcttgtct ttctcgggca atcttctctat 11580
 tattatagca atagatttgt atagttgctt tctattgtct aacagcttgt tattctgtag 11640
 catcaaactc atggcagcct gacttgcttc ttgtgaagag agcataccat ttccaatcga 11700
 agatacgtg gaatcttctg cgctagaatc aagaccatac ggctaccgg ttgtgagaga 11760
 ttccatgggc cttatgacat atcctggaaa gagtagctca tcagacttac gtttactctc 11820
 tatatcaata tctacatcag gagcaatcat ttcaataaac agccgacata catcccagac 11880
 gctataagct gtacgtgctt ttaccgtcag attcttggct gtttcaatgt cgtccatttt 11940
 ggttttcttt taccagtatt gttcgtttga taatgtatc ttgcttatta cattataaaa 12000
 tctgtgcaga tcacatgtca aaacaacttt ttatcacaag atagtaccgc aaaacgaacc 12060
 tgcgggccgt ctaaaaatta aggaaaagca gcaaagggtgc attttttaaa tatgaaatga 12120
 agataccgca gtaccaatta ttttcgcagt acaaataatg cgcggccggt gcatttttctg 12180
 aaagaacgag agacaaacag gacaattaaa gttagttttt cgagttagcg tgtttgaata 12240
 ctgcaagata caagataaat agagtagttg aaactagata tcaattgcac acaagatcgg 12300
 cgctaagcat gccacaattt ggtatattat gtaaaacacc acctaagggtg cttgttcgtc 12360
 agtttgtgga aaggtttgaa agaccttcag gtgagaaaat agcattatgt gctgctgaac 12420
 taacctattt atgttggtg attacacata acggaacagc aatcaagaga gccacattca 12480
 tgagctataa tactatcata agcaattcgc tgagtttcga tattgtcaat aaatcactcc 12540
 agtttaata caagacgcaa aaagcaaca ttctggaagc ctcatataag aaattgattc 12600
 ctgcttgga atttacaatt attccttact atggacaaaa acatcaatct gatatcactg 12660
 atattgtaag tagtttgcaa ttacagttcg aatcatcgga agaagcagat aagggaaata 12720
 gccacagtaa aaaaatgcta aagcacttct aagtgagggt gaaagcatct gggagatcac 12780
 tgagaaaata ctaaatcgt ttgagtatac ttcgagattt acaaaaacaa aaactttata 12840
 ccaattcctc ttctagcta ctttcatcaa ttgtggaaga ttacgcgata ttaagaacgt 12900
 tgatccgaaa tcattttaat tagtccaaaa taagtatctg ggagtaataa tccagtgttt 12960
 agtgacagag acaaagacaa gcgttagtag gcacatatat ttcttttagcg caaggggtag 13020

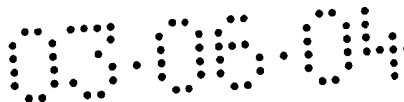
<210> 44
 <211> 15810
 <212> DNA
 <213> vektor pSYlaMFE1sH6a

<400> 44
 atcgataagc ttttcaattc aattcatcat ttttttttta ttcttttttt tgatttcggt 60
 ttctttgaaa tttttttgat tcggtaatct ccgaacagaa ggaagaacga aggaaggagc 120



acagacttag attggtatat atacgcatat gtagtggtga agaaacatga aattgcccag 180
 tattcttaac ccaactgcac agaacaaaaa cctgcaggaa acgaagataa atcatgtcga 240
 aagctacata taaggaacgt gctgtacttc atcctagtcc tgttgetgcc aagctattta 300
 atatcatgca cgaaaagcaa acaaacttgt gtgcttcatt ggatgttcgt accaccaagg 360
 aattactgga gttagtgtga gcattaggtc ccaaaatttg tttactaaaa acacatgtgg 420
 atatcttgac tgatttttcc atggagggca cagttaagcc gctaaaggca ttatccgcca 480
 agtacaattt tttactcttc gaagacagaa aatttgctga cattggtaat acagtcaaat 540
 tgcagtactc tgcgggtgta tacagaatag cagaatgggc agacattacg aatgcacacg 600
 gtgtgggtggg cccaggtatt gttagcgggt tgaagcaggc ggcagaagaa gtaacaaagg 660
 aacctagagg ccttttgatg ttagcagaat tgtcatgcaa gggctcccta tctactggag 720
 aatatactaa gggtagtgtt gacattgcga agagcgacaa agattttgtt atcggcttta 780
 ttgctcaaag agacatgggt ggaagagatg aaggttacga ttggttgatt atgacacccg 840
 gtgtgggttt agatgacaag ggagacgcat tgggtcaaca gtatagaacc gtggatgatg 900
 tggctcttac aggatctgac attattattg ttggaagagg actatttgca aagggaaggg 960
 atgctaaggt agaggggtgaa cgttacagaa aagcaggctg ggaagcatat ttgagaagat 1020
 gcggccagca aaactaaaaa actgtattat aagtaaatgc atgtatacta aactcacaaa 1080
 ttagagcttc aatttaatta tatcagttat taccgggaa tctcggtcgt aatgattttt 1140
 ataatgacga aaaaaaaaaa attggaaaga aaaagcttta atgcggtagt ttatcacagt 1200
 taaattgcta acgcagtcag gcaccgtgta tgaaatctaa caatgcgctc atcgatcatcc 1260
 tcggcacccg caccctggat gctgtaggca taggcttggg tatgcgggta ctgccggggc 1320
 tcttgcgga tatcgccat tccgacagca tcgccagtca ctatggcgtg ctgctagcgc 1380
 tatatgcgtt gatgcaattt ctatgcgcac ccgttctcgg agcactgtcc gaccgctttg 1440
 gccgccgcc agtcctgtc gcttcgtac ttggagccac tatcgactac gcgatcatgg 1500
 cgaccacacc cgtcctgtgg atccttcaat atgcgcacat acgctgttat gttcaaggtc 1560
 ccttcgttta agaacgaaag cggcttctct tttgagggat gtttcaagtt gttcaaactc 1620
 atcaaatttg caaatcccca gtctgtatct agagcgttga atcggtgatg cgatttgta 1680
 attaaattga tgggtgcacc attaccaggt ctagatatac caatggcaaa ctgagcacia 1740
 caataccagt ccggatcaac tggcaccatc tctcccgtag tctcatctaa tttttcttcc 1800
 ggatgaggtt ccagatatac cgcaacacct ttattatggt ttccctgagg gaataataga 1860
 atgtccatt cgaaatcacc aattctaaac ctgggcgaat tgtatttcgg gtttgtaac 1920
 tcgttccagt caggaatggt ccacgtgaag ctatcttcca gcaaagtctc cacttcttca 1980

tcaaattgtg gagaatactc ccaatgctct tatctatggg acttccggga aacacagtac 2040
 cgatacttcc caattcgtct tcagagctca ttgtttgttt gaagagacta atcaaagaat 2100
 cgtttttctca aaaaaattaa tatcttaact gatagtttga tcaaaggggc aaaacgtagg 2160
 ggcaaacaaa cggaaaaatc gttttctcaa ttttctgatg ccaagaactc taaccagtct 2220
 tatctaaaaa ttgccttatg atccgtctct cgggttacag cctgtgtaac tgattaatcc 2280
 tgcccttcta atcaccatto taatgtttta attaagggat tttgtcttca ttaacggctt 2340
 tcgctcataa aaatgttatg acgttttgcc cgcaggcggg aaaccatcca cttcacgaga 2400
 ctgatctcct ctgccggaac accgggcata tccaacttat aagttggaga aataagagaa 2460
 tttcagattg agagaatgaa aaaaaaaaaa cctgaaaaaa aaggttgaaa ccagttccct 2520
 gaaattattc ccctacttga ctaataagta tataaagacg gtaggtattg attgtaattc 2580
 tgtaaactca tttcttaaac ttcttaaatt ctacttttat agttagtctt ttttttagtt 2640
 ttaaaacacc aagaacttag tttcgaataa acacacataa acaaacacca tgagatttcc 2700
 ttcaattttt actgcagttt tattcgcagc atcctccgca ttagctgctc cagtcaacac 2760
 tacaacagaa gatgaaacgg cacaaattcc ggcgaagct gtcacgggtt actcagattt 2820
 agaaggggat ttcgatgttg ctgttttgcc attttccaac agcacaataa acgggttatt 2880
 gtttataaat actactattg ccagcattgc tgctaaagaa gaaggggtat ctctagataa 2940
 aaggtatgag gtgcgcaacg tgtccgggat gtaccatgtc acgaacgact gctccaactc 3000
 aagcattgtg tatgaggcag cggacatgat catgcacacc cccgggtgcg tgccctgcgt 3060
 tcggggagaac aactcttccc gctgctgggt agcgtcacc cccacgctcg cagctaggaa 3120
 cgccagcgtc ccactacga caatacgacg ccacgtcgat ttgctcgttg gggcggctgc 3180
 tttctgttcc gctatgtaag tgggggatct ctgcggatct gtcttctcgc tctccagct 3240
 gttcaccatc tcgcctcgcc ggcattgagac ggtgcaggac tgcaattgct caatctatcc 3300
 cgccacata acgggtcacc gtatggcttg ggatatgatg atgaactggc accaccacca 3360
 tcaccattaa agatctogac ttggttgaac acgttgccaa ggcttaagtg aatttacttt 3420
 aaagtcttgc atttaaataa attttctttt tatagcttta tgacttagtt tcaatttata 3480
 tactatttta atgacatttt cgattcattg attgaaagct ttgtgttttt tcttgatgcg 3540
 ctattgcatt gttcttgtct ttttcgccac atgtaatatc tgtagtagat acctgataca 3600
 ttgtggatgc tgagtgaat tttagttaat aatggaggcg ctcttaataa ttttggggat 3660
 attggctttt ttttttaaag tttacaaatg aattttttcc gccaggataa cgattctgaa 3720
 gttactctta gcgttctat cggtagagcc atcaaatcat gcctataaat catgcctata 3780



tttagcgtgca gtcagtatca tctacatgaa aaaaactccc gcaattttctt atagaatacgc 3840
 ttgaaaatta aatgtacgcg ccaagataag ataacatata tctagctaga tgcagtaata 3900
 tacacagatt cccgcggacg tgggaaggaa aaaattagat aacaaaatct gagtgatatg 3960
 gaaattccgc tgtatagctc atatctttcc cttaacacc agaaatgtaa aaatcttggt 4020
 acgaaggatc tttttgctaa tgtttctcgc tcaatcctca tttcttccct acgaagagtc 4080
 aaatctactt gttttctgcc ggtatcaaga tccatatctt ctagtttcac catcaaagtc 4140
 caattttctag tatacagttt atgtcccaac gtaacagaca atcaaaattg gaaaggataa 4200
 gtatccttca aagaatgatt ctgcgctggc tctgaaccg cctaattgga acagagaagt 4260
 ccaaaacgat gctataagaa ccagaaataa aacgataaaa ccataccagg atcctctacg 4320
 ccggacgcat cgtggccggc atcacggcg ccacaggtgc ggttgctggc ccctatatcg 4380
 ccgacatcac cgatggggaa gatcgggctc gccacttcgg gctcatgagc gcttgtttcg 4440
 gcgtgggtat ggtggcaggc cccgtggccg ggggactggt gggcgccatc tcttgcatg 4500
 caccattcct tggggcgcg gtgctcaacg gctcaacct actactgggc tgcttcctaa 4560
 tgcaggagtc gcataaggga gagcgtcgac cgatgccctt gagagccttc aaccagtc 4620
 gctccttcgg gtggcgcg ggcatgacta tgcgcgcgc acttatgact gtcttcttta 4680
 tcatgcaact cgtaggacag gtgcggcag cgctctgggt cattttcggc gaggaccgct 4740
 ttgcgtggag cgcgacgat atcggcctgt cgcttgcggt attcggaatc ttgcacgcc 4800
 tcgctcaagc cttcgtcact ggtcccgcca ccaaactgtt cggcgagaag caggccatta 4860
 tcgcccgcgt ggcggccgac gcgctgggct acgtcttgcg ggcgttcgcg acgcgaggct 4920
 ggatggcctt cccattatg attcttctcg ctccggcg catcgggatg cccgcgttcg 4980
 aggcgatgct gtccaggcag gtagatgacg accatcaggg acagcttcaa ggatcgctcg 5040
 cggtctttac cagcctaact tcgatcactg gaccgctgat cgtcacggcg atttatgccg 5100
 cctcggcgag cacatggaac gggttggcat ggattgtagg cgcgcacctt taccttgctc 5160
 gctcccccgc gttgcgtcgc ggtgcatgga gccggggccac ctgcacctga atggaagccg 5220
 gcggcacctc gctaacggat tcaccactcc aagaattgga gccaatcaat tcttgcgag 5280
 aactgtgaat gcgcaaacca acccttgga gaacatatcc atcgcgtccg ccactctcag 5340
 cagccgcacg cggcgcatct cgggcagcgt tgggtcctgg ccacgggtgc gcatgatcgt 5400
 gctcctgctg ttgaggaccc ggetaggctg gcgggggttc cttactgggt agcagaatga 5460
 atcacggata cgcgagcgaa cgtgaagcga ctgctgctgc aaaacgtctg cgacctgagc 5520
 aacaacatga atggtcttcg gtttcctgt ttcgtaaagt ctggaaacgc ggaagtcagc 5580
 gccctgcacc attatgttcc ggatctgcat cgcaggatgc tgctggctac cctgtggaac 5640



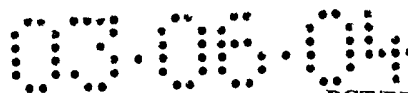
acctacatct gtattaacga agcgctggca ttgacctga gtgatttttc tctgggtcccg 5700
 ccgcatccat accgccagtt gtttaccctc acaacgttcc agtaaccggg catgttcate 5760
 atcagtaacc cgtatcgtga gcatcctctc tcgtttcate ggtatcatta ccccatgaa 5820
 cagaaattcc cccttacacg gaggcacaa gtgaccaaac aggaaaaaac cgcccttaac 5880
 atggcccgct ttatcagaag ccagacatta acgcttctgg agaaactcaa cgagctggac 5940
 gcggatgaac aggcagacat ctgtgaatcg cttcacgacc acgctgatga gctttaccgc 6000
 agctgcctcg cgcgtttcgg tgatgacggg gaaaacctct gacacatgca gctcccgag 6060
 acggtcacag cttgtctgta agcgggtccg ggagcagaca agcccgtag ggcgcgtcag 6120
 cgggtgttgg cgggtgtcgg ggcgcagcca tgaccagtc acgtagcgat agcggagtgt 6180
 atactggctt aactatgcgg catcagagca gattgtactg agagtgcacc atatgcgggtg 6240
 tgaaataccg cacagatgcg taaggagaaa ataccgcac aggcgtctct ccgcttcctc 6300
 gctcactgac tcgctgcgct cggctgttcg gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaa 6360
 ggcggttaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa 6420
 aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct 6480
 ccgccccct gacgagcatc aaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaaccgcac 6540
 aggactataa agataccagg cgtttcccc tggaagctcc ctgctgcgct ctctgttcc 6600
 gacctgcg cttaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttc 6660
 tcatagctca cgctgtagg atctcagttc ggtgtaggtc gttcgctcca agctgggctg 6720
 tgtgcacgaa cccccgttc agcccgaccg ctgcgcctta tccggttaact atcgtcttga 6780
 gtccaaccgg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag 6840
 cagagcgagg tatgtaggcg gtgtacaga gttcttgaag tgggtggcta actacggcta 6900
 cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc tctgtgaag ccagttacct tcggaaaaag 6960
 agttggtagc tcttgatccg gcaaacaac caccgctggg agcgggtggt tttttgtttg 7020
 caagcagcag attacgcgca gaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga tcttttctac 7080
 ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc acgttaaggg attttggta tgagattatc 7140
 aaaaaggatc ttcacctaga tcctttttaa ttaaaaatga agttttaaat caatctaaag 7200
 tatatatgag taaacttggg ctgacagtta ccaatgctta atcagtgagg cacctatctc 7260
 agcgatctgt ctatttcggt catccatagt tgctgactc cccgtcgtgt agataactac 7320
 gatacgggag ggcttaccat ctggccccag tgctgcaatg ataccgcgag acccagctc 7380
 accggctcca gatttatcag caataacca gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg 7440



tcctgcaact ttatccgcct ccatccagtc tattaattgt tgccgggaag ctagagtaag 7500
 tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaacgt tgttgccatt gctgcaggca tegtgggtgc 7560
 acgctcgctg tttggtatgg cttcattcag ctccggttcc caacgatcaa ggcgagttac 7620
 atgatcccc atgttgtgca aaaaagcggg tagctccttc ggtcctccga tegtgtgcag 7680
 aagtaagttg gccgcagtgt tatcactcat ggttatggca gcactgcata attctcttac 7740
 tgtcatgcca tccgtaagat gcttttctgt gactgggtgag tactcaacca agtcattctg 7800
 agaatagtgt atgcggcgac cgagttgctc ttgccggcg tcaacacggg ataataccgc 7860
 gccacatagc agaactttta aagtgtcat cattggaaaa cgttcttcgg ggcgaaaact 7920
 ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag ttcgatgtaa cccactcgtg caccacaactg 7980
 atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa 8040
 tgccgcaaaa aaggaataa gggcgacacg gaaatgttga atactcatac tcttctcttt 8100
 tcaatattat tgaagcattt atcagggtta ttgtctcatg agcggatata tatttgaatg 8160
 tatttagaaa aataaaca aa taggggttcc ggcacattt ccccgaaaag tgccacctga 8220
 cgtctaagaa accattatta tcatgacatt aacctataaa aaataggcgt atcacgaggc 8280
 cctttcgtct tcaagaattc tcatgtttga cagcttatca tcatccact tgtatatttg 8340
 gatgaatttt tgaggaattc tgaaccagtc ctaaaacgag taaataggac cggcaattct 8400
 tcaagcaata aacaggaata ccaattatta aaagataact tagtcagatc gtacaataaa 8460
 gctttgaaga aaaatgcgcc ttattcaatc ttgcataaa aaaatggccc aaaatctcac 8520
 attggaagac atttgatgac ctatttctt tcaatgaagg gcctaacgga gttgactaat 8580
 gttgtgggaa attggaccga taagcgtgct tctgcgtgg ccaggacaac gtatactcat 8640
 cagataacag caatacctga tcaactcttc gcactagttt ctcggtacta tgcataatgat 8700
 ccaatatcaa aggaaatgat agcattgaag gatgagacta atccaattga ggagtggcag 8760
 catatagaac agctaaaggg tagtgctgaa ggaagcatac gataccccgc atggaatggg 8820
 ataatatcac aggaggtact agactacctt tcatcctaca taaatagacg catataagta 8880
 cgcatttaag cataaacacg cactatgccg ttcttctcat gtatatatat atacaggcaa 8940
 cagcagata taggtgcgac gtgaacagtg agctgtatgt gcgcagctcg cgttgcaattt 9000
 tcggaagcgc tegtcttcgg aaacgctttg aagttctat tccgaagttc ctattctcta 9060
 gaaagtatag gaacttcaga gcgcttttga aaaccaaag cgctctgaag acgcactttc 9120
 aaaaaacca aaacgcaccg gactgtaacg agctactaaa atattgcgaa taccgcttcc 9180
 acaaacattg ctcaaaagta tctctttgct atatatctct gtgctatata cctatataac 9240
 catcccatcc accttcgct ccttgaactt gcatctaaac tcgacctta cattttttat 9300

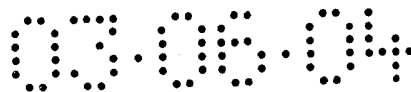


gtttatctct agtattacct cttagacaaa aaaattgtag taagaactat tcatagagtt 9360
 aatcgaaaac aatacgaaaa tgtaaacatt tcctatacgt agtatataga gacaaaatag 9420
 aagaaaccgt tcataatttt ctgaccaatg aagaatcatc aacgctatca ctttctgttc 9480
 acaaagtatg cgcaatccac atcgggtatag aatataatcg gggatgcctt tatcttgaaa 9540
 aaatgcaccc gcagcttcgc tagtaatcag taaacgcggg aagtggagtc aggctttttt 9600
 tatggaagag aaaatagaca ccaaagtagc cttcttctaa ccttaacgga cctacagtgc 9660
 aaaaagttat caagagactg cattatagag cgcacaaagg agaaaaaag taatctaaga 9720
 tgctttgtta gaaaaatagc gctctcggga tgcatttttg tagaacaaaa aagaagtata 9780
 gattcttggt ggtaaaatag cgctctcgcg ttgcatttct gttctgtaaa aatgcagctc 9840
 agattctttg ttgaaaaat tagcgtcttc gcgttgcat tttgttttac aaaaatgaag 9900
 cacagattct tcgttggtaa aatagcgtt tcgcgttgca tttctgttct gtaaaaatgc 9960
 agctcagatt ctttgtttga aaaattagcg ctctcgcgtt gcatttttgt tctacaaaat 10020
 gaagcacaga tgcttcgtta acaaagatat gctattgaag tgcaagatgg aaacgcagaa 10080
 aatgaaccgg ggatgcgacg tgcaagatta cctatgcaat agatgcaata gtttctccag 10140
 gaaccgaaat acatacattg tcttcgtaa agcgttagac tatatattat tatacaggtt 10200
 caaatatact atctgtttca gggaaaactc ccaggttcgg atgttcaaaa ttcaatgatg 10260
 ggtaacaagt acgatcgtaa atctgtaaaa cagtttgctg gatattaggc tgtatctcct 10320
 caaagcgtat tcgaatatca ttgagaagct gcattttttt tttttttttt tttttttttt 10380
 tttttatata tatttcaagg atataccatt gtaatgtctg cccctaagaa gatcgtcgtt 10440
 ttgccaggtg accacgttgg tcaagaaatc acagccgaag ccattaaggt tottaaagct 10500
 atttctgatg ttctgtccaa tgtcaagttc gatttcgaaa atcatttaat tgggtggtgct 10560
 gctatcgatg ctacaggtgt ccacttcca gatgagggcg tggaagcctc caagaaggtt 10620
 gatgccgttt tgttaggtgc tgtgggtggt cctaaatggg gtaccggtag tgttagacct 10680
 gaacaaggtt tactaaaaat ccgtaaagaa cttcaattgt acgccaaact aagaccatgt 10740
 aactttgcat ccgactctct tttagactta tctccaatca agccacaatt tgctaaaggt 10800
 actgacttcg ttgttgtcag agaattagtg ggaggtatct acttttggtta gagaaaggaa 10860
 gacgatgggt atggtgtcgc ttgggatagt gaacaatata ccgttccaga agtgcaaaga 10920
 atcacaagaa tggccgcttt catggcccta caacatgagc caccattgcc tatttgggtcc 10980
 ttggataaag ctaatgtttt ggcctottca agattatgga gaaaaactgt ggaggaaacc 11040
 atcaagaacg aattccctac attgaaggtt caacatcaat tgattgattc tgccgccatg 11100



atcctagtta agaacccaac ccacctaataat ggtattataa tcaccagcaa catgtttggt 11160
gatatcatct ccgatgaagc ctccgttatc ccaggttcct tgggtttggt gccatctgcg 11220
tccttggcct ctttgccaga caagaacacc gcatttggtt tgtacgaacc atgccacggt 11280
tctgctccag atttgccaaa gaataagggt gaccctatcg ccactatctt gtctgctgca 11340
atgatgttga aattgtcatt gaacttgcct gaagaaggta aggccattga agatgcagtt 11400
aaaaagggtt tggatgcagg tatcagaact ggtgatttag gtggttccaa cagtaccacc 11460
gaagtccgtg atgctgtcgc cgaagaagtt aagaaaatcc ttgcttaaaa agattctctt 11520
tttttatgat atttgtacaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 11580
aaaatgcagc gtcacatcgg ataataatga tggcagccat tgtagaagtg ctttttgcatt 11640
ttctagtctc ttctcggtc tagctagttt tactacatcg cgaagataga atcttagatc 11700
acactgcctt tgetgagctg gatcatatga gtaacaaaag agtggttaagg cctcgttaaa 11760
ggacaaggac ctgagcggaa gtgtatcgta aagtagacgg agtatactag tatagtctat 11820
agtcctgga attctaagtg ccagctttat aatgtcattc tccttactac agaccgcct 11880
gaaagtagac acatcatcat cagtaagctt tgacaaaaag cattgagtag ctaactcttc 11940
tatgcaatct atagctgttt tataaggcat tcaatggaca gattgaggtt ttgaaacat 12000
actagtgaat ttagccttaa tcccttctcg aagttaatca tgcattatgg tgtaaaaaat 12060
gcaactcgcg ttgctctact tttcccgaa tttccaaata cgcagctggg gtgattgctc 12120
gatttcgtaa cgaaagtttt gtttataaaa accgcgaaaa ccttctgtaa cagatagatt 12180
tttacagcgc tgatatacaa tgacatcagc tgtaatggaa aataactgaa atatgaatgg 12240
cgagagactg cttgcttgta ttaagcaatg tattatgcag cacttccaac ctatggtgta 12300
cgatgaaagt aggtgtgtaa tcgagacgac aagggggact tttccagttc ctgatcatta 12360
taagaaatac aaaacgttag catttgcat tgttggacat gtactgaata cagacgacac 12420
accggttaatt gaaaaagaac tggattggcc tgatcctgca ctagtgtaca atacaattgt 12480
cgatcgaatc ataaatcacc cagaattatc acagtttata tcggttgcat ttattagtca 12540
gttaaaggcc accatcggag agggtttaga tattaatgta aaaggcagc taaaccgcag 12600
gggaaagggt atcagaaggc ctaaaggcgt attttttaga tacatggaat ctccatttgt 12660
caatacaaag gtcactgcat tcttctctta tcttcgagat tataataaaa ttgcctcaga 12720
atatcacaat aatactaaat tcattctcac gttttcatgt caagcatatt gggcatctgg 12780
cccaaacttc tccgccttga agaattgtat ttggtgctcc ataattcatg aatacatttc 12840
taagtttgtg gaaagagaac aggataaagg tcatatagga gatcaggagc taccgcctga 12900
agaggaccct tctcgtgaac taaacaatgt acaacatgaa gtcaatagtt taacggaaca 12960

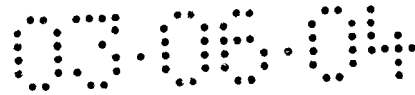
agatgctggag gcggatgaag gattgtgggg tgaaatagat tcattatgtg aaaaatggca 13020
gtctgaagcg gagagtcaaa ctgaggcgga gataatagcc gacaggataa ttggaaatag 13080
ccagaggatg gcgaacctca aaattcgctg tacaaagttc aaaagtgtct tgtatcatat 13140
actaaaggaa ctaattcaat ctcagggaac cgtaaagggt tatcgcggtg gtagtttttc 13200
acacgattcg ataaagataa gcttacatta tgaagagcag catattacag ccgtatgggt 13260
ctacttgata gtaaaatttg aagagcattg gaagcctgtt gatgtagagg tcgagtttag 13320
atgcaagttc aaggagcgaa aggtggatgg gtaggttata tagggatata gcacagagat 13380
atatagcaaa gagatacttt tgaggcaatg tttgtggaag cggatttcgc aatatttttag 13440
tagctcgta cagtccggtg cgtttttggt tttttgaaag tgcgtcttca gagcgctttt 13500
ggttttcaaa agcgctctga agttcctata ctttctagag aataggaaact tcggaatagg 13560
aacttcaaag cgtttccgaa aacgagcgt tccgaaaatg caacgcgagc tgcgcacata 13620
cagctcactg ttcacgtcgc acctatatct gcgtgttgcc tgtatatata tatacatgag 13680
aagaacggca tagtgcgtgt ttatgcttaa atgcgtactt atatgcgtct atttatgtag 13740
gatgaaagggt agtctagtag ctccgtgat attatcccat tccatgcggg gtatcgtatg 13800
cttccctcag cactaccctt tagctgttct atatgctgcc actcctcaat tggattagtc 13860
tcaccttca atgcattcat ttcctttgat attggatcat accctagaag tattacgtga 13920
ttttctgccc cttaccctcg ttgctactct cctttttttc gtgggaaccg ctttagggcc 13980
ctcagtgatg gtgttttgta atttatatgc tcctcttgca tttgtgtctc tacttcttgt 14040
tcgctggag ggaacttctt catttgtatt agcatggttc acttcagtcc ttccttccaa 14100
ctcactcttt ttttgctgta aacgattctc tgccgccagt tcattgaaac tattgaatat 14160
atcctttaga gattccggga tgaataaatc acctattaaa gcagcttgac gatctgggtg 14220
aactaaagta agcaattggg taacgacgct tacgagcttc ataacatctt cttccgttgg 14280
agctgggtgg actaataact gtgtacaatc cttttttctc atgagcattt cggtagctct 14340
cttcttgtct ttctcgggca atcttctat tattatagca atagatttgt atagttgctt 14400
tctattgtct aacagcttgt tattctgtag catcaaatct atggcagcct gacttgcttc 14460
ttgtgaagag agcataccat ttccaatcga agatacgtg gaatcttctg cgctagaatc 14520
aagaccatac ggcctaccgg ttgtgagaga ttccatgggc cttatgacat atcctggaaa 14580
gagtagctca tcagacttac gtttactctc tatatcaata tctacatcag gagcaatcat 14640
ttcaataaac agccgacata catcccagac gctataagct gtacgtgctt ttaccgtcag 14700
attcttggct gtttcaatgt cgtccatttt ggttttcttt taccagtatt gttcgtttga 14760



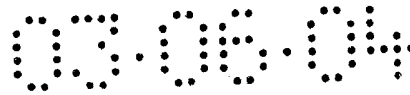
taatgtattc ttgcttatta cattataaaa tctgtgcaga tcacatgtca aaacaacttt 14820
ttatcacaag atagtaccgc aaaacgaacc tgcgggccgt ctaaaaatta aggaaaagca 14880
gcaaaggtgc attttttaaaa tatgaaatga agataccgca gtaccaatta ttttcgcagt 14940
acaaataatg cgcggccggt gcatttttcg aaagaacgcg agacaaacag gacaattaaa 15000
gttagttttt cgagtttagc tgtttgaata ctgcaagata caagataaat agagtagttg 15060
aaactagata tcaattgcac acaagatcgg cgctaagcat gccacaattt ggtatattat 15120
gtaaaacacc acctaagggtg cttgttcgct agtttgtgga aaggtttgaa agaccttcag 15180
gtgagaaaat agcattatgt gctgctgaac taacctattt atgttggatg attacacata 15240
acggaacagc aatcaagaga gccacattca tgagctataa tactatcata agcaattcgc 15300
tgagtttcga tattgtcaat aaatcactcc agtttaata caagacgcaa aaagcaacaa 15360
ttctggaagc ctcatataag aaattgattc ctgcttggga atttacaatt attccttact 15420
atggacaaaa acatcaatct gatatcactg atattgtaag tagtttgcaa ttacagttcg 15480
aatcatcgga agaagcagat aagggaata gccacagtaa aaaaatgcta aagcacttct 15540
aagtgagggg gaaagcatct gggagatcac tgagaaaata ctaaattcgt ttgagtatac 15600
ttcgagattt acaaaaacaa aaactttata ccaattcttc ttcttagcta ctttcatcaa 15660
ttgtggaaga ttcagcgata ttaagaacgt tgatccgaaa tcattttaat tagtccaaaa 15720
taagtatctg ggagtaataa tccagtgttt agtgacagag acaaagacaa gcgttagtag 15780
gcacatatat ttcttttagc caaggggtag 15810

<210> 45
<211> 3928
<212> DNA
<213> vektor pBKS-E2SH6

<400> 45
cacctaaatt gtaagcgta atattttgtt aaaattcgcg ttaaattttt gttaaatcag 60
ctcatttttt aaccaatagg ccgaaatcgg caaaatccct tataaatcaa aagaatagac 120
cgagataggg ttgagtgttg ttccagtttg gaacaagagt ccactattaa agaacgtgga 180
ctccaacgct aaagggcgaa aaaccgtcta tcagggcgat ggcccactac gtgaaccatc 240
accctaatac agtttttttg ggtcgaggtg ccgtaaagca ctaaatcgga accctaaagg 300
gagccccga ttttagactt gacggggaaa gccggcgaac gtggcgagaa aggaagggaa 360
gaaagcgaag ggagcgggct ctagggcgct ggcaagtgtg gcggtcacgc tgcgcgtaac 420
caccacacc gccgcgctta atgcgcgct acagggcgcg tccattcgc cattcaggct 480
gcgcaactgt tgggaagggc gatcgggtgc ggctctctcg ctattacgcc agctggcgaa 540



agggggatgt gctgcaaggc gattaagttg ggtaacgccca gggttttccc agtcacgacg 600
 ttgtaaaacg acggccagtg aattgtaata cgactcacta tagggcgaat tgggtaccgg 660
 gccccccctc gaggtcgacg gtatcgataa gcttgcacgc ctgcagttaa ttaactatta 720
 gtgatgggtg tgatgggtgc tgccctcgat cacctgccac tctgtttag acagcagcag 780
 cgggctaagc tctgatctat ccctgtcctc caagtcacaa cgctctcctc gagtccaatt 840
 gcatgcggct tcgaacctgt gctccacgcc cccacgtac atcctaacct tgaagatggg 900
 gaagttgaca gtgcaggggt agtgccagag cctatatggg taatgaacca tacacctagg 960
 tgtcagccag ggcccagaac cgcactctggc gtaggtggcc tcgggggtgt tccgaaaaca 1020
 gtcagtgggg caggtcaagg tgttgttgcc ggcccccccg atgttgacg gggggccccc 1080
 acacgtcttg gtgaacccag tgccattcat ccatgtacag ccgaaccagt tgcctcgcg 1140
 cggccgcgtg ttgttgagaa tcagcacatc cgagtcgttc gccccccagt tatacgtggg 1200
 gacaccaaac cgatcggtcg tccccaccac aacagggctc ggggtgaagc aatacactgg 1260
 accgcacacc tgagacgcgg gtacaatacc acacggtcga ggcgcgtagt gccagcagta 1320
 gggcctctgg tccgagctgt taggctcagt gtaagtggg ggacccacc cctgagcgaa 1380
 cttgtcgatg gagcgacagc tggccaagcg ctctgggcat ccagacgagt tgaatttgtg 1440
 tttgtagaat agtgcgcaa agaacctgt ttggaggag tcgttgacgt tcagggcagt 1500
 cctgttgatg tgccaactgc cggttggtgt tacgagctgg attttctgag ccgacccggg 1560
 gctaaagagg gacacaaggc ccctggatc ggaggctgct gccctcctg acacgcgggt 1620
 atggtaccgg gccccccctc gaggtcgacg gtatcgataa gcttgatata gaattcctgc 1680
 agccggggg atccactagt totagagcg ccgccaccgc ggtggagctc cagcttttgt 1740
 tccctttagt gaggttaat ttcgagcttg gcgtaatcat ggtcatagct gtttcctgtg 1800
 tgaaattgtt atccgctcac aattccacac aacatacgag ccggaagcat aaagtgtaaa 1860
 gcctgggggt cctaataagt gagctaactc acattaattg cggtgcgctc actgcccgct 1920
 ttccagtcgg gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga 1980
 ggcggtttgc gtattggcg ctcttcgct tctcgcctca ctgactcgt gcgctcggtc 2040
 gttcggctgc ggcgagcggt atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa 2100
 tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt 2160
 aaaaaggccg cggtgctggc gtttttccat aggtccgcc cccctgacga gcatcacaaa 2220
 aatcgacgt caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt 2280
 cccctggaa gctccctcgt gcgtctcct gttccgacct tgccgcttac cggataacct 2340
 tccgccttc tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gtcacgctg taggtatctc 2400



```

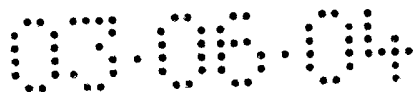
agttcgggtgt aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc 2460
gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggttaag acacgactta 2520
tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggcggtgct 2580
acagagttct tgaagtgggt gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtatc 2640
tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa 2700
caaaccaccg ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa 2760
aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa 2820
aactcacgtt aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt 2880
ttaaattaaa aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac 2940
agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcatcc 3000
atagttgcct gactccccgt cgtgtagata actacgatac gggagggctt accatctggc 3060
cccagtgtcg caatgatacc gcgagacca cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata 3120
aaccagccag ccggaagggc cgagcgcaga agtggtctct caactttatc cgcctccatc 3180
cagtctatta attgttgccg ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgccg 3240
aacgttggtg ccattgctac aggcacgtg gtgtcacgct cgtcgttttg tatggcttca 3300
ttcagctccg gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat ccccatggt gtgcaaaaaa 3360
ggggttagct ccttcgggtc tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtggtatca 3420
ctcatggtta tggcagcact gcataattct cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt 3480
tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat agtgatgcg gcgaccgagt 3540
tgctcttgcc cggcgtcaat acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg 3600
ctcatcattg gaaaacgttc ttccggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga 3660
tccagttcga tgtaaccac tcgtgcaccc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc 3720
agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg caaaatgccg caaaaaaggg aataaggggc 3780
acacggaaat gttgaatact catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag 3840
ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg 3900
gttccgcgca catttccccg aaaagtgc 3928

```

<210> 46
 <211> 6104
 <212> DNA
 <213> vektor pYIG5HCCL-22aH6

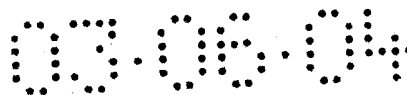
<400> 46
 agcgcccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcgttgcc gattcattaa tgcagctggc 60

acgacaggtt tcccgactgg aaagcgggca gtgagcgcaa cgcaattaat gtgagtttagc 120
 tcactcatta ggcaccccag gctttacact ttatgcttcc ggctcgtatg ttgtgtggaa 180
 ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac gaatttaata 240
 cgactcacta tagggaattc gaggatcctt caatatgcgc acatacgtg ttatgttcaa 300
 ggtcccttcg tttagaacg aaagcgggtc tccctttgag ggatgtttca agttgttcaa 360
 atctatcaaa tttgcaaata cccagtctgt atctagagcg ttgaatcggg gatgcgattt 420
 gttaattaaa ttgatgggtg caccattacc aggtctagat ataccaatgg caaactgagc 480
 acaacaatac cagtcgggat caactggcac catctctccc gtagtctcat ctaatttttc 540
 ttccggatga ggttcagat ataccgcaac acctttatta tggtttccct gagggaaataa 600
 tagaatgtcc cattcgaaat caccaattct aaacctgggc gaattgtatt tcgggtttgt 660
 taactcgttc cagtcaggaa tgttccacgt gaagctatct tccagcaaag tctocacttc 720
 ttcatacaat tgtggagaat actcccaatg ctcttatcta tgggacttcc gggaaacaca 780
 gtaccgatac tcccgaattc gtcttcagag ctcatgtttt gtttgaagag actaatcaaa 840
 gaatcgtttt ctcaaaaaaa ttaatatctt aactgatagt ttgatcaaag gggcaaaacg 900
 taggggcaaa caaacggaaa aatcgtttct caaattttct gatgccaaga actctaacca 960
 gtcttatcta aaaattgcct tatgatccgt ctctccggtt acagcctgtg taactgatta 1020
 atcctgcctt tctaatacacc attctaattg ttttaattaag ggattttgtc ttcattaacg 1080
 gctttcgctc ataaaaatgt tatgacgttt tgcgcgcagg cgggaaacca tccaattcac 1140
 gagactgatc tctctgccg gaacaccggg catctccaac ttataagttg gagaaataag 1200
 agaatttcag attgagagaa tgaaaaaaaa aaacctgaa aaaaaagggt gaaaccagtt 1260
 cctgaaatt attcccctac ttgactaata agtatataaa gacggtaggt attgattgta 1320
 attctgtaaa tctattttctt aaacttttta aattctactt ttatagttag totttttttt 1380
 agtttttaaa caccaagaac ttagtttcga ataaacacac ataaacaaac accatgagat 1440
 ttccttcaat ttttactgca gttttattcg cagcatcctc cgcattagct gctccagtca 1500
 aactacaac agaagatgaa acggcacaaa ttccggctga agctgtcatc gggttactcag 1560
 atttagaagg ggatttcgat gttgctgttt tgccattttc caacagcaca aataacgggt 1620
 tattgtttat aaatactact attgccagca ttgctgctaa agaagaaggg gtatctctag 1680
 ataaaaggca taccgcgtg tcaggagggg cagcagcctc cgataccagg ggccttggtg 1740
 cctcttttag ccccggtcg gctcagaaaa tccagctcgt aaacaccaac ggcagttggc 1800
 acatcaacag gactgcctg aactgcaacg actccctcca aacagggttc tttgcgcac 1860



tattctacaa acacaaattc aactcgtctg gatgcccaga gcgcttgcc agctgtcgtc 1920
 ccatcgacaa gttcgtcag ggggtgggtc ccctcactta cactgagcct aacagctcgg 1980
 accagaggcc ctactgctgg cactacgcgc ctcgaccgtg tggatttgta cccgcgtctc 2040
 aggtgtgcgg tccagtgtat tgcttcaccc cgagccctgt tgtgggtggg acgaccgatc 2100
 ggtttggtgt cccacgtat aactgggggg cgaacgactc ggatgtgctg attctcaaca 2160
 acacgcggcc gcgcgagggc aactggttcg gctgtacatg gatgaatggc actgggttca 2220
 ccaagacgtg tgggggcccc ccgtgcaaca tcgggggggc cggcaacaac accttgacct 2280
 gccccactga ctgttttcgg aagcaccocg aggccactta cgccagatgc ggttctgggc 2340
 cctggctgac acctaggtgt atggttcatt acccatatag gctctggcac taccocctgca 2400
 ctgtcaactt caccatcttc aaggtagga tgtacgtggg gggcgtggag cacaggttcg 2460
 aagccgatg caattggact cgaggagagc gttgtgactt ggaggacagg gatagatcag 2520
 agcttagctc gctgctgctg tctacaacag agtggcaggt gatcgagggc agacaccatc 2580
 accaccatca ctaatagtta attaacgac tcgacttggg tgaacacgtt gccaggctt 2640
 aagtgaattt actttaagt cttgcattta aataaatttt ctttttatag ctttatgact 2700
 tagtttcaat ttatatacta ttttaatgac attttcgatt cattgattga aagctttgtg 2760
 tttttcttg atgcgtatt gcattgttct tgtcttttcc gccacatgta atatctgtag 2820
 tagatacctg atacattgtg gatgctgagt gaaattttag ttaataatgg aggcgtcttt 2880
 aataattttg gggatattgg cttttttttt taaagtttac aaatgaattt tttccgccag 2940
 gataacgatt ctgaagtac tcttagcgtt cctatcggtg cagccatcaa atcatgccta 3000
 taaatcatgc ctatatttgc gtgcagtcag tatcatctac atgaaaaaaaa ctcccgaat 3060
 ttcttataga atacgttgaa aattaaatgt acgcgccaag ataagataac atatatctag 3120
 ctagatgcag taatatacac agattccgc ggacgtggga aggaaaaaat tagataacaa 3180
 aatctgagt atattggaaat tccgctgtat agctcatatc tttcccttca acaccagaaa 3240
 tgtaaaaatc ttgttacgaa ggatcttttt gctaattgtt ctgcctcaat cctcatttct 3300
 tcctacgaa gagtcaaatc tacttgtttt ctgccggtat caagatccat atcttctagt 3360
 ttcaccatca aagtccaatt tctagtatac agtttatgtc ccaacgtaac agacaatcaa 3420
 aattggaaag gataagtatc cttcaaagaa tgattctgcg ctggctcctg aaccgectaa 3480
 tgggaacaga gaagtccaaa acgatgctat aagaaccaga aataaaacga taaaaccata 3540
 ccaggatcca agcttggcac tggcgtcgt tttacaacgt cgtgactggg aaaaccctgg 3600
 cgttaccxaa cttaatcgcc ttgcagcaca tcccccttcc gccagctggc gtaatagcga 3660
 agaggccgc accgatcgcc ctcccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg aatgggaaat 3720

tgtaaacggtt aatattttgt taaaattcgc gttaaatttt tgttaaatca gtcatttttt 3780
 taaccaatag gccgaaatcg gcaaaatccc ttataaatca aaagaataga ccgagatagg 3840
 gttgagtgtt gttccagttt ggaacaagag tccactatta aagaacgtgg actccaacgt 3900
 caaagggcga aaaaccgtct atcagggcga tggccacta cgtgaaccat caccctaate 3960
 aagttttttg gggtcgaggt gccgtaaagc actaaatcgg aaccctaaag ggagcccccg 4020
 atttagagct tgacggggaa agccggcgaa cgtggcgaga aaggaaggga agaaagcgaa 4080
 aggagcgggc gctagggcgc tggcaagtgt agcggtcacg ctgcgcgtaa ccaccacacc 4140
 cgccgcgctt aatgcgccgc tacagggcgc gtcaggtggc acttttcggg gaaatgtgcg 4200
 cggaacccct atttgtttat ttttctaaat acattcaaat atgtatccgc tcatgagaca 4260
 ataaccctga taaatgcttc aataatattg aaaaaggaag agtatgagta ttcaacattt 4320
 ccgtgtcgcc cttattccct tttttgcggc attttgccct cctgtttttg ctcaccaga 4380
 aacgctgggt aaagtaaaag atgctgaaga tcagttgggt gcacgagtggt gttacatcga 4440
 actggatctc aacagcggta agatccttga gagttttcgc ccgaagaac gttttccaat 4500
 gatgagcact tttaaagtct tgctatgtgg cgcggtatta tcccgatttg acgcgggca 4560
 agagcaactc ggtcgccgca tacactatct tcagaatgac ttggttgagt actcaccagt 4620
 cacagaaaag catcttacgg atggcatgac agtaagagaa ttatgcagtg ctgcdataac 4680
 catgagtgat aacactgcgg ccaacttact tctgacaacg atcggaggac cgaaggagct 4740
 aaccgctttt ttgcacaaca tgggggatca tgtaactcgc cttgatcgtt gggaaccgga 4800
 gctgaatgaa gccataccaa acgacgagcg tgacaccacg atgcctgtag caatggcaac 4860
 aacgttgccg aaactattaa ctggcgaact acttactcta gcttcccggc aacaattaat 4920
 agactggatg gagggcgata aagttgcagg accacttctg cgtcggccc ttccggctgg 4980
 ctggtttatt gctgataaat ctggagccgg tgagcgtggg tctcgggta tcattgcagc 5040
 actggggcca gatggtaagc cctcccgat cgtagttatc tacacgacgg ggagtcaggc 5100
 aactatggat gaacgaaata gacagatcgc tgagataggt gcctcactga ttaagcattg 5160
 gtaactgtca gaccaagttt actcatatat acttttagatt gatttaaaac ttcattttta 5220
 atttaaaagg atctaggtga agatcctttt tgataatctc atgaccaaaa tcccttaacg 5280
 tgagttttcg ttccactgag cgtcagaccc cgtagaaaag atcaaaggat cttcttgaga 5340
 tccttttttt ctgcgcgtaa tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccacgc taccagcgg 5400
 ggtttgtttg ccggatcaag agctaccaac tctttttccg aaggtaactg gcttcagcag 5460
 agcgcagata ccaaatactg tccttctagt gtagccgtag ttaggccacc acttcaagaa 5520

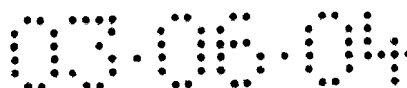


ctctgtagca cgcctacat acctcgctct gctaactctg ttaccagtgg ctgctgccag 5580
 tggcgataag tcgtgtctta cggggttgga ctcaagacga tagttaccgg ataaggcgca 5640
 gcggtcgggc tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac 5700
 cgaactgaga tacctacagc gtgagcattg agaaagcgcc acgcttcccg aaggagagaaa 5760
 ggcggacagg tatccggtaa gcggcagggt cggaacagga gagcgacga gggagcttcc 5820
 agggggaaaac gcctggtatc tttatagtcc tgtcgggttt cgccacctct gacttgagcg 5880
 tcgatttttg tgatgctcgt caggggggag gagcctatgg aaaaacgcca gcaacggcg 5940
 ctttttaagg ttcctggcct tttgctggcc ttttgctcac atgttctttc ctgcgttacc 6000
 ccctgattct gtggataacc gtattaccgc ctttgagtga gctgataccg ctgcgcgag 6060
 ccgaacgacc gagcgacagc agtcagttag cgaggaagcg gaag 6104

<210> 47
 <211> 16301
 <212> DNA
 <213> vektor pYYIGSE2H6

<400> 47
 atcgataagc ttttcaattc aattcatcat ttttttttta ttcttttttt tgatttcggg 60
 ttctttgaaa tttttttgat tcggtaatct ccgaacagaa ggaagaacga aggaaggagc 120
 acagacttag attggtatat atacgcatat gtagtggtga agaaacatga aattgcccag 180
 tattcttaac ccaactgcac agaacaaaaa cctgcaggaa acgaagataa atcatgtcga 240
 aagctacata taaggaacgt gctgctactc atcctagtcc tgttgctgcc aagctattta 300
 atatcatgca cgaaaagcaa acaaacttgt gtgcttcatt ggatgttcgt accaccaagg 360
 aattactgga gttagttgaa gcattaggtc ccaaaatttg tttactaaaa acacatgtgg 420
 atatcttgac tgatttttcc atggagggca cagttaagcc gctaaaggca ttatccgcca 480
 agtacaattt tttactcttc gaagacagaa aatttgctga cattggtaat acagtcaa 540
 tgcagtactc tgccgggtga tacagaatag cagaatgggc agacattacg aatgcacacg 600
 gtgtggtggg occaggtatt gttagcgggt tgaagcaggc ggcagaagaa gtaacaaagg 660
 aacctagagg ctttttgatg ttagcagaat tgtcatgcaa gggctcccta tctactggag 720
 aatatactaa gggtagtggt gacattgcga agagcgacaa agattttgtt atcggtttta 780
 ttgctcaaag agacatgggt ggaagagatg aagggttacga ttggttgatt atgacacccg 840
 gtgtgggttt agatgacaag ggagacgcat tgggtcaaca gtatagaacc gtggatgatg 900
 tgggtctctac aggatctgac attattattg ttggaagagg actatttgca aagggaaggg 960
 atgctaaggt agagggtgaa cgttacagaa aagcaggctg ggaagcatat ttgagaagat 1020

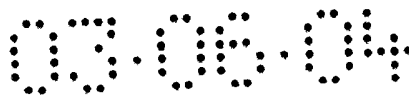
gcggccagca aaactaaaaa actgtattat aagtaaatgc atgtatacta aactcacaaa 1080
 ttagagcttc aatttaatta tatcagttat taccgggaa totcggtcgt aatgattttt 1140
 ataatgacga aaaaaaaaaa attggaaaga aaaagcttta atgcggtagt ttatcacagt 1200
 taaattgcta acgcagtcag gcaccgtgta tgaaatctaa caatgcgctc atcgatcatcc 1260
 tcggcacctg caccctggat gctgtaggca taggcttggg tatgccggta ctgccggggc 1320
 tcttgcgga tatcgctccat tccgacagca tcgccagtca ctatggcgtg ctgctagcgc 1380
 tatatgcgtt gatgcaattt ctatgcgcac ccgttctcgg agcactgtcc gaccgctttg 1440
 gccgcggccc agtcctgctc gcttcgctac ttggagccac tctcgactac gcgatcatgg 1500
 cgaccacacc cgtcctgtgg atccttcaat atgcgcacat acgctgttat gttcaaggtc 1560
 ccttcgttta agaacgaaag cggctcttct tttgagggat gtttcaagtt gttcaaactc 1620
 atcaaatttg caaatcccca gtctgtatct agagcgttga atcgggtgatg cgatttgttt 1680
 attaaattga tgggtgcacc attaccaggt ctagatatac caatggcaaa ctgagcacia 1740
 caataccagt cgggatcaac tggcaccatc tctcccgtag tctcatctaa ttttcttcc 1800
 ggatgaggtt ccagatatac cgcaacacct ttattatggg ttcctgagg gaataataga 1860
 atgtccatt cgaaatcacc aattctaaac ctgggcgaat tgtatttcgg gtttgttaac 1920
 tcgttccagt caggaatgtt ccacgtgaag ctatcttcca gcaaagtctc cacttcttca 1980
 tcaaattgtg gagaatactc ccaatgctct tatctatggg acttccggga aacacagtac 2040
 cgatacttcc caattcgtct tcagagctca ttgtttgttt gaagagacta atcaaagaat 2100
 cgttttctca aaaaaattaa tatcttaact gatagtttga tcaaaggggc aaaacgtagg 2160
 ggcaaacaaa cggaaaaatc gtttctcaaa ttttctgatg ccaagaactc taaccagtct 2220
 tatctaaaaa ttgccttatg atcctctctc ccggttacag cctgtgtaac tgattaatcc 2280
 tgcccttcta atcaccattc taatgtttta attaaggat tttgtcttca ttaacggctt 2340
 tcgctcataa aaatgttatg acgttttgcc cgcaggcggg aaaccatcca cttcacgaga 2400
 ctgatctcct ctgccggaac accgggcac tccaacttat aagttggaga aataagagaa 2460
 tttcagattg agagaatgaa aaaaaaaaaa cctgaaaaaa aaggttgaaa ccagttccct 2520
 gaaattatc cctacttga ctaataagta tataaagacg gtaggtattg attgtaattc 2580
 tgtaaactta tttcttaaac ttcttaaat ctacttttat agttagtctt ttttttagtt 2640
 ttaaacacc aagaacttag tttcgaataa acacacataa acaaacacca tgagatttcc 2700
 ttcaattttt actgcagttt tattcgcagc atcctccgca ttagctgctc cagtcaacac 2760
 tacaacagaa gatgaaacgg cacaatttcc ggctgaagct gtcacgggtt actcagattt 2820
 agaaggggat ttcatgttg ctgttttgcc attttccaac agcaciaata acgggttatt 2880



gtttataaat actactattg ccagcattgc tgctaaagaa gaaggggtat ctctagataa 2940
 aaggcatacc cgcgtgtcag gaggggcagc agcctccgat accaggggcc ttgtgtccct 3000
 ctttagcccc gggtcggctc agaaaatcca gctcgtaaac accaacggca gttggcacat 3060
 caacaggact gccctgaact gcaacgactc cctccaaaca gggttctttg ccgcactatt 3120
 ctacaaacac aaattcaact cgtctggatg ccagagcgc ttggccagct gtcgtccat 3180
 cgacaagttc gctcaggggt ggggtccct cacttacct gagcctaaca gtcggacca 3240
 gaggcctac tgctggcact acgcgcctcg accgtgtggt attgtaccg cgtctcaggt 3300
 gtgcggtcca gtgtattgct tcaccccgag ccctgttgtg gtggggacga ccgatcggtt 3360
 tgggtcccc acgtataact ggggggcgaa cgactcggat gtgctgattc tcaacaacac 3420
 gcggccgcgc cgaggcaact ggttcggctg tacatggatg aatggcactg gggtcaccaa 3480
 gacgtgtggg gggcccccg gcaacatcgg gggggccggc aacaacacct tgacctgccc 3540
 cactgactgt ttctggaagc accccgaggc cacttacgcc agatgcggtt ctgggccttg 3600
 gctgacacct aggtgtatgg ttcattacc atattaggctc tggcactacc cctgcactgt 3660
 caacttcacc atcttcaagg ttaggatgta cgtggggggc gtggagcaca gggtcgaagc 3720
 cgcagtcaat tggactcgag gagagcgttg tgacttgag gacagggata gatcagagct 3780
 tagctcgctg ctgctgtcta caacagagtg gcaggtgatc gagggcagac accatcacca 3840
 ccatcactaa tagttaatta acgatctoga cttgggtgaa cacgttgcca aggtttaagt 3900
 gaatttactt taaagtcttg catttaaata aattttcttt ttatagcttt atgacttagt 3960
 ttcaatttat atactatttt aatgacattt tcgattcatt gattgaaagc tttgtgtttt 4020
 ttcttgatgc gctattgcat tgttcttgct tttttcgcca catgtaatat ctgtagtaga 4080
 tacctgatac attgtggatg ctgagtgaat ttttagttaa taatggaggc gctcttaata 4140
 attttgggga tattggcttt tttttttaa gtttacaaat gaatttttcc cgccaggata 4200
 acgattctga agttactctt agcgttccta tcggtacagc catcaaatca tgcctataaa 4260
 tcatgcctat atttgcgtgc agtcagtatc atctacatga aaaaaactcc cgcaatttct 4320
 tatagaatac gttgaaaatt aaatgtacgc gccaaagataa gataacatat atctagctag 4380
 atgcagtaat atacacagat tcccgcgagc gtgggaagga aaaaattaga taacaaaatc 4440
 tgagtgatat ggaaattccg ctgtatagct catatctttc cttcaaacac cagaaatgta 4500
 aaaatcttgt tacgaaggat ctttttcta atgtttctcg ctcaatcctc atttcttccc 4560
 tacgaagagt caaatctact tgttttctgc cggtatcaag atccatatct tctagtttca 4620
 ccatcaaagt ccaatttcta gtatacagtt tatgtcccaa cgtaacagac aatcaaaatt 4680

ggaaaggata agtatccttc aaagaatgat tctgcgctgg ctctgaacc gcctaattggg 4740
 aacagagaag tccaaaacga tgctataaga accagaaata aaacgataaa accataaccag 4800
 gatcctctac gccggacgca tcgtggccgg catcaccggc gccacaggtg cggttgctgg 4860
 cccctatatc gccgacatca ccgatgggga agatcgggct cgccacttcg ggctcatgag 4920
 cgcttgcttc ggctgggta tggcggcagg ccccgctggc gggggactgt tgggcgccat 4980
 ctcttgcat gcaccattcc ttgcggcgcc ggtgctcaac ggctcaacc tactactggg 5040
 ctgcttcta atgcaggagt cgcataaggg agagcgtcga ccgatgccct tgagagcctt 5100
 caaccagtc agctccttc ggtgggcgcg gggcatgact atcgtcgccg cacttatgac 5160
 tgtcttcttt atcatgcaac tcgtaggaca ggtgccggca gcgctctggg tcattttcgg 5220
 cgaggaccgc tttcgtgga gcgcagcat gatcgccctg tcgcttgcgg tattcggaat 5280
 cttgcacgce ctgctcaag ccttcgtcac tggcccgcc accaaacgtt tcggcgagaa 5340
 gcaggccatt atcgccggca tggcggccga cgcgctgggc tacgtcttgc tggcgttcgc 5400
 gacgcgaggc tggatggcct tccccattat gattcttctc gcttcggcg gcacgaggat 5460
 gcccgcttg caggccatgc tgtccaggca ggtagatgac gaccatcagg gacagcttca 5520
 aggatcgctc gcgctctta ccagcctaac ttgatcact ggaccgctga tcgtcacggc 5580
 gatttatgcc gcctcggcga gcacatggaa cgggttgga tggattgtag gcgccgcct 5640
 ataccttgc tcctccccg cgttgctcg cggcgcctg agccgggcca cctcgacctg 5700
 aatggaagcc ggcggcact cgctaacgga ttcaccact caagaattgg agccaatcaa 5760
 ttcttgcgga gaactgtgaa tgcgcaaacc aacccttggc agaacatata catcgctcc 5820
 gccatctcca gcgcgcac gcggcgcatc tcgggcagcg ttgggtcctg gccacgggtg 5880
 cgcgatgctg tgctcctgct gttgaggacc cggctaggct ggccgggttg cttactggt 5940
 tagcagaatg aatcaccgat acgcgagcga acgtgaagcg actgctgctg caaaacgtct 6000
 gcgacctgag caacaacatg aatggtcttc ggtttcgtg tttcgtaaag tctggaaacg 6060
 cggaagtcat cgccctgcac cattatgttc cggatctgca tcgcaggatg ctgctggcta 6120
 ccctgtggaa cacctacatc tgtattaacg aagcgtggc attgaccctg agtgattttt 6180
 ctctggtccc gccgatcca taccgccagt tgtttacct cacaacgttc cagtaaccgg 6240
 gcatgttcat catcagtaac ccgtatctg agcatcctct ctggtttcat cggtatcatt 6300
 acccccatga acagaaatc cccttacac ggaggcatca agtgaccaa caggaaaaa 6360
 ccgcccttaa catggccgc tttatcagaa gccagacatt aacgcttctg gagaaactca 6420
 acgagctgga cgcggatgaa caggcagaca tctgtgaatc gttcacgac cacgctgatg 6480
 agctttaccg cagctgcctc gcgcgtttcg gtgatgacgg tgaaaacctc tgacacatgc 6540

agctcccga gacgggcaca gcttgtctgt aagcgggtgcc gggagcagac aagcccgtca 6600
 gggcgcgta gcggtgttg gcggtgtcg gggcgagcc atgaccagc cagtagcga 6660
 tagcggagt tatactggct taactatgag gcatcagagc agattgtact gagagtgcac 6720
 catatgcggt gtgaaatacc gcacagatgc gtaaggagaa aataccgcat caggcgctct 6780
 tccgcttct cgtcactga ctgctgagc tgggtcggtc gggtgcggcg agcggtatca 6840
 gctcactcaa aggcggtaac acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaagaac 6900
 atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggcgcggt gctggcggtt 6960
 ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgtcaag tcagaggtgg 7020
 cgaaacccga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgagc 7080
 tctcctgttc cgacctgcc gcttaccgga taactgtcgc cttttctccc ttgggaagc 7140
 gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt cgttcgctcc 7200
 aagctgggct gtgtgcacga acccccgtt cagccgacc gctgcgcctt atccggtaac 7260
 tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt 7320
 aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct 7380
 aactacggct aactagaag gacagtattt ggtatctgag ctctgctgaa gccagttacc 7440
 ttcggaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg tagcgggtgt 7500
 tttttgttt gcaagcagca gattacgagc agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg 7560
 atcttttcta cggggtctga cgtcagtggt aacgaaaact caggttaagg gattttgttc 7620
 atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagtttttaa 7680
 tcaatctaaa gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt aatcagtgag 7740
 gcacctatct cagcgatctg tctatttctg tcatccatag ttgcctgact ccccgctgtg 7800
 tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat gataccgga 7860
 gaccacgct caccggtcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg aaggccgag 7920
 cgcagaagt gtctgcaac tttatccgc tccatccagt ctattaattg ttgcgggaa 7980
 gctagagtaa gtagttcgc agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat tgctgcaggc 8040
 atcgtggtgt cagctcgtc gtttggtatg gcttcattca gctccggttc ccaacgatca 8100
 aggcgagtta catgatcccc catgttgtgc aaaaagcgg ttagctcctt cggctcctcg 8160
 atcgttgtca gaagtaagtt ggcgcagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat 8220
 aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgctttctg tgactggtga gtactcaacc 8280
 aagtcattct gagaatagt tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc gtcaacacgg 8340



gataataccg cgccacatag cagaacttta aaagtgtca tcattggaaa acgttcttcg 8400
gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta acccactcgt 8460
gcacccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca 8520
ggaaggcaaa atgccgcaaa aaaggaata agggcgacac ggaaatgttg aatactcata 8580
ctcttccttt ttcaatatta ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat gagcggatac 8640
atatttgaat gtatttagaa aaataaaca ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaaa 8700
gtgccacctg acgtctaaga aaccattatt atcatgacat taacctataa aaaataggcg 8760
tatcagcagg ccttttcgtc ttcaagaatt ctcatgtttg acagcttata atcgatccac 8820
ttgtatattt ggatgaattt ttgaggaatt ctgaaccagt cctaaaacga gtaaatagga 8880
cgggcaattc ttcaagcaat aacaggaat accaattatt aaaagataac ttagtcagat 8940
cgtacaataa agctttgaag aaaaatgcgc cttattcaat ctttgcataa aaaaatggcc 9000
caaaatctca cattggaaga ctttgatga cctcatttct ttcaatgaag ggctaaccgg 9060
agttgactaa tggtgtggga aattggaccg ataagcgtgc ttctgccgtg gccaggacaa 9120
cgtatactca tcagataaca gcaataacctg atcactactt cgcactagtt tctcggtaact 9180
atgcatatga tccaatatca aaggaaatga tagcattgaa ggatgagact aatccaattg 9240
aggagtggca gcatatagaa cagctaaagg gtagtgctga aggaagcata cgataccccg 9300
catggaatgg gataatatca caggaggtag tagactacct ttcatcctac ataaatagac 9360
gcatataagt acgcatttaa gcataaacac gcactatgcc gttcttctca tgtatatata 9420
tatacaggca acacgcagat ataggtgoga cgtgaacagt gagctgtatg tgcgcagctc 9480
gcgttgcat ttcggaagcg ctcggtttcg gaaacgcttt gaagtctcta ttccgaagtt 9540
cctattctct agaaagtata ggaacttcag agcgcttttg aaaacccaaa gcgctctgaa 9600
gacgcacttt caaaaaacca aaaacgcacc ggactgtaac gagctactaa aatattgcga 9660
ataccgcttc cacaaacatt gctcaaaagt atctctttgc tatatatctc tgtgctatat 9720
ccctatataa ccatcccatc cacctttcgc tccttgaact tgcactaaa ctcgacctct 9780
acatttttta tgtttatctc tagtattacc tcttagacaa aaaaattgta gtaagaacta 9840
ttcatagagt taatcgaaaa caatacgaaa atgtaaacat ttcctatacg tagtatatag 9900
agacaaaata gaagaaaccg ttcataattt tctgaccaat gaagaatcat caacgctatc 9960
actttctgtt cacaaagtat gcgcaatcca catcggtata gaatataatc ggggatgcct 10020
ttatcttgaa aaaatgcacc cgcagcttcg ctagtaatca gtaaacgcgg gaagtggagt 10080
caggcttttt ttatggaaga gaaaatagac accaaagtag ccttcttcta acctaacgg 10140
acctacagt caaaaagtta tcaagagact gcattataga gcgcacaaag gagaaaaaaa 10200

gtaatctaag atgctttgtt agaaaaatag cgctctcggt atgcattttt gtagaacaaa 10260
aaagaagtat agattcttgt tggtaaaata gcgctctcgc gttgcatttc tgttctgtaa 10320
aatgcagct cagattcttt gtttgaaaaa ttagcgctct cgcggtgcat ttttgtttta 10380
caaaaatgaa gcacagattc ttcgttggtt aaatagcgct ttcggttgc atttctgttc 10440
tgtaaaaatg cagctcagat tctttgtttg aaaaattagc gctctcggt tgcatttttg 10500
ttctacaaaa tgaagcacag atgcttcgtt aacaaagata tgctattgaa gtgcaagatg 10560
gaaacgcaga aaatgaaccg gggatgcgac gtgcaagatt acctatgcaa tagatgcaat 10620
agtttctcca ggaaccgaaa tacatacatt gtcttcgta aagcgctaga ctatatatta 10680
ttatacaggt tcaaatatac tatctgtttc agggaaaact ccaggttcg gatgttcaaa 10740
attcaatgat gggtaacaag tacgatcgta aatctgtaaa acagtttgc ggatattag 10800
ctgtatctcc tcaaagcgta ttcgaatata attgagaagc tgcatttttt tttttttttt 10860
tttttttttt ttttttatat atatttcaag gatataccat tgtaatgtct gccctaaga 10920
agatcgctgt tttgccaggt gaccagttg gtcaagaaat cacagccgaa gccattaagg 10980
ttcttaaagc tatttctgat gttcgttcca atgtcaagtt cgatttcgaa aatcatttaa 11040
ttggtggtgc tgctatcgat gctacaggtg tcccacttcc agatgaggcg ctggaagcct 11100
ccaagaaggt tgatgccgtt ttgttaggtg ctgtgggtgg tccataaatg ggtaccggta 11160
gtgttagacc tgaacaaggt ttactaaaaa tccgtaaaga acttcaattg tacgccaact 11220
taagaccatg taactttgca tccgactctc ttttagactt atctccaatc aagccacaat 11280
ttgctaaagg tactgacttc gttgtgtgca gagaattagt gggaggtatt tactttggta 11340
agagaaagga agacgatggt gatggtgtcg cttgggatag tgaacaatac accgttccag 11400
aagtgcaaag aatcacaaga atggccgctt tcatggccct acaacatgag ccaccattgc 11460
ctatttggtc cttggataaa gctaattgtt tggcctcttc aagattatgg agaaaaactg 11520
tggaggaaac catcaagaac gaattcccta cattgaaggt tcaacatcaa ttgattgatt 11580
ctgccgccat gatcctagtt aagaacccaa cccacctaaa tggattata atcacagca 11640
acatgtttgg tgatatcatc tccgatgaag cctccgttat ccaggttcc ttgggtttgt 11700
tgccatctgc gtccttggcc tctttgccag acaagaacac cgcatttggg ttgtacgaac 11760
catgccacgg ttctgtcca gatttgcaa agaataaggt tgaccctatc gccactatct 11820
tgtctgctgc aatgatgttg aaattgtcat tgaacttgc tgaagaaggt aaggccattg 11880
aagatgcagt taaaaaggtt ttggatgcag gtatcagaac tgggtattta ggtggttcca 11940
acagtaccac cgaagtcggt gatgctgtcg ccgaagaagt taagaaaatc cttgcttaaa 12000

aagattctct ttttttatga tatttgtaca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 12060
aaaaaaaaaa aaaaatgcag cgtcacatcg gataataatg atggcagcca ttgtagaagt 12120
gccttttgca tttctagtct ctttctcggt ctagctagtt ttactacatc gcgaagatag 12180
aatcttagat cacactgcct ttgctgagct ggatcatatg agtaacaaaa gagtggtaag 12240
gcctcgtaa aggacaagga cctgagcgga agtgtatcgt aaagtagacg gagtatacta 12300
gtatagtcta tagtccgtgg aattctaagt gccagcttta taatgtcatt ctcttacta 12360
cagaccgcc tgaaagtaga cacatcatca tcagtaagct ttgacaaaaa gcattgagta 12420
gctaactctt ctatgcaatc tatagctggt ttataaggca ttcaatggac agattgaggt 12480
ttttgaaaca tactagtga attagcctta atcccttctc gaagttaatc atgcattatg 12540
gtgtaaaaa tgcaactcgc gttgctctac tttttccga atttccaaat acgcagctgg 12600
ggtgattgct cgatttcgta acgaaagttt tgtttataaa aaccgcgaaa accttctgta 12660
acagatagat ttttacagcg ctgatataca atgacatcag ctgtaatgga aaataactga 12720
aatatgaatg gcgagagact gcttgcttgt attaagcaat gtattatgca gcacttcaa 12780
cctatggtgt acgatgaaag taggtgtgta atcgagacga caagggggac ttttccagtt 12840
cctgatcatt ataagaaata caaacgtta gcatttgcatt ttgttgga tgtactgaat 12900
acagacgaca caccggtaat tgaaaaagaa ctggattggc ctgatcctgc actagtgtac 12960
aatacaattg tcgatcgaat cataaatcac ccagaattat cacagtttat atcggttgca 13020
tttattagtc agttaaggc caccatcgga gagggtttag atattaatgt aaaaggcacg 13080
ctaaaccgca ggggaaaggg tatcagaagg cctaaaggcg ttttttttag atacatggaa 13140
tctccatttg tcaatacaaa ggtcactgca ttcttctctt atcttcgaga ttataataaa 13200
attgcctcag aatatcacia taatactaaa ttcatctca cgttttcatg tcaagcatat 13260
tgggcatctg gcccaaactt ctccgccttg aagaatgtta tttggtgctc cataattcat 13320
gaatacattt ctaagtttgt ggaaagagaa caggataaag gtcatatagg agatcaggag 13380
ctaccgcctg aagaggacc ttctcgtgaa ctaacaatg tacaacatga agtcaatagt 13440
ttaacggaac aagatgcgga ggcggatgaa ggattgtggg gtgaaataga ttcatatgt 13500
gaaaaatggc agtctgaagc ggagagtcaa actgaggcgg agataatagc cgacaggata 13560
attggaaata gccagaggat ggcgaacctc aaaattcgtc gtacaaagtt caaaagtgtc 13620
ttgtatcata tactaaagga actaattcaa tctcagggaa ccgtaaagggt ttatcgcggt 13680
agtagttttt cacacgattc gataaagata agcttacatt atgaagagca gcattattaca 13740
gccgtatggg tctacttgat agtaaaattt gaagagcatt ggaagcctgt tgatgtagag 13800
gtcgagttaa gatgcaagtt caaggagcga aaggtggatg ggtaggttat ataggatat 13860

agcacagaga tatatagcaa agagatactt ttgaggcaat gtttgtggaa gcggtattcg 13920
caatatttta gtagctcggt acagtccggt gcgtttttgg ttttttgaaa gtgcgtcttc 13980
agagcgcttt tggttttcaa aagcgctctg aagttcctat actttctaga gaataggaac 14040
ttcggaaatag gaacttcaaa gcgtttccga aaacgagcgc ttccgaaaat gcaacgcgag 14100
ctgcgcacat acagctcact gttcacgtcg cacctatata tgcgtgttgc ctgtatatat 14160
atatacatga gaagaacggc atagtgcgtg tttatgctta aatgcgtact tataatgcgtc 14220
tatttatgta ggatgaaagg tagtctagta cctcctgtga tattatccca ttccatgcgg 14280
ggtatcgat gcttccttca gcactaccct ttagctgttc tataatgcgtc cactcctcaa 14340
ttggattagt ctcatccttc aatgcattca ttctcttga tattggatca taccctagaa 14400
gtattacgtg attttctgcc ccttaccctc gttgctactc tctttttttt cgtgggaacc 14460
gctttagggc cctcagtgat ggtgttttgt aatttatatg ctctcttgc atttgtgtct 14520
ctacttcttg ttgcctgga gggaaactct tcatttgtat tagcatgggt cacttcagtc 14580
cttcttcca actcactctt tttttgctgt aaacgattct ctgcgccag ttcatgaaa 14640
ctattgaata tatcttttag agattccggg atgaataaat cacctattaa agcagcttga 14700
cgatctggtg gaactaaagt aagcaattgg gtaacgacgc ttacgagctt cataacatct 14760
tcttccgttg gagctggtgg gactaataac tgtgtacaat ccatttttct catgagcatt 14820
tcggtagctc tcttcttgtc tttctgggc aatcttcta ttattatagc aatagatttg 14880
tatagttgct ttctattgtc taacagcttg ttattctgta gcatcaaata tatggcagcc 14940
tgacttgctt cttgtgaaga gagcatacca ttccaatcg aagatacgt ggaatcttct 15000
gcgctagaat caagaccata cggcctaccg gttgtgagag attccatggg ccttatgaca 15060
tatctggaa agagtagctc atcagactta cgtttactct ctatatcaat atctacatca 15120
ggagcaatca tttcaataaa cagccgacat acatcccaga cgctataagc tgtacgtgct 15180
tttaccgtca gattcttggc tgtttcaatg tcgtccattt tggttttctt ttaccagtat 15240
tgttcgttg ataattgtatt cttgcttatt acattataaa atctgtgcag atcacatgtc 15300
aaaacaactt tttatcacia gatagtaccg caaacgaac ctgcgggccc tctaaaaatt 15360
aaggaaaagc agcaaagggt cattttttaa atatgaaatg aagataccgc agtaccaatt 15420
attttcgcag tacaataat gcgcggccgg tgcatttttc gaaagaacgc gagacaaaca 15480
ggacaattaa agttagtttt tcgagttagc gtgtttgaat actgcaagat acaagataaa 15540
tagagtagtt gaaactagat atcaattgca cacaagatcg gcgctaagca tgccacaatt 15600
tggtatatta tgtaaaacac cacctaaggt gcttgttcgt cagtttgtgg aaaggtttga 15660

aagaccttca ggtgagaaaa tagcattatg tgctgctgaa ctaacctatt tatgttggat 15720
 gattacacat aacggaacag caatcaagag agccacattc atgagctata atactatcat 15780
 aagcaattcg ctgagtttcg atattgtcaa taaatcactc cagttttaa atacaagacgca 15840
 aaaagcaaca attctggaag cctcattaaa gaaattgatt cctgcttggg aatttacaat 15900
 tattccttac tatggacaaa aacatcaatc tgatatcact gatattgtaa gtagtttgca 15960
 attacagttc gaatcatcgg aagaagcaga taagggaat agccacagta aaaaaatgct 16020
 aaagcacttc taagttaggg tgaaagcacc tgggagatca ctgagaaaat actaaattcg 16080
 tttaggtata ctctgagatt taaaaaaca aaaactttat accaattcct ctctctagct 16140
 actttcatca attgtggaag attcagcgat attaagaacg ttgatccgaa atcattttaa 16200
 ttagtccaaa ataagtatct gggagtaata atccagtgtt tagtgacaga gacaaagaca 16260
 agcgttagta ggcacatata ctctcttagc gcaaggggta g 16301

<210> 48
 <211> 4989
 <212> DNA
 <213> vektor pYIG7

<400> 48
 agcgcccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcgttggcc gattcattaa tgcagctggc 60
 acgacagggtt tcccgactgg aaagcgggca gtgagcgcaa cgcaattaat gtgagtttagc 120
 tcaatcatta ggcaccccag gctttacact ttatgcttcc ggctcgtatg ttgtgtggaa 180
 ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac gaatttaata 240
 cgactcacta tagggaattc ggatccttca atatgcgcac atacgctgtt atgttcaagg 300
 tcccttcggt taagaacgaa agcggctctc cttttgaggg atgtttcaag ttgttcaaat 360
 ctatcaaatt tgcaaatccc cagtctgtat ctagagcgtt gaatcgggtga tgcgatttgt 420
 taattaaatt gatggtgtca ccattaccag gtctagatat accaatggca aactgagcac 480
 aacaatacca gtccggatca actggcacca tctctcccg agtctcatct aatttttctt 540
 ccggatgagg ttccagatat accgcaacac ctttattatg gtttccctga gggaaataata 600
 gaatgtcca ttcgaaatca ccaattctaa acctgggcga attgtatttc gggtttggtta 660
 actcgttcca gtcaggaatg ttccacgtga agctatcttc cagcaaagtc tccacttctt 720
 catcaaattg tggagaatac tcccaatgct cttatctatg ggacttccgg gaaacacagt 780
 accgatactt cccaattcgt ctccagagct cattgtttgt ttgaagagac taatcaaaga 840
 atcgttttct caaaaaaatt aatatcttaa ctgatagttt gatcaaagg gcaaaacgta 900
 ggggcaaaca aacggaaaaa tcgtttctca aattttctga tgccaagaac tctaaccagt 960

cttatctaaa aattgcctta tgatccgtct ctccggttac agcctgtgta actgattaat 1020
 cctgcctttc taatcaccat tctaattgttt taattaagggt attttgtctt cattaacggc 1080
 tttcgctcat aaaaatgtta tgacgttttg cccgcaggcg ggaaaccatc cacttcacga 1140
 gactgatctc ctctgccgga acaccgggca tctccaactt ataagttgga gaaataagag 1200
 aatttcagat tgagagaatg aaaaaaaaa accctgaaaa aaaagggtga aaccagttcc 1260
 ctgaaattat tcccctactt gactaataag tatataaaga cggtaggtat tgattgtaat 1320
 tctgtaaate tattttcttaa actttcttaa ttctactttt atagttagtc ttttttttag 1380
 ttttaaaaca ccaagaactt agtttcgaat aaacacacat aaacaaacac catgaggtct 1440
 ttgctaatac tagtgctttg cttcctgccc ctggctgctc tgggggtacc agatctcgac 1500
 ttggttgaaac acgttgccaa ggcttaagtg aatttacttt aaagtcttgc atttaaataa 1560
 attttctttt tatagcttta tgacttagtt tcaatttata tactatttta atgacatttt 1620
 cgattcattg attgaaagct ttgtgttttt tcttgatgcg ctattgcatt gttcttgtct 1680
 ttttcgccac atgtaataac tgtagtagat acctgataca ttgtggatgc tgagtgaat 1740
 tttagttaat aatggaggcg ctcttaataa ttttggggat attggctttt ttttttaaag 1800
 tttacaaatg aattttttcc gccaggataa cgattctgaa gttactotta gcgttctat 1860
 cggtagacgc atcaaatcat gcctataaat catgcctata tttgcgtgca gtcagtatca 1920
 tctacatgaa aaaaactccc gcaatttctt atagaatacg ttgaaaatta aatgtacggc 1980
 ccaagataag ataacatata tctagctaga tgcagtaata tacacagatt cccgcggacg 2040
 tgggaaggaa aaaattagat aacaaaatct gagtgatatg gaaattccgc tgtatagctc 2100
 atatctttcc cttcaacacc agaaatgtaa aaatcttgtt acgaaggatc tttttgctaa 2160
 tgtttctcgc tcaatcctca tttcttccct acgaagagtc aaatctactt gttttctgcc 2220
 ggtatcaaga tccatatctt ctagtttcac catcaaagtc caatttctag tatacagttt 2280
 atgtcccaac gtaacagaca atcaaaattg gaaaggataa gtatccttca aagaatgatt 2340
 ctgcgctggc tcctgaaccg cctaattggga acagagaagt ccaaaacgat gctataagaa 2400
 ccagaaataa aacgataaaa ccataccagg atccaagctt ggcactggcc gtcgttttac 2460
 aacgtcgtga ctgggaaaac cctggcggtta cccaacttaa tcgccttgca gcacatcccc 2520
 ctttcgccag ctggcgtaat agcgaagagg cccgcaccga tcgcccttcc caacagttgc 2580
 gcagcctgaa tggcgaatgg gaaattgtaa acgttaatat tttgttaaaa ttgcggttaa 2640
 atttttgtta aatcagctca ttttttaacc aataggccga aatcggcaaa atcccttata 2700
 aatcaaaaga atagaccgag atagggttga gtgtgttcc agtttggaa aagagtccac 2760
 tattaagaa cgtggactcc aacgtcaaag ggcgaaaaac cgtctatcag ggcgatggcc 2820

cactacgtga accatcaccc taatcaagtt ttttggggtc gaggtgccgt aaagcactaa 2880
 atcggaaccc taaagggagc ccccgattta gagcttgacg gggaaagccg gcgaacgtgg 2940
 cgagaaagga agggaagaaa gcgaaaggag cgggcgctag ggcgctggca agtgtagcgg 3000
 tcacgctgcg .cgtaaccacc acaccgccc cgcttaatgc gccgctacag ggcgctcag 3060
 gtggcacttt tcggggaaat gtgcgaggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt 3120
 caaatatgta tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa 3180
 ggaagagtat gagtattcaa catttcctg tcgcccttat tccctttttt gcggcatttt 3240
 gccttcctgt ttttgctcac ccagaaacgc tgggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt 3300
 tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg atctcaacag cggtaagatc cttgagagtt 3360
 ttcgccccga agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcg 3420
 tattatcccg tattgacgcc gggcaagagc aactcggctg ccgcatacac tattctcaga 3480
 atgaacttgg tgaagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa 3540
 gagaattatg cagtgtctgcc ataaccatga gtgataacac tgccggccaac ttacttctga 3600
 caacgatcgg aggaccgaag gagctaaccg cttttttgca caacatgggg gatcatgtaa 3660
 ctgccttga tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca 3720
 ccacgatgcc tgtagcaatg gcaacaacgt tgccgaaact attactggc gaactactta 3780
 ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac 3840
 ttctgcgctc ggcccttcg gctggctggg ttattgctga taaatctgga gccggtgagc 3900
 gtgggtctcg cggtatcatt gcagcactgg gccagatgg taagccctcc cgtatcgtag 3960
 ttatctacac gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag atcgctgaga 4020
 taggtgcctc actgattaag catttgtaac tgtcagacca agtttactca tatatacttt 4080
 agattgattt aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata 4140
 atctcatgac caaaatccct taacgtgagt tttcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag 4200
 aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt tttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa 4260
 caaaaaaacc accgctacca gcggtggtt gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt 4320
 ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt ctagtgtagc 4380
 cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc tacatacctc gctctgctaa 4440
 tcctgttacc agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg tottaccggg ttggactcaa 4500
 gacgatagtt accggataag gcgcagcggc cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc 4560
 ccagcttggg gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag cattgagaaa 4620

gcgccacgct tcccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc agggtcggaa 4680
 caggagagcg cagcagggag cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg 4740
 ggtttcgcca cctctgactt gagcgtogat ttttgtgatg ctogtcaggg gggcggagcc 4800
 tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt tacggttcct ggccttttgc tggccttttg 4860
 ctcacatggt ctttcctgcg ttatccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg 4920
 agtgagctga taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg 4980
 aagcggaag 4989

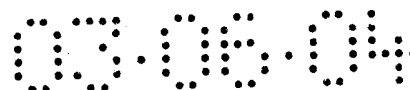
<210> 49
 <211> 5422
 <212> DNA
 <213> vektor pYIG7E1

<400> 49
 agcgcccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcgttggcc gattcattaa tgcagctggc 60
 acgacaggtt tcccgaactg aaagcgggca gtgagcgcaa cgcaattaat gtgagttage 120
 tcactcatta ggcaccccag gctttacact ttatgcttcc ggctcgtatg ttgtgtggaa 180
 ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac gaatttaata 240
 cgactcacta tagggaattc ggatccttca atatggcac atacgctgtt atgttcaagg 300
 tcccttgggt taagaacgaa agcggctctc cttttgaggg atgtttcaag ttgttcaaat 360
 ctatcaaatt tgcaaattcc cagtctgtat ctagagcgtt gaatcgggtga tgcgatttgt 420
 taattaaatt gatggtgtca ccattaccag gtctagatat accaatggca aactgagcac 480
 aacaatacca gtccggatca actggcacca tctctcccg agtctcatct aatttttctt 540
 cgggatgagg ttccagatat accgcaacac ctttattatg gtttccctga ggggaataata 600
 gaatgtccca ttcgaaatca ccaattctaa acctgggcga attgtatttc gggtttgtta 660
 actcgttcca gtcaggaatg ttccacgtga agctatcttc cagcaaagtc tccacttctt 720
 catcaaattg tggagaatac tccaatgct cttatctatg ggacttccgg gaaacacagt 780
 accgatactt cccaattcgt cttcagagct cattgtttgt ttgaagagac taatcaaaga 840
 atcgttttct caaaaaaatt aatatcttaa ctgatagttt gatcaaaggg gcaaaacgta 900
 ggggcaaaca aacggaaaaa tcgtttctca aattttctga tgccaagaac tctaaccagt 960
 cttatctaaa aattgcctta tgatccgtct ctccggttac agcctgtgta actgattaat 1020
 cctgcctttc taatcaccat tctaattgtt taattaaggg attttgtctt cattaacggc 1080
 tttcgtcat aaaaatgtta tgacgttttg cccgcaggcg ggaaaccatc cacttcacga 1140
 gactgatctc ctctgccgga acaccgggca tctccaactt ataagttgga gaaataagag 1200

aatttcagat tgagagaatg aaaaaaaaaa accctgaaaa aaaaggttga aaccagttcc 1260
 ctgaaattat tcccctactt gactaataag tatataaaga cggtaggtat tgattgtaat 1320
 tctgtaaatc tatttcttaa acttcttaaa ttctactttt atagttagtc ttttttttag 1380
 ttttaaaaca ccaagaactt agtttcgaat aaacacacat aaacaaacac catgaggtct 1440
 ttgctaatac tagtgctttg cttcctgccc ctggctgctc tggggtatga ggtgcgcaac 1500
 gtgtccggga tgtaccatgt cactgaacgac tgctccaact caagcattgt gtatgaggca 1560
 ggggacatga tcatgcacac ccccggtgct gtgcctgctg ttggggagaa caactcttcc 1620
 cgctgctggg tagcgtcac cccacgctc gcagctagga acgccagcgt cccaccacg 1680
 acaatacgac gccacgtcga tttgctcgtt ggggcggtg ctttctgttc cgctatgtac 1740
 gtgggggacc tctgctgctc tgtcttctc gtctccagc tgttcacat ctgcctcgc 1800
 cggcatgaga cgggtgcagga ctgcaattgc tcaatctatc ccggccacat aacgggtcac 1860
 cgtatggctt gggatatgat gatgaactgg taatagacc ttctcacctc ggccgataag 1920
 ctgagatctc gacttggttg aacacgttgc caaggcttaa gtgaatttac tttaaagtct 1980
 tgcatttaaa taaattttct ttttatagct ttatgactta gtttcaattt atatactatt 2040
 ttaatgacat tttcgattca ttgattgaaa gctttgtgtt ttttcttgat gcgctattgc 2100
 attgttcttg tctttttcgc cacatgtaat atotgtagta gatacctgat acattgtgga 2160
 tgctgagtga aattttagtt aataatggag gcgctcttaa taattttggg gatattggct 2220
 ttttttttta aagtttaca atgaattttt tccgccagga taacgattct gaagttactc 2280
 ttagcgttcc tatcggtaca gccatcaaat catgcctata aatcatgcct atatttgcgt 2340
 gcagtcagta tcatctacat gaaaaaaact cccgcaattt cttatagaat acgttgaaaa 2400
 ttaaatgtac gcgccaagat aagataacat atatctagct agatgcagta atatacacag 2460
 attcccgcgg acgtgggaag gaaaaaatta gataacaaa tctgagtgat atggaaattc 2520
 cgctgtatag ctcatatctt tcccttcaac accagaaatg taaaaatctt gttacgaagg 2580
 atctttttgc taatgtttct cgctcaatcc tcatctcttc cctacgaaga gtcaaactca 2640
 cttgttttct gccggtatca agatccatat cttctagttt caccatcaaa gtccaatttc 2700
 tagtatacag tttatgtccc aacgtaacag acaatcaaaa ttggaaagga taagtatcct 2760
 tcaaagaatg attctgcgct ggctcctgaa ccgcctaag ggaacagaga agtccaaaac 2820
 gatgctataa gaaccagaaa taaaacgata aaaccatacc aggatccaag cttggcactg 2880
 gccgtcgttt tacaacgtcg tgactgggaa aacctggcg ttaccaact taatgcctt 2940
 gcagcacatc cccctttcgc cagctggcgt aatagcgaag aggccgcac cgatcgccct 3000
 tcccaacagt tgcgcagcct gaatggcgaa tgggaaattg taaacgttaa tattttgtta 3060



aaattcgcgt taaatTTTTg ttaaatacagc tcattTTTTta accaataggc cgaaatcggc 3120
aaaatccctt ataaatcaaa agaatagacc gagatagggt tgagtgttgt tccagtttgg 3180
aacaagagtc cactattaaa gaacgtggac tccaacgtca aagggcgaaa aaccgtctat 3240
cagggcgatg gccactacg tgaacatca ccctaataca gttttttggg gtcgaggtgc 3300
cgtaaagcac taaatcggaa ccctaaaggg agccccgat ttagagcttg acggggaaaag 3360
ccggcgaaagc tggcgagaaa ggaagggaag aaagcgaaaag gagcggggcg tagggcgctg 3420
gcaagtgtag cggtcacgct gcgcgtaacc accacaccg ccgcgcttaa tgcgcgcta 3480
cagggcgctg caggtggcac ttttcgggga aatgtgcgcg gaaccctat ttgtttattt 3540
ttctaaatac attcaaata gtatccgctc atgagacaat aaccctgata aatgcttcaa 3600
taatatgaa aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgccct tattcccttt 3660
tttgcggcat tttgccttcc tgtttttgct caccagaaa cgctggtgaa agtaaaagat 3720
gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt tacatogaac tggatctcaa cagcggtaag 3780
atccttgaga gttttcgccc cgaagaacgt tttccaatga tgagcacttt taaagttctg 3840
ctatgtggcg cgttattatc ccgtattgac gccgggcaag agcaactcgg tcgccgcata 3900
cactattctc agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat 3960
ggcatgacag taagagaatt atgcagtgt gccataacca tgagtgataa cactgcggcc 4020
aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa ccgctttttt gcacaacatg 4080
ggggatcatg taactcgctt tgatcggttg gaaccggagc tgaatgaagc cataccaaac 4140
gacgagcgtg acaccacgat gcctgtagca atggcaaca cgttgcgcaa actattaact 4200
ggcgaactac ttactctagc tttccggcaa caattaatag actggatgga ggcggataaa 4260
gttgcaggac cacttctgcg ctccggcctt ccggctgggt ggtttattgc tgataaatct 4320
ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga tggtaagccc 4380
tcccgtatcg tagttatcta cagcagggg agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga 4440
cagatcgctg agatagggtc ctactgatt aagcattggt aactgtcaga ccaagtttac 4500
tcatatatac tttagattga tttaaaactt catttttaat ttaaaaggat ctagggtgaag 4560
atcctttttg ataattctcat gacaaaatc ccttaacgtg agttttcgtt ccactgagcg 4620
tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc ctttttttct gcgcgtaatc 4680
tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc ggatcaagag 4740
ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtc 4800
cttctagtgt agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac 4860



ctcgctctgc taatcctggt accagtggt gctgccagt gcgataagtc gtgtcttacc 4920
 ggggttgact caagacgata gttaccggat aaggcgagc ggtcgggctg aacggggggg 4980
 tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt 5040
 gagcattgag aaagcgccac gcttcccga gggagaaagg cggacaggta tccggtaagc 5100
 ggcagggtcg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc ctggatatctt 5160
 tatagtctcg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gatttttctg atgctcgtca 5220
 ggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacggggcct ttttacgggt cctggccttt 5280
 tgcctggcctt ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt ggataaacgt 5340
 attaccgcct ttgagtgagc tgataccgct cgcgcagcc gaacgaccga gcgcagcgag 5400
 tcagtgagcg aggaagcgga ag 5422

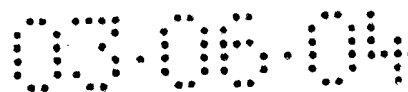
<210> 50
 <211> 15621
 <212> DNA
 <213> vektor pSY1YIG7E1s

<400> 50
 atcgataagc ttttcaattc aattcatcat ttttttttta ttcttttttt tgatttcggt 60
 ttctttgaaa tttttttgat tcggtaatct ccgaacagaa ggaagaacga aggaaggagc 120
 acagacttag attggtatat atacgcata gtagtggtga agaaacatga aattgcccag 180
 tattcttaac ccaactgcac agaacaaaaa cctgcaggaa acgaagataa atcatgtcga 240
 aagctacata taaggaacgt gctgctactc atcctagtcc tgttgctgcc aagctattta 300
 atatcatgca cgaaaagcaa acaaacttgt gtgcttcatt ggatgttcgt accaccaagg 360
 aattactgga gttagttgaa gcattaggtc ccaaaatttg tttactaaaa acacatgtgg 420
 atatcttgac tgatttttcc atggagggca cagttaagcc gctaaaggca ttatccgcca 480
 agtacaattt ttactcttc gaagacagaa aatttgcga cattggtaat acagtcaa 540
 tgcagtactc tcggggtgta tacagaatag cagaatgggc agacattacg aatgcacacg 600
 gtgtgggtggg ccaggtatt gtagcggtt tgaagcaggc ggcagaagaa gtaacaaagg 660
 aacctagagg ccttttgatg ttagcagaat tgtcatgcaa gggctcccta tctactggag 720
 aatatactaa gggactgtt gacattgcga agagcgacaa agattttgtt atcggcttta 780
 ttgctcaaag agacatgggt ggaagagatg aaggttacga ttggttgatt atgacacccg 840
 gtgtgggttt agatgacaag ggagacgat tgggtcaaca gtatagaacc gtggatgatg 900
 tggctcttac aggatctgac attattattg ttggaaggag actatttgca aaggaaggg 960
 atgctaaggt agagggtgaa cgttacagaa aagcaggctg ggaagcatat ttgagaagat 1020

gcggccagca aaactaaaaa actgtattat aagtaaagtc atgtatacta aactcacaaa 1080
 ttagagcttc aatttaatta tatcagttat taccgggaa tctcggtcgt aatgattttt 1140
 ataatacga aaaaaaaaaa attggaaaga aaaagcttta atgcggtagt ttatcacagt 1200
 taaattgcta acgcagtcag gcaccgtgta tgaaatctaa caatgcgctc atcgtcatcc 1260
 tcggcaccgt caccctggat gctgtaggca taggcttggg tatgccggta ctgccgggcc 1320
 tcttgccgga tatcgtccat tccgacagca tcgccagtca ctatggcgtg ctgctagcgc 1380
 tatatgcgtt gatgcaattt ctatgcgcac ccgttctcgg agcactgtcc gaccgctttg 1440
 gccgcgccc agtcctgctc gcttcgctac ttggagccac tatcgactac gcgatcatgg 1500
 cgaccacacc cgtcctgtgg atcctgggtat ggttttatcg ttttatttct ggttcttata 1560
 gcatcgtttt ggacttctct gtccattta ggccgttcag gagccagcgc agaatacttc 1620
 tttgaaggat acttatcctt tccaattttg attgtctgtt acgttgggac ataaactgta 1680
 tactagaaat tggactttga tgggtgaaact agaagatatg gatcttgata ccggcagaaa 1740
 acaagtagat ttgactcttc gtagggaaga aatgaggatt gagcgagaaa cattagcaaa 1800
 aagatccttc gtaacaagat ttttacattt ctggtgttga agggaaagat atgagctata 1860
 cagcgggaatt tccatatcac tcagattttg ttatctaatt ttttccttcc cactccgcg 1920
 ggaatctgtg tatattactg catctagcta gatatatgtt atcttatctt gccgcgtaca 1980
 ttttaatttc aacgtattct ataagaaatt gccggagttt ttttcatgta gatgatactg 2040
 actgcacgca aatataggca tgatttatag gcatgatttg atggtgttac cgataggaac 2100
 gctaagagta acttcagaat cgttatcctg gcggaaaaaa ttcatttgta aactttaaaa 2160
 aaaaaagcca atatcccaa aattattaag agcgctcca ttattaacta aaatttcact 2220
 cagcatccac aatgtatcag gtatctacta cagatattac atgtggcgaa aaagacaaga 2280
 acaatgcaat agcgcatcaa gaaaaaacac aaagctttca atcaatgaat cgaaaatgtc 2340
 attaaaatag tatataaatt gaaactaagt cataaagcta taaaaagaaa atttatttaa 2400
 atgcaagact ttaaagtaaa ttcacttaag ccttggcaac gtgttcaacc aagtcgagat 2460
 ctgagcttat cggccgaggt gagaagggtc tattaccagt tcatcatcat atcccaagcc 2520
 atacggtgac ccgttatgtg gccgggatag attgagcaat tgcagtcctg caccgtctca 2580
 tgccggcgag gcgagatggt gaacagctgg gagacgagga agacagatcc gcagaggtcc 2640
 cccacgtaca tagcggaaca gaaagcagcc gcccacga gcaaatcgac gtggcgtcgt 2700
 attgtcgtgg tggggacgct ggcgttcta gctgcgagcg tgggggtgag cgctaccag 2760
 cagcgggaag agttgttctc ccgaacgcag ggcacgcacc cgggggtgtg catgatcatg 2820
 tccgctgcct catacacaat gcttgagttg gagcagtcgt tcgtgacatg gtacatcccg 2880

gacacgttgc gcacctcata cccagagca gccaggggca ggaagcaaag cactagtatt 2940
 agcaaagacc tcatggtggt tgtttatgtg tgtttattcg aaactaagtt cttggtgttt 3000
 taaaactaaa aaaaagacta actataaaag tagaatttaa gaagttaaag aaatagattt 3060
 acagaattac aatcaatacc taccgtcttt atatacttat tagtcaagta ggggaataat 3120
 ttcaggggaac tgggtttcaac cttttttttc aggggttttt tttttcattc tctcaatctg 3180
 aaattctctt atttctocaa cttataagtt ggagatgccc ggtgttcggg cagaggagat 3240
 cagtctctg aagtggatgg tttcccgctt gcggggcaaaa cgtcataaca tttttatgag 3300
 cgaaagccgt taatgaagac aaaatccctt aattaaaaca ttagaatggt gattagaaag 3360
 gcaggattaa tcagttacac aggctgtaac cggagagacg gatcataagg caattttttag 3420
 ataagactgg ttagagttct tggcatcaga aaatttgaga aacgattttt ccgtttgttt 3480
 gccctacgt tttgccctt tgatcaaact atcagttaag atattaattt ttttgagaaa 3540
 acgattcttt gattagtctt ttcaaacaaa caatgagctc tgaagacgaa ttgggaagta 3600
 tcggtactgt gtttcccgga agtcccatag ataagagcat tgggagtatt ctccacaatt 3660
 tgatgaagaa gtggagactt tgctggaaga tagcttcacg tggaacattc ctgactggaa 3720
 cgagttaaca aaccgaaat acaattcgcc cagggtttaga attggtgatt tcgaatggga 3780
 cattctatta ttccctcagg gaaaccataa taaaggtgtt gcgttatatc tggaacctca 3840
 tccggaagaa aaattagatg agactacggg agagatggtg ccagttgatc cggactggta 3900
 ttgttggtgt cagtttgcca ttggtatatc tagacctggt aatggtgaca ccatcaattt 3960
 aattaacaaa tcgcatcacc gattcaacgc tctagataca gactggggat ttgcaaattt 4020
 gatagatttg aacaacttga aacatccctc aaaaggaaga ccgctttcgt tcttaaacga 4080
 agggaccttg aacataacag cgtatgtgct catattgaag gatcctctac gccggacgca 4140
 tcgtggccgg catcacgggc gccacaggtg cggttgctgg cccctatatc gccgacatca 4200
 ccgatgggga agatcgggct cgcacttcg ggtcatgag cgttgtttc ggcgtgggta 4260
 tggtggcagg cccgtggcc gggggactgt tgggcgcat ctccctgcat gcaccattcc 4320
 ttgcggcggc ggtgctcaac ggcctcaacc tactactggg ctgcttcta atgcaggagt 4380
 cgcataaggg agagcgtcga ccgatgccct tgagagcctt caaccagtc agtccttcc 4440
 ggtgggcgcg gggcatgact atcgtcgccg cacttatgac tgtcttctt atcatgcaac 4500
 tcgtaggaca ggtgcgggca gcgctctggg tcattttcgg cgaggaccgc ttcgctgga 4560
 gcgcgacgat gatcggcctg tcgcttgcgg tattcggaat cttgcacgcc ctgctcaag 4620
 ccttcgtcac tgggtccgcc accaaacgtt tcggcgagaa gcaggccatt atcgccggca 4680

tggcgggccga cgcgctgggc tacgtcttgc tggcgttcgc gacgcgaggc tggatggcct 4740
 tccccattat gattctttctc gcttccggcg gcatcgggat gcccgcggtg caggccatgc 4800
 tgtccaggca ggtagatgac gaccatcagg gacagcttca aggatcgctc gcggctctta 4860
 ccagcctaac ttgatcact ggaccgctga tcgtcacggc gatttatgcc gcctcggcga 4920
 gcacatggaa cgggttggca tggattgtag gcgcgccct ataccttgctc tgcctccccg 4980
 cgttgcgctc cgggtcatgg agccgggcca cctcgacctg aatggaagcc ggcggcacct 5040
 cgctaacgga ttcaccactc caagaattgg agccaatcaa ttcttgcgga gaactgtgaa 5100
 tgcgcaaacc aaccttggc agaacatctc catcgctcc gccatctcca gcagccgcac 5160
 gcggcgcatc tcgggcagcg ttgggtcctg gccacgggtg cgcgatgatc tgcctcctgc 5220
 gttgaggacc cggctaggct ggcggggttg ccttactggt tagcagaatg aatcaccgat 5280
 acgcgagcga acgtgaagcg actgctgctg caaaacgtct gcgacctgag caacaacatg 5340
 aatggtcttc ggtttccgtg ttctgtaaag tctggaacg cggaagtcag cgccctgcac 5400
 cattatgttc cggatctgca tcgcaggatg ctgctggcta ccctgtggaa cacctacatc 5460
 tgtattaacg aagcgctggc attgacctg agtgattttt ctctggctcc gccgcatcca 5520
 taccgccagt tgtttacct cacaacgttc cagtaaccgg gcatgttcat catcagtaac 5580
 ccgtatcgtg agcatcctct ctcgtttcat cggatcatt acccccatga acagaaatc 5640
 ccccttacac ggaggcatca agtgaccaa caggaaaaaa ccgcccttaa catggccgcg 5700
 tttatcagaa gccagacatt aacgcttctg gagaaactca acgagctgga cgcggatgaa 5760
 caggcagaca tctgtgaatc gcttcacgac cagctgatg agctttaccg cagctgcctc 5820
 gcgcgtttcg gtgatgacgg tgaaaacctc tgacacatgc agctcccgga gacggtcaca 5880
 gcttgtctgt aagcgggtgcc gggagcagac aagcccgta gggcgcgta cggggtgtg 5940
 gcgggtgtcg gggcgagcc atgacctagt cacgtagcga tagcggagtg tatactggct 6000
 taactatgcg gcatcagagc agattgtact gagagtgcac catatgcggt gtgaaatacc 6060
 gcacagatgc gtaaggagaa aataccgcat caggcgctct tccgcttct cgtcactga 6120
 ctgctgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg agcggtatca gtcactcaa aggcggtaat 6180
 acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaagaac atgtgagcaa aaggccagca 6240
 aaaggccagg aaccgtaaaa aggcgcggtt gctggcgttt ttccataggc tccgcccccc 6300
 tgacgagcat cacaaaaatc gacgtcaag tcagaggtgg cgaaaccga caggactata 6360
 aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgacctgcc 6420
 gcttaccgga tacctgtccg cctttctccc ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc 6480
 acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt cgttcgctcc aagctgggt gtgtgcacga 6540



acccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc 6600
 ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggg aacaggatta gcagagcgag 6660
 gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtgggtggcct aactacggct aactagaag 6720
 gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag 6780
 ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg tagcgggtgg ttttttgttt gcaagcagca 6840
 gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cgggggtctga 6900
 cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc atgagattat caaaaaggat 6960
 cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagttttaaa tcaatctaaa gtatatatga 7020
 gtaaaacttg tctgacagtt accaatgctt aatcagtggg gcacctatct cagcgatctg 7080
 tctatttcgt tcatccatag ttgcctgact ccccgctgtg tagataacta cgatacggga 7140
 gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat gataccgca gaccacgct caccggctcc 7200
 agatttatca gcaataaacc agccagccgg aagggccgag cgcagaagtg gtcctgcaac 7260
 tttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa gctagagtaa gtagttcgcc 7320
 agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat tgctgcaggc atcgtgggtg cacgctcgtc 7380
 gtttggtatg gcttcattca gtcocggttc ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc 7440
 catgttggtc aaaaaagcgg ttagctcctt cggctcctcg atcgttggtc gaagtaagtt 7500
 ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc 7560
 atccgtaaga tgcttttctg tgactgggtga gtactcaacc aagtcattct gagaatagt 7620
 tatgcggcga ccgagttgct cttgcccgcc gtcaacacgg gataataccg cgccacatag 7680
 cagaacttta aaagtgtca tcattggaaa acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat 7740
 cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta acccactcgt gcacccaact gatcttcagc 7800
 atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaaa 7860
 aaaggaata agggcgacac ggaaatgttg aatactcata ctcttccttt ttcaatatta 7920
 ttgaagcatt tatcaggggtt attgtctcat gagcggatag atatttgaat gtatttagaa 7980
 aaataaacia ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaaa gtgccacctg acgtctaaga 8040
 aaccattatt atcatgacat taacctataa aaaataggcg tatcacgagg ccctttcgtc 8100
 ttcaagaatt ctcatgtttg acagcttctc atcgatccac ttgtatattt ggatgaattt 8160
 ttgaggaatt ctgaaccagt cctaaaacga gtaaatagga ccggcaattc ttcaagcaat 8220
 aaacaggaat accaattatt aaaagataac ttagtcagat cgtacaataa agctttgaag 8280
 aaaaatgcgc cttattcaat ctttgcataa aaaaatggcc caaatctca cattggaaga 8340

catttgatga cctcatttct ttcaatgaag ggctaacgg agttgactaa tgttggtgga 8400
 aattggaccg ataagcgtgc ttctgccgtg gccaggacaa cgtatactca tcagataaca 8460
 gcaatacctg atcactactt cgcactagtt tctcggtact atgcatatga tccaatatca 8520
 aaggaaatga tagcattgaa ggatgagact aatccaattg aggagtggca gcatatagaa 8580
 cagctaaagg gtagtgctga aggaagcata cgataccccg catggaatgg gataatatca 8640
 caggaggtac tagactacct ttcatcctac ataaatagac gcatataagt acgcatttaa 8700
 gcataaacac gcaactatgcc gttctttctca tgtatatata tatacaggca acacgcagat 8760
 ataggtgcga cgtgaacagt gagctgtatg tgcgcagctc gcgttgcat ttcggaagcg 8820
 ctctttttcg gaaacgcttt gaagttctta ttccgaagtt cctatttctc agaaagtata 8880
 ggaacttcag agcgcctttt gaaacacaaa gcgctctgaa gacgcacttt caaaaaacca 8940
 aaaacgcacc ggactgtaac gagctactaa aatattgcga ataccgcttc cacaaacatt 9000
 gctcaaaagt atctctttgc tatatatctc tgtgctatat cctatatata ccatcccatc 9060
 cacctttcgc tccttgaact tgcactctaa ctcgacctct acatttttta tgtttatctc 9120
 tagtattacc tcttagacaa aaaaattgta gtaagaacta ttcatagagt taatcgaaaa 9180
 caatacgaaa atgtaaacat ttcctatacg tagtatatag agacaaaata gaagaaaccg 9240
 ttcataattt tctgaccaat gaagaatcat caacgctatc actttctggt caciaagtat 9300
 gcgcaatcca catcggtata gaataatac ggggatgcct ttatcttgaa aaaatgcacc 9360
 cgcagcttcg ctagtaatca gtaaacgcgg gaagtggagt caggcttttt ttatggaaga 9420
 gaaaatagac accaaagtag ccttcttcta acctaacgg acctacagt caaaaagtta 9480
 tcaagagact gcattataga gcgcacaaag gagaaaaaaa gtaatctaag atgctttggt 9540
 agaaaaatag cgctctcggg atgcattttt gtagaacaaa aaagaagtat agattcttgt 9600
 tggtaaaata gcgctctcgc gttgcatttc tgttctgtaa aaatgcagct cagattcttt 9660
 gtttgaaaaa tttagcgtct cgcgttgcat ttttgtttta caaaaatgaa gcacagattc 9720
 ttcgttggtg aaatagcgtc ttgcggttgc atttctgttc tgtaaaaatg cagctcagat 9780
 tctttgtttg aaaaattagc gctctcgcgt tgcatttttg ttctacaaa tgaagcacag 9840
 atgcttcgtt acaaagata tgctattgaa gtgcaagatg gaaacgcaga aaatgaaccg 9900
 gggatgcgac gtgcaagatt acctatgcaa tagatgcaat agtttctcca ggaaccgaaa 9960
 tacatacatt gtcttccgta aagcgttaga ctatatatta ttatacaggt tcaaatatac 10020
 tatctgtttc agggaaaact cccaggttcg gatgttcaaa attcaatgat gggtaacaag 10080
 tacgatcgta aatctgtaaa acagtttctc ggatattagg ctgtatctcc tcaaagcgta 10140
 ttogaatata attgagaagc tgcatttttt tttttttttt tttttttttt ttttttatat 10200

atattttcaag gatataccat tgtaatgtct gccctaaga agatcgctcgt ttgcccaggt 10260
 gaccacgttg gtcaagaaat cacagccgaa gccattaagg ttcttaaagc tattttctgat 10320
 gttcgttcca atgtcaagtt cgatttcgaa aatcatttaa ttggtggtgc tgctatcgat 10380
 gctacaggtg tccacttcc agatgaggcg ctggaagcct ccaagaaggt tgatgccgtt 10440
 ttgttaggtg ctgtgggttg tcctaaatgg ggtaccggtg gtgttagacc tgaacaaggt 10500
 ttactaaaaa tccgtaaaga acttcaattg tacgccaaact taagaccatg taactttgca 10560
 tccgactctc ttttagactt atctccaatc aagccacaat ttgctaaagg tactgacttc 10620
 gttgtgtgca gagaattagt gggaggtatt tactttggta agagaaagga agacgatggt 10680
 gatggtgtcg cttgggatag tgaacaatac accgttccag aagtgc aaag aatcacaaga 10740
 atggccgctt tcatggccct acaacatgag ccaccattgc ctatttggtc cttggataaa 10800
 gctaattgtt tggcctcttc aagattatgg agaaaaactg tggaggaaac catcaagaac 10860
 gaattcccta cattgaaggt tcaacatcaa ttgattgatt ctgccgccat gatcctagtt 10920
 aagaacccaa cccaccta aa tggattata atcaccagca acatgtttgg tgatatcatc 10980
 tccgatgaag cctccgttat ccaggttcc ttgggtttgt tgccatctgc gtccttggcc 11040
 tctttgccag acaagaacac cgcatttgggt ttgtacgaac catgccacgg ttctgctcca 11100
 gatttgccaa agaataaggt tgacctatc gccactatct tgtctgctgc aatgatgttg 11160
 aaattgtcat tgaacttgcc tgaagaaggt aaggccattg aagatgcagt taaaaaggtt 11220
 ttggatgcag gtatcagaac tgggtattta ggtggttcca acagtaccac cgaagtcggt 11280
 gatgctgtcg ccgaagaagt taagaaaatc cttgcttaaa aagattctct ttttttatga 11340
 tatttgtaca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaatgcag 11400
 cgtcacatcg gataataatg atggcagcca ttgtagaagt gccttttgca tttctagtct 11460
 ctttctcggt ctagctagtt ttactacatc gcgaagatag aatcttagat cacactgcct 11520
 ttgctgagct ggatcatatg agtaacaaaa gagtggttaag gcctcgtaa aggacaagga 11580
 cctgagcgga agtgatcgt aaagtagacg gagtatacta gtatagtcta tagtccgtgg 11640
 aattctaagt gccagcttta taatgtcatt ctcttacta cagaccogcc tgaaagtaga 11700
 cacatcatca tcagtaagct ttgacaaaaa gcattgagta gctaactctt ctatgcaatc 11760
 tatagctgtt ttataaggca ttcaatggac agattgaggt ttttgaaaca tactagtga 11820
 attagcctta atcccttctc gaagttaatc atgcattatg gtgtaaaaaa tgcaactcgc 11880
 gttgctctac tttttccga atttccaaat acgcagctgg ggtgattgct cgatttcgta 11940
 acgaaagttt tgtttataaa aaccgcgaaa accttctgta acagatagat ttttacagcg 12000

ctgatataca atgacatcag ctgtaatgga aaataactga aatatgaatg gcgagagact 12060
gcttgcttgt attaagcaat gtattatgca gcacttccaa cctatggtgt acgatgaaag 12120
taggtgtgta atcgagacga caagggggac ttttcagtt cctgatcatt ataagaaata 12180
caaaacgtta gcatttgcatt ttgttggaca tgtactgaat acagacgaca caccggtaat 12240
tgaaaaagaa ctggattggc ctgacctgc actagtgtac aatacaattg tcatcgaat 12300
cataaatcac ccagaattat cacagtttat atcggttgca tttattagtc agttaaggc 12360
caccatcgga gagggtttag atattaatgt aaaaggcacg ctaaaccgca ggggaaagg 12420
tatcagaagg cctaaaggcg ttttttttag atacatggaa tctccatttg tcaatacaaa 12480
ggtcactgca ttcttctctt atcttcgaga ttataataaa attgcctcag aatatcacia 12540
taataactaa ttcatctca cgttttcatg tcaagcatat tgggcatctg gcccaaactt 12600
ctccgccttg aagaatgtta ttggtgctc cataattcat gaatacattt ctaagtttgt 12660
ggaaagagaa caggataaag gtcatatagg agatcaggag ctaccgcctg aagaggaccc 12720
ttctcgtgaa ctaaacaatg tacaacatga agtcaatagt ttaacggaac aagatgcgga 12780
ggcggatgaa ggattgtggg gtgaaataga ttcatatgt gaaaaatggc agtctgaagc 12840
ggagagtcaa actgaggcgg agataatagc cgacaggata attggaaata gccagaggat 12900
ggcgaacctc aaaattcgtc gtacaaagtt caaaagtgtc ttgtatcata tactaaagga 12960
actaattcaa tctcaggga ccgtaaagg tttatcggt agtagttttt cacacgattc 13020
gataaagata agcttacatt atgaagagca gcatattaca gccgtatggg tctacttgat 13080
agtaaaattt gaagagcatt ggaagcctgt tgatgtagag gtogagtta gatgcaagtt 13140
caaggagcga aagggtgatg ggtaggttat ataggatat agcacagaga tatatagcaa 13200
agagatactt ttgaggcaat gtttgtggaa gcggtattcg caatatttta gtagctcgtt 13260
acagtcgggt gcgttttttg ttttttgaaa gtgcgtcttc agagcgcttt tggttttcaa 13320
aagcgctctg aagttcctat actttctaga gaataggaac ttcggaatag gaacttcaaa 13380
gcgtttccga aaacgagcgc ttccgaaaat gcaacgcgag ctgcgcacat acagctcact 13440
gttcacgtcg cacctatata tgcgtgttgc ctgtatatat atatacatga gaagaacggc 13500
atagtgcgtg tttatgctta aatgcgtact tatatgcgtc ttttatgta ggatgaaagg 13560
tagtctagta cctcctgtga tattatccca ttccatgcgg ggtatcgtat gcttccttca 13620
gcactacctt ttagctgttc tatatgctgc cactcctcaa ttggattagt ctcatccttc 13680
aatgcattca tttcctttga tattggatca taccctagaa gtattacgtg attttctgcc 13740
ccttacctc gttgctactc tccttttttt cgtgggaacc gctttagggc cctcagtgat 13800
ggtgttttgt aatttatatg ctctcttgc atttgtgtct ctacttcttg ttgcctgga 13860

gggaaacttct tcatttgtat tagcatgggt cacttcagtc cttecttcca actcactctt 13920
 tttttgctgt aaacgattct ctgccgccag ttcattgaaa ctattgaata tatccttttag 13980
 agattccggg atgaataaat cacctattaa agcagcttga cgatctgggt gaactaaagt 14040
 aagcaattgg gtaacgacgc ttacgagctt cataacatct tcttccgttg gagctgggtg 14100
 gactaataac tgtgtacaat ccatttttct catgagcatt tcggtagctc tcttcttgtc 14160
 tttctcgggc aatcttctta ttattatagc aatagatttg tatagttgct ttctattgtc 14220
 taacagcttg ttattctgta gcatcaaate tatggcagcc tgacttgctt cttgtgaaga 14280
 gagcatacca tttccaatcg aagatacgct ggaatcttct gcgctagaat caagaccata 14340
 cggcctaccg gttgtgagag attccatggg ccttatgaca tatcctggaa agagtagctc 14400
 atcagactta cgtttactct ctatatcaat atctacatca ggagcaatca tttcaataaa 14460
 cagccgacat acatcccaga cgctataagc tgtacgtgct tttaccgtca gattcttggc 14520
 tgtttcaatg tcgtccattt tgggttttct ttaccagtat tgttcgtttg ataattgtatt 14580
 cttgcttatt acattataaa atctgtgcag atcacatgtc aaaacaactt tttatcacia 14640
 gatagtaccg caaaacgaac ctgccggccg tctaaaaatt aaggaaaagc agcaaagggt 14700
 catTTTTaaa atatgaaatg aagataccgc agtaccaatt attttcgcag taaaaataat 14760
 gcgcggccgg tgcatttttc gaaagaacgc gagacaaaca ggacaattaa agttagtttt 14820
 tcgagttagc gtgtttgaat actgcaagat acaagataaa tagagtagtt gaaactagat 14880
 atcaattgca cacaagatcg gcgctaagca tgccacaatt tgggtatatta tgtaaaacac 14940
 cacctaagg tcttgttcgt cagtttgtgg aaaggtttga aagaccttca ggtgagaaaa 15000
 tagcattatg tgctgctgaa ctaacctatt tatgttggat gattacacat aacggaacag 15060
 caatcaagag agccacattc atgagctata atactatcat aagcaattcg ctgagtttcg 15120
 atattgtcaa taaatcactc cagttttaat acaagacgca aaaagcaaca attctggaag 15180
 cctcattaaa gaaattgatt cctgcttggg aatttacaat tttccttac tatggacaaa 15240
 aacatcaatc tgatatcact gatattgtaa gtagtttgca attacagttc gaatcatcgg 15300
 aagaagcaga taagggaat agccacagta aaaaaatgct aaagcacttc taagtggagg 15360
 tgaaagcacc tgggagatca ctgagaaaat actaaattcg tttgagtata cttcgagatt 15420
 taaaaaaaca aaaactttat accaattcct ctccctagct actttcatca attgtggaag 15480
 attcagcgat attaagaacg ttgatccgaa atcattttaa ttagtccaaa ataagtatct 15540
 gggagtaata atccagtgtt tagtgacaga gacaaagaca agcgtagta ggcacatata 15600
 cttcttttagc gcaaggggta g 15621

<210> 51
 <211> 3593
 <212> DNA
 <213> vektor pPICZalphaA

<400> 51
 agatctaaca tccaaagacg aaagggttgaa tgaaaccttt ttgccatccg acatccacag 60
 gtccattctc acacataagt gccaaacgca acaggagggg atacactagc agcagaccgt 120
 tgcaaacgca ggacctccac tctctttctc ctcaacaccc acttttgcca tcgaaaaacc 180
 agcccagtta ttgggcttga ttggagctcg ctcatccaa ttctttctat taggctacta 240
 acaccatgac tttattagcc tgtctatcct ggccccctg gcgaggttca tgtttgttta 300
 tttccgaatg caacaagctc cgcattacac ccgaacatca ctccagatga gggctttctg 360
 agtgtgggggt caaatagttt catgttcccc aaatggccca aaactgacag tttaaacgct 420
 gtcttggaaac ctaatatgac aaaagcgtga tctcatccaa gatgaactaa gtttggttcg 480
 ttgaaatgct aacggccagt tgggtcaaaaa gaaacttcca aaagtcggca taccgtttgt 540
 cttgtttggt attgattgac gaatgctcaa aaataatctc attaatgctt agcgcagtct 600
 ctctatcgct tctgaacccc ggtgcacctg tgccgaaacg caaatgggga aacaccgct 660
 ttttgatga ttatgcattg tctccacatt gtatgcttcc aagattctgg tgggaatact 720
 gctgatagcc taacgttcat gatcaaaatt taactgttct aaccctact tgacagcaat 780
 atataaacag aaggaagctg ccctgtctta aacctttttt tttatcatca ttattagctt 840
 actttcataa ttgcgactgg ttccaattga caagcttttg attttaacga cttttaacga 900
 caacttgaga agatcaaaaa acaactaatt attcgaaacg atgagatttc cttcaatttt 960
 tactgctggt ttattcgag catctccgc attagctgct ccagtcaaca ctacaacaga 1020
 agatgaaacg gcacaaattc cggtgaagc tgtcatcggt tactcagatt tagaagggga 1080
 tttegatgtt gctgttttgc ctttttccaa cagcacaat aacgggttat tgtttataaa 1140
 tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta tctctcgaga aaagagaggc 1200
 tgaagctgaa ttcacgtggc ccagccggcc gtctcgatc ggtacctga gccgcggcgg 1260
 ccgccagctt tctagaacaa aaactcatct cagaagagga tctgaatagc gccgtcgacc 1320
 atcatcatca tcatcattga gttttagacc ttagacatga ctgttctca gttcaagttg 1380
 ggcacttacg agaagaccgg tcttgctaga ttctaataca gaggatgtca gaatgccatt 1440
 tgctgagag atgcaggctt catttttgat acttttttat ttgtaacctat tatagtatag 1500
 gatttttttt gtcattttgt ttcttctcgt acgagcttgc tctgatcag cctatctcgc 1560
 agctgatgaa tatcttgttg taggggtttg ggaaaatcat tcgagtttga tgtttttctt 1620

ggtattttccc actcctcttc agagtacaga agattaagtg agaccttcgt ttgtgcggat 1680
 cccccacaca ccatagcttc aaaatgtttc tactcctttt ttactcttcc agattttctc 1740
 ggactccgcg catcgccgta ccacttcaaa acaccaagc acagcatact aaattttccc 1800
 tctttcttcc tctaggggtg cgttaattac ccgtactaaa ggtttggaaa agaaaaaaga 1860
 gaccgcctcg tttctttttc ttcgtcgaaa aaggcaataa aaatttttat cacgtttctt 1920
 tttcttgaaa tttttttttt tagttttttt ctctttcagt gacctccatt gatatttaag 1980
 ttaataaacg gtcttcaatt tctcaagttt cagtttcatt tttcttgttc tattacaact 2040
 ttttttactt cttgttcatt agaaagaaag catagcaatc taatctaagg ggcgggtgtg 2100
 acaattaatc atcggcatag tatatcgga tagtataata cgacaagggtg aggaactaaa 2160
 ccatggccaa gttgaccagt gccgttccgg tgcacaccgc gcgcgacgtc gccggagcgg 2220
 tcgagttctg gaccgaccgg ctcggttctt cccgggactt cgtggaggac gacttcgccg 2280
 gtgtggtcgg ggacgacgtg accctgttca tcagcgcggt ccaggaccag gtggtgccgg 2340
 acaacaccct ggcctgggtg tgggtgcgcg gcctggacga gctgtacgcc gagtggtcgg 2400
 aggtcgtgtc cacgaacttc cgggacgcct cggggccggc catgaccgag atcggcgagc 2460
 agccgtgggg gcgggagttc gccctgcgcg acccggccgg caactgcgtg cacttcgtgg 2520
 ccgaggagca ggactgacac gtccgacggc ggcccacggg tcccaggcct cggagatccg 2580
 tccccctttt cctttgtcga tatcatgtaa ttagttatgt cacgcttaca ttcaagccct 2640
 cccccacat ccgtcttaac cgaaaaggaa ggagttagac aacctgaagt ctaggtcctt 2700
 atttattttt ttatagttat gttagtatta agaacgttat ttatatttca aatttttctt 2760
 tttttctgt acagacgcgt gtacgcatgt aacattatac tgaaaacctt gcttgagaag 2820
 gttttgggac gtcgaaggc ttttaatttg aagctggaga ccaacatgtg agcaaaaggc 2880
 cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggtccgc 2940
 cccctgacg agcatcacia aatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga 3000
 ctataaagat accaggcgtt tccccctgga agctccctcg tgcgtctctc tgttccgacc 3060
 ctgcgcctta ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcaa 3120
 tgcacgcct gtaggtatct cagttcgggtg taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg 3180
 cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagttc 3240
 aaccggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga 3300
 gcgaggtatg taggcgggtg tacagagttc ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact 3360
 agaaggacag tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt 3420
 ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag 3480

cagcagatta cgcgagaaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacggg 3540

tctgacgctc agtggaaacga aaactcacgt taagggaattt tggatcatgag atc 3593

<210> 52

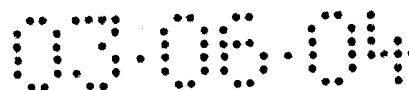
<211> 3547

<212> DNA

<213> vektor pPICZalphaD'

<400> 52

agatctaaca tccaaagacg aaaggttgaa tgaaaccttt ttgccatccg acatccacag 60
gtccattctc acacataagt gccaaacgca acaggagggg atacactagc agcagacgt 120
tgcaaacgca ggacctccac tcctcttctc ctcaacaccc acttttgcca tcgaaaaacc 180
agcccagtta ttgggcttga ttggagctcg ctcatccaa ttcttctat taggtacta 240
acaccatgac ttattagcc tgtctatcct ggccccctg gcgaggttca tgtttgttta 300
ttccgaatg caacaagctc cgcattacac ccgaacatca ctccagatga gggctttctg 360
agtgtggggg caaatagttt catgttcccc aaatggccca aaactgacag tttaaagct 420
gtcttggaa ctaatatgac aaaagcgtga tctcatccaa gatgaactaa gtttggttcg 480
ttgaaatgct aacggccagt tgggtcaaaaa gaaacttcca aaagtcggca taccgtttgt 540
cttgtttggt attgattgac gaatgctcaa aaataatctc attaatgctt agcgcagtct 600
ctctatcgt tctgaacccc ggtgcacctg tgccgaaacg caaatgggga aacacccgct 660
ttttggatga ttatgcattg tctccacatt gtatgcttcc aagattctgg tgggaatact 720
gctgatagcc taacgttcat gatcaaaatt taactgttct aacccctact tgacagcaat 780
atataaacag aaggaagctg cctgtotta aacctttttt ttatcatca ttattagctt 840
actttcataa ttgcgactgg ttccaattga caagcttttg attttaacga cttttaacga 900
caacttgaga agatcaaaaa acaactaatt attcgaaacg atgagatttc cttcaatttt 960
tactgctggt ttattcgcag catcctccgc attagctgct ccagtcaaca ctacaacaga 1020
agatgaaacg gcacaaattc cggctgaagc tgtcatcggt tactcagatt tagaagggga 1080
tttcgatggt gctgttttgc ctttttccaa cagcaciaat aacgggttat tgtttataaa 1140
tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta tctctcgaga aaagggggcc 1200
gaattcgeat gcggccgcca gctttctaga acaaaaactc atctcagaag aggatctgaa 1260
tagcgccgct gaccatcatc atcatcatca ttgagtttgt agccttagac atgactgttc 1320
ctcagttcaa gttgggcaat tacgagaaga ccggtcttgc tagattctaa tcaagaggat 1380
gtcagaatgc cathttgcctg agagatgcag gcttcatttt tgatactttt ttatttgtaa 1440
cctatatagt ataggatttt tttgtcatt ttgtttcttc tcgtaacgagc ttgctcctga 1500



tcagcctatc tcgcagctga tgaatatctt gtggtagggg tttgggaaaa tcattcgagt 1560
 ttgatgtttt tcttgggtatt tcccactcct cttcagagta cagaagatta agtgagacct 1620
 tcgtttgtgc ggcaccccca cacaccatag cttcaaaatg tttctactcc ttttttactc 1680
 ttccagattt tctcggactc cgcgcacgc cgtaccactt caaaacaccc aagcacagca 1740
 tactaaattt tcctcttttc ttctcttagg gtgtcggtta ttaccctgtac taaagggttg 1800
 gaaaagaaaa aagagaccgc ctcgtttctt tttcttcgtc gaaaaaggca ataaaaattt 1860
 ttatcacgtt tctttttctt gaaatttttt ttttagttt tttctcttt cagtgcctc 1920
 cattgatatt taagttaata aacgggtctt aatttctcaa gtttcagttt cttttttctt 1980
 gttctattac aacttttttt acttcttggt cattagaaag aaagcatagc aatctaactt 2040
 aagggcggtt gttgacaatt aatcatcggc atagtatatc ggcatagtat aatacgacaa 2100
 ggtgaggaac taaaccatgg ccaagttgac cagtgcctgt ccggtgctca ccgcgcgcga 2160
 cgtcgccgga gcggtcgagt tctggaccga ccggtcggg tttcccggg acttcgtgga 2220
 ggacgacttc gccggtgtgg tccgggacga cgtgacctg ttcacagcg cggccagga 2280
 ccagggtggt gcggacaaca ccctggcctg ggtgtgggtg cgcggcctgg acgagctgta 2340
 cgccagtggt tcggaggtcg tgtccacgaa cttccgggac gcctccgggc cggccatgac 2400
 cgagatcggc gacgagccgt gggggcgga gttcgccctg cgcgaccgg ccggcaactg 2460
 cgtgcacttc gtggcgagg agcaggactg acacgtccga cggcgggcca cgggtcccag 2520
 gcctcggaga tcggtccccc ttttccttg tcgatatcat gtaattagt atgtcacgct 2580
 tacattcacg cctccccc acatccgctc taaccgaaaa ggaaggagt agacaacctg 2640
 aagtctaggt ccctatttat ttttttatag ttatgttagt attaagaacg ttatttatat 2700
 ttcaaatttt tctttttttt ctgtacagac gcgtgtacgc atgtaacatt atactgaaaa 2760
 ccttgcttga gaaggttttg ggacgctcga aggttttaatt ttgcaagctg gagaccaaca 2820
 tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa gccgcggtg ctggcgtttt 2880
 tccataggct ccgccccct gacgagcatc acaaaaatcg acgtcaagt cagaggtggc 2940
 gaaacccgac aggaactata agataccagg cgtttccccc tggaagctcc ctcgtgcgt 3000
 ctctgttcc gacctgccc cttaccgat acctgtccc cttctccct tcgggaagcg 3060
 tggcgcttcc tcaatgctca cgtgttaggt atctcagttc ggtgtaggtc gttcgtccca 3120
 agctgggctg tgtgcacgaa cccccgtt agcccgaccg ctgcgcctta tccggtaact 3180
 atcgtcttga gtccaacccg gtaagacag acttatcgcc actggcagca gccactggta 3240
 acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag tgggtggccta 3300

actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct 3360
 tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaacaaac caccgctggg agcgggtggt 3420
 tttttgtttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga 3480
 tctttttctac ggggtctgac gctcagtggg acgaaaactc acgttaaggg attttgggtca 3540
 tgagatc 3547

<210> 53
 <211> 3558
 <212> DNA
 <213> vektor pPICZalphaE'

<400> 53
 agatctaaca tccaaagacg aaagggttgaa tgaaaccttt ttgccatccg acatccacag 60
 gtccattctc acacataagt gccaaacgca acaggagggg atacactagc agcagaccgt 120
 tgcaaacgca ggacctccac tctcttctc ctcaacaccc acttttgcca tcgaaaaacc 180
 agcccagtta ttgggcttga ttggagctcg ctcatccaa tctcttctat taggctacta 240
 acaccatgac ttattagcc tgtctatcct ggccccctg gcgaggttca tgtttgttta 300
 tttccgaatg caacaagctc cgcattacac ccgaacatca ctccagatga gggctttctg 360
 agtgtggggg caaatagttt catgttcccc aaatggccca aaactgacag tttaaacgct 420
 gtcttggaa ctaatatgac aaaagcgtga tctcatccaa gatgaactaa gtttggttcg 480
 ttgaaatgct aacggccagt tggtaaaaa gaaacttcca aaagtcggca taccgtttgt 540
 cttgtttggg attgattgac gaatgctcaa aaataatctc attaatgctt agcgcagtct 600
 ctctatcgtc totgaacccc ggtgcacctg tgccgaaacg caaatgggga aacacccgct 660
 ttttggatga ttatgcattg tctccacatt gtatgcttcc aagattctgg tgggaatact 720
 gctgatagcc taacgttcat gatcaaaatt taactgttct aaccctact tgacagcaat 780
 atataaacag aaggaagctg cctgtcttta aacctttttt ttatcatca ttattagctt 840
 actttcataa ttgcgactgg ttccaattga caagcttttg attttaacga cttttaacga 900
 caacttgaga agatcaaaaa acaactaatt attcgaaacg atgagatttc cttcaatttt 960
 tactgtgttt ttattgcgag catctccgc attagctgct ccagtcaaca ctacaacaga 1020
 agatgaaacg gcacaaatc cggctgaagc tgtcatcggt taotcagatt tagaagggga 1080
 tttcgatggt gctgttttgc cattttccaa cagcaciaat aacgggttat tgtttataaa 1140
 tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta tctctcgaga aaagagaggc 1200
 tgaagcctgc agcatatgct cgaggccgcc agctttctag aacaaaaact catctcagaa 1260
 gaggatctga atagcgccgt cgaccatcat catcatcatc attgagtttg tagccttaga 1320

catgactgtt cctcagttca agttggggcac ttacgagaag accggtcttg ctagattcta 1380
atcaagagga tgtcagaatg ccatttgcct gagagatgca ggcttcattt ttgatacttt 1440
tttatttgta acctatatag tataggattt tttttgtcat tttgtttctt ctcgtagcag 1500
cttgctcctg atcagcctat ctgcagctg atgaatatct tgtggtaggg gtttgggaaa 1560
atcattcgag tttgatgttt ttcttgggtat ttccactcc tcttcagagt acagaagatt 1620
aagtgaagcc ttctgttggt cggtatcccc acacaccata gcttcaaaat gtttctactc 1680
cttttttact ctccagatt ttctcggact ccgcgcacgc ccgtaccact tcaaaacacc 1740
caagcacagc atactaaatt ttccctcttt ctctctctag ggtgtcgtta attaccgta 1800
ctaaaggttt ggaaaagaaa aaagagaccg cctcgtttct tttcttcgt cgaaaaaggc 1860
aataaaaatt tttatcacgt ttctttttct tgaaattttt ttttttagtt ttttctctt 1920
tcagtgaact ccattgatat ttaagttaat aaacggtctt caatttctca agtttcagtt 1980
tcatttttct tgttctatta caactttttt tacttcttgt tcattagaaa gaaagcatag 2040
caatctaact taagggggcg tgttgacaat taatcatcg catagtatat cggcatagta 2100
taatacgaca aggtgaggaa ctaaaccatg gccaaagtga ccagtgcctg tccggtgctc 2160
accgcgcgcg acgtgcgcg agcggtcgag ttctggaccg accggctcgg gttctcccg 2220
gacttcgtgg aggacgactt cgcgggtgtg gtccgggacg acgtgacct gttcatcagc 2280
gcggtccagg accaggtggt gccggacaac acctggcct ggggtgtgggt gcgcggcctg 2340
gacgagctgt acgccgagt gtccggaggtc gtgtccacga acttccggga cgcctccgg 2400
ccggccatga ccgagatcgg cgagcagccg tggggggggg agttcgcct gcgcgacctg 2460
gccggcaact gcgtgcactt cgtggccgag gagcaggact gacacgtccg accgcggccc 2520
acgggtccca ggctcggag atccgtcccc cttttcttt gtcgatatca tgtaattagt 2580
tatgtcacgc ttacattcac gccctcccc cactccgct ctaaccgaaa aggaaggagt 2640
tagacaacct gaagtctagg tccctattta tttttttata gttatgttag tattaagaac 2700
gttatttata tttcaaattt ttctttttt tctgtacaga cgcgtgtacg catgtaacat 2760
tatactgaaa accttgcttg agaaggtttt gggacgctc agggctttaa tttgcaagct 2820
ggagaccaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt 2880
gctggcgttt ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag 2940
tcagaggtgg cgaaaccga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc 3000
cctcgtgcgc tctcctgttc cgacctgcc gcttacgga tacctgtccg cttttctccc 3060
ttcgggaagc gtggcgcttt ctcaatgctc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt 3120
cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga acccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt 3180

atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc 3240
 agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa 3300
 gtggtggcct aactacggct aactagaag gacagtatctt ggtatctgcg ctctgctgaa 3360
 gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg 3420
 tagcggtggt ttttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga 3480
 agatcctttg atcttttcta cgggggtctga cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg 3540
 gatcttggtc atgagatc 3558

<210> 54
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> syntetická sonda nebo primer

<400> 54
 tcgagaaaag gggcccgaaat tcgcatgc 28

<210> 55
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> syntetická sonda nebo primer

<400> 55
 ggccgcatgc gaattcgggc cccttttc 28

<210> 56
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> syntetická sonda nebo primer

<400> 56
 tcgagaaaag agaggctgaa gcctgcagca tatgc 35

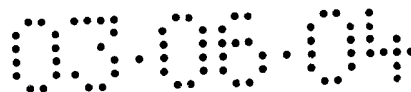
<210> 57
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> syntetická sonda nebo primer

<400> 57
 ggccgcatat gctgcaggct tcagcctctc ttttc 35

<210> 58
 <211> 3997
 <212> DNA
 <213> vektor pPICZalphaD'E1sH6

<400> 58
 agatctaaca tccaaagacg aaagggtgaa tgaaaccttt ttgccatccg acatccacag 60
 gtccattctc acacataagt gccaaacgca acaggagggg atacactagc agcagaccgt 120

tgcaaacgca ggacctccac tctcttctc ctcaacaccc acttttgcca tcgaaaaacc 180
 agcccagtta ttgggcttga ttggagctcg ctcatccaa ttcttctat taggctacta 240
 acaccatgac tttattagcc tgtctatcct ggccccctg gcgagggtca tgtttgttta 300
 tttccgaatg caacaagctc cgcattacac ccgaacatca ctccagatga gggctttctg 360
 agtgtggggt caaatagttt catgttcccc aaatggccca aaactgacag tttaaacgct 420
 gtcttggaac ctaatatgac aaaagcgtga tctcatccaa gatgaactaa gtttggttcg 480
 ttgaaatgct aacggccagt tggcaaaaa gaaacttcca aaagtcggca taccgtttgt 540
 cttgtttggt attgattgac gaatgctcaa aaataatctc attaatgctt agcgcagtct 600
 ctctatcgct tctgaacccc ggtgcacctg tgccgaaacg caaatgggga aacaccgct 660
 ttttgatga ttatgcattg tctccacatt gtatgcttcc aagattctgg tgggaatact 720
 gctgatagcc taacgttcat gatcaaaatt taactgttct aaccctact tgacagcaat 780
 atataaacag aaggaagctg ccctgtctta aacctttttt tttatcatca ttattagctt 840
 actttcataa ttgcgactgg ttccaattga caagcttttg attttaacga cttttaacga 900
 caacttgaga agatcaaaaa acaactaatt attcgaaacg atgagatttc cttcaatttt 960
 tactgctgtt ttattcgag catcctcgc attagctgct ccagtcaaca ctacaacaga 1020
 agatgaaacg gcacaaattc cggctgaagc tgtcatcggg tactcagatt tagaagggga 1080
 tttcgatgtt gctgttttgc cattttccaa cagcacaat aacgggttat tgtttataaa 1140
 tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta tctctcgaga aaaggatga 1200
 ggtgcgcaac gtgtccggga tgtaccatgt cacgaacgac tgctccaact caagcattgt 1260
 gtatgaggca gcggacatga tcatgcacac ccccggtgc gtgccctgcg ttcgggagaa 1320
 caactcttcc cgctgctggg tagcgtcac cccacgctc gcagctagga acgccagcgt 1380
 cccactacg acaatacgac gccacgtcga tttgctcgtt ggggcggctg ctttctgttc 1440
 cgctatgtac gtgggggac tctgcggac tgtcttctc gtctccagc tgttcaccat 1500
 ctgcctcgc cggcatgaga cggtcagga ctgcaattgc tcaatctatc ccggccacat 1560
 aacaggtcac cgtatggctt gggatatgat gatgaactgg caccaccac atcaccatta 1620
 aagatctaag cttgaatccc gcggccatgc gaattcgcat gcggccgcca gctttctaga 1680
 acaaaaactc atctcagaag aggatctgaa tagcgcgctc gaccatcatc atcatcatca 1740
 ttgagtttgt agccttagac atgactgttc ctcaattcaa gttgggcact tacgagaaga 1800
 ccggtcttgc tagattctaa tcaagaggat gtcagaatgc catttgctg agagatgcag 1860
 gtttcatttt tgatactttt ttatttgtaa cctatatagt ataggatttt ttttgctatt 1920



ttgtttcttc tcgtacgagc ttgctcctga tcagcctatc tcgcagctga tgaatatctt	1980
gtggtagggg tttgggaaaa tcattcgagt ttgatgtttt tcttgggtatt tcccactcdt	2040
cttcagagta cagaagatta agtgagacct tcgtttgtgc ggatcccccacacccatag	2100
cttcaaaatg tttctactcc ttttttactc ttccagatth tctcggactc cgcgcacgc	2160
cgtaccactt caaaacaccc aagcacagca tactaaatth tccctcttth ttcctctagg	2220
gtgtcgtaa ttacccttac taaaggttg gaaaagaaaa aagagaccgc ctcgthtctt	2280
tttcttcgtc gaaaaaggca ataaaaatth ttatcacgtt tctttttctt gaaatthtth	2340
tttttagttt tttctcttht cagtgaactc cattgatatt taagttaata aacggtctth	2400
aatttctcaa gtttcagttt catttttctt gttctattac aactthttht acttctgtt	2460
cattagaaag aaagcatagc aatctaactt aaggggcggt gttgacaatt aatcatcggc	2520
atagtatata ggcatagtat aatacgacaa ggtgaggaac taaaccatgg ccaagttgac	2580
cagtgcggtt ccggtgctca ccgcgcgcga cgtcgcgcga gcggtcgagt tctggaccga	2640
ccggtcggg tctctccggg acttcgtgga ggacgactc gccggtgtgg tccgggacga	2700
cgtgacctg ttcatcagc cggtccagga ccaggtggtg ccggacaaca ccctggcctg	2760
ggtgtgggtg cgcggcctg acgagctgta cgcgagtggt tcggaggtcg tgtccacgaa	2820
cttccgggac gcctccgggc cggccatgac cgagatcggc gagcagccgt gggggcggga	2880
gttcgcctg cgcgacctg ccggcaactg cgtgcactc gtggccgagg agcaggactg	2940
acacgtccga cggcgccca cgggtccag gcctcggaga tccgtccccc ttttctttg	3000
tcgatatcat gtaattagtt atgtcacgt tactatcacg cctccccc acatccgctc	3060
taaccgaaaa ggaaggagtt agacaacctg aagtctaggt ccctatttat ttttttatag	3120
ttatgttagt attaagaacg ttatttatat ttcaaattth tcttttttht ctgtacagac	3180
gcgtgtacgc atgtaacatt atactgaaaa ccttgcttga gaaggthtth ggacgctcga	3240
aggctthaat ttgcaagctg gagaccaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga	3300
accgtaaaaa ggcgcggtg ctggcgtht tccataggct ccgccccct gacgagcatc	3360
acaaaaatcg acgtcaagt cagaggtggc gaaaccgac aggactataa agataccagg	3420
cgtttccccc tggaagctc ctcgtgcgt ctctgttcc gacctgccg cttaccggat	3480
acctgtcgc ctttctcct tcgggaagc tggcgctth tcaatgctca cgtgtaggt	3540
atctcagttc ggtgtaggtc gttcgtcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgttc	3600
agccgaccg ctgcgctta tccggtact atcgtcttga gtccaacctg gtaagacag	3660
acttatcgc actggcagca gccactggt aacaggttag cagagcgagg tatgtaggc	3720
gtgctacaga gttcttgaag tgggtggcta actacggcta cactagaagg acagtattg	3780

gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg 3840
gcaaacaaac caccgctggt agcgggtggt tttttgtttg caagcagcag attacgcgca 3900
gaaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga tcttttctac ggggtctgac gctcagtggg 3960
acgaaaactc acgttaaggg attttggtca tgagatc 3997

<210> 59
<211> 4004
<212> DNA
<213> vektor pPICZalphaE'Elsh6

<400> 59
agatctaaca tccaaagacg aaaggttgaa tgaaaccttt ttgccatccg acatccacag 60
gtccattctc acacataagt gccaaacgca acaggagggg atacactagc agcagaccgt 120
tgcaaacgca ggacctccac tcctcttctc ctcaacaccc actttttgcca tcgaaaaacc 180
agcccagtta ttgggcttga ttggagctcg ctcatccaa ttccttctat taggctacta 240
acaccatgac tttattagcc tgtctatcct ggccccctg gcgaggttca tgtttgttta 300
tttccgaatg caacaagctc cgcattacac ccgaacatca ctccagatga gggettctctg 360
agtgtgggggt caaatagttt catgttcccc aaatggccca aaactgacag tttaaacgct 420
gtcttggaac ctaatatgac aaaagcgtga tctcatccaa gatgaactaa gtttggttcg 480
ttgaaatgct aacggccagt tgggtcaaaa gaaacttcca aaagtcggca taccgtttgt 540
cttgtttggt attgattgac gaatgctcaa aaataatctc attaattgctt agcgcagtct 600
ctctatcgtc tctgaacccc ggtgcacctg tgccgaaacg caaatgggga aacacccgct 660
ttttggatga ttatgcattg tctccacatt gtatgcttcc aagattctgg tgggaatact 720
gctgatagcc taacgttcat gatcaaaatt taactgttct aaccctact tgacagcaat 780
atataaacag aaggaagctg cctgtcttta aacctttttt tttatcatca ttattagctt 840
actttcataa ttgcgactgg ttccaattga caagcttttg attttaacga cttttaacga 900
caacttgaga agatcaaaaa acaactaatt attcgaaacg atgagatttc cttcaatttt 960
tactgctggt ttattcgag catcctccgc attagctgct ccagtcaaca ctacaacaga 1020
agatgaaacg gcacaaattc cggctgaagc tgtcatcggt tactcagatt tagaagggga 1080
tttcgatggt gctgttttgc cattttccaa cagcaciaat aacgggttat tgtttataaa 1140
tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta tctctcgaga aaagagagggc 1200
tgaagcctat gaggtgogca acgtgtccgg gatgtacat gtcacgaacg actgctccaa 1260
ctcaagcatt gtgtatgagg cagcggacat gatcatgcac acccccgggt gcgtgccctg 1320
cgttcggggag aacaactctt cccgctgctg ggtagcgtc acccccacgc tcgcagctag 1380

gaacgccagc gtccccacta cgacaatacg acgccacgtc gatttgctcg ttggggcggc 1440
 tgctttctgt tccgctatgt acgtggggga tctctgcgga tctgtcttcc tcgtctccca 1500
 gctgttcacc atctcgctc gccggcatga gacggtgcag gactgcaatt gctcaatcta 1560
 tccccgccac ataacgggtc accgtatggc ttgggatatg atgatgaact ggcaccacca 1620
 ccatcaccat taaagatcta agcttgaatc ccgcggccat ggcataatgc gccgccagct 1680
 ttctagaaca aaaactcatc tcagaagagg atctgaatag cgccgtcgac catcatcatc 1740
 atcatcattg agtttgtagc cttagacatg actgttcctc agttcaagtt gggcacttac 1800
 gagaagaccg gtcttgctag attctaataca agaggatgtc agaatgccat ttgcctgaga 1860
 gatgcaggct tcatttttga tactttttta ttgttaacct atatagtata ggattttttt 1920
 tgtcattttg tttcttctcg tacgagcttg ctctgatca gcctatctcg cagctgatga 1980
 atatcttggt gtaggggttt gggaaaatca ttcgagtttg atgtttttct tggattttcc 2040
 cactcctctt cagagtacag aagattaagt gagaccttcg tttgtgcgga tccccacac 2100
 accatagctt caaaatgttt ctactccttt tttactcttc cagattttct cggactccgc 2160
 gcatcgccgt accacttcaa aacacccaag cacagcatac taaattttcc ctctttcttc 2220
 ctctaggggt tcgttaatta cccgtactaa aggtttggaa aagaaaaaag agaccgcctc 2280
 gtttcttttt cttcgtcgaa aaaggcaata aaaattttta tcacgtttct ttttcttgaa 2340
 attttttttt ttagtttttt tctctttcag tgacctccat tgatatttaa gtttaataaac 2400
 ggtcttcaat ttctcaagtt tcagtttcat ttttcttggt ctattacaac tttttttact 2460
 tcttgttcat tagaaagaaa gcatagcaat ctaatctaag gggcggtgtt gacaattaat 2520
 catcggcata gtatatcggc atagtataat acgacaaggt gaggaactaa accatggcca 2580
 agttgaccag tgccgttccg gtgtcaccg cgcgcgacgt cgccggagcg gtcgagttct 2640
 ggaccgaccg gtcgggttc tccggggact tcgtggagga cgacttcgcc ggtgtggtcc 2700
 gggacgacgt gacctgttc atcagcgcg tccaggacca ggtggtgcc gacaacacc 2760
 tggcctgggt gtgggtgcgc ggccgtggac agctgtacgc cgagtggctg gaggtcgtgt 2820
 ccacgaactt ccgggacgcc tccgggccg ccatgaccga gatcggcgag cagccgtggg 2880
 ggcgggagtt cgccctgcgc gaccggccg gcaactgcgt gcacttcgtg gccgaggagc 2940
 aggactgaca cgtccgacgg cggccacgg gtcccaggcc tcggagatcc gtcccccttt 3000
 tcctttgtcg atatcatgta attagttatg tcacgcttac attcagccc tccccccaca 3060
 tccgctctaa ccgaaaagga aggagttaga caacctgaag tctaggtccc tatttatatt 3120
 tttatagtta tgtagtatt aagaacgtta tttatatttc aaatttttct tttttttctg 3180

tacagacgcg tgtacgcatg taacattata ctgaaaacct tgcttgagaa ggttttggga 3240
 cgctcgaagg ctttaatttg caagctggag accaacaatgt gagcaaaagg ccagcaaaag 3300
 gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg cccccctgac 3360
 gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga 3420
 taccaggcgt tcccccttg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac cctgccgctt 3480
 accggatacc tgtcgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca atgctcacgc 3540
 tgtaggtatc tcagttcggg ttaggtcggt cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaaccc 3600
 cccgttcagc ccgaccgtg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta 3660
 agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgaggat 3720
 gtaggcgggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaaggaca 3780
 gtatttggtg tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct 3840
 tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtggttttt ttgtttgcaa gcagcagatt 3900
 acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct tttctacggg gtctgaagct 3960
 cagtgggaacg aaaactcacg ttaagggatt ttggtcatga gatc 4004

<210> 60
 <211> 4492
 <212> DNA
 <213> vektor pPICZalphaD'E2sH6

<400> 60
 agatctaaca tccaaagacg aaaggttgaa tgaaaacctt ttgccatccg acatccacag 60
 gtccattctc acacataagt gccaaacgca acaggagggg atacactagc agcagaccgt 120
 tgcaaacgca ggacctccac tctctttctc ctcaacaccc acttttgcca tcgaaaaacc 180
 agccagttta ttgggcttga ttggagctcg ctcatccaa ttccttctat taggtacta 240
 acaccatgac tttattagcc tgtctatcct ggcctccctg gcgaggttca tgtttgttta 300
 tttccgaatg caacaagctc cgcattacac ccgaacatca ctccagatga gggctttctg 360
 agtgtggggg caaatagttt catgttcccc aaatggcca aaactgacag tttaaagct 420
 gtcttggaac ctaatatgac aaaagcgtga tctcatccaa gatgaactaa gtttggttcg 480
 ttgaaatgct aacggccagt tggtaaaaa gaaacttcca aaagtcggca taccgtttgt 540
 cttgtttggt attgattgac gaatgetcaa aaataatctc attaatgctt agcgcagtct 600
 ctctatcgt tctgaacccc ggtgcacctg tgccgaaacg caaatgggga aacaccgct 660
 ttttgatga ttatgcattg tctccacatt gtatgcttcc aagattctgg tgggaatact 720
 gctgatagcc taacgttcat gatcaaaatt taactgttct aaccctact tgacagcaat 780

atataaacag aaggaagctg ccctgtctta aacctttttt tttatcatca ttattagctt 840
 actttcataa ttgcgactgg ttccaattga caagcttttg attttaacga cttttaacga 900
 caacttgaga agatcaaaaa acaactaatt attcgaaacg atgagatttc cttcaatttt 960
 tactgctggt ttattcgag catcctccgc attagctgct ccagtcaaca ctacaacaga 1020
 agatgaaacg gcacaaattc cggctgaagc tgtcatcggg tactcagatt tagaagggga 1080
 tttcgatggt gctgttttgc cattttccaa cagcaciaat aacgggttat tgtttataaa 1140
 tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta tctctcgaga aaaggcatac 1200
 ccgctgttca ggaggggag cagcctccga taccaggggc cttgtgtccc tctttagccc 1260
 cgggtcggct cagaaaatcc agctcgtaaa caccaacggc agttggcaca tcaacaggac 1320
 tgccctgaac tgcaacgact ccctccaaac aggggtcttt gccgactat tctacaaaca 1380
 caaattcaac tcgtctggat gccagagcg cttggccagc tgtcgtcca tcgacaagtt 1440
 cgctcagggg tggggtcccc tcaactaac tgagcctaac agctcggacc agaggcccta 1500
 ctgctggcac tacgcgcctc gaccgtgtgg tattgtaccg gcgtctcagg tgtgcgggtc 1560
 agtgatttgc ttcaccccg gacctgtgt ggtggggacg accgatcggg ttggtgtccc 1620
 cactataac tggggggcga acgactcgga tgtgctgatt ctcaacaaca cgcggccgcc 1680
 gcgaggcaac tgggtcggct gtacatggat gaatggcact ggggtcacca agacgtgtgg 1740
 gggcccccgc tgcaacatcg ggggggcccg caacaacacc ttgacctgcc ccactgactg 1800
 ttttcggaag cccccgagg ccacctacgc cagatcggt tctgggccct ggctgacacc 1860
 taggtgtatg gttcattacc catataggct ctggcactac ccctgcactg tcaacttcac 1920
 catcttcaag gttaggatgt acgtgggggg cgtggagcac aggttcgaag ccgcatgcaa 1980
 ttggactcga ggagagcgtt gtgacttga ggacaggat agatcagagc ttagcccgct 2040
 gctgctgtct acaacagagt ggcaggatg cgagggcaga caccatcacc accatcacta 2100
 atagttaatt aactgcaggc atgcaagctt atcgataccg tcgacgaatt cgcagcggc 2160
 cgccagcttt ctagaacaaa aactcatctc agaagaggat ctgaatagcg ccgtcgacca 2220
 tcatcatcat catcattgag tttgtagcct tagacatgac tgttcctcag ttcaagttgg 2280
 gcacttacga gaagaccggc cttgctagat tctaataag aggatgtcag aatgccattt 2340
 gcctgagaga tgcaggcttc atttttgata cttttttatt tgtaacctat atagtatagg 2400
 attttttttg tcattttgtt tcttctcgta cgagcttgct cctgatcagc ctatctcgca 2460
 gctgatgaat atctgtggt aggggtttgg gaaaatcatt cgagtttgat gtttttcttg 2520
 gtatttccca ctctcttca gactacagaa gattaagtga gacctctgtt tgtgcggatc 2580
 cccacacac catagcttca aaatgtttct actcctttt tactcttcca gattttctcg 2640

gactccgcgc atcgccgtac cacttcaaaa caccgaagca cagcatacta aattttccct 2700
 cttttcttcct ctagggtgtc gttaattacc cgtactaaag gtttggaanaa gaaaaaagag 2760
 accgcctcgt ttctttttct tcgtcgaaaa aggcaataaa aatttttate acgtttcttt 2820
 ttcttgaaat tttttttttt agtttttttc tctttcagtg acctccattg atattttaagt 2880
 taataaacgg tcttcaattt ctcaagtttc agtttcattt ttcttgttct attacaactt 2940
 tttttacttc ttgttcatta gaaagaaagc atagcaatct aatctaaggg gcggtgttga 3000
 caattaatca tcggcatagt atatcgcat agtataatac gacaaggtga ggaactaaac 3060
 catggccaag ttgaccagtg ccgttccggg gctcacccgc cgcgacgtcg ccggagcggg 3120
 cgagttctgg accgaccggc tcgggttctc ccgggacttc gtggaggacg acttcgccgg 3180
 tgtggtccgg gacgacgtga cctgtttcat cagcgcgggc caggaccagg tgggtgccga 3240
 caacaccctg gcctgggtgt ggggtgcgcg cctggacgag ctgtacgccg agtggtcgga 3300
 ggtcgtgtcc acgaacttcc gggacgcctc cgggcccggc atgaccgaga tcggcgagca 3360
 gccgtggggg cgggagttcg cctgcgcga cccggccggc aactgcgtgc acttcgtggc 3420
 cgaggagcag gactgacacg tccgacggcg gccacgggt cccaggcctc ggagatccgt 3480
 ccccttttc ctttgtcgat atcatgtaat tagttatgtc acgcttacat tcacgcctc 3540
 ccccacatc cgtctatacc gaaaaggaag gagttagaca acctgaagtc taggtcccta 3600
 tttatttttt tatagttatg ttagtattaa gaacgttatt tatatttcaa atttttcttt 3660
 tttttctgta cagacgcgtg tacgcatgta acattatact gaaaaccttg cttgagaagg 3720
 ttttgggacg ctcgaaggct ttaatttgca agctggagac caacatgtga gcaaaaggcc 3780
 agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat aggctccgc 3840
 cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac 3900
 tataaagata ccaggcgttt cccctggaa gctccctcgt gcgctctcct gttccgacct 3960
 tgccgcttac eggatacctg tccgccttcc tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcaat 4020
 gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc 4080
 acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca 4140
 acccggttaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag 4200
 cgaggatatg aggcgggtgct acagagttct tgaagtggg gcctaactac ggctacacta 4260
 gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg 4320
 gtagctcttg atccggcaaa caaacaccg ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc 4380
 agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacgggg 4440

ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggatttt ggtcatgaga tc

4492

<210> 61

<211> 4431

<212> DNA

<213> vektor pPICZalphaE'E2sH6

<400> 61

agatctaaca tccaaagacg aaagggttgaa tgaaaccttt ttgccatccg acatccacag	60
gtccattctc acacataagt gccaaacgca acaggagggg atactactagc agcagaccgt	120
tgcaaacgca ggacctccac tctctttctc ctcaacaccc acttttgcca tcgaaaaacc	180
agcccagtta ttgggcttga ttggagctcg ctcatccaa ttcttctat taggtacta	240
acaccatgac ttatttagcc tgtctatcct ggccccctg gcgaggttca tgtttgttta	300
tttccgaatg caacaagctc cgcattacac ccgaacatca ctccagatga gggctttctg	360
agtgtggggg caaatagttt catgttcccc aaatggcca aaactgacag tttaaaccgt	420
gtcttggaaac ctaatatgac aaaagcgtga tctcatcaa gatgaactaa gtttggttcg	480
ttgaaatgct aacggccagt tggcaaaaa gaaacttcca aaagtcggca taccgtttgt	540
cttgtttggt attgattgac gaatgctcaa aaataatctc attaatgctt agcgcagtct	600
ctctatcgct tctgaacccc ggtgcacctg tgccgaaacg caaatgggga aacacccgct	660
ttttggatga ttatgcattg tctccacatt gtatgcttcc aagattctgg tgggaatact	720
gctgatagcc taacgttcat gatcaaaatt taactgttct aaccctact tgacagcaat	780
atataaacag aaggaagctg cctgtctta aacctttttt ttatcatca ttattagctt	840
actttcataa ttgcgactgg ttccaattga caagcttttg attttaacga cttttaacga	900
caacttgaga agatcaaaaa acaactaatt attcgaaacg atgagatttc cttcaatttt	960
tactgtgttt ttattcgag catctccgc attagctgct ccagtcaaca ctacaacaga	1020
agatgaaacg gcacaaattc cggctgaagc tgtcatcggg tactcagatt tagaagggga	1080
tttcgatgtt gctgttttgc ctttttcaa cagcacaat aacgggttat tgtttataaa	1140
tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta tctctcgaga aaagagaggc	1200
tgaagcccat acccgctgt caggaggggc agcagcctcc gataccaggg gccttgtgtc	1260
cctcttttagc cccgggtcgg ctcaaaaaat ccagctcgta aacaccaacg gcagttggca	1320
catcaacagg actgcctga actgcaacga ctccctocaa acagggttct ttgccgcact	1380
attctacaaa cacaaattca actcgtctgg atgccagag cgcttggcca gctgtcgtc	1440
catcgacaag ttcgctcagg ggtgggggtcc cctcacttac actgagccta acagctcgga	1500
ccagaggccc tactgtgtgc actacgcgc tcgaccgtgt ggtattgtac ccgcgtctca	1560

ggtgtgcggt ccagtgtatt gcttcacccc gagccctgtt gtggtgggga cgaccgatcg 1620
 gtttgggtgc cccacgtata actggggggc gaacgactcg gatgtgctga ttctcaacaa 1680
 cacgcggccg ccgcgaggca actggttcgg ctgtacatgg atgaatggca ctgggttcac 1740
 caagacgtgt gggggccccc. cgtgcaacat cgggggggccc ggcaacaaca ccttgacctg 1800
 cccactgac tgttttcgga agcaccocga ggccacctac gccagatgcy gttctgggccc 1860
 ctggctgaca cctaggtgta tggttcatta cccatatagg ctctggcact acccctgcac 1920
 tgtcaacttc accatcttca aggttaggat gtacgtgggg ggctgggagc acaggttcga 1980
 agccgcatgc aattggactc gaggagagcg ttgtgacttg gaggacaggg atagatcaga 2040
 gcttagcccg ctgctgctgt ctacaacaga gtggcaggtg atcgagggca gacaccatca 2100
 ccaccatcac taatagttaa ttaactgcag gcatgcaagc ttatcgatac cgtcgaccat 2160
 catcatcatc atcattgagt ttgtagcctt agacatgact gttcctcagt tcaagttggg 2220
 caettacgag aagaccggtc ttgctagatt ctaatcaaga ggatgtcaga atgccatttg 2280
 cctgagagat gcaggcttca tttttgatac ttttttattt gtaacctata tagtatagga 2340
 tttttttgt cattttgttt ctctcgtac gagcttgctc ctgatcagcc tatctcgag 2400
 ctgatgaata tcttgtggta ggggtttggg aaaatcattc gagtttgatg tttttcttgg 2460
 tatttccac tctcttcag agtacagaag attaagtgag accttcgttt gtgcgatcc 2520
 cccacacacc atagcttcaa aatgtttcta ctctttttt actcttcag attttctcgg 2580
 actccgcgca tcgcgtacc acttcaaaac acccaagcac agcatactaa attttccctc 2640
 tttcttctc taggggtgctg ttaattaccg gtactaaagg tttggaaaag aaaaaagaga 2700
 cgcctcgtt tctttttctt cgtcgaaaaa ggcaataaaa atttttatca cgtttctttt 2760
 tcttgaaatt ttttttttta gttttttct ctctcagtga cctccattga tatttaagtt 2820
 aataaacggt cttcaatttc tcaagtttca gtttcatttt tcttgttcta ttacaacttt 2880
 ttttacttct tgttcattag aaagaaagca tagcaatcta atctaagggg cgtgttgac 2940
 aattaatcat cggcatagta tatcggcata gtataatag acaaggtgag gaactaaacc 3000
 atggccaagt tgaccagtgc cgttcgggtg ctaccgcgc gcgacgtgc cggagcggtc 3060
 gagttctgga ccgaccggct cgggttctcc cgggacttcg tggaggacga ctctcgccgt 3120
 gtggtccggg acgacgtgac cctgttcac agcgcgggtc aggaccaggt ggtgccggac 3180
 aacaccctgg cctgggtgtg ggtgcgcggc ctggacgagc tgtacgccga gtggtcggag 3240
 gtcgtgtcca cgaacttcg ggacgcctcc gggccggcca tgaccgagat cggcgagcag 3300
 ccgtgggggc gggagttcgc cctgcgcgac ccggccggca actgcgtgca ctctgtggcc 3360
 gaggagcagg actgacacgt ccgacggcgg cccacgggtc ccaggcctcg gagatccgtc 3420

cccctttttcc tttgtcgata tcatgtaatt agttatgtca cgcttacatt cacgcccctcc 3480
 ccccatcatcc gctctaaccg aaaaggaagg agttagacaa cctgaagtct aggtccctat 3540
 ttattttttt atagtatatgt tagtattaag aacgttattt atatttcaaa tttttctttt 3600
 ttttctgtac agacgcgtgt acgcatgtaa cattatactg aaaaccttgc ttgagaaggt 3660
 tttgggacgc tcgaagggtt taatttgcaa gctggagacc aacatgtgag caaaaggcca 3720
 gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata ggctccgccc 3780
 cctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact 3840
 ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg ttccgacctt 3900
 gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga agcgtggcgc tttctcaatg 3960
 ctcacgctgt aggtatctca gttcgggtgta ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca 4020
 cgaaccccc gttcagcccg accgctgcgc cttatccggt aactatcgtc ttgagtccaa 4080
 cccggtaga cacgacttat cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc 4140
 gaggtatgta ggcgggtgcta cagagttctt gaagtgggtg cctaactacg gctacactag 4200
 aaggacagta tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa aaagagttgg 4260
 tagctottga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttg tttgcaagca 4320
 gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacgggggc 4380
 tgacgctcag tggaacgaaa actcacgtta agggattttg gtcatgagat c 4431

<210> 62
 <211> 2880
 <212> DNA
 <213> vektor pUC18Mfa

<400> 62
 gcgccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggcgc attcattaat gcagctggca 60
 cgacagggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaatg tgagttagct 120
 cactcattag gcacccaggg ctttacactt tatgcttccg gtcggtatgt tgtgtggaat 180
 tgtgagcgga taacaatttc acacaggaaa cagctatgac catgattacg ccaagcttac 240
 cccttcttct ttagcagcaa tgctggcaat agtagtattt ataaacaata acccgttatt 300
 tgtgctggtg gaaaatggca aaacagcaac atcgaaatcc ccttctaaat ctgagtaacc 360
 gatgacagct tcagccggaa tttgtgcctt ttcattctct gttgtagtgt tgactggagc 420
 agctaatacg gaggatgctg cgaataaaac tgcagtaaaa attgaaggaa atctcatgaa 480
 ttactggcc gtcgtttttac aacgtcgtga ctgggaaaac cctggcgta cccaacttaa 540
 tcgccttgca gcacatcccc ctttcgccag ctggcgtaat agcgaagagg cccgcaccga 600

tcgcccttcc caacagttgc gcagcctgaa tggcgaatgg cgcctgatgc ggtattttct 660
 ccttacgcat ctgtgcggta tttcacaccg catatggtgc actctcagta caatctgctc 720
 tgatgccgca tagttaagcc agccccgaca cccgcccaaca cccgctgacg cgcctgacg 780
 ggcttgtctg ctcccggcat ccgcttacag acaagctgtg accgtctccg ggagctgcat 840
 gtgtcagagg ttttcaccgt catcacgaa acgcgcgaga cgaaagggcc tcgtgatacg 900
 cctattttta taggttaatg tcatgataat aatggtttct tagacgtcag gtggcacttt 960
 tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta 1020
 tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat 1080
 gagtattcaa catttcctgt tcgcccttat tccctttttt gcggcatttt gccttcctgt 1140
 ttttgctcac ccagaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg 1200
 agtgggttac atcgaaactgg atotcaacag cggtaagatc cttgagagtt ttcgccccga 1260
 agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcgg tattatcccg 1320
 tattgacgcc gggcaagagc aactcggctg ccgcatacac tattctcaga atgacttggg 1380
 tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg 1440
 cagtgtgcc ataaccatga gtgataacac tgcggccaac ttactttctga caacgatcgg 1500
 aggaccgaag gagctaaccg cttttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctgccttga 1560
 tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc 1620
 tgtagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact attaaactggc gaactactta ctctagcttc 1680
 ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgctc 1740
 ggcccttccg gctggctggg ttattgtctga taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg 1800
 cggtatcatt gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac 1860
 gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag atcgtctgaga taggtgcctc 1920
 actgattaag cattggtaac tgtcagacca agtttactca tatatacttt agattgattt 1980
 aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac 2040
 caaaatccct taacgtgagt tttcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa 2100
 aggatcttct tgagatcctt tttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc 2160
 accgtacca gcggtgggtt gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaagg 2220
 aactggcttc agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg 2280
 ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc tacatacttc gctctgctaa tcctgttacc 2340
 agtggctgct gccagtggcg ataagctgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt 2400

accggataag ggcagcggt cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttgga 2460
 gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct 2520
 tcccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg 2580
 cacgagggag cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca 2640
 cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg ctcgtcaggg gggcggagcc tatggaaaaa 2700
 cgccagcaac gcggcctttt tacggttcct ggccttttgc tggccttttg ctcacatgtt 2760
 ctttctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga 2820
 taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga 2880

<210> 63
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> adaptorový peptid

<400> 63

His His His His His
 1 5

<210> 64
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> adaptorový peptid

<400> 64

Glu Glu Gly Glu Pro Lys
 1 5

<210> 65
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> adaptorový peptid

<400> 65

Glu Glu Ala Glu Pro Lys
 1 5

<210> 66
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> místo úpravy

<220>
 <221> alternativní znak
 <222> (5)..(5)
 <223> X je jakákoliv aminokyselina

<400> 66

Ile Glu Gly Arg Xaa
1 5

<210> 67

<211> 5

<212> PRT

<213> místo úpravy

<220>

<221> alternativní znak

<222> (5)..(5)

<223> X je jakákoliv aminokyselina

<400> 67

Ile Asp Gly Arg Xaa
1 5

<210> 68

<211> 5

<212> PRT

<213> místo úpravy

<220>

<221> alternativní znak

<222> (5)..(5)

<223> X je jakákoliv aminokyselina

<400> 68

Ala Glu Gly Arg Xaa
1 5

<210> 69

<211> 5

<212> PRT

<213> adaptorový peptid

<400> 69

Val Ile Glu Gly Arg
1 5

<210> 70

<211> 4

<212> PRT

<213> adaptorový peptid

<400> 70

Ile Glu Gly Arg
1

<210> 71
<211> 4
<212> PRT
<213> adaptorový peptid

<400> 71

Ile Asp Gly Arg
1

<210> 72
<211> 4
<212> PRT
<213> adaptorový peptid

<400> 72

Ala Glu Gly Arg
1

<210> 73
<211> 4
<212> PRT
<213> HCV E1

<400> 73

Asn Asn Ser Ser
1

<210> 74
<211> 8
<212> PRT
<213> epitop FLAG

<400> 74

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 75
<211> 12
<212> PRT
<213> epitop proteinu C

<400> 75

Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile Asp Gly Lys
1 5 10

<210> 76
<211> 11
<212> PRT
<213> epitop VSV

<400> 76

Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys
1 5 10

<210> 77

<211> 9

<212> PRT

<213> streptag

<400> 77

Ala Trp Arg His Pro Gln Phe Gly Gly
1 5

<210> 78

<211> 12

<212> PRT

<213> epitop Tag 100

<400> 78

Glu Glu Thr Ala Arg Phe Gln Pro Gly Tyr Arg Ser
1 5 10

<210> 79

<211> 10

<212> PRT

<213> epitop c-mc

<400> 79

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
1 5 10

<210> 80

<211> 11

<212> PRT

<213> epitop HA

<400> 80

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu
1 5 10

<210> 81

<211> 9

<212> PRT

<213> epitop HA

<400> 81

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
1 5

<210> 82
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> epitop HA

<400> 82

Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu
 1 5 10

<210> 83
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> thrombinové štěpící místo

<400> 83

Leu Val Pro Arg Gly Ser
 1 5

<210> 84
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> kolagenázové rozpoznávací místo

<220>
 <221> alternativní znak
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa je jakákoliv aminokyselina, ale nejčastěji neutrálníaminokyselina

<400> 84

Pro Xaa Gly Pro
 1

<210> 85
 <211> 192
 <212> PRT
 <213> virus hepatitidy C

<400> 85

Tyr Gln Val Arg Asn Ser Ser Gly Leu Tyr His Val Thr Asn Asp Cys
 1 5 10 15

Pro Asn Ser Ser Val Val Tyr Glu Ala Ala Asp Ala Ile Leu His Thr
 20 25 30

Pro Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu Gly Asn Ala Ser Arg Cys Trp
 35 40 45

Val Ala Val Thr Pro Thr Val Ala Thr Arg Asp Gly Lys Leu Pro Thr
 50 55 60

Thr Gln Leu Arg Arg His Ile Asp Leu Leu Val Gly Ser Ala Thr Leu
65 70 75 80

Cys Ser Ala Leu Tyr Val Gly Asp Leu Cys Gly Ser Val Phe Leu Val
85 90 95

Gly Gln Leu Phe Thr Phe Ser Pro Arg His His Trp Thr Thr Gln Asp
100 105 110

Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg Met Ala
115 120 125

Trp Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Ala Ala Leu Val Val Ala
130 135 140

Gln Leu Leu Arg Ile Pro Gln Ala Ile Met Asp Met Ile Ala Gly Ala
145 150 155 160

His Trp Gly Val Leu Ala Gly Ile Ala Tyr Phe Ser Met Val Gly Asn
165 170 175

Trp Ala Glu Val Leu Val Val Leu Leu Leu Phe Ala Gly Val Asp Ala
180 185 190

<210> 86
<211> 209
<212> PRT
<213> virus hepatitidy C

<400> 86

Met Leu Gly Lys Leu Ile Asp Thr Leu Thr Cys Gly Phe Ala Asp Leu
1 5 10 15

Met Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro Leu Gly Gly Ala Ala Arg
20 25 30

Ala Leu Ala His Gly Ala Arg Val Leu Glu Asp Gly Val Ile Tyr Ala
35 40 45

Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile Phe Leu Leu Ala Leu
50 55 60

Leu Ser Cys Leu Thr Val Pro Ala Ser Ala Tyr Gln Val Arg Asn Ser
65 70 75 80

Ser Gly Leu Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Pro Asn Ser Ser Val Val

85

90

95

Tyr Glu Ala Ala Asp Ala Ile Leu His Thr Pro Gly Cys Val Pro Cys
100 105 110

Val Arg Glu Gly Asn Ala Ser Arg Cys Trp Val Ala Val Thr Pro Thr
115 120 125

Val Ala Thr Arg Asp Gly Lys Leu Pro Thr Thr Gln Leu Arg Arg His
130 135 140

Ile Asp Leu Leu Val Gly Ser Ala Thr Leu Cys Ser Ala Leu Tyr Val
145 150 155 160

Gly Asp Leu Cys Gly Ser Val Phe Leu Val Gly Gln Leu Phe Thr Phe
165 170 175

Ser Pro Arg His His Trp Thr Thr Gln Asp Cys Asn Cys Ser Ile Tyr
180 185 190

Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn
195 200 205

Trp

<210> 87
<211> 192
<212> PRT
<213> virus hepatitidy C

<400> 87

Tyr Glu Val Arg Asn Val Ser Gly Met Tyr His Val Thr Asn Asp Cys
1 5 10 15

Ser Asn Ser Ser Ile Val Tyr Glu Ala Ala Asp Met Ile Met His Thr
20 25 30

Pro Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu Asn Asn Ser Ser Arg Cys Trp
35 40 45

Val Ala Leu Thr Pro Thr Leu Ala Ala Arg Asn Ala Ser Val Pro Thr
50 55 60

Thr Thr Ile Arg Arg His Val Asp Leu Leu Val Gly Ala Ala Ala Phe
65 70 75 80

Cys Ser Ala Met Tyr Val Gly Asp Leu Cys Gly Ser Val Phe Leu Val
85 90 95

Ser Gln Leu Phe Thr Ile Ser Pro Arg Arg His Glu Thr Val Gln Asp
100 105 110

Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg Met Ala
115 120 125

Trp Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Thr Ala Leu Val Val Ser
130 135 140

Gln Leu Leu Arg Ile Pro Gln Ala Val Val Asp Met Val Ala Gly Ala
145 150 155 160

His Trp Gly Val Leu Ala Gly Leu Ala Tyr Tyr Ser Met Val Gly Asn
165 170 175

Trp Ala Lys Val Leu Val Val Met Leu Leu Phe Ala Gly Val Asp Gly
180 185 190

<210> 88

<211> 209

<212> PRT

<213> virus hepatitidy C

<400> 88

Met Leu Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys Gly Phe Ala Asp Leu
1 5 10 15

Met Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro Leu Gly Gly Ala Ala Arg
20 25 30

Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp Gly Val Asn Tyr Ala
35 40 45

Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile Phe Leu Leu Ala Leu
50 55 60

Leu Ser Cys Leu Thr Ile Pro Ala Ser Ala Tyr Glu Val Arg Asn Val
65 70 75 80

Ser Gly Met Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Ser Asn Ser Ser Ile Val
85 90 95

Tyr Glu Ala Ala Asp Met Ile Met His Thr Pro Gly Cys Val Pro Cys

100

105

110

Val Arg Glu Asn Asn Ser Ser Arg Cys Trp Val Ala Leu Thr Pro Thr
115 120 125

Leu Ala Ala Arg Asn Ala Ser Val Pro Thr Thr Thr Ile Arg Arg His
130 135 140

Val Asp Leu Leu Val Gly Ala Ala Ala Phe Cys Ser Ala Met Tyr Val
145 150 155 160

Gly Asp Leu Cys Gly Ser Val Phe Leu Val Ser Gln Leu Phe Thr Ile
165 170 175

Ser Pro Arg Arg His Glu Thr Val Gln Asp Cys Asn Cys Ser Ile Tyr
180 185 190

Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn
195 200 205

Trp

<210> 89
<211> 209
<212> PRT
<213> virus hepatitidy C

<400> 89

Met Leu Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys Gly Phe Ala Asp Leu
1 5 10 15

Met Gly Tyr Ile Pro Val Val Gly Ala Pro Val Gly Gly Val Ala Arg
20 25 30

Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp Gly Ile Asn Tyr Ala
35 40 45

Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile Phe Leu Leu Ala Leu
50 55 60

Leu Ser Cys Ile Thr Thr Pro Val Ser Ala Val Glu Val Lys Asn Asn
65 70 75 80

Ser Asn Ser Tyr Met Ala Thr Asn Asp Cys Ser Asn Ser Ser Ile Ile
85 90 95

Trp Gln Leu Glu Gly Ala Val Leu His Thr Pro Gly Cys Val Pro Cys
100 105 110

Glu Leu Ala Asp Asn Thr Ser Arg Cys Trp Val Pro Val Thr Pro Asn
115 120 125

Met Ala Ile Arg Gln Pro Gly Glu Leu Thr Lys Gly Leu Arg Ala His
130 135 140

Val Asp Val Ile Val Met Ser Ala Thr Leu Cys Ser Ala Leu Tyr Val
145 150 155 160

Gly Asp Val Cys Gly Ala Leu Met Ile Ala Ala Gln Val Val Val Val
165 170 175

Ser Pro Gln His His His Phe Val Gln Glu Cys Asn Cys Ser Ile Tyr
180 185 190

Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn
195 200 205

Trp

<210> 90
<211> 209
<212> PRT
<213> virus hepatitidy C

<400> 90

Met Leu Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys Gly Phe Ala Asp Leu
1 5 10 15

Met Gly Tyr Ile Pro Val Val Gly Ala Pro Val Gly Gly Val Ala Arg
20 25 30

Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp Gly Ile Asn Tyr Ala
35 40 45

Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile Phe Leu Leu Ala Leu
50 55 60

Leu Ser Cys Val Thr Ala Pro Val Ser Ala Val Glu Val Lys Asn Thr
65 70 75 80

Ser Gln Ala Tyr Met Ala Thr Asn Asp Cys Ser Asn Asn Ser Ile Val

85

90

95

Trp Gln Leu Glu Asp Ala Val Leu His Val Pro Gly Cys Val Pro Cys
100 105 110

Glu Asn Ser Ser Gly Arg Phe His Cys Trp Ile Pro Ile Ser Pro Asn
115 120 125

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

Ile Asp Ala Val Val Met Ser Ala Thr Leu Cys Ser Ala Leu Tyr Val
145 150 155 160

Gly Asp Val Cys Gly Ala Val Met Ile Ala Ala Gln Ala Phe Ile Val
165 170 175

Ala Pro Lys Arg His Tyr Phe Val Gln Glu Cys Asn Cys Ser Ile Tyr
180 185 190

Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn
195 200 205

Trp

<210> 91
<211> 209
<212> PRT
<213> virus hepatitidy C

<400> 91

Met Leu Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys Gly Phe Ala Asp Leu
1 5 10 15

Met Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro Val Gly Gly Val Ala Arg
20 25 30

Ala Leu Ala His Gly Val Arg Ala Leu Glu Asp Gly Ile Asn Phe Ala
35 40 45

Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile Phe Leu Leu Ala Leu
50 55 60

Phe Ser Cys Leu Ile His Pro Ala Ala Ser Leu Glu Trp Arg Asn Thr
65 70 75 80

Ser Gly Leu Tyr Val Leu Thr Asn Asp Cys Ser Asn Ser Ser Ile Val
85 90 95

Tyr Glu Ala Asp Asp Val Ile Leu His Thr Pro Gly Cys Ile Pro Cys
100 105 110

Val Gln Asp Gly Asn Thr Ser Thr Cys Trp Thr Pro Val Thr Pro Thr
115 120 125

Val Ala Val Lys Tyr Val Gly Ala Thr Thr Ala Ser Ile Arg Ser His
130 135 140

Val Asp Leu Leu Val Gly Ala Ala Thr Met Cys Ser Ala Leu Tyr Val
145 150 155 160

Gly Asp Met Cys Gly Ala Val Phe Leu Val Gly Gln Ala Phe Thr Phe
165 170 175

Arg Pro Arg Arg His Gln Thr Val Gln Thr Cys Asn Cys Ser Leu Tyr
180 185 190

Pro Gly His Leu Ser Gly His Arg Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn
195 200 205

Trp

<210> 92

<211> 209

<212>, PRT

<213> virus hepatitidy C

<400> 92

Met Ser Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys Gly Phe Ala Asp Leu
1 5 10 15

Met Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro Val Gly Gly Val Ala Arg
20 25 30

Ala Leu Ala His Gly Val Arg Ala Val Glu Asp Gly Ile Asn Tyr Ala
35 40 45

Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile Phe Leu Leu Ala Leu
50 55 60

Leu Ser Cys Leu Thr Val Pro Thr Ser Ala Val Asn Tyr Arg Asn Ala

65

70

75

80

Ser Gly Val Tyr His Ile Thr Asn Asp Cys Pro Asn Ser Ser Ile Val
 85 90 95

Tyr Glu Thr Glu His His Ile Leu His Leu Pro Gly Cys Leu Pro Cys
 100 105 110

Val Arg Val Gly Asn Gln Ser Arg Cys Trp Val Ala Leu Thr Pro Thr
 115 120 125

Val Ala Ala Pro Tyr Ile Gly Ala Pro Leu Glu Ser Leu Arg Ser His
 130 135 140

Val Asp Leu Met Val Gly Ala Ala Thr Ala Cys Ser Ala Leu Tyr Ile
 145 150 155 160

Gly Asp Leu Cys Gly Gly Val Phe Leu Val Gly Gln Met Phe Ser Phe
 165 170 175

Gln Pro Arg Arg His Trp Thr Thr Gln Asp Cys Asn Cys Ser Ile Tyr
 180 185 190

Ala Gly His Val Thr Gly His Arg Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn
 195 200 205

Trp

<210> 93
 <211> 209
 <212> PRT
 <213> virus hepatitidy C

<400> 93

Met Leu Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys Gly Phe Ala Asp Leu
 1 5 10 15

Met Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Gly Pro Ile Gly Gly Val Ala Arg
 20 25 30

Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp Gly Val Asn Tyr Ala
 35 40 45

Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile Phe Ile Leu Ala Leu
 50 55 60

Leu Ser Cys Leu Thr Val Pro Ala Ser Ala Val Pro Tyr Arg Asn Ala
65 70 75 80

Ser Gly Ile Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Pro Asn Ser Ser Ile Val
85 90 95

Tyr Glu Ala Asp Asn Leu Ile Leu His Ala Pro Gly Cys Val Pro Cys
100 105 110

Val Met Thr Gly Asn Val Ser Arg Cys Trp Val Gln Ile Thr Pro Thr
115 120 125

Leu Ser Ala Pro Ser Leu Gly Ala Val Thr Ala Pro Leu Arg Arg Ala
130 135 140

Val Asp Tyr Leu Ala Gly Gly Ala Ala Leu Cys Ser Ala Leu Tyr Val
145 150 155 160

Gly Asp Ala Cys Gly Ala Leu Phe Leu Val Gly Gln Met Phe Thr Tyr
165 170 175

Arg Pro Arg Gln His Ala Thr Val Gln Asn Cys Asn Cys Ser Ile Tyr
180 185 190

Ser Gly His Val Thr Gly His Arg Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn
195 200 205

Trp

<210> 94

<211> 209

<212> PRT

<213> virus hepatitidy C

<400> 94

Met Leu Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys Gly Phe Ala Asp Leu
1 5 10 15

Met Gly Tyr Ile Pro Val Val Gly Ala Pro Leu Gly Gly Val Ala Ala
20 25 30

Ala Phe Ala His Gly Val Arg Ala Leu Glu Asp Gly Ile Asn Tyr Ala
35 40 45

Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile Phe Leu Leu Ala Leu

50

55

60

Leu Ser Cys Leu Thr Thr Pro Ala Ser Ala Leu Thr Tyr Gly Asn Ser
65 70 75 80

Ser Gly Leu Tyr His Leu Thr Asn Asp Cys Pro Asn Ser Ser Ile Val
85 90 95

Leu Glu Ala Asp Ala Met Ile Leu His Leu Pro Gly Cys Leu Pro Cys
100 105 110

Val Arg Val Asn Asn Gln Ser Thr Cys Trp His Ala Val Ser Pro Thr
115 120 125

Leu Ala Ile Pro Asn Ala Ser Thr Pro Ala Thr Gly Phe Arg Arg His
130 135 140

Val Asp Leu Leu Ala Gly Ala Ala Val Val Cys Ser Ser Leu Tyr Ile
145 150 155 160

Gly Asp Leu Cys Gly Ser Leu Phe Leu Ala Gly Gln Leu Phe Thr Phe
165 170 175

Gln Pro Arg Arg His Trp Thr Val Gln Asp Cys Asn Cys Ser Ile Tyr
180 185 190

Thr Gly His Val Thr Gly His Arg Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn
195 200 205

Trp

<210> 95
<211> 209
<212> PRT
<213> virus hepatitidy C

<400> 95

Met Leu Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys Gly Phe Ala Asp Leu
1 5 10 15

Met Gly Tyr Ile Pro Val Val Gly Ala Pro Leu Gly Gly Ile Ala Ala
20 25 30

Ala Leu Ala His Gly Val Arg Ala Val Glu Asp Gly Ile Asn Tyr Ala
35 40 45

Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile Phe Leu Leu Ala Leu
50 55 60

Leu Ser Cys Leu Thr Thr Pro Ala Ser Ala Val His Tyr Ala Asn Lys
65 70 75 80

Ser Gly Leu Tyr His Leu Thr Asn Asp Cys Pro Asn Ser Ser Ile Val
85 90 95

Tyr Glu Ala Pro Ala Val Ile Met His Leu Pro Gly Cys Val Pro Cys
100 105 110

Val Lys Val Gly Asn Gln Ser Thr Cys Trp Leu Pro Ala Ser Pro Thr
115 120 125

Leu Ala Val Pro Asn Ala Ser Thr Pro Leu Thr Arg Phe Arg Lys His
130 135 140

Val Asp Leu Met Val Gly Ala Ala Ala Phe Cys Ser Ala Met Tyr Val
145 150 155 160

Gly Asp Ile Cys Gly Gly Leu Phe Leu Leu Gly Gln Val Val Thr Ile
165 170 175

Arg Pro Arg Leu His Gln Thr Val Gln Glu Cys Asn Cys Ser Ile Tyr
180 185 190

Thr Gly Lys Ile Thr Gly His Arg Met Ala Trp Asp Ile Met Met Asn
195 200 205

Trp

<210> 96
<211> 209
<212> PRT
<213> virus hepatitidy C

<400> 96

Met Leu Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys Gly Leu Ala Asp Leu
1 5 10 15

Met Gly Tyr Ile Pro Val Leu Gly Gly Pro Leu Gly Gly Val Ala Ala
20 25 30

Ala Leu Ala His Gly Val Arg Ala Ile Glu Asp Gly Val Asn Tyr Ala

35

40

45

Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile Leu Leu Leu Ala Leu
50 55 60

Leu Ser Cys Leu Thr Ile Pro Ala Ser Ala Ile Gln Val Lys Asn Ala
65 70 75 80

Ser Gly Ile Tyr His Leu Thr Asn Asp Cys Ser Asn Asn Ser Ile Val
85 90 95

Phe Glu Ala Glu Thr Met Ile Leu His Leu Pro Gly Cys Val Pro Cys
100 105 110

Ile Lys Ala Gly Asn Glu Ser Arg Cys Trp Leu Pro Val Ser Pro Thr
115 120 125

Leu Ala Val Pro Asn Ser Ser Val Pro Ile His Gly Phe Arg Arg His
130 135 140

Val Asp Leu Leu Val Gly Ala Ala Ala Phe Cys Ser Ala Met Tyr Ile
145 150 155 160

Gly Asp Leu Cys Gly Ser Ile Phe Leu Val Gly Gln Leu Phe Thr Phe
165 170 175

Arg Pro Lys Tyr His Gln Val Thr Gln Asp Cys Asn Cys Ser Ile Tyr
180 185 190

Ala Gly His Ile Thr Gly His Arg Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn
195 200 205

Trp

<210> 97
<211> 363
<212> PRT
<213> virus hepatitidy C

<400> 97

Glu Thr His Val Thr Gly Gly Asn Ala Gly Arg Thr Thr Ala Gly Pro
1 5 10 15

Val Gly Leu Leu Thr Pro Gly Ala Lys Gln Asn Ile Gln Leu Ile Asn
20 25 30

Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Ser Thr Ala Leu Asn Cys Asn Glu
35 40 45

Ser Leu Asn Thr Gly Trp Leu Ala Gly Leu Phe Tyr Gln His Lys Phe
50 55 60

Asn Ser Ser Gly Cys Pro Glu Arg Leu Ala Ser Cys Arg Arg Leu Thr
65 70 75 80

Asp Phe Ala Gln Gly Trp Gly Pro Ile Ser Tyr Ala Asn Gly Ser Gly
85 90 95

Leu Asp Glu Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Pro Pro Arg Pro Cys Gly
100 105 110

Ile Val Pro Ala Lys Ser Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro
115 120 125

Ser Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Ser Gly Ala Pro Thr Tyr
130 135 140

Ser Trp Gly Ala Asn Asp Thr Asp Val Phe Val Leu Asn Asn Thr Arg
145 150 155 160

Pro Pro Leu Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn Ser Thr Gly
165 170 175

Phe Thr Lys Val Cys Gly Ala Pro Pro Cys Val Ile Gly Gly Val Gly
180 185 190

Asn Asn Thr Leu Leu Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro Glu
195 200 205

Ala Thr Tyr Ser Arg Cys Gly Ser Gly Pro Trp Ile Thr Pro Arg Cys
210 215 220

Met Val Asp Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Ile Asn
225 230 235 240

Tyr Thr Ile Phe Lys Val Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg
245 250 255

Leu Glu Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg Cys Asp Leu Glu
260 265 270

Asp Arg Asp Arg Ser Glu Leu Ser Pro Leu Leu Leu Ser Thr Thr Gln
275 280 285

Trp Gln Val Leu Pro Cys Ser Phe Thr Thr Leu Pro Ala Leu Ser Thr
290 295 300

Gly Leu Ile His Leu His Gln Asn Ile Val Asp Val Gln Tyr Leu Tyr
305 310 315 320

Gly Val Gly Ser Ser Ile Ala Ser Trp Ala Ile Lys Trp Glu Tyr Val
325 330 335

Val Leu Leu Phe Leu Leu Leu Ala Asp Ala Arg Val Cys Ser Glu Phe
340 345 350

Trp Met Met Leu Leu Ile Ser Gln Ala Glu Ala
355 360

<210> 98
<211> 363
<212> PRT
<213> virus hepatitidy C

<400> 98

His Thr Arg Val Ser Gly Gly Ala Ala Ala Ser Asp Thr Arg Gly Leu
1 5 10 15

Val Ser Leu Phe Ser Pro Gly Ser Ala Gln Lys Ile Gln Leu Val Asn
20 25 30

Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Arg Thr Ala Leu Asn Cys Asn Asp
35 40 45

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

Asn Ser Ser Gly Cys Pro Glu Arg Leu Ala Ser Cys Arg Ser Ile Asp
65 70 75 80

Lys Phe Ala Gln Gly Trp Gly Pro Leu Thr Tyr Thr Glu Pro Asn Ser
85 90 95

Ser Asp Gln Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Ala Pro Arg Pro Cys Gly
100 105 110

Ile Val Pro Ala Ser Gln Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro
115 120 125

Ser Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Phe Gly Val Pro Thr Tyr
130 135 140

Asn Trp Gly Ala Asn Asp Ser Asp Val Leu Ile Leu Asn Asn Thr Arg
145 150 155 160

Pro Pro Arg Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn Gly Thr Gly
165 170 175

Phe Thr Lys Thr Cys Gly Gly Pro Pro Cys Asn Ile Gly Gly Ala Gly
180 185 190

Asn Asn Thr Leu Thr Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro Glu
195 200 205

Ala Thr Tyr Ala Arg Cys Gly Ser Gly Pro Trp Leu Thr Pro Arg Cys
210 215 220

Met Val His Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Val Asn
225 230 235 240

Phe Thr Ile Phe Lys Val Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg
245 250 255

Phe Glu Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg Cys Asp Leu Glu
260 265 270

Asp Arg Asp Arg Ser Glu Leu Ser Pro Leu Leu Leu Ser Thr Thr Glu
275 280 285

Trp Gln Ile Leu Pro Cys Ser Phe Thr Thr Leu Pro Ala Leu Ser Thr
290 295 300

Gly Leu Ile His Leu His Gln Asn Ile Val Asp Val Gln Tyr Leu Tyr
305 310 315 320

Gly Val Gly Ser Ala Val Val Ser Leu Val Ile Lys Trp Glu Tyr Val
325 330 335

Leu Leu Leu Phe Leu Leu Leu Ala Asp Ala Arg Ile Cys Ala Cys Leu
340 345 350

Trp Met Met Leu Leu Ile Ala Gln Ala Glu Ala
355 360