



(12) PATENT

(19) NO

(11) 331877

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

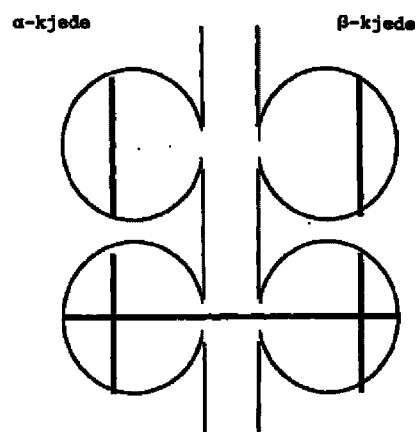
C07K 14/725 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
G01N 33/566 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20041325	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2002.08.30 PCT/GB2002/03986
(22)	Inng.dag	2004.03.30	(85)	Videreføringsdag	2004.03.30
(24)	Løpedag	2002.08.30	(30)	Prioritet	2001.08.31, GB, 0121187 2002.08.16, GB, 0219146 2002.08.16, US, 404182
(41)	Alm.tilgj	2004.03.30			
(45)	Meddelt	2012.04.23			
(73)	Innehaver	Immunocore Ltd, 57c Milton Park, Abingdon, GB-OX144RX OXFORDSHIRE, Storbritannia			
(72)	Oppfinner	Bent Karsten Jakobsen, c/o Avidex Ltd, 57C Milton Park, GB-OX144RX ABINGDON, OXFORDSHIRE, Storbritannia			
(74)	Fullmektig	Meir Glick, 63 Golden Road, US-MA02072 STOUGHTON, USA Tandbergas Patentkontor AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge			

(54)	Benevnelse	Løselig $\alpha\beta$-form-T-cellereseptor (sTCR), multivalent T-cellereseptor(TCR)-kompleks, nukleinsyremolekyl, vektor, vertscelle og fremgangsmåte for å fremskaffe hele eller deler av T-cellereseptoren, fremgangsmåte for å påvise MHC-peptidkomplekser, og farmasøytisk formulering inneholdende sTCR eller multivalent TCR-kompleks.		
(56)	Anførte publikasjoner	REITER Y. et al., "Construction of a Functional Disulfide-Stabilized TCR Fv Indicates that Antibody and TCR Fv Frameworks Are Very Similar in Structure", Immunity, 1995, vol. 2, s.281-287, ISSN 1074-7613, US 6080840 A		
(57)	Sammendrag			

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en løselig T-cellereseptor (sTCR) som omfatter (i) hele eller deler av en TCR-alfa-kjede, unntatt transmembrandomenet derav, og (ii) hele eller deler av en TCR-beta-kjede, unntatt transmembrandomenet derav. (i) og (ii) omfatter hver et funksjonelt variabelt domene og i det minste en del av det konstante domenet på TCRkjeden, og er bundet sammen med en disulfidbinding mellom residier på konstantdomenet som ikke er til stede i nativTCR.



— Nativ intrakjededisulfidbinding

— Ikke-nativ interkjededisulfidbinding



TCR-domene

Foreliggende oppfinnelse vedrører løselige T-cellereseptorer (TCR).

Som beskrevet i WO 99/60120 medierer TCR T-cellers gjenkjennelse av spesifikke MHC- (Major Histocompatibility Complex) peptidkomplekser og er i egenskap
5 av dette essensielle for virkningen av immunsystemets cellulære del.

Antistoffer og TCR er de eneste to typer av molekyler som gjenkjenner antigener på en spesifikk måte, og dermed er TCR den eneste reseptoren for spesielle peptid-
antigener som presenteres av MHC der det fremmede peptidet ofte er det eneste tegnet på
et avvik inne i cellen. T-cellegjenkjenning forekommer når en T-celle og en antigen-
10 presenterende celle (APC) kommer i direkte fysisk kontakt, og blir initiert ved sammen-
kopling av TCRer og pMHC-komplekser.

TCR er et heterodimert celleoverflateprotein tilhørende immunoglobulin-
superfamilien som er assosiert med uforanderlige proteiner i CD3-komplekset som er
involvert i medieringen av signaloverføring. TCR foreligger i $\alpha\beta$ - og i $\gamma\delta$ -former som er
15 strukturelt like, men T-celler som uttrykker dem har svært distinkte anatomiske
lokaliseringer og sannsynligvis funksjoner. Den ekstracellulære delen av reseptoren består
av to membranproksimale konstante domener og to membrandistale variable domener
med polymorfe løkker som er analoge med de komplementaritets-bestemmende regionene
(CDR) på antistoffer. Det er disse løkkene som danner bindingssetet på TCR-molekylet
20 og som bestemmer peptidspesifisitet. MHC-klasse-I- og MHC-klasse-II-ligander er også
proteiner i immunoglobulinsuperfamilien, men de er spesialiserte for antigenpresentering
med et polymorft peptidbindingssete som gjør dem i stand til å presentere et bredt spekter
av korte peptidfragmenter på APC-celleoverflaten.

Løselige TCRer er nyttige, ikke bare til formålet med å undersøke spesifikke
25 TCR-pMHC-interaksjoner, men også potensielt som et diagnostisk redskap for å påvise
infeksjon, eller for å påvise markører for autoimmunsykdom. Løselige TCRer har også
anvendelse innenfor farging, for eksempel til farging av celler for å avsløre tilstede-
værelse av et spesielt peptidantigen som presenteres i konteksten med MHC. Likeledes
kan løselige TCRer bli benyttet for å levere et terapeutisk middel, for eksempel en
30 cytotoxisk forbindelse eller en immunstimulerende forbindelse, til celler som presenterer
et spesielt antigen. Løselige TCRer kan også bli benyttet for å hemme T-celler, for
eksempel de som reagerer mot et autoimmunt peptidantigen.

Proteiner som består av mer enn én polypeptidsubenhet, og som har et trans-
membrandomene, kan være vanskelige å fremstille i løselig form fordi proteinet i mange
35 tilfeller blir stabilisert med sin transmembranregion. Dette er tilfellet for TCR, og det
kommer frem i forskningslitteraturen som beskriver trunkerte former av TCR som
inneholder enten bare ekstracellulære domener eller ekstracellulære og cytoplasmiske
domener som kan bli gjenkjent av TCR-spesifikke antistoffer (noe som tyder på at den
delen av den rekombinante TCRen som blir gjenkjent av antistoffet er korrekt foldet),

men som ikke kan bli fremstilt med et godt utbytte, som ikke er stabile ved lave konsentrasjoner og/eller som ikke kan gjenkjenne MHC-peptidkomplekser. Denne litteraturen er presentert i WO 99/60120.

Et antall artikler beskriver fremstillingen av TCR-heterodimerer som inkluderer den native disulfidbroen som binder sammen de respektive subenhetene (Garboczi, et al., (1996), Nature 384(6605): 134-41, Garboczi, et al., (1996), J. Immunol. 157(12):5403-10, Chang et al., (1994), PNAS USA 91: 11408-11412, Davodeau et al., (1993), J. Biol. Chem. 268(21): 15455-15460, Golden et al., (1997), J. Imm. Meth. 206: 163-169, US patentskrift nr. 6080840). Selv om slike TCRer kan bli gjenkjent av TCR-spesifikke antistoffer ble likevel ingen vist å kunne gjenkjenne sin native ligand ved noe annet enn ved relativt høye konsentrasjoner og/eller de var ikke stabile.

I WO 99/60120 blir det beskrevet en løselig TCR som er korrekt foldet slik at den er i stand til å gjenkjenne sin native ligand, som er stabil over et tidsrom og som kan bli fremstilt i rimelige mengder. Denne TCRen omfatter et TCR- α - eller TCR- γ -kjede-ekstracellulærdomene dimerisert henholdsvis med et TCR- β - eller TCR- δ -kjede-ekstracellulærdomene ved hjelp av et par C-terminale dimeriseringspeptider slik som såkalte leucizippere. Denne strategien for fremstilling av TCR er generelt anvendbar for alle TCRer.

Reiter et al., Immunity, 1995, 2:281-287, beskriver i detalj fremstillingen av et løselig molekyl som omfatter disulfidstabiliserte TCR- α - og TCR- β -domener, der ett er bundet til en trunkert form av Pseudomonaseksotoksin (PE38). En av de fremsatte grunnene for å fremstille dette molekylet var å overvinne den naturlige ustabiliteten til enkeltkjede-TCRer. Posisjonen til den nye disulfidbindingen i de variable domenene til TCR ble identifisert via homologi med de variable domenene til antistoffer, i hvilke disse tidligere har blitt introdusert (se for eksempel Brinkmann et al., (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 7538-7542 og Reiter et al., (1994) Biochemistry 33: 5451-5459). Siden det ikke foreligger slik homologi mellom de konstante antistoff- og TCR-domenene kan ikke en slik teknikk bli benyttet for å identifisere passende seter for nye interkjededisulfidbindinger mellom konstante TCR-domener.

Gitt viktigheten av løselige TCRer ville det vært ønskelig å tilveiebringe en alternativ måte å fremstille slike molekyler.

Ifølge et første aspekt tilveiebringer foreliggende oppfinnelse, som angitt i krav 1, en løselig $\alpha\beta$ -form-T-cellereseptor (sTCR), hvor

(a) en kovalent disulfidbinding forbinder et residue på immunoglobulinregionen på det konstante domenet til α -kjeden med et residue på immunoglobulinregionen på det konstante domenet til β -kjeden, der en interkjededisulfidbinding i nativ TCR ikke er til stede, eller

(b) en kovalent disulfidbinding forbinder cysteinresiduer som er substituert for:

Thr 48 i ekson 1 på TRAC*01 og Ser 57 i ekson 1 på TRBC1*01 eller TRBC2*01,

Thr 45 i ekson 1 på TRAC*01 og Ser 77 i ekson 1 på TRBC1*01 eller TRBC2*01,

5 Tyr 10 i ekson 1 på TRAC*01 og Ser 17 i ekson 1 på TRBC1*01 eller TRBC2*01,

Thr 45 i ekson 1 på TRAC*01 og Asp 59 i ekson 1 på TRBC1*01 eller TRBC2*01,

10 Ser 15 i ekson 1 på TRAC*01 og Glu 15 i ekson 1 på TRBC1*01 eller TRBC2*01.

Ifølge et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen en sTCR ifølge krav 1, som omfatter (i) hele eller deler av en TCR- α -kjede, unntatt transmembrandomenet derav, og (ii) hele eller deler av en TCR- β -kjede, unntatt transmembrandomenet derav, der (i) og (ii) hver omfatter et funksjonelt variabelt domene og i det minste en del av det konstante domenet til TCR-kjeden.

Ifølge et ytterligere aspekt tilveiebringer oppfinnelsen et multivalent T-celle-reseptor (TCR)-kompleks, som angitt i krav 22, som omfatter et flertall av sTCRer ifølge ethvert av de foregående krav.

15 Ifølge enda et aspekt tilveiebringer oppfinnelsen et nukleinsyremolekyl, angitt i krav 26, som omfatter en sekvens som koder for (i) eller (ii) fra en sTCR ifølge ethvert av kravene 2-21, eller en sekvens som er komplementær dertil.

Ifølge et ytterligere aspekt tilveiebringer oppfinnelsen, i krav 27, en vektor, som omfatter et nukleinsyremolekyl ifølge krav 26.

25 Ifølge et ytterligere aspekt tilveiebringer oppfinnelsen, i krav 28, en vertscelle, som omfatter en vektor ifølge krav 27.

Ifølge enda et ytterligere aspekt tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for å fremskaffe (i) eller (ii) som definert i ethvert av kravene 2-21, som omfatter å inkubere en vertscelle ifølge krav 28 ved betingelser som fører til uttrykking av peptidet og deretter rensing av polypeptidet.

30 Ifølge enda et ytterligere aspekt tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for å fremskaffe en løselig $\alpha\beta$ -form-T-cellereseptor (sTCR), som omfatter å:

inkubere en vertscelle som omfatter en vektor som omfatter et nukleinsyremolekyl som koder for en TCR- α -kjede og en vertscelle som omfatter en vektor som omfatter et nukleinsyremolekyl som koder for en TCR- β -kjede ved betingelser som fører til uttrykking av de respektive TCR-kjedene,

35 rense de respektive TCR-kjedene, og

blande de respektive TCR-kjedene ved refoldingsbetingelser slik at en kovalent disulfidbinding forbinder et residue på immunoglobulinregionen på det konstante domenet på α -kjeden med en residue på immunoglobulinregionen på det konstante

domenet på β -kjeden, der disulfidbindingen er en binding som ikke er tilstede i nativ TCR.

Ifølge enda et ytterligere aspekt tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for å påvise MHC-peptidkomplekser, som omfatter å:

- 5 (i) tilveiebringe en løselig TCR ifølge ethvert av kravene 1-21, en løselig TCR fremstilt ved fremgangsmåten ifølge ethvert av kravene 31-51, et multivalent T-cellereseptorkompleks ifølge ethvert av kravene 22-25 eller et multivalent T-cellereseptorkompleks fremstilt ved fremgangsmåten ifølge ethvert av kravene 52-55,
- (ii) bringe den løselige TCRen eller det multivalente TCR-komplekset i kontakt
- 10 med MHC-peptidkompleksene, og
- (iii) påvise binding av den løselige TCRen eller det multivalente TCR-komplekset til MHC-peptidkompleksene.

Ifølge enda et ytterligere aspekt tilveiebringer oppfinnelsen en farmasøytisk formulering, som omfatter

- 15 en sTCR (a) ifølge ethvert av kravene 1-21, eller (b) fremstilt ved fremgangsmåten ifølge ethvert av kravene 31-51, og/eller
- et multivalent TCR-kompleks (a) ifølge ethvert av kravene 22-25, eller
- (b) fremstilt ved fremgangsmåten ifølge ethvert av kravene 52-55,
- sammen med en farmasøytisk akseptabel bærer.

- 20 sTCRene ifølge foreliggende oppfinnelse har den fordel at de ikke inneholder heterologe polypeptider som kan være immunogene eller som kan føre til at sTCRene raskt blir fjernet fra kroppen. TCRer ifølge foreliggende oppfinnelse har videre en tredimensjonal struktur som er svært lik strukturen til de native TCRe de er avledet fra, og på grunn av denne strukturelle likheten er det ikke sannsynlig at de er immunogene.
- 25 sTCRer kan i overensstemmelse med oppfinnelsen bli brukt til å gjenkjenne Klasse-I-MHC-peptidkomplekser eller Klasse-II-MHC-peptidkomplekser.

TCRer ifølge foreliggende oppfinnelse er løselige. I konteksten til denne søknaden er løselighet definert som TCR sin evne til å bli rensset som en monodispers heterodimer i fosfatbufret saltvannsoppløsning (PBS) (KCl 2,7mM, KH_2PO_4 1,5mM, NaCl 137mM og Na_2PO_4 8mM, pH 7,1-7,5, Life Technologies, Bibco BRL) ved en

30 konsentrasjon på 1 mg/ml og der >90 % av nevnte TCR fremdeles foreligger som en monodispers heterodimer etter inkubering ved 25 °C i 1 time. For å kunne vurdere løseligheten av TCRen blir den først rensset som beskrevet i eksempel 2. Etter denne rensingen blir 100 μg av TCRen analysert med analytisk størrelsessekskluderings-

35 kromatografi ved for eksempel å benytte en Pharmacia-Superdex-75-HR-kolonne som er balansert med PBS. Ytterligere 100 μg av TCRen blir inkubert ved 25 °C i 1 time og deretter analysert med størrelsessekskluderingskromatografi som tidligere. Størrelses-

eksklusjonskurvene blir så analysert ved integrasjon, og arealene under toppene som tilsvare den monodisperse heterodimeren blir sammenlignet. De relevante toppene kan

bli identifisert ved å sammenligne med elueringsposisjonene til proteinstandarder med kjent molekylvekt. Den monodisperse heterodimere løselige TCRe har en molekylvekt på omtrent 50 kDa. Som fastslått ovenfor er TCRe ifølge foreliggende oppfinnelse løselige. Som forklart i nærmere detalj nedenfor kan likevel TCRe bli koplet til en
 5 enhet slik at det resulterende komplekset blir uløselig eller de kan bli presentert på overflaten til en uløselig fast bærer.

Nummereringen av TCR-aminosyrer som blir benyttet her følger IMGT-systemet som er beskrevet i The T cell Receptor Factsbook, 2001, LeFranc & LeFranc, Academic Press. I dette systemet har α -kjede-konstantdomenet følgende notasjon: TRAC*01, der
 10 "TR" indikerer T-celle-reseptorgen, "A" indikerer α -kjede-gen, "C" indikerer konstantregion og "01*" indikerer allel 1. β -kjede-konstantdomenet har den følgende notasjonen: TRBC1*01. I dette tilfellet er det to mulige konstantregiongener "C1" og C2". Det translaterte domenet som er kodet for av hvert allel kan bli dannet av den genetiske koden fra flere eksoner og derfor er disse også spesifisert. Aminosyrer er
 15 nummerert i overensstemmelse med eksonet til det spesielle domenet der de er til stede. Den ekstracellulære delen av nativt TCR består av to polypeptider ($\alpha\beta$ eller $\gamma\delta$) der hver av disse har et membranproksimalt konstant domene og et membrandistalt variabelt domene (se figur 1). Hver av de konstante og variable domene inkluderer en intrakjededisulfidbinding. De variable domene inneholder de svært polymorfe løkkene
 20 som er analoge med de komplementaritetsbestemmende regionene (CDR) til antistoffer. CDR3 på TCR interagerer med peptidet som blir presentert av MHC, og CDRene 1 og 2 interagerer med peptidet og med MHC. Mangfoldet av TCR-sekvenser blir generert via somatisk reorganisering av sammenkoblede variable gener (V), diversitetsgener (D), forbindelsesgener (J) og konstante gener. Funksjonelle α -kjede-polypeptider blir dannet
 25 av reorganiserte V-J-C-regioner, mens β -kjeder består av V-D-J-regioner. Det ekstracellulære konstante domenet har en membranproksimal region og en immunoglobulin-region. Den membranproksimale regionen består av aminosyrene mellom transmembrandomenet og den membranproksimale cysteinresidien. De konstante immunoglobulindomenene består av resten av aminosyreresidier i det konstante domenet, og de
 30 strekker seg fra det membranproksimale cysteinet til begynnelsen på forbindelsesregionen, og er karakterisert ved tilstedeværelsen av en folding av immunoglobulintype. Det er ett enkelt α -kjede-konstantdomene, kjent som Ca1 eller TRAC*01, og to ulike β -konstantdomener, kjent som C β 1 eller TRBC1*01 og C β 2 eller TRBC2*01. Forskjellen mellom disse ulike β -konstantdomene utgår fra aminosyreresidier 4, 5 og 37 fra ekson
 35 1. TRBC1*01 har dermed 4N, 5K og 37F i ekson 1 derav, og TRBC2*01 har 4K, 5N og 37Y i ekson 1 derav. Forekomsten av hver av de ekstracellulære TCR-domenene er variabel.

Ifølge foreliggende oppfinnelse blir disulfidbindingen introdusert mellom residier som er lokalisert i de konstante domene (eller deler derav) til de respektive kjedene. De

respektive kjedene til TCR omfatter tilstrekkelig av de variable domenene derav til å være i stand til å interagere med sitt pMHC-kompleks. Slike interaksjoner kan bli målt ved å benytte et BIAcore-3000 eller BIAcore-2000 instrument som beskrevet i henholdsvis eksempel 3 eller i WO 99/6120.

5 I en utførelsesform omfatter de respektive kjedene i sTCRen ifølge oppfinnelsen også intrakjededisulfidbindingene derav. TCRen ifølge foreliggende oppfinnelse kan omfatte hele den ekstracellulære konstante Ig-regionen til de respektive TCR-kjedene, og helst hele det ekstracellulære domenet til de respektive kjedene, d.v.s. inkludert den membranproksimale regionen. I nativ TCR er det en disulfidbinding som forbinder de
10 konserverte membranproksimale regionene til de respektive kjedene. I en utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse er ikke denne disulfidbindingen til stede. Dette kan oppnås ved å mutere de rette cysteinresidiene (henholdsvis aminosyre 4, ekson 2 i TRAC*01-genet og aminosyre 2 i både TRBC1*01- og TRBC2*01-genet) til en annen aminosyre, eller ved å trunkere de respektive kjedene slik at cysteinresidiene ikke blir
15 inkludert. En foretrukket løselig TCR ifølge oppfinnelsen omfatter de native α - og β -TCR-kjedene der disse er trunkerte på C-terminalen slik at cysteinresidiene som danner den native interkjededisulfidbindingen blir ekskludert, d.v.s. trunkert på residene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, eller 10 N-terminalt i forhold til cysteinresidiene. Det må likevel være klart at den native interkjededisulfidbindingen kan være til stede i TCRer ifølge foreliggende
20 oppfinnelse, og at det i visse utførelsesformer er slik at bare én av TCR-kjedene inneholder den native cysteinresidien som danner den native interkjededisulfidbindingen. Dette cysteinet kan bli benyttet til å kople enheter til TCRen.

De respektive TCR-kjedene kan likevel være kortere. Fordi de konstante domenene ikke er direkte involvert i kontaktene med peptid-MHC-ligandene kan det C-terminale trunkeringspunktet bli forandret vesentlig uten tap av funksjonalitet.
25

Alternativt kan et større fragment av de konstante domenene være til stede enn det som er foretrukket her, d.v.s. de konstante domenene behøver ikke å bli trunkerte bare i forkant av cysteinene som danner interkjededisulfidbindingen. For eksempel kan hele det konstante domenet unntatt transmembrandomenet (d.v.s. de ekstracellulære og
30 cytoplasmiske domenene) bli inkludert. Det kan i dette tilfellet være fordelaktig å mutere én eller flere av cysteinresidiene som danner interkjededisulfidbindingen i den cellulære TCRen til en annen aminosyreresidie som ikke er involvert i dannelsen av disulfidbinding, eller å fjerne én eller flere residier.

Signalpeptidet kan bli utelatt dersom den løselige TCRen skal bli uttrykt i
35 prokaryote celler, for eksempel i *E.coli*, siden dette peptidet ikke har noen funksjon i den ferdig utviklede TCRen i forhold til dennes ligandbindende evne, og peptidet kan i visse tilfeller motvirke dannelsen av en funksjonell løselig TCR. I de fleste tilfeller blir kløyvingssetet der signalpeptidet blir splittet fra de ferdig utviklede TCR-kjedene forutsatt, men det blir ikke bestemt eksperimentelt. Konstruering av de uttrykte TCR-

kjedene slik at de blir noen få, d.v.s. opp til for eksempel omtrent 10, aminosyrer lengre eller kortere på den N-terminale enden behøver ikke å ha noen betydning for funksjonaliteten (d.v.s. på evnen til å gjenkjenne pMHC) til den løselige TCRen. Visse tilføyelser, som ikke er til stede i den originale proteinsekvensen, kan bli påsatt. For eksempel kan en kort markørsekvens som kan fremme rensing av TCR-kjedene bli påsatt, forutsatt at den ikke påvirker den korrekte strukturen og foldingen av det antigenbindende setet på TCRen.

Ved uttrykking i *E.coli* kan en metioninresidie bli satt inn på det N-terminale startstedet på den ferdig utviklede beregnede proteinsekvensen for å muliggjøre initiering av translasjon.

Langt fra alle residier i de variable domenene til TCR-kjedene er essensielle for antigenspesifisitet og funksjonalitet. Dermed kan et anselig antall mutasjoner bli introdusert i dette domenet uten at antigenspesifisitet og funksjonalitet blir påvirket. Langt fra alle residier i de konstante domenene til TCR-kjedene er essensielle for antigenspesifisitet og funksjonalitet. Dermed kan et anselig antall mutasjoner bli introdusert i denne regionen uten at antigenspesifisiteten blir påvirket.

TCR- β -kjeden inneholder en cysteinresidie som ikke finnes i den cellulære eller native TCRen. Det er foretrukket at denne cysteinresidien blir fjernet eller mutert til en annen residie for å unngå ukorrekt intrakjede- eller interkjedeparing. Substitueringer av denne cysteinresidien med en annen residie, for eksempel serin eller alanin, kan ha signifikant positiv effekt på refoldingeffektivitet *in vitro*.

Disulfidbindingen kan bli dannet ved å mutere residier på de respektive kjedene som ikke er cystein slik at de blir cysteiner, noe som fører til at bindingen blir dannet mellom de muterte residiene. Residier hvis respektive β -karboner ligger omtrent 6Å (0,6nm) eller mindre, og helst i området 3,5Å (0,35nm) til 5,9Å (0,59nm) fra hverandre i nativ TCR er foretrukket, slik at en disulfidbinding kan bli dannet mellom cysteinresidier som blir introdusert istedenfor de native residiene. Det er foretrukket at disulfidbindingene foreligger mellom residier i den konstante immunoglobulinregionen, selv om de kan eksistere mellom residier i den membranproksimale regionen. Foretrukne seter der cysteiner kan bli introdusert for å danne disulfidbindingene er de følgende residiene i ekson 1 i TRAC*01 for TCR- α -kjeden og TRBC1*01 eller TRBC2*01 for TCR- β -kjeden:

TCR- α -kjede	TCR- β -kjede	Nativ β -karbon separasjon (nm)
Thr 48	Ser 57	0,473
Thr 45	Ser 77	0,533
Tyr 10	Ser 17	0,359
Thr 45	Asp 59	0,560
Ser 15	Glu 15	0,59

En sTCR ifølge foreliggende oppfinnelse er avledet fra A6-Tax-TCR (Garboczi et al., Nature, 1996, 384(6605): 134-141). I en utførelsesform omfatter sTCRen hele TCR- α -kjeden som er N-terminal for ekson 2, residie 4 fra TRAC*01 (amino-syrer 1-182 på α -kjeden ifølge nummereringen benyttet i Garboczi et al) og hele TCR- β -kjeden som er N-terminal for ekson 2, residie 2 på både TRBC1*01 og TRCB2*01 (amino-syrer 1-210 på β -kjeden ifølge nummereringen benyttet i Garboczi et al). For å kunne danne disulfid-bindingen kan treonin 48 på ekson 1 i TRAC*01 (treonin 158 på α -kjeden ifølge nummereringen benyttet i Garboczi et al) og serin 57 på ekson 1 i både TRBC1*01 og TRBC2*01 (serin 172 på β -kjeden ifølge nummereringen benyttet i Garboczi et al) begge bli mutert til cystein. Disse aminosyrene er lokalisert på β -tråd-D i det konstante domenet til henholdsvis α - og β -TCR-kjeder.

Det må pekes på at residie 1 (ifølge nummereringen som er benyttet i Garboczi et al) er henholdsvis K og N i figur 3a og figur 3b. Den N-terminale metioninresidien er ikke til stede i nativ A6-Tax-TCR og, som nevnt ovenfor, er noen ganger til stede når de respektive kjedene blir fremstilt i bakterielle ekspresjonssystemer.

Nå som residiene i humane TCRer som kan bli mutert til cysteinresidier for å danne en ny interkjededisulfidbinding har blitt identifisert, vil fagfolk på området være i stand til å mutere enhver TCR på samme måte for å fremstille en løselig form av den TCRen som har en ny interkjededisulfidbinding. Hos mennesker behøver fagfolk kun å se etter de følgende motiver i de respektive TCR-kjedene for å identifisere residien som skal bli mutert (den understrekede residien er den som skal muteres til cystein).

25	α -kjede Thr 48:	DSDVYITDK <u>T</u> VLDMRSMDFK (amino-syrer 39-58 fra ekson 1 på TRAC*01-genet)
	α -kjede Thr 45:	QSKDSDVYT <u>T</u> DKTVLDMRSM (amino-syrer 36-55 fra ekson 1 på TRAC*01-genet)
30	α -kjede Tyr 10:	DIQNPDPAV <u>Y</u> QLRDSKSSDK (amino-syrer 1-20 fra ekson 1 på TRAC*01-genet)
	α -kjede Ser 15:	DPAVYQLRD <u>S</u> KSSDKSVCLF (amino-syrer 6-25 fra ekson 1 på TRAC*01-genet)
35	β -kjede Ser 57:	NGKEVHSGV <u>S</u> TDPQPLKEQP (amino-syrer 48-67 fra ekson 1 på TRBC1*01- og TRBC2*01-genet)
	β -kjede Ser 77:	ALNDSRYAL <u>S</u> SRLRVSATFW (amino-syrer 68-87 fra ekson 1 på

TRBC1*01- og TRBC2*01-genet)

β-kjede Ser 17: PPEVAVFEPSEAEISHTQKA (aminosyrer 8-27 fra ekson 1 på TRBC1*01- og TRBC2*01-genet)

5

β-kjede Asp 59: KEVHSGVSTDPQPLKEQPAL (aminosyrer 50-69 fra ekson 1 på TRBC1*01- og TRBC2*01-genet)

10

β-kjede Glu 15: VFPPEVAVFEPSEAEISHTQ (aminosyrer 6-25 fra ekson 1 på TRBC1*01- og TRBC2*01-genet)

Hos andre arter er det ikke sikkert at TCR-kjedene har regioner med 100 % identitet med motivene ovenfor. Fagfolk på området vil likevel være i stand til å benytte motivene ovenfor for å identifisere de tilsvarende delene av TCR-α- og TCR-β-kjedene og dermed også residien som skal muteres til cystein. Sammenligningsteknikker kan bli benyttet i så henseende. For eksempel kan ClustalW, som er tilgjengelig på internettetsiden til the European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/index.html>), bli benyttet for å sammenligne motivene ovenfor med en spesiell TCR-kjedesekvens for å kunne lokalisere den relevante delen av TCR-sekvensen som skal muteres.

Foreliggende oppfinnelse inkluderer i sitt omfang humane disulfidbundne αβ-TCRer i tillegg til disulfidbundne αβ-TCRer fra andre pattedyr, inkludert men ikke begrenset til, mus, rotte, svin, geit og sau. Som nevnt ovenfor vil fagfolk på området være i stand til å bestemme seter, tilsvarende til de humane setene som er beskrevet ovenfor, der cysteinresidier kan bli introdusert for å danne en interkjededisulfidbinding. For eksempel vises i det følgende aminosyresekvensene til løselige muse-Cα- og muse-Cβ-domener, sammen med motiver som viser de murine residiene, som er ekvivalente med de humane residiene som er nevnt ovenfor, som kan bli mutert til cysteiner for å danne en TCR-interkjededisulfidbinding (der de relevante residiene er understreket):

30 Løselig muse-Cα-domene:

PYIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKTVLDMKA
MDSKSNGAIAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVP

Løselig muse Cβ-domene:

35 EDLRNVTTPKVSLFEP SKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWVNGREVHS
GVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLRV SATFWHNP RNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEG
SPKPVTQNISAEAWGRAD

Murin ekvivalent til human α-kjede Thr 48: ESGTFITDKTVLDMKAMDSK

	Murin ekvivalent til human α -kjede Thr 45:	KTMESGTFIT <u>TD</u> KTVLDMKAM
	Murin ekvivalent til human α -kjede Tyr 10:	YIQNPEPAVY <u>QL</u> KDPRSQDS
5	Murin ekvivalent til human α -kjede Ser 15:	AVYQLKDPR <u>S</u> QDSTLCLFTD
	Murin ekvivalent til human β -kjede Ser 57:	NGREVHSGV <u>ST</u> DPQAYKESN
10	Murin ekvivalent til human β -kjede Ser 77:	KESNYSYCL <u>SS</u> RRLRVSATFW
	Murin ekvivalent til human β -kjede Ser 17:	PPKVSLFEP <u>S</u> KAEIANKQKA
	Murin ekvivalent til human β -kjede Asp 59:	REVHSGVST <u>DP</u> QAYKESNYS
15	Murin ekvivalent til human β -kjede Glu 15:	VTPPKVSLF <u>EP</u> SKAEIANKQ

I en foretrukket utførelsesform av foreliggende oppfinnelse omfatter (i) og (ii) av TCRen hver det funksjonelle variable domenet fra en første TCR fusjonert med hele eller
 20 deler av det konstante domenet fra en annen TCR, der den første og den andre TCRen stammer fra den samme arten, og der interkjededisulfidbindingen foreligger mellom residier i nevnte respektive hele eller del av det konstante domenet som ikke er til stede i nativ TCR. I en utførelsesform er den første og den andre TCRen human. Med andre ord virker de disulfidbundne konstante domenene som et skjellest til hvilket variable domener
 25 kan bli fusjonert. Den resulterende TCR vil være vesentlig identisk med den native TCR fra hvilken den første TCRen er fremskaffet. Et slikt system tillater enkel uttrykking av ethvert funksjonelt variabelt domene på et stabilt konstant domeneskjellest.

De konstante domenene til A6-Tax-TCR beskrevet ovenfor, eller i det hele tatt de konstante domenene til enhver av de mutante $\alpha\beta$ -TCRene som har en ny interkjede-
 30 disulfidbinding som beskrevet ovenfor, kan bli benyttet som et skjellest på hvilket heterologe variable domener kan bli fusjonert. Det er foretrukket at fusjonsproteinet opprettholder så mye av konformasjonen til de heterologe variable domenene som mulig. Derfor er det foretrukket at de heterologe variable domenene blir bundet til de konstante domenene på ethvert punkt mellom de introduserte cysteinresidiene og N-terminalen på
 35 det konstante domenet. For A6-Tax-TCR er de introduserte cysteinresidiene på α - og β -kjedene helst lokaliserte på henholdsvis treonin 48 fra ekson 1 i TRAC*01 (treonin 158 på α -kjeden ifølge nummereringen benyttet i Garboczi et al) og serin 57 fra ekson 1 i både TRBC1*01 og TRBC2*01 (serin 172 på β -kjeden ifølge nummereringen benyttet Garboczi et al). Derfor er det foretrukket at forbindelsespunktene til de heterologe

variable α - og β -kjededomenene ligger mellom residene 48 (159 ifølge nummereringen benyttet i Garboczi et al) eller 58 (173 ifølge nummereringen benyttet i Garboczi et al) og N-terminalen på henholdsvis de konstante α - eller β -domenene.

Residiene i de konstante domenene til de heterologe α - og β -kjedene som tilsvarer
 5 forbindelsespunktene i A6-Tax-TCR kan bli identifisert ved hjelp av sekvenshomologi. Fusjonsproteinet blir helst fremstilt slik at det inkluderer hele den heterologe sekvensen som ligger N-terminalt i forhold til forbindelsespunktet.

Som diskutert i nærmere detalj nedenfor kan sTCRene ifølge foreliggende oppfinnelse bli derivatisert med eller fusjonert med en enhet på sine C- eller N-terminale
 10 ender. C-terminalen er foretrukket siden denne ligger langt fra bindingsdomenet. I en utførelsesform har én eller begge TCR-kjedene en cysteinresidie på sin C- og/eller N-terminal på hvilke en slik enhet kan bli fusjonert.

En løselig TCR (som helst er human) ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli tilveiebrakt i vesentlig ren form, eller i form av et rensset eller isolert preparat. For
 15 eksempel kan den bli tilveiebrakt i en form som er vesentlig fri for andre proteiner.

Et flertall med løselige TCRer ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli tilveiebrakt i et multivalent kompleks. I et aspekt tilveiebringer dermed foreliggende oppfinnelse et multivalent T-cellereseptor- (TCR) kompleks som omfatter et flertall av løselige T-cellereseptorer som beskrevet heri. Hver av de i flertallet med løselige TCRer er helst
 20 identiske.

I et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen, som tidligere nevnt, en fremgangsmåte for å påvise MHC-peptidkomplekser.

I det multivalente komplekset ifølge foreliggende oppfinnelse kan TCRene foreligge i form av multimerer, og/eller foreligge på eller være assosiert med et lipidlag,
 25 for eksempel et liposom.

I sin enkleste form omfatter et multivalent TCR-kompleks ifølge foreliggende oppfinnelse en multimer som består av to eller tre eller fire eller flere T-cellereseptormolekyler som er assosiert (for eksempel kovalent eller på annen måte forbundet) med hverandre, helst via et forbindelsesmolekyl. Hensiktsmessige
 30 forbindelsesmolekyler inkluderer, men er ikke begrenset til, multivalente koplingsmolekyler slik som avidin, streptavidin, neutravidin og ekstravidin, der hver av disse har fire bindings seter for biotin. Biotinylerte TCR-molekyler kan dermed bli dannet på multimerer av T-cellereseptorer som har et flertall med TCR-bindings seter. Antallet TCR-molekyler i multimeren vil være avhengig av mengden av TCR i forhold til mengden av
 35 forbindelsesmolekyl som er benyttet for å danne multimerene, og også av tilstedeværelsen eller fraværet av andre biotinylerte molekyler. Foretrukne multimerer er dimere, trimere eller tetramere TCR-komplekser.

Strukturer som er en god del større enn TCR-tetramerer kan bli benyttet for å finne eller målsøke celler som uttrykker spesifikke MHC-peptidkomplekser. Helst er

strukturene av størrelsesorden 10nm til 10µm i diameter. Hver struktur kan fremvise flere TCR-molekyler som har en innbyrdes avstand seg i mellom som tillater to eller flere TCR-molekyler på strukturen å binde samtidig til to eller flere MHC-peptidkomplekser på en celle, og som dermed øker reaksjonsvilligheten til den multimere bindingsenheten for cellen.

Passende strukturer som kan benyttes med oppfinnelsen inkluderer membran-strukturer slik som liposomer og faste strukturer som helst er partikler slik som kuler, for eksempel latekskuler. Andre strukturer som kan bli belagt på overflaten med T-celle-reseptormolekyler er også passende. Helst er strukturene belagte med T-cellereseptor-multimerer istedenfor individuelle T-cellereseptormolekyler.

I tilfellet med liposomer kan T-cellereseptormolekylene eller multimerer derav bli koplet til eller på annen måte bli assosiert med membranen. Teknikker for dette er velkjent for fagfolk på området.

Et merke eller en annen enhet, slik som et toksin eller en terapeutisk enhet, kan bli inkludert i et multivalent TCR-kompleks ifølge foreliggende oppfinnelse. For eksempel kan merket eller enheten bli inkludert i en multimer med blandede molekyler. Ett eksempel på et slikt multimert molekyl er en tetramer som inneholder tre TCR-molekyler og ett peroksidasemolekyl. Dette kan bli oppnådd ved å blande TCRen og enzymet i et molart forhold på 3:1 for å danne tetramere komplekser, og isolere det ønskede komplekset fra komplekser som ikke inneholder det forholdet av molekyler. Disse blandede molekylene kan inneholde enhver kombinasjon av molekyler, gitt at sterisk hindring ikke kompromitterer eller ikke vesentlig kompromitterer den ønskede funksjonen til molekylene. Posisjoneringen av bindingssetene på streptavidinmolekylet er hensiktsmessig for blandede tetramerer siden sterisk hindring ikke er sannsynlig.

Alternative måter å biotinylere TCRen på kan være mulige. For eksempel kan kjemisk biotinylering bli benyttet. Alternative biotinyleringsmerker kan bli benyttet, selv om visse aminosyrer i biotinmerkesekvensen er essensielle (Schatz, (1993), Biotechnology NY 11(10): 1138-43). Blandingen som blir benyttet til biotinylering kan også bli variert. Enzymene krever Mg-ATP og lav ionestyrke, selv om begge disse betingelsene kan bli variert, for eksempel kan det være mulig å benytte en høyere ionestyrke og en lengre reaksjonstid. Det kan være mulig å benytte et annet molekyl enn avidin eller streptavidin for å danne multimerer av TCRen. Ethvert molekyl som binder biotin på en multivalent måte vil være hensiktsmessig. Alternativt kan en helt annet forbindelse bli benyttet (slik som polyhistidinmerke på chelatert nikkellion (Quiagen Product Guide 1999, Kapittel 3 "Protein Expression, Purification, Detection and Assay" s. 35-37). Helst er merket lokalisert i nærheten av den C-terminale enden av proteinet for å redusere omfanget av sterisk hindring ved interaksjon med peptid-MHC-komplekser til et minimum.

Én av eller begge TCR-kjedene kan bli merket med et merke som kan bli påvist, for eksempel et merke som er hensiktsmessig til diagnostiske formål. Oppfinnelsen tilveiebringer dermed en fremgangsmåte for å påvise MHC-peptidkomplekser, der fremgangsmåten omfatter å bringe MHC-peptidkompleksene i kontakt med et TCR-kompleks eller et multimert TCR-kompleks ifølge oppfinnelsen som er spesifikt for MHC-peptidkomplekset, og påvise binding mellom TCR-komplekset eller det multimere TCR-komplekset og MHC-peptidkomplekset. I tetramer TCR, som er dannet ved å benytte biotinylerede heterodimerer, kan fluorescerende streptavidin (kommersielt tilgjengelig) bli benyttet for å tilveiebringe et merke som det er mulig å påvise. En fluorescensmerket tetramer er hensiktsmessig til bruk i FACS-analyse, for eksempel for å påvise antigenpresenterende celler som bærer peptidet som TCRen er spesifikk mot.

En annen måte å påvise de løselige TCRe ifølge foreliggende oppfinnelse består i å benytte TCR-spesifikke antistoffer, spesielt monoklonale antistoffer. Det finnes mange kommersielt tilgjengelige anti-TCR-antistoffer, slik som $\alpha F1$ og $\beta F1$, som gjenkjenner de konstante regionene på henholdsvis α - og β -kjeden.

TCRen (eller et multivalent kompleks derav) ifølge foreliggende oppfinnelse kan alternativt eller i tillegg bli assosiert med (for eksempel kovalent eller på annen måte forbundet med) et terapeutisk middel som for eksempel kan være en toksisk enhet som kan benyttes for å drepe celler, eller et immunstimulerende middel slik som et interleukin eller et cytokin. Et multivalent TCR-kompleks ifølge foreliggende oppfinnelse kan ha økt bindingskapasitet for et pMHC sammenlignet med en ikke-multimer T-cellereseptor-heterodimer. De multivalente TCR-kompleksene ifølge oppfinnelsen er dermed spesielt nyttige til å lete opp eller målsøke celler som presenterer spesielle antigener *in vitro* eller *in vivo*, og de er også nyttige som mellomprodukter i fremstillingen av ytterligere multivalente TCR-komplekser som har slike anvendelser. TCR-komplekset eller det multivalente TCR-komplekset kan derfor bli tilveiebrakt i en farmasøytisk akseptabel formulering.

Den løselige TCRen eller det multivalente TCR-komplekset kan bli benyttet til å levere terapeutiske midler til en lokalisering av celler som presenterer et spesielt antigen. Det vil være nyttig i mange situasjoner og spesielt mot tumorer. Et terapeutisk middel kan bli levert slik at effekten av det vil være lokal men ikke bare på cellen det bindes til. Én spesiell strategi forestiller seg dermed antitumormolekyler som er koplet til T-cellereseptorer eller multivalente TCR-komplekser som er spesifikke for tumorantigener.

Mange terapeutiske midler kan bli benyttet i denne anvendelsen, for eksempel radioaktive forbindelser, enzymer (for eksempel perforin) eller kjemoterapeutiske midler (for eksempel cisplatin). For å trygge at toksiske effekter kun kommer til uttrykk på det ønskede stedet kan toksinet bli plassert inne i et liposom som er koplet til streptavidin slik at forbindelsen blir frigjort langsomt. Dette vil forhindre ødeleggende effekter under

transporten gjennom kroppen og sikre at toksinet har maksimal effekt etter at TCRen binder til de relevante antigenpresenterende cellene.

Andre passende terapeutiske midler inkluderer:

- småmolekylcytotoksiske midler, d.v.s. forbindelser med evnen til å drepe pattedyrceller som har en molekylvekt på mindre enn 700 dalton. Slike forbindelser kan også inneholde toksiske metaller som er i stand til å inneha cytotoksiske effekter. Videre er det slik at disse småmolekylcytotoksiske midlene også inkluderer prolegemidler, d.v.s. forbindelser som brytes ned eller blir omdannet ved fysiologiske betingelser for å frigjøre cytotoksiske midler. Eksempler på slike midler inkluderer cisplatin, maytansinderivater, rachelmycin, docetaxel, etoposid, gemcitabin, ifosfamid, irinotecan, melphalan, mitoxantron, sorfimernatriumphotofrin-II, temozolmid, topotecan, trimetreat, glucuronat, auristatin E, vincristin og doxorubicin.
- peptidcytotoksiner, d.v.s. proteiner eller fragmenter derav med evnen til å drepe pattedyrceller. Eksempler inkluderer ricin, difteritoksin, pseudomonabakterieeksotoksin A, DNase og RNase,
- radionuklider, d.v.s. ustabile isotoper av stoffer som brytes ned mens de frigjør én eller flere α - eller β -partikler eller γ -stråling. Eksempler inkluderer jod-131, rhenium-186, indium-111, yttrium-90, vismut-210 og -213, actinium-225 og astatin-213,
- prolegemidler slik som antistoffrettede enzymatiske prolegemidler,
- immunstimulerende midler, d.v.s. enheter som stimulerer immunrespons. Eksempler inkluderer cytokiner slik som IL-2, kjemokiner slik som IL-8, platefaktor-4, melanomvekststimulerende protein, o.s.v., antistoffer eller fragmenter derav, komplement-aktivatorer, xenogene proteindomener, allogene proteindomener, virale/bakterielle proteindomener og virale/bakterielle peptider.

Løselige TCRer eller multivalente TCR-komplekser ifølge oppfinnelsen kan bli koplet til et enzym som er i stand til å omdanne et prolegemiddel til et legemiddel. Dette gjør at prolegemidlet kun blir omdannet til legemiddelet på det stedet der det er nødvendig (d.v.s. det stedet som er bestemt av sTCRen).

Eksempler på passende MHC-peptidmål for TCRen ifølge oppfinnelsen inkluderer, men er ikke begrenset til, virale epitoper slik som HTLV-1-epitoper (for eksempel Tax-peptidet som er begrenset av HLA-A2, HTLV-1 er assosiert med leukemi), HIV-epitoper, EBV-epitoper, CMV-epitoper, melanomepitoper (for eksempel MAGE-1 HLA-A1 begrenset epitop) og andre kreftspesifikke epitoper (for eksempel det nyrecellekarsinomassosiert antigenet G250 som er begrenset av HLA-A2), og epitoper som er assosiert med autoimmunforstyrrelser slik som revmatoid artritt. Andre sykdoms-assosierte pMHC-mål som er passende til anvendelse ifølge foreliggende oppfinnelse er beskrevet i the HLA Factbook (Barclay (Red.) Academic Press) og mange andre blir identifisert.

En mengde sykdomsbehandlinger kan potensielt bli forbedret ved å lokalisere legemiddelet ved hjelp av spesifisiteten til løselige TCRer.

Virale sykdommer, for hvilke legemidler finnes, for eksempel HIV, SIV, EBV, CMV, vil dra nytte av at legemidlet blir frigjort eller aktivert i nærheten av de infiserte cellene. Når det gjelder kreft vil en lokalisering i nærheten av tumorer eller metastaser forbedre effekten av toksiner eller immunostimulerende midler. Ved autoimmune sykdommer kan immundempende legemidler bli frigjort langsomt og dermed ha en mer lokal effekt over lengre tid mens den totale immunkapasiteten til individet blir påvirket så lite som mulig. Ved motvirkning av frastøtning av transplantater kan effekten av immundempende legemidler bli optimalisert på samme måte. Ved vaksinelevering kan vaksineantigenet bli lokalisert i nærheten av antigenpresenterende celler og dermed forbedre effektiviteten til antigenet. Fremgangsmåten kan også bli benyttet til synliggjøring.

De løselige TCRene ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli benyttet for å modulere T-celleaktivering ved binding til spesifikke pMHC og dermed hemme T-celleaktivering. Autoimmune sykdommer som involverer T-cellemediert inflammasjon og/eller vevsskade vil være mottakelig for denne tilnærmingen, for eksempel diabetes type I. Kjennskap til den spesifikke peptidepitopen som presenteres av det relevante pMHC er påkrevd til denne anvendelsen.

Medikamenter ifølge oppfinnelsen vil vanligvis bli levert som en del av et sterilt, farmasøytisk preparat som normalt vil inkludere en farmasøytisk akseptabel bærer. Dette farmasøytiske preparatet kan foreligge i en passende form (avhengig av den ønskede fremgangsmåten for administrering til en pasient). Det kan bli tilveiebrakt i enhetsdoseringsform, vil generelt være tilveiebrakt i en forseglet beholder og kan bli tilveiebrakt som en del av et sett. Et slikt sett vil normalt (selv om det ikke er nødvendig) inkludere instruksjoner for anvendelse. Det kan inneholde et flertall av nevnte enhetsdoseringsformer.

Det farmasøytiske preparatet kan bli tilpasset til administrering på en bestemt måte, for eksempel oralt (inkludert buccalt eller sublingualt), rektalt, nasalt, topisk (inkludert buccalt, sublingualt eller transdermalt), vaginalt eller parenteralt (inkludert subkutan, intramuskulært, intravenøst eller intradermalt). Slike preparater kan bli fremstilt med enhver fremgangsmåte som er kjent i farmasien, for eksempel ved å tilsette de aktive ingrediensene til bæreren(e) ved sterile betingelser.

Farmasøytiske preparater som er tilpasset til oral administrering kan bli presentert som avgrensede enheter slik som kapsler eller tabletter, som pulvere eller granuler, som løsninger, siruper eller oppløsninger (i vandige eller ikke-vandige væsker, eller som spiselige skumtyper eller vispinger, eller som emulsjoner). Passende eksipienser for tabletter eller harde gelatinkapsler inkluderer laktose, maisstivelse eller derivater derav, stearinsyre eller salter derav. Passende eksipienser til bruk sammen med myke gelatin-

kapsler inkluderer for eksempel planteoljer, voks, fettyper, halvfaste eller flytende polyoler o.s.v.

Til fremstilling av løsninger og siruper inkluderer eksipienser som kan bli benyttet for eksempel vann, polyoler og ulike sukkertyper. Til fremstillingen av suspensjoner kan oljer (for eksempel planteoljer) bli benyttet for å tilveiebringe olje-i-vann- eller vann-i-olje-suspensjoner. Farmasøytiske preparater som er tilpasset til transdermal administrering kan bli presentert i form av plastre som det er ment skal forbli i nær kontakt med huden til mottakeren over en lengre tidsperiode. Den aktive ingrediensen kan for eksempel bli levert fra plastret ved hjelp av iontoforese slik det generelt er beskrevet i *Pharmaceutical Research*, 3(6):318 (1986). Farmasøytiske preparater som er tilpasset til topisk administrering kan bli utformet som salver, kremer, suspensjoner, pulver, løsninger, pastaer, geler, spray, aerosoler eller oljer. Mot infeksjoner i øyet eller andre eksterne vev, for eksempel munn og hud, blir preparatene helst påført som en topisk salve eller krem. Når den er utformet i en salve kan den aktive ingrediensen bli benyttet med enten en parafinbasert eller vannblandbar salvebasis. Alternativt kan den aktive ingrediensen bli utformet i en krem med en olje-i-vann krembase eller en vann-i-olje base. Farmasøytiske preparater som er tilpasset til topisk administrering på øyet inkluderer øyedråper der den aktive ingrediensen er løst eller suspendert i en passende bærer, spesielt i et vandig løsningsmiddel. Farmasøytiske preparater som er tilpasset til topisk administrering i munnen inkluderer sugetabletter og munnskyllemidler.

Farmasøytiske preparater som er tilpasset til rektal administrering kan bli presentert i form av stikkpiller eller klystér. Farmasøytiske preparater som er tilpasset til nasal administrering der bæreren er et fast stoff inkluderer et grovt pulver som for eksempel har en partikkelstørrelse i området 20 til 500 mikrometer blir administrert på samme måte som når man tar snus, d.v.s. ved rask inhalering gjennom nesen fra en beholder med pulveret som holdes nært opp til nesen. Passende preparater der bæreren er en væske til administrering som en nesespray eller som nesedråper inkluderer vandige løsninger eller oljeløsninger av den aktive ingrediensen. Farmasøytiske preparater som er tilpasset til administrering ved inhalering inkluderer fine støvpartikler eller dusjer som kan bli frembrakt ved hjelp av ulike typer av doseutmålte aerosoler under trykk, forstøvere eller insufflatorer. Farmasøytiske preparater som er tilpasset til vaginal administrering kan bli presentert som pessarer, tamponger, kremer, geler, pastaer, skum eller sprayer. Farmasøytiske preparater som er tilpasset til parenteral administrering inkluderer vandige eller ikke-vandige sterile injeksjonsløsninger som kan inneholde antioksidanter, buffere, bakteriostater og løst stoff som gjør utformingen vesentlig isoton i forhold til blodet til mottakeren, og vandige og ikke-vandige sterile suspensjoner som kan inkludere suspenderende midler og fortykningsmidler. Eksipienser som kan bli benyttet i injiserbare løsninger inkluderer for eksempel vann, alkoholer, polyoler, glyserin og planteoljer. Preparatene kan bli presentert i enhetsdoserings- eller multidoserings-

beholdere, for eksempel forseglede ampuller og rør, og kan bli lagret i en frysetørket (lyofilisert) tilstand der kun tilsetning av den sterile bærervæsken er nødvendig, for eksempel vann til injeksjoner, rett i forkant av bruk. Ekstemporerte injeksjonsløsninger og suspensjoner kan bli fremstilt fra sterile pulvere, granuler og tabletter.

5 Det farmasøytiske preparatet kan inneholde preserveringsmidler, løsnings- fremmende midler, stabiliserende midler, fuktningmidler, emulgeringsmidler, søtningsmidler, fargestoffer, luktstoffer, salter (stoffer ifølge foreliggende oppfinnelse kan i seg selv bli tilveiebrakt i form av et farmasøytisk akseptabelt salt), buffere, overtrekksstoffer eller antioksidanter. De kan også inneholde terapeutisk aktive midler i tillegg til stoffene
10 ifølge foreliggende oppfinnelse.

Doseringer av stoffene ifølge foreliggende oppfinnelse kan varier innenfor vide grenser avhengig av sykdommen eller forstyrrelsen som skal bli behandlet, alderen eller tilstanden til individet som skal bli behandlet o.s.v., og en lege vil i siste instans bestemme passende doseringer som skal benyttes. Doseringen kan bli gjentatt så ofte som det er
15 hensiktsmessig. Hvis bivirkninger viser seg kan mengden og/eller frekvensen av doseringen bli redusert i overensstemmelse med normal klinisk praksis.

Genkloningsteknikker kan bli benyttet for å tilveiebringe en sTCR ifølge oppfinnelsen, helst i vesentlig ren form. Disse teknikkene er for eksempel beskrevet i J. Sambrook et al., Molecular Cloning 2. utgave, Cold Spring Harbor Laboratory Press
20 (1989). I et videre aspekt tilveiebringer dermed foreliggende oppfinnelse et nukleinsyremolekyl som omfatter en sekvens som koder for en kjede fra den løselige TCRen ifølge foreliggende oppfinnelse, eller en sekvens som er komplementær med denne. Slike nukleinsyresekvenser kan bli fremskaffet ved å isolere nukleinsyrer som koder for TCR fra T-cellekloner, og innføre passende mutasjoner (ved innskudd, delesjon eller
25 substitusjon).

Nukleinsyremolekylet kan foreligge i isolert eller i rekombinant form. Det kan bli inkorporert i en vektor og vektoren kan bli satt inn i en vertscelle. Slike vektorer og passende verter danner enda flere aspekter av foreliggende oppfinnelse.

Oppfinnelsen tilveiebringer også en fremgangsmåte for å fremskaffe en TCR-
30 kjede, der fremgangsmåten omfatter å inkubere en slik vertscelle ved betingelser som medfører uttrykking av TCR-kjeden for deretter å rense polypeptidet.

De løselige TCRene ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli fremskaffet ved uttrykking i en bakterie, slik som *E.coli*, i form av inklusjonslegemer, og ved påfølgende refolding *in vitro*.

35 Refolding av TCR-kjedene kan foregå *in vitro* ved passende betingelser for ny folding. I en spesiell utførelsesform blir en TCR med korrekt konformasjon oppnådd ved refolding av løseliggjorte TCR-kjeder i en refoldingsbuffer som omfatter et løseliggjørende middel, for eksempel urea. Urea kan fordelaktig være til stede med en konsentrasjon på minst 0,1 M, eller i det minste 1 M, eller i det minste 2,5 M, eller

omtrent 5 M. Et alternativt løseliggjørende middel som kan bli benyttet er guanidin, benyttet med en konsentrasjon på mellom 0,1 M og 8 M, helst minst 1 M, eller i det minste 2,5 M. Før refolding blir et reduserende middel helst benyttet for å sikre fullstendig reduksjon av cysteinresidier. Andre denaturerende midler slik som DTT og

5 guanidin kan bli benyttet når det er nødvendig. Ulike denaturerende midler og reduserende midler kan bli benyttet før refoldingstrinnet (for eksempel urea, β -merkaptotanol). Alternative redokspar kan bli benyttet under refolding, slik som et cystamin/cysteamin redokspar, DTT eller β -merkaptotanol/atmosfærisk oksygen, og cystein i reduserte og oksiderte former.

10 Foldingseffektivitet kan også bli økt ved tilsetningen av visse andre protein-komponenter til refoldingsblandingen, for eksempel chaperonproteiner. Forbedret refolding har blitt oppnådd ved å la proteinet passere gjennom kolonner med immobiliserte mini-chaperoner (Altamirano, et al., (1999), *Nature Biotechnology* 17: 187-191, Altamirano, et al., (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94(8): 3576-8).

15 Alternativt kan løselig TCR ifølge foreliggende oppfinnelse bli fremskaffet ved uttrykking i et eukaryot celledsystem, slik som i en insektcelle.

Rensing av TCRen kan bli oppnådd på mange ulike måter. Alternative ionebytter-fremgangsmåter kan bli benyttet, eller andre fremgangsmåter for proteinrensing kan bli benyttet, slik som gelfiltreringskromatografi eller affinitetskromatografi.

20 Løselige TCRer og multivalente TCR-komplekser ifølge foreliggende oppfinnelse kan også bli benyttet ved screening etter midler, slik som små kjemiske forbindelser, som har evnen til å hemme bindingen av TCRen til dens pMHC-kompleks. En fremgangsmåte for screening etter et middel som hemmer bindingen av en T-cellereseptor til et peptid-MHC-kompleks som omfatter å overvåke bindingen av en løselig T-cellereseptor ifølge

25 oppfinnelsen til et peptid-MHC-kompleks i nærvær av et middel, og velge ut midler som hemmer slik binding, er også mulig.

Passende teknikker for en slik screeningsfremgangsmåte inkluderer den overflate-plasmon-resonansbaserte fremgangsmåten beskrevet i WO 01/22084. Andre velkjente teknikker som kan danne basisen for denne screeningsfremgangsmåten er "Scintillation

30 Proximity Analysis" (SPA) og "Amplified Luminescent Proximity Assay".

Midler som blir valgt ved hjelp av screeningsfremgangsmåter ifølge oppfinnelsen kan bli benyttet som legemidler, eller som basisen i et legemiddelutviklingsprogram, der de blir modifiserte eller på annen måte forbedret for å få karakteristika som gjør dem mer passende til administrering som et medikament. Slike medikamenter kan bli benyttet til

35 behandlingen av tilstander som inkluderer en uønsket T-cellerespons. Slike tilstander inkluderer kreft (for eksempel nyrekreft, ovariekreft, tarmkreft, hode- og nakkekreft, testikkelkreft, lungekreft, magekreft, livmorhalskreft, blærekreft, prostatakreft eller melanom), autoimmune sykdommer, transplantatfrastøtning og sykdom som oppstår hos verten forårsaket av et transplantat.

Foretrukne egenskaper ved hvert aspekt ifølge oppfinnelsen er som for hver av de andre aspektene *mutatis mutandis*.

Eksempler

5 Oppfinnelsen blir ytterligere beskrevet i de følgende eksemplene.

Det blir i det påfølgende referert til de vedlagte tegningene der:

Figur 1 er et skjematisk diagram av en løselig TCR med en introdusert interkjededisulfidbinding ifølge oppfinnelsen,

10 **Figur 2a og 2b** viser henholdsvis nukleinsyresekvensen til α - og β -kjedene fra en løselig A6-TCR som er mutert for å introdusere et cysteinkodon. Skyggeleggingen indikerer det introduserte cysteinkodonet,

Figur 3a viser den ekstracellulære aminosyresekvensen til A6-TCR- α -kjeden, inkludert T₄₈→C mutasjonen (understreket) benyttet for å fremstille den nye interkjededisulfidbindingen, og **Figur 3b** viser den ekstracellulære aminosyresekvensen
15 til A6-TCR- β -kjeden, inkludert S₅₇→C mutasjonen (understreket) benyttet for å fremstille den nye interkjededisulfidbindingen,

Figur 4 er en kurve som er fremskaffet etter anionbytterkromatografi av løselig A6-TCR, som viser proteineluering fra en POROS-50HQ-kolonne ved å benytte en 0-500mM NaCl gradient, slik som indikert med den stiplede linjen,

20 **Figur 5** – A. Reduserende SDS-PAGE (Coomassiefarget) av fraksjoner fra kolonnen som ble kjørt som vist i figur 4. B. Ikke-reduserende SDS-PAGE (Coomassiefarget) av fraksjoner fra kolonnen som ble kjørt som vist i figur 4. Topp 1 inneholder åpenbart hovedsakelig ikke-disulfidbundet β -kjede, topp 2 inneholder TCR-heterodimer som er interkjededisulfidbundet, og skulderen skyldes *E.coli*-forurensninger
25 som er blandet med den interkjededisulfidbundne sTCRen, som er dårlig synlig på denne reproduserte tegningen,

Figur 6 er en kurve fremskaffet ved størrelsesekskluderende kromatografi av sammenslåtte fraksjoner fra topp 1 i figur 5. Proteinet elueres som en enkelt stor topp tilsvarende til heterodimeren,

30 **Figur 7** er en BIAcore-responskurve av den spesifikke bindingen av disulfidbundet-A6-løselig-TCR til HLA-A2-tax-kompleks. Den innskutte figuren viser bindingsrespons sammenlignet med kontroll for en enkelt injeksjon av disulfidbundet-A6-løselig-TCR,

Figur 8a viser A6-TCR- α -kjedesekvensen inkludert ny cysteinresidie mutert for å
35 inkorporere et BamH1-restriksjonssete. Skyggelegging indikerer mutasjonene som er introdusert for å danne BamH1-restriksjonssetet. **Figurene 8b og 8c** viser DNA-sekvensen til α - og β -kjeden til JM22-TCR, mutert for å inkludere ytterligere cysteinresidier for å kunne danne en ikke-nativ disulfidbinding,

Figur 9a og 9b viser henholdsvis de ekstracellulære aminosyresekvensene til α - og β -kjedene til JM22-TCR, som er fremstilt fra DNA-sekvensene ifølge figurene 8a og 8b,

Figur 10 er en kurve som er satt opp på bakgrunn av anionbytterkromatografi av løselig disulfidbundet JM22-TCR og som viser proteineluering fra en POROS-50HQ-kolonne ved å benytte en 0-500mM gradient av NaCl som illustrert med den stiplede linjen,

Figur 11a viser en reduserende SDS-PAGE (Coomassiefarget) av fraksjoner fra kolonnen som ble kjørt i figur 10 som vist, og **Figur 11b** viser en ikke-reduserende SDS-PAGE (Coomassiefarget) av fraksjoner fra kolonnen som ble kjørt i figur 10 som vist. Topp 1 inneholder åpenbart TCR-heterodimer som er interkjededisulfidbundet.

Figur 12 er en kurve som er utarbeidet på bakgrunn av størrelsessekskluderende kromatografi foretatt på sammenslåtte fraksjoner fra topp 1 i figur 10. Proteinet elueres som en enkelt stor topp som tilsvarer heterodimeren. Utbytte er 80 %,

Figur 13 – A. BIAcore-responskurve av den spesifikke bindingen av disulfidbundet JM22-løselig-TCR til HLA-Flu-kompleks. B. Bindingsrespons sammenlignet med kontroll for en enkelt injeksjon av disulfidbundet JM22-løselig-TCR,

Figurene 14a og 14b viser DNA-sekvensen til α - og β -kjedene i NY-ESO som er mutert for å inkludere ytterligere cysteinresidier for å danne ikke-nativ disulfidbinding,

Figurene 15a og 15b viser henholdsvis de ekstracellulære α - og β -kjedeaminosyresekvensene til NY-ESO-TCR som er fremstilt fra DNA-sekvensene ifølge figurene 14a og 14b,

Figur 16 er en kurve som er fremkommet på bakgrunn av anionbytterkromatografi av løselig NY-ESO-disulfidbundet-TCR og som viser proteineluering fra en POROS-50HQ-kolonne ved å benytte en 0-500mM gradient med NaCl som indikert med den stiplede linjen,

Figur 17 – A. Reduserende SDS-PAGE (Coomassiefarget) av fraksjoner fra kolonnen kjørt i figur 16 som vist. B. Ikke-reduserende SDS-PAGE (Coomassiefarget) av fraksjoner fra kolonnen kjørt i figur 16 som vist. Topp 1 og 2 inneholder åpenbart TCR-heterodimer som er interkjededisulfidbundet,

Figur 18 viser størrelsesseksklusjonskromatografi av sammenslåtte fraksjoner fra topp 1 (A) og topp 2 (B) i figur 17. Proteinet elueres som en enkelt stor topp som tilsvarer heterodimeren,

Figur 19 viser en BIAcore-responskurve av den spesifikke bindingen av disulfidbundet NY-ESO-løselig-TCR til HLA-NYESO-kompleks. A. topp 1, B. topp 2,

Figurene 20a og 20b viser henholdsvis DNA-sekvensene til α - og β -kjedene fra en løselig NY-ESO-TCR som er mutert for å introdusere et nytt cysteinkodon (indikert ved skyggelegging). Sekvensen inkluderer cysteinet involvert i den native interkjededisulfidbindingen (indikert med uthevet kodon),

Figurene 21a og 21b viser henholdsvis de ekstracellulære aminosyresekvensene til α - og β -kjedene fra NY-ESO-TCR som er fremstilt fra DNA-sekvensene ifølge Figurene 20a og 20b,

Figur 22 viser en kurve som er utarbeidet på bakgrunn av anionbytterkromatografi av løselig NY-ESO-TCR $\alpha^{cys}\beta^{cys}$ og som viser proteineluering fra en POROS-50HQ-kolonne ved å benytte en 0-500mM gradient av NaCl som indikert med den stiplede linjen,

Figur 23 viser en kurve som er utarbeidet på bakgrunn av anionbytterkromatografi av løselig NY-ESO-TCR α^{cys} og som viser proteineluering fra en POROS-50HQ-kolonne ved å benytte en 0-500mM gradient av NaCl som indikert med den stiplede linjen,

Figur 24 viser en kurve som er utarbeidet på bakgrunn av anionbytterkromatografi av løselig NY-ESO-TCR β^{cys} og som viser proteineluering fra en POROS-50HQ-kolonne ved å benytte en 0-500mM gradient av NaCl som indikert med den stiplede linjen,

Figur 25 viser en reduserende SDS-PAGE (Coomassiefarget) av NY-ESO-TCR $\alpha^{cys}\beta^{cys}$ -, -TCR α^{cys} - og -TCR β^{cys} -fraksjoner fra anionbytterkolonne kjørt i henholdsvis figurene 22-24. Sporene 1 og 7 er molekylvektmarkører, spor 2 er NYESOd α TCR1g4- α -cys- β -topp (EB/084/033), spor 3 er NYESOd α TCR1g4- α -cys- β -liten topp (EB/084/033), spor 4 er NYESOd α TCR1g4- α - β -cys (EB/084/034), spor 5 er NYESOd α TCR1g4- α -cys- β -cys-liten topp (EB/084/035) og spor 6 er NYESOd α TCR1g4- α -cys- β -cys-topp (EB/084/035),

Figur 26 viser en ikke-reduserende SDS-PAGE (Coomassiefarget) av NY-ESO-TCR $\alpha^{cys}\beta^{cys}$ -, -TCR α^{cys} - og -TCR β^{cys} -fraksjoner fra anionbytterkolonne kjørt i henholdsvis figurene 22-24. Sporene 1 og 7 er molekylvektmarkører, spor 2 er NYESOd α TCR1g4- α -cys- β -topp (EB/084/033), spor 3 er NYESOd α TCR1g4- α -cys- β -liten topp (EB/084/033), spor 4 er NYESOd α TCR1g4- α - β -cys (EB/084/034), spor 5 er NYESOd α TCR1g4- α -cys- β -cys-liten topp (EB/084/035) og spor 6 er NYESOd α TCR1g4- α -cys- β -cys-topp (EB/084/035),

Figur 27 er en kurve som er utarbeidet på bakgrunn av størrelseseksklusjonskromatografi av løselig NY-ESO-TCR $\alpha^{cys}\beta^{cys}$ og som viser proteineluering fra sammenslåtte fraksjoner fra figur 22. Proteinet elueres som en enkelt stor topp som tilsvarer heterodimeren,

Figur 28 er en kurve som er utarbeidet på bakgrunn av størrelseseksklusjonskromatografi av løselig NY-ESO-TCR α^{cys} og som viser eluering av sammenslåtte fraksjoner fra figur 22. Proteinet elueres som en enkelt stor topp som tilsvarer heterodimeren,

Figur 29 er en kurve som er utarbeidet på bakgrunn av størrelseseksklusjonskromatografi av løselig NY-ESO-TCR β^{cys} og som viser proteineluering fra sammenslåtte

fraksjoner fra figur 22. Proteinet elueres som en enkelt stor topp som tilsvarer heterodimeren,

Figur 30 er en BIAcore-responskurve av den spesifikke bindingen av NY-ESO-TCR $\alpha^{cys}\beta^{cys}$ til HLA-NY-ESO-kompleks,

5 **Figur 31** er en BIAcore-responskurve av den spesifikke bindingen av NY-ESO-TCR α^{cys} til HLA-NY-ESO-kompleks,

Figur 32 er en BIAcore-responskurve av den spesifikke bindingen av NY-ESO-TCR β^{cys} til HLA-NY-ESO-kompleks,

10 **Figurene 33a og 33b** viser henholdsvis DNA-sekvensene til α - og β -kjedene fra en løselig AH-1,23-TCR som er mutert for å introdusere et nytt cysteinkodon (indikert ved skyggelegging). Sekvensene inkluderer cysteinet som er involvert i den native interkjededisulfidbindingen (indikert med uthevet kodon),

Figurene 34a og 34b viser henholdsvis de ekstracellulære aminosyresekvensene til α - og β -kjedene i AH-1,23-TCR som er fremstilt fra DNA-sekvensene ifølge figurene
15 33a og 33b,

Figur 35 er en kurve som er utarbeidet på bakgrunn av anionbytterkromatografi av løselig AH-1,23-TCR og som viser proteineluering fra en POROS-50HQ-kolonne ved å benytte en 0-500mM gradient av NaCl som indikert med den stiplede linjen,

20 **Figur 36** er en reduserende SDS-PAGE (10 % Bis-Tris-gel, Coomassiefarget) av AH-1,23-TCR-fraksjoner fra anionbytterkolonnen kjørt i figur 35. Undersøkte proteiner er anionbytterfraksjonene av TCR-1,23-S-S fra refolding 3. Spor 1 er molekylvektmarkører, spor 2 er B4, spor 3 er C2, spor 4 er C3, spor 5 er C4, spor 6 er C5, spor 7 er C6, spor 8 er C7, spor 9 er C8 og spor 10 er C9,

25 **Figur 37** er en ikke-reduserende SDS-PAGE (10 % Bis-Tris-gel, Coomassiefarget) av AH-1,23-TCR-fraksjoner fra anionbytterkolonne kjørt i figur 35. Undersøkte proteiner er anionbytterfraksjonene av TCR-1,23-S-S fra refolding 3. Spor 1 er molekylvektmarkører, spor 2 er B4, spor 3 er C2, spor 3 er C2, spor 4 er C3, spor 5 er C4, spor 6 er C5, spor 7 er C6, spor 8 er C7, spor 9 er C8 og spor 10 er C9,

30 **Figur 38** er en kurve som er utarbeidet på bakgrunn av størrelseseksklusjonskromatografi av løselig AH-1,23-TCR og som viser proteineluering fra sammenslåtte fraksjoner fra figur 35. Proteinet elueres som en enkelt stor topp som tilsvarer heterodimeren,

35 **Figurene 39a og 39b** viser henholdsvis DNA- og aminosyresekvensen til α -kjeden fra løselig A6-TCR, som er mutert for å introdusere et nytt cystein på residie 48 i ekson 1 på TRAC*01. De skyggelagte nukleotidene indikerer det nye introduserte cysteinkodonet og understreket aminosyre indikerer det introduserte cysteinet,

Figurene 40a og 40b viser henholdsvis DNA- og aminosyresekvensen til α -kjeden fra løselig A6-TCR, som er mutert for å introdusere et nytt cystein på residie 45 i

ekson 1 på TRAC*01. De skyggelagte nukleotidene indikerer det nye introduserte cysteinkodonet og understreket aminosyre indikerer det introduserte cysteinet,

Figurene 41a og 41b viser henholdsvis DNA- og aminosyresekvensen til α -kjeden fra løselig A6-TCR, som er mutert for å introdusere et nytt cystein på residie 61 i

ekson 1 på TRAC*01. De skyggelagte nukleotidene indikerer det nye introduserte cysteinkodonet og understreket aminosyre indikerer det introduserte cysteinet,

Figurene 42a og 42b viser henholdsvis DNA- og aminosyresekvensen til α -kjeden fra løselig A6-TCR, som er mutert for å introdusere et nytt cystein på residie 50 i ekson 1 på TRAC*01. De skyggelagte nukleotidene indikerer det nye introduserte

cysteinkodonet og understreket aminosyre indikerer det introduserte cysteinet,

Figurene 43a og 43b viser henholdsvis DNA- og aminosyresekvensen til α -kjeden fra løselig A6-TCR, som er mutert for å introdusere et nytt cystein på residie 10 i ekson 1 på TRAC*01. De skyggelagte nukleotidene indikerer det nye introduserte cysteinkodonet og understreket aminosyre indikerer det introduserte cysteinet,

Figurene 44a og 44b viser henholdsvis DNA- og aminosyresekvensen til α -kjeden fra løselig A6-TCR, som er mutert for å introdusere et nytt cystein på residie 15 i ekson 1 på TRAC*01. De skyggelagte nukleotidene indikerer det nye introduserte cysteinkodonet og understreket aminosyre indikerer det introduserte cysteinet,

Figurene 45a og 45b viser henholdsvis DNA- og aminosyresekvensen til α -kjeden fra løselig A6-TCR, som er mutert for å introdusere et nytt cystein på residie 12 i ekson 1 på TRAC*01. De skyggelagte nukleotidene indikerer det nye introduserte cysteinkodonet og understreket aminosyre indikerer det introduserte cysteinet,

Figurene 46a og 46b viser henholdsvis DNA- og aminosyresekvensen til α -kjeden fra løselig A6-TCR, som er mutert for å introdusere et nytt cystein på residie 22 i ekson 1 på TRAC*01. De skyggelagte nukleotidene indikerer det nye introduserte cysteinkodonet og skyggelagt aminosyre indikerer det introduserte cysteinet,

Figurene 47a og 47b viser henholdsvis DNA- og aminosyresekvensen til α -kjeden fra løselig A6-TCR, som er mutert for å introdusere et nytt cystein på residie 52 i ekson 1 på TRAC*01. De skyggelagte nukleotidene indikerer det nye introduserte cysteinkodonet og understreket aminosyre indikerer det introduserte cysteinet,

Figurene 48a og 48b viser henholdsvis DNA- og aminosyresekvensen til α -kjeden fra løselig A6-TCR, som er mutert for å introdusere et nytt cystein på residie 43 i ekson 1 på TRAC*01. De skyggelagte nukleotidene indikerer det nye introduserte cysteinkodonet og understreket aminosyre indikerer det introduserte cysteinet,

Figurene 49a og 49b viser henholdsvis DNA- og aminosyresekvensen til α -kjeden fra løselig A6-TCR, som er mutert for å introdusere et nytt cystein på residie 57 i ekson 1 på TRAC*01. De skyggelagte nukleotidene indikerer det nye introduserte cysteinkodonet og understreket aminosyre indikerer det introduserte cysteinet,

Figurene 50a og 50b viser henholdsvis DNA- og aminosyresekvensen til β -kjeden fra løselig A6-TCR, som er mutert for å introdusere et nytt cystein på residie 77 i ekson 1 på TRBC2*01. De skyggelagte nukleotidene indikerer det nye introduserte cysteinkodonet og understreket aminosyre indikerer det introduserte cysteinet,

5 **Figurene 51a og 51b** viser henholdsvis DNA- og aminosyresekvensen til β -kjeden fra løselig A6-TCR, som er mutert for å introdusere et nytt cystein på residie 17 i ekson 1 på TRBC2*01. De skyggelagte nukleotidene indikerer det nye introduserte cysteinkodonet og understreket aminosyre indikerer det introduserte cysteinet,

Figurene 52a og 52b viser henholdsvis DNA- og aminosyresekvensen til β -kjeden fra løselig A6-TCR, som er mutert for å introdusere et nytt cystein på residie 13 i ekson 1 på TRBC2*01. De skyggelagte nukleotidene indikerer det nye introduserte cysteinkodonet og understreket aminosyre indikerer det introduserte cysteinet,

15 **Figurene 53a og 53b** viser henholdsvis DNA- og aminosyresekvensen til β -kjeden fra løselig A6-TCR, som er mutert for å introdusere et nytt cystein på residie 59 i ekson 1 på TRBC2*01. De skyggelagte nukleotidene indikerer det nye introduserte cysteinkodonet og understreket aminosyre indikerer det introduserte cysteinet,

Figurene 54a og 54b viser henholdsvis DNA- og aminosyresekvensen til β -kjeden fra løselig A6-TCR, som er mutert for å introdusere et nytt cystein på residie 79 i ekson 1 på TRBC2*01. De skyggelagte nukleotidene indikerer det nye introduserte cysteinkodonet og understreket aminosyre indikerer det introduserte cysteinet,

20 **Figurene 55a og 55b** viser henholdsvis DNA- og aminosyresekvensen til β -kjeden fra løselig A6-TCR, som er mutert for å introdusere et nytt cystein på residie 14 i ekson 1 på TRBC2*01. De skyggelagte nukleotidene indikerer det nye introduserte cysteinkodonet og understreket aminosyre indikerer det introduserte cysteinet,

25 **Figurene 56a og 56b** viser henholdsvis DNA- og aminosyresekvensen til β -kjeden fra løselig A6-TCR, som er mutert for å introdusere et nytt cystein på residie 55 i ekson 1 på TRBC2*01. De skyggelagte nukleotidene indikerer det nye introduserte cysteinkodonet og understreket aminosyre indikerer det introduserte cysteinet,

Figurene 57a og 57b viser henholdsvis DNA- og aminosyresekvensen til β -kjeden fra løselig A6-TCR, som er mutert for å introdusere et nytt cystein på residie 63 i ekson 1 på TRBC2*01. De skyggelagte nukleotidene indikerer det nye introduserte cysteinkodonet og understreket aminosyre indikerer det introduserte cysteinet,

30 **Figurene 58a og 58b** viser henholdsvis DNA- og aminosyresekvensen til β -kjeden fra løselig A6-TCR, som er mutert for å introdusere et nytt cystein på residie 15 i ekson 1 på TRBC2*01. De skyggelagte nukleotidene indikerer det nye introduserte cysteinkodonet og understreket aminosyre indikerer det introduserte cysteinet,

Figurene 59-64 er kurver som er utarbeidet på bakgrunn av anionbytter-kromatografi av løselig A6-TCR som inneholder en ny interkjededisulfidbinding mellom henholdsvis: residiene 48 fra ekson 1 i TRAC*01 og 57 fra ekson 1 i TRBC2*01,

residiene 45 fra ekson 1 i TRAC*01 og 77 fra ekson 1 i TRBC2*01, residiene 10 fra ekson 1 i TRAC*01 og 17 fra ekson 1 i TRBC2*01, residiene 45 fra ekson 1 i TRAC*01 og 59 fra ekson 1 i TRBC2*01, residiene 52 fra ekson 1 i TRAC*01 og 55 fra ekson 1 i TRBC2*01, residiene 15 fra ekson 1 i TRAC*01 og 15 fra ekson 1 i TRBC2*01, og som
 5 viser proteineluering fra en POROS-50-kolonne ved å benytte en 0-500mM gradient av NaCl som indikert med den stiplede linjen,

Figurene 65a og 65b er henholdsvis reduserende og ikke-reduserende SDS-PAGE (Coomassiefarget) av løselig A6-TCR som inneholder en ny interkjededisulfidbinding mellom residiene 48 fra ekson 1 i TRAC*01 og 57 fra ekson 1 i TRBC2*01, og
 10 fraksjoner som ble kjørt ble samlet fra anionbytterkolonnen kjørt i figur 59,

Figur 66a og 66b er henholdsvis reduserende og ikke-reduserende SDS-PAGE (Coomassiefarget) av løselig A6-TCR som inneholder en ny interkjededisulfidbinding mellom residiene 45 fra ekson 1 i TRAC*01 og 77 fra ekson 1 i TRBC2*01, og fraksjoner som ble kjørt ble samlet fra anionbytterkolonnen kjørt i figur 60,

15 **Figurene 67a og 67b** er henholdsvis reduserende og ikke-reduserende SDS-PAGE (Coomassiefarget) av løselig A6-TCR som inneholder en ny interkjededisulfidbinding mellom residiene 10 fra ekson 1 i TRAC*01 og 17 fra ekson 1 i TRBC2*01, og fraksjoner som ble kjørt ble samlet fra anionbytterkolonnen kjørt i figur 61,

Figurene 68a og 68b er henholdsvis reduserende og ikke-reduserende SDS-PAGE (Coomassiefarget) av løselig A6-TCR som inneholder en ny interkjededisulfidbinding mellom residiene 45 fra ekson 1 i TRAC*01 og 59 fra ekson 1 i TRBC2*01, og
 20 fraksjoner som ble kjørt ble samlet fra anionbytterkolonnen kjørt i figur 62,

Figurene 69a og 69b er henholdsvis reduserende og ikke-reduserende SDS-PAGE (Coomassiefarget) av løselig A6-TCR som inneholder en ny interkjededisulfidbinding mellom residiene 52 fra ekson 1 i TRAC*01 og 55 fra ekson 1 i TRBC2*01, og
 25 fraksjoner som ble kjørt ble samlet fra anionbytterkolonnen kjørt i figur 63,

Figurene 70a og 70b er henholdsvis reduserende og ikke-reduserende SDS-PAGE (Coomassiefarget) av løselig A6-TCR som inneholder en ny interkjededisulfidbinding mellom residiene 15 fra ekson 1 i TRAC*01 og 15 fra ekson 1 i TRBC2*01, og
 30 fraksjoner som ble kjørt ble samlet fra anionbytterkolonnen kjørt i figur 64,

Figur 71 er en kurve som er utarbeidet på bakgrunn av størrelseseksklusjonskromatografi av løselig A6-TCR som inneholder en ny interkjededisulfidbinding mellom residiene 48 fra ekson 1 i TRAC*01 og 57 fra ekson 1 i TRBC2*01, og som viser proteineluering fra en Superdex-200-HL-gelfiltreringskolonne. Fraksjoner som ble kjørt
 35 ble samlet fra anionbytterkolonnen kjørt i figur 59,

Figur 72 er en kurve som er utarbeidet på bakgrunn av størrelseseksklusjonskromatografi av løselig A6-TCR som inneholder en ny interkjededisulfidbinding mellom residiene 45 fra ekson 1 i TRAC*01 og 77 fra ekson 1 i TRBC2*01, og som viser

proteineluering fra en Superdex-200-HL-gelfiltreringskolonne. Fraksjoner som ble kjørt ble samlet fra anionbytterkolonnen kjørt i figur 60,

Figur 73 er en kurve som er utarbeidet på bakgrunn av størrelseseksklusjons-kromatografi av løselig A6-TCR som inneholder en ny interkjededisulfidbinding mellom
5 residiene 10 fra ekson 1 i TRAC*01 og 17 fra ekson 1 i TRBC2*01, og som viser proteineluering fra en Superdex-200-HL-gelfiltreringskolonne. Fraksjoner som ble kjørt ble samlet fra anionbytterkolonnen kjørt i figur 61,

Figur 74 er en kurve som er utarbeidet på bakgrunn av størrelseseksklusjons-kromatografi av løselig A6-TCR som inneholder en ny interkjededisulfidbinding mellom
10 residiene 45 fra ekson 1 i TRAC*01 og 59 fra ekson 1 i TRBC2*01, og som viser proteineluering fra en Superdex-200-HL-gelfiltreringskolonne. Fraksjoner som ble kjørt ble samlet fra anionbytterkolonnen kjørt i figur 62,

Figur 75 er en kurve som er utarbeidet på bakgrunn av størrelseseksklusjons-kromatografi av løselig A6-TCR som inneholder en ny interkjededisulfidbinding mellom
15 residiene 52 fra ekson 1 i TRAC*01 og 55 fra ekson 1 i TRBC2*01, og som viser proteineluering fra en Superdex-200-HL-gelfiltreringskolonne. Fraksjoner som ble kjørt ble samlet fra anionbytterkolonnen kjørt i figur 63,

Figur 76 er en kurve som er utarbeidet på bakgrunn av størrelseseksklusjons-kromatografi av løselig A6-TCR som inneholder en ny interkjededisulfidbinding mellom
20 residiene 15 fra ekson 1 i TRAC*01 og 15 fra ekson 1 i TRBC2*01, og som viser proteineluering fra en Superdex-200-HL-gelfiltreringskolonne. Fraksjoner som ble kjørt ble samlet fra anionbytterkolonnen kjørt i figur 64,

Figurene 77-80 er BIAcore-responskurver som henholdsvis viser binding av løselig A6-TCR som inneholder en ny interkjededisulfidbinding mellom: residiene 48 fra
25 ekson 1 i TRAC*01 og 57 fra ekson 1 i TRBC2*01, residiene 45 fra ekson 1 i TRAC*01 og 77 fra ekson 1 i TRBC2*01, residiene 10 fra ekson 1 i TRAC*01 og 17 fra ekson 1 i TRBC2*01 og residiene 45 fra ekson 1 i TRAC*01 og 59 fra ekson 1 i TRBC2*01 til HLA-A2-tax-pMHC.

Figur 81 er en BIAcore-kurve som viser uspesifikk binding av løselig A6-TCR,
30 som inneholder en ny interkjededisulfidbinding mellom residiene 52 fra ekson 1 i TRAC*01 og 55 fra ekson 1 i TRBC2*01, til HLA-A2-tax og til HLA-A2-NY-ESO-pMHC,

Figur 82 er en BIAcore-responskurve som viser binding av løselig A6-TCR, som inneholder en ny interkjededisulfidbinding mellom residiene 15 fra ekson 1 i TRAC*01
35 og 15 fra ekson 1 i TRBC2*01, til HLA-A2-tax-pMHC,

Figur 83a er et elektrontetthetskart rundt modellen med 1BD2-sekvens (Kjede A Thr164, Kjede B Ser174). Kart er profilert ved 1,0, 2,0 og 3,0 σ . **Figur 83b** er et elektrontetthetskart etter forbedring med Cys i de to posisjonene A164 og B174. Kartet er profilert ved de samme σ -nivåene som for figur 83a,

Figur 84 sammenligner strukturene til 1BD2-TCR med en NY-ESO-TCR ifølge foreliggende oppfinnelse ved å overlappe nevnte strukturer i bånd- og trådrepresentasjoner,

Figurene 85a og 85b viser henholdsvis DNA- og aminosyresekvensene til β -kjeden i NY-ESO-TCR med et inkorporert biotینگjenkjenningssete. Biotینگjenkjenningssettet er uthevet,

Figurene 86a og 86b viser henholdsvis DNA- og aminosyresekvensene til β -kjeden i NY-ESO-TCR med et inkorporert hekso-histidinmerke. Hekso-histidinmerket er uthevet,

Figur 87 viser elueringen av løselig NY-ESO-TCR, som inneholder en ny disulfidbinding og en biotینگjenkjenningssekvens, fra POROS-50HQ-anionbytterkolonne ved å benytte en 0-500mM gradient av NaCl som indikert med den stiplede linjen,

Figur 88 viser elueringen av løselig NY-ESO-TCR, som inneholder en ny disulfidbinding og et hekso-histidinmerke, fra POROS-50HQ-anionbytterkolonne ved å benytte en 0-500mM gradient av NaCl som indikert med den stiplede linjen,

Figur 89 er en proteinelueringsprofil fra gelfiltreringskromatografi av oppsamlede fraksjoner fra den NY-ESO-biotinmerkede anionbytterkolonnen som ble kjørt og som er illustrert i figur 87,

Figur 90 er en proteinelueringsprofil fra gelfiltreringskromatografi av oppsamlede fraksjoner fra den NY-ESO-hekso-histidinmerkede anionbytterkolonnen som ble kjørt og som er illustrert i figur 88,

Figurene 91a-h viser FACS-histogrammer som illustrerer fargingsintensiteten fremkommet fra 25 000 hendelser for HLA-A2-positiv EBV-transformert B-cellelinje (PP LCL) inkubert med de følgende konsentrasjoner av henholdsvis NY-ESO-peptid og fluorescerende NY-ESO-TCR-tetramerer: NYESO 0 TCR 5 μ g, NYESO 10⁻⁴M TCR 5 μ g, NYESO 10⁻⁵M TCR 5 μ g, NYESO 10⁻⁶M TCR 5 μ g, NYESO 0 TCR 10 μ g, NYESO 10⁻⁴M TCR 10 μ g, NYESO 10⁻⁵M TCR 10 μ g, NYESO 10⁻⁶M TCR 10 μ g,

Figur 92 viser DNA-sekvensen til β -kjeden i A6-TCR med den konstante regionen fra TRBC1*01,

Figur 93 er en anionbytterkromatografikurve av løselig A6-TCR som inneholder den konstante regionen fra TRBC*01 og som viser proteineluering fra en POROS-50HQ-kolonne ved å benytte en 0-500mM gradient av NaCl som indikert med den stiplede linjen,

Figur 94 – A. Reduserende SDS-PAGE (Coomassiefarget) av fraksjoner fra kolonne kjørt i figur 93 som vist. B. Ikke-reduserende SDS-PAGE (Coomassiefarget) av fraksjoner fra kolonne kjørt i figur 93 som vist,

Figur 95 – Størrelseseksklusjonskromatografi av oppsamlede fraksjoner fra topp 2 i figur 93. Topp 1 inneholder TCR-heterodimer som er interkjededisulfidbundet,

Figur 96 – A. BIAcore-analyse av spesifikk binding av disulfidbundet A6-løselig-TCR til HLA-Flu-kompleks. B. Bindingsrespons sammenlignet med kontroll for en enkelt injeksjon av disulfidbundet A6-løseligTCR,

Figur 97 viser nukleinsyresekvensen til den muterte β -kjeden fra A6-TCR med
5 det "frie" cysteinet inkorporert,

Figur 98 – Anionbytterkromatografi av løselig A6-TCR med det "frie" cysteinet inkorporert som viser proteineluering fra en POROS-50HQ-kolonne ved å benytte en 0-500mM gradient av NaCl som indikert med den stiplede linjen,

Figur 99 – A. Reduserende SDS-PAGE (Coomassiefarget) av fraksjoner fra
10 kolonne kjørt i figur 98 som vist. B. Ikke-reduserende SDS-PAGE (Coomassiefarget) av fraksjoner fra kolonne kjørt i figur 98 som vist,

Figur 100 – Størrelseseksklusjonskromatografi av sammenslåtte fraksjoner fra topp 2 i Figur 98. Topp 1 inneholder heterodimer som er interkjededisulfidbundet,

Figur 101 – A. BIAcore-analyse av den spesifikke bindingen av disulfidbundet
15 A6-løselig-TCR med det "frie" cysteinet inkorporert, til HLA-Flu-kompleks. B. Bindingsrespons sammenlignet med kontroll for en enkelt injeksjon av disulfidbundet A6-løselig-TCR,

Figur 102 viser nukleinsyresekvensen til den muterte β -kjeden fra A6-TCR der en serinresidie er mutert inn istedenfor det "frie" cysteinet,

Figur 103 – Anionbytterkromatografi av løselig A6-TCR der en serinresidie er
20 mutert inn istedenfor det "frie" cysteinet og som viser proteineluering fra en POROS-50HQ-kolonne ved å benytte en 0-500mM gradient av NaCl som indikert med den stiplede linjen,

Figur 104 – A. Reduserende SDS-PAGE (Coomassiefarget) av fraksjoner fra
25 kolonne kjørt i figur 103 som vist. B. Ikke-reduserende SDS-PAGE (Coomassiefarget) av fraksjoner fra kolonne kjørt i figur 103 som vist. Topp 2 inneholder åpenbart TCR-heterodimer som er interkjededisulfidbundet,

Figur 105 – Størrelseseksklusjonskromatografi av oppsamlede fraksjoner fra topp 2 i figur 103. Topp 1 inneholder TCR-heterodimer som er interkjededisulfidbundet,

Figur 106 – A. BIAcore-analyse av den spesifikke bindingen av disulfidbundet
30 A6-løselig-TCR, som inneholder en serinresidie mutert inn istedenfor det "frie" cysteinet, til HLA-Flu-kompleks. B. Bindingsrespons sammenlignet med kontroll for en enkelt injeksjon av disulfidbundet A6-løselig-TCR,

Figur 107 viser nukleotidsekvensen til pYX112,

Figur 108 viser nukleotidsekvensen til pYX122,
35

Figur 109 viser DNA- og proteinsekvensen til pre-pro-paringsfaktor-alfa fusjonert med TCR- α -kjede,

Figur 110 viser DNA- og proteinsekvensen til pre-pro-paringsfaktor-alfa fusjonert med TCR- β -kjede,

Figur 111 viser et Western-blot av løselig TCR uttrykt i *S.cerevisiae*-SEY6210. Spor C inneholder 60ng rensset løselig NY-ESO-TCR som en kontroll. Sporene 1 og 2 inneholder proteiner som er høstet fra to ulike TCR-transformerte gjærkulturer,

Figur 112 viser nukleinsyresekvensen til innskuddet mellom KpnI og EcoRI på pEX172-plasmidet. Resten av plasmidet er pBlueScript-II KS-,

Figur 113 er et skjematisk diagram av TCR-kjedene til kloning inn i baculovirus,

Figur 114 viser nukleinsyresekvensen til disulfid-A6- α -TCR-konstruksjonen som et BamHI-innskudd som kan bli satt inn i ekspresjonsplasmidet pAcAB3,

Figur 115 viser disulfid-A6- β -TCR-konstruksjonen som et BamHI-innskudd som kan bli satt inn i ekspresjonsplasmidet pAcAB3, og

Figur 116 viser en Coomassiefarget gel og Western-blot mot bakterielt fremstilt disulfid-A6-TCR og insekt-disulfid-A6-TCR.

I alle de påfølgende eksemplene er de løselige TCR-kjedene som er fremstilt trunkerte straks C-terminalt for cysteinresidiene som danner den native interkjede-disulfidbindingen, hvis ikke annet er opplyst.

Eksempel 1 – Design av primere og mutagenese av A6-Tax-TCR- α - og - β -kjeder

For å kunne mutere A6-treonin 48 i ekson 1 i TRAC*01 til cystein ble de følgende primerne designet (mutasjon vist med små bokstaver):

5' – C ACA GAC AAA tgT GTG CTA GAC AT
5' – AT GTC TAG CAC Aca TTT GTC TGT G

For å kunne mutere A6-Tax-serin 57 i ekson 1 i både TRBC1*01 og TRBC2*01 til cystein ble de følgende primerne designet (mutasjon vist med små bokstaver):

5' – C AGT GGG GTC tGC ACA GAC CC
5' – GG GTC TGT GCa GAC CCC ACT G

PCR-mutagenese:

Ekspresjonsplasmider som inneholdt genene for α - og β -kjedene i A6-Tax-TCR ble mutert ved å benytte henholdsvis α -kjedeprimerene eller β -kjedeprimerene på følgende måte. 100ng plasmid ble blandet med 5 μ l 10mM dNTP, 25 μ l 10xPfu-buffer (Stratagene), 10 enheter Pfu-polymerase (Stratagene) og sluttvolumet ble justert til 240 μ l med H₂O. I 48 μ l av denne blandingen ble primere som var fortynnet for å gi en slutt-konsentrasjon på 0,2 μ M i 50 μ l sluttreaksjonsvolum tilsatt. Etter et første denaturerings-trinn på 30 sekunder ved 95 °C ble reaksjonsblandingen utsatt for 15 runder med

denaturering (95 °C, 30 sek.), sammensmelting (55 °C, 60 sek.) og elongering (73 °C, 8 min.) i en Hybaid-PCR-express-PCR-maskin. Produktet ble deretter fordøyd i 5 timer ved 37 °C med 10 enheter av DpnI-restriksjonsenzym (New England Biolabs). 10µl av den fordøyde reaksjonsblandingen ble transformert inn i kompetente XL1-Blue-bakterier og dyrket i 18 timer ved 37 °C. En enkelt koloni ble plukket og dyrket over natt i 5ml TYP+ampicillin (16g/l Bacto-Trypton, 16g/l Gjærekstrakt, 5g/l NaCl, 2,5g/l K₂HPO₄, 100mg/l Ampicillin). Plasmid-DNA ble rensset på en Qiagen-mini-prep-kolonne i overensstemmelse med forhandlerens instruksjoner og sekvensene ble bekreftet med automatisk sekvensering på sekvenseringsenheten til Department of Biochemistry, Oxford University. De respektive muterte nukleinsyre- og aminosyresekvensene er vist i figur 2a og 3a for α-kjeden og i figur 2b og 3b for β-kjeden.

Eksempel 2 – Uttrykking, refolding og rensing av løselig TCR

Ekspresjonsplasmidene inneholdende henholdsvis de muterte α- og β-kjedene ble transformert separat inn i *E.coli*-BL21pLysS, og enkeltstående ampicillinresistente kolonier ble dyrket ved 37 °C i TYP- (ampicillin 100µg/ml) medium til OD₆₀₀ var nådd 0,4 før proteinuttrykking ble indusert med 0,5mM IPTG. Celler ble høstet tre timer etter induksjonen ved sentrifugering i 30 minutter ved 4000rpm i en Beckman-J-6B. Cellepelletter ble resuspendert i en buffer som inneholdt 50mM Tris-HCl, 25 % (w/v) sukrose, 1mM NaEDTA, 0,1 % (w/v) NaAzid, 10mM DTT, pH 8,0. Etter et trinn med frysing-tining over natt ble resuspenderte celler sonikert med 1 minutts pulser i totalt omtrent 10 minutter i en Milsonix-XL2020-sonikator ved å benytte en standard probe med 12mm i diameter. Inklusjonslegemepelletter ble gjenvunnet ved sentrifugering i 30 minutter ved 13000rpm i en Beckman-J2-21-sentrifuge. Tre detergentvaskinger ble deretter utført for å fjerne celleavfall og membrankomponenter. Hver gang ble inklusjonslegemepelleten homogenisert i en Triton-buffer (50mM Tris-HCl, 0,5 % Triton-X100, 200mM NaCl, 10mM NaEDTA, 0,1 % (w/v) NaAzid, 2mM DTT, pH 8,0) før pelleten ble gjenskapt ved hjelp av sentrifugering i 15 minutter ved 13000rpm i en Beckman-J2-21. Detergent og salt ble deretter fjernet med en liknende vasking i følgende buffer: 50mM Tris-HCl, 1mM NaEDTA, 0,1 % (w/v) NaAzid, 2mM DTT, pH 8,0. Til slutt ble inklusjonslegemene fordelt i like deler på 30mg og frosset ned til -70 °C. Inklusjonslegemeproteinutbytte ble kvantitert ved å løseliggjøre med 6M guanidin-HCl og måling med en Bradford-fargestoffbindende analyse (PerBio). Omtrent 30mg (d.v.s. 1µmol) av hver løseliggjorte inklusjonslegemekjede ble tint opp fra frosset stokkløsning, prøver ble deretter blandet og blandingen ble fortynnet til 15ml av en guanidinløsning (6M guanidinhidroklorid, 10mM natriumacetat, 10mM EDTA) for å sikre fullstendig kjededenaturering. Guanidinløsningen inneholdende fullstendig reduserte og denaturerte TCR-kjeder ble deretter injisert i 1 liter av den følgende refoldingsbufferen: 100mM Tris

pH 8,5, 400mM L-arginin, 2mM EDTA, 5mM redusert glutation, 0,5mM oksidert glutation, 5M urea, 0,2mM PMSF. Løsningen ble hensatt i 24 timer. Refoldingsblandingen ble deretter dialysert to ganger, først mot 10 liter 100mM urea og deretter mot 10 liter 100mM urea, 10mM Tris pH 8,0. Både refoldingstrinn og dialysertrinn ble utført
 5 ved 6-8 °C.

sTCR ble separert fra degraderingsprodukter og urenheter ved å sette den dialyserte refoldingsblandingen på en POROS-50HQ-anionbytterkolonne og eluere bundet protein med en 0-500mM gradient av NaCl over 50 kolonnevolumer ved å benytte en Akta-renser (Pharmacia) som i figur 4. Fraksjoner samlet fra toppene ble lagret ved 4
 10 °C og analysert med Coomassiefarget SDS-PAGE (figur 5) før de ble slått sammen og konsentrert opp. Til slutt ble sTCRene rensert og karakterisert ved å benytte en Sephadex-200HR-gelfiltreringskolonne (Figur 6) balansert med HBS-EP-buffer (10mM HEPES pH 7,4, 150mM NaCl, 3,5mM EDTA, 0,05 % nonidet p40). Fraksjonene fra toppen som eluerte ved en relativ molekylvekt på omtrent 50kDa ble slått sammen og konsentrert før
 15 karakterisering med BIAcore-overflate-plasmon-resonans-analyse ble foretatt.

Eksempel 3 – BIAcore-overflate-plasmon-resonans-karakterisering av sTCR-binding til spesifikk pMHC

En overflate-plasmon-resonans-biosensor (BIAcore-3000) ble benyttet for å analysere bindingen av en sTCR til sin peptid-MHC-ligand. Dette ble fremmet ved å fremstille enkle pMHC-komplekser (beskrevet nedenfor) som ble immobiliserte på en streptavidinbelagt bindingsoverflate på en semi-orientert måte som tillot effektiv testing av bindingen av en løselig T-cellereseptor til opp til fire ulike pMHC (immobiliserte på
 25 separate strømningsceller) samtidig. Manuell injeksjon av HLA-kompleks tillater at det presise nivået av immobiliserte klasse-I-molekyler med letthet kan bli manipulert. Slike immobiliserte komplekser er i stand til å binde både T-cellereseptorer og koreseptoren CD8αα, der begge kan bli injisert i den løselige fasen. Spesifikk binding av TCR blir oppnådd selv ved lave konsentrasjoner (minst 40μg/ml) noe som tyder på at TCRen er
 30 relativt stabil. pMHC-bindende egenskaper for sTCR er observert å være kvalitativt og kvantitativt tilsvarende enten sTCR blir benyttet i den løselige eller i den immobiliserte fasen. Dette er en viktig kontroll for partiell aktivitet fra løselige typer og tyder også på at biotinylerte pMHC-komplekser er biologisk like aktive som ikke-biotinylerte komplekser.

Biotinylerte klasse-I HLA-A2-peptidkomplekser ble refoldet *in vitro* fra
 35 bakterieuttrykte inklusjonslegemer som inneholdt de integrerte subenhetsproteinene og syntetiske peptid, etterfulgt av rensing og enzymatisk biotinylering *in vitro* (O'Callaghan et al., (1999) Anal. Biochem. 266: 9-15). Tung HLA-kjede ble uttrykt med et C-terminalt biotinyleringsmerke som erstatter de transmembrane og cytoplasmiske domenene til proteinet i en hensiktsmessig konstruksjon. Uttrykkingsnivåer av inklusjonslegemer på

~75mg/liter bakteriell kultur ble oppnådd. Den lette HLA-kjeden eller β 2-mikroglobulin ble også uttrykt som inklusjonslegemer i *E.coli* fra en hensiktsmessig konstruksjon ved et nivå på ~500mg/liter bakteriell kultur.

E.coli-celler ble lyserte og inklusjonslegemer ble rensset til omtrent 80 % renhet.

5 Protein fra inklusjonslegemer ble denaturert i 6M guanidin-HCl, 50mM Tris pH 8,1, 100mM NaCl, 10mM DTT, 10mM EDTA og ble refoldet ved en konsentrasjon på 30mg/liter tung kjede, 30mg/liter β 2m inn i 0,4M L-arginin-HCl, 100mM Tris pH 8,1, 3,7mM cystamin, 6,6mM β -cystamin, 4mg/ml peptid (for eksempel tax 11-19) ved tilsetning av en enkelt puls med denaturert protein til refoldingsbuffer ved $<5^{\circ}\text{C}$.

10 Refolding ble tillatt å bli fullstendig ved 4°C i minst 1 time.

Buffer ble byttet ved dialyse i 10 volumer med 10mM Tris pH 8,1. To bufferskift var nødvendig for å redusere ionestyrken til løsningen tilstrekkelig. Proteinløsningen ble deretter filtrert gjennom et $1,5\mu\text{m}$ celluloseacetatfilter og satt på en POROS-50HQ-anionbytterkolonne (8ml i volum). Protein ble eluert med en lineær 0-500mM gradient av NaCl. HLA-A2-peptidkompleks eluerte ved omtrent 250mM NaCl, og toppfraksjoner ble 15 samlet, en blanding av proteasehemmere (Calbiochem) ble tilsatt og fraksjonene ble avkjølt på is.

Biotinylertmerkede HLA-komplekser ble byttet buffer på i 10mM Tris pH 8,1, 5mM NaCl ved å benytte Pharmacia-hurtigavsaltingskolonne som var balansert med den 20 samme bufferen. Umiddelbart etter eluering ble de proteininnholdende fraksjonene avkjølt på is og proteasehemmerblanding (Calbiochem) ble tilsatt. Biotinyleringsreagenser ble deretter tilsatt: 1mM biotin, 5mM ATP (bufret til pH 8), 7,5mM MgCl_2 og $5\mu\text{g/ml}$ BirA-enzym (renset i henhold til O'Callaghan et al., (1999) Anal. Biochem. 266: 9-15). Blandingen ble deretter tillatt å inkubere ved romtemperatur over natt.

25 Biotinylerte HLA-komplekser ble rensset ved å benytte gelfiltreringskromatografi. En Pharmacia-Superdex-75-HR-10/30-kolonne ble på forhånd balansert med filtrert PBS og 1ml av biotinyleringsreaksjonsblandingen ble satt på og kolonnen ble kjørt med 0,5ml PBS per minutt. Biotinylerte HLA-komplekser eluerte som en enkelt topp ved omtrent 15ml. Fraksjoner som inneholdt protein ble slått sammen, avkjølt på is og protease- 30 hemmerblanding ble tilsatt. Proteinkonsentrasjon ble bestemt ved å benytte en Coomassiebindingsanalyse (PerBio), og like volumer med biotinylerte HLA-komplekser ble lagret og frosset ned til -20°C . Streptavidin ble immobilisert med standard amin-koplingsfremgangsmåter.

Interaksjonene mellom A6-Tax-sTCR inneholdende en ny interkjedebinding og 35 dennes ligand/MHC-kompleks eller en irrelevant HLA-peptidkombinasjon, fremstillingen av hvilke er beskrevet ovenfor, ble analysert på en BIAcore-3000-overflate-plasmon-resonans- (SPR) biosensor. SPR måler forandringer i brytningsindeks uttrykt i responsenheter (RU) nær en sensoroverflate inne i en liten strømningscelle, et prinsipp som kan bli benyttet for å påvise reseptor-ligand interaksjoner og for å analysere deres affinitet og

kinetiske parametere. Probestrømningscellene ble gjort klare ved å immobilisere de individuelle HLA-peptidkompleksene i separate strømningsceller via binding mellom biotinet som var kryssbundet på $\beta 2m$ og streptavidin som var kjemisk kryssbundet på den aktiverte overflaten til strømningscellene. Analysen ble deretter utført ved å la sTCR passere over overflatene i de ulike strømningscellene med en konstant strømningshastighet, måle SPR-responsen som følge av dette. Først ble spesifisiteten av interaksjonen bekreftet ved å la sTCR passere over to ulike overflater med en konstant strømningshastighet på $5\mu\text{l}$ per minutt, én belagt med ~ 5000 RU med spesifikt peptid-HLA-kompleks og den andre belagt med ~ 5000 RU med ikke-spesifikt peptid-HLA-kompleks (figur 7, innskutt figur). Injeksjoner av løselig sTCR med konstant strømningshastighet og med ulike konsentrasjoner over peptid-HLA-komplekset ble benyttet for å definere bakgrunnsresonansen. Verdiene for disse kontrollmålingene ble trukket fra verdiene som ble funnet med spesifikt-HLA-kompleks og benyttet for å beregne bindingsaffiniteter uttrykt som dissosiasjonskonstanten, K_d (Price & Dwek, Principles and Problems in Physical Chemistry for Biochemists (2. utgave) 1979, Clarendon Press, Oxford), som i figur 7.

Den fremkomne K_d -verdien ($1,8\mu\text{M}$) ligger nært opp til den som er rapportert for interaksjonen mellom A6-Tax-sTCR uten den nye disulfidbindingen og pMHC ($0,91\mu\text{M}$ – Ding et al., 1999, Immunity 11:45-56).

Eksempel 4 – Fremstilling av løselig JM22-TCR inneholdende en ny disulfidbinding.

β -kjeden til den løselige A6-TCRen fremstilt i eksempel 1 inneholder i den native sekvensen et BglII-restriksjonssete (AAGCTT) som er hensiktsmessig til bruk som et ligeringssete.

PCR-mutagenese ble utført som beskrevet i detalj nedenfor for å introdusere et BamHI-restriksjonssete (GGATCC) i α -kjeden til løselig A6-TCR, plassert 5' i forhold til det nye cysteinkodonet. Sekvensen beskrevet i figur 2a ble benyttet som et templat for denne mutagenesen. De følgende primerne ble benyttet:

| BamHI |

5' – ATATCCAGAACCCgGAtCCTGCCGTGTA – 3'

5' – TACACGGCAGGAaTCcGGGTCTGGATAT – 3'

100ng plasmid ble blandet med $5\mu\text{l}$ 10mM dNTP, $25\mu\text{l}$ 10xPfu-buffer (Stratagene), 10 enheter Pfu-polymerase (Stratagene) og sluttvolumet ble justert til $240\mu\text{l}$ med H_2O . $48\mu\text{l}$ av denne blandingen ble tilsatt primere som var fortynnet for å gi en sluttkonsentrasjon på $0,2\mu\text{M}$ i $50\mu\text{l}$ sluttreaksjonsvolum. Etter et første denatureringstrinn på 30 sekunder ved 95°C ble reaksjonsblandingen utsatt for 15 omganger med

denaturering (95 °C, 30 sek.), sammensmelting (55 °C, 60 sek.) og elongering (73 °C, 8 min.) i en Hybaid-PCR-express-PCR-maskin. Produktet ble deretter fordøyd i 5 timer ved 37 °C med 10 enheter DpnI-restriksjonsenzym (New England Biolabs). 10 µl fra den fordøyde reaksjonen ble transformert inn i kompetente XL1-Blue-
 5 bakterier og dyrket i 18 timer ved 37 °C. En enkelt koloni ble plukket og dyrket over natt i 5ml TYP+ampicillin (16g/l Bacto-Trypton, 16g/l Gjærekstrakt, 5g/l NaCl, 2,5g/l K₂HPO₄, 100mg/l Ampicillin). Plasmid-DNA ble rensset på en Qiagen-mini-prep-kolonne i henhold til forhandlers instruksjoner og sekvensen ble bekreftet med automatisk sekvensering ved sekvenseringsfasiliteten til Department of Biochemistry, Oxford University. Mutasjonene
 10 som ble introdusert i α-kjeden var "tause", og derfor forble aminosyresekvensen til denne kjeden uforandret fra den som er vist ifølge figur 3a. DNA-sekvensen til den muterte α-kjeden er vist i figur 8a.

For å kunne fremstille en løselig JM22-TCR med en inkorporert ny disulfid-binding ble A6-TCR-plasmider som inneholdt BamHI-restriksjonssetet på α-kjeden og
 15 BglII-restriksjonssetet på β-kjeden benyttet som templat:

```

      | NdeI |
5' – GGAGATATACATATGCAACTACTAGAACAA – 3'
5' – TACACGGCAGGATCCGGGTTCTGGATATT – 3'
20      | BamHI |

      | NdeI |
5' – GGAGATATACATATGGTGGATGGTGGGAATC – 3'
5' – CCCAAGCTTAGTCTGCTCTACCCCAGGCCTCGGC – 3'
25      | BglII  |

```

JM22-TCR-α- og –β-kjedekonstruksjoner ble fremskaffet med PCR-kloning på følgende måte. PCR-reaksjoner ble utført ved å benytte primerne som er vist ovenfor og templatene inneholdende JM22-TCR-kjedene. PCR-produktene ble restriksjonsfordøyd
 30 med de relevante restriksjonsenzymene og klonet inn i pGMT7 for å fremskaffe ekspresjonsplasmider. Sekvensen til plasmidinnskuddene ble bekreftet med automatisert DNA-sekvensering. Figurene 8b og 8c viser henholdsvis DNA-sekvensene til de muterte α- og β-kjedene til JM22-TCR, og figurene 9a og 9b viser de resulterende aminosyre-sekvensene.

35 De respektive TCR-kjedene ble uttrykt, ko-refoldet og rensset som beskrevet i eksemplene 1 og 2. Figur 10 illustrerer elueringen av løselig disulfidbundet JM22-TCR-protein fra en POROS-50HQ-kolonne ved å benytte en 0-500mM gradient av NaCl som indikert med den stiplede linjen. Figur 11 viser resultatene fra både reduserende SDS-PAGE (Coomassiefarget) og ikke-reduserende SDS-PAGE (Coomassiefarget) geler av

fraksjoner fra kolonnen kjørt og illustrert av figur 10. Topp 1 inneholder åpenbart TCR-heterodimer som er interkjededisulfidbundet. Figur 12 viser proteineluering fra en størrelseseksklusjonskolonne av sammenslåtte fraksjoner fra topp 1 ifølge figur 10.

En BIAcore-analyse av bindingen av JM22-TCR til pMHC ble utført som beskrevet i eksempel 3. Figur 13a viser BIAcore-analyse av den spesifikke bindingen av disulfidbundet JM22-løselig-TCR til HLA-Flu-kompleks. Figur 13b viser bindingsresponsen sammenlignet med kontroll for en enkelt injeksjon av disulfidbundet JM22-løselig-TCR. Kd-verdien til denne disulfidbundne TCRen for HLA-Flu-kompleks ble bestemt å være $7,9 \pm 0,51 \mu\text{M}$.

10

Eksempel 5 – Fremstilling av løselig NY-ESO-TCR inneholdende en ny disulfidbinding.

cDNA som koder for NY-ESO-TCR ble isolert fra T-celler tilveiebrakt av Enzo Cerundolo (Institute of Molecular Medicine, University of Oxford) i overensstemmelse med kjente teknikker. cDNA som koder for NY-ESO-TCR ble fremstilt ved å behandle mRNA med revers transkriptase.

For å kunne fremstille en løselig NY-ESO-TCR med en ny disulfidbinding inkorporert ble A6-TCR-plasmider inneholdende BamHI-restriksjonssetet på α -kjeden og BglIII-restriksjonssetet på β -kjeden benyttet som templat, som beskrevet i eksempel 4. De følgende primerne ble benyttet:

| NdeI |

5' – GGAGATATACATATGCAGGAGGTGACACAG – 3'

5' – TACACGGCAGGATCCGGGTTCTGGATATT – 3,

| BamHI |

| NdeI |

5' – GGAGATATACATATGGGTGTCCTCAGACC – 3'

5' – CCCAAGCTTAGTCTGCTCTACCCAGGCCTCGGC – 3'

| BamHI |

30

NY-ESO-TCR- α - og - β -kjedekonstruksjoner ble fremskaffet med PCR-kloning på følgende måte. PCR-reaksjoner ble utført ved å benytte primerne som er vist ovenfor og templat inneholdende NY-ESO-TCR-kjedene. PCR-produktene ble restriksjonsfordøyd med de relevante restriksjonsenzymene og klonet inn i pGMT7 for å få ekspresjonsplasmider. Sekvensene til plasmidinnskuddene ble bekreftet med automatisert DNA-sekvensering. Figurene 14a og 14b viser henholdsvis DNA-sekvensene til de muterte α - og β -kjedene til NY-ESO-TCR, og figurene 15a og 15b viser de resulterende aminosyresekvensene.

35

De respektive TCR-kjedene ble ko-refoldet og rensset som beskrevet i eksemplene 1 og 2, med unntak av følgende forandring i protokollen:

Denaturering av løselige TCRer: 30mg av det løseliggjorte TCR- β -kjede-inklusjonslegemet og 60mg av det løseliggjorte TCR- α -kjede-inklusjonslegemet ble tint fra frosne stokkløsninger. Inklusjonslegemene ble fortynnet til en sluttkonsentrasjon på 5mg/ml i 6M guanidinkløsning, og DTT (2M stokkløsning) ble tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 10mM. Blandingen ble inkubert ved 37 °C i 30 min.

Refolding av løselige TCRer: 1L refoldingsbuffer ble rørt kraftig ved 5 °C $\pm$ 3 °C. Redoksparet 2-merkaptoetylamin og cystamin (henholdsvis til sluttkonsentrasjon på 6,6mM og 3,7mM) ble tilsatt omtrent 5 minutter før tilsetting av denaturerte TCR-kjeder. Proteinet ble deretter tillatt å gjennomgå refolding i omtrent 5 timer $\pm$ 15 minutter under røring ved 5 °C $\pm$ 3 °C.

Dialyse av refoldede løselige TCRer: Refoldet TCR ble dialysert i Spectrapor-1-membran (Spectrum, Produktnr. 132670) mot 10L 10mM Tris pH 8,1 ved 5 °C $\pm$ 3 °C i 18-20 timer. Etter denne tiden ble den dialyserte bufferen skiftet ut med ny 10mM Tris pH 8,1 (10L) og dialyse ble fortsatt ved 5 °C $\pm$ 3 °C i ytterligere 20-22 timer.

Figur 16 viser elueringen av løselig NY-ESO-disulfidbundet-TCR-protein fra en POROS-50HQ-kolonne ved å benytte en 0-500mM gradient av NaCl som indikert med den stiplede linjen. Figur 17 viser resultatene fra både reduserende SDS-PAGE (Coomassiefarget) og ikke-reduserende SDS-PAGE (Coomassiefarget) geler av fraksjoner fra kolonnen som ble kjørt og som er illustrert i Figur 16. Toppene 1 og 2 inneholder åpenbart TCR-heterodimer som er interkjededisulfidbundet. Figur 18 viser størrelses-eksklusjonskromatografi av sammenslåtte fraksjoner fra topp 1 (A) og topp 2 (B) i figur 17. Proteinet elueres som en enkelt stor topp som tilsvarer heterodimeren.

En BIAcore-analyse av bindingen av disulfidbundet NY-ESO-TCR til pMHC ble utført som beskrevet i eksempel 3. Figur 19 viser BIAcore-analyse av den spesifikke bindingen av disulfidbundet løselig TCR til HLA-NYESO-kompleks. A. topp 1, B. topp 2.

Kd-verdien til denne disulfidbundne TCRen for HLA-NY-ESO-komplekset ble bestemt å være $9,4 \pm 0,84 \mu\text{M}$.

Eksempel 6 – Fremstilling av løselig NY-ESO-TCR inneholdende en ny interkjededisulfidbinding og minst ett av de to cysteinene som er nødvendige for å danne den native interkjededisulfidbindingen.

For å kunne fremstille en løselig NY-ESO-TCR med en ny disulfidbinding inkorporert og i det minste ett av cysteinresidiene som er involvert i den native interkjededisulfidbindingen ble plasmider som inneholdt BamHI-restriksjonssetet på α -

kjeden og BglII-restriksjonssetet på β -kjeden benyttet som skjellett som beskrevet i eksempel 4. De følgende primerne ble benyttet:

```

      | NdeI |
5  5' – GGAGATATACATATGCAGGAGGTGACACAG – 3'
    5' – CCCAAGCTTAACAGGAAGTTTCTGGGCTGGGGAAGAA – 3'
      | HindIII |

      | NdeI |
10 5' – GGAGATATACATATGGGTGTCACCTCAGACC – 3'
    5' – CCCAAGCTTAACAGTCTGCTCTACCCCAGGCCTCGGC – 3'
      | BglII |

```

NY-ESO-TCR- α - og β -kjede-konstruksjoner ble tilveiebrakt med PCR-kloning på følgende måte. PCR-reaksjoner ble utført ved å benytte primerne vist ovenfor og templater inneholdende NY-ESO-TCR-kjedene. PCR-produktene ble restriksjonsfordøyd med de relevante restriksjonsenzymene og klonet inn i pGMT7 for å få ekspresjonsplasmider. Sekvensen til plasmidinnskuddene ble bekreftet med automatisert DNA-sekvensering. Figur 20a og 20b viser henholdsvis DNA-sekvensen til de muterte α - og β -kjedene til NY-ESO-TCRen, og figur 21a og 21b viser de resulterende aminosyresekvensene.

For å fremstille en løselig NY-ESO-TCR inneholdende både en ikke-nativ interkjededisulfidbinding og den native interkjededisulfidbindingen ble DNA som var isolert ved å gjøre bruk av begge primerne ovenfor benyttet. For å fremstille løselige TCRer med en ikke-nativ interkjededisulfidbinding og kun én av cysteinresidiene som er involvert i den native interkjededisulfidbindingen, ble DNA som var isolert ved å gjøre bruk av én av primerne ovenfor sammen med den hensiktsmessige primeren fra eksempel 5 benyttet.

De respektive TCR-kjedene ble uttrykt, ko-refoldet og rensset som beskrevet i eksempel 5.

Figurene 22-24 illustrerer elueringen av løselig NY-ESO-TCR $\alpha^{cys}\beta^{cys}$ (d.v.s. med ikke-native og med native cysteiner i begge kjeder), -TCR α^{cys} (med ikke-native cysteiner i begge kjeder men med det native cysteinet kun i α -kjeden) og -TCR β^{cys} (med ikke-native cysteiner i begge kjeder men med det native cysteinet kun i β -kjeden) fra POROS-50HQ-anionbytterkolonner ved å benytte en 0-500mM gradient av NaCl som indikert med den stiplede linjen. Figurene 25 og 26 viser henholdsvis resultatet fra reduserende SDS-PAGE (Coomassiefarget) og ikke-reduserende SDS-PAGE (Coomassiefarget) geler av fraksjoner fra kolonner kjørt med NY-ESO-TCR $\alpha^{cys}\beta^{cys}$, NY-ESO-TCR α^{cys} og NY-ESO-TCR β^{cys} illustrert i Figurene 22-24. Disse indikerer klart at TCR-heterodimerer som er interkjede-

disulfidbundet har blitt dannet. Figurene 27-29 viser proteinelueringsprofiler fra gelfiltreringskromatografi av oppsamlede fraksjoner fra anionbytterkolonnen kjørt med NY-ESO-TCR $\alpha^{cys}\beta^{cys}$, NY-ESO-TCR α^{cys} og NY-ESO-TCR β^{cys} og som henholdsvis er illustrert i figurene 22-24. Proteinene elueres som en enkelt stor topp som tilsvarer TCR-heterodimeren.

BIACore-analyse av sTCR-binding til pMHC ble utført som beskrevet i eksempel 3. Figurene 30-32 viser BIACore-analyse av den spesifikke bindingen av henholdsvis NY-ESO-TCR $\alpha^{cys}\beta^{cys}$, NY-ESO-TCR α^{cys} og NY-ESO-TCR β^{cys} til HLA-NYESO-kompleks.

TCR $\alpha^{cys}\beta^{cys}$ hadde en K_d på $18,08 \pm 2,075 \mu M$, TCR α^{cys} hadde en K_d på $19,24 \pm 2,01 \mu M$ og TCR β^{cys} hadde en K_d på $22,5 \pm 4,0692 \mu M$.

Eksempel 7 – Fremstilling av løselig AH-1,23-TCR inneholdende en ny interkjededisulfidbinding.

cDNA som koder for AH-1,23-TCR ble isolert fra T-celler levert av Hill Gaston (Medical School, Addenbrooke's Hospital, Cambridge) i overensstemmelse med kjent teknikk. cDNA som koder for NY-ESO-TCR ble fremstilt ved å behandle mRNAet med revers transkriptase.

For å kunne fremstille en løselig AH-1,23-TCR med en ny disulfidbinding inkorporert ble TCR-plasmider som inneholdt BamHI-restriksjonssetet på α -kjeden og BglII-restriksjonssetet på β -kjeden benyttet som et skjellest som beskrevet i eksempel 4. De følgende primerne ble benyttet:

```

      | NdeI |
25  5' – GGGAAGCTTACATATGAAGGAGGTGGAGCAGAATTCTGG – 3'
      5' – TACACGGCAGGATCCGGGTTCTGGATATT – 3'
      | BamHI |

      | NdeI |
30  5' – TTGGAATTCACATATGGGCGTCATGCAGAACCCAAGACAC – 3'
      5' – CCCAAGCTTAGTCTGCTCTACCCCAGGCCTCGGC – 3'
      | BglII |

```

AH-1,23-TCR- α - og - β -kjedekonstruksjoner ble tilveiebrakt med PCR-kloning som følger. PCR-reaksjoner ble utført ved å benytte primerne vist ovenfor og templatene inneholdende AH-1,23-TCR-kjedene. PCR-produktene ble restriksjonsfordøyd med de relevante restriksjonsenzymene og klonet inn i pGMT7 for å få ekspresjonsplasmider. Sekvensen til plasmidinnskuddene ble bekreftet med automatisert DNA-sekvensering.

Figurene 33a og 33b viser henholdsvis DNA-sekvensen til de muterte α - og β -kjedene til AH-1,23-TCR, og Figur 34a og 43b viser de resulterende aminosyresekvensene.

De respektive TCR-kjedene ble uttrykt, ko-refoldet og rensset som beskrevet i Eksempel 5.

Figur 35 illustrerer elueringen av løselig disulfidbundet AH-1,23-TCR-protein fra en POROS-50HQ-anionbytterkolonne ved å benytte en 0-500mM gradient av NaCl som indikert med den stiplede linjen. Figurene 36 og 37 viser henholdsvis resultatene av reduserende SDS-PAGE (Coomassiefarget) og ikke-reduserende SDS-PAGE (Coomassiefarget) geler av fraksjoner fra kolonnen som ble kjørt og som er illustrert i figur 35. Disse gelene indikerer klart tilstedeværelsen av en TCR-heterodimer som er interkjededisulfidbundet. Figur 38 viser elueringsprofilen fra en Superdex-75-HR-gelfiltreringskolonne av sammenslåtte fraksjoner fra anionbytterkolonnen som ble kjørt og som er illustrert i figur 35. Proteinet elueres som en enkelt stor topp som tilsvarer heterodimeren.

Eksempel 8 – Fremstilling av løselig A6-TCR som inneholder en ny interkjededisulfidbinding mellom alternative posisjoner i immunoglobulinregionen til det konstante domenet.

De følgende eksperimentene ble utført for å undersøke hvorvidt det var mulig å danne funksjonelle løselige TCRer som inneholdt en ny disulfidbinding i TCR-immunoglobulinregionen på en posisjon forskjellig fra mellom treonin 48 på ekson 1 i TRAC*01 og serin 57 på ekson 1 i både TRBC1*01 / TRBC2*01.

Til mutering av A6-TCR- α -kjeden ble de følgende primerne designet (nummeret i primernavnene refererer til posisjonen til aminosyreresidien som skal bli mutert i ekson 1 fra TRAC*01, muterte residier er vist med små bokstaver):

T48 $\rightarrow$ C mutasjon

5' – CACAGACAAAtgTGTGCTAGACAT – 3'

5' – ATGTCTAGCACAcTTTGTCTGTG – 3'

Y10 $\rightarrow$ C mutasjon

5' – CCCTGCCGTGTgCCAGCTGAGAG – 3'

5' – CTCTCAGCTGGcACACGGCAGGG – 3'

L12 $\rightarrow$ C mutasjon

5' – CCGTGTACCAGtgcAGAGACTCTAAATC – 3'

5' – GATTTAGAGTCTCTgcaCTGGTACACGG – 3'

S15 → C mutasjon

5' – CAGCTGAGAGACTgTAAATCCAGTGAC – 3'

5' – GTCACTGGATTTAcAGTCTCTCAGCTG – 3'

5 V22 → C mutasjon

5' – CAGTGACAAGTCTtgCTGCCTATTCAC – 3'

5' – GTGAATAGGCAGcaAGACTTGTCAGT – 3'

Y43 → C mutasjoner

10 5' – GATTCTGATGTGTgTATCACAGACAAAT – 3'

5' – ATTTGTCTGTGATAcACACATCAGAATC – 3'

T45 → C mutasjon

5' – CTGATGTGTATATCtgtGACAAAAGTGTGC – 3'

15 5' – GCACAGTTTTGTcacaGATATACACATCAG – 3'

L50 → C mutasjon

5' – AGACAAAAGTGTGtgtGACATGAGGTCT – 3'

5' – AGACCTCATGTCacaCACAGTTTTGTCT – 3'

20

M52 → C mutasjon

5' – ACTGTGCTAGACtgtAGGTCTATGGAC – 3'

5' – GTCCATAGACCTacaGTCTAGCACAGT – 3'

25 S61 → C mutasjon

5' – CTTCAAGAGCAACtGTGCTGTGGCC – 3'

5' – GGCCACAGCACaGTTGCTCTTGAAG – 3'

30 Til å mutere TCR-A6-β-kjeden ble de følgende primerne benyttet (nummeret i primernavnene refererer til posisjonen til aminosyreresidien som skal bli mutert i ekson 1 på TRBC2*01. Muterte residier er vist med små bokstaver):

S57 → C mutasjon

5' – CAGTGGGGTCtGCACAGACCC – 3'

35 5' – GGGTCTGTGCaGACCCCACTG – 3'

V13 → C mutasjon

5' – CCGAGGTCGCTtgtTTTGAGCCATCAG – 3'

5' – CTGATGGCTCAAAacaAGCGACCTCGG – 3'

F14 → C mutasjon

5' – GGTCTGTGTgtGAGCCATCAGA – 3'

5' – TCTGATGGCTCacaCACAGCGACC – 3'

5

S17 → C mutasjon

5' – GTGTTTGAGCCATgtGAAGCAGAGATC – 3'

5' – GATCTCTGCTTCacATGGCTCAAACAC – 3'

10 G55 → C mutasjon

5' – GAGGTGCACAGTtGtGTCAGCACAGAC – 3'

5' – GTCTGTGCTGACaCaACTGTGCACCTC – 3'

D59 → C mutasjon

15 5' – GGGTCAGCACAtgCCCGCAGCCC – 3'

5' – GGGCTGCGGGcaTGTGCTGACCC – 3'

L63 → C mutasjon

5' – CCCGCAGCCCtgCAAGGAGCAGC – 3'

20 5' – GCTGCTCCTTGCaGGGCTGCGGG – 3'

S77 → C mutasjon

5' – AGATACGCTCTGiGCAGCCGCCT – 3'

5' – AGGCGGCTGCaCAGAGCGTATCT – 3'

25

R79 → C mutasjon

5' – CTCTGAGCAGctGCCTGAGGGTC – 3'

5' – GACCCTCAGGCaGCTGCTCAGAG – 3'

30 E15 → C mutasjon

5' – GCTGTGTTTtgtCCATCAGAA – 3'

5' – TTCTGATGGacaAAACACAGC – 3'

35 PCR-mutagenese, amplifisering av α - og β -TCR-konstruksjoner, ligering og plasmidrensing ble utført som beskrevet i eksempel 1 ved å benytte den hensiktsmessige kombinasjonen av primerne ovenfor for å fremstille løselige TCRer med nye interkjededisulfidbindinger mellom de følgende aminosyreparene inkludert:

TCR- α -kjede	TCR- β -kjede	α -primer benyttet	β -primer benyttet
Thr 48	Ser 57	T48 $\rightarrow$ C	S57 $\rightarrow$ C
Thr 45	Ser 77	T45 $\rightarrow$ C	S77 $\rightarrow$ C
Ser 61	Ser 57	S61 $\rightarrow$ C	S57 $\rightarrow$ C
Leu 50	Ser 57	L50 $\rightarrow$ C	S57 $\rightarrow$ C
Tyr 10	Ser 17	Y10 $\rightarrow$ C	S17 $\rightarrow$ C
Ser 15	Val 13	S15 $\rightarrow$ C	V13 $\rightarrow$ C
Thr 45	Asp 59	T45 $\rightarrow$ C	D59 $\rightarrow$ C
Leu 12	Ser 17	L12 $\rightarrow$ C	S17 $\rightarrow$ C
Ser 61	Arg 79	S61 $\rightarrow$ C	R79 $\rightarrow$ C
Leu 12	Phe 14	L12 $\rightarrow$ C	F14 $\rightarrow$ C
Val 22	Phe 14	V22 $\rightarrow$ C	F14 $\rightarrow$ C
Met 52	Gly 55	M52 $\rightarrow$ C	G55 $\rightarrow$ C
Tyr 43	Leu 63	Y43 $\rightarrow$ C	L63 $\rightarrow$ C
Ser 15	Glu 15	S15 $\rightarrow$ C	E15 $\rightarrow$ C

Figurene 39 til 58 viser DNA- og aminosyresekvensene til de muterte A6-TCR-kjedene som er amplifisert med primerne ovenfor. Kodonene som koder for de muterte cysteinene er uthevet.

- 5 De respektive TCR-kjedene ble uttrykt, ko-refoldet og rensset som beskrevet i eksempel 5. Etter rensing på POROS-50HQ-anionbytterkolonne ble de resulterende proteinene kjørt på SDS-PAGE-geler for å kunne vurdere hvorvidt korrekte refoldede løselige TCRer hadde blitt dannet. Disse gelene ble også undersøkt for å bekrefte tilstedeværelse eller fravær av disulfidbundet protein med korrekt molekylvekt i det
- 10 rensede materialet. Undersøkte TCRer som inneholdt de følgende nye interkjededisulfidbindingene misslyktes i å danne disulfidbundne proteiner med korrekt molekylvekt i dette bakterielle ekspresjonssystemet og de ble ikke undersøkt nærmere. Alternative prokaryote eller eukaryote ekspresjonssystemer er likevel tilgjengelige.

TCR- α -kjede	TCR- β -kjede
Ser 61	Ser 57
Leu 50	Ser 57
Ser 15	Val 13
Leu 12	Ser 17
Ser 61	Arg 79
Leu 12	Phe 14
Val 22	Phe 14
Tyr 43	Leu 63

Figurene 59 til 64 illustrerer henholdsvis elueringen av løselig TCR inneholdende nye interkjededisulfidbindinger mellom de følgende residene: Thr 48 – Ser 57, Thr 45 – Ser 77, Tyr 10 – Ser 17, Thr 45 – Asp 59, Met 52 – Gly 55 og Ser 15 – Glu 15 fra en POROS-200HQ-anionbytterkolonne ved å benytte en 0-500mM gradient med NaCl som indikert med den stiplede linjen. Figurene 65 til 70 viser henholdsvis resultatene fra 5 reduserende SDS-PAGE (Coomassiefarget) og ikke-reduserende SDS-PAGE (Coomassiefarget) geler av fraksjoner fra kolonnen som ble kjørt og som er illustrert i figurene 59 til 64. Disse gelene indikerer klart tilstedeværelsen av TCR-heterodimer som er interkjededisulfidbundet.

10 Figurene 71 til 76 viser elueringsprofiler fra en Sephadex-200-HR-gelfiltreringskolonne av sammenslåtte fraksjoner fra anionbytterkolonnen som ble kjørt og som er illustrert i Figurene 59 til 64.

En BIAcore-analyse av bindingen av TCRene til pMHC ble utført som beskrevet i eksempel 3. Figurene 77 til 82 viser BIAcore-kurver som viser de rensede løselige 15 TCRene sin evne til å binde HLA-A2-tax-pMHC-komplekser.

Thr 48 – Ser 57 hadde en Kd på 7,8μM, Thr 45 – Ser 77 hadde en Kd på 12,7μM, Tyr 10 – Ser 17 hadde en Kd på 34μM, Thr 45 – Asp 59 hadde en Kd på 14,9μM og Ser 15 – Glu 15 hadde en Kd på 6,3μM. Met 52 – Gly 55 var i stand til å binde til sitt native ”mål”, HLA-A2-tax-komplekset, selv om det også binder på en liknende måte til et 20 ”irrelevant” mål, HLA-A2-NY-ESO-komplekset (se figur 81).

Eksempel 9 – Røntgenkrystallografi av den disulfidbundne NY-ESO-T-celle-reseptoren, spesifikk for NY-ESO-HLA-A2-komplekset.

25 NY-ESO-dsTCR ble klonet som beskrevet i eksempel 5 og uttrykt på følgende måte.

Ekspresjonsplasmidene inneholdende henholdsvis de muterte α- og β-kjedene ble transformert separat inn i *E.coli*-BL21-pLysS og enkeltstående ampicillinresistente kolonier ble dyrket ved 37 °C i TYP-medium (ampicillin 100μg/ml) til OD₆₀₀ nådde 0,7 30 før proteinuttrykking ble indusert med 0,5mM IPTG. Celler ble høstet 18 timer etter induksjon ved hjelp av sentrifugering i 30 minutter med 4000rpm i en Beckman-J-6B. Cellepelletter ble resuspendert i lyseringsbuffer som inneholdt 10mM Tris-HCl pH 8,1, 10mM MgCl₂, 150mM NaCl, 2mM DTT, 10 % glyserol. For hver liter med bakteriekultur ble 100μl lysozym (20 mg/ml) og 100μl Dnase-I (20 μg/ml) tilsatt. Etter inkubering på is i 35 30 minutter ble den bakterielle suspensjonen sonikert med 1 minutts pulser i totalt 10 minutter ved å benytte en Milsonix-XL2020-sonikator med en standard 12mm i diameter probe. Inklusjonslegemepelletter ble gjenvunnet ved å sentrifugere i 30 minutter ved 13000rpm i en Beckman-J2-21-sentrifuge (4 °C). Tre vaskinger i Triton-vaskebuffer (50mM Tris-HCl pH 8,1, 0,5 % Triton-X100, 100mM NaCl, 10mM NaEDTA, 0,1 %

(w/v), 2mM DTT) ble deretter gjennomført for å fjerne cellerester og membrankomponenter. Hver gang ble inklusjonslegemepelleten homogenisert i Triton-vaskebuffer før pelleten ble gjenvunnet med sentrifugering i 15 minutter ved 13000rpm i en Beckman-J2-21. Detergent og salt ble deretter fjernet med en tilsvarende vasking i resuspensjonsbuffer (50mM Tris-HCl pH 8,1, 100mM NaCl, 10mM NaEDTA, 0,1 % (w/v) NaAzid, 2mM DTT). Til slutt ble inklusjonslegemene løseliggjort i 6M guanidinbuffer (6M guanidinhidroklorid, 50mM Tris pH 8,1, 100mM NaCl, 10mM EDTA, 10mM DTT), fordelt i like deler med 120mg i hver og frosset ned til -70 °C. Inklusjonslegemer ble kvantitert ved å løseliggjøre dem i 6M guanidin-HCl og måle med en Bradford-fargestoffbindende analyse (PerBio).

Omtrent 60mg (d.v.s. 2,4µmol) frosset løseliggjort alfakjede ble blandet med 30mg (d.v.s. 1,2µmol) frosset løseliggjort betakjede. TCR-blandingen ble fortynnet til et sluttvolum på 18ml med 6M guanidinbuffer og varmet opp til 37 °C i 30 minutter for å sikre fullstendig kjededenedaturering. Guanididløsningen inneholdende fullstendig reduserte og denaturerte TCR-kjeder ble så blandet i 1 liter med kald refoldingsbuffer (100mM Tris pH 8,1, 400mM L-arginin-HCl, 2mM EDTA, 6,6mM 2-mekaptoetylamin, 3,7mM cystamin, 5M urea) under omrøring. Løsningen ble hensatt i kjølerommet (5 °C ± 3 °C) for å la refolding skje. Refoldingsløsningen ble deretter dialysert mot 12 liter med vann i 18-20 timer etterfulgt av 12 liter med 10mM Tris pH 8,1 i 18-20 timer (5 °C ± 3 °C). Spectrapor-1-dialysemembran (Spectrum Laboratories produktnummer 132670) som har en molekylvektsbegrensning på 6-8000 kDa ble benyttet i denne dialyseprosessen. Det dialyserte proteinet ble filtrert gjennom filtre med porestørrelse på 0,45µm (Schleicher og Schuell, Referansenummer 10 404012) tilpasset til en Nalgene-filtreringsenhet.

Refoldet NY-ESO-TCR ble separert fra degraderingsprodukter og urenheter ved å sette refoldingsløsningen på en POROS-50HQ-anionbytterkolonne (Applied Biosystems) ved å benytte en ÄKTA-renser (Amersham Biotech). En POROS-50HQ-kolonne ble forhåndsbalansert med 10 kolonnevolumer med buffer-A (10mM Tris pH 8,1) før protein ble satt på. Det bundne proteinet ble eluert med en gradient på 0-500mM NaCl over 7 kolonnevolumer. Toppfraksjoner (1ml) ble analysert på denaturerende SDS-PAGE ved å benytte en ikke-reduserende prøvebuffer. Toppfraksjoner inneholdende det heterodimere alfa-beta-komplekset ble ytterligere rensert ved å benytte en Superdex-75HR-gelfiltreringskolonne som var balansert med 25mM MES pH 6,5. Fraksjonene fra proteintoppen som eluerte ved en relativ molekylvekt på omtrent 50 kDa ble slått sammen, konsentrert til 42mg/ml i Ultrafree-concentrators (Milipore, delnummer UFV2BGC40) og lagret ved -80 °C.

Krystallisering av NY-ESO-TCR ble utført med hengende-dråpe teknikk ved 18 °C ved å benytte 1µl proteinløsning (8,4mg/ml) i 5mM MES pH 6,5 blandet med et ekvivalent volum med krystalliseringsbuffer. Krystaller ble dannet ved flere ulike

betingelser når Crystal-Screen-buffere (Hampton Research) ble benyttet. Enkeltstående kubiske krystaller ($< 100\mu\text{m}$) ble dyrket frem i 30 % PEG 4000, 0,1M Na-Citrat pH 5,6, 0,2M ammoniumacetatbuffer og benyttet til strukturbestemmelse.

Krystaller av NY-ESO-TCR ble hurtigfrosset og testet for diffraksjon i røntgenstrålen fra en Daresbury-synchrotron. Krystallene diffrakterte til 0,25nm (2,5Å) oppløsning. Ett datasett ble samlet inn og prosessert for å gi et 98,6 % komplett sett med amplituder som var fornuftig til omtrent 0,27nm (2,7Å), men brukbart opp til 0,25nm (2,5Å). Den forenende R-faktoren, d.v.s. overensstemmelsen mellom mange målinger av krystallografiske ekvivalente refleksjoner, var 10,8 % for alle dataene. Dette er marginalt i det høyeste løsningsskallet. Romgruppen var $P2_1$, med celledimensjoner $a=4,25\text{nm}$ (42,5Å), $b=5,95\text{nm}$ (59,5Å), $c=8,17\text{nm}$ (81,7Å), $\beta=91,5^\circ$. Celledimensjonene og symmetrien betydde at det var to kopier i cellen. Den asymmetriske enheten, au eller det minste volumet som det er nødvendig å undersøke, har bare ett molekyl, og det andre molekylet i cellen blir dannet med 2_1 -symmetrioperasjonen. Posisjoneringen av molekylet i au er tilfeldig i Y-retningen. Så lenge det er i korrekt posisjon i x-z-planet kan det bli oversatt når det er ønskelig i y-retningen. Dette er referert til som fri parameter i denne "polare" romgruppen.

PDB-databasen gir bare ett treff som inneholder en A/B-heterodimer TCR, 1BD2. Dette treffet har også koordinatene til det HLA-beslektede peptidet i kompleks med TCRen. TCR-kjede-B var den samme i NY-ESO men kjede-A hadde små forskjeller i C-domenet og signifikante forskjeller i N-domenet. Ved å benytte 1BD2-A/B-modellen til molekylær erstatning ga MR en gal løsning, som illustrert med omfattende overlapp med symmetriekvivalente molekyler. Ved å benytte B-kjeden alene ble en bedre løsning oppnådd som ikke hadde signifikante konflikter med naboer. Korrelasjonskoeffisienten var 49 %, den krystallografiske R-faktoren 50 % og den nærmeste tilnærmingen var 0,49nm (49Å). Rotasjons- og translasjonsoperasjonen som var nødvendig for å transformere kjede-B-modellen til MR-ekvivalenten ble foretatt på kjede-A. Den hybride MR-løsningen som dermed ble generert passet godt i cellen med minimale konflikter.

Elektrontetthetskart stemte generelt overens med modellen og tillot dennes tilpasning for å passe sekvensen til NY-ESO-TCRen. Men, utgangsmodellen hadde mange hull, spesielt manglende sidekjeder, som er karakteristisk for dårlig ordnede deler av modellen. Mange av hårnålsløkkene mellom kjeder hadde svært lav tetthet og var vanskelige å modellere. Den krystallografiske R-faktoren til modellen er 30 %. R-faktoren er et mellomværende, d.v.s. den er forskjellen mellom de kalkulerte og observerte amplitudene.

Som figur 83a og 83b viser så passer ikke den innskutte sekvensen fra 1BD2 noe særlig med tettheten. Forandring av modellen med Cys i posisjon 164 i kjede-A og 174 i kjede-B etterfulgt av ytterligere forbedring viste klart at denne sekvensfastsettelsen er mye bedre tilpasset til tettheten. Men, forskjellene når det gjelder størrelse på sidekjeden

er minimale, så det var lite forstyrrelse i modellen. Elektrontettheten i den regionen er lite forandret.

- Det viktigste aspektet ved dette arbeidet er at den nye TCRen er svært lik i struktur med den publiserte modellen (1BD2). Sammenligningen kan inkludere hele TCRen, de konstante domenene eller den lille delen nær mutasjonspunktet.

r.m.s.-avviksverdiene er ført opp i tabellen nedenfor. Sammenligningen av strukturer er vist i figur 84.

	Kjede-A, hele	Kjede-B, hele	Kjede-A, Konstant	Kjede-B, Konstant	Kort strekk
r.m.s- fortrengning	2,831	1,285	1,658	1,098	0,613
Gjennomsnittlig fortrengning	2,178	1,001	1,235	0,833	0,546
Maksimal fortrengning	9,885	6,209	6,830	4,490	1,330

(Alle enheter er i Å)

10

Det korte strekket refererer til enkeltkjeden fra kjede-A (A157 til A169) og enkeltkjeden fra kjede-B (B170 til B183) som nå er bundet sammen av disulfidbroen. Avvikene ble kun beregnet for hovedatomene i kjeden.

- Disse resultatene viser at introduksjonen av disulfidbindingen har minimal effekt på den lokale strukturen av TCRen rundt bindingen. Noen større effekter blir observert når TCRen blir sammenlignet med den publiserte strukturen (1BD2) til A6-TCR men økningen i RMS-fortrengning skyldes i hovedsak forskjeller i løkkekonformasjoner (se figur 84). Disse løkkene utgjør ikke en del av kjernestrukturen til TCRen, som er dannet av en serie β -flater som danner en karakteristisk Ig-folding. RMS-avviket for hele α -kjeden er spesielt stort på grunn av forskjellen i sekvensen til variable domener mellom A6 (1BD2) og NY-ESO-TCRer. A6 og NY-ESO-TCRene har likevel det samme variable β -domenet og RMS-avvikene hele β -kjeden viser at strukturen til dette variable domenet også er opprettholdt i TCRen med den nye disulfidbindingen. Disse dataene indikerer derfor at kjernestrukturen til TCRen blir opprettholdt i krystallstrukturen til TCRen med den nye disulfidbindingen.

Eksempel 10 – Fremstilling av løselige NY-ESO-TCRer som inneholder en ny interkjededisulfidbinding og C-terminale β -kjede-merkingseter.

For å kunne fremstille en løselig NY-ESO-TCR med en ny disulfidbinding inkorporert ble A6-TCR-plasmider inneholdende restriksjonssetene BamHI fra α -kjeden og BglIII fra β -kjeden benyttet som skjellletter som beskrevet i eksempel 4.

NY-ESO-TCR- β -kjede konstruksjoner ble fremskaffet med PCR-kloning på følgende måte. PCR-reaksjoner ble utført ved å benytte primerne som er vist nedenfor og templater som inneholdt NY-ESO-TCR-kjedene.

| NdeI |

For 5' – GGAGATATACATATGGGTGTCACTCAGAAC – 3'

10 Rev 5' – CCACCGGATCCGTCTGCTCTACCCCAGGC – 3'

| BamHI |

PCR-produktene ble restriksjonsfordøyd med de relevante restriksjonsenzymene og klonet inn i pGMT7 inneholdende biotingsjenkjenningssekvensen for å tilveiebringe ekspresjonsplasmider. Sekvensen til plasmidinnskuddene ble bekreftet med automatisert DNA-sekvensering. Figur 85a viser DNA-sekvensen til β -kjeden fra NY-ESO-TCR med biotingsjenkjenningssettet inkorporert, og figur 85b viser den resulterende aminosyresekvensen.

A-kjedekonstruksjonen ble fremstilt som beskrevet i eksempel 5. De respektive TCR-kjedene ble uttrykt, ko-refoldet og rensset som beskrevet i eksempel 5.

For å kunne fremstille løselig NY-ESO-TCR inneholdende en ikke-nativ interkjededisulfidbinding og et hekso-histidinmerke på C-terminalen til β -kjeden ble de samme primerne og NY-ESO-templatet som ovenfor benyttet. PCR-produktene ble restriksjonsfordøyd med de relevante restriksjonsenzymene og klonet inn i pGMT7 inneholdende hekso-histidinsekvensen for å tilveiebringe ekspresjonsplasmider. Figur 86a viser DNA-sekvensen til β -kjeden på NY-ESO-TCR med hekso-histidinmerket inkorporert, og figur 86b viser den resulterende aminosyresekvensen.

Figur 87 illustrerer elueringen av løselig NY-ESO-TCR inneholdende en ny disulfidbinding og biotingsjenkjenningssekvensen fra en POROS-50HQ-anionbytterkolonne ved å benytte en 0-500mM gradient av NaCl som indikert med den stiplede linjen. Figur 88 illustrerer elueringen av løselig NY-ESO-TCR inneholdende en ny disulfidbinding og hekso-histidinmerket fra en POROS-50HQ-anionbytterkolonne ved å benytte en 0-500mM gradient av NaCl som indikert med den stiplede linjen.

Figur 89 og 90 viser proteinelueringsprofiler fra gelfiltreringskromatografi av sammenslåtte fraksjoner fra NY-ESO-biotin-merket og NY-ESO-hekso-histidinmerket anionbytterkolonnekjøringer illustrert av henholdsvis figur 87 og 88. Proteinene elueres som en enkelt stor topp tilsvarende til TCR-heterodimeren.

En BIAcore-analyse av sTCR binding til pMHC ble utført som beskrevet i Eksempel 3. NY-ESO-biotin-TCRen hadde en K_d på $7,5\mu\text{M}$ og NY-ESO-heksa-histidinmerket-TCRen hadde en K_d på $9,6\mu\text{M}$.

5 **Eksempel 11 – Cellefarging ved å benytte fluorescensmerkede tetramerer av løselig NY-ESO-TCR inneholdende en ny interkjededisulfidbinding.**

Fremstilling av TCR-tetramer:

De løselige NY-ESO-TCRene, inneholdende en ny disulfidbinding og en
 10 biotingenkjenningssekvens fremstilt som i eksempel 10, ble benyttet for å danne de løselige TCR-tetramerene som er nødvendige for cellefarging. 2,5ml renset løselig TCR løsning ($\sim 0,2\text{mg/ml}$) ble byttet buffer på til biotinyleringsreaksjonsbuffer (50mM Tris pH 8,0, 10mM MgCl_2) ved å benytte en PD-10-kolonne (Pharmacia). Eluatet (3,5ml) ble konsentrert til 1ml ved å benytte en centricon-konsentrator (Amicon) med en ekskludering
 15 av molekylvekt på 10 kDa. Dette ble gjort om til 10mM med ATP tilsatt fra stokkløsning ($0,1\text{g/ml}$ justert til pH 7,0). Et volum av en blanding av proteasehemmere ble deretter tilsatt (protease inhibitor cocktail Set 1, Calbiochem Biochemicals), tilstrekkelig til å gi en sluttkonsentrasjon av proteaseblanding på 1/100 av stokkløsningen slik den blir levert, etterfulgt av 1mM biotin (tilsatt fra 0,2M stokkløsning) og $20\mu\text{g/ml}$ enzym (fra $0,5\text{mg/ml}$
 20 stokkløsning). Blandingen ble deretter inkubert over natt ved romtemperatur. Overskudd av biotin ble fjernet fra løsningen med størrelseseksklusjonskromatografi på en S75-HR-kolonne. Nivået av biotinylering på NY-ESO-TCRen ble bestemt med en størrelses-eksklusjon-HPLC-basert fremgangsmåte som følger. $50\mu\text{l}$ av den biotinylerste NY-ESO-TCRen (2mg/ml) ble inkubert med $50\mu\text{l}$ streptavidinbelagte agarosekuler (Sigma) i 1
 25 time. Kulene ble deretter spunnet ned og $50\mu\text{l}$ av den ubundne prøven ble kjørt på en TSK-2000-SW-kolonne (Tosoohaas) ved å benytte en strømningshastighet på $0,5\text{ml/min}$ (200mM fosfatbuffer pH 7,0) over 30 minutter. Tilstedeværelsen av biotinylerst NY-ESO-TCR ble påvist med et UV-spektrometer ved både 214nm og ved 280nm. Den biotinylerste NY-ESO ble kjørt mot en ikke-biotinylerst NY-ESO-TCR-kontroll. Prosentandelen av
 30 biotinylering ble beregnet ved å subtrahere topparealet til det biotinylerste proteinet fra det fra det ikke-biotinylerste proteinet.

Tetramerisering av den biotinylerste løselige TCRen ble oppnådd ved å benytte neutravidin-phycoerythronkonjugat (Cambridge Biosciences, UK). Konsentrasjonen av biotinylerst løselig TCR ble målt ved å benytte en Coomassie-proteinanalyse (Pierce) og et
 35 forhold mellom løselig TCR $0,8\text{mg/ml}$ neutravidin-phycoerythronkonjugat ble beregnet for å oppnå metting av neutravidin-PE med biotinylerst TCR ved et forhold på 1:4. $19,5\mu\text{l}$ av en $6,15\text{mg/ml}$ -løsning av biotinylerst NY-ESO-løselig-TCR i fosfatbufret saltvann (PBS) ble tilsatt sakte til $150\mu\text{l}$ av en 1mg/ml neutravidin-PE løselig over is med forsiktig

risting. 100,5µl PBS ble deretter tilsatt til denne løsningen for å tilveiebringe en slutt-konsentrasjon av NY-ESO-TCR-tetramer på 1 mg/ml.

Fargingsprotokoll:

5 Fire like volumer med $0,3 \times 10^6$ HLA-A2-positive EBV-transformert B-cellelinje (PP LCL) i 0,5ml PBS ble inkubert med varierende konsentrasjoner (0 , 10^{-4} , 10^{-5} og 10^{-6} M) av HLA-A2-NYESO-peptid (SLLMWITQC) i 2 timer ved 37°C . Disse PP-LCL-cellene ble deretter vasket to ganger i Hanks-bufret-saltvannsløsning (HBSS) (Gibco, UK).

10 Hver av de fire like volumene ble fordelt likt og farget med biotinyleret NY-ESO-disulfidbundet-TCR som var nylig tetramerisert med neutravidin-phycoerythrin. Celler ble inkubert med enten 5 eller 10µg phycoerythrinmerket, tetramere dsTCR-komplekser på is i 30 minutter og vasket med HBSS. Celler ble vasket igjen, resuspendert i HBSS og analysert med FACS Vantage. 25 000 hendelser ble innsamlet og data ble analysert ved å
15 benytte WinMIDI-programvare.

Resultater:

Figurene 91a-h illustrerer som histogrammer FACS Vantage-dataene generert for hver av prøvene som ble fremstilt som beskrevet ovenfor. Den følgende tabellen viser
20 prosentandelen av positivt fargede celler som ble observert for hver av prøvene:

Prøve	Positivt fargede celler (%)
0 NY-ESO-peptid, 5µg TCR	0,75
10^{-4} M NY-ESO-peptid, 5µg TCR	84,39
10^{-5} M NY-ESO-peptid, 5µg TCR	35,29
10^{-6} M NY-ESO-peptid, 5µg TCR	7,98
0 NY-ESO-peptid, 10µg TCR	0,94
10^{-4} M NY-ESO-peptid, 10µg TCR	88,51
10^{-5} M NY-ESO-peptid, 10µg TCR	8,25
10^{-6} M NY-ESO-peptid, 10µg TCR	3,45

Disse dataene indikerer klart at andelen av celler merket med NY-ESO-TCR-tetramerene øker på en måte som er korrelert til konsentrasjonen av peptidet
25 (SLLMWITQC) i hvilken de hadde blitt inkubert. Disse NY-ESO-TCR-tetramerene er derfor enheter som er hensiktsmessige til spesifikk cellemerking basert på uttrykkningen av HLA-A2-NYESO-komplekset.

I foreliggende eksempel har en fluorescerende konjugert NY-ESO-TCR-tetramer blitt benyttet. Tilsvarende nivåer av cellebinding vil likevel være forventet dersom dette
30 merket ble byttet ut med en passende terapeutisk enhet.

Eksempel 12 – Fremstilling av løselig A6-TCR med en ny disulfidbinding med den konstante C β 1-regionen inkorporert.

5 Alle de forutgående eksemplene beskriver fremstillingen av løselige TCRer med en ny disulfidbinding og med konstante C β 2-regionen inkorporert. Foreliggende eksempel viser at løselige TCRer som har den konstante C β 1-regionen inkorporert kan bli fremstilt med hell.

10 *Design av primere til PCR-sammenføyning av A6-TCR- β -kjede-V-domene med C β 1:*

Til PCR-konstruksjon av A6-TCR- β -kjede-V-domene ble de følgende primerne designet:

15 5' – GGAGATATACATATGAACGCTGGTGTCACT – 3'
5' – CCTTGTTTCAGGTCCTCTGTGACCGTGAG – 3'

Til PCR-konstruksjon av C β 1 ble de følgende primerne designet:

20 5' – CTCACGGTCACAGAGGACCTGAACAAGG – 3'
5' – CCCAAGCTTAGTCTGCTCTACCCCAGGCCTCGGC – 3'

Beta-VTCR-konstruksjon og C β 1-konstruksjon ble amplifisert separat ved å benytte standard PCR-teknologi. De ble forbundet med hverandre ved å benytte
25 sammenføyende-PCR. Plasmid-DNA ble rensset på en Qiagen-mini-prep-kolonne i overensstemmelse med forhandlers instruksjoner og sekvensen ble bekreftet med automatisert sekvensering ved sekvenseringsenheten til Department of Biochemistry, Oxford University. Sekvensen til A6+C β 1 er vist i figur 92.

Dermed ble A6+C β 1 koplet til A6-alfa-TCR med interkjededisulfidbinding etter
30 at cysteiner ble introdusert i C-domenet til begge kjeder.

Den løselige TCRen ble uttrykt og refoldet som beskrevet i eksempel 2.

Rensing av refoldet løselig TCR:

sTCR ble separert fra degraderingsprodukter og urenheter ved å sette den
35 dialyserte refoldingsløsningen på en POROS-50HQ-anionbytterkolonne og eluere bundet protein med en 0-500mM gradient av NaCl over 50 kolonnevolumer ved å benytte en Akta-renser (Pharmacia) som i figur 93. Toppfraksjoner ble lagret ved 4 °C og analysert med Coomassiefarget SDS-PAGE (figur 94) før de ble slått sammen og konsentrert. Til slutt ble sTCRene rensset og karakterisert ved å benytte en Superdex-200HR-

gelfiltreringskolonne (figur 95) som var balansert med HBS-EP-buffer (10mM HEPES pH 7,4, 150mM NaCl, 3,5mM EDTA, 0,05 % nonidet p40). Fraksjoner fra toppen som eluerte ved en relativ molekylvekt på omtrent 50 kDa ble slått sammen og konsentrert før karakterisering med BIAcore-overflate-plasmon-resonansanalyse.

5 En BIAcore-analyse av bindingen av den disulfidbundne A6-TCRen til pMHC ble utført som beskrevet i eksempel 3. Figur 96 viser BIAcore-analyse av den spesifikke bindingen av disulfidbundet A6-løselig-TCR til sin tilhørende pMHC.

Den løselige A6-TCR med en ny disulfidbinding og med den konstante C β 1-regionen inkorporert hadde en K_d på $2,42 \pm 0,55 \mu\text{M}$ for sin tilhørende pMHC. Denne
10 verdien er svært lik K_d-verdien på $1,8 \mu\text{M}$ som er bestemt for den løselige A6-TCRen med en ny disulfidbinding og som har den konstante C β 2-regionen inkorporert slik som det ble bestemt i eksempel 3.

Eksempel 13 – Fremstilling av løselig A6-TCR med en ny disulfidbinding og som har det
15 *”frie” cysteinet i β -kjeden inkorporert.*

De konstante β -kjederegionene til TCRer inkluderer en cysteinresidie (residie 75 i ekson 1 på TRBC1*01 og TRBC2*01) som ikke er involvert i verken interkjede- eller intrakjededisulfidbindingsdannelse. Alle de forutgående eksemplene beskriver frem-
20 stillingen av løselige TCRer med en ny disulfidbinding der dette ”frie” cysteinet har blitt mutert til alanin for å unngå mulig dannelse av ”upassende” disulfidbindinger som kan føre til redusert utbytte av funksjonell TCR. Foreliggende eksempel viser at løselige TCRer med dette ”frie” cysteinet inkorporert kan bli fremstilt.

25 *Design av primere og mutagenese av TCR- β -kjede:*

For å kunne mutere alaninet i TCR- β -kjeden (residie 75 i ekson 1 på TRBC1*01 og TRBC2*01) til cystein ble de følgende primerne designet (mutasjon er vist med små bokstaver):

30 5' – T GAC TCC AGA TAC tgT CTG AGC AGC CG
5' – CG GCT GCT CAG Aca GTA TCT GGA GTC A

PCR-mutagenese, uttrykking og refolding av den løselige TCRen ble foretatt som beskrevet i eksempel 2.

35

Rensing av refoldet løselig TCR:

sTCR ble separert fra degraderingsprodukter og urenheter ved å sette den dialyserte refoldingsløsningen på en POROS-50HQ-anionbytterkolonne og eluere bundet protein med en 0-500mM gradient av NaCl over 50 kolonnevolumer ved å benytte en

Akta-reanser (Pharmacia) som i figur 98. Toppfraksjoner ble lagret ved 4 °C og analysert med Coomassiefarget SDS-PAGE (figur 99) før de ble slått sammen og konsentrert. Til slutt ble sTCRen rensert og karakterisert ved å benytte en Superdex-200HR-gelfiltreringskolonne (figur 100) som var balansert med HBS-EP-buffer (10mM HEPES pH 7,4, 150mM NaCl, 3,5mM EDTA, 0,05 % nonidet p40). Toppen som eluerte ved en relativ molekylvekt på omtrent 50 kDa ble slått sammen og konsentrert før karakterisering med BIAcore-overflate-plasmon-resonansanalyse.

En BIAcore-analyse av bindingen av disulfidbundet A6-TCR til pMHC ble utført som beskrevet i eksempel 3. Figur 101 viser BIAcore-analyse av den spesifikke bindingen av disulfidbundet A6-løselig-TCR til sin tilhørende pMHC.

Den løselige A6-TCRen med en ny disulfidbinding og med det "frie" cysteinet i β -kjeden inkorporert hadde en K_d på $21,39 \pm 3,55 \mu\text{M}$ for sin tilhørende pMHC.

Eksempel 14 – Fremstilling av løselig A6-TCR med en ny disulfidbinding der "fritt" cystein i β -kjeden er mutert til serin.

Foreliggende eksempel viser at løselige TCRer med en ny disulfidbinding der det "frie" cysteinet i β -kjeden (residie 75 i ekson 1 på TRBC1*01 og TRBC2*01) er mutert til serin kan bli fremstilt med hell.

Design av primere og mutagenese av TCR- β -kjede:

For å kunne mutere alaninet i TCR- β -kjeden som tidligere hadde blitt substituert for det native cysteinet (residie 75 i ekson 1 fra TRBC1*01 og TRBC2*01) til serin ble de følgende primerne designet (mutasjon er vist med små bokstaver):

5' – T GAC TCC AGA TAC tCT CTG AGC AGC CG

5' – CG GCT GCT CAG AGa GTA TCT GGA GTC A

PCR-mutagenese (som resulterer i en mutert beta-kjede som vist i figur 102), uttrykking og refolding av løselig TCR ble utført som beskrevet i eksempel 2.

Rensing av refoldet løselig TCR:

sTCR ble separert fra degraderingsprodukter og urenheter ved å sette den dialyserte refoldingsløsningen på en POROS-50HQ-anionbytterkolonne og eluere bundet protein med en 0-500mM gradient av NaCl over 50 kolonnevolumer ved å benytte en Akta-reanser (Pharmacia) som vist i figur 103. Toppfraksjoner ble lagret ved 4 °C og analysert med Coomassiefarget SDS-PAGE (figur 104) før de ble slått sammen og konsentrert. Til slutt ble sTCRene rensert og karakterisert ved å benytte en Superdex-200HR-gelfiltreringskolonne (figur 105) som var balansert med HBS-EP-buffer (10mM

HEPES pH 7,4, 150mM NaCl, 3,5mM EDTA, 0,05 % nonidet p40). Toppen som eluerte ved en relativ molekylvekt på omtrent 50 kDa ble slått sammen og konsentrert før karakterisering med BIAcore-overflate-plasmon-resonansanalyse.

En BIAcore-analyse av bindingen av den disulfidbundne A6-TCRen til pMHC ble utført som beskrevet i eksempel 3. Figur 106 viser BIAcore-analyse av den spesifikke bindingen av disulfidbundet A6-løselig-TCR til sin tilhørende pMHC.

Den løselige A6-TCRen med en ny disulfidbinding der det "frie" cysteinet i β -kjeden var mutert til serin hadde en K_d på $2,98 \pm 0,27 \mu\text{M}$ for sin tilhørende pMHC. Denne verdien er svært lik K_d -verdien på $1,8 \mu\text{M}$ som ble bestemt for den løselige A6-TCRen med en ny disulfidbinding der det "frie" cysteinet i β -kjeden var mutert til alanin slik det ble bestemt i eksempel 3.

Eksempel 15 – Kloning av NY-ESO-TCR- α - og β -kjeder som inneholder en ny disulfidbinding inn i gjærekspresjonsvektorer.

15

NY-ESO-TCR- α og - β -kjeder ble fusjonert med C-terminalen på pre-pro-paringsfaktor-alfa-sekvensen fra *Saccharomyces cerevisiae* og henholdsvis klonet inn i gjærekspresjonsvektorene pYX122 og pYX112 (se figur 107 og 108).

De følgende primerne ble designet for å PCR-amplifisere pre-pro-paringsfaktor-alfa-sekvensen fra *S.cerevisiae*-SEY6210 (Robinson et al., (1991), Mol. Cell Biol. 11(12):5813-24) for fusjonering med TCR- α -kjeden.

5' – TCT GAA TTC ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT AC – 3'

5' – TCA CCT CCT GGG CTT CAG CCT CTC TTT TAT C – 3'

25

De følgende primerne ble designet for å PCR-amplifisere pre-pro-paringsfaktor-alfa-sekvensen fra *S.cerevisiae*-SEY6210 for fusjonering med TCR- β -kjeden.

5' – TCT GAA TTC ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT AC – 3'

30 5' – GTG TCT CGA GTT AGT CTG CTC TAC CCC AGG C – 3'

Gjær-DNA ble tilveiebrakt ved å resuspendere en koloni av *S.cerevisiae*-SEY6210 i 30 μl med 0,25 % SDS i vann og varme opp til 90 °C i 3 minutter. Pre-pro-paringsfaktor-alfa-sekvensene til fusjonering med TCR- α - og TCR- β -kjedene ble tilveiebrakt ved å PCR-amplifisere 0,25 μl gjær-DNA med de respektive primerparene som er beskrevet ovenfor og ved å benytte følgende PCR-betingelser. 12,5pmol av hver primer ble blandet med 200 μM dNTP, 5 μl 10x Pfu-buffer og 1,25 enheter med Pfu-polymerase (Stratagene) i et sluttvolum på 50 μl . Etter et første denatureringstrinn på 30 sekunder ved 92 °C ble reaksjonsblandingen utsatt for 30 runder med denaturering (92 °C,

30 sek.), sammensmelting (46,9 °C, 60 sek.) og elongering (72 °C, 2 min.) i en Hybaid-PCR-express-PCR-maskin.

De følgende primerne ble designet for å PCR-amplifisere TCR- α -kjeden som skulle bli fusjonert med pre-pro-paringsfaktor-alfa-sekvensen nevnt ovenfor.

5

5' – GGC TGA AGC CCA GGA GGT GAC ACA GAT TCC – 3'

5' – CTC CTC TCG AGT TAG GAA CTT TCT GGG CTG GG – 3'

De følgende primerne ble designet for å PCR-amplifisere TCR- β -kjeden som
10 skulle bli fusjonert med pre-pro-paringsfaktor-alfa-sekvensen nevnt ovenfor.

5' – GGC TGA AGC CGG CGT CAC TCA GAC CCC AAA AT – 3'

5' – GTG TCT CGA GTT AGT CTG CTC TAC CCC AGG C – 3'

15 PCR-betingelsene for amplifisering av TCR- α - og TCR- β -kjedene var de samme som nevnt ovenfor med unntak av følgende forandringer: DNA-templatet som ble benyttet for å amplifisere TCR- α - og TCR- β -kjedene var henholdsvis NY-ESO-TCR- α - og - β -kjedene (som fremstilt i eksempel 5), og sammensmeltingstemperaturen som ble benyttet var 60,1 °C.

20 PCR-produktene ble deretter benyttet i en PCR-sammenføyingsreaksjon ved å utnytte de komplementære overlappende sekvensene som var blitt introdusert i de første PCR-produktene for å danne full-lengde kimert gen. De resulterende PCR-produktene ble fordøyd med restriksjonsenzymene EcoRI og XhoI og klonet inn i enten pYX122 eller pYX112 som var fordøyd med de samme enzymene. De resulterende plasmidene ble
25 rensset på en Qiagen-mini-prep-kolonne i henhold til forhandlerens instruksjoner og sekvensene ble bekreftet med automatisert sekvensering ved sekvenseringsenheten til Genetics Ltd, Queensway, New Milton, Hampshire, UK. Figur 109 og 110 viser DNA- og proteinsekvensene til de klonede kimere produktene.

30 *Eksempel 16 – Uttrykking av løselig NY-ESO-TCR, som inneholder en ny disulfidbinding, i gjær.*

Gjærekspresjonsplasmidene, henholdsvis inneholdende TCR- α - og TCR- β -kjedene, fremstilt som beskrevet i eksempel 15 ble ko-transformert inn i *S.cerevisiae*-
35 SEY6210 ved å benytte protokollen beskrevet av Agatep et al., (1998) (Tekniske tips på internett (<http://tto.trends.com>) 1:51:P01525). En enkelt koloni som vokste på syntetisk-dropout (SD) agar inneholdende histidin og uracil (Qbiogene, Illkirch, Frankrike) ble dyrket over natt ved 30 °C i 10ml SD-medium inneholdende histidin og uracil. Over-natt-kulturen ble sub-dyrket 1:10 i 10ml friskt SD-medium inneholdende histidin og uracil og

dyrket i 4 timer ved 30 °C. Kulturen ble sentrifugert i 5 minutter ved 3800rpm i en Heraeus-Megafuge-2.0R (Kendro Laboratory Products Ltd., Bishop's Stortford, Hertfordshire, UK) og supernatanten ble høstet. 5µl StratClean-Resin (Stratagene) ble blandet med supernatanten og holdt roterende i et blodhjul ved 4 °C over natt.

- 5 StrataClean-resinet ble spunnet ned ved 3800rpm i en Heraeus-Megafuge-2.0R og mediumet ble fjernet. 25µl reduserende prøvebuffer (950µl Laemmli-prøvebuffer (Biorad) inneholdende 50µl 2M DTT) ble tilsatt til resinet og prøvene ble varmet opp til 95 °C i 5 minutter og deretter avkjølt på is før 20µl av blandingen ble satt på en SDS-PAGE-gel ved 0,8mA konstant/cm² av geloverflate i 1 time. Proteinene i gelen ble overført til
- 10 Immuno-Blot-PVDF-membraner (Bio-Rad) og probet med TCR-anti-α-kjede-antistoff som beskrevet i Eksempel 17 nedenfor med unntak av følgende forandringer. Det primære antistoffet (TCR-anti-α-kjede) og de sekundære antistoffene ble henholdsvis benyttet i 1/200 og 1/1000 fortynninger. Figur 111 viser et bilde av den utviklede membranen. Resultatene viser at det er et lavt nivå av TCR-utskilling fra gjær og ut i mediumet.

15

Eksempel 17 – Disulfid-A6-Tax-TCR-α- og -β-kjedeuttrykking i Baculovirus.

Kloningsstrategi:

- A- og β-kjedene til disulfid-A6-Tax-TCR ble klonet fra pGMT7 inn i en
- 20 pBlueScript-KS2-basert vektor kalt pEX172. Denne vektoren ble designet for å klonе ulike MHC-klasse-II-β-kjeder, til insektcelleuttrykking, ved å benytte ledersekvensen fra DRB1*0101, et AgeI-sete for innsetting av ulike peptidkodende sekvenser, en linker-region og MluI- og SalI-seter for å kunne klonе DRβ-kjedene inn foran Jun-Leucinzipper-sekvensen. Sekvensen der pEX172 er forskjellig fra pBlueScript-II-KS, lokalisert mellom
- 25 KpnI- og EcoRI-setene i BlueScript-II-KS, er vist i figur 112. For å kunne klonе TCR-kjeder i insektceller ble denne pEX172 kuttet med AgeI og SalI for å fjerne linker-regionen og MluI-setet, og TCR-kjedene kan bli satt inn der peptidsekvensen ville startet. TCR-sekvensene ble klonet fra pGMT7 med et BspEI-sete på den 5'-enden (dette medfører AgeI-kompatible overheng) og et SalI-sete på den 3'-enden. For å kunne
- 30 tilveiebringe kløyvingssetet for fjerningen av DRβ-leadersekvensen ble de første tre residene på DRβ-kjeden (GDT) beholdt. For å unngå at Jun-Leucinzipper-sekvensen blir transkribert var det nødvendig å sette inn et stoppkodon foran SalI-setet. En skjematisk oversikt over dette er vist i figur 113. Når TCR-kjedene kom på plass i dette plasmidet ble BamHI-fragmentet kuttet ut og subklonet inn i pAcAB3-vektoren som har homologire-
- 35 kombinasjonsseter for Baculovirus. pAcAB3-vektoren har to divergente promotorer, én med et BamHI-sete og én med et BglII-kloningssete. Det foreligger et BglII-sete i A6-TCR-β-kjeden slik at A6-TCR-α-kjeden ble satt inn i BglII-setet, og β-kjeden ble deretter subklonet inn i BamHI-setet.

I overensstemmelse med kloningsstrategien ovenfor ble de følgende primerne designet (homologi med vektorene er vist med store bokstaver):

A6 α : F: 5' – gtagtccggagacaccggaCAGAAGGAAGTGGAGCAGAAC

5 R: 5' – gtaggtcgacTAGGAACTTTCTGGGCTGGG

A6 β : F: 5' – gtagtccggagacaccggaAACGCTGGTGTCACTCAGA

R: 5' – gtaggtcgacTAGTCTGCTCTACCCCAGG

PCR, kloning og subkloning:

10 Ekspresjonsplasmider inneholdende genene for A6-Tax-TCR- α - eller - β -kjeden ble benyttet som templat i de følgende PCR-reaksjonene. 100ng α -plasmid ble blandet med 1 μ l 10mM dNTP, 5 μ l 10x Pfu-buffer (Stratagene), 1,25 enheter Pfu-polymerase (Stratagene), 50pmol av A6 α -primerne ovenfor og sluttvolumet ble justert til 50 μ l med H₂O. En liknende reaksjonsblanding ble laget for β -kjeden der β -plasmidet og paret med
15 β -primere ble benyttet. Reaksjonsblandingen ble utsatt for 35 runder med denaturering (95 °C, 60 sek.), sammensmelting (50 °C, 60 sek.) og elongering (72 °C, 8 min.) i en Hybaid-PCR-express-PCR-maskin. Produktet ble deretter fordøyd i 2 timer ved 37 °C med 10 enheter BspEI-restriksjonsenzym og deretter for ytterligere 2 timer med 10 enheter Sall (New England Biolabs). De fordøyde reaksjonene ble ligert inn i pEX172
20 som hadde blitt fordøyd med AgeI og Sall, og disse ble transformert inn i kompetente XL1-Blue-bakterier og dyrket i 18 timer ved 37 °C. En enkelt koloni ble plukket fra hver av α - og β - og dyrket over natt i 5ml TYP+ampicillin (16g/l Bacto-Tryptone, 16g/l Gjærekstrakt, 5g/l NaCl, 2,5g/l K₂HPO₄, 100mg/l Ampicillin). Plasmid-DNA ble rensset på en QIAgen-mini-prep-kolonne i henhold til forhandlers instruksjoner og sekvensen ble
25 bekreftet med automatisert sekvensering på sekvensenheten til Genetix. Aminosyre-sekvensene til BamHI-innskuddene er vist i figur 114 og 115 for henholdsvis α -kjeden og β -kjeden.

Disse α - og β -kjede-disulfid-A6-Tax-TCR-kjede-konstruksjonene i pEX172 ble fordøyd ut i 2 timer ved 37 °C med BamHI-restriksjonsenzym (New England Biolabs). A-
30 kjede-BamHI-innskuddet ble ligert inn i pAcAB3-vektor (Pharmingen-BD Biosciences: 21216P) som hadde blitt fordøyd med BglII-enzym. Dette ble transformert inn i kompetente XL1-Blue-bakterier og dyrket i 18 timer ved 37 °C. En enkelt koloni ble plukket fra denne platen og dyrket over natt i 5ml TYP+ampicillin og plasmid-DNA ble rensset som tidligere. Dette plasmidet ble deretter fordøyd med BamHI og β -kjede-BamHI-
35 innskuddet ble ligert inn, transformert inn i kompetente XL1-Blue-bakterier, dyrket over natt, plukket til TYP-ampicillin og dyrket før det ble minipreppet som tidligere ved å benytte en QIAgen-mini-prep-kolonne. Den korrekte orienteringen av både α - og β -kjedene ble bekreftet med sekvensering der følgende primere ble benyttet:

pAcAB3 α forover: 5' – gaaattatgcatttgaggatg

pAcAB3 β forover: 5' – attaggcctctagagatccg

Transfeksjon, infeksjon, uttrykking og analyse av A6-TCR i insektceller:

5 Ekspresjonsplasmidet inneholdende α - og β -kjeden ble transfektert inn i sf9-celler (Pharmingen-BD Biosciences: 21300C), dyrket i serumfritt medium (Pharmingen-BD Biosciences: 551411), ved å benytte Baculogold-transfeksjonssettet (Pharmingen-BD Biosciences: 21100K) etter forhandlerens instruksjoner. Etter 5 dager ved 27 °C ble 200 μ l av mediumet disse transfekterte cellene hadde blitt dyrket i tilsatt til 100ml High-Five-celler ved 1×10^6 celler/ml i serumfritt medium. Etter ytterligere 6 dager ved 27 °C ble 1ml
10 av dette mediumet fjernet og sentrifugert ved 13 000rpm i en Heraeus-microfuge i 5 minutter for å få dannet en pellet av celleavfall.

10 μ l av denne insekt-A6-disulfidbundne-TCR-supernatanten ble kjørt side om side med positive kontroller med 5 μ g og 10 μ g bakteriell A6-disulfidbundet-TCR på en ferdig støpt 4-20 % Tris/glysin-gel (Invitrogene: EC60252). Reduserte prøver ble laget ved å tilsette 10 μ l reducerende prøvebuffer (950 μ l Laemmli-prøvebuffer (Bio-Rad: 161-0737) 50 μ l 2M DTT) og varme opp til 95 °C i 5 minutter, avkjøle ved romtemperatur i 10 minutter og deretter sette på 20 μ l. Ikke-reduerte prøver ble laget ved å tilsette 10 μ l Laemmli-prøvebuffer og sette på 20 μ l.

20 Gelen ble kjørt ved 150 volt i 1 time i en Novex-Xcell-geltank og deretter ble gelen farget i 50ml Coomassiefargeløsning i 1 time under forsiktig risting (1,1g Coomassiepulver i 500ml metanol, rør i 1 time, tilsett 100ml eddiksyre, lag opp til 1 liter med H₂O og rør i 1 time før det filtreres gjennom et 0,45 μ m filter). Gelen ble avfarget tre ganger 30 minutter med forsiktig risting i 50ml avfargingsløsning (som
25 Coomassiefargeløsning uten Coomassiepulver).

Western-Blot ble utført ved å kjøre SDS-PAGE-geler som før men proteinene ble overført på Immuno-Blot-PVDF-membraner (Bio-Rad: 162-0174) istedenfor å farge gelene med Coomassie. Seks filterpapir ble klippet til gelens størrelse og dynket i overføringsbuffer (2,39g glysin, 5,81g Tris-Base, 0,77g DTT løst i 500ml H₂O, 200ml
30 metanol tilsatt og fylt opp med H₂O til 1000ml). PVDF-membranen ble gjort klar ved å bløtgjøre den i metanol i 1 minutt og deretter i overføringsbuffer i 2 minutter. Tre filterpapir ble plassert på anodeoverflaten til Immuno-blot-apparatet (Pharmacia – Novablot) deretter ble membranen plassert på toppen fulgt av gelen og deretter tre ekstra filterpapir på katodesiden. Immuno-blot ble kjørt i 1 time ved 0,8mA konstant/cm² på
35 geloverflate.

Etter blottingen ble membranen blokkert i 7,5ml blokkeringsbuffer (4 Trisbuffrede salttabletter (Sigma: T5030), 3g fettfri tørrmelk (Sigma: M7409), 30 μ l Tween-20 fylt opp til 30ml med H₂O) i 60 minutter med forsiktig risting. Membranen ble vasket tre ganger i 5 minutter med TBS-vaskebuffer (20 TBS-tabletter, 150 μ l Tween-20

fyllt opp til 300ml med H₂O). Membranen ble deretter inkubert i primært antistoff 1/50 fortynning av anti-TCR- α -kjede klon 3A8 (Serotec: MCA987) eller anti-TCR- β -kjede klon 8A3 (Serotec: MCA988) i 7,5ml blokkeringsbuffer i 1 time med forsiktig risting. Membranen ble vasket som før i TBS-vaskebuffer. Deretter ble en sekundær antistoff-
5 inkubering med HRP-merket geit-anti-mus-antistoff (Santa Cruz Biotech: Sc-2005) med 1/1000 fortynning i 7,5ml blokkeringsbuffer utført i 30 minutter med forsiktig risting. Membranen ble vasket som før og deretter vasket i 30ml H₂O med 2 TBS-tabletter.

Antistoffbindingen ble påvist med Opti-4CN-kolometrisk påvisning (Biorad: 170-8235) /1,4ml Opt-4CN-fortynningsmiddel, 12,6ml H₂O, 0,28ml Opti-4CN-substrat).
10 Membranene ble farget i 30 minutter og deretter vasket i H₂O i 15 minutter. Membranene ble tørket ved romtemperatur og bilder ble lagt ved siden av et bilde av den coomassie-fargede gelen (Figur 116).

Resultater:

15 På figur 116 kan de sees at begge disulfid-TCRene er dannet som en heterodimer som er stabil i SDS-gelen. Begge brytes opp i α - og β -kjeder ved reduksjon. Insekt-disulfid-TCR-heterodimeren har en litt høyere molekylvekt enn den bakterielt fremstilte utgaven, antagelig på grunn av glykosyleringen i insektcellene. I dette tilfellet kan det observeres at insektcellene fremstiller α -kjede i overskudd og frie α -kjeder kan sees i det
20 ikke-reduserte sporet på anti- α -western-blottet.

Disse dataene viser klart at baculovirusekspresjonssystemet beskrevet ovenfor tilveiebringer et levedyktig alternativ til prokaryot uttrykking av løselige TCRer som inneholder nye disulfidbindinger.

P a t e n t k r a v

1. Løselig $\alpha\beta$ -form-T-cellereseptor (sTCR),
k a r a k t e r i s e r t v e d a t
 - 5 (a) en kovalent disulfidbinding forbinder et residue på immunoglobulinregionen på det konstante domenet til α -kjeden med et residue på immunoglobulinregionen på det konstante domenet til β -kjeden, der en interkjededisulfidbinding i nativ TCR ikke er til stede, eller
 - (b) en kovalent disulfidbinding forbinder cysteinresiduer som er substituert for:
 - 10 Thr 48 i ekson 1 på TRAC*01 og Ser 57 i ekson 1 på TRBC1*01 eller TRBC2*01,
 - Thr 45 i ekson 1 på TRAC*01 og Ser 77 i ekson 1 på TRBC1*01 eller TRBC2*01,
 - 15 Tyr 10 i ekson 1 på TRAC*01 og Ser 17 i ekson 1 på TRBC1*01 eller TRBC2*01,
 - Thr 45 i ekson 1 på TRAC*01 og Asp 59 i ekson 1 på TRBC1*01 eller TRBC2*01,
 - Ser 15 i ekson 1 på TRAC*01 og Glu 15 i ekson 1 på TRBC1*01 eller
 - 20 TRBC2*01.
2. sTCR ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d a t den omfatter (i) hele eller deler av en TCR- α -kjede, unntatt transmembrandomenet derav, og (ii) hele eller deler av en TCR- β -kjede, unntatt
 - 25 transmembrandomenet derav, der (i) og (ii) hver omfatter et funksjonelt variabelt domene og i det minste en del av det konstante domenet til TCR-kjeden.
3. sTCR ifølge krav 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d a t én av eller begge (i) og (ii) omfatter hele det ekstracellulære
 - 30 konstante Ig-domenet til TCR-kjeden.
4. sTCR ifølge krav 2 eller 3,
k a r a k t e r i s e r t v e d a t én av eller begge (i) og (ii) omfatter hele det ekstracellulære domenet til TCR-kjeden.
- 35 5. sTCR ifølge ethvert av kravene 1a og 2, 3 og 4 når avhengig av krav 1a,
k a r a k t e r i s e r t v e d a t disulfidbindingen som ikke er til stede i nativ TCR foreligger mellom cysteinresiduer som er substituert inn for residuer hvis β -karbonatomer ligger mindre enn 0,6 nm fra hverandre i den native TCR-strukturen.

6. sTCR ifølge krav 5,
karakterisert ved at disulfidbindingen som ikke er til stede i nativ TCR foreligger mellom cysteinresiduer som er substituert inn for Thr 48 i ekson 1 på TRAC*01 og Ser 57 i ekson 1 på TRBC1*01 eller TRBC2*01.
- 5 7. sTCR ifølge krav 5,
karakterisert ved at disulfidbindingen som ikke er til stede i nativ TCR foreligger mellom cysteinresiduer som er substituert inn for Thr 45 i ekson 1 på TRAC*01 og Ser 77 i ekson 1 på TRBC1*01 eller TRBC2*01.
- 10 8. sTCR ifølge krav 5,
karakterisert ved at disulfidbindingen som ikke er til stede i nativ TCR foreligger mellom cysteinresiduer som er substituert inn for Tyr 10 i ekson 1 på TRAC*01 og Ser 17 i ekson 1 på TRBC1*01 eller TRBC2*01.
- 15 9. sTCR ifølge krav 5,
karakterisert ved at disulfidbindingen som ikke er til stede i nativ TCR foreligger mellom cysteinresiduer som er substituert inn for Thr 45 i ekson 1 på TRAC*01 og Asp 59 i ekson 1 på TRBC1*01 eller TRBC2*01.
- 20 10. sTCR ifølge krav 5,
karakterisert ved at disulfidbindingen som ikke er til stede i nativ TCR foreligger mellom cysteinresiduer som er substituert inn for Ser 15 i ekson 1 på TRAC*01 og Glu 15 i ekson 1 på TRBC1*01 eller TRBC2*01.
- 25 11. sTCR ifølge ett av kravene 1b og 2, 3 og 4 når avhengig av krav 1b,
karakterisert ved at en interkjededisulfidbinding i nativ TCR ikke er til stede.
12. sTCR ifølge ethvert av de foregående krav,
30 karakterisert ved at native α - og β -TCR-kjeder er trunkerte på C-terminal ende slik at cysteinresiduene som danner den native interkjededisulfidbindingen er fjernet.
13. sTCR ifølge ethvert av kravene 1-11,
karakterisert ved at cysteinresiduer som danner den native interkjededisulfid-
35 bindingen substitueres med en annen residue.
14. sTCR ifølge krav 13,
karakterisert ved at cysteinresiduer som danner den native interkjededisulfid-
bindingen substitueres med serin eller alanin.

15. sTCR ifølge ethvert av de foregående krav,
karakterisert ved at et uparet cysteinresidue som er til stede i nativ TCR- β -kjede ikke er til stede.
- 5 16. sTCR ifølge ethvert av kravene 2-15,
karakterisert ved at (i) og (ii) hver omfatter det funksjonelle variable domenet fra en første TCR fusjonert med hele eller deler av det konstante domenet fra en annen TCR, der den første og den andre TCRen stammer fra den samme arten.
- 10 17. sTCR ifølge krav 16,
karakterisert ved at de konstante domenenene til den andre TCRen er trunkerte på N-terminal side av residuene som danner den ikke-native interkjededisulfidbindingen.
18. sTCR ifølge ethvert av de foregående krav,
15 karakterisert ved at én av eller begge kjedene er derivatisert med, eller fusjonert med, en enhet på sin C-terminale eller N-terminale ende.
19. sTCR ifølge ethvert av de foregående krav,
karakterisert ved at én av eller begge kjedene har et cysteinresidue på sin C-
20 terminale eller N-terminale ende på hvilken en enhet kan bli fusjonert.
20. sTCR ifølge ethvert av de foregående krav,
karakterisert ved at den ytterligere omfatter et merke som kan bli påvist.
- 25 21. sTCR ifølge ethvert av de foregående krav,
karakterisert ved at den er assosiert med et terapeutisk middel.
22. Multivalent T-cellereseptor (TCR)-kompleks,
karakterisert ved at det omfatter et flertall av sTCRer ifølge ethvert av de
30 foregående krav.
23. Kompleks ifølge krav 22,
karakterisert ved at det omfatter en sTCR-multimer.
- 35 24. Kompleks ifølge krav 23,
karakterisert ved at det omfatter to eller tre eller fire eller flere T-cellereseptormolekyler som er assosiert med hverandre, helst via et forbindelsesmolekyl.

25. Kompleks ifølge kravene 20, 21 eller 22,
karakterisert ved at sTCRene eller sTCR-multimerene foreligger i et lipidbilag
eller er forbundet med en partikkel.
- 5 26. Nukleinsyremolekyl,
karakterisert ved at det omfatter en sekvens som koder for (i) eller (ii) fra en
sTCR ifølge ethvert av kravene 2-21, eller en sekvens som er komplementær dertil.
- 10 27. Vektor,
karakterisert ved at den omfatter et nukleinsyremolekyl ifølge krav 26.
28. Vertscelle,
karakterisert ved at den omfatter en vektor ifølge krav 27.
- 15 29. Fremgangsmåte for å fremskaffe (i) eller (ii) som definert i ethvert av kravene 2-
21,
karakterisert ved at den omfatter å inkubere en vertscelle ifølge krav 28 ved
betingelser som fører til uttrykking av peptidet og deretter rensing av polypeptidet.
- 20 30. Fremgangsmåte ifølge krav 29,
karakterisert ved at den ytterligere omfatter å blande (i) og (ii) ved passende
refoldingsbetingelser.
- 25 31. Fremgangsmåte for å fremskaffe en løselig $\alpha\beta$ -form-T-cellereseptor (sTCR),
karakterisert ved at den omfatter å:
 inkubere en vertscelle som omfatter en vektor som omfatter et nukleinsyre-
molekyl som koder for en TCR- α -kjede og en vertscelle som omfatter en vektor som
omfatter et nukleinsyremolekyl som koder for en TCR- β -kjede ved betingelser som fører
til uttrykking av de respektive TCR-kjedene,
30 rens de respektive TCR-kjedene, og
 blande de respektive TCR-kjedene ved refoldingsbetingelser slik at en kovalent
disulfidbinding forbinder et residu på immunoglobulinregionen på det konstante
domenet på α -kjeden med en residu på immunoglobulinregionen på det konstante
domenet på β -kjeden, der disulfidbindingen er en binding som ikke er tilstede i nativ
35 TCR.
32. Fremgangsmåte ifølge krav 31,
karakterisert ved at nukleinsyren som koder for en TCR- α -kjede koder for (i)
hele eller deler av en TCR- α -kjede, unntatt transmembrandomenet derav, og TCR-

nukleinsyren som koder for en TCR- β -kjede koder for (ii) hele eller deler av en TCR- β -kjede, unntatt transmembrandomenet derav, og hvori (i) og (ii) hver omfatter et funksjonelt variabelt domene og i det minste en del av det konstante domenet av TCR-kjeden.

5

33. Fremgangsmåte ifølge krav 32,
karakterisert ved at én av eller begge (i) og (ii) omfatter hele det ekstracellulære konstante Ig-domenet til TCR-kjeden.

10

34. Fremgangsmåte ifølge krav 32 eller 33,
karakterisert ved at én av eller begge (i) og (ii) omfatter hele det ekstracellulære domenet til TCR-kjeden.

15

35. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 31-34,
karakterisert ved at en interkjededisulfidbinding i native TCR ikke er til stede.

20

36. Fremgangsmåte ifølge krav 35,
karakterisert ved at native α - og β -TCR-kjeder er trunkerte på C-terminal ende slik at cysteinresiduene som danner den native interkjededisulfidbindingen er fjernet.

25

37. Fremgangsmåte ifølge krav 35,
karakterisert ved at cysteinresiduer som danner den native interkjededisulfidbindingen er substituert med et annet residue.

30

38. Fremgangsmåte ifølge krav 37,
karakterisert ved at cysteinresiduer som danner den native interkjededisulfidbindingen er substituert med serin eller alanin.

39. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 31-38,

karakterisert ved at et uparet cysteinresidue som er til stede i native TCR- β -kjede ikke er til stede.

35

40. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 31-39,
karakterisert ved at disulfidbindingen som ikke er til stede i nativ TCR foreligger mellom cysteinresiduer som er substituert inn for residuer hvis β -karbonatomer ligger mindre enn 0,6 nm fra hverandre i den native TCR-strukturen.

41. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 31-40,
karakterisert ved at disulfidbindingen som ikke er til stede i nativ TCR foreligger mellom cysteinresiduer som er substituert inn for Thr 48 i ekson 1 på TRAC*01 og Ser 57 i ekson 1 på TRBC1*01 eller TRBC2*01.
- 5 42. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 31-40,
karakterisert ved at disulfidbindingen som ikke er til stede i native TCR foreligger mellom cysteinresiduer som er substituert inn for Thr 45 i ekson 1 på TRAC*01 og Ser 77 i ekson 1 på TRBC1*01 eller TRBC2*01.
- 10 43. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 31-40,
karakterisert ved at disulfidbindingen som ikke er til stede i native TCR foreligger mellom cysteinresiduer som er substituert inn for Tyr 10 i ekson 1 på TRAC*01 og Ser 17 i ekson 1 på TRBC1*01 eller TRBC2*01.
- 15 44. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 31-40,
karakterisert ved at disulfidbindingen som ikke er til stede i native TCR foreligger mellom cysteinresiduer som er substituert inn for Thr 45 i ekson 1 på TRAC*01 og Asp 59 i ekson 1 på TRBC1*01 eller TRBC2*01.
- 20 45. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 31-40,
karakterisert ved at disulfidbindingen som ikke er til stede i native TCR foreligger mellom cysteinresiduer som er substituert inn for Ser 15 i ekson 1 på TRAC*01 og Glu 15 i ekson 1 på TRBC1*01 eller TRBC2*01.
- 25 46. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 31-45,
karakterisert ved at (i) og (ii) hver omfatter det funksjonelle variable domenet til en første TCR fusjonert med hele eller deler av det konstante domenet til en annen TCR, der den første og den andre TCRen stammer fra den samme arten.
- 30 47. Fremgangsmåte ifølge krav 46,
karakterisert ved at de konstante domenene til den andre TCRen er trunkerte på N-terminal side av residuene som danner den ikke-native interkjededisulfidbindingen.
- 35 48. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 32-47,
karakterisert ved at én av eller begge kjedene er derivatisert med, eller fusjonert med, en enhet på sin C-terminale eller N-terminale ende.

49. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 32-48,
karakterisert ved at én av eller begge kjedene har en cysteinresidue på sin
C-terminale og/eller N-terminale ende til hvilken en enhet kan bli fusjonert.
- 5 50. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 32-49,
karakterisert ved at sTCRen ytterligere omfatter et merke som kan bli påvist.
51. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 32-50,
karakterisert ved at sTCRen er assosiert med et terapeutisk middel.
- 10 52. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 32-51,
karakterisert ved at den ytterligere omfatter å kombinere et flertall av sTCRer
for å danne et multivalent T-cellereseptor (TCR)-kompleks.
- 15 53. Fremgangsmåte ifølge krav 52,
karakterisert ved at sTCRene kombineres for å danne en sTCR-multimer.
54. Fremgangsmåte ifølge krav 53,
karakterisert ved at to eller tre eller fire eller flere T-cellereseptorer assosieres
20 med hverandre, helst via et forbindelsesmolekyl.
55. Fremgangsmåte ifølge kravene 52, 53 eller 54,
karakterisert ved at sTCRene eller sTCR-multimerene er kombinert i et
lipidbilag eller er forbundet med en partikkel.
- 25 56. Fremgangsmåte for å påvise MHC-peptidkomplekser,
karakterisert ved at den omfatter å:
- (i) tilveiebringe en løselig TCR ifølge ethvert av kravene 1-21, en løselig TCR
fremstilt ved fremgangsmåten ifølge ethvert av kravene 31-51, et multivalent T-celle-
30 reseptorkompleks ifølge ethvert av kravene 22-25 eller et multivalent T-cellereseptor-
kompleks fremstilt ved fremgangsmåten ifølge ethvert av kravene 52-55,
 - (ii) bringe den løselige TCRen eller det multivalente TCR-komplekset i kontakt
med MHC-peptidkompleksene, og
 - (iii) påvise binding av den løselige TCRen eller det multivalente TCR-komplekset
35 til MHC-peptidkompleksene.
57. Farmasøytisk formulering,
karakterisert ved at den omfatter
en sTCR (a) ifølge ethvert av kravene 1-21, eller (b) fremstilt ved frem-

gangsmåten ifølge ethvert av kravene 31-51, og/eller
et multivalent TCR-kompleks (a) ifølge ethvert av kravene 22-25, eller
(b) fremstilt ved fremgangsmåten ifølge ethvert av kravene 52-55,
sammen med en farmasøytisk akseptabel bærer.

SEQUENCE LISTING

<110> Avidex Ltd
 Jakobsen, Bent Karsten
 Glick, Meir

<120> Substances

<130> P325660WO/NJL

<140> PCT/GB02/03986

<141> 2002-08-30

<150> GB 0121187.9

<151> 2001-08-31

<150> GB0219146.8

<151> 2002-08-16

<150> US60/404182

<151> 2002-08-16

<160> 183

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Asp	Ser	Asp	Val	Tyr	Ile	Thr	Asp	Lys	Thr	Val	Leu	Asp	Met	Arg	Ser
1				5					10					15	

Met	Asp	Phe	Lys
			20

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Gln	Ser	Lys	Asp	Ser	Asp	Val	Tyr	Ile	Thr	Asp	Lys	Thr	Val	Leu	Asp
1				5					10					15	

Met	Arg	Ser	Met
			20

<210> 3

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Asp Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys
1 5 10 15

Ser Ser Asp Lys
20

<210> 4
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser
1 5 10 15

Val Cys Leu Phe
20

<210> 5
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu
1 5 10 15

Lys Glu Gln Pro
20

<210> 6
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Ala Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser
1 5 10 15

Ala Thr Phe Trp
20

<210> 7
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His
 1 5 10 15

Thr Gln Lys Ala
 20

<210> 8
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8

Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Leu
 20

<210> 9
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9

Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile
 1 5 10 15

Ser His Thr Gln
 20

<210> 10
 <211> 91
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 10

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

Arg Ser Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln
 20 25 30

Ile Asn Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys
 35 40 45

Thr Val Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile
 50 55 60

Ala Trp Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu
65 70 75 80

Thr Asn Ala Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro
85 90

<210> 11
<211> 126
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 11

Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ser Leu Phe Glu Pro
1 5 10 15

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

Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn
35 40 45

Gly Arg Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Ala Tyr Lys
50 55 60

Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala
65 70 75 80

Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe
85 90 95

His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly Ser Pro Lys Pro
100 105 110

Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp
115 120 125

<210> 12
<211> 20
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 12

Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Lys Ala
1 5 10 15

Met Asp Ser Lys
20

<210> 13
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 13

Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp
 1 5 10 15

Met Lys Ala Met
 20

<210> 14
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 14

Tyr Ile Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp Pro Arg
 1 5 10 15

Ser Gln Asp Ser
 20

<210> 15
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 15

Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp Pro Arg Ser Gln Asp Ser Thr Leu Cys
 1 5 10 15

Leu Phe Thr Asp
 20

<210> 16
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 16

Asn Gly Arg Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Ala Tyr
 1 5 10 15

Lys Glu Ser Asn
 20

Ala Asn Lys Gln
20

<210> 21
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 21
 cacagacaaa tgtgtgctag acat

24

<210> 22
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 22
 atgtctagca cacatttgtc tgtg

24

<210> 23
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 23
 cagtgggggc tgcacagacc c

21

<210> 24
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 24
 gggctctgtgc agacccact g

21

<210> 25
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 25
 atatccagaa cccggatcct gccgtgta

28

<210> 26

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

<220>
<223> Primer

<400> 26
tacacggcag gaatccgggt tctggatat 29

<210> 27
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 27
ggagatatatac atatgcaact actagaacaa 30

<210> 28
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 28
tacacggcag gatccgggtt ctggatatt 29

<210> 29
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 29
ggagatatatac atatggtgga tgggtggaatc 30

<210> 30
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 30
cccaagctta gtctgctcta cccaggcct cggc 34

<210> 31
<211> 30

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primer

 <400> 31
 ggagatatatac atatgcagga ggtgacacag 30

 <210> 32
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primer

 <400> 32
 tacacggcag gatccgggtt ctggatatt 29

 <210> 33
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primer

 <400> 33
 ggagatatatac atatgggtgt cactcagacc 30

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

 <220>
 <223> Primer

 <400> 34
 cccaagctta gtctgctcta ccccaggcct cggc 34

 <210> 35
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primer

 <400> 35
 ggagatatatac atatgcagga ggtgacacag 30

 <210> 36
 <211> 37
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 36

cccaagctta acaggaactt tctgggctgg ggaagaa

37

<210> 37

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 37

ggagatatac atatgggtgt cactcagacc

30

<210> 38

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 38

cccaagctta acagtctgct ctaccccagg cctcggc

37

<210> 39

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 39

gggaagctta catatgaagg aggtggagca gaattctgg

39

<210> 40

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 40

tacacggcag gatccgggtt ctggatatt

29

<210> 41

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 41
ttggaattca catatgggcg tcatgcagaa cccaagacac 40

<210> 42
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 42
cccaagctta gtctgctcta cccaggcct cggc 34

<210> 43
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 43
cacagacaaa tgtgtgctag acat 24

<210> 44
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 44
atgtctagca cacatttgtc tgtg 24

<210> 45
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 45
ccctgccgtg tgccagctga gag 23

<210> 46
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

 <400> 46
 ctctcagctg gcacacggca ggg 23

 <210> 47
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primer

 <400> 47
 ccgtgtacca gtgcagagac tctaaatc 28

 <210> 48
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primer

 <400> 48
 gatttagagt ctctgcactg gtacacgg 28

 <210> 49
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primer

 <400> 49
 cagctgagag actgtaaatc cagtgc 27

 <210> 50
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primer

 <400> 50
 gtcactggat ttacagtctc tcagctg 27

 <210> 51
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>

<223> Primer

<400> 51

cagtgacaag tcttgctgcc tattcac

27

<210> 52

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 52

gtgaataggc agcaagactt gtcactg

27

<210> 53

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 53

gattctgatg tgtgtatcac agacaaat

28

<210> 54

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 54

atttgtctgt gatacacaca tcagaatc

28

<210> 55

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 55

ctgatgtgta tatctgtgac aaaactgtgc

30

<210> 56

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 56
gcacagtttt gtcacagata tacacatcag 30

<210> 57
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 57
agacaaaact gtgtgtgaca tgaggtct 28

<210> 58
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 58
agacctcatg tcacacacag ttttgtct 28

<210> 59
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 59
actgtgctag actgtaggtc tatggac 27

<210> 60
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 60
gtccatagac ctacagtcta gcacagt 27

<210> 61
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 61
cttcaagagc aactgtgctg tggcc 25

<210> 62
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 62
ggccacagca cagttgctct tgaag 25

<210> 63
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 63
cagtggggtc tgcacagacc c 21

<210> 64
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 64
gggtctgtgc agacccact g 21

<210> 65
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 65
ccgaggtcgc ttgttttgag ccatcag 27

<210> 66
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 66

ctgatggctc aaaacaagcg acctcgg

27

<210> 67

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 67

ggtcgctgtg tgtgagccat caga

24

<210> 68

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 68

tctgatggct cacacacagc gacc

24

<210> 69

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 69

gtgtttgagc catgtgaagc agagatc

27

<210> 70

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 70

gatctctgct tcacatggct caaacac

27

<210> 71

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 71

gaggtgcaca gttgtgtcag cacagac

27

<210> 72
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 72
gtctgtgctg acacaactgt gcacctc 27

<210> 73
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 73
gggtcagcac atgcccgcag ccc 23

<210> 74
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 74
gggctgcggg catgtgctga ccc 23

<210> 75
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 75
cccgcagccc tgcaaggagc agc 23

<210> 76
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 76
gctgctcctt gcagggtgc ggg 23

<210> 77
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 77
 agatacgctc tgtgcagccg cct 23

<210> 78
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 78
 aggcggctgc acagagcgta tct 23

<210> 79
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 79
 ctctgagcag ctgcctgagg gtc 23

<210> 80
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 80
 gaccctcagg cagctgctca gag 23

<210> 81
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 81
 gctgtgtttt gtccatcaga a 21

<210> 82
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 82
 ttctgatgga caaaacacag c 21

<210> 83
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 83
 ggagatatac atatgggtgt cactcagaac 30

<210> 84
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 84
 ccaccggatc cgtctgctct accccaggcg gagatataca tatgaacgct ggtgtcact 59

<210> 85
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 85
 ccttgttcag gtcctctgtg accgtgag 28

<210> 86
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 86
 ctcacggtca cagaggacct gaacaagg 28

<210> 87

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

<220>
<223> Primer

<400> 87
cccaagctta gtctgctcta cccaggcct cggc 34

<210> 88
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 88
tgactccaga tactgtctga gcagccg 27

<210> 89
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 89
cggctgctca gacagtatct ggagtca 27

<210> 90
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 90
tgactccaga tactctctga gcagccg 27

<210> 91
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 91
cggctgctca gagagtatct ggagtca 27

<210> 92
<211> 32

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 92
tctgaattca tgagatttcc ttcaattttt ac 32

<210> 93
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 93
tcacctcctg ggcttcagcc tctcttttat c 31

<210> 94
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 94
tctgaattca tgagatttcc ttcaattttt ac 32

<210> 95
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 95
gtgtctcgag ttagtctgct ctaccccagg c 31

<210> 96
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 96
ggctgaagcc caggaggtga cacagattcc 30

<210> 97
<211> 32
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 97

ctcctctcga gttaggaact ttctgggctg gg

32

<210> '98

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 98

ggctgaagcc ggcgtcactc agaccccaaa at

32

<210> 99

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 99

gtgtctcgag ttagtctgct ctaccccagg c

31

<210> 100

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 100

gtagtccgga gacaccggac agaaggaagt ggagcagaac

40

<210> 101

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 101

gtaggtcgac taggaacttt ctgggctggg

30

<210> 102

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 102

gtagtccgga gacaccgga acgctggtgt cactcaga

38

<210> 103

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 103

gtaggtcgac tagtctgctc taccacagg

29

<210> 104

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 104

gaaattatgc atttgaggat g

21

<210> 105

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 105

attaggcctc tagagatccg

20

<210> 106

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HLA-A2 NYESO peptide

<400> 106

Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys

1

5

<210> 107

<211> 621

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 107

atgcagaagg aagtggagca gaactctgga cccctcagtg ttccagaggg agccattgcc	60
tctctcaact gcacttacag tgaccgaggt tcccagtcct tcttctggta cagacaatat	120
tctgggaaaa gccctgagtt gataatgtcc atatactcca atggtgacaa agaagatgga	180
aggtttacag cacagctcaa taaagccagc cagtatgttt ctctgctcat cagagactcc	240
cagcccagtg attcagccac ctacctctgt gccgttataa ctgacagctg ggggaaattg	300
cagtttggag cagggaccca gggtgtggtc accccagata tccagaacct tgaccctgcc	360
gtgtaccagc tgagagactc taaatccagt gacaagtctg tctgcctatt caccgatttt	420
gattctcaaa caaatgtgtc acaaagtaag gattctgatg tgtatatcac agacaaatgt	480
gtgctagaca tgaggtctat ggacttcaag agcaacagtg ctgtggcctg gagcaacaaa	540
tctgactttg catgtgcaaa cgcttcaac aacagcatta ttccagaaga caccttcttc	600
cccagccag aaagttccta a	621

<210> 108

<211> 741

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 108

atgaacgctg gtgtcactca gacccccaaa ttccaggtcc tgaagacagg acagagcatg	60
acactgcagt gtgccagga tatgaaccat gaatacatgt cctgggtatcg acaagaccca	120
ggcatggggc tgaggctgat tcattactca gttgggtgctg gtatcactga ccaaggagaa	180
gtccccaatg gctacaatgt ctccagatca accacagagg atttcccgct caggctgctg	240
tcggctgctc cctcccagac atctgtgtac ttctgtgcca gcaggccggg actagcggga	300
gggcgaccag agcagtactt cgggccgggc accaggctca cggtcacaga ggacctgaaa	360
aacgtgttcc caccgaggt cgctgtgttt gagccatcag aagcagagat ctccacacc	420
caaaaggcca cactggtgtg cctggccaca ggcttctacc ccgaccacgt ggagctgagc	480
tggtgggtga atgggaagga ggtgcacagt ggggtctgca cagacccgca gccctcaag	540
gagcagcccg cctcaatga ctccagatac gctctgagca gccgcctgag ggtctcggcc	600
accttctggc aggacccccg caaccacttc cgctgtcaag tccagttcta cgggctctcg	660
gagaatgacg agtggaccca ggatagggcc aaaccgtca cccagatcgt cagcgccgag	720
gcctggggta gagcagacta a	741

<210> 109

<211> 245

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 109

Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu Lys Thr Gly
 1 5 10 15

Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr Met
 20 25 30

Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr
 35 40 45

Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro Asn Gly Tyr
 50 55 60

Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Leu Leu Ser
 65 70 75 80

Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser Arg Pro Gly
 85 90 95

Leu Ala Gly Gly Arg Pro Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu
 100 105 110

Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val
 115 120 125

Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu
 130 135 140

Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp
 145 150 155 160

Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln
 165 170 175

Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Ala Leu Ser
 180 185 190

Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asp Pro Arg Asn His
 195 200 205

Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp
 210 215 220

Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala
 225 230 235 240

Trp Gly Arg Ala Asp
 245

<210> 110
 <211> 621
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 110
 atgcagaagg aagtggagca gaactctgga cccctcagtg ttccagaggg agccattgcc 60
 tctctcaact gcacttacag tgaccgaggt tcccagtcct tcttctggta cagacaatat 120
 tctgggaaaa gccctgagtt gataatgtcc atatactcca atggtgacaa agaagatgga 180
 aggtttacag cacagctcaa taaagccagc cagtatgttt ctctgctcat cagagactcc 240
 cagcccagtg attcagccac ctacctctgt gccgttacaa ctgacagctg ggggaaattg 300
 cagtttgag cagggaccca ggttggtggtc acccagata tccagaacct ggatcctgcc 360
 gtgtaccagc tgagagactc taaatccagt gacaagtctg tctgcctatt caccgatttt 420
 gattctcaaa caaatgtgtc acaaagtaag gattctgatg tgtatatcac agacaaatgt 480
 gtgctagaca tgaggtctat ggacttcaag agcaacagtg ctgtggcctg gagcaacaaa 540
 tctgactttg catgtgcaaa cgccttcaac aacagcatta ttccagaaga caccttcttc 600
 cccagcccag aaagttccta a 621

<210> 111
 <211> 615
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 111
 atgcaactac tagaaciaag tcctcagttt ctaagcatcc aagagggaga aaatctcact 60
 gtgtactgca actcctcaag tgttttttcc agcttacaat ggtacagaca ggagcctggg 120
 gaaggtcctg tcctcctggt gacagtagtt acgggtggag aagtgaagaa gctgaagaga 180
 ctaacctttc agtttggtga tgcaagaaag gacagttctc tccacatcac tgcgccccag 240
 cctgggtgata caggcctcta cctctgtgca ggagcgggaa gccaaggaaa tctcatcttt 300
 ggaaaaggca ctaaactctc tgttaaacca aatatccaga acccgatcc tgccgtgtac 360
 cagctgagag actctaaatc cagtgacaag tctgtctgcc tattcaccga ttttgattct 420
 caaaciaatg tgtcaciaag taaggattct gatgtgtata tcacagacaa atgtgtgcta 480
 gacatgaggt ctatggactt caagagcaac agtgctgtgg cctggagcaa caaatctgac 540

tttgcattgtg caaacgcctt caacaacagc attattccag aagacacctt cttccccagc 600
ccagaaagtt cctaa 615

<210> 112
<211> 735
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 112
atggtggatg gtggaatcac tcagtcccca aagtacctgt tcagaaagga aggacagaat 60
gtgaccctga gttgtgaaca gaatttgaac cacgatgcca tgtactggta ccgacaggac 120
ccagggcaag ggctgagatt gatctactac tcacagatag taaatgactt tcagaaagga 180
gatatagctg aaggggtacag cgtctctcgg gagaagaagg aatcctttcc tctcactgtg 240
acatcgggccc aaaagaaccc gacagctttc tatctctgtg ccagtagttc gaggagctcc 300
tacgagcagt acttcggggc gggcaccagg ctcacgggtca cagaggacct gaaaaacgtg 360
ttcccacccg aggtcgtgtg gtttgagcca tcagaagcag agatctccca cacccaaaag 420
gccacactgg tgtgcctggc cacaggcttc taccgccacc acgtggagct gagctggtgg 480
gtgaatggga aggaggtgca cagtggggtc tgcacagacc cgcagcccct caaggagcag 540
cccgcctca atgactccag atacagcctg agcagccgcc tgaggggtctc ggccaccttc 600
tggcagaacc cccgcaacca cttccgctgt caagtccagt tctacgggct ctcggagaat 660
gacgagtggg cccaggatag ggccaaacct gtcaccaga ttgtcagcgc cgaggcctgg 720
ggtagagcag actaa 735

<210> 113
<211> 204
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 113

Met Gln Leu Leu Glu Gln Ser Pro Gln Phe Leu Ser Ile Gln Glu Gly
1 5 10 15

Glu Asn Leu Thr Val Tyr Cys Asn Ser Ser Ser Val Phe Ser Ser Leu
20 25 30

Gln Trp Tyr Arg Gln Glu Pro Gly Glu Gly Pro Val Leu Leu Val Thr
35 40 45

Val Val Thr Gly Gly Glu Val Lys Lys Leu Lys Arg Leu Thr Phe Gln
50 55 60

Phe Gly Asp Ala Arg Lys Asp Ser Ser Leu His Ile Thr Ala Ala Gln
65 70 75 80

Pro Gly Asp Thr Gly Leu Tyr Leu Cys Ala Gly Ala Gly Ser Gln Gly
85 90 95

Asn Leu Ile Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu Ser Val Lys Pro Asn Ile
100 105 110

Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser
115 120 125

Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val
130 135 140

Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys Val Leu
145 150 155 160

Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser
165 170 175

Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile
180 185 190

Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser
195 200

<210> 114
<211> 244
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 114

Met Val Asp Gly Gly Ile Thr Gln Ser Pro Lys Tyr Leu Phe Arg Lys
1 5 10 15

Glu Gly Gln Asn Val Thr Leu Ser Cys Glu Gln Asn Leu Asn His Asp
20 25 30

Ala Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Gln Gly Leu Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ser Gln Ile Val Asn Asp Phe Gln Lys Gly Asp Ile Ala Glu
50 55 60

Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Ser Phe Pro Leu Thr Val
65 70 75 80

Thr Ser Ala Gln Lys Asn Pro Thr Ala Phe Tyr Leu Cys Ala Ser Ser
85 90 95

Ser Arg Ser Ser Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr
100 105 110

Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe
115 120 125

Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val
130 135 140

Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp
145 150 155 160

Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln Pro
165 170 175

Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Ser Leu Ser Ser
180 185 190

Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe
195 200 205

Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr
210 215 220

Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp
225 230 235 240

Gly Arg Ala Asp

<210> 115

<211> 627

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 115

atgcaggagg ygacacagat tcctgcagct ctgagtgtcc cagaaggaga aaacttggtt 60

ctcaactgca gtttcactga tagcgctatt tacaacctcc agtggttttag gcaggaccct 120

gggaaagggtc tcacatctct gttgcttatt cagtcaagtc agagagagca aacaagtgga 180

agacttaatg cctcgctgga taaatcatca ggacgtagta ctttatacat tgcagcttct 240

cagcctggtg actcagccac ctacctctgt gctgtgaggc ccacatcagg aggaagctac 300

atacctacat ttggaagagg aaccagcctt attgttcac cgtatatcca gaaccctgac 360
 cctgccgtgt accagctgag agactctaaa tccagtgaca agtctgtctg cctattcacc 420
 gattttgatt ctcaaacaaa tgtgtcacaa agtaaggatt ctgatgtgta tatcacagac 480
 aaatgtgtgc tagacatgag gtctatggac ttcaagagca acagtgtgtg ggccctggagc 540
 aacaaatctg actttgcatg tgcaaacgcc ttcaacaaca gcattattcc agaagacacc 600
 ttcttcccca gccagaaag ttcctaa 627

<210> 116
 <211> 729
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 116
 atgggtgtca ctcagacccc aaaattccag gtcctgaaga caggacagag catgacactg 60
 cagtgtgccc aggatatgaa ccatgaatac atgtcctggg atcgacaaga cccaggcatg 120
 gggtgagggc tgattcatta ctcagttggg gctgggtatca ctgaccaagg agaagtcccc 180
 aatggctaca atgtctccag atcaaccaca gaggatttcc cgctcaggct gctgtcggct 240
 gctccctccc agacatctgt gtacttctgt gccagcagtt acgtcgggaa caccggggag 300
 ctgttttttg gagaaggctc taggctgacc gtactggagg acctgaaaaa cgtgttccca 360
 cccgaggtcg ctgtgtttga gccatcagaa gcagagatct cccacaccca aaaggccaca 420
 ctggtgtgcc tggccacagg cttctacccc gaccacgtgg agctgagctg gtgggtgaat 480
 gggaaggagg tgcacagtgg ggtctgcaca gaccgcagc ccctcaagga gcagcccgcc 540
 ctcaatgact ccagatacgc tctgagcagc cgcctgaggg tctcgccac cttctggcag 600
 gacccccgca accacttccg ctgtcaagtc cagttctacg ggctctcgga gaatgacgag 660
 tggaccagg atagggccaa acccgtcacc cagatcgtca gcgccgaggc ctggggtaga 720
 gcagactaa 729

<210> 117
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> X is any amino acid

<400> 117

Met Gln Glu Xaa Thr Gln Ile Pro Ala Ala Leu Ser Val Pro Glu Gly

1	5	10	15
Glu Asn Leu Val Leu Asn Cys Ser Phe Thr Asp Ser Ala Ile Tyr Asn	20	25	30
Leu Gln Trp Phe Arg Gln Asp Pro Gly Lys Gly Leu Thr Ser Leu Leu	35	40	45
Leu Ile Gln Ser Ser Gln Arg Glu Gln Thr Ser Gly Arg Leu Asn Ala	50	55	60
Ser Leu Asp Lys Ser Ser Gly Arg Ser Thr Leu Tyr Ile Ala Ala Ser	65	70	75
Gln Pro Gly Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Arg Pro Thr Ser	85	90	95
Gly Gly Ser Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Ser Leu Ile Val	100	105	110
His Pro Tyr Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp	115	120	125
Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser	130	135	140
Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp	145	150	155
Lys Cys Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala	165	170	175
Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn	180	185	190
Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser	195	200	205
<210> 118			
<211> 244			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 118			
Met Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu Lys Thr Gly Gln	5	10	15

Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr Met Ser
20 25 30

Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Glu Thr Gly Leu Arg Leu Ile His
35 40 45

Tyr Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro Asn Gly
50 55 60

Tyr Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Leu Leu
65 70 75 80

Ser Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Tyr
85 90 95

Val Gly Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu Thr
100 105 110

Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe
115 120 125

Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val
130 135 140

Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp
145 150 155 160

Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln Pro
165 170 175

Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Ala Leu Ser Ser
180 185 190

Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asp Pro Arg Asn His Phe
195 200 205

Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr
210 215 220

Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp
225 230 235 240

Gly Arg Ala Asp

<210> 119
 <211> 630
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 119
 atgcaggagg ygacacagat tcctgcagct ctgagtgtcc cagaaggaga aaacttggtt 60
 ctcaactgca gtttactga tagcgctatt tacaacctcc agtgggttag gcaggaccct 120
 gggaaagggtc tcacatctct gttgcttatt cagtcaagtc agagagagca aacaagtgga 180
 agacttaatg cctcgctgga taaatcatca ggacgtagta ctttatacat tgcagcttct 240
 cagcctggtg actcagccac ctacctctgt gctgtgaggc ccacatcagg aggaagctac 300
 atacctacat ttggaaggagg aaccagcctt attgttcatc cgtatatcca gaacctgac 360
 cctgccgtgt accagctgag agactctaaa tccagtgaac agtctgtctg cctattcacc 420
 gattttgatt ctcaaacaaa tgtgtcacia agtaaggatt ctgatgtgta tatcacagac 480
 aaatgtgtgc tagacatgag gtctatggac ttcaagagca acagtgctgt ggcctggagc 540
 aacaaatctg actttgcatg tgcaaacgcc ttcaacaaca gcattattcc agaagacacc 600
 ttcttcccca gccagaaaag ttctgttaa 630

<210> 120
 <211> 732
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 120
 atgggtgtca ctacagacccc aaaattccag gtctgaaga caggacagag catgacactg 60
 cagtgtgccc aggatatgaa ccatgaatac atgtcctggt atcgacaaga cccaggcatg 120
 gggctgaggc tgattcatta ctacagttggt gctggtatca ctgaccaagg agaagtcccc 180
 aatggctaca atgtctccag atcaaccaca gaggatttcc cgctcaggct gctgtcggct 240
 gctccctccc agacatctgt gtacttctgt gccagcagtt acgtcgggaa caccggggag 300
 ctgttttttg gagaaggctc taggctgacc gtactggagg acctgaaaaa cgtgttccca 360
 cccgaggctg ctgtgtttga gccatcagaa gcagagatct cccacacca aaaggccaca 420
 ctggtgtgcc tggccacagg cttctacccc gaccacgtgg agctgagctg gtgggtgaat 480
 ggggaaggagg tgcacagtgg ggtctgcaca gaccgcagc cctcaagga gcagcccgcc 540
 ctcaatgact ccagatacgc tctgagcagc cgcctgaggg tctcgccac cttctggcag 600
 gacccccgca accacttccg ctgtcaagtc cagttctacg ggctctcgga gaatgacgag 660
 tggaccagc atagggccaa acccgtcacc cagatcgtca gcgccgaggc ctggggtaga 720
 gcagactgtt aa 732

<210> 121
 <211> 209
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> X is any amino acid

<400> 121

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

Glu Asn Leu Val Leu Asn Cys Ser Phe Thr Asp Ser Ala Ile Tyr Asn
 20 25 30

Leu Gln Trp Phe Arg Gln Asp Pro Gly Lys Gly Leu Thr Ser Leu Leu
 35 40 45

Leu Ile Gln Ser Ser Gln Arg Glu Gln Thr Ser Gly Arg Leu Asn Ala
 50 55 60

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

Gln Pro Gly Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Arg Pro Thr Ser
 85 90 95

Gly Gly Ser Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Ser Leu Ile Val
 100 105 110

His Pro Tyr Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp
 115 120 125

Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser
 130 135 140

Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp
 145 150 155 160

Lys Cys Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala
 165 170 175

Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn
 180 185 190

Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser
 195 200 205

Cys

<210> 122
 <211> 243
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 122

Met Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu Lys Thr Gly Gln
 1 5 10 15

Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr Met Ser
 20 25 30

Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr Ser
 35 40 45

Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro Asn Gly Tyr Asn
 50 55 60

Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Leu Leu Ser Ala
 65 70 75 80

Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Tyr Val Gly
 85 90 95

Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu Thr Val Leu
 100 105 110

Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro
 115 120 125

Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
 130 135 140

Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn
 145 150 155 160

Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys
 165 170 175

Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Ala Leu Ser Ser Arg Leu

180	185	190
Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asp Pro Arg Asn His Phe Arg Cys		
195	200	205
Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp		
210	215	220
Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg		
225	230	235 240

Ala Asp Cys

<210> 123
 <211> 624
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 123
 atgaaggagg tggagcagaa ttctggaccc ctcaagtgtc cagagggagc cattgcctct 60
 ctcaactgca cttacagtga ccgaggttcc cagtccttct tctggtacag acaatattct 120
 gggaaaagcc ctgagttgat aatgttcata tactccaatg gtgacaaaga agatggaagg 180
 ttacagcac agctcaataa agccagccag tatgtttctc tgctcatcag agactcccag 240
 cccagtgatt cagccaccta cctctgtgcc gtgaaggggg ggtctggggg ttaccagaaa 300
 gttacctttg gaactggaac aaagctccaa gtcaccccaa atatccagaa cccggatcct 360
 gccgtgtacc agctgagaga ctctaaatcc agtgacaagt ctgtctgcct attcaccgat 420
 tttgattctc aaacaaatgt gtcacaaagt aaggattctg atgtgtatat cacagacaaa 480
 tgtgtgctag acatgaggtc tatggacttc aagagcaaca gtgctgtggc ctggagcaac 540
 aaatctgact ttgcatgtgc aaacgccttc aacaacagca ttattccaga agacaccttc 600
 ttccccagcc cagaaagttc ctaa 624

<210> 124
 <211> 735
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 124
 atgggcgtca tgcagaaccc aagacacctg gtcaggagga ggggacagga ggcaagactg 60
 agatgcagcc caatgaaagg acacagtcac gtttactggc atcggcagct cccagaggaa 120
 ggtctgaaat tcatggttta tctccagaaa gaaaatatca tagatgagtc aggaatgcca 180
 aaggaacgat tttctgctga atttcccaa gagggcccca gcatcctgag gatccagcag 240

```

gtagtgcgag gagattcggc agcttatttc tgtgccagct caccacagac agggggcaca 300
gatacgcagt attttggccc aggcacccgg ctgacagtgc tcgaggacct gaaaaacgtg 360
ttcccacccg aggtcgctgt gtttgagcca tcagaagcag agatctccca cacccaaaag 420
gccacactgg tgtgcctggc cacaggcttc taccgagacc acgtggagct gagctggtgg 480
gtgaatggga aggaggtgca cagtggggtc tgcacagacc cgcagcccct caaggagcag 540
cccgccctca atgactccag atacgctctg agcagccgcc tgagggtctc ggccaccttc 600
tggcaggacc cccgcaacca cttccgctgt caagtccagt tctacgggct ctcggagaat 660
gacgagtgga ccaggatag ggccaaaccc gtcaccaga tcgtcagcgc cgaggcctgg 720
ggtagagcag actaa 735

```

```

<210> 125
<211> 207
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```
<400> 125
```

```

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

```

```

Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln Ser
20           25          30

```

```

Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile Met
35           40          45

```

```

Phe Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala Gln
50           55          60

```

```

Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser Gln
65           70          75          80

```

```

Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Lys Gly Gly Ser Gly
85           90          95

```

```

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

```

```

Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser
115         120         125

```

```

Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln
130         135         140

```

Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys
145 150 155 160

Cys Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val
165 170 175

Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn
180 185 190

Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser
195 200 205

<210> 126

<211> 244

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 126

Met Gly Val Met Gln Asn Pro Arg His Leu Val Arg Arg Gly Gln
1 5 10 15

Glu Ala Arg Leu Arg Cys Ser Pro Met Lys Gly His Ser His Val Tyr
20 25 30

Trp Tyr Arg Gln Leu Pro Glu Glu Gly Leu Lys Phe Met Val Tyr Leu
35 40 45

Gln Lys Glu Asn Ile Ile Asp Glu Ser Gly Met Pro Lys Glu Arg Phe
50 55 60

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

Val Val Arg Gly Asp Ser Ala Ala Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Pro Gln
85 90 95

Thr Gly Gly Thr Asp Thr Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr
100 105 110

Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe
115 120 125

Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val
130 135 140

Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp
 145 150 155 160

Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln Pro
 165 170 175

Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Ala Leu Ser Ser
 180 185 190

Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asp Pro Arg Asn His Phe
 195 200 205

Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr
 210 215 220

Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp
 225 230 235 240

Gly Arg Ala Asp

<210> 127
 <211> 621
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 127
 atgcagaagg aagtggagca gaactctgga cccctcagtg ttccagaggg agccattgcc 60
 tctctcaact gcacttacag tgaccgaggt tcccagtcct tcttctggta cagacaatat 120
 tctgggaaaa gccctgagtt gataatgtcc atatactcca atgggtgacaa agaagatgga 180
 aggtttacag cacagctcaa taaagccagc cagtatgttt ctctgctcat cagagactcc 240
 cagcccagtg attcagccac ctacctctgt gccgttacaa ctgacagctg ggggaaattg 300
 cagtttggag cagggaccca gggtgtggtc accccagata tccagaacct tgaccctgcc 360
 gtgtaccagc tgagagactc taaatccagt gacaagtctg tctgcctatt caccgatttt 420
 gattctcaaa caaatgtgtc acaaagtaag gattctgatg tgtatatcac agacaaatgt 480
 gtgctagaca tgaggtctat ggacttcaag agcaacagtg ctgtggcctg gagcaacaaa 540
 tctgactttg catgtgcaaa cgccttcaac aacagcatta ttccagaaga caccttcttc 600
 cccagcccag aaagttccta a 621

<210> 128
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 128

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

Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln
 20 25 30

Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile
 35 40 45

Met Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala
 50 55 60

Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser
 65 70 75 80

Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Thr Thr Asp Ser
 85 90 95

Trp Gly Lys Leu Gln Phe Gly Ala Gly Thr Gln Val Val Val Thr Pro
 100 105 110

Asp Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys
 115 120 125

Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr
 130 135 140

Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys
 145 150 155 160

Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala
 165 170 175

Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser
 180 185 190

Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser
 195 200 205

<210> 129

<211> 621

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 129

```

atgcagaagg aagtggagca gaactctgga cccctcagtg ttccagaggg agccattgcc      60
tctctcaact gcacttacag tgaccgaggt tcccagtcct tcttctggta cagacaatat      120
tctgggaaaa gccctgagtt gataatgtcc atatactcca atggtgacaa agaagatgga      180
aggtttacag cacagctcaa taaagccagc cagtatgttt ctctgctcat cagagactcc      240
cagcccagtg attcagccac ctacctctgt gccgttacaa ctgacagctg ggggaaattg      300
cagtttggag cagggaccca ggttgtggtc accccagata tccagaacct tgaccctgcc      360
gtgtaccagc tgagagactc taaatccagt gacaagtctg tctgcctatt caccgatttt      420
gattctcaaa caaatgtgtc acaaagtaag gattctgatg tgtatatctg tgacaaaact      480
gtgctagaca tgaggtctat ggacttcaag agcaacagtg ctgtggcctg gagcaacaaa      540
tctgactttg catgtgcaaa cgccttcaac aacagcatta ttccagaaga caccttcttc      600
cccagcccag aaagttccta a                                          621

```

```

<210> 130
<211> 206
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 130

```

```

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

```

```

Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln
20          25          30

```

```

Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile
35          40          45

```

```

Met Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala
50          55          60

```

```

Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser
65          70          75          80

```

```

Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Thr Thr Asp Ser
85          90          95

```

```

Trp Gly Lys Leu Gln Phe Gly Ala Gly Thr Gln Val Val Val Thr Pro
100          105          110

```

```

Asp Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys
115          120          125

```

Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr
 130 135 140

Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Cys Asp Lys Thr
 145 150 155 160

Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala
 165 170 175

Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser
 180 185 190

Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser
 195 200 205

<210> 131
 <211> 621
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 131
 atgcagaagg aagtgaggca gaactctgga cccctcagtg ttccagaggg agccattgcc 60
 tctctcaact gcacttacag tgaccgaggt tcccagtcct tcttctggta cagacaatat 120
 tctgggaaaa gccctgagtt gataatgtcc atatactcca atgggtgacaa agaagatgga 180
 aggttttacag cacagctcaa taaagccagc cagtatgttt ctctgctcat cagagactcc 240
 cagcccagtg attcagccac ctacctctgt gccgttacaa ctgacagctg ggggaaattg 300
 cagtttggag cagggaccca ggttgtggtc accccagata tccagaacct tgaccctgcc 360
 gtgtaccagc tgagagactc taaatccagt gacaagtctg tctgcctatt caccgatttt 420
 gattctcaaa caaatgtgtc acaaagtaag gattctgatg tgtatatcac agacaaaact 480
 gtgctagaca tgaggtctat ggacttcaag agcaactgtg ctgtggcctg gagcaacaaa 540
 tctgactttg catgtgcaaa cgccttcaac aacagcatta ttccagaaga caccttcttc 600
 cccagcccag aaagttccta a 621

<210> 132
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 132

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

Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln
 20 25 30

Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile
 35 40 45

Met Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala
 50 55 60

Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser
 65 70 75 80

Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Thr Thr Asp Ser
 85 90 95

Trp Gly Lys Leu Gln Phe Gly Ala Gly Thr Gln Val Val Val Thr Pro
 100 105 110

Asp Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys
 115 120 125

Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr
 130 135 140

Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr
 145 150 155 160

Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Cys Ala Val Ala
 165 170 175

Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser
 180 185 190

Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser
 195 200 205

<210> 133

<211> 621

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 133

atgcagaagg aagtggagca gaactctgga cccctcagtg ttccagaggg agccattgcc 60

tctctcaact gcacttacag tgaccgaggt tcccagtcct tcttctggta cagacaatat 120

tctgggaaaa gccctgagtt gataatgtcc atatactcca atgggtgacaa agaagatgga 180

aggtttacag cacagctcaa taaagccagc cagtatgttt ctctgctcat cagagactcc 240

```

cagcccagtg attcagccac ctacctctgt gccgttaciaa ctgacagctg ggggaaattg 300
cagtttggag cagggaccca ggttgtggtc accccagata tccagaaccc tgaccctgcc 360
gtgtaccagc tgagagactc taaatccagt gacaagtctg tctgcctatt caccgatttt 420
gattctcaaa caaatgtgtc acaaagtaag gattctgatg tgtatatcac agacaaaact 480
gtgtgtgaca tgaggtctat ggacttcaag agcaacagtg ctgtggcctg gagcaacaaa 540
tctgactttg catgtgcaaa cgccttcaac aacagcatta ttccagaaga caccttcttc 600
cccagcccag aaagttccta a 621

```

<210> 134

<211> 206

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 134

```

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

```

```

Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln
20           25           30

```

```

Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile
35           40           45

```

```

Met Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala
50           55           60

```

```

Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser
65           70           75           80

```

```

Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Thr Thr Asp Ser
85           90           95

```

```

Trp Gly Lys Leu Gln Phe Gly Ala Gly Thr Gln Val Val Val Thr Pro
100           105           110

```

```

Asp Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys
115           120           125

```

```

Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr
130           135           140

```

```

Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr
145           150           155           160

```

Val Cys Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala
165 170 175

Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser
180 185 190

Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser
195 200 205

```
<210> 135
<211> 621
<212> DNA
<213> Homo sapiens
```

<400>	135						
atgcagaagg	aagtggagca	gaactctgga	cccctcagtg	ttccagaggg	agccattgcc		60
tctctcaact	gcacttacag	tgaccgaggt	tcccagtcct	tcttctggta	cagacaatat		120
tctgggaaaa	gccctgagtt	gataatgtcc	atatactcca	atgggtgacaa	agaagatgga		180
aggtttacag	cacagctcaa	taaagccagc	cagtatgttt	ctctgctcat	cagagactcc		240
cagcccagtg	attcagccac	ctacctctgt	gccgttacaa	ctgacagctg	ggggaaattg		300
cagtttggag	cagggaccca	ggttgtggtc	accccagata	tccagaacct	tgaccctgcc		360
gtgtgccagc	tgagagactc	taaatccagt	gacaagtctg	tctgcctatt	caccgatttt		420
gatttctcaa	caaatgtgtc	acaaagtaag	gattctgatg	tgtatatcac	agacaaaact		480
gtgctagaca	tgaggtctat	ggacttcaag	agcaacagtg	ctgtggcctg	gagcaacaaa		540
tctgactttg	catgtgcaaa	cgccttcaac	aacagcatta	ttccagaaga	caccttcttc		600
cccagcccag	aaagttccta	a					621

```
<210> 136
<211> 206
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 136

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

Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln
20 25 30

Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile
35 40 45

Met Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala
50 55 60

Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser
65 70 75 80

Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Thr Thr Asp Ser
85 90 95

Trp Gly Lys Leu Gln Phe Gly Ala Gly Thr Gln Val Val Val Thr Pro
100 105 110

Asp Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Cys Gln Leu Arg Asp Ser Lys
115 120 125

Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr
130 135 140

Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr
145 150 155 160

Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala
165 170 175

Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser
180 185 190

Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser
195 200 205

<210> 137

<211> 621

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 137

atgcagaagg aagtggagca gaactctgga cccctcagtg ttccagaggg agccattgcc 60

tctctcaact gcatttacag tgaccgaggt tcccagtcct tcttctggta cagacaatat 120

tctgggaaaa gccctgagtt gataatgtcc atatactcca atggtgacaa agaagatgga 180

aggtttacag cacagctcaa taaagccagc cagtatgttt ctctgctcat cagagactcc 240

cagcccagtg attcagccac ctacctctgt gccgttacaa ctgacagctg ggggaaattg 300

cagtttggag cagggaccca ggttgtggtc accccagata tccagaacct tgaccctgcc 360

gtgtaccagc tgagagactg taaatccagt gacaagtctg tctgcctatt caccgatttt 420

gattctcaaa caaatgtgtc acaaagtaag gattctgatg tgtatatcac agacaaaact 480
 gtgctagaca tgaggcttat ggacttcaag agcaacagtg ctgtggcctg gagcaacaaa 540
 tctgactttg catgtgcaaa cgccttcaac aacagcatta ttccagaaga caccttcttc 600
 cccagcccag aaagttccta a 621

<210> 138

<211> 206

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 138

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

Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln
 20 25 30

Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile
 35 40 45

Met Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala
 50 55 60

Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser
 65 70 75 80

Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Thr Thr Asp Ser
 85 90 95

Trp Gly Lys Leu Gln Phe Gly Ala Gly Thr Gln Val Val Val Thr Pro
 100 105 110

Asp Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Cys Lys
 115 120 125

Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr
 130 135 140

Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr
 145 150 155 160

Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala
 165 170 175

Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser

180 185 190

Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser
 195 200 205

<210> 139
 <211> 621
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 139
 atgcagaagg aagtggagca gaactctgga cccctcagtg ttccagaggg agccattgcc 60
 tctctcaact gcacttacag tgaccgaggt tcccagtcct tcttctggta cagacaatat 120
 tctgggaaaa gccctgagtt gataatgtcc atatactcca atggtgacaa agaagatgga 180
 aggtttacag cacagctcaa taaagccagc cagtatgttt ctctgctcat cagagactcc 240
 cagcccagtg attcagccac ctacctctgt gccgttacaa ctgacagctg ggggaaattg 300
 cagtttggag cagggaccca ggttgtggtc accccagata tccagaacct tgaccctgcc 360
 gtgtaccagt gcagagactc taaatccagt gacaagtctg tctgcctatt caccgatttt 420
 gattctcaaa caaatgtgtc acaaagtaag gattctgatg tgtatatcac agacaaaact 480
 gtgctagaca tgaggtctat ggacttcaag agcaacagtg ctgtggcctg gagcaacaaa 540
 tctgactttg catgtgcaaa cgccttcaac aacagcatta ttccagaaga caccttcttc 600
 cccagcccag aaagttccta a 621

<210> 140
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 140

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

Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln
 20 25 30

Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile
 35 40 45

Met Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala
 50 55 60

Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser
 65 70 75 80

Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Thr Thr Asp Ser
85 90 95

Trp Gly Lys Leu Gln Phe Gly Ala Gly Thr Gln Val Val Val Thr Pro
100 105 110

Asp Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Cys Arg Asp Ser Lys
115 120 125

Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr
130 135 140

Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr
145 150 155 160

Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala
165 170 175

Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser
180 185 190

Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser
195 200 205

<210> 141

<211> 621

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 141

atgcagaagg aagtggagca gaactctgga cccctcagtg ttccagaggg agccattgcc 60

tctctcaact gcacttacag tgaccgaggt tcccagtcct tcttctggta cagacaatat 120

tctgggaaaa gccctgagtt gataatgtcc atatactcca atggtgacaa agaagatgga 180

aggtttacag cacagctcaa taaagccagc cagtatgttt ctctgctcat cagagactcc 240

cagcccagtg attcagccac ctacctctgt gccgttacaa ctgacagctg ggggaaattg 300

cagtttggag cagggaccca ggttgtggtc accccagata tccagaaccc tgaccctgcc 360

gtgtaccagc tgagagactc taaatccagt gacaagtctt gctgcctatt caccgatttt 420

gattctcaaa caaatgtgtc acaaagtaag gattctgatg tgtatatcac agacaaaact 480

gtgctagaca tgaggtctat ggacttcaag agcaacagtg ctgtggcctg gagcaacaaa 540

tctgactttg catgtgcaaa cgccttcaac aacagcatta ttccagaaga caccttcttc 600

cccagcccag aaagttccta a 621

<210> 142
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 142

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

Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln
 20 25 30

Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile
 35 40 45

Met Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala
 50 55 60

Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser
 65 70 75 80

Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Thr Thr Asp Ser
 85 90 95

Trp Gly Lys Leu Gln Phe Gly Ala Gly Thr Gln Val Val Val Thr Pro
 100 105 110

Asp Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys
 115 120 125

Ser Ser Asp Lys Ser Cys Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr
 130 135 140

Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr
 145 150 155 160

Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala
 165 170 175

Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser
 180 185 190

Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser
 195 200 205

<210> 143
 <211> 621
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 143
 atgcagaagg aagtgaggca gaactctgga cccctcagtg ttccagaggg agccattgcc 60
 tctctcaact gcacttacag tgaccgaggt tcccagtcct tcttctggta cagacaatat 120
 tctgggaaaa gccctgagtt gataatgtcc atatactcca atgggtgacaa agaagatgga 180
 aggttttacag cacagctcaa taaagccagc cagtatgttt ctctgctcat cagagactcc 240
 cagcccagtg attcagccac ctacctctgt gccgttacaa ctgacagctg ggggaaattg 300
 cagtttggag cagggacca ggttggtggtc accccagata tccagaacct tgaccctgcc 360
 gtgtaccagc tgagagactc taaatccagt gacaagtctg tctgcctatt caccgatttt 420
 gattctcaaa caaatgtgtc acaaagtaag gattctgatg tgtatatcac agacaaaact 480
 gtgctagact gtaggtctat ggacttcaag agcaacagtg ctgtggcctg gagcaacaaa 540
 tctgactttg catgtgcaaa cgccttcaac aacagcatta ttccagaaga caccttcttc 600
 cccagcccag aaagttccta a 621

<210> 144
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 144

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

Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln
 20 25 30

Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile
 35 40 45

Met Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala
 50 55 60

Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser
 65 70 75 80

Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Thr Thr Asp Ser
 85 90 95

Trp Gly Lys Leu Gln Phe Gly Ala Gly Thr Gln Val Val Val Thr Pro

100	105	110
Asp Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys		
115	120	125
Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr		
130	135	140
Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr		
145	150	155
Val Leu Asp Cys Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala		
165	170	175
Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser		
180	185	190
Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser		
195	200	205

<210> 145
 <211> 621
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 145
 atgcagaagg aagtggagca gaactctgga cccctcagtg ttccagaggg agccattgcc 60
 tctctcaact gcacttacag tgaccgaggt tcccagtcct tcttctggta cagacaatat 120
 tctgggaaaa gccctgagtt gataatgtcc atatactcca atggtgacaa agaagatgga 180
 aggtttacag cacagctcaa taaagccagc cagtatgttt ctctgctcat cagagactcc 240
 cagcccagtg attcagccac ctacctctgt gccgttacaa ctgacagctg ggggaaattg 300
 cagtttggag cagggaccca ggttgtggtc accccagata tccagaacct tgaccctgcc 360
 gtgtaccagc tgagagactc taaatccagt gacaagtctg tctgcctatt caccgatttt 420
 gattctcaaa caaatgtgtc acaaagtaag gattctgatg tgtgtatcac agacaaaact 480
 gtgctagaca tgaggtctat ggacttcaag agcaacagtg ctgtggcctg gagcaacaaa 540
 tctgactttg catgtgcaaa cgccttcaac aacagcatta ttccagaaga caccttcttc 600
 ccagcccag aaagttccta a 621

<210> 146
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 146

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

Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln
 20 25 30

Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile
 35 40 45

Met Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala
 50 55 60

Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser
 65 70 75 80

Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Thr Thr Asp Ser
 85 90 95

Trp Gly Lys Leu Gln Phe Gly Ala Gly Thr Gln Val Val Val Thr Pro
 100 105 110

Asp Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys
 115 120 125

Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr
 130 135 140

Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Cys Ile Thr Asp Lys Thr
 145 150 155 160

Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala
 165 170 175

Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser
 180 185 190

Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser
 195 200 205

<210> 147

<211> 741

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 147

atgaacgctg gtgtcactca gaccccaaaa ttccaggtcc tgaagacagg acagagcatg 60

```

acactgcagt gtgcccagga tatgaaccat gaatacatgt cctggtatcg acaagaccca 120
ggcatggggc tgaggctgat tcattactca gttggtgctg gtatcactga ccaaggagaa 180
gtccccaatg gctacaatgt ctccagatca accacagagg atttcccgct caggctgctg 240
tcggctgctc cctcccagac atctgtgtac ttctgtgcca gcaggccggg actagcggga 300
gggcgaccag agcagtactt cgggccgggc accaggctca cggtcacaga ggacctgaaa 360
aacgtgttcc cacccgaggt cgctgtgttt gagccatcag aagcagagat ctcccacacc 420
caaaaggcca cactggtgtg cctggccaca ggcttctacc ccgaccacgt ggagctgagc 480
tggtgggtga atgggaagga ggtgcacagt ggggtctgca cagacccgca gccctcaag 540
gagcagcccg ccctcaatga ctccagatac gctctgagca gccgcctgag ggtctcggcc 600
accttctggc aggacccccg caaccacttc cgctgtcaag tccagttcta cgggctctcg 660
gagaatgacg agtggacca ggatagggcc aaacccgtca cccagatcgt cagcgccgag 720
gcctggggta gagcagacta a 741

```

```

<210> 148
<211> 246
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 148

```

```

Met Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu Lys Thr
1           5           10          15

```

```

Gly Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr
20           25          30

```

```

Met Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu Ile His
35           40          45

```

```

Tyr Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro Asn Gly
50           55          60

```

```

Tyr Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Leu Leu
65           70          75          80

```

```

Ser Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser Arg Pro
85           90          95

```

```

Gly Leu Ala Gly Gly Arg Pro Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg
100          105         110

```

Leu Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala
 115 120 125

Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr
 130 135 140

Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser
 145 150 155 160

Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro
 165 170 175

Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Ala Leu
 180 185 190

Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asp Pro Arg Asn
 195 200 205

His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu
 210 215 220

Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu
 225 230 235 240

Ala Trp Gly Arg Ala Asp
 245

<210> 149

<211> 741

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 149

atgaacgctg gtgtcactca gacccccaaaa ttccagggtcc tgaagacagg acagagcatg 60

acactgcagt gtgcccagga tatgaaccat gaatacatgt cctgggtatcg acaagaccca 120

ggcatggggc tgaggctgat tcattactca gttggtgctg gtatcactga ccaaggagaa 180

gtccccaatg gctacaatgt ctccagatca accacagagg atttcccgt caggctgctg 240

tcggctgctc cctcccagac atctgtgtac ttctgtgcca gcaggccggg actagcggga 300

gggcgaccag agcagtactt cgggccgggc accagggtca cggtcacaga ggacctgaaa 360

aacgtgttcc caccagagg cgctgtgttt gagccatcag aagcagagat ctcccacacc 420

caaaaggcca cactggtgtg cctggccaca ggcttctacc ccgaccacgt ggagctgagc 480

tgggtgggtga atgggaagga ggtgcacagt ggggtcagca cagacccgca gcccctcaag 540

gagcagcccg ccctcaatga ctccagatac gctctgtgta gccgcctgag ggtctcggcc 600

accttctggc aggacccccg caaccacttc cgctgtcaag tccagttcta cgggctctcg 660
 gagaatgacg agtggaccca ggatagggcc aaacccgtca cccagatcgt cagcgccgag 720
 gcctggggta gagcagacta a 741

<210> 150
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 150

Met Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu Lys Thr
 1 5 10 15

Gly Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr
 20 25 30

Met Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu Ile His
 35 40 45

Tyr Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro Asn Gly
 50 55 60

Tyr Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Leu Leu
 65 70 75 80

Ser Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser Arg Pro
 85 90 95

Gly Leu Ala Gly Gly Arg Pro Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg
 100 105 110

Leu Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala
 115 120 125

Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr
 130 135 140

Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser
 145 150 155 160

Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro
 165 170 175

Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Ala Leu
 180 185 190

Cys Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asp Pro Arg Asn
 195 200 205

His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu
 210 215 220

Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu
 225 230 235 240

Ala Trp Gly Arg Ala Asp
 245

<210> 151
 <211> 741
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 151
 atgaacgctg gtgtcactca gacccccaaaa ttccaggtcc tgaagacagg acagagcatg 60
 acactgcagt gtgcccagga tatgaaccat gaatacatgt cctggtatcg acaagaccca 120
 ggcattggggc tgaggctgat tcattactca gttggtgctg gtatcactga ccaaggagaa 180
 gtccccaatg gctacaatgt ctccagatca accacagagg atttcccgtc caggctgctg 240
 tcggctgctc cctcccagac atctgtgtac ttctgtgcca gcaggccggg actagcggga 300
 gggcgaccag agcagtactt cgggccgggc accaggctca cggtcacaga ggacctgaaa 360
 aacgtgttcc cacccgaggt cgctgtgttt gagccatgtg aagcagagat ctccacacc 420
 caaaaggcca cactggtgtg cctggccaca ggcttctacc ccgaccacgt ggagctgagc 480
 tgggtgggtga atgggaagga ggtgcacagt ggggtcagca cagaccgca gccctcaag 540
 gagcagcccg ccctcaatga ctccagatac gctctgagca gccgcctgag ggtctcggcc 600
 accttctggc aggacccccg caaccacttc cgctgtcaag tccagttcta cgggctctcg 660
 gagaatgacg agtggacca ggatagggcc aaaccctgca cccagatcgt cagcgccgag 720
 gcctggggta gagcagacta a 741

<210> 152
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 152

Met Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu Lys Thr
 1 5 10 15

Gly Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr
20 25 30

Met Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu Ile His
35 40 45

Tyr Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro Asn Gly
50 55 60

Tyr Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Leu Leu
65 70 75 80

Ser Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser Arg Pro
85 90 95

Gly Leu Ala Gly Gly Arg Pro Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg
100 105 110

Leu Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala
115 120 125

Val Phe Glu Pro Cys Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr
130 135 140

Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser
145 150 155 160

Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro
165 170 175

Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Ala Leu
180 185 190

Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asp Pro Arg Asn
195 200 205

His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu
210 215 220

Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu
225 230 235 240

Ala Trp Gly Arg Ala Asp
245

<210> 153
 <211> 741
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 153
 atgaacgctg gtgtcactca gaccccaaaa ttccagggtcc tgaagacagg acagagcatg 60
 aactgcagt gtgccagga tatgaaccat gaatacatgt cctgggtatcg acaagaccca 120
 ggcatggggc tgaggctgat tcattactca gttggtgctg gtatcactga ccaaggagaa 180
 gtccccaatg gctacaatgt ctccagatca accacagagg atttcccgt caggctgctg 240
 tcggctgctc cctcccagac atctgtgtac ttctgtgcca gcaggccggg actagcggga 300
 gggcgaccag agcagtactt cgggccgggc accagggtca cggtcacaga ggacctgaaa 360
 aacgtgttcc cacccgagggt cgcttgtttt gagccatcag aagcagagat ctccacacc 420
 caaaaggcca cactggtgtg cctggccaca ggcttctacc ccgaccacgt ggagctgagc 480
 tgggtgggtga atgggaagga ggtgcacagt ggggtcagca cagacccgca gccctcaag 540
 gagcagcccc ccctcaatga ctccagatac gctctgagca gccgcctgag ggtctcggcc 600
 accttctggc aggacccccg caaccacttc cgctgtcaag tccagttcta cgggctctcg 660
 gagaatgacg agtggaccca ggatagggcc aaaccgtca cccagatcgt cagcgccgag 720
 gcctggggta gagcagacta a 741

<210> 154
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 154

Met Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu Lys Thr
 1 5 10 15

Gly Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr
 20 25 30

Met Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu Ile His
 35 40 45

Tyr Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro Asn Gly
 50 55 60

Tyr Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Leu Leu
 65 70 75 80

Ser Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser Arg Pro

85					90					95					
Gly	Leu	Ala	Gly	Gly	Arg	Pro	Glu	Gln	Tyr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Arg
			100					105					110		
Leu	Thr	Val	Thr	Glu	Asp	Leu	Lys	Asn	Val	Phe	Pro	Pro	Glu	Val	Ala
		115					120					125			
Cys	Phe	Glu	Pro	Ser	Glu	Ala	Glu	Ile	Ser	His	Thr	Gln	Lys	Ala	Thr
	130					135					140				
Leu	Val	Cys	Leu	Ala	Thr	Gly	Phe	Tyr	Pro	Asp	His	Val	Glu	Leu	Ser
145					150					155					160
Trp	Trp	Val	Asn	Gly	Lys	Glu	Val	His	Ser	Gly	Val	Ser	Thr	Asp	Pro
			165						170					175	
Gln	Pro	Leu	Lys	Glu	Gln	Pro	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Arg	Tyr	Ala	Leu
		180						185					190		
Ser	Ser	Arg	Leu	Arg	Val	Ser	Ala	Thr	Phe	Trp	Gln	Asp	Pro	Arg	Asn
		195					200					205			
His	Phe	Arg	Cys	Gln	Val	Gln	Phe	Tyr	Gly	Leu	Ser	Glu	Asn	Asp	Glu
	210					215					220				
Trp	Thr	Gln	Asp	Arg	Ala	Lys	Pro	Val	Thr	Gln	Ile	Val	Ser	Ala	Glu
225					230					235					240
Ala	Trp	Gly	Arg	Ala	Asp										
				245											

<210> 155

<211> 741

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 155

atgaacgctg gtgtcactca gacccccaaaa ttccagggtcc tgaagacagg acagagcatg	60
acactgcagt gtgcccagga tatgaaccat gaatacatgt cctgggtatcg acaagaccca	120
ggcatggggc tgaggctgat tcattactca gttgggtgctg gtatcactga ccaaggagaa	180
gtccccaatg gctacaatgt ctccagatca accacagagg atttcccgtc caggctgctg	240
tcggctgctc cctcccagac atctgtgtac ttctgtgcca gcaggccggg actagcgggg	300
gggcgaccag agcagtactt cgggcccgggc accagggtca cggtcacaga ggacctgaaa	360

```

aacgtgttcc caccgaggt cgctgtgttt gagccatcag aagcagagat ctccacacc 420
caaaaggcca cactggtgtg cctggccaca ggcttctacc ccgaccacgt ggagctgagc 480
tggtgggtga atgggaagga ggtgcacagt ggggtcagca catgcccgca gccctcaag 540
gagcagcccc ccctcaatga ctccagatac gctctgagca gccgcctgag ggtctcggcc 600
accttctggc aggacccccg caaccacttc cgctgtcaag tccagttcta cgggctctcg 660
gagaatgacg agtggaccca ggatagggcc aaacccgtca cccagatcgt cagcgccgag 720
gcctggggta gagcagacta a 741

```

<210> 156

<211> 246

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 156

```

Met Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu Lys Thr
1           5           10           15

```

```

Gly Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr
20           25           30

```

```

Met Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu Ile His
35           40           45

```

```

Tyr Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro Asn Gly
50           55           60

```

```

Tyr Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Leu Leu
65           70           75           80

```

```

Ser Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser Arg Pro
85           90           95

```

```

Gly Leu Ala Gly Gly Arg Pro Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg
100          105          110

```

```

Leu Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala
115          120          125

```

```

Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr
130          135          140

```

```

Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser
145          150          155          160

```

Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Cys Pro
 165 170 175

Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Ala Leu
 180 185 190

Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asp Pro Arg Asn
 195 200 205

His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu
 210 215 220

Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu
 225 230 235 240

Ala Trp Gly Arg Ala Asp
 245

<210> 157

<211> 741

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 157

atgaacgctg gtgtcactca gacccccaaa ttccaggtcc tgaagacagg acagagcatg	60
acactgcagt gtgcccagga tatgaaccat gaatacatgt cctgggtatcg acaagaccca	120
ggcatggggc tgaggctgat tcattactca gttgggtgctg gtatcactga ccaaggagaa	180
gtccccaatg gctacaatgt ctccagatca accacagagg atttcccgtc caggctgctg	240
tcggctgctc cctcccagac atctgtgtac ttctgtgcca gcaggccggg actagcggga	300
gggcgaccag agcagtactt cgggccgggc accagggtca cggtcacaga ggacctgaaa	360
aacgtgttcc caccgaggt cgctgtgttt gagccatcag aagcagagat ctcccacacc	420
caaaaggcca cactggtgtg cctggccaca ggcttctacc ccgaccacgt ggagctgagc	480
tggtgggtga atgggaagga ggtgcacagt ggggtcagca cagacccgca gccctcaag	540
gagcagcccg ccctcaatga ctccagatac gctctgagca gctgcctgag ggtctcggcc	600
accttctggc aggacccccg caaccacttc cgctgtcaag tccagttcta cgggctctcg	660
gagaatgacg agtggaccca ggatagggcc aaaccgctca cccagatcgt cagcgccgag	720
gcctggggta gagcagacta a	741

<210> 158

<211> 246

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 158

Met Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu Lys Thr
 1 5 10 15

Gly Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr
 20 25 30

Met Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu Ile His
 35 40 45

Tyr Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro Asn Gly
 50 55 60

Tyr Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Leu Leu
 65 70 75 80

Ser Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser Arg Pro
 85 90 95

Gly Leu Ala Gly Gly Arg Pro Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg
 100 105 110

Leu Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala
 115 120 125

Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr
 130 135 140

Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser
 145 150 155 160

Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro
 165 170 175

Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Ala Leu
 180 185 190

Ser Ser Cys Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asp Pro Arg Asn
 195 200 205

His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu
 210 215 220

Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu

225 '230 235 240

Ala Trp Gly Arg Ala Asp
245

```
<210> 159
<211> 741
<212> DNA
<213> Homo sapiens
```

<400>	159						
atgaacgctg	gtgtcactca	gacccccaaa	ttccagggtcc	tgaagacagg	acagagcatg		60
acactgcagt	gtgcccagga	tatgaaccat	gaatacatgt	cctgggtatcg	acaagaccca		120
ggcatggggc	tgaggctgat	tcattactca	gttgggtgctg	gtatcactga	ccaaggagaa		180
gtccccaatg	gctacaatgt	ctccagatca	accacagagg	atttcccgct	caggctgctg		240
tcggctgctc	cctcccagac	atctgtgtac	ttctgtgcca	gcaggccggg	actagcggga		300
gggcgaccag	agcagtactt	cgggccgggc	accagggtca	cggtcacaga	ggacctgaaa		360
aacgtgttcc	cacccgaggt	cgctgtgtgt	gagccatcag	aagcagagat	ctccacacc		420
caaaaggcca	cactgggtgtg	cctggccaca	ggcttctacc	ccgaccacgt	ggagctgagc		480
tggtgggtga	atgggaagga	ggtgcacagt	ggggtcagca	cagacccgca	gcccctcaag		540
gagcagcccc	ccctcaatga	ctccagatac	gctctgagca	gccgcctgag	ggtctcggcc		600
accttctggc	aggacccccg	caaccacttc	cgctgtcaag	tccagttcta	cgggctctcg		660
gagaatgacg	agtggaccca	ggatagggcc	aaacccgtca	cccagatcgt	cagcgccgag		720
gcctggggta	gagcagacta	a					741

```
<210> 160
<211> 246
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 160

Met Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu Lys Thr
1 5 10 15

Gly Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr
20 25 30

Met Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu Ile His
35 40 45

Tyr Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro Asn Gly
50 55 60

Tyr Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Leu Leu
65 70 75 80

Ser Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser Arg Pro
85 90 95

Gly Leu Ala Gly Gly Arg Pro Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg
100 105 110

Leu Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala
115 120 125

Val Cys Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr
130 135 140

Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser
145 150 155 160

Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro
165 170 175

Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Ala Leu
180 185 190

Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asp Pro Arg Asn
195 200 205

His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu
210 215 220

Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu
225 230 235 240

Ala Trp Gly Arg Ala Asp
245

<210> 161

<211> 741

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 161

atgaacgctg gtgtcactca gacccccaaa ttccaggtcc tgaagacagg acagagcatg 60

acactgcagt gtgcccagga tatgaaccat gaatacatgt cctgggtatcg acaagaccca 120

ggcatggggc tgaggctgat tcattactca gttgggtgctg gtatcactga ccaaggagaa 180

```

gtccccaatg gctacaatgt ctccagatca accacagagg atttcccgct caggctgctg 240
tcggctgctc cctcccagac atctgtgtac ttctgtgcca gcaggccggg actagcggga 300
gggcgaccag agcagtactt cgggccgggc accagggtca cggtcacaga ggacctgaaa 360
aacgtgttcc cacccgaggt cgctgtgttt gagccatcag aagcagagat ctcccacacc 420
caaaaggcca cactgggtgtg cctggccaca ggcttctacc cggaccacgt ggagctgagc 480
tggtgggtga atgggaagga ggtgcacagt tgtgtcagca cagaccgca gccctcaag 540
gagcagcccg ccctcaatga ctccagatac gctctgagca gccgcctgag ggtctcggcc 600
accttctggc aggacccccg caaccacttc cgctgtcaag tccagttcta cgggctctcg 660
gagaatgacg agtggacca ggatagggcc aaaccgctca cccagatcgt cagcgccgag 720
gcctggggta gagcagacta a 741

```

<210> 162

<211> 246

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 162

```

Met Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu Lys Thr
1           5           10           15

```

```

Gly Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr
          20           25           30

```

```

Met Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu Ile His
          35           40           45

```

```

Tyr Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro Asn Gly
          50           55           60

```

```

Tyr Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Leu Leu
65           70           75           80

```

```

Ser Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser Arg Pro
          85           90           95

```

```

Gly Leu Ala Gly Gly Arg Pro Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg
          100           105           110

```

```

Leu Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala
          115           120           125

```

Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr
130 135 140

Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser
145 150 155 160

Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Cys Val Ser Thr Asp Pro
165 170 175

Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Ala Leu
180 185 190

Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asp Pro Arg Asn
195 200 205

His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu
210 215 220

Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu
225 230 235 240

Ala Trp Gly Arg Ala Asp
245

<210> 163

<211> 741

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 163

atgaacgctg gtgtcactca gacccccaaa ttccaggtcc tgaagacagg acagagcatg	60
acactgcagt gtgcccagga tatgaaccat gaatacatgt cctggatatcg acaagaccca	120
ggcatggggc tgaggctgat tcattactca gttgggtgctg gtatcactga ccaaggagaa	180
gtccccaatg gctacaatgt ctccagatca accacagagg atttcccgtc caggctgctg	240
tcggctgctc cctcccagac atctgtgtac ttctgtgccg gcaggccggg actagcggga	300
gggcgaccag agcagtactt cgggccgggc accaggctca cggtcacaga ggacctgaaa	360
aacgtgttcc caccgaggt cgctgtgttt gagccatcag aagcagagat ctcccacacc	420
caaaaggcca cactggtgtg cctggccaca ggcttctacc cgcaccacgt ggagctgagc	480
tggtgggtga atgggaagga ggtgcacagt ggggtcagca cagaccgca gccctgcaag	540
gagcagcccc ccctcaatga ctccagatac gctctgagca gccgcctgag ggtctcggcc	600
accttctggc aggacccccg caaccacttc cgctgtcaag tccagttcta cgggctctcg	660
gagaatgacg agtggaccca ggatagggcc aaaccgctca cccagatcgt cagcgccgag	720

gcctggggta gacgagacta a

741

<210> 164
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 164

Met Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu Lys Thr
 1 5 10 15

Gly Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr
 20 25 30

Met Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu Ile His
 35 40 45

Tyr Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro Asn Gly
 50 55 60

Tyr Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Leu Leu
 65 70 75 80

Ser Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser Arg Pro
 85 90 95

Gly Leu Ala Gly Gly Arg Pro Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg
 100 105 110

Leu Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala
 115 120 125

Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr
 130 135 140

Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser
 145 150 155 160

Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro
 165 170 175

Gln Pro Cys Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Ala Leu
 180 185 190

Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asp Pro Arg Asn
 195 200 205

His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu
 210 215 220

Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu
 225 230 235 240

Ala Trp Gly Arg Ala Asp
 245

<210> 165
 <211> 741
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 165
 atgaacgctg gtgtcactca gacccccaaa ttccaggtcc tgaagacagg acagagcatg 60
 acactgcagt gtgcccagga tatgaaccat gaatacatgt cctggatatcg acaagaccca 120
 ggcatggggc tgaggctgat tcattactca gttgggtgctg gtatcactga ccaaggagaa 180
 gtccccaatg gctacaatgt ctccagatca accacagagg atttcccgct caggctgctg 240
 tcggctgctc cctcccagac atctgtgtac ttctgtgcca gcaggccggg actagcggga 300
 gggcgaccag agcagtactt cgggccgggc accaggctca cggtcacaga ggacctgaaa 360
 aacgtgttcc cacccgaggt cgctgtgttt tgtccatcag aagcagagat ctcccacacc 420
 caaaaggcca cactgggtgtg cctggccaca ggcttctacc ccgaccacgt ggagctgagc 480
 tggtgggtga atgggaagga ggtgcacagt ggggtcagca cagacccgca gccctcaag 540
 gagcagcccc ccctcaatga ctccagatac gctctgagca gccgcctgag ggtctcggcc 600
 accttctggc aggacccccg caaccacttc cgctgtcaag tccagttcta cgggctctcg 660
 gagaatgacg agtggacca ggatagggcc aaaccctgca cccagatcgt cagcgccgag 720
 gcctggggta gagcagacta a 741

<210> 166
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 166

Met Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu Lys Thr
 1 5 10 15

Gly Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr
 20 25 30

Met Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu Ile His
 35 40 45

Tyr Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro Asn Gly
 50 55 60

Tyr Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Leu Leu
 65 70 75 80

Ser Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser Arg Pro
 85 90 95

Gly Leu Ala Gly Gly Arg Pro Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg
 100 105 110

Leu Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala
 115 120 125

Val Phe Cys Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr
 130 135 140

Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser
 145 150 155 160

Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro
 165 170 175

Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Ala Leu
 180 185 190

Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asp Pro Arg Asn
 195 200 205

His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu
 210 215 220

Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu
 225 230 235 240

Ala Trp Gly Arg Ala Asp
 245

<210> 167

<211> 783

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 167

```

atgggtgtca ctcagacccc aaaattccag gtcctgaaga caggacagag catgacactg      60
cagtgtgccc aggatatgaa ccatgaatac atgtcctggt atcgacaaga cccaggcatg      120
gggctgaggc tgattcatta ctcagttggt gctggtatca ctgaccaagg agaagtcccc      180
aatggctaca atgtctccag atcaaccaca gaggatttcc cgctcaggct gctgtcggct      240
gctccctccc agacatctgt gtacttctgt gccagcagtt acgtcgggaa caccggggag      300
ctgttttttg gagaaggctc taggctgacc gtactggagg acctgaaaaa cgtgttccca      360
cccagagtcg ctgtgtttga gccatcagaa gcagagatct cccacacca aaaggccaca      420
ctgggtgtgcc tggccacagg cttctacccc gaccacgtgg agctgagctg gtgggtgaat      480
gggaaggagg tgcacagtgg ggtctgcaca gaccgcgagc ccctcaagga gcagcccgcc      540
ctcaatgact ccagatacgc tctgagcagc cgctgaggg tctcggccac cttctggcag      600
gacccccgca accacttccg ctgtcaagtc cagttctacg ggctctcgga gaatgacgag      660
tggaccagg atagggccaa acccgtcacc cagatcgtca gcgccgaggc ctggggtaga      720
gcagacggat ccggtggtgg tctgaacgat atttttgaag ctcagaaaat cgaatggcat      780
taa                                                                    783

```

<210> 168

<211> 260

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 168

```

Met Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu Lys Thr Gly Gln
1           5           10          15

```

```

Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr Met Ser
          20           25           30

```

```

Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr Ser
          35           40           45

```

```

Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro Asn Gly Tyr Asn
50           55           60

```

```

Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Leu Leu Ser Ala
65           70           75           80

```

```

Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Tyr Val Gly
          85           90           95

```

Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu Thr Val Leu
 100 105 110

Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro
 115 120 125

Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
 130 135 140

Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn
 145 150 155 160

Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys
 165 170 175

Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Ala Leu Ser Ser Arg Leu
 180 185 190

Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asp Pro Arg Asn His Phe Arg Cys
 195 200 205

Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp
 210 215 220

Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg
 225 230 235 240

Ala Asp Gly Ser Gly Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys
 245 250 255

Ile Glu Trp His
 260

<210> 169

<211> 762

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 169

atgggtgtca ctcagacccc aaaattccag gtcctgaaga caggacagag catgacactg 60

cagtgtgccc aggatatgaa ccatgaatac atgtcctggt atcgacaaga cccaggcatg 120

gggctgaggc tgattcatta ctcagttggt gctggtatca ctgaccaagg agaagtcccc 180

aatggctaca atgtctccag atcaaccaca gaggatttcc cgctcaggct gctgtcggct 240

gctccctccc agacatctgt gtacttctgt gccagcagtt acgtcgggaa caccggggag 300

ctgttttttg gagaaggctc taggctgacc gtactggagg acctgaaaaa cgtgttccca 360
 cccgagggtcg ctgtgtttga gccatcagaa gcagagatct cccacaccca aaaggccaca 420
 ctggtgtgcc tggccacagg cttctacccc gaccacgtgg agctgagctg gtgggtgaat 480
 gggaaggagg tgcacagtgg ggtctgcaca gaccgcgagc ccctcaagga gcagcccgcc 540
 ctcaatgact ccagatacgc tctgagcagc cgcctgaggg tctcgccac cttctggcag 600
 gacccccgca accacttccg ctgtcaagtc cagttctacg ggctctcgga gaatgacgag 660
 tggacccagg atagggccaa acccgtcacc cagatcgtca gcgccgagggc ctggggtaga 720
 gcagacggat ccggtggtgg tcatcatcac catcatcact aa 762

<210> 170

<211> 253

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 170

Met Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu Lys Thr Gly Gln
 1 5 10 15

Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr Met Ser
 20 25 30

Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr Ser
 35 40 45

Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro Asn Gly Tyr Asn
 50 55 60

Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Leu Leu Ser Ala
 65 70 75 80

Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Tyr Val Gly
 85 90 95

Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu Thr Val Leu
 100 105 110

Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro
 115 120 125

Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
 130 135 140

Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn

145		150		155		160
Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys						
	165		170		175	
Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Ala Leu Ser Ser Arg Leu						
	180		185		190	
Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asp Pro Arg Asn His Phe Arg Cys						
	195		200		205	
Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp						
	210		215		220	
Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg						
	225		230		235	240
Ala Asp Gly Ser Gly Gly Gly His His His His His His						
	245		250			

<210> 171

<211> 741

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 171

```

atgaacgctg gtgtcactca gacccccaaaa ttccaggtcc tgaagacagg acagagcatg      60
acactgcagt gtgcccagga tatgaacat gaatacatgt cctggtatcg acaagaccca      120
ggcatggggc tgaggctgat tcattactca gttgggtgctg gtatcactga ccaaggagaa      180
gtccccaatg gctacaatgt ctccagatca accacagagg atttcccgt caggctgctg      240
tcggctgctc cctcccagac atctgtgtac ttctgtgcca gcaggccggg actagcggga      300
gggcgaccag agcagtactt cgggccgggc accaggctca cggtcacaga ggacctgaac      360
aagggtgttcc caccgaggt cgctgtgttt gagccatcag aagcagagat ctccacacc      420
caaaaggcca cactggtgtg cctggccaca ggcttcttcc cggaccacgt ggagctgagc      480
tggtgggtga atgggaagga ggtgcacagt ggggtctgca cagaccgca gcccctcaag      540
gagcagcccg cctcaatga ctccagatac tctctgagca gccgcctgag ggtctcggcc      600
accttctggc aggacccccg caaccacttc cgctgtcaag tccagttcta cgggctctcg      660
gagaatgacg agtggaccca ggatagggcc aaaccgctca cccagatcgt cagcgccgag      720
gcctggggta gagcagacta a                                     741

```

<210> 172

<211> 741
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 172
 atgaacgctg gtgtcactca gacccccaaaa ttccagggtcc tgaagacagg acagagcatg 60
 aactgcagt gtgcccagga tatgaaccat gaatacatgt cctgggtatcg acaagaccca 120
 ggcatggggc tgaggctgat tcattactca gttgggtgctg gtatcactga ccaaggagaa 180
 gtccccaatg gctacaatgt ctccagatca accacagagg atttcccgt caggctgctg 240
 tcggctgctc cctcccagac atctgtgtac ttctgtgcca gcaggccggg actagcggga 300
 gggcgaccag agcagtactt cgggccgggc accaggctca cggtcacaga ggacctgaaa 360
 aacgtgttcc cacccgaggt cgctgtgttt gagccatcag aagcagagat ctcccacacc 420
 caaaaggcca cactggtgtg cctggccaca ggcttctacc ccgaccacgt ggagctgagc 480
 tgggtgggtga atgggaagga ggtgcacagt ggggtctgca cagaccgcga gccctcaag 540
 gagcagcccg ccctcaatga ctccagatac tgtctgagca gccgcctgag ggtctcggcc 600
 accttctggc aggacccccg caaccacttc cgctgtcaag tccagttcta cgggctctcg 660
 gagaatgacg agtggaccca ggatagggcc aaaccgctca cccagatcgt cagcgccgag 720
 gcctggggta gagcagacta a 741

<210> 173
 <211> 741
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 173
 atgaacgctg gtgtcactca gacccccaaaa ttccagggtcc tgaagacagg acagagcatg 60
 aactgcagt gtgcccagga tatgaaccat gaatacatgt cctgggtatcg acaagaccca 120
 ggcatggggc tgaggctgat tcattactca gttgggtgctg gtatcactga ccaaggagaa 180
 gtccccaatg gctacaatgt ctccagatca accacagagg atttcccgt caggctgctg 240
 tcggctgctc cctcccagac atctgtgtac ttctgtgcca gcaggccggg actagcggga 300
 gggcgaccag agcagtactt cgggccgggc accaggctca cggtcacaga ggacctgaaa 360
 aacgtgttcc cacccgaggt cgctgtgttt gagccatcag aagcagagat ctcccacacc 420
 caaaaggcca cactggtgtg cctggccaca ggcttctacc ccgaccacgt ggagctgagc 480
 tgggtgggtga atgggaagga ggtgcacagt ggggtctgca cagaccgcga gccctcaag 540
 gagcagcccg ccctcaatga ctccagatac tctctgagca gccgcctgag ggtctcggcc 600
 accttctggc aggacccccg caaccacttc cgctgtcaag tccagttcta cgggctctcg 660
 gagaatgacg agtggaccca ggatagggcc aaaccgctca cccagatcgt cagcgccgag 720

gcctggggta gagcagacta a

741

<210> 174

<211> 6671

<212> DNA

<213> Expression vector pYX112

<400> 174

gaattcacca tggatcctag ggcccacaag cttacgcgtc gaccgggta tccgtatgat	60
gtgcctgact acgcatgata tctcgagctc agctagctaa ctgaataagg aacaatgaac	120
gtttttcctt tctcttggtc ctagtattaa tgactgaccg atacatccct tttttttttt	180
gtctttgtct agctccagct tttgttccct ttagtgaggg ttaattcaat tcactggccg	240
tcgttttaca acgtcgtgac tgggaaaacc ctggcggttac ccaacttaat cgccttgcat	300
cacatcccc tttcgccagc tggcgtaata gcgaagaggc ccgcaccgat cgccttccc	360
aacagttgct cagcctgaat ggcgatggc gcgacgcgcc ctgtagcggc gcattaagcg	420
cggcgggtgt ggtggttacg cgcagcgtga ccgctacact tgccagcgcc ctagcgcccc	480
ctcctttcgc tttcttccct tcctttctcg ccacgttcgc cggtttccc cgtcaagctc	540
taaatcgggg gctcccttta gggttccgat ttagtggttt acggcacctc gaccccaaaa	600
aacttgatta gggatgatgt tcacgtatgt ggccatcgcc ctgatagacg gtttttcgcc	660
ctttgacgtt ggagtccacg ttctttaata gtggactctt gttccaaact ggaacaacac	720
tcaaccctat ctcggtctat tcttttgatt tataagggat ttgcccatt tcggcctatt	780
ggttaaaaaa tgagctgatt taacaaaaat ttaacgcgaa ttttaacaaa atattaacgt	840
ttacaatttc ctgatgcggt attttctcct tacgcatctg tgcggtatct cacaccgcat	900
agggtataaa ctgatataat taaattgaag ctctaatttg tgagtttagt atacatgcat	960
ttacttataa tacagttttt tagttttgct ggccgcatct tctcaaatat gcttcccagc	1020
ctgcttttct gtaacgttca cctgtacct tagcatccct tccctttgca aatagtcctc	1080
ttccaacaat aataatgtca gatcctgtag agaccacatc atccacgggt ctatactgtt	1140
gacccaatgc gtctcccttg tcatctaaac ccacaccggg tgtcataatc aaccaatcgt	1200
aaccttcac tcttccaccc atgtctcttt gagcaataaa gccgataaca aaatctttgt	1260
cgctcttcgc aatgtcaaca gtacccttag tatattctcc agtagatagg gagcccttgc	1320
atgacaattc tgctaacatc aaaaggcctc taggttccct tgttacttct tctgccgcct	1380
gcttcaaacc gctaacaata cctggcccca gcacaccgtg tgcattcgta atgtctgccc	1440
attctgctat tctgtataca cccgcagagt actgcaattt gactgtatta ccaatgtcag	1500
caaattttct gtcttcgaag agtaaaaaat tgtacttggc ggataatgcc tttagcggct	1560

taactgtgcc	ctccatcgaa	aaatcagtc	atatatccac	atgtgttttt	agtaaacaaa	1620
ttttgggacc	taatgcttca	actaactcca	gtaattcctt	ggtggtacga	acatccaatg	1680
aagcacacaa	gtttgtttgc	ttttcgtgca	tgatattaaa	tagcttggca	gcaacaggac	1740
taggatgagt	agcagcacgt	tccttatatg	tagctttcga	catgatttat	cttcgtttcc	1800
tgcaggtttt	tgttctgtgc	agttgggtta	agaatactgg	gcaatttcac	gtttcttcaa	1860
cactacatat	gcgtatatat	accaatctaa	gtctgtgctc	cttccttcgt	tcttccttct	1920
gttcggagat	taccgaatca	aaaaaatctc	aaagaaaccg	aatcaaaaa	aaagaataaa	1980
aaaaaatga	tgaattgaat	tgaaaagctg	tggtatggcg	cactctcagt	acaatctgct	2040
ctgatgccgc	atagttaagc	cagccccgac	accgcaccaac	accgctgac	gcgccctgac	2100
gggcttgtct	gctcccgga	tccgcttaca	gacaagctgt	gaccgtctcc	gggagctgca	2160
tgtgtcagag	gttttcaccg	tcattcaccga	aacgcgcgag	acgaaagggc	ctcgtgatac	2220
gcctattttt	ataggttaat	gtcatgataa	taatggtttc	ttaggacgga	tcgcttgcc	2280
gtaacttaca	cgcgctcgt	atcttttaat	gatggaataa	tttggaatt	tactctgtgt	2340
ttatttattt	ttatgttttg	tatttggtt	ttagaaagta	aataaagaag	gtagaagagt	2400
tacggaatga	agaaaaaaaa	ataaacaaag	gtttaaaaaa	tttcaacaaa	aagcgtactt	2460
tacatatata	tttattagac	aagaaaagca	gattaaatag	atatacattc	gattaacgat	2520
aagtaaaatg	taaaatcaca	ggattttcgt	gtgtggtcct	ctacacagac	aagatgaaac	2580
aattcggcat	taataacctga	gagcaggaag	agcaagataa	aaggtagtat	ttgttggcga	2640
tccccctaga	gtcttttaca	tcttcggaaa	acaaaaacta	ttttttcttt	aatttctttt	2700
tttactttct	atttttaatt	tatatattta	tattaaaaaa	tttaaattat	aattattttt	2760
atagcacgtg	atgaaaagga	cccagggtgg	acttttcggg	gaaatgtgcg	cggaaccctt	2820
atgtgtttat	ttttctaaat	acattcaa	atgtatccgc	tcattgagaca	ataaccgtga	2880
taaatgcttc	aataatattg	aaaaaggaag	agtatgagta	ttcaacattt	ccgtgtcgcc	2940
cttattccct	tttttgcggc	attttgcctt	cctgtttttg	ctcaccacga	aacgctggtg	3000
aaagtaaaag	atgctgaaga	tcagttgggt	gcacgagtg	gttacatcga	actggatctc	3060
aacagcggta	agatccttga	gagttttcgc	cccgaagaac	gttttccaat	gatgagcact	3120
tttaaagtcc	tgctatgtgg	cgcggtatta	ttccgtattg	acgcggggca	agagcaactc	3180
gctcgccgca	tacactattc	tcagaatgac	ttggttgagt	actcaccagt	cacagaaaag	3240
catcttacgg	atggcatgac	agtaagagaa	ttatgcagtg	ctgccataac	catgagtgat	3300
aacactgcgg	ccaacttact	tctgacaacg	atcggaggac	cgaaggagct	aaccgctttt	3360

ttggacaaca	tgggggatca	tgtaactcgc	cttgatcggt	gggaaccgga	gctgaatgaa	3420
gccataccaa	acgacgagcg	tgacaccacg	atgcctgtag	caatggcaac	aacgttgcg	3480
aaactattaa	ctggcgaact	acttactcta	gcttcccggc	aacaattaat	agactggatg	3540
gaggcgata	aagttgcagg	accacttctg	cgctcggccc	ttccggctgg	ctggtttatt	3600
gctgataaat	ctggagccgg	tgagcgtggg	tctcgcggta	tcattgcagc	actggggcca	3660
gatggtaagc	cctcccgat	cgtagttatc	tacacgacgg	ggagtcaggc	aactatggat	3720
gaacgaaata	gacagatcgc	tgagataggt	gcctcactga	ttaagcattg	gtaactgtca	3780
gaccaagttt	actcatatat	actttagatt	gatttaaaac	ttcattttta	atttaaaagg	3840
atctaggtga	agatcctttt	tgataatctc	atgacaaaaa	tcctttaacg	tgagttttcg	3900
ttccactgag	cgtcagaccc	cgtagaaaag	atcaaaggat	cttcttgaga	tccttttttt	3960
ctgcgcgtaa	tctgctgctt	gcaaacaaaa	aaaccaccgc	taccagcggg	ggtttggttg	4020
ccggatcaag	agctaccaac	tctttttccg	aaggtaactg	gcttcagcag	agcgcagata	4080
ccaaataactg	tccttctagt	gtagccgtag	ttaggccacc	acttcaagaa	ctctgtagca	4140
ccgectacat	acctcgctct	gctaaccctg	ttaccagtgg	ctgctgccag	tggcgataag	4200
tcgtgtctta	ccgggttgga	ctcaagacga	tagttaccgg	ataaggcgca	gcggtcgggc	4260
tgaacggggg	gttcgtgcac	acagcccagc	ttggagcgaa	cgacctacac	cgaactgaga	4320
tacctacagc	gtgagctatg	agaaagcgcc	acgcttcccc	aaggagagaa	ggcggacagg	4380
tatecggtaa	gcggcagggg	cggaacagga	gagcgcacga	gggagcttcc	agggggaaac	4440
gcctggtatc	tttatagtcc	tgtcgggttt	cgccacctct	gacttgagcg	tcgatttttg	4500
tgatgctcgt	cagggggg	gagcctatgg	aaaaacgcca	gcaacgcggc	ctttttacgg	4560
ttcctggcct	tttgctggcc	ttttgctcac	atgttctttc	ctgcgttatc	ccctgattct	4620
gtggataacc	gtattaccgc	ctttgagtga	gctgataccg	gtcgccgcag	ccgaacgacc	4680
gagcgcagcg	agtcagttag	cgaggaagcg	gaagagcgcc	caatacgcaa	accgcctctc	4740
cccgcgcgtt	ggccgattca	ttaatgcagc	tggcacgaca	ggtttcccg	ctggaaagcg	4800
ggcagtgagc	gcaacgcaat	taatgtgagt	tacctcactc	attaggcacc	ccaggcttta	4860
cactttatgc	ttccggctcc	tatgttgtgt	ggaattgtga	gcggataaca	atttcacaca	4920
ggaaacagct	atgaccatga	ttacgccaag	ctcgaaatac	gactcactat	agggcggaatt	4980
gggtaccggg	ccggccgtcg	agcttgatgg	catcggtgtg	tcacgctcgt	cgtttggtat	5040
ggcttcattc	agctccggtt	cccaacgatc	aaggcgagtt	acatgatccc	ccatgttgtg	5100
aaaaaaagcg	gttagctctt	cggtcctccg	atcgttgtca	gaagtaagtt	ggccgcagtg	5160
ttatcactca	tggttatggc	aggaactgca	taattctctt	actgtcatgc	catccgtaag	5220

```

atgcttttct gtgactgggtg tactcaacca agtcattctg agaatagtgt atgcggcgac 5280
cgagttgctc ttgcccggcg tcaacacggg ataataccgc gccacatagc agaactttaa 5340
aagtgctcat cattggaaaa cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt 5400
tgagatccag ttcgatgtaa cccactcgtg cacccaactg atcttcagca tcttttactt 5460
tcaccagcgt ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggaataa 5520
gggcgacacg gaaatgttga atactcatac tcttcctttt tcaatattat tgaagcattt 5580
atcaggggta ttgtctcatg agcgatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat 5640
aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgac gtctaagaaa ccattattat 5700
catgacatta acctataaaa ataggcgat cagaggccc tttcgtcttc aagaattggg 5760
gatctacgta tggtcattct tcttcagatt ccctcatgga gaagtgcggc agatgtatat 5820
gacagagtcg ccagtttcca agagacttta ttcaggcact tccatgatag gcaagagaga 5880
agaccagag atgttggtgt cctagttaca catgggtattt attccagagt attcctgatg 5940
aatgggttta gatggacata cgaagagttt gaatcgttta ccaatgttcc taacgggagc 6000
gtaatgggtga tggaactgga cgaatccatc aatagatacg tcctgaggac cgtgctaccc 6060
aatggactg attgtgaggg agacctaaact acatagtgtt taaagattac ggatatttaa 6120
cttacttaga ataatgccat ttttttgagt tataataatc ctacgttagt gtgagcggga 6180
tttaaaactgt gaggacctca atacattcag acacttctga cggtatcacc ctacttattc 6240
ccttcgagat tataatctagg aacccatcag gttgggtggaa gattaccctg tctaagactt 6300
ttcagcttcc tctattgatg ttacactcgg acaccctttt tctggcatcc agtttttaat 6360
cttcagtggc atgtgagatt ctccgaaatt aattaaagca atcacacaat tctctcggat 6420
accacctcgg ttgaaactga caggtgggtt gttacgcgtg ctaatgcaaa ggagcctata 6480
tacctttggc tcggctgctg taacaggga tataaagggc agcataattt aggagttag 6540
tgaacttgca acatttacta ttttcccttc ttacgtaa atttttcttt ttaattctaa 6600
atcaatcttt ttcaattttt tgtttgtatt cttttcttgc ttaaattctat aactacaaaa 6660
aacacataca g 6671

```

<210> 175

<211> 6743

<212> DNA

<213> Expression vector pYX122

<400> 175

gaattcacca tggatcctag ggcccacaag cttacgcgtc gaccgggta tccgtatgat 60

gtgcctgact acgcatgata tctcgagctc agctagctaa ctgaataagg aacaatgaac 120

gtttttcctt tctcttggtc ctagtattaa tgactgaccg atacatccct tttttttttt	180
gtctttgtct agctccagct tttgttccct ttagtgaggg ttaattcaat tcaactggcg	240
tcgttttaca acgtcgtgac tgggaaaacc ctggcggttac ccaacttaat cgccttgacg	300
cacatccccc tttcgccagc tggcgtaata gcgaagaggc ccgcaccgat cgcccttccc	360
aacagttgcg cagcctgaat ggcgaatggc gcgacgcgcc ctgtagcggc gcattaagcg	420
cggcgggtgt ggtggttacg cgcagcgtga ccgctacact tgccagcgcc ctagcgcccc	480
ctcctttcgc tttcttccct tcctttctcg ccacgttcgc cggctttccc cgtcaagctc	540
taaatcgggg gctcccttta gggttccgat ttagtggttt acggcacctc gaccccaaaa	600
aacttgatta gggtagtggt tcacgtagtg ggccatcgcc ctgatagacg gtttttcgcc	660
ctttgacggt ggagtcacg tcttttaata gtggactctt gttccaaact ggaacaacac	720
tcaaccctat ctcggtctat tcttttgatt tataagggat ttgccgatt tcggcctatt	780
ggttaaaaaa tgagctgatt taacaaaaat ttaacgcgaa ttttaacaaa atattaacgt	840
ttacaatttc ctgatgcggt attttctcct tacgcatctg tgcggtattt cacaccgcat	900
agatccgctg agttcaagag aaaaaaaaaag aaaaagcaaa aagaaaaaag gaaagcgcgc	960
ctcgttcaga atgacacgta tagaatgatg cattaccttg tcatcttcag tatcatactg	1020
ttcgataaca tacttactga cattcatagg tatacatata tacacatgta tatatatcgt	1080
atgctgcagc tttaaataat cgggtgcact acataagaac acctttggtg gaggggaacat	1140
cgttggttcc attgggcgag gtggcttctc ttatggcaac cgcaagagcc ttgaacgcac	1200
tctcactacg gtgatgatca ttcttgctc gcagacaatc aacgtggagg gtaattctgc	1260
ttgcctctgc aaaactttca agaaaatgcg ggatcatctc gcaagagaga tctcctactt	1320
tctccctttg caaaccaagt tcgacaaactg cgtacggcct gttcgaaaga tctaccaccg	1380
ctctggaaaag tgctcatcc aaaggcgcaa atcctgatcc aaaccttttt actccacgcg	1440
ccagtagggc ctctttaaat gcttgaccga gagcaatccc gcagtcttca gtggtgtgat	1500
ggtcgtctat gtgtaagtca ccaatgcact caacgattag cgaccagccg gaatgcttgg	1560
ccagagcatg tatcatatgg tccagaaacc ctatacctgt gtggacgtta atcacttgcg	1620
attgtgtggc ctgttctgct actggttctg cctctttttc tgggaagatc gagtgctcta	1680
tcgctagggg accagccttt aaagagatcg caatctgaat cttggtttca tttgtaatac	1740
gctttactag ggctttctgc tctgtcatct ttgccttcgt ttatcttgcc tgctcatttt	1800
ttagtatatt cttcgaagaa atcacattac tttatataat gtataattca ttatgtgata	1860
atgccaatcg ctaagaaaaa aaaagagtca tccgctaggg gaaaaaaaaa aatgaaaatc	1920

attaccgagg cataaaaaaa tatagagtgt actagaggag gccaaagagta atagaaaaag	1980
aaaattgcgg gaaaggactg tgttatgact tccctgacta atgccgtggt caaacgatac	2040
ctggcagtga ctcttagcgc tcaccaagct cttaaaacgg gaatttatgg tgcactctca	2100
gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa gccagccccg acaccgcga acaccgctg	2160
acgcgccctg acgggcttgt ctgctcccg catccgctta cagacaagct gtgaccgtct	2220
ccgggagctg catgtgtcag aggttttcac cgtcatcacc gaaacgcgcg agacgaaagg	2280
gcctcgtgat acgcctatct ttataggcta atgtcatgat aataatgggt tcttaggacg	2340
gatcgcttgc ctgtaactta cagcgcctc gtatctttta atgatggaat aatttgggaa	2400
tttactctgt gtttatctat ttttatgttt tgtatttgga ttttagaaag taaataaaga	2460
aggtagaaga gttacggaat gaagaaaaaa aaataaacia aggttttaaa aatttcaaca	2520
aaaagcgtac ttacatata tatttattag acaagaaaag cagattaaat agatatacat	2580
tcgattaacg ataagtaaaa tgtaaaatca caggattttc gtgtgtgggt ttctacacag	2640
acaagatgaa acaattcggc attaatatct gagagcagga agagcaagat aaaaggtagt	2700
atttgttggc gatcccccta gagtctttta catcttcgga aaacaaaaac tattttttct	2760
ttaatttctt tttttacttt ctatttttaa ttatatatt tatattaaaa aatttaaatt	2820
ataattattt ttatagcacg tgatgaaaag gaccaggtg gcacttttcg gggaaatgtg	2880
cgcggaaccc ctatttgttt atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga	2940
caataaccgt gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat	3000
ttccgtgtcg cccttattcc cttttttgcg gcattttgcc ttccgttttt tgctcaccca	3060
gaaacgctgg tgaaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc	3120
gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgttttcca	3180
atgatgagca cttttaaagt tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgat tgacgccggg	3240
caagagcaac tcggtcgccg catacactat tctcagaatg acttggttga gtactacca	3300
gtcacagaaa agcatcttac ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata	3360
accatgagtg ataactctgc ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag	3420
ctaaccgctt ttttgacaa catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg	3480
gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca	3540
acaacgttgc gcaactatt aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta	3600
atagactgga tggaggcgga taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ccttccggct	3660
ggctggttta ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcgcgg tatcattgca	3720
gcactggggc cagatggtaa gccctcccg atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag	3780

gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat	3840
tggttaactgt cagaccaagt ttactcatat atactttaga ttgatttaaa acttcatttt	3900
taattttaaaa ggatctaggt gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa	3960
cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga	4020
gacccctttt ttctgcgct aatctgctgc ttgcaaacia aaaaaccacc gctaccagcg	4080
gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc	4140
agagcgcaga taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag	4200
aactctgtag caccgcctac atacctcgt ctgctaatac tgttaccagt ggctgctgcc	4260
agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg	4320
cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac	4380
accgaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga	4440
aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt	4500
ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag	4560
cgctgatttt tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg	4620
gcctttttac ggttcctggc cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tctgctgta	4680
tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc	4740
agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg cccaatacgc	4800
aaaccgcctc tccccgcgcg ttggccgatt cattaatgca gctggcacga caggtttccc	4860
gactggaaag cgggcagtga gcgcaacgca attaattgta gttacctcac tcattaggca	4920
ccccaggctt tacactttat gcttccggct cctatgttgt gtggaattgt gagcggataa	4980
caatttcaca caggaaacag ctatgaccat gattacgcca agctcgaaat acgactcact	5040
atagggcgaa ttgggtaccg ggccggccgt cgagcttgat ggcatcgtgg tgtcacgctc	5100
gtcgttttgt atggcttcat tcagctccgg ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgac	5160
cccatgttg tgaaaaaaag cggtagctc ttcggtcctc cgatcgttgt cagaagtaag	5220
ttggccgcag tgttatcact catggttatg gcaggaactg cataattctc ttactgtcat	5280
gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgtactcaac caagtcattc tgagaatagt	5340
gtatgcggcg accgagttgc tcttgcccg cgtaacacg ggataatacc gcgccacata	5400
gcagaacttt aaaagtgtc atcattggaa aacgttcttc ggggcgaaaa ctctcaagga	5460
tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt aaccactcg tgcaccaac tgatcttcag	5520
catcttttac tttcaccagc gtttctgggt gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa	5580

```

aaaaggggaat aagggcgaca cggaaatggt gaatactcat actcttcctt tttcaatatt 5640
attgaagcat ttatcagggt tattgtctca tgagcgatac atatttgaat gtatttagaa 5700
aaataaacia ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaa gtgccacctg acgtctaaga 5760
aaccattatt atcatgacat taacctataa aaataggcgt atcacgaggc cctttcgtct 5820
tcaagaattg gggatctacg tatggtcatt cttcttcaga ttccctcatg gagaagtgcg 5880
gcagatgtat atgacagagt cgccagtttc caagagactt tattcaggca cttccatgat 5940
aggcaagaga gaagaccag agatgttggt gtcctagtta cacatggtat ttattccaga 6000
gtattcctga tgaaatgggt tagatggaca tacgaagagt ttgaatcgtt taccaatggt 6060
cctaacggga gcgtaatggt gatggaactg gacgaatcca tcaatagata cgtcctgagg 6120
accgtgctac ccaaatggac tgattgtgag ggagacctaa ctacatagtg tttaaagatt 6180
acggatattt aacttactta gaataatgcc atttttttga gttataataa tcctacgtta 6240
gtgtgagcgg gatttaaact gtgaggacct caatacatc agacacttct gacggtatca 6300
ccctacttat tcccttcgag attatatcta ggaacccatc aggttggtgg aagattacc 6360
gttctaagac ttttcagctt cctctattga tgttacctc ggacaccct tttctggcat 6420
ccagttttta atcttcagtg gcatgtgaga ttctccgaaa ttaattaaag caatcacaca 6480
attctctcgg ataccacctc gggtgaaact gacagggtgt ttgttacgca tgctaatgca 6540
aaggagccta tatacctttg gctcggctgc tgtaacaggg aatataaagg gcagcataat 6600
ttaggagttt agtgaacttg caacatttac tattttccct tcttacgtaa atatttttct 6660
ttttaattct aaatcaatct ttttcaattt tttgtttgta ttcttttctt gcttaaattct 6720
ataactacaa aaaacacata cag 6743

```

```

<210> 176
<211> 296
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```
<400> 176
```

```

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
1           5           10           15

```

```

Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
20           25           30

```

```

Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Leu Asp Leu Glu Gly Asp Phe
35           40           45

```

```

Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu

```

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

<210> 177
 <211> 903
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 177
 gaattcatga gatttccttc aatTTTTtact gcagttttat tcgcagcatc ctccgcatta 60
 gctgctccag tcaacactac aacagaagat gaaacggcac aaattccggc tgaagctgtc 120
 atcggttact tagattttaga aggggatttc gatgttgctg ttttgccatt ttccaacagc 180
 acaaataacg ggttattggt tataaatact actattgcc a gcattgctgc taaagaagaa 240
 ggggtatctt tggataaaag agaggctgaa gcccaggagg tgacacagat tcctgcagct 300
 ctgagtgtcc cagaaggaga aaacttggtt ctcaactgca gtttactga tagcgctatt 360
 tacaacctcc agtgggttag gcaggacctt gggaaaggct tcacatctct gttgcttatt 420
 cagtcaagtc agagagagca aacaagtgg a gacttaatg cctcgctgga taaatcatca 480
 ggacgtagta ctttatacat tgcagcttct cagcctgggt actcagccac ctacctctgt 540
 gctgtgaggg ccacatcagg aggaagctac atacctacat ttggaagagg aaccagcctt 600
 attgttcac cgtatatcca gaacccggat cctgccgtgt accagctgag agactctaaa 660
 tccagtgaca agtctgtctg cctattcacc gattttgatt ctcaaacaaa tgtgtcacia 720
 agtaaggatt ctgatgtgta tatcacagac aaatgtgtgc tagacatgag gtctatggac 780
 ttcaagagca acagtgtgtt ggcctggagc aacaaatctg actttgcatg tgcaaacgcc 840
 ttcaacaaca gcattattcc agaagacacc ttcttcccc gcccagaaag ttcctaactc 900
 gag 903

<210> 178
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 178

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
 1 5 10 15

Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
 20 25 30

Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Leu Asp Leu Glu Gly Asp Phe
 35 40 45

Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu

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

Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile
 305 310 315 320

Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp
 325 330

<210> 179

<211> 1005

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 179

```

gaattcatga gatttccttc aatttttact gcagttttat tcgcagcatc ctccgcatta      60
gctgctccag tcaacactac aacagaagat gaaacggcac aaattccggc tgaagctgtc      120
atcggttact tagatttaga aggggatttc gatgttgctg ttttgccatt ttccaacagc      180
acaaataacg gggtattgtt tataaatact actattgcca gcattgctgc taaagaagaa      240
ggggtatctt tggataaaag agaggctgaa gccggcgctca ctcagacccc aaaattccag      300
gtcctgaaga caggacagag catgacactg cagtgtgccc aggatatgaa ccatgaatac      360
atgtcctggg atcgacaaga cccaggcatg gggctgaggc tgattcatta ctcagttggg      420
gctggtatca ctgaccaagg agaagtcccc aatggctaca atgtctccag atcaaccaca      480
gaggatttcc cgctcaggct gctgtcggct gtcctctccc agacatctgt gtactttctgt      540
gccagcagtt acgtcgggaa caccggggag ctgttttttg gagaaggctc taggctgacc      600
gtactggagg acctgaaaaa cgtgttccca cccgaggtcg ctgtgtttga gccatcagaa      660
gcagagatct cccacacca aaaggccaca ctggtgtgcc tggccacagg cttctacccc      720
gaccacgtgg agctgagctg gtgggtgaat ggggaaggagg tgcacagtgg ggtctgcaca      780
gacccgcagc ccctcaagga gcagcccgcc ctcaatgact ccagatacgc tctgagcagc      840
cgcctgaggg tctcgccac cttctggcag gacccccgca accacttccg ctgtcaagtc      900
cagttctacg ggctctcgga gaatgacgag tggaccagg atagggccaa acccgtcacc      960
cagatcgtca gcgccgaggc ctggggtaga gcagactaac tcgag                        1005

```

<210> 180

<211> 317

<212> DNA

<213> pEX172 Plasmid

<400> 180

```

ggatccagca tgggtgtgtct gaagctccct ggaggctcct gcatgacagc gctgacagtg      60
acactgatgg tgctgagctc cccactggct ttgtccggag acaccggtgg cggatctcta      120

```

gttcacgcg gtagtggagg cgggtggtcc ggagacacgc gtagtaggt cgacggaggc 180
 ggtgggggta gaatcgccc gctggaggaa aaagtgaaaa ccttgaaagc tcagaactcg 240
 gagctggcgt ccacggccaa catgctcagg gaacagggtg cacagcttaa acagaaagtc 300
 atgaactact aggatcc 317

<210> 181

<211> 884

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 181

ggatccagca tgggtgtgtct gaagctccct ggaggctcct gcatgacagc gctgacagtg 60
 aactgatgg tgctgagctc cccactggct ttgtccggag acaccggaga caccggacag 120
 aaggaagtgg agcagaactc tggaccctc agtgttccag agggagccat tgcctctctc 180
 aactgcactt acagtgaccg aggttcccag tccttcttct ggtacagaca atattctggg 240
 aaaagccctg agttgataat gtccatatac tccaatggtg acaaagaaga tggaaggttt 300
 acagcacagc tcaataaagc cagccagtat gtttctctgc tcatcagaga ctcccagccc 360
 agtgattcag ccacctacct ctgtgccgtt acaactgaca gctgggggaa attgcagttt 420
 ggagcaggga cccaggttgt ggtcacccca gatatccaga accctgacct tgccgtgtac 480
 cagctgagag actctaaatc cagtgacaag tctgtctgcc tattcaccga ttttgattct 540
 caaacaatg tgtcacaag taaggattct gatgtgtata tcacagacaa atgtgtgcta 600
 gacatgaggt ctatggactt caagagcaac agtgctgtgg cctggagcaa caaatctgac 660
 tttgcatgtg caaacgcctt caacaacagc attattccag aagacacctt cttccccagc 720
 ccagaaagtt cctaagtcga cggaggcggg gggggtagaa tcgcccggct ggaggaaaaa 780
 gtgaaaacct tgaaagctca gaactcggag ctggcgcca cggccaacat gctcaggga 840
 cagggtggcac agcttaaaca gaaagtcatg aactactagg atcc 884

<210> 182

<211> 1004

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 182

ggatccagca tgggtgtgtct gaagctccct ggaggctcct gcatgacagc gctgacagtg 60
 aactgatgg tgctgagctc cccactggct ttgtccggag acaccggaga caccggaac 120
 gctggtgtca ctacagcccc aaaattccag gtcctgaaga caggacagag catgacactg 180
 cagtgtgccc aggatatgaa ccatgaatac atgtcctggt atcgacaaga cccaggcatg 240
 gggctgaggc tgattcatta ctacgttggg gctgggtatca ctgaccaagg agaagtcccc 300

```

aatggctaca atgtctccag atcaaccaca gaggatttcc cgctcaggct gctgtcggct 360
gctccctccc agacatctgt gtacttctgt gccagcagge cgggactagc gggagggcga 420
ccagagcagt acttcggggcc gggcaccagg ctcacgggtca cagaggacct gaaaaacgtg 480
ttcccacccg aggtcgctgt gtttgagcca tcagaagcag agatctccca caccctaaaag 540
gccacactgg tgtgcctggc cacaggcttc taccctgacc acgtggagct gagctggtgg 600
gtgaatggga aggaggtgca cagtgggggtc tgcacagacc cgcagcccct caaggagcag 660
cccgccctca atgactccag atacgctctg agcagccgcc tgagggtctc ggccaccttc 720
tggcaggacc cccgcaacca cttccgctgt caagtccagt tctacgggct ctcggagaat 780
gacgagtgga cccaggatag ggccaaaccc gtcaccaga tcgtcagcgc cgaggcctgg 840
ggtagagcag actaagtcga cggaggcggg gggggtagaa tcgcccggct ggaggaaaaa 900
gtgaaaacct tgaaagctca gaactcggag ctggcggtcca cggccaacat gctcagggaa 960
caggtggcac agcttaaaca gaaagtcatg aactactagg atcc 1004

```

```

<210> 183
<211> 206
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```
<400> 183
```

```

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

```

```

Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln
20           25           30

```

```

Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile
35           40           45

```

```

Met Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala
50           55           60

```

```

Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser
65           70           75           80

```

```

Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Thr Thr Asp Ser
85           90           95

```

```

Trp Gly Lys Leu Gln Phe Gly Ala Gly Thr Gln Val Val Val Thr Pro
100           105           110

```

Asp Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys
115 120 125

Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr
130 135 140

Asn Val ,Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys
145 150 155 160

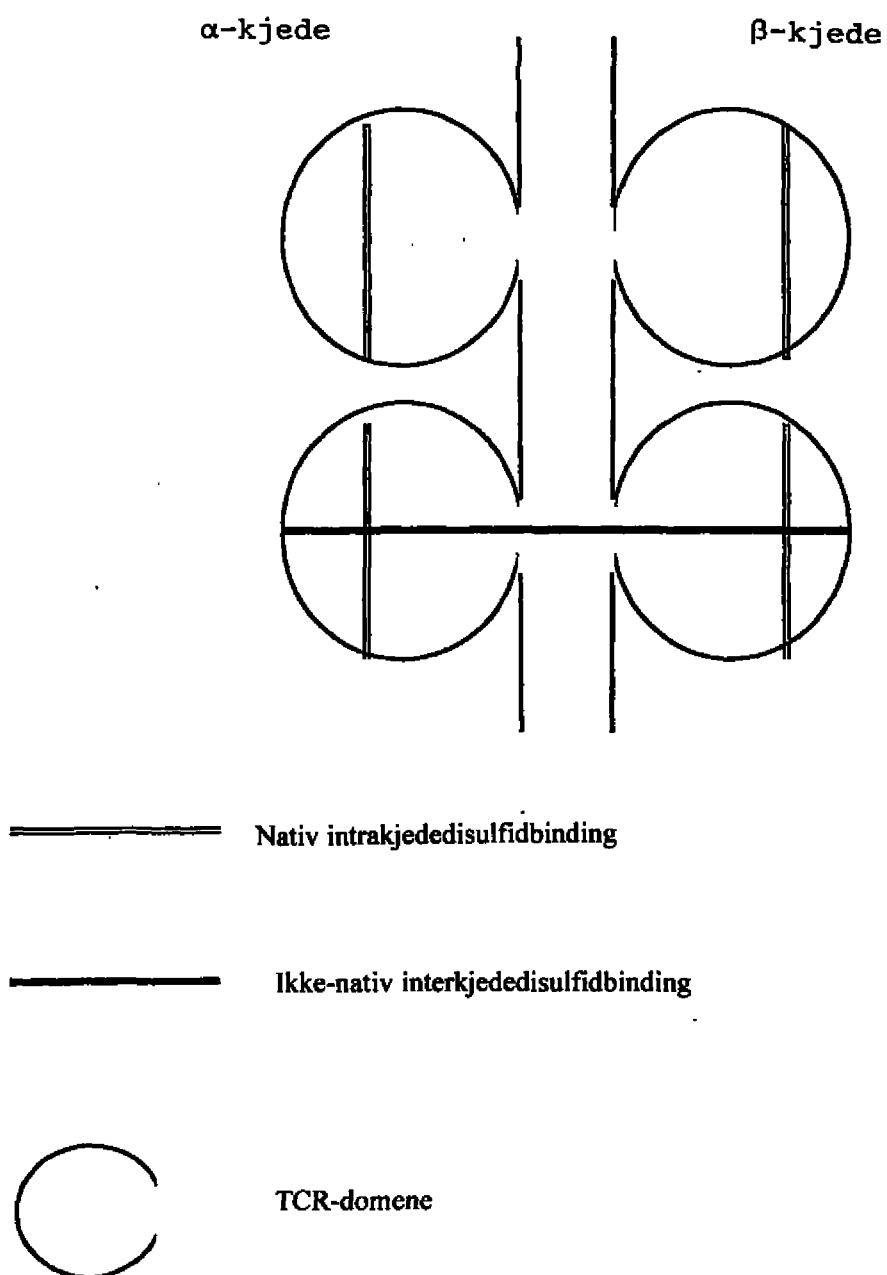
Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala
165 170 175

Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser
180 185 190

Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser
195 200 205

1/81

Figur 1



2/81

Figur 2a

atgcagaaggaagtggagcagaactctggacccctcagtggtccagagggagccattg
 cctctctcaactgcacttacagtgaccgaggttcccagtccttcttctgtgtacagaca
 atattctgggaaaagccctgagttgataatgtocatatactccaatggtgacaaagaa
 gatggaagggtttacagcacagctcaataaagccagccagtatgtttctctgctcatca
 gagactcccagcccagtgattcagccacctacctctgtgccgttacaaotgacagctg
 ggggaaaattgcagtttggagcagggaccaggttggtggtcaccccagatatccagaac
 cctgaccctgccgtgtaccagctgagagactctaaatccagtgacaagtctgtctgcc
 tattcaccgatttttgattctcaaacaatgtgtcacaaagtaaggattctgatgtgta
 tatcacagacaaa**ctg**gtgctagacatgaggtctatggacttcaagagcaacagtgct
 gtggcctggagcaacaaatctgactttgcatgtgcaaacgccttcaacaacagcatta
 ttccagaagacaccttcttcccagcccagaaagttcctaa

Figur 2b

atgaacgctgggtgtcactcagaccccaaaattccaggtcctgaagacaggacagagca
 tgacactgcagtggtgccaggatatgaacatgaatacatgtcctgggtatcgacaaga
 cccaggcatggggctgaggctgattcattactcagttggtgctgggtatcactgaccaa
 ggagaagtccccaatgggtacaatgtctccagatcaaccacagaggatttcccgtca
 ggctgctgtcggctgctccctcccagacatctgtgtacttctgtgccagcaggccggg
 actagcgggagggcgaccagagcagtaacttcgggcccgggcaccaggctcacggtcaca
 gaggacctgaaaaacgtgttcccacccgaggtcgctgtgtttgagccatcagaagcag
 agatctcccacacccaaaaggccacactgggtgtgcctggccacaggcttctacccga
 ccacgtggagctgagctgggtgggtgaatgggaaggaggtgcacagtggggtc**ctg**aca
 gaccgcagcccctcaaggagcagcccgccctcaatgactccagatacgtctctgagca
 gccgcctgagggctctggccaccttctggcaggacccccgcaaccacttccgctgtca
 agtccagttctacgggctctcggagaatgacgagtggaaccaggatagggccaaaccc
 gtcacccagatcgtcagcgcgaggccctggggtagagcagactaa

3/81

Figur 3a

MQ

K₁EVEQNSGPL SVPEGAIASL NCTYSDRGSQ SFFWYRQYSG KSPELIMSIY
SNGDKEDGRF TAQLNKASQY VLLIRDSQP SDSATYLCAV TTDSWGKLOF
GAGTQVVVTP DIQNPDPVY QLRDSKSSDK SVCLFTDFDS QTNVSQSKDS
DVYITDKCVL DMRSMDFKSN SAVAWSNKSD FACANAFNNS LIPEDTFFES
PESS*

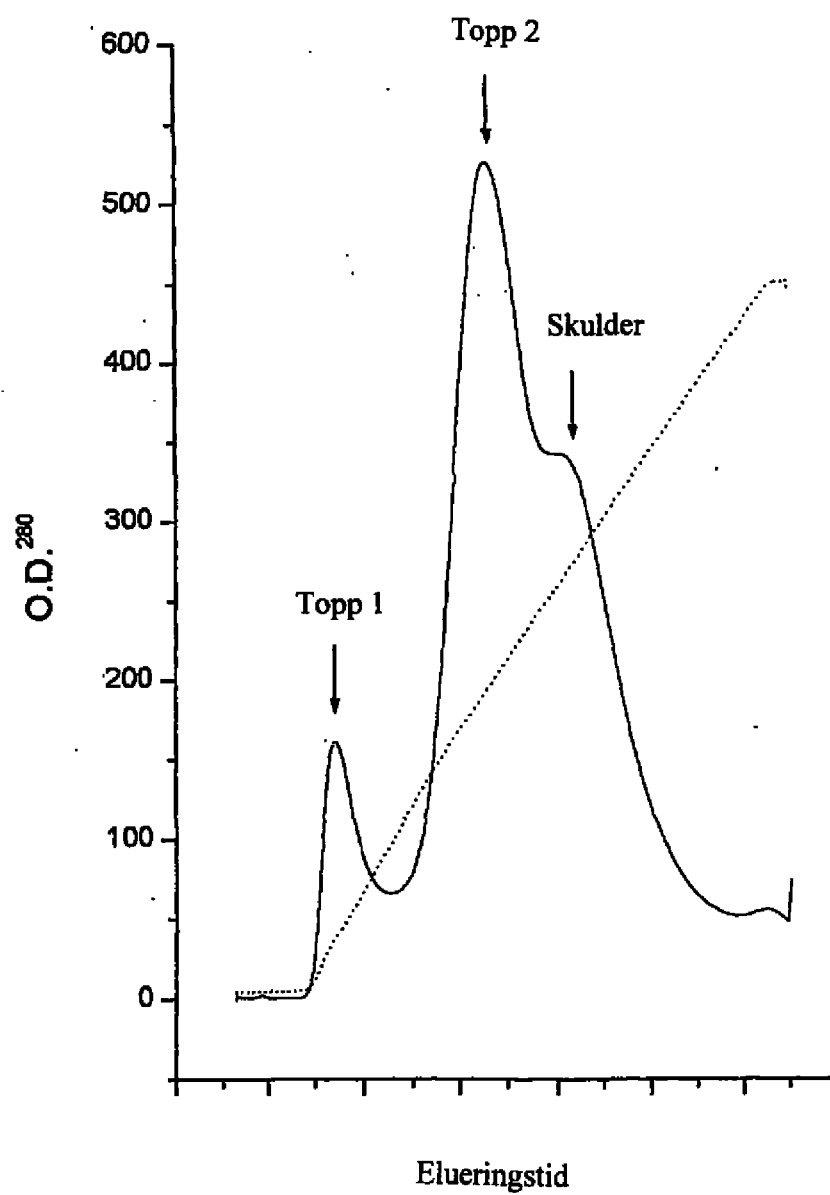
Figur 3b

M

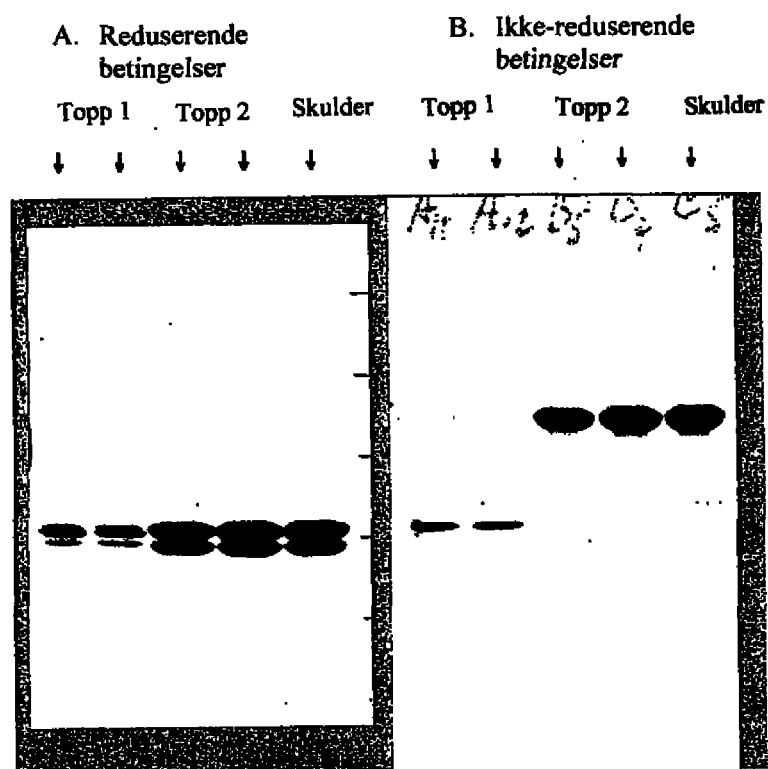
N₁AGVTQTPKF QVLKTGQSM T LQCAQDMNHE YMSWYRQDPG MGLRLIHYSV
GAGITDQGEV PNGYNVSRST TEDFPLRLLS AAPSQTSVYF CASRPGLAGG
RPEQYFGPGT RLTVTEDLKN VFPPEVAVFE PSEAEISHTQ KATLVCLATG
FYPDHVELSW WVNGKEVHSG VCTDPQPLKE QPALNDSRYA LSSRLRVSAT
FWQDPRNHFR CQVQFYGLSE NDEWTQDRAK PVTQIVSAEA WGRAD*

4/81

Figur 4



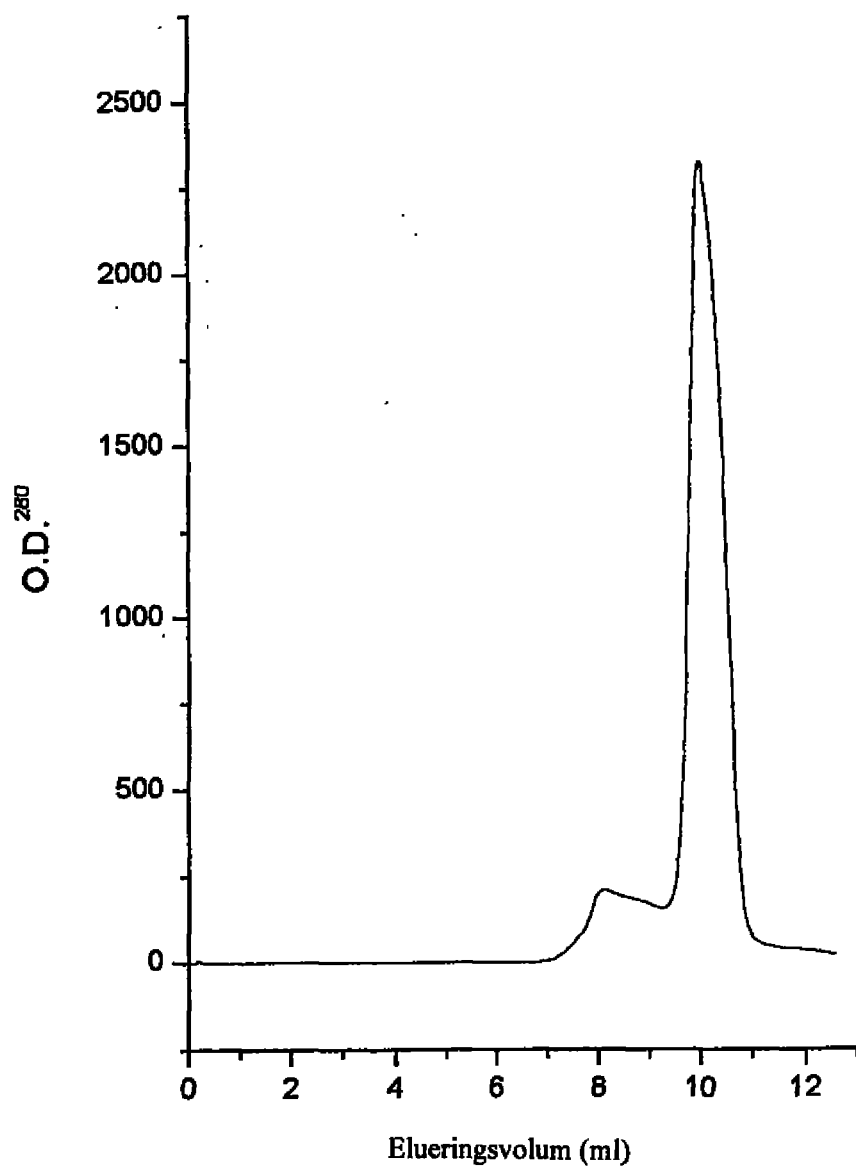
5/81



Figur 5

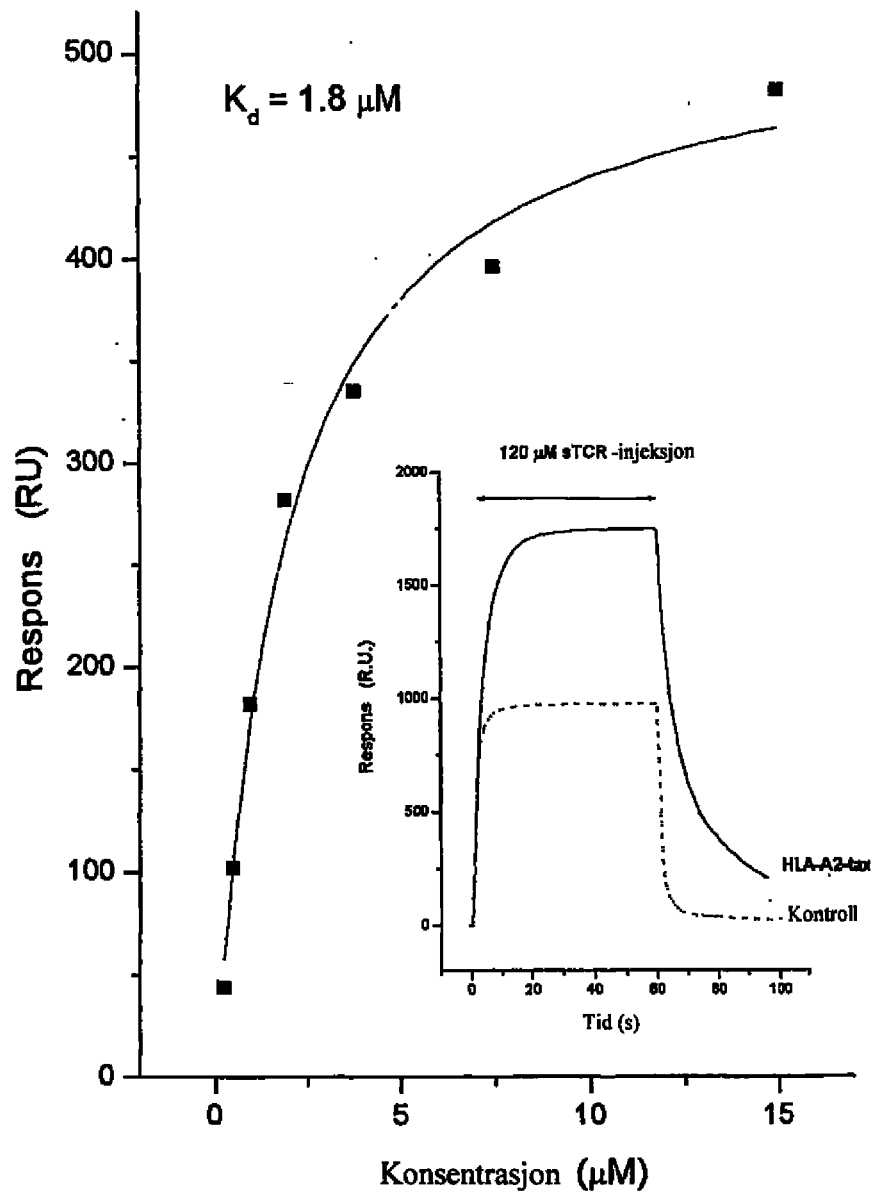
6/81

Figur 6



7/81

Figur 7



9/81

Figur 9a

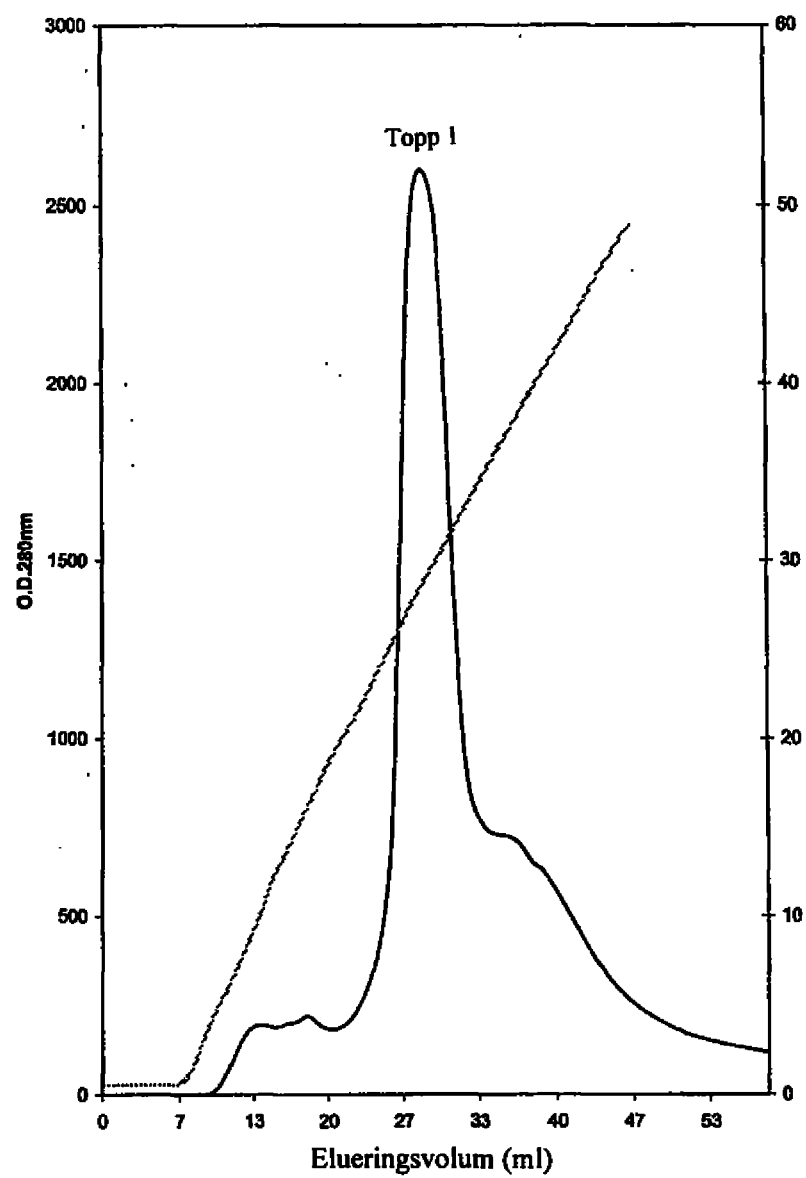
MQLLEQSPQFLSIQEGENLTVYCNSSSVFSSLQWYRQEP
GEGPVLLVTVVTGGEVKKLRLTFQFGDARKDSSLHIT
AAQPGDTGLYLCAGAGSQGNLIFGKGTKLSVKPNIQNP
DPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVY
ITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSI
IPEDTFFPSPESS Stopp

Figur 9b

MVDGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSC EQNLNHDAMYWY
RQDPGQGLRLIYYSQIVNDFQKGDIAEGYSVSREKKESF
PLTVTSAQKNPTAFYLCASSSRSSYEQYFGPGTRLTVTE
DLKNVFPPEVAVFEPSEABISHTQKATLVCLATGFYPDH
VELSWVVGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYSLSS
RLRVSATFWQNPRNHFR CQVQFYGLSENDEWTQDRAK
PVTQIVSAEAWGRAD Stopp

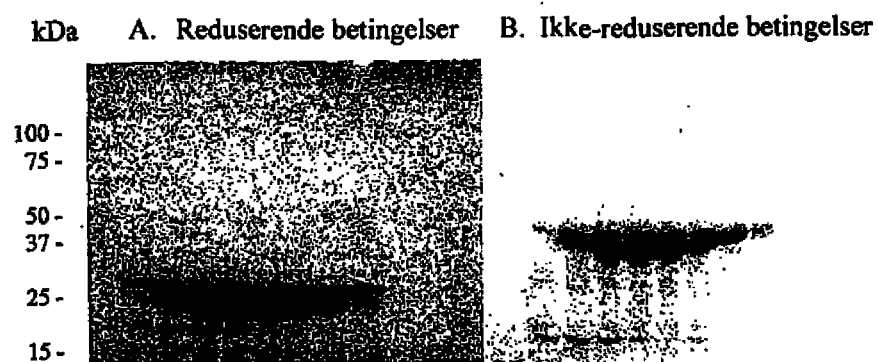
10/81

Figur 10

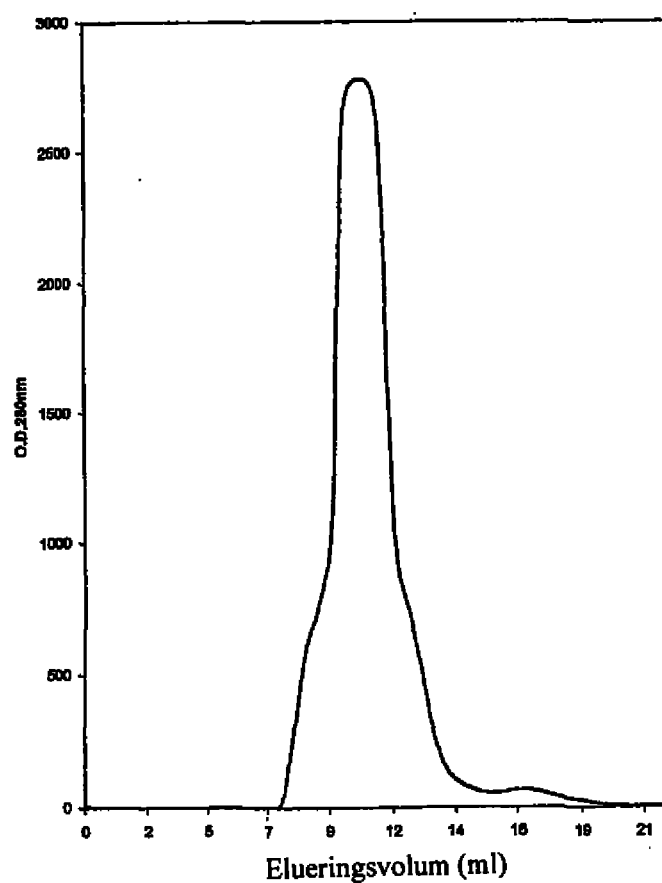


11/81

Figur 11

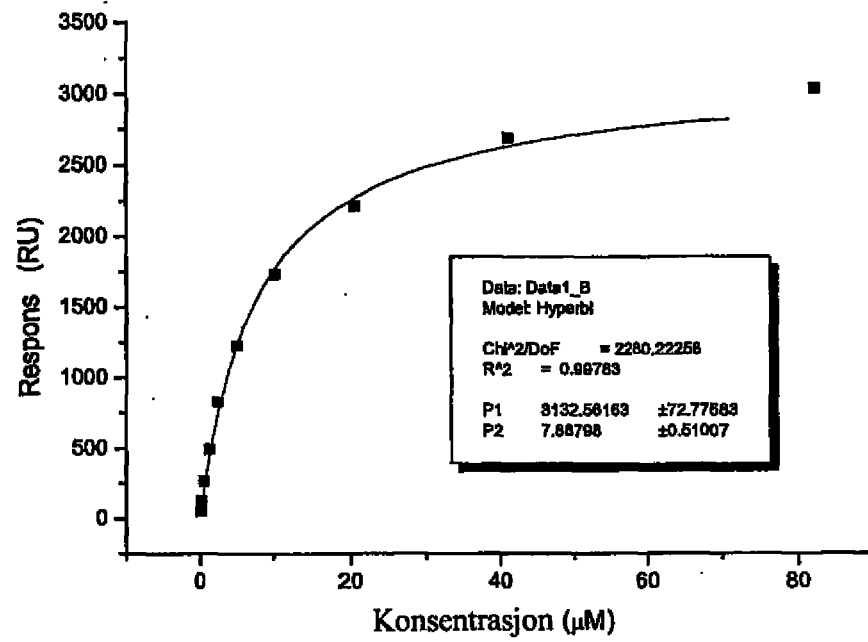


Figur 12

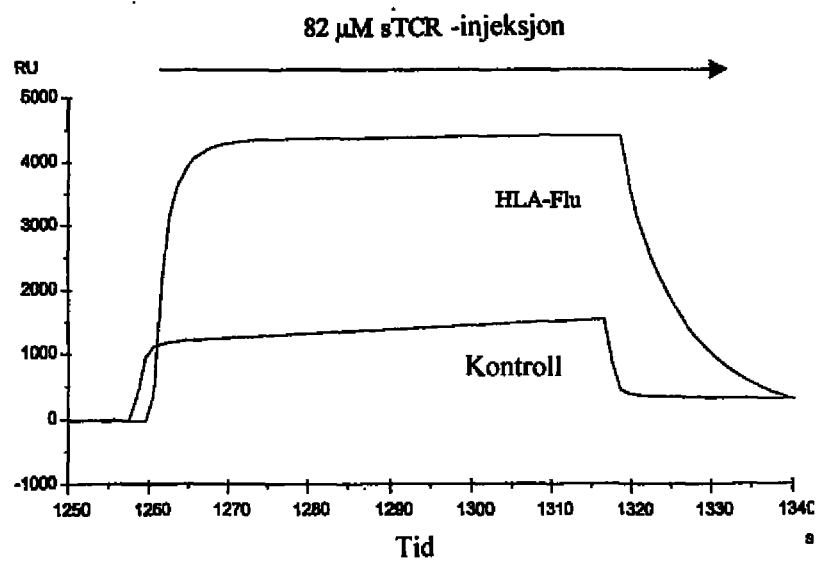


12/81

Figur 13a



Figur 13b



13/81

Figur 14a

atgcaggaggygacacagattcctgcagctctgagtgtcccagaaggagaaaacttgg
 ttctcaactgcagtttcaactgatacgctatttacaacctccagtgggttaggcagga
 ccctgggaaaggtctcacatctctgttgcttattcagtcagtcagagagagcaaaca
 agtggagacttaatgcctcgctggataaatcatcaggacgtagtactttatacattg
 cagcttctcagcctgggtgactcagccacctacctctgtgctgtgaggoccatcagg
 aggaagctacataacctacatttggaagaggaaccagccttattgttcacccgtatc
 cagaacctgacctgccgtgtaccagctgagagactctaaatccagtgacaagtctg
 tctgcctattcacccgattttgattctcaaaacaaatgtgtcacaaagtaaggattctga
 tgtgtatatcacagacaaatgtgtgctagacatgaggtctatggacttcaagagcaac
 agtgcctgtggcctggagcaacaaatctgactttgcatgtgcaaacgccttcaacaaca
 gcattattccagaagacaccttcttccccagccagaaagttcctaa

Figur 14b

atgggtgtcactcagacccccaaaattccaggtcctgaagacaggacagagcatgacac
 tgcagtgtgcccaggatatgaacctgaatacatgtcctgggtatcgacaagacctcagg
 catggggctgaggctgattcattactcagttgggtgctgggtatcactgaccaaggagaa
 gtccccaatggctacaatgtctccagatcaaccacagaggatttcccgctcaggctgc
 tgtcggtgctccctcccagacatctgtgtacttctgtgccagcagttacgtcgggaa
 caccggggagctgttttttggagaaggctctaggctgacctgactggaggacctgaaa
 aacgtgttcccacccgaggtcgctgtgtttgagccatcagaagcagagatctcccaca
 cccaaaaggccacactggtgtgcctggccacaggcttctaccccgaccacgtggagct
 gagctgggtgggtgaatgggaaggaggtgcacagtggggtctgcacagacctgcagccc
 ctcaaggagcagcccgccctcaatgactccagatacgtctctgagcagccgctgaggg
 tctcgccaccttctggcaggacccccgcaaccacttccgctgtcaagtccagttcta
 cgggctctcggagaatgacgagtggacctcaggatagggccaaacctgtcaccagatc
 gtcagcgccgaggcctggggtagagcagactaa

Figur 15a

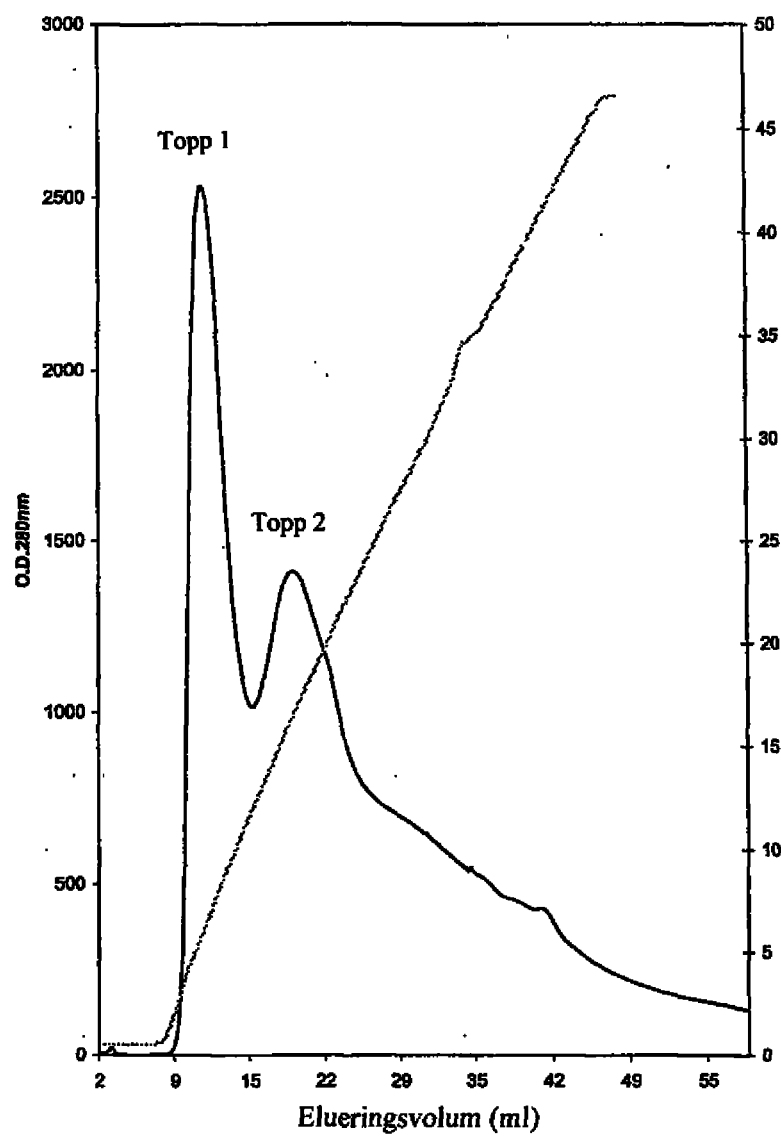
MQEXTQIPAALSVPEGENLVLNCSFTDSAIYNLQWFRQ
 DPGKGLTSLLLIQSSQREQTSGRLNASLDKSSGRSTLYI
 AASQPGDSATYLC AVRPTSGGSYIPTFGRGTS LIVHPYI
 QNPDP AVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDS
 D VYITDKCVLDMRSMDFKSN SAVAWSNKSDFACANAF
 NNSIIPEDTFFPSPESS Stopp

Figur 15b

MGVTQTPKFQVLKTGQSM TLQCAQDMNHEYMSWYRQ
 DPGMetGLRLIHYSVGAGITDQGEVPNGYNVSRSTTEDF
 PLRLLSAAPSQTSVYFCASSYVGNTGELFFGEGSRLTVL
 EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPD
 HVELSWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYAL
 SSRLRVSATFWQDPRNHFR CQVQFYGLSENDEWTQDRA
 KPVTQIVSABAWGRAD Stopp

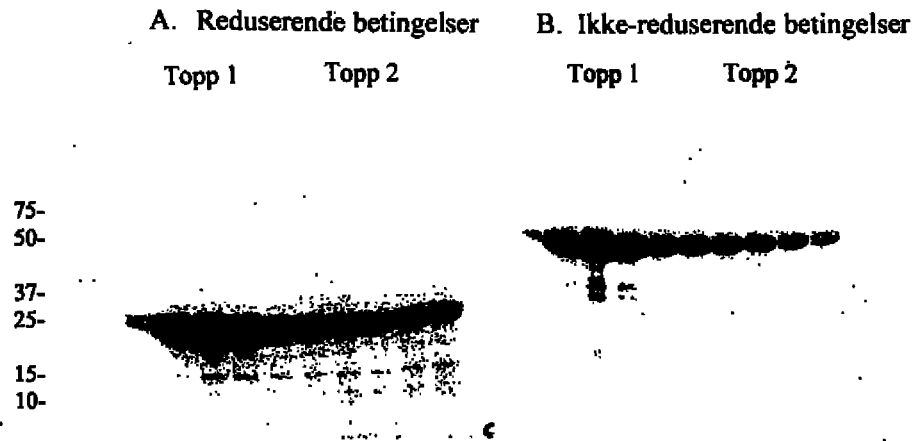
14/81

Figur 16

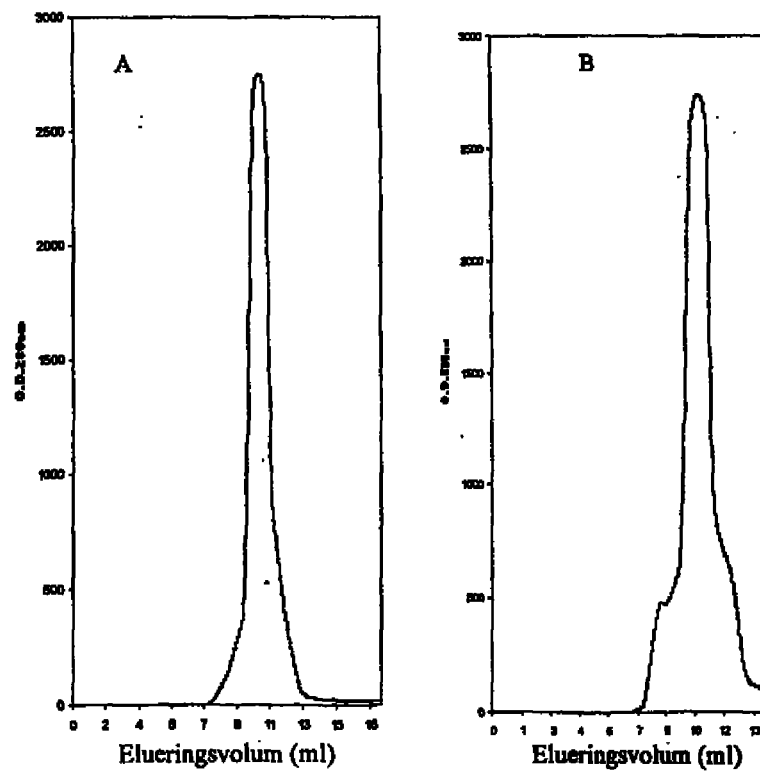


15/81

Figur 17

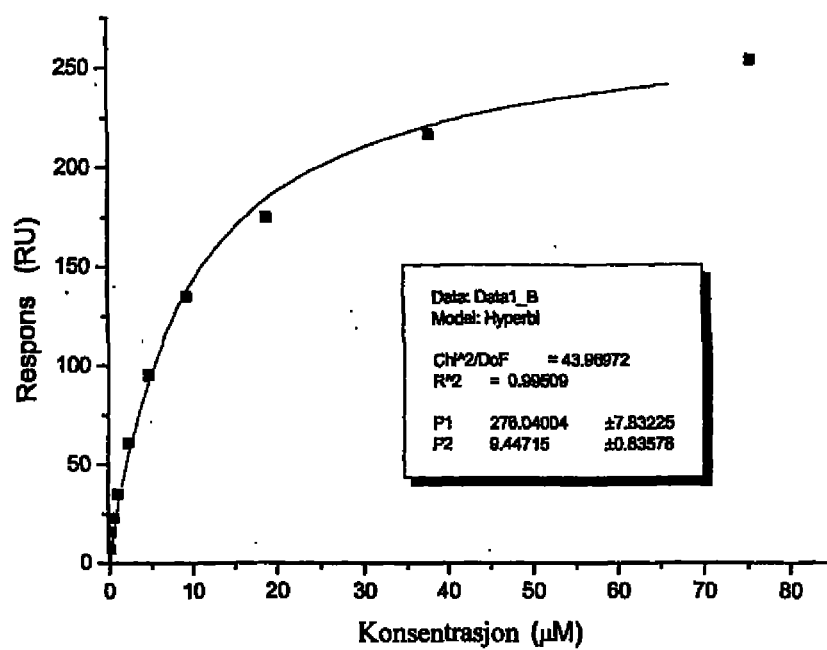


Figur 18

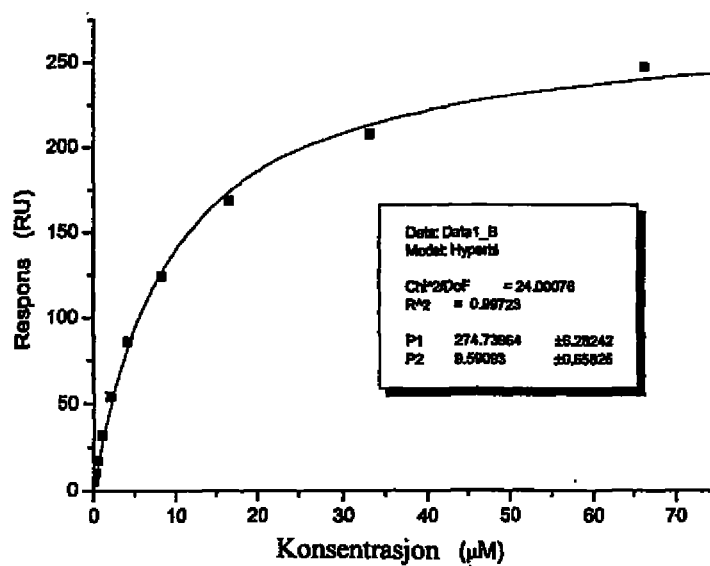


16/81

Figur 19a



Figur 19b



17/81

Figur 20a

atgcaggaggygacacagattcctgcagctctgagtgtcccagaaggagaaaacttgg
 ttctcaactgcagtttctactgatagcgtatattacaacctccagtggtttaggcagga
 ccctgggaaaggctcacatctctgttgcttattcagtcagtcaagtcagagagagcaaaca
 agtggaaagacttaatgcctcgctggataaatcatcaggacgtagtactttatacattg
 cagcttctcagcctggtgactcagccacctacctctgtgctgtgaggcccacatcagg
 aggaagctacatacctacatttggaaagggaacagccttattgttcatccgtatatc
 cagaaccttgacctgacctgtaccagctgagagactctaaatccagtgacaagtctg
 tctgcctattcaccgattttgattctcaaacaatgtgtcacaaagtaaggattctga
 tgtgtatatcacagacaaa[]gtgctagacatgaggtctatggacttcaagagcaac
 agtgcctgtggcctggagcaacaatctgactttgcatgtgcaaacgccttcaacaaca
 gcattattccagaagacaccttcttccccagcccagaaagttcctgttaa

Figur 20b

atgggtgtcactcagacccccaaaattccaggtcctgaagacaggacagagcatgacac
 tgcagtgtgccaggatatgaaccatgaatacatgtcctgggtatcgacaagaccagg
 catggggctgaggctgattcattactcagttgggtgctgggtatcactgaccaaggagaa
 gtccccaatggctacaatgtctccagatcaaccacagaggatttcccgctcaggctgc
 tgtcggctgctccctcccagacatctgtgtacttctgtgccagcagttacgtcgggaa
 caccggggagctgttttttgagaaggctctaggctgacctgactggaggacctgaaa
 aacgtgttcccacccgaggtcgctgtgtttgagccatcagaagcagagatctcccaca
 cccaaaaggccacactggtgtgcctggccacaggcttctaccccgaccacgtggagct
 gagctgggtgggtgaatgggaaggaggtgcacagtgggggtc[]acagacccgcagccc
 ctcaaggagcagcccgccctcaatgactccagatacgctctgagcagccgcctgaggg
 tctcggccaccttctggcaggacccccgcaaccacttccgctgtcaagtccagttcta
 cgggctctcggagaatgacgagtggaacccaggatagggccaaacccgtcaccagatc
 gtcagcgccgaggcctggggtagagcagactgttaa

Figur 21a

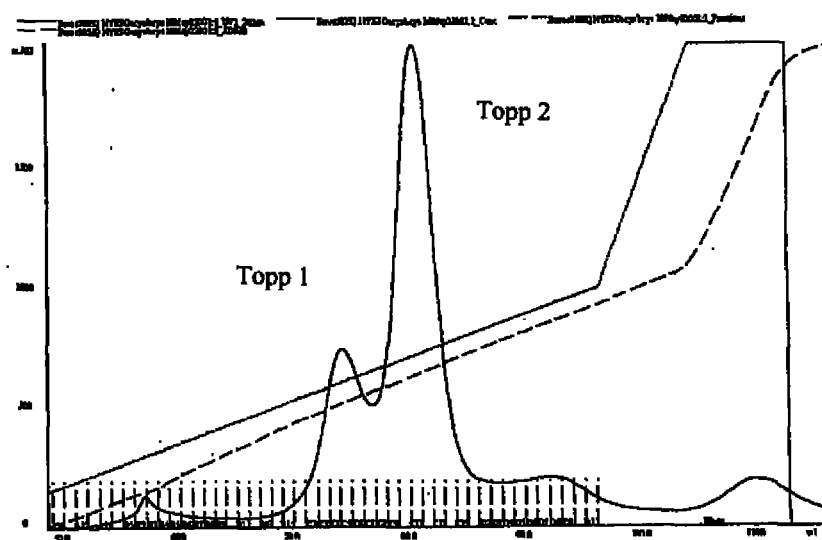
MQEXTQIPAALSVPEGENLVLNCSFTDSAIYNLQWFRQ
 DPGKGLTSLLLIQSSQREQTSGRLNASLDKSSGRSTLYI
 AASQPGDSATYLC AVRPTSGGSYIPTFGRGTS LIVHPYI
 QNPDP AVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDS
 DVIYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAF
 NNSIIPEDTFFPSPBESSC Stopp

Figur 21b

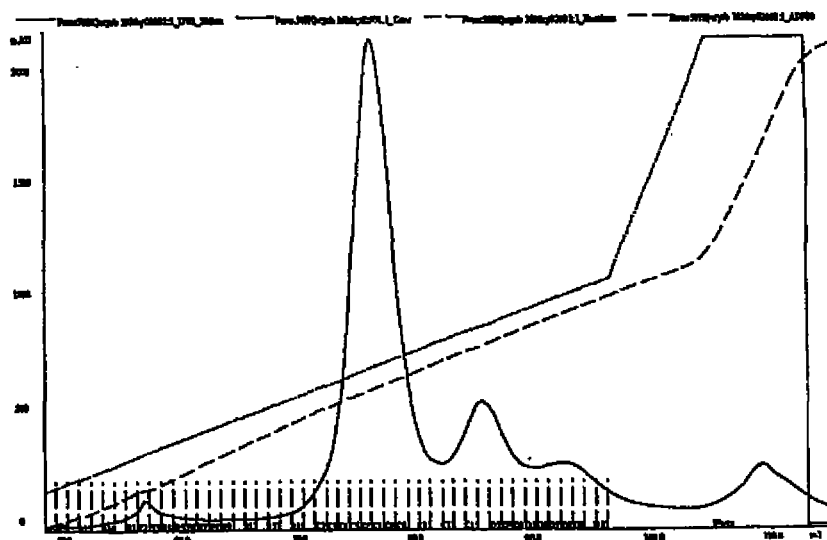
MGVTQTPKFQVLKTGQSM TLQCAQDMNHEYMSWYRQ
 DPGMGLRLIHYSVGAGITDQGEVPNGYNVSRSTTEDFP
 LRLLSAAPSQTSVYFCASSYVGNTGELFFGEGSRLTVLE
 DLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDH
 VELSWVWNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYALSS
 RLRVSATFWQDPRNHFR CQVQFYGLSENDEWTQDRAK
 PVTQIVSAEAWGRADC Stopp

18/81

Figur 22

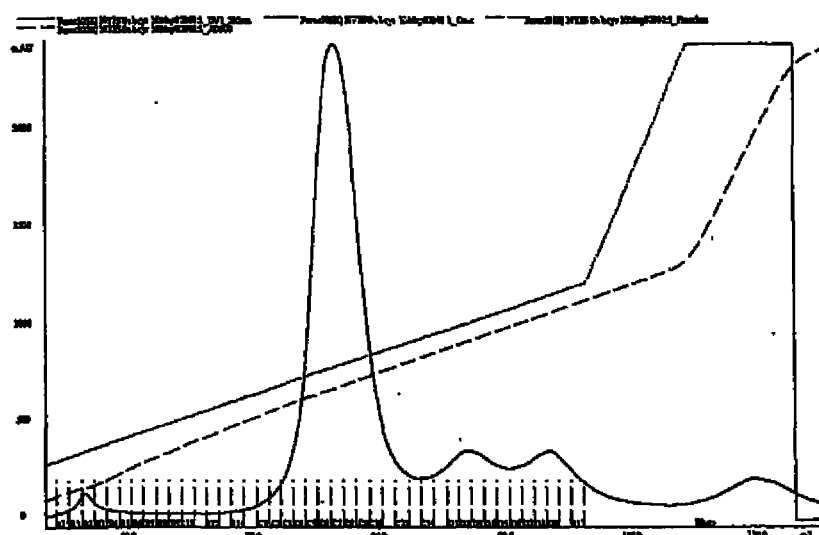


Figur 23



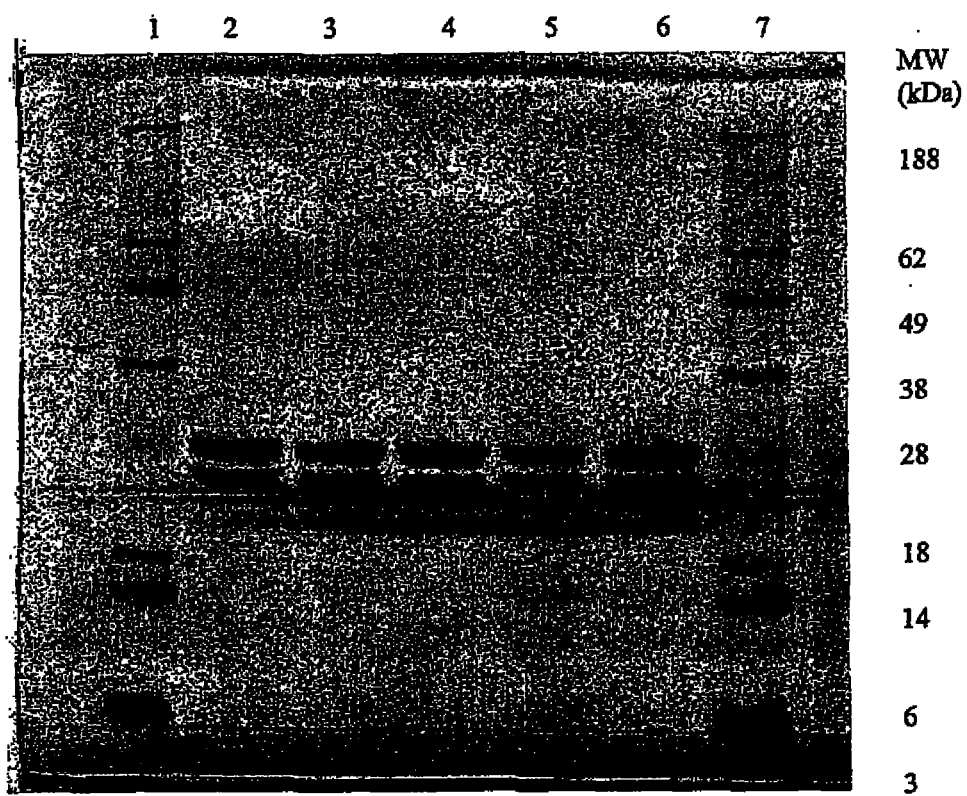
19/81

Figur 24



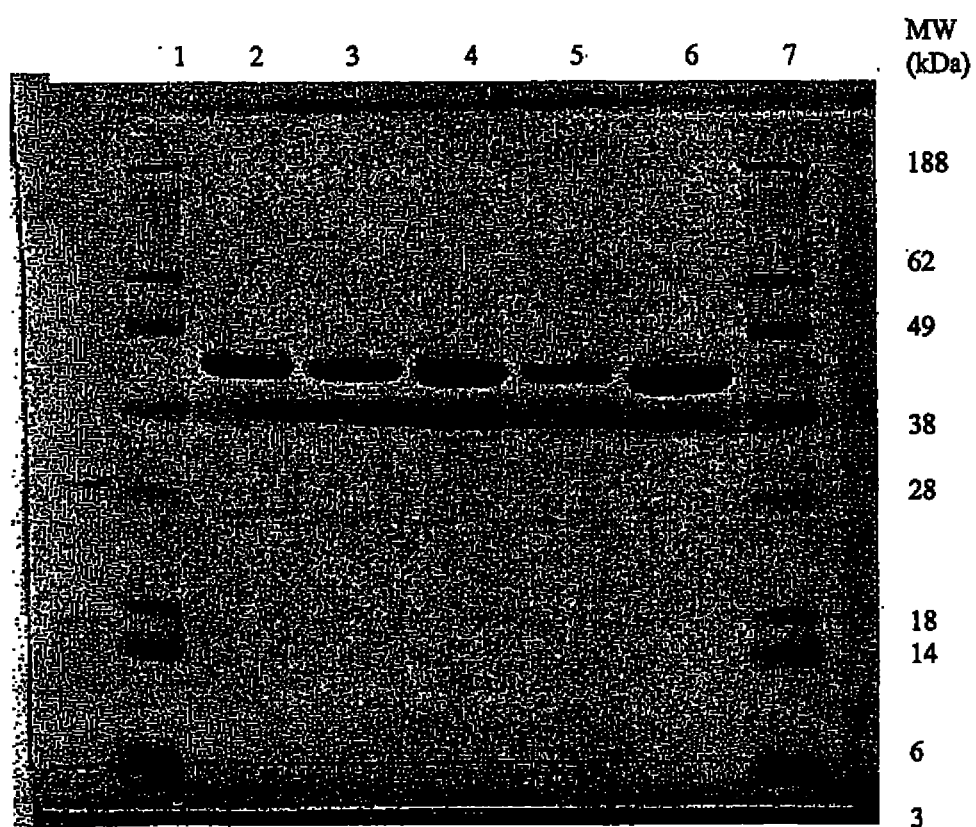
20/81

Figur 25



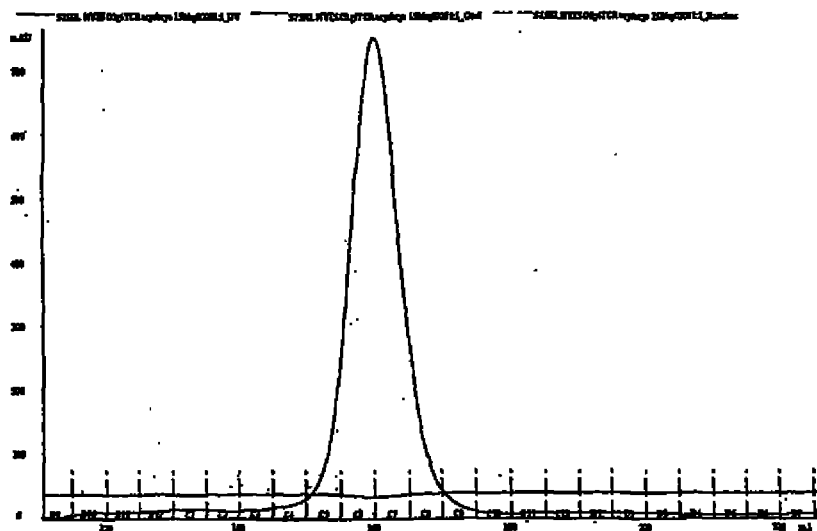
21/81

Figur 26

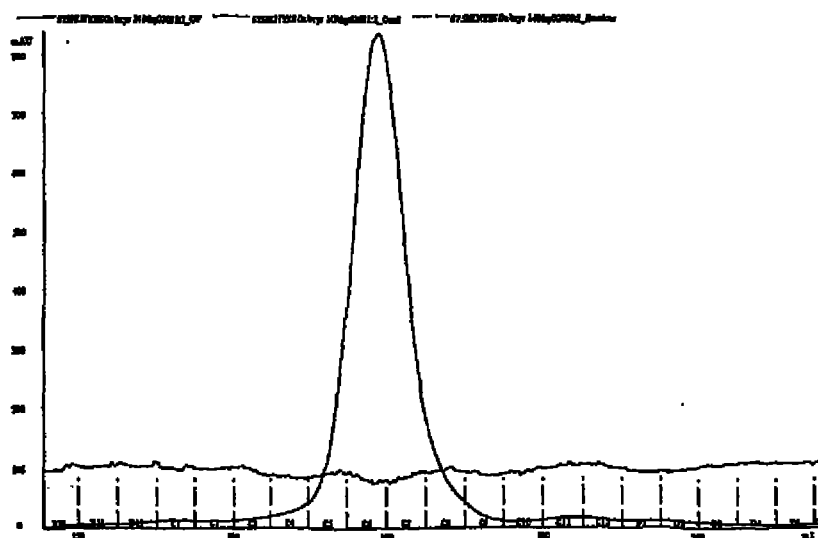


22/81

Figur 27

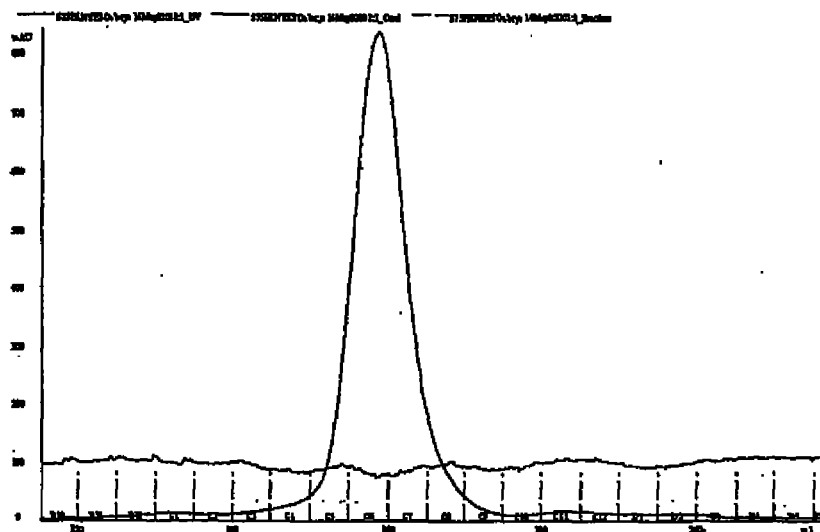


Figur 28



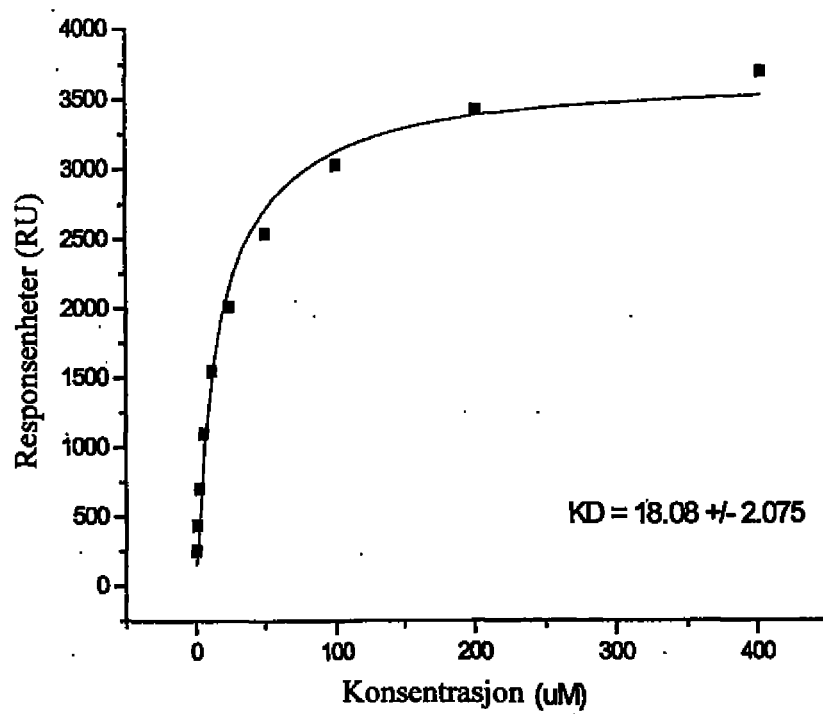
23/81

Figur 29



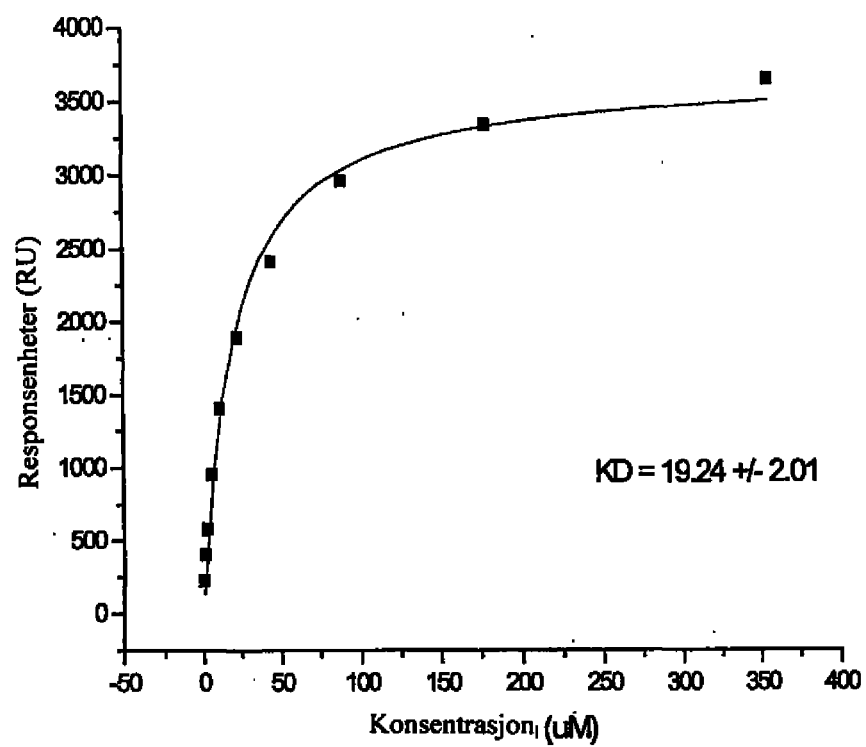
24/81

Figur. 30



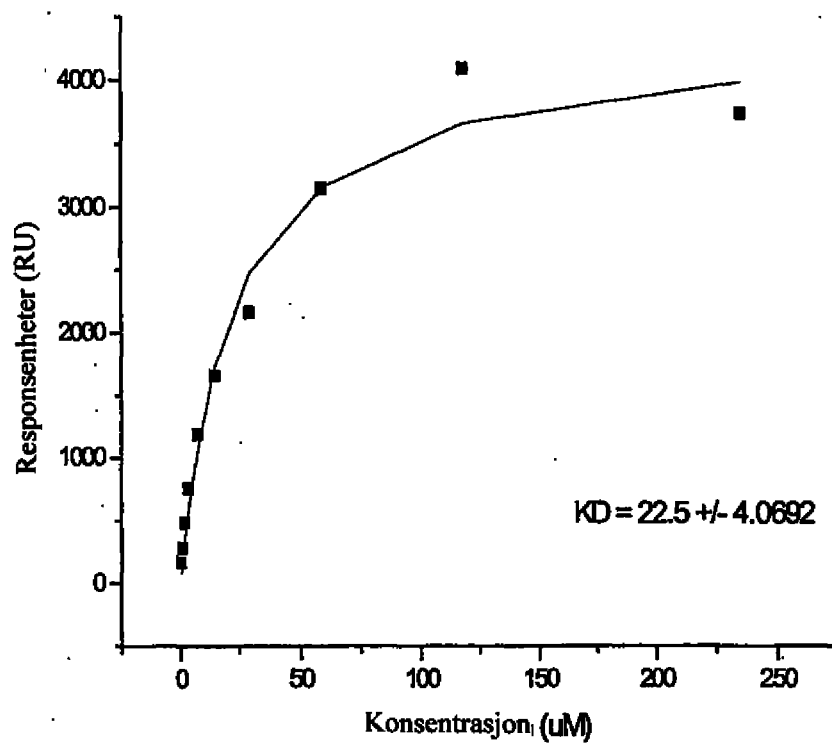
25/81

Figur 31



26/81

Figur 32



27/81

Figur 33a

atgaaggaggtggagcagaattctggacccctcagtgttccagagggagccattg
 cctctctcaactgcacttacagtgaccgaggttcccagtccttcttctggtacag
 acaatatctctgggaaaagccctgagttgataatgttcatatactccaatggtgac
 aaagaagatggaaggtttacagcacagctcaataaagccagccagtatgtttctc
 tgctcatcagagactcccagcccagtgattcagccacctacctctgtgccgtgaa
 gggggggtctgggggttaccagaaagtacctttggaactggaacaaagctccaa
 gtcacccaaatatccagaacccggatcctgccgtgtaccagctgagagactcta
 aatccagtgacaagtctgtctgcctattcaccgattttgattctcaaacaaatgt
 gtcacaaagtaaggattctgatgtgtatatcacagacaaa[box]gtgctagacatg
 aggtctatggacttcaagagcaacagtgctgtggcctggagcaacaaatctgact
 ttgcatgtgcaaacgccttcaacaacagcattattccagaagacaccttcttccc
 cagcccagaaagttcctaa

Figur 33b

atgggcgctcatgcagaacccaagacacctggtcaggaggaggggacaggaggcaa
 gactgagatgcagcccaatgaaaggacacagtcagtttactggtatcggcagct
 cccagaggaaggtctgaaattcatggtttatctccagaaagaaaatatcatagat
 gagttaggaatgcaaaggaacgattttctgctgaatttcccaaagagggcccca
 gcatcctgaggatccagcaggtagtgcgaggagattcggcagcttatttctgtgc
 cagctcaccacagacagggggcacagatacgcagttatttggcccaggcacccgg
 ctgacagtgctcgaggacctgaaaaacgtgttcccacccgaggtcgctgtgtttg
 agccatcagaagcagagatctcccacacccaaaaggccacactggtgtgcctggc
 cacaggcttctaccccgaccacgtggagctgagctggtgggtgaatgggaaggag
 gtgcacagtggggtc[box]acagaccccgagccctcaaggagcagccgcctca
 atgaactccagatacgtctctgagcagccgctgaggggtctcgccaccttctggca
 ggacccccgcaaccacttccgctgtcaagtccagttctacgggctctcgagaat
 gacgagtggacccaggatagggccaaaccgctcaccagatcgtcagcgccgagg
 cctggggtagagcagactaa

Figur 34a

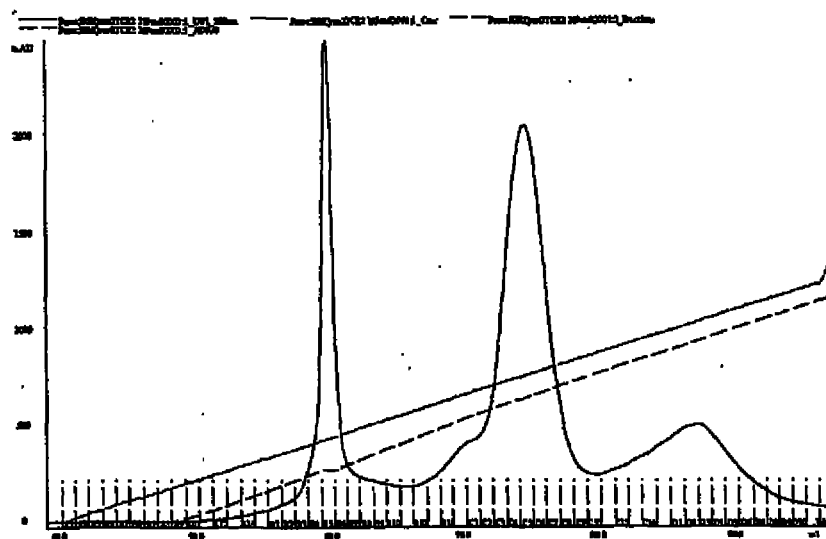
MKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYS
 GKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLLRDSQP
 SDSATYLCVKGSGGYQKVTFGTGTLQVIPNIQNPDPA
 VYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKC
 VLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFF
 PSPESS Stopp

Figur 34b

MGVMQNPRHLVRRRGQEARLRCSPMKGHSHVYWYRQLP
 EGLKFMVYLQKENIIDESGMPKERFSAEFPKEGPSILRIQ
 QVVRGDSAAYFCASSPQTGGTDTQYFGPGTRLTVLEDLKN
 VFPPEVAVFEPSEABISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSW
 WVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYALSSRLRVSAT
 FWQDPRNHFRQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAE
 AWGRAD Stopp

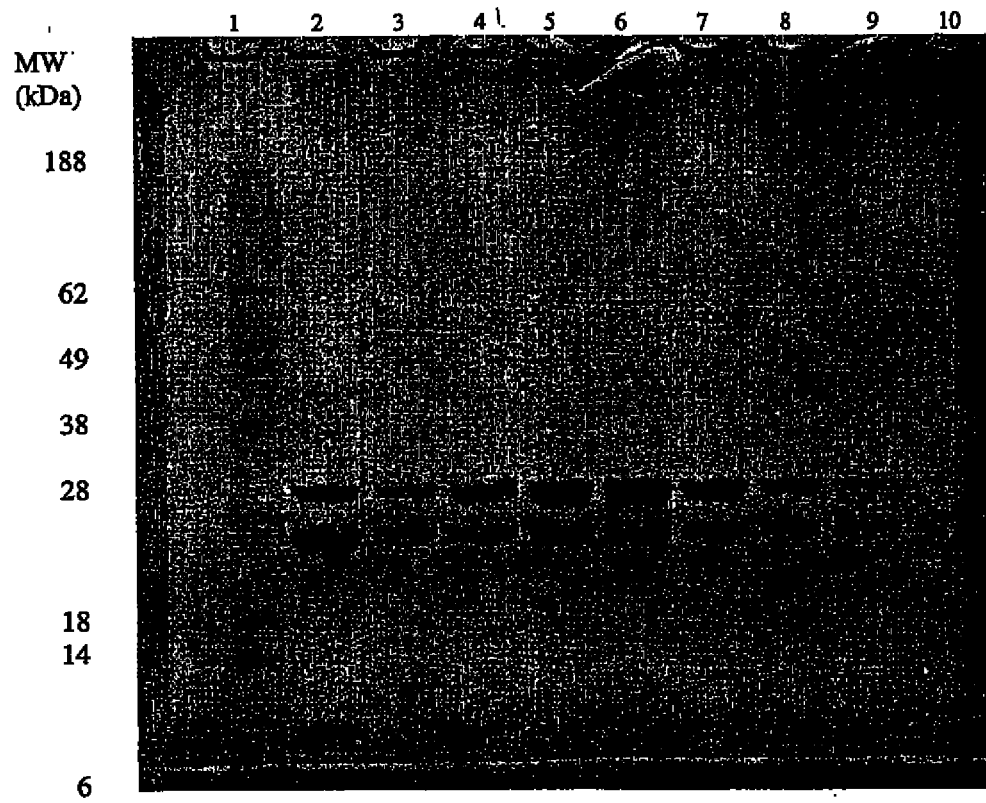
28/81

Figur 35



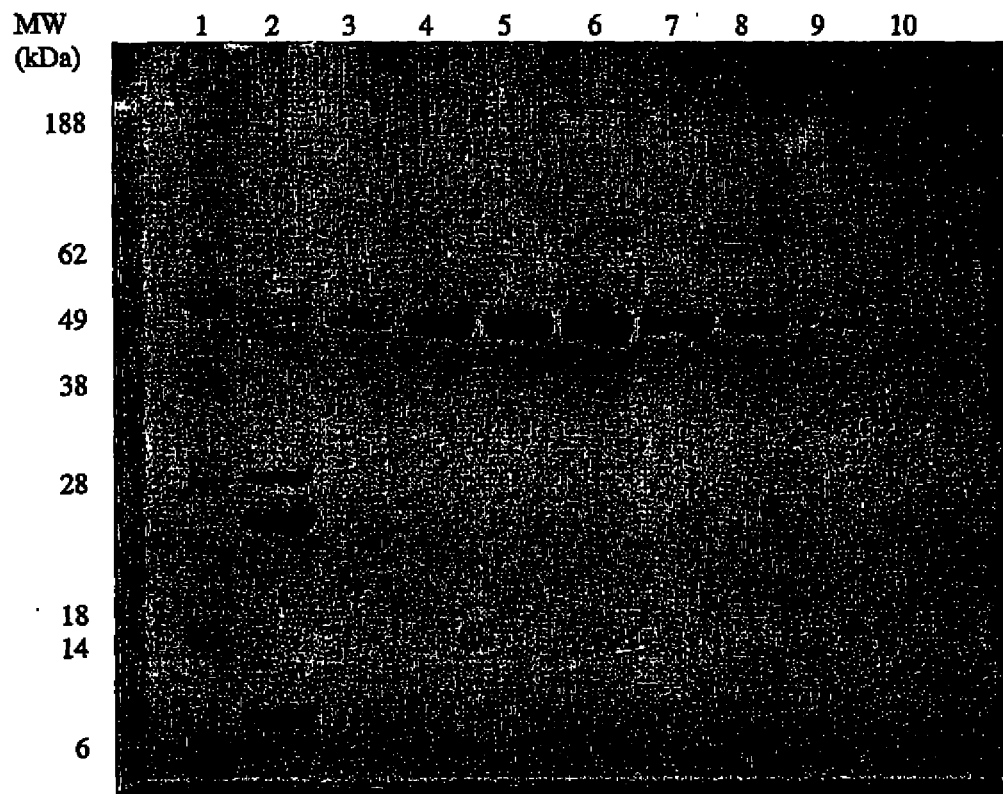
29/81

Figur 36



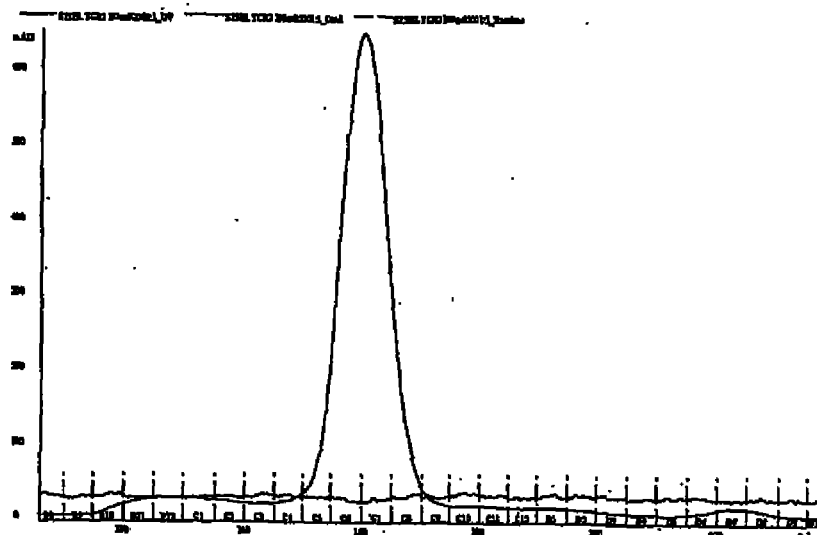
30/81

Figur 37



31/81

Figur 38



32/81

Figur 39a – T48→C α -kjede

atgcagaaggaagtggagcagaactctggacccctcagtgttccagagggagcca
 ttgcctctctcaactgcacttacagtgaccgaggttcccagtccttcttctggta
 cagacaatatctctgggaaaagccctgagttgataatgtccatataactccaatggt
 gacaaagaagatggaaggtttacagcacagctcaataaagccagccagtatgttt
 ctctgctcatcagagactcccagcccagtgattcagccacctacctctgtgccgt
 tacaactgacagctgggggaaattgcagtttggagcagggacccaggttgtggtc
 accccagatatccagaaccctgaccctgccgtgtaccagctgagagactctaaat
 ccagtgacaagtctgtctgcctattcaccgattttgattctcaaacaatgtgtc
 acaaagtaaggattctgatgtgtatatcacagacaaa[redacted]gtgctagacatgagg
 tctatggacttcaagagcaacagtgctgtggcctggagcaacaatctgactttg
 catgtgcaaacgccttcaacaacagcattattccagaagacaccttcttccccag
 cccagaaagttcctaa

Figur 39b – T48→C α -kjede

MQ

K₁EVEQNSGPL SVPEGAIASL NCTYSDRGSQ SFFWYRQYSG KSPELIMSIY SNGDKEDGRF
 TAQLNKASQY VLLIRDSQP SDSATYLCAY TTDSWGKLQF GAGTQVVVTP DIQNPDPVAV
 QLRDSKSSDK SVCLFTDFDS QTNVSQSKDS DVYITDKCVL DMRSMDFKSN SAVAWSNKSD
 FACANAFNNS IIPEDTFFPS PESS*

Figur 40a – T45→C alfa-kjede-DNA-sekvens

Atgcagaaggaagtggagcagaactctggacccctcagtgttccagagggagcca
 ttgcctctctcaactgcacttacagtgaccgaggttcccagtccttcttctggta
 cagacaatatctctgggaaaagccctgagttgataatgtccatataactccaatggt
 gacaaagaagatggaaggtttacagcacagctcaataaagccagccagtatgttt
 ctctgctcatcagagactcccagcccagtgattcagccacctacctctgtgccgt
 tacaactgacagctgggggaaattgcagtttggagcagggacccaggttgtggtc
 accccagatatccagaaccctgaccctgccgtgtaccagctgagagactctaaat
 ccagtgacaagtctgtctgcctattcaccgattttgattctcaaacaatgtgtc
 acaaagtaaggattctgatgtgtatatc[redacted]gacaaaactgtgctagacatgagg
 tctatggacttcaagagcaacagtgctgtggcctggagcaacaatctgactttg
 catgtgcaaacgccttcaacaacagcattattccagaagacaccttcttccccag
 cccagaaagttcctaa

Figur 40b – T45→C alfa-kjede-aminosyresekvens

MQ

K₁EVEQNSGPL SVPEGAIASL NCTYSDRGSQ SFFWYRQYSG KSPELIMSIY SNGDKEDGRF
 TAQLNKASQY VLLIRDSQP SDSATYLCAY TTDSWGKLQF GAGTQVVVTP DIQNPDPVAV
 QLRDSKSSDK SVCLFTDFDS QTNVSQSKDS DVYICDKTVL DMRSMDFKSN SAVAWSNKSD
 FACANAFNNS IIPEDTFFPS PESS*

33/81

Figur 41a – S61→C alfa-kjede-DNA-sekvens

Atgcagaaggaagtggagcagaactctggacccctcagtgttccagagggagcca
 ttgcctctctcaactgcacttacagtgaccgaggttcccagtccttcttctggta
 cagacaatattctgggaaaagccctgagttgataatgtccatatactccaatggg
 gacaaagaagatggaaggtttacagcacagctcaataaagccagccagtatgttt
 ctctgctcatcagagactcccagcccagtgattcagccacctacctctgtgccgt
 tacaactgacagctgggggaaattgcagtttggagcagggacccaggttgtgggc
 accccagatatccagaaccctgaccctgccgtgtaccagctgagagactctaaat
 ccagtgacaagtctgtctgcctattcaccgattttgattctcaaacaaatgtgtc
 acaaagtaaggattctgatgtgtatatcacagacaaaactgtgctagacatgagg
 tctatggacttcaagagcaacgctgtggcctggagcaacaaatctgactttg
 catgtgcaaacgccttcaacaacagcattattccagaagacaccttcttccccag
 cccagaaaagttcctaa

Figur 41b – S61→C alfa-kjede-aminosyresekvens

MQ

K₁EVEQNSGPL SVPEGAIASL NCTYSDRGSQ SFFWYRQYSG KSPELIMSIY
 SNGDKEDGRF TAQLNKASQY VSLILIRDSQP SDSATYLCV TTDWGLQF
 GAGTQVVVTP DIQNPDPVY QLRDSKSSDK SVCLFTDFDS QTNVSQSKDS
 DVYITDKTVL DMRSMDFKSN CAVAWSNKSD FACANAFNNS IIPEDTFPS PESS*

Figur 42a – L50→C alfa-kjede-DNA-sekvens

Atgcagaaggaagtggagcagaactctggacccctcagtgttccagagggagcca
 ttgcctctctcaactgcacttacagtgaccgaggttcccagtccttcttctggta
 cagacaatattctgggaaaagccctgagttgataatgtccatatactccaatggg
 gacaaagaagatggaaggtttacagcacagctcaataaagccagccagtatgttt
 ctctgctcatcagagactcccagcccagtgattcagccacctacctctgtgccgt
 tacaactgacagctgggggaaattgcagtttggagcagggacccaggttgtgggc
 accccagatatccagaaccctgaccctgccgtgtaccagctgagagactctaaat
 ccagtgacaagtctgtctgcctattcaccgattttgattctcaaacaaatgtgtc
 acaaagtaaggattctgatgtgtatatcacagacaaaactgtgctgacatgagg
 tctatggacttcaagagcaacagtgctgtggcctggagcaacaaatctgactttg
 catgtgcaaacgccttcaacaacagcattattccagaagacaccttcttccccag
 cccagaaaagttcctaa

Figur 42b – L50→C alfa-kjede-aminosyresekvens

MQ

K₁EVEQNSGPL SVPEGAIASL NCTYSDRGSQ SFFWYRQYSG KSPELIMSIY
 SNGDKEDGRF TAQLNKASQY VSLILIRDSQP SDSATYLCV TTDWGLQF
 GAGTQVVVTP DIQNPDPVY QLRDSKSSDK SVCLFTDFDS QTNVSQSKDS
 DVYITDKTVL DMRSMDFKSN SAVAWSNKSD FACANAFNNS IIPEDTFPS PESS*

34/81

Figur 43a – Y10→C α -kjede

atgcagaaggaagtggagcagaactctggacccctcagtgttccagagggagcca
 ttgcctctctcaactgcacttacagtgaccgaggttcccagtccttcttctggta
 cagacaatattctgggaaaagccctgagttgataatgtccatatactccaatggg
 gacaaagaagatggaaggtttacagcacagctcaataaagccagccagtatgttt
 ctctgctcatcagagactcccagcccagtgattcagccacctacctctgtgccgt
 tacaactgacagctgggggaaattgcagtttggagcagggacccaggttgtggtc
 accccagatatccagaaccctgaccctgccgtg[REDACTED]cagctgagagactctaaat
 ccagtgacaagtctgtctgcctattcaccgattttgattctcaaacaaatgtgtc
 acaaagtaaggattctgatgtgtatatcacagacaaaactgtgctagacatgagg
 tctatggacttcaagagcaacagtgctgtggcctggagcaacaaatctgactttg
 catgtgcaaacgccttcaacaacagcattattccagaagacaccttcttccccag
 cccagaaagttcctaa

Figur 43b – Y10→C α -kjede

MQ
 K₁EVEQNSGPL SVPEGAIASL NCTYSDRGSQ SFFWYRQYSG KSPELIMSIY
 SNGDKEDGRF TAQLNKASQY VLLIRDSQP SDSATYLCAV TTDSWGKLQF
 GAGTQVVVTP DIQNPDPVC QLRDSKSSDK SVCLFTDFDS QTNVSQSKDS
 DVYITDKTVL DMRSMDFKSN SAVAWSNKSD FACANAFNNS IIPEDTFFPS PESS*

Figur 44a – S15→C α -kjede

atgcagaaggaagtggagcagaactctggacccctcagtgttccagagggagcca
 ttgcctctctcaactgcacttacagtgaccgaggttcccagtccttcttctggta
 cagacaatattctgggaaaagccctgagttgataatgtccatatactccaatggg
 gacaaagaagatggaaggtttacagcacagctcaataaagccagccagtatgttt
 ctctgctcatcagagactcccagcccagtgattcagccacctacctctgtgccgt
 tacaactgacagctgggggaaattgcagtttggagcagggacccaggttgtggtc
 accccagatatccagaaccctgaccctgccgtgtaccagctgagagac[REDACTED]aaat
 ccagtgacaagtctgtctgcctattcaccgattttgattctcaaacaaatgtgtc
 acaaagtaaggattctgatgtgtatatcacagacaaaactgtgctagacatgagg
 tctatggacttcaagagcaacagtgctgtggcctggagcaacaaatctgactttg
 catgtgcaaacgccttcaacaacagcattattccagaagacaccttcttccccag
 cccagaaagttcctaa

Figur 44b – S15→C α -kjede

MQ
 K₁EVEQNSGPL SVPEGAIASL NCTYSDRGSQ SFFWYRQYSG KSPELIMSIY
 SNGDKEDGRF TAQLNKASQY VLLIRDSQP SDSATYLCAV TTDSWGKLQF
 GAGTQVVVTP DIQNPDPVY QLRDCKSSDK SVCLFTDFDS QTNVSQSKDS
 DVYITDKTVL DMRSMDFKSN SAVAWSNKSD FACANAFNNS IIPEDTFFPS PESS*

35/81

Figur 45a – L12→C α -kjede

atgcagaaggaagtggagcagaactctggacccctcagtgttccagagggagcca
 ttgcctctctcaactgcacttacagtgaccgaggttcccagtccttcttctggta
 cagacaatattctgggaaaagccctgagttgataatgtccatatactccaatggg
 gacaaagaagatggaaggtttacagcacagctcaataaagccagccagtatgttt
 ctctgctcatcagagactcccagcccagtgattcagccacctacctctgtgccgt
 tacaactgacagctgggggaaattgcagtttggagcagggacccaggttgtggc
 accccagatatccagaaccctgacctgccgtgtaccagctgagagactctaaat
 ccagtgacaagtctgtctgcctattcaccgattttgattctcaaacaaatgtgtc
 acaaagtaaggattctgatgtgtatatcacagacaaaactgtgctagacatgagg
 tctatggacttcaagagcaacagtgctgtggcctggagcaacaaatctgactttg
 catgtgcaaacgccttcaacaacagcattattccagaagacaccttcttccccag
 cccagaaagttcctaa

Figur 45b – L12→C α -kjede

MQ

K₁EVEQNSGPL SVPEGALASL NCTYSDRGSQ SFFWYRQYSG KSPELIMSIY
 SNGDKEDGRF TAQLNKASQY VSLIIRDSQP SDSATYLCAY TTDSWGKLQF
 GAGTQVVVTP DIQNPDPVAV QCRDSKSSDK SVCLFTDFDS QTNVSQSKDS
 DVYITDKTVL DMRSMDPKSN SAVAWSNKSD FACANAFNNS IIPEDTFFPS PESS*

Figure 46a – V22→C α -kjede

atgcagaaggaagtggagcagaactctggacccctcagtgttccagagggagcca
 ttgcctctctcaactgcacttacagtgaccgaggttcccagtccttcttctggta
 cagacaatattctgggaaaagccctgagttgataatgtccatatactccaatggg
 gacaaagaagatggaaggtttacagcacagctcaataaagccagccagtatgttt
 ctctgctcatcagagactcccagcccagtgattcagccacctacctctgtgccgt
 tacaactgacagctgggggaaattgcagtttggagcagggacccaggttgtggc
 accccagatatccagaaccctgacctgccgtgtaccagctgagagactctaaat
 ccagtgacaagtctctgcctattcaccgattttgattctcaaacaaatgtgtc
 acaaagtaaggattctgatgtgtatatcacagacaaaactgtgctagacatgagg
 tctatggacttcaagagcaacagtgctgtggcctggagcaacaaatctgactttg
 catgtgcaaacgccttcaacaacagcattattccagaagacaccttcttccccag
 cccagaaagttcctaa

Figur 46b – V22→C α -kjede

MQ

K₁EVEQNSGPL SVPEGALASL NCTYSDRGSQ SFFWYRQYSG KSPELIMSIY
 SNGDKEDGRF TAQLNKASQY VSLIIRDSQP SDSATYLCAY TTDSWGKLQF
 GAGTQVVVTP DIQNPDPVAV QLRDSKSSDK SECLFTDFDS QTNVSQSKDS
 DVYITDKTVL DMRSMDPKSN SAVAWSNKSD FACANAFNNS IIPEDTFFPS PESS*

36/81

Figur 47a – M52→C α -kjede

atgcagaaggaagtggagcagaactctggacccctcagtgttccagagggagcca
 ttgcctctctcaactgcacttacagtgaccgaggttcccagtccttcttctggta
 cagacaatatctctgggaaaagccctgagttgataatgtccatatactccaatggt
 gacaaagaagatggaaggtttacagcacagctcaataaagccagccagtatgttt
 ctctgctcatcagagactcccagcccagtgattcagccacctacctctgtgccgt
 tacaactgacagctgggggaaattgcagtttggagcagggacccaggttgtggtc
 accccagatatccagaaccctgaccctgccgtgtaccagctgagagactctaaat
 ccagtgacaagtctgtctgcctattcaccgattttgattctcaaacaatgtgtc
 acaaagtaaggattctgatgtgtatatcacagacaaaactgtgctagacatgagg
 tctatggacttcaagagcaacagtgctgtggcctggagcaacaaatctgactttg
 catgtgcaaacgccttcaacaacagcattattccagaagacaccttcttccccag
 cccagaaagttcctaa

Figur 47b – M52→C α -kjede

MQ

K₁EVEQNSGPL SVPEGAIASL NCTYSDRGSQ SFFWYRQYSG KSPELIMSIY
 SNGDKEDGRF TAQLNKASQY VSLLRDSQP SDSATYLCV TTDWGLQF
 GAGTQVVVTP DIQNPDPVY QLRDSKSSDK SVCLFTDFDS QTNVSQSKDS
 DVYITDKTVL DCRSMDFKSN SAVAWSNKSD FACANAFNNS IIPEDTFFPS PESS*

Figur 48a – Y43→C α -kjede

atgcagaaggaagtggagcagaactctggacccctcagtgttccagagggagcca
 ttgcctctctcaactgcacttacagtgaccgaggttcccagtccttcttctggta
 cagacaatatctctgggaaaagccctgagttgataatgtccatatactccaatggt
 gacaaagaagatggaaggtttacagcacagctcaataaagccagccagtatgttt
 ctctgctcatcagagactcccagcccagtgattcagccacctacctctgtgccgt
 tacaactgacagctgggggaaattgcagtttggagcagggacccaggttgtggtc
 accccagatatccagaaccctgaccctgccgtgtaccagctgagagactctaaat
 ccagtgacaagtctgtctgcctattcaccgattttgattctcaaacaatgtgtc
 acaaagtaaggattctgatgtgcatcacagacaaaactgtgctagacatgagg
 tctatggacttcaagagcaacagtgctgtggcctggagcaacaaatctgactttg
 catgtgcaaacgccttcaacaacagcattattccagaagacaccttcttccccag
 cccagaaagttcctaa

Figur 48b – Y43→C α -kjede

MQ

K₁EVEQNSGPL SVPEGAIASL NCTYSDRGSQ SFFWYRQYSG KSPELIMSIY
 SNGDKEDGRF TAQLNKASQY VSLLRDSQP SDSATYLCV TTDWGLQF
 GAGTQVVVTP DIQNPDPVY QLRDSKSSDK SVCLFTDFDS QTNVSQSKDS
 DVCI¹TDKTVL DMRSMDFKSN SAVAWSNKSD FACANAFNNS IIPEDTFFPS PESS*

37/81

Figur 49a - Ser57→C β-kjede

atgaacgctggtgtcactcagacccccaaaattccaggtcctgaagacaggacaga
 gcatgacactgcagtggtgccaggatgatgaaccatgaatacatgtcctgggtatcg
 acaagacccaggcatggggctgaggctgattcattactcagttggtgctgggtatc
 actgaccaaggagaagtccccaatggctacaatgtctccagatcaaccacagagg
 atttcccgctcaggctgctgtcggctgctccctcccagacatctgtgtacttctg
 tgccagcaggccgggactagcgggagggcgaccagagcagtacttcgggcccgggc
 accaggctcacggtcacagaggacctgaaaaacgtgttcccacccgaggtcgctg
 tgtttgagccatcagaagcagagatctcccacacccaaaaggccacactggtgtg
 cctggccacaggcttctaccccgaccacgtggagctgagctggtgggtgaatggg
 aaggaggtgcacagtggggtcagcagacccgcagccctcaaggagcagcccg
 cctcaatgactccagatacgctctgagcagccgctgaggggtctcgccacctt
 ctggcaggacccccgcaaccacttccgctgtcaagtccagttctacgggctctcg
 gagaatgacgagtggaaccaggatagggccaaaccgctcaccagatcgtcagcg
 ccgaggcctggggtagagcagactaa

Figur 49b Ser57→C β-kjede

M

N₁AGVTQTPKF QVLKTQSMT LQCAQDMNHE YMSWYRQDPG MGLRLIHYSV
 GAGITDQGEV PNGYNVSRST TEDFPLRLLS AAPSTSVYF CASRPGLAGG
 RPEQYFGPGT RLTVTEDLKN VFPPEVAVFE PSEAEISHTQ KATLVCLATG
 FYPDHVELSW WVNGKEVHSG VCTDPQPLKE QPALNDSRYA LSSRLRVSAT
 FWQDPRNHFR CQVQFYGLSE NDEWTQDRAK PVTQIVSAEA WGRAD*

Figur 50a - Ser77→C β-kjede

atgaacgctggtgtcactcagacccccaaaattccaggtcctgaagacaggacaga
 gcatgacactgcagtggtgccaggatgatgaaccatgaatacatgtcctgggtatcg
 acaagacccaggcatggggctgaggctgattcattactcagttggtgctgggtatc
 actgaccaaggagaagtccccaatggctacaatgtctccagatcaaccacagagg
 atttcccgctcaggctgctgtcggctgctccctcccagacatctgtgtacttctg
 tgccagcaggccgggactagcgggagggcgaccagagcagtacttcgggcccgggc
 accaggctcacggtcacagaggacctgaaaaacgtgttcccacccgaggtcgctg
 tgtttgagccatcagaagcagagatctcccacacccaaaaggccacactggtgtg
 cctggccacaggcttctaccccgaccacgtggagctgagctggtgggtgaatggg
 aaggaggtgcacagtggggtcagcagacccgcagccctcaaggagcagcccg
 cctcaatgactccagatacgctctgagccgctgaggggtctcgccacctt
 ctggcaggacccccgcaaccacttccgctgtcaagtccagttctacgggctctcg
 gagaatgacgagtggaaccaggatagggccaaaccgctcaccagatcgtcagcg
 ccgaggcctggggtagagcagactaa

Figur 50b Ser77→C β-kjede

M

N₁AGVTQTPKF QVLKTQSMT LQCAQDMNHE YMSWYRQDPG MGLRLIHYSV
 GAGITDQGEV PNGYNVSRST TEDFPLRLLS AAPSTSVYF CASRPGLAGG
 RPEQYFGPGT RLTVTEDLKN VFPPEVAVFE PSEAEISHTQ KATLVCLATG
 FYPDHVELSW WVNGKEVHSG VSTDPOPLKE QPALNDSRYA LCSRLRVSAT
 FWQDPRNHFR CQVQFYGLSE NDEWTQDRAK PVTQIVSAEA WGRAD*

38/81

Figur 51a – Ser17→C β -kjede

atgaacgctggtgtcactcagacccccaaaattccaggtcctgaagacaggacaga
 gcatgacactgcagtgtgcccaggatatgaaccatgaatacatgtcctggtatcg
 acaagacccaggcatggggctgaggtgattcattactcagttggtgctggtatc
 actgaccaaggagaagtccccaatggctacaatgtctccagatcaaccacagagg
 atttcccgtcaggctgctgtcggtgctccctcccagacatctgtgtacttctg
 tgccagcaggccgggactagcgggagggcgaccagagcagtagtacttcggggccgggc
 accaggtcacggtcacagaggacctgaaaaacgtgttcccacccgaggtcgctg
 tgtttgagcca[red]gaagcagagatctcccacacccaaaaggccacactggtgtg
 cctggccacaggcttctaccccgaccacgtggagctgagctggtgggtgaatggg
 aaggaggtgcacagtggggctcagcacagacccgcagcccctcaaggagcagcccg
 ccctcaatgactccagatacgtctgagcagccgcctgaggggtctcggccacctt
 ctggcaggacccccgcaaccaettccgctgtcaagtccagttctacgggctctcg
 gagaatgacgagtggaaccaggatagggccaaacccgtcaccacagatcgtcagcg
 ccgaggcctggggtagagcagactaa

Figur 51b Ser17→C β -kjede

M

N₁AGVTQTPKF QVLKTGQSMT LQCAQDMNHE YMSWYRQDPG MGLRLIHYSV
 GAGITDQGEV PNGYNVSRST TEDFPLRLLS AAPSTSVYF CASRPGLAGG
 RPEQYFGPGT RLTVTEDLKN VFPPEVAVFE PCEAEISHTQ KATLVCLATG
 FYPDHVELSW WVNGKEVHSG VSTDPOPLKE QPALNDSRYA LSSRLRVSAT
 FWQDPRNHFR CQVQFYGLSE NDEWTQDRAK PVTQIVSAEA WGRAD*

Figur 52a – Val 13→C β -kjede

atgaacgctggtgtcactcagacccccaaaattccaggtcctgaagacaggacaga
 gcatgacactgcagtgtgcccaggatatgaaccatgaatacatgtcctggtatcg
 acaagacccaggcatggggctgaggtgattcattactcagttggtgctggtatc
 actgaccaaggagaagtccccaatggctacaatgtctccagatcaaccacagagg
 atttcccgtcaggctgctgtcggtgctccctcccagacatctgtgtacttctg
 tgccagcaggccgggactagcgggagggcgaccagagcagtagtacttcggggccgggc
 accaggtcacggtcacagaggacctgaaaaacgtgttcccacccgaggtcgct[red]
 [red]tttgagccatcagaagcagagatctcccacacccaaaaggccacactggtgtg
 cctggccacaggcttctaccccgaccacgtggagctgagctggtgggtgaatggg
 aaggaggtgcacagtggggctcagcacagacccgcagcccctcaaggagcagcccg
 ccctcaatgactccagatacgtctgagcagccgcctgaggggtctcggccacctt
 ctggcaggacccccgcaaccaettccgctgtcaagtccagttctacgggctctcg
 gagaatgacgagtggaaccaggatagggccaaacccgtcaccacagatcgtcagcg
 ccgaggcctggggtagagcagactaa

Figur 52 Val 13→C β -kjede

M

N₁AGVTQTPKF QVLKTGQSMT LQCAQDMNHE YMSWYRQDPG MGLRLIHYSV
 GAGITDQGEV PNGYNVSRST TEDFPLRLLS AAPSTSVYF CASRPGLAGG
 RPEQYFGPGT RLTVTEDLKN VFPPEVACFE PSEAEISHTQ KATLVCLATG
 FYPDHVELSW WVNGKEVHSG VSTDPOPLKE QPALNDSRYA LSSRLRVSAT
 FWQDPRNHFR CQVQFYGLSE NDEWTQDRAK PVTQIVSAEA WGRAD*

39/81

Figur 53a - Asp 59→C β -kjede

atgaacgctggtgtcactcagacccccaaaattccaggtcctgaagacaggacaga
 gcatgacactgcagtggtgccaggatatgaaccatgaatacatgtcctgggtatcg
 acaagacccaggcatggggtgaggctgattcattactcagttggtgctggtatc
 actgaccaaggagaagtccccaatggctacaatgtctccagatcaaccacagagg
 atttcccgtcaggtgctgtcggtgctccctcccagacatctgtgtacttctg
 tgccagcaggccgggactagcgggagggcgaccagagcagtaacttcgggcccggc
 accaggtcacggtcacagaggacctgaaaaacgtgttcccacccgaggtcgctg
 tgtttgagccatcagaagcagagatctcccacacccaaaaggccacactggtgtg
 cctggccacaggcttctaccccgaccacgtggagctgagctggtgggtgaatggg
 aaggaggtgcacagtggtgagcaca[REDACTED]ccgcagcccctcaaggagcagccg
 ccctcaatgactccagatagctctgagcagccgcctgaggggtctcgccacctt
 ctggcaggacccccgcaaccacttccgctgtcaagtccagttctacgggctctcg
 gagaatgacgagtggaaccaggatagggccaaaccggtcaccagatcgtcagcg
 ccgaggcctggggtagagcagactaa

Figur 53b Asp 59→C β -kjede

M

N₁AGVTQTPKF QVLKTQSMT LQCAQDMNHE YMSWYRQDPG MGLRLIHYSV
 GAGITDQGEV PNGYNVSRST TEDFPLRLLS AAPQSQTSVYF CASRPGLAGG
 RPEQYFGPGT RLIVTEDLKN VFPPEVAVFE PSEAEISHTQ KATLVCLATG
 FYPDHVELSW WVNGKEVHSG VSTCPQLKE QPALNDSRYA LSSRLRVSAT
 FWQDPRNHFR CQVQFYGLSE NDEWTQDRAK PVTQIVSAEA WGRAD*

Figur 54a - Arg 79→C β -kjede

atgaacgctggtgtcactcagacccccaaaattccaggtcctgaagacaggacaga
 gcatgacactgcagtggtgccaggatatgaaccatgaatacatgtcctgggtatcg
 acaagacccaggcatggggtgaggctgattcattactcagttggtgctggtatc
 actgaccaaggagaagtccccaatggctacaatgtctccagatcaaccacagagg
 atttcccgtcaggtgctgtcggtgctccctcccagacatctgtgtacttctg
 tgccagcaggccgggactagcgggagggcgaccagagcagtaacttcgggcccggc
 accaggtcacggtcacagaggacctgaaaaacgtgttcccacccgaggtcgctg
 tgtttgagccatcagaagcagagatctcccacacccaaaaggccacactggtgtg
 cctggccacaggcttctaccccgaccacgtggagctgagctggtgggtgaatggg
 aaggaggtgcacagtggtgagcaca[REDACTED]ccgcagcccctcaaggagcagccg
 ccctcaatgactccagatagctctgagcagc[REDACTED]ctgaggggtctcgccacctt
 ctggcaggacccccgcaaccacttccgctgtcaagtccagttctacgggctctcg
 gagaatgacgagtggaaccaggatagggccaaaccggtcaccagatcgtcagcg
 ccgaggcctggggtagagcagactaa

Figur 54b Arg 79→C β -kjede

M

N₁AGVTQTPKF QVLKTQSMT LQCAQDMNHE YMSWYRQDPG MGLRLIHYSV
 GAGITDQGEV PNGYNVSRST TEDFPLRLLS AAPQSQTSVYF CASRPGLAGG
 RPEQYFGPGT RLIVTEDLKN VFPPEVAVFE PSEAEISHTQ KATLVCLATG
 FYPDHVELSW WVNGKEVHSG VSTDQPLKE QPALNDSRYA LSSCLRVSAT
 FWQDPRNHFR CQVQFYGLSE NDEWTQDRAK PVTQIVSAEA WGRAD*

40/81

Figur 55a – Phe 14→C β-kjede

atgaacgctggtgtcactcagacccccaaaattccaggtcctgaagacaggacaga
 gcatgacactgcagtggtgcccaggatatgaaccatgaatacatgtcctgggtatcg
 acaagacccaggcatggggctgaggctgattcattactcagttggtgctggtatc
 actgaccaaggagaagtccccaatggctacaatgtctccagatcaaccacagagg
 atttcccgtcaggctgctgtcggtgctccctcccagacatctgtgtacttctg
 tggcagcaggccgggactagcgggagggcgaccagagcagtacttcgggcccggc
 accaggctcacggtcacagaggacctgaaaaacgtgttcccacccgaggtcgctg
 tg~~gag~~gagccatcagaagcagagatctcccacacccaaaaggccacactggtgtg
 cctggccacaggcttctaccccgaccacgtggagctgagctggtgggtgaatggg
 aaggaggtgcacagtggggtcagcacagaccgcagccctcaaggagcagccg
 ccctcaatgactccagatacgtctgagcagccgcctgaggggtctcgccacctt
 ctggcaggacccccgcaaccacttccgctgtcaagtccagttctacgggctctcg
 gagaatgacgagtggaaccaggatagggccaaaccggtcaccagatcgtcagcg
 ccgaggcctggggtagagcagactaa

Figur 55b Phe 14→C β-kjede

M

N₁AGVTQTPKF QVLKTGQSM T LQCAQDMNHE YMSWYRQDPG MGLRLIHYSV
 GAGITDQGEV PNGYNVSRST TEDFPLRLLS AAPQSOTSVYF CASRPGLAGG
 RPEQYFGPGT RLTVTEDLKN VFPPEVAVCE PSEAEISHTQ KATLVCLATG
 FYPDHVELSW WVNGKEVHSG VSTDPOPLKE QPALNDSRYA LSSRLRVSAT
 FWQDPRNHFR CQVQFYGLSE NDEWTQDRAK PVTQIVSARA WGRAD*

Figur 56a – Gly 55→C β-kjede

atgaacgctggtgtcactcagacccccaaaattccaggtcctgaagacaggacaga
 gcatgacactgcagtggtgcccaggatatgaaccatgaatacatgtcctgggtatcg
 acaagacccaggcatggggctgaggctgattcattactcagttggtgctggtatc
 actgaccaaggagaagtccccaatggctacaatgtctccagatcaaccacagagg
 atttcccgtcaggctgctgtcggtgctccctcccagacatctgtgtacttctg
 tggcagcaggccgggactagcgggagggcgaccagagcagtacttcgggcccggc
 accaggctcacggtcacagaggacctgaaaaacgtgttcccacccgaggtcgctg
 tg~~gag~~gagccatcagaagcagagatctcccacacccaaaaggccacactggtgtg
 cctggccacaggcttctaccccgaccacgtggagctgagctggtgggtgaatggg
 aaggaggtgcacagt~~gag~~gtcagcacagaccgcagccctcaaggagcagccg
 ccctcaatgactccagatacgtctgagcagccgcctgaggggtctcgccacctt
 ctggcaggacccccgcaaccacttccgctgtcaagtccagttctacgggctctcg
 gagaatgacgagtggaaccaggatagggccaaaccggtcaccagatcgtcagcg
 ccgaggcctggggtagagcagactaa

Figur 56b Gly 55→C β-kjede

M

N₁AGVTQTPKF QVLKTGQSM T LQCAQDMNHE YMSWYRQDPG MGLRLIHYSV
 GAGITDQGEV PNGYNVSRST TEDFPLRLLS AAPQSOTSVYF CASRPGLAGG
 RPEQYFGPGT RLTVTEDLKN VFPPEVAVFE PSEAEISHTQ KATLVCLATG
 FYPDHVELSW WVNGKEVHSC VSTDPOPLKE QPALNDSRYA LSSRLRVSAT
 FWQDPRNHFR CQVQFYGLSE NDEWTQDRAK PVTQIVSARA WGRAD*

41/81

Figur 57a – Leu 63→C β-kjede

atgaacgctggtgtcactcagacccccaaaattccaggtcctgaagacaggacaga
 gcatgacactgcagtgtgcccaggatatgaaccatgaatacatgtcctggtatcg
 acaagacccaggcatggggctgaggctgattcattactcagttggtgctggtatc
 actgaccaaggagaagtccccaatggctacaatgtctccagatcaaccacagagg
 atttcccgcctcaggctgctgtcggctgctccctcccagacatctgtgtacttctg
 tgccagcaggccgggactagcgggagggcgaccagagcagtagtacttcggggccgggc
 accaggctcacggtcacagaggacctgaaaaacgtgttcccacccgaggctcgctg
 tgtttgagccatcagaagcagagatctcccacacccaaaaggccacactggtgtg
 cctggccacaggcttctaccccgaccacgtggagctgagctggtggtgaatggg
 aaggaggtgcacagtggggctcagcacagacccgcagcccctgcaaggagcagcccg
 ccctcaatgactccagatacgtctctgagcagccgcctgaggggtctcggccacctt
 ctggcaggacccccgcaaccacttccgctgtcaagtccagttctacgggctctcg
 gagaatgacgagtggacccaggatagggccaaacccgtcaccagatcgtcagcg
 ccgaggcctggggtagagcagactaa

Figur 57b Leu 63→C β-kjede

M

N₁AGVTQTPKF QVLKTQSMT LQCAQDMNHE YMSWYRQDPG MGLRLIHYSV
 GAGITDQGEV PNGYNVSRST TEDFPLRLLS AAPSQTSVYF CASRPGLAGG
 RPEQYFGPGT RLTVTEDLKN VFPPEVAVFE PSEAEISHTQ KATLVCLATG
 FYPDHVELSW WVNGKEVHSG VSTDPQPCKE QPALNDSRYA LSSRLRVSAT
 FWQDPRNHFR CQVQFYGLSE NDEWTQDRAK PVTQIVSAEA WGRAD*

Figur 58a – Glu 15→C β-kjede

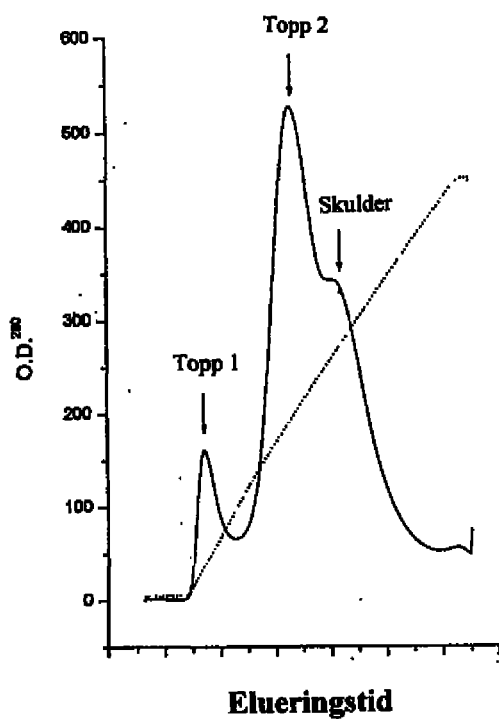
atgaacgctggtgtcactcagacccccaaaattccaggtcctgaagacaggacaga
 gcatgacactgcagtgtgcccaggatatgaaccatgaatacatgtcctggtatcg
 acaagacccaggcatggggctgaggctgattcattactcagttggtgctggtatc
 actgaccaaggagaagtccccaatggctacaatgtctccagatcaaccacagagg
 atttcccgcctcaggctgctgtcggctgctccctcccagacatctgtgtacttctg
 tgccagcaggccgggactagcgggagggcgaccagagcagtagtacttcggggccgggc
 accaggctcacggtcacagaggacctgaaaaacgtgttcccacccgaggctcgctg
 tgtttcccatcagaagcagagatctcccacacccaaaaggccacactggtgtg
 cctggccacaggcttctaccccgaccacgtggagctgagctggtggtgaatggg
 aaggaggtgcacagtggggctcagcacagacccgcagcccctcaaggagcagcccg
 ccctcaatgactccagatacgtctctgagcagccgcctgaggggtctcggccacctt
 ctggcaggacccccgcaaccacttccgctgtcaagtccagttctacgggctctcg
 gagaatgacgagtggacccaggatagggccaaacccgtcaccagatcgtcagcg
 ccgaggcctggggtagagcagactaa

Figur 58b Glu 15→C β-kjede

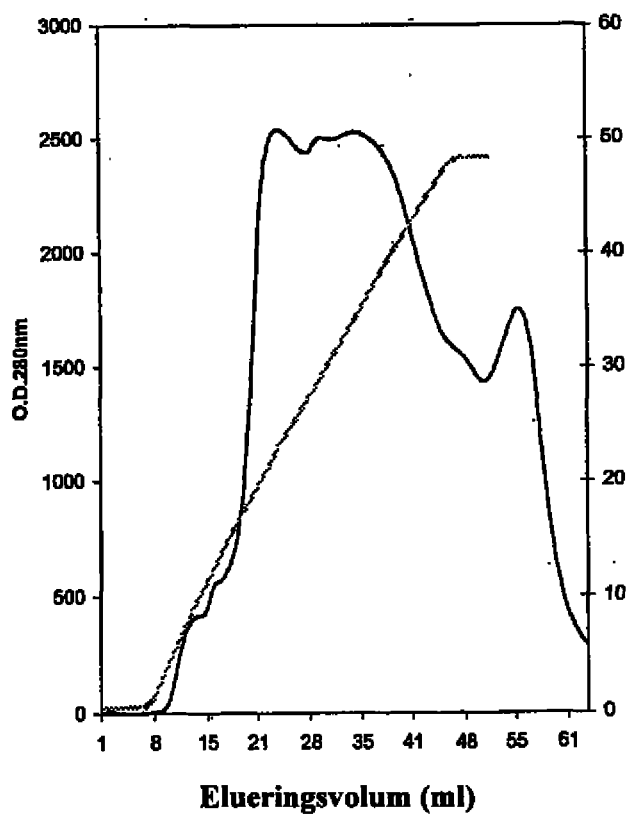
M

N₁AGVTQTPKF QVLKTQSMT LQCAQDMNHE YMSWYRQDPG MGLRLIHYSV
 GAGITDQGEV PNGYNVSRST TEDFPLRLLS AAPSQTSVYF CASRPGLAGG
 RPEQYFGPGT RLTVTEDLKN VFPPEVAVFC PSEAEISHTQ KATLVCLATG
 FYPDHVELSW WVNGKEVHSG VSTDPQPLKE QPALNDSRYA LSSRLRVSAT
 FWQDPRNHFR CQVQFYGLSE NDEWTQDRAK PVTQIVSAEA WGRAD*

42/81

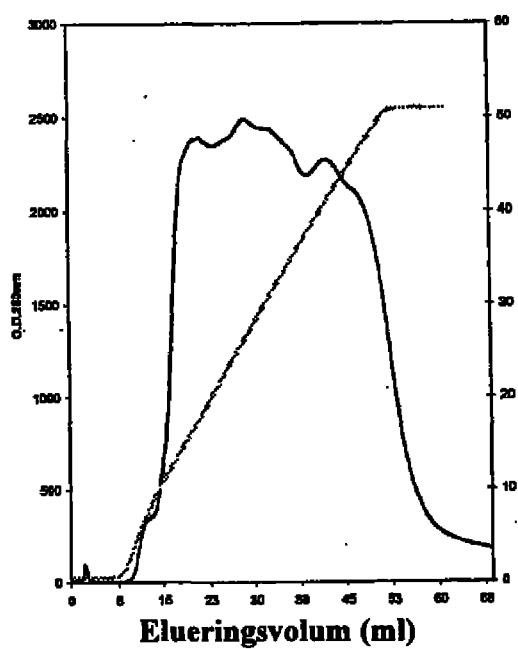
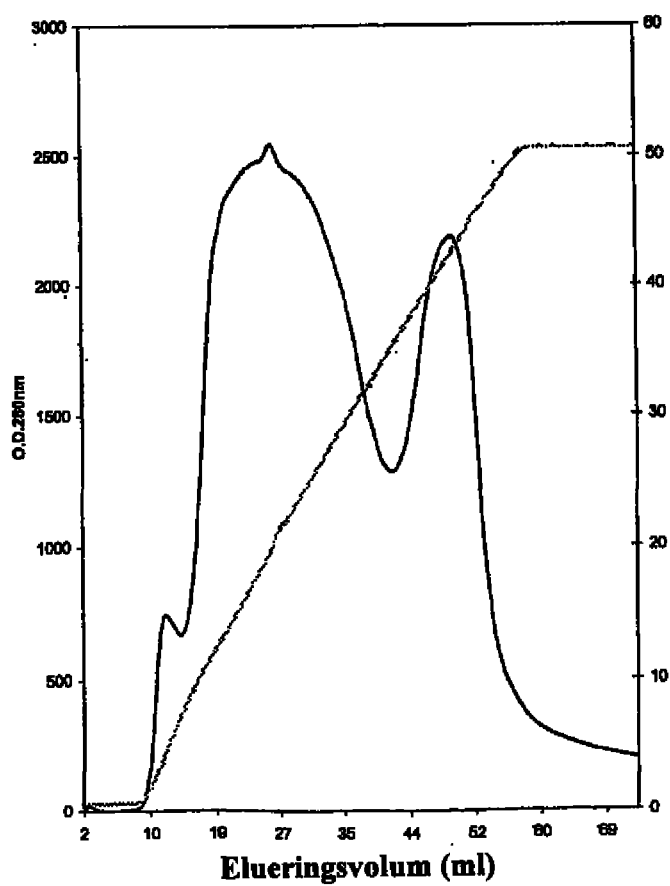


Figur 59: AE-kolonne Thr48/Ser57

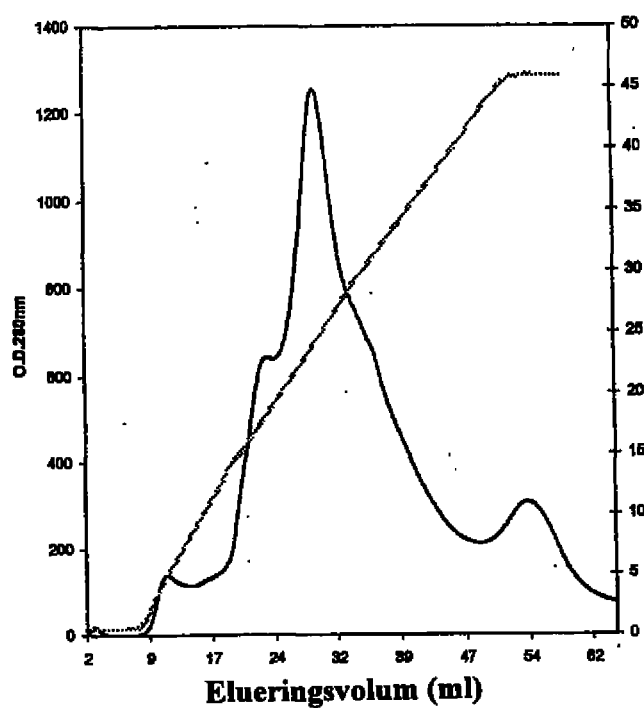


Figur 60: AE-kolonne Thr45/Ser77

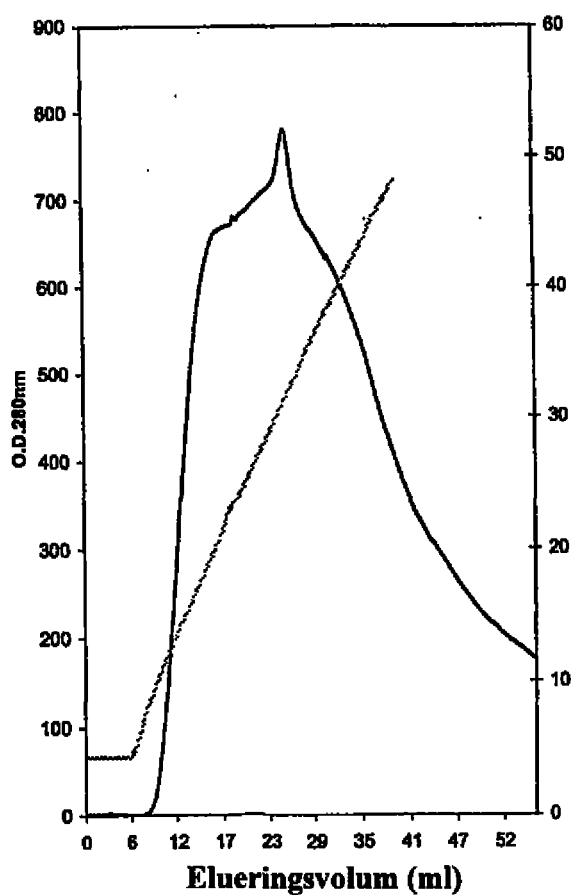
43/81

**Figur 61: AE-kolonne Tyr10/Ser17****Figur 62: AE-kolonne Thr45/Asp59**

44/81

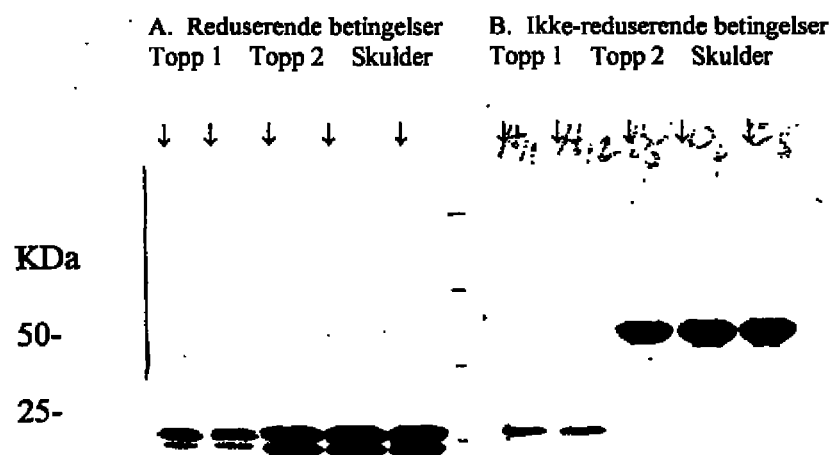


Figur 63: AE-kolonne Met52/Gly55

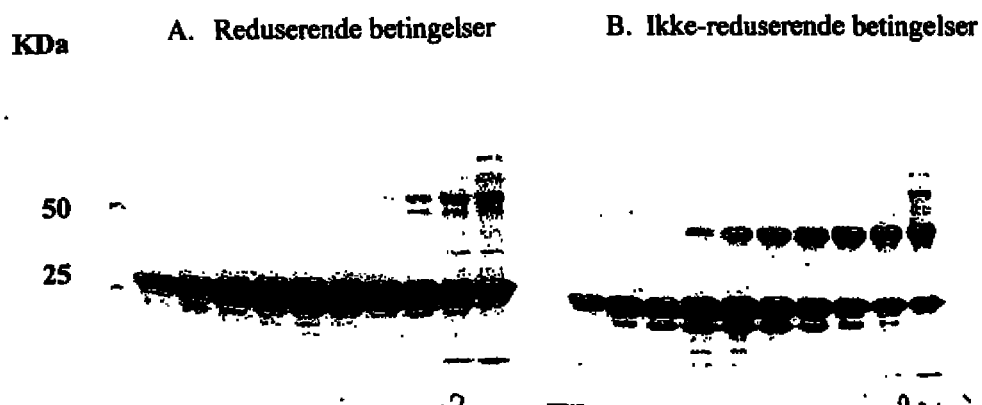


Figur 64: AE-kolonne Ser15/Glu15

45/81

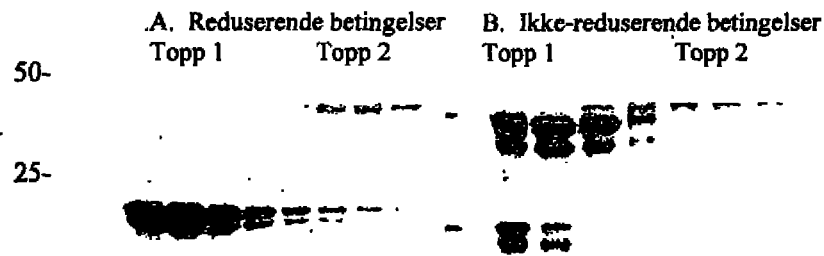


Figur 65: SDS PAGE Thr 48 / Ser 57

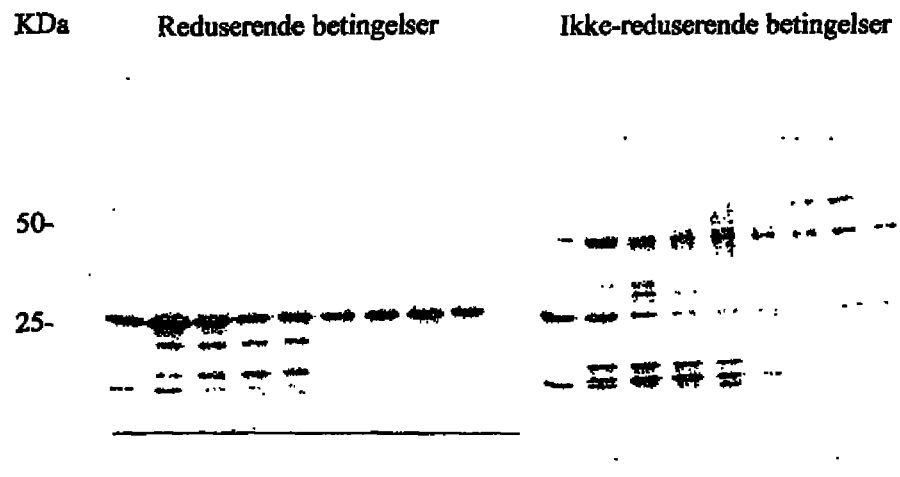


Figur 66: SDS PAGE Thr 45 / Ser 77

46/81

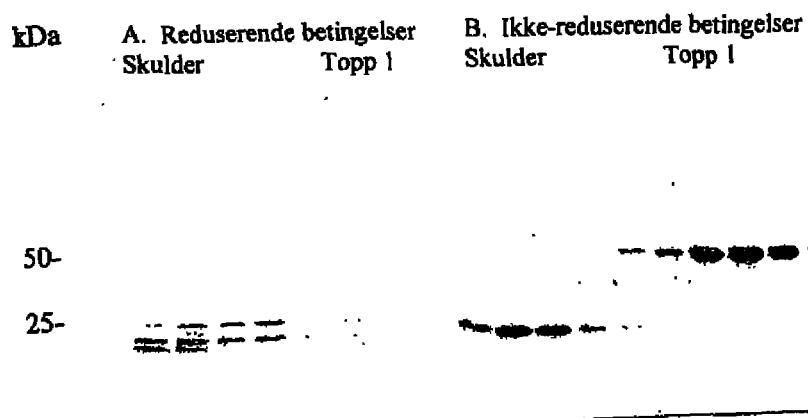


Figur 67 SDS PAGE Tyr 10 / Ser 17

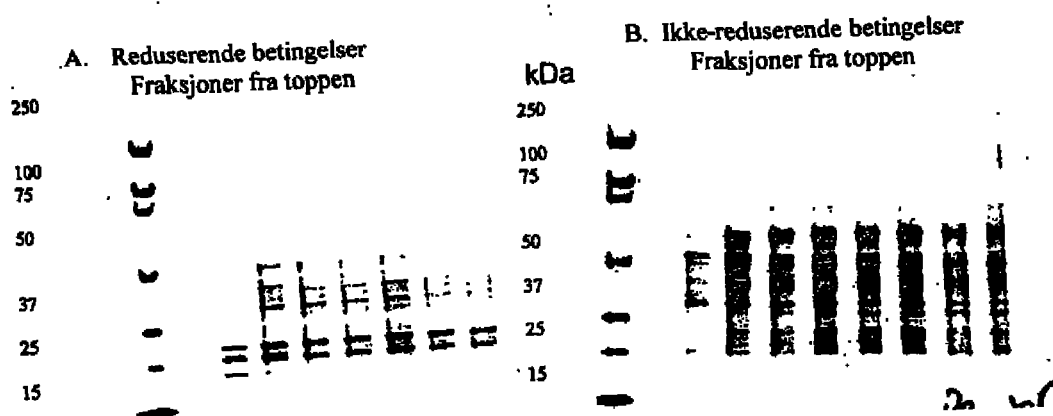


Figur 68 SDS PAGE Thr 45 / Asp 59

47/81

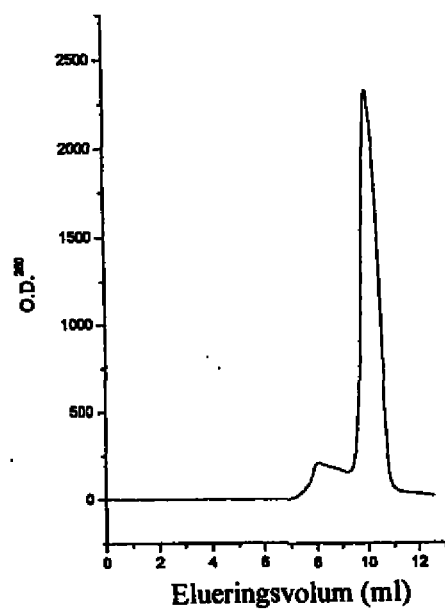
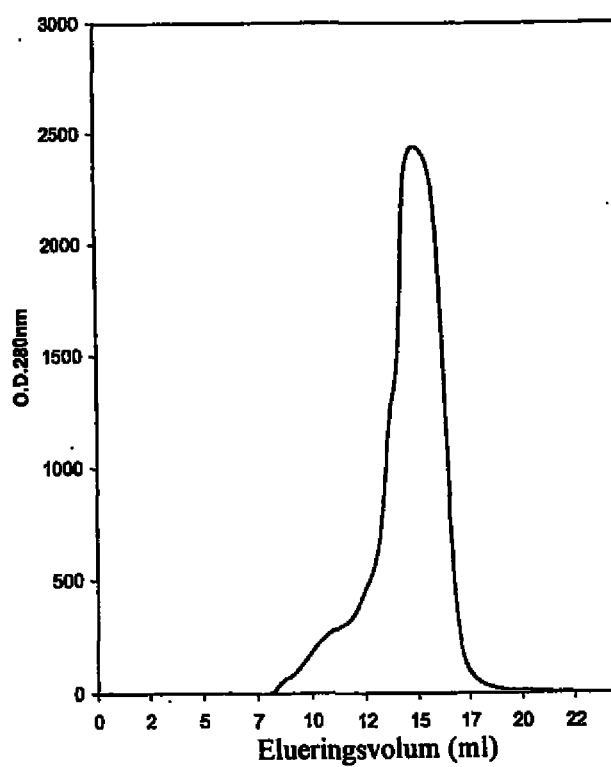


Figur 69: SDS PAGE Met52/Gly55

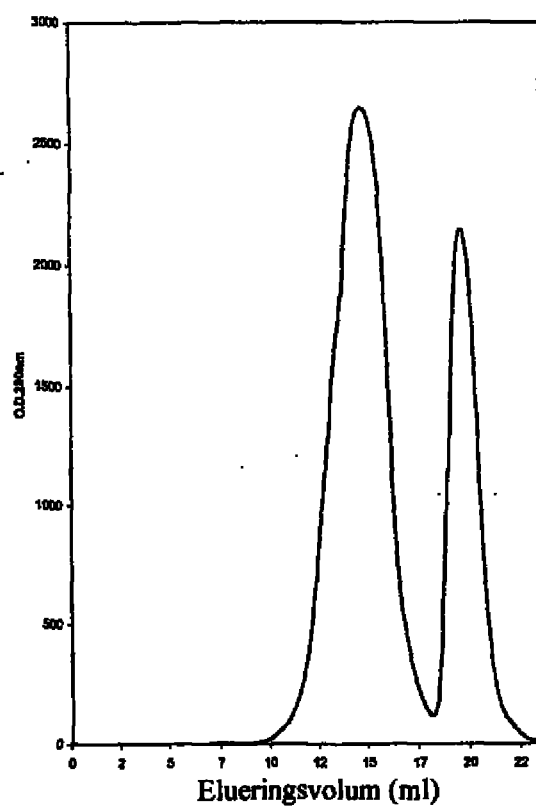


Figur 70: SDS PAGE Ser 15/Glu 15

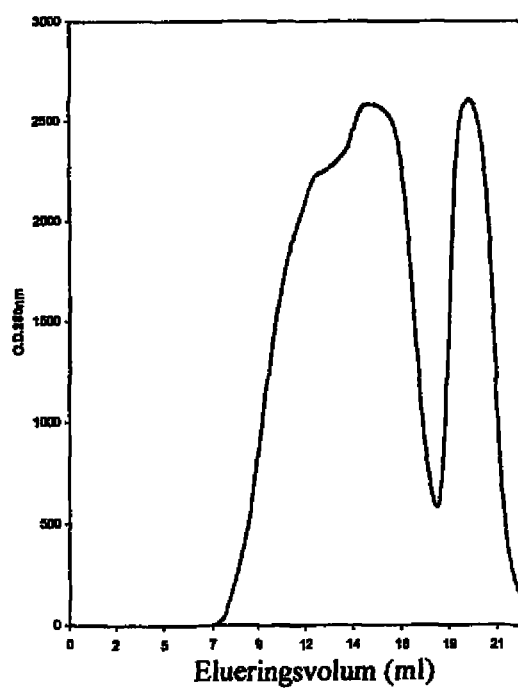
48/81

**Figur 71: SEC Thr48/Ser57****Figur 72: SEC Thr45/Ser77 (200 HR-kolonne)**

49/81

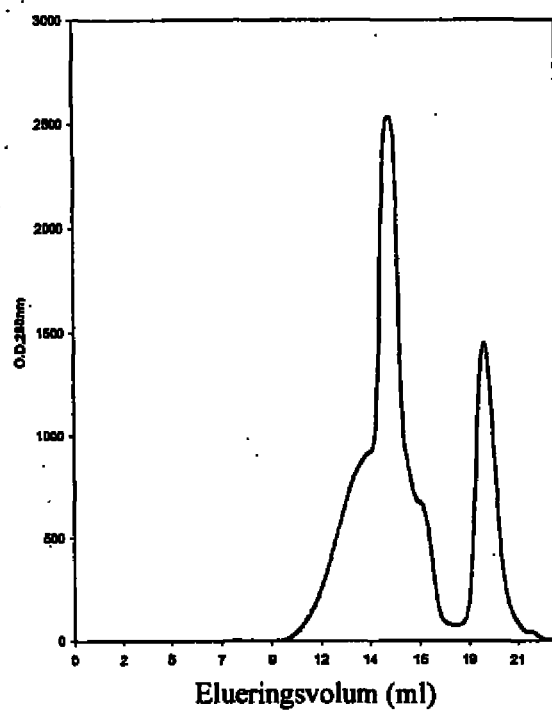


Figur 73: SEC Tyr 10 / Ser 17 (200 HR-kolonne)

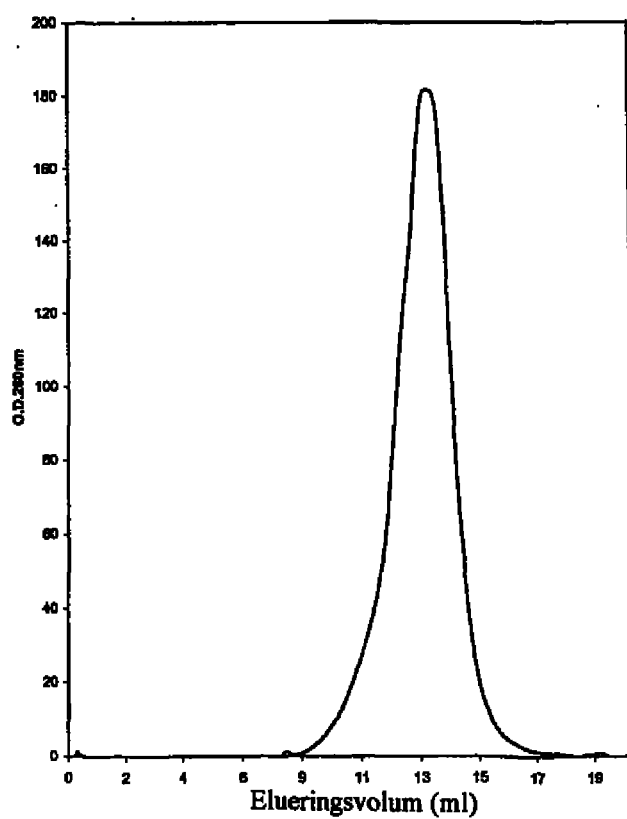


Figur 74: SEC Thr 45/Asp 59 (200 HR-kolonne)

50/81

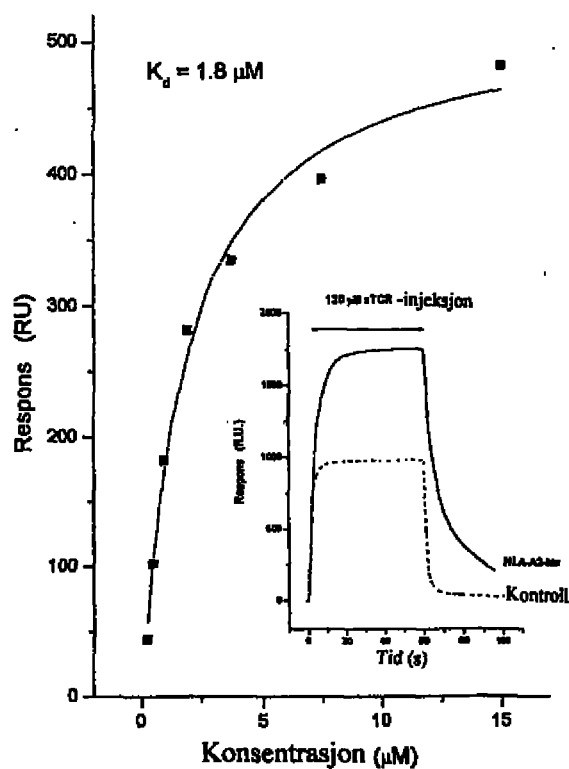


Figur 75 SEC Met 52 / Gly 55 (200 HR-kolonne)

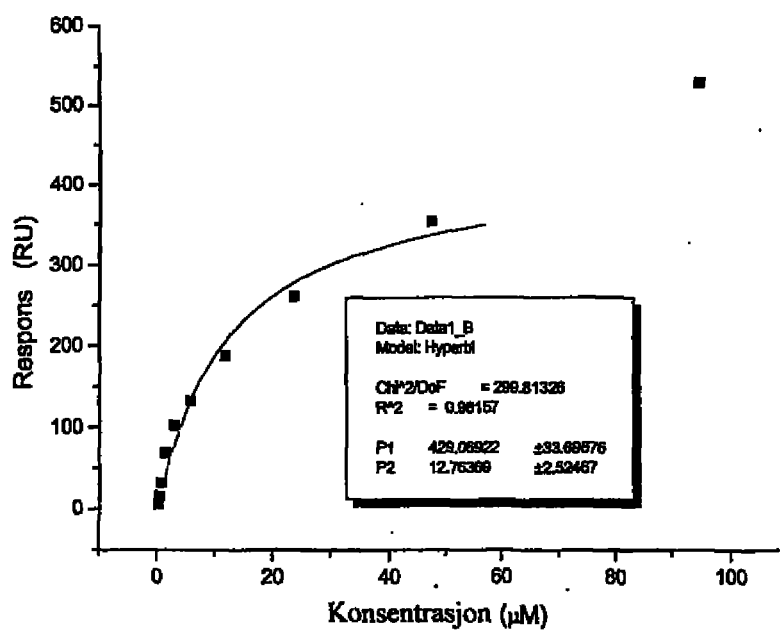


Figur 76: SEC Ser 15/Glu 15 (200 HR-kolonne)

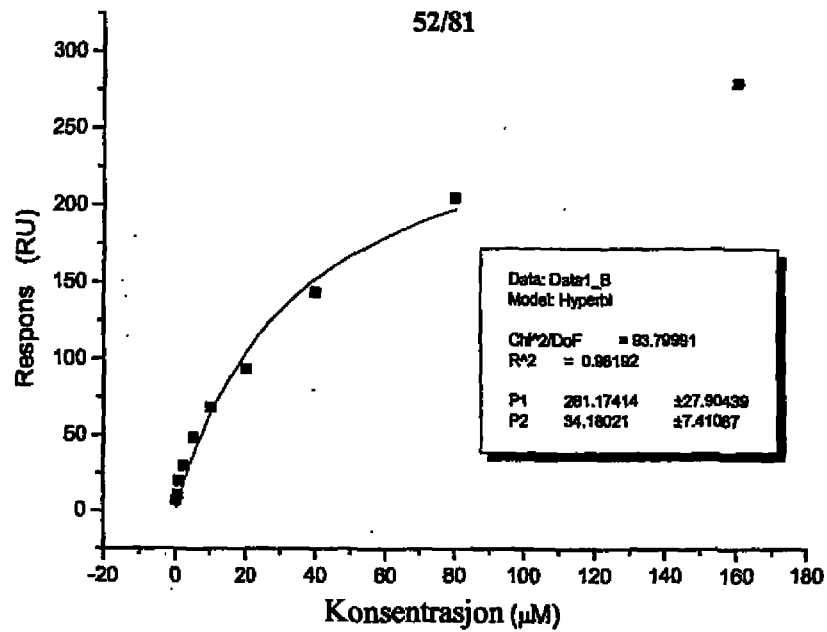
51/81



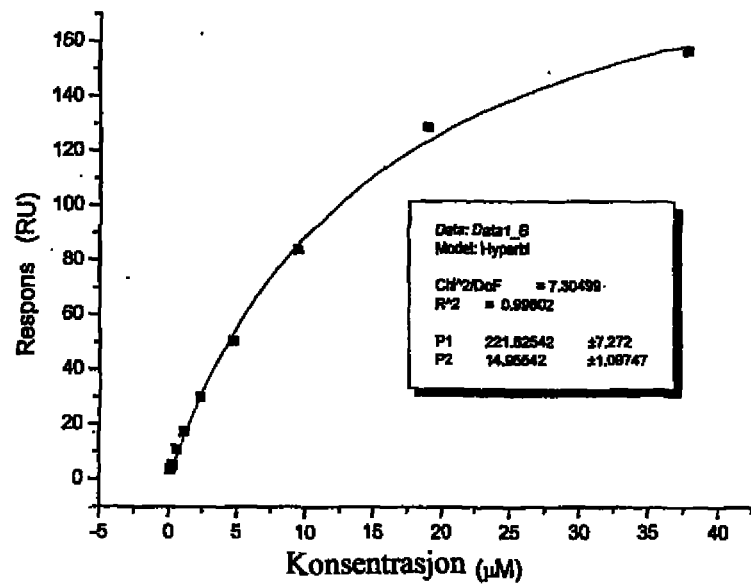
Figur 77: Thr 48/Ser 57



Figur 78: Thr 45/Ser 77

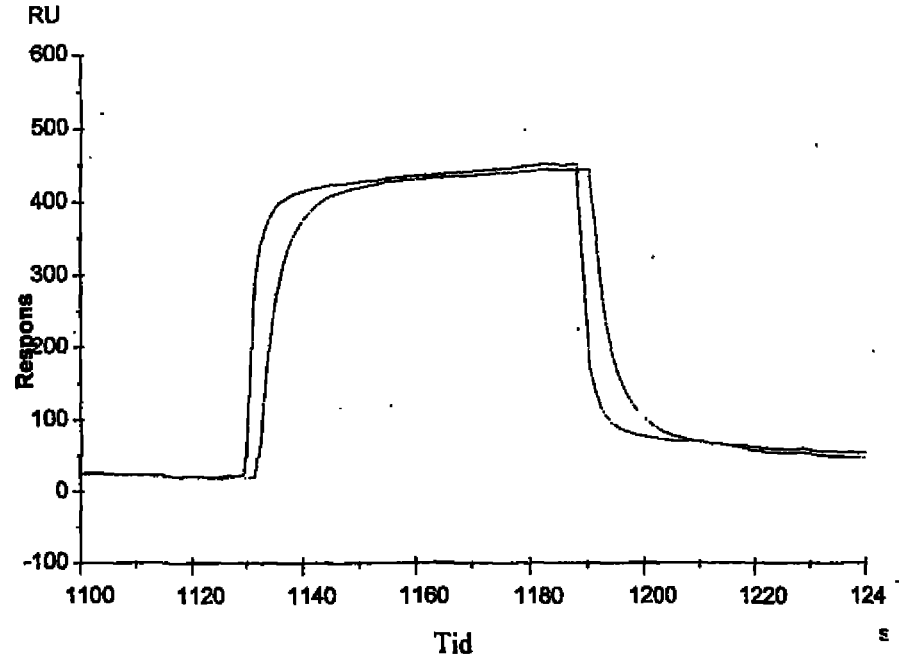


Figur 79: Tyr 10/Ser 17

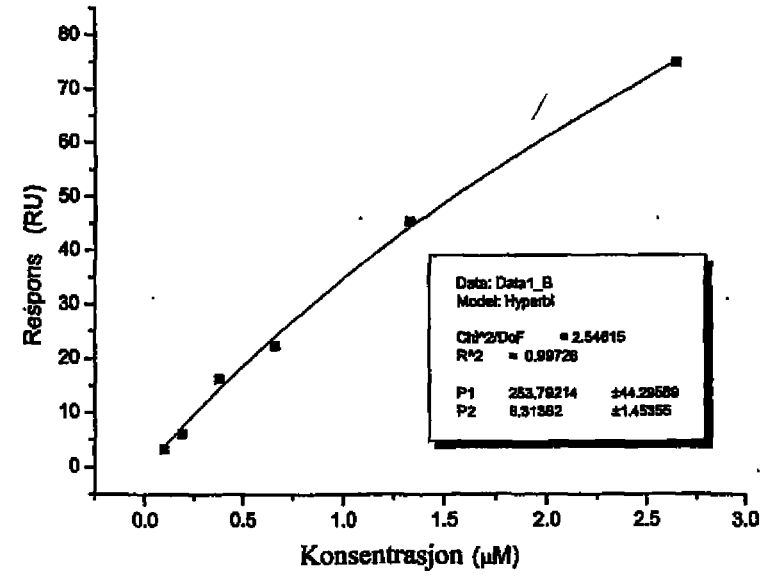


Figur 80: Thr 45/Asp 59

53/81



Figur 81: Met 52/Gly 55



Figur 82: Ser 15/Glu 15

54/81

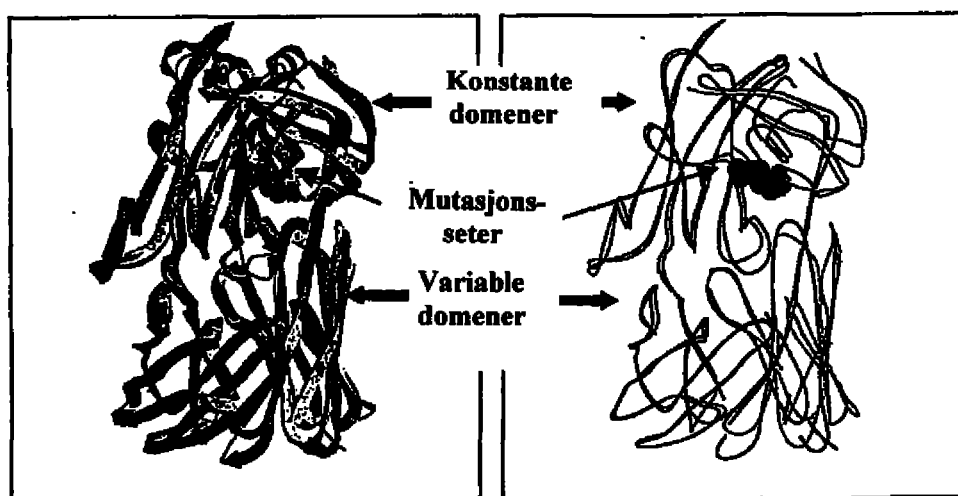
Figur 83a



Figur 83b



Figur 84



55/81

Figur 85a

atgggtgtcactcagacccccaaaattccaggtcctgaagacaggacagagcatgaca
 ctgcagtgtgcccaggatatgaaccatgaatacatgtcctgggtatcgacaagaccca
 ggcatggggctgaggctgattcattactcagttgggtgctggtatcaactgaccaagga
 gaagtecccaatggctacaatgtctccagatcaaccacagaggatttcccgctcagg
 ctgctgtcggctgctccctcccagacatctgtgtacttctgtgccagcagttacgtc
 gggaacacccggggagctgttttttgagaaggctctaggctgaccgtactggaggac
 ctgaaaaacgtgttcccacccgaggtcgtgtgtttgagccatcagaagcagagatc
 tcccacacccaaaaggccacactgggtgtgcctggccacaggcttctacccccgaccac
 gtggagctgagctgggtgggtgaatgggaaggaggtgcacagtggggctctgcacagac
 ccgcagccctcaaggagcagcccgccctcaatgactccagatacgtctctgagcagc
 cgctgagggctctcgccaccttctggcaggacccccgcaaccacttccgctgtcaa
 gtccagttctacgggctctcggagaatgacgagtggaacccaggatagggccaaaccc
 gtcacccagatcgtcagcgccgaggcctggggtagagcagacggatccgggtggtggt
 ctgaacgatatttttgaagctcagaaaaatcgaatggcattaa

Figur 85b

M G V T Q T P K F Q V L K T G Q S M T L Q C A Q D M N H E Y M
 S W Y R Q D P G M G L R L I H Y S V G A G I T D Q G E V P N G
 Y N V S R S T T E D F P L R L L S A A P S Q T S V Y F C A S S
 Y V G N T G E L F F G E G S R L T V L E D L K N V F P P E V A
 V F E P S E A E I S H T Q K A T L V C L A T G F Y P D H V E L
 S W W V N G K E V H S G V C T D P Q P L K E Q P A L N D S R Y
 A L S S R L R V S A T F W Q D P R N H F R C Q V Q F Y G L S E
 N D E W T Q D R A K P V T Q I V S A E A W G R A D G S G G G 
 Stopp

56/81

Figur 86a

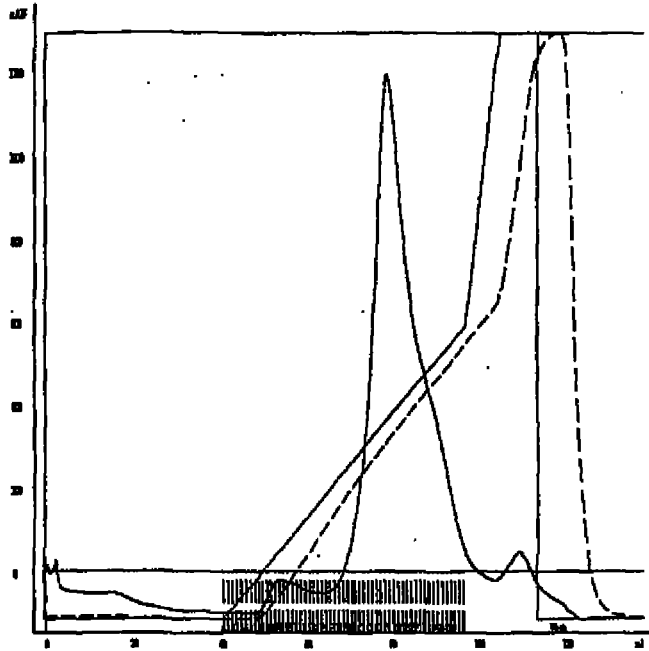
atgggtgtcactcagacccccaaaattccaggtcctgaagacaggacagagcatgaca
 ctgcagtgtgcccaggatatgaaccatgaatacatgtcctgggtatcgacaagaccca
 ggcatggggctgaggtgattcattactcagttggtgctgggtatcactgaccaagga
 gaagtccccaatggctacaatgtctccagatcaaccacagaggatttcccgctcagg
 ctgctgtcggtgctccctcccagacatctgtgtacttctgtgccagcagttacgtc
 gggaaacaccggggagctgttttttgggagaaggctctaggctgaccgtactggaggac
 ctgaaaaacgtgttcccacccgaggtcgctgtgtttgagccatcagaagcagagatc
 tcccacacccaaaaggccacactggtgtgcctggccacaggcttctaccccgaccac
 gtggagctgagctggtgggtgaatgggaaggaggtgcacagtggggtctgcacagac
 ccgcagccctcaaggagcagcccgccctcaatgactccagatacgctctgagcagc
 cgctgaggggtctcgccaccttctggcaggacccccgcaaccacttccgctgtcaa
 gtccagttctacgggtctctggagaatgacgagtggaaccaggatagggccaaacc
 gtcaccagatcgtcagcgccgaggcctggggtagagcagacggatccggtggtggt
 catcatcaccatcatcactaa

Figur 86b

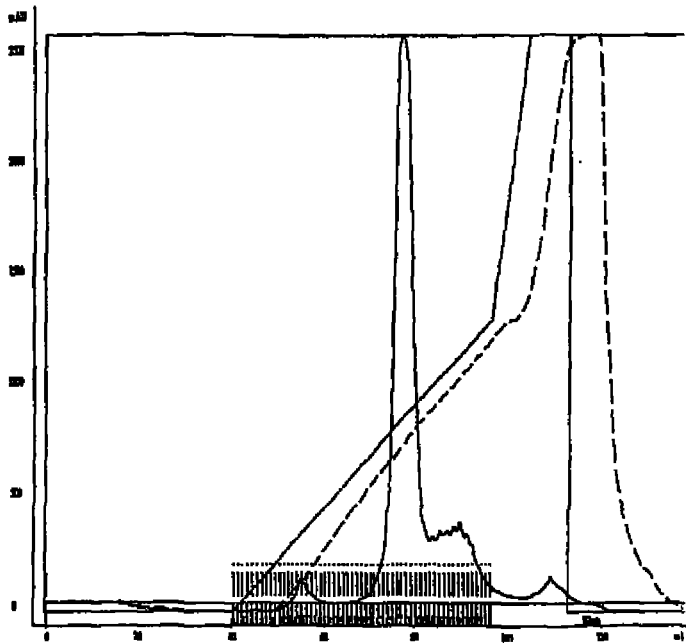
M G V T Q T P K F Q V L K T G Q S M T L Q C A Q D M N H E Y M
 S W Y R Q D P G M G L R L I H Y S V G A G I T D Q G E V P N G
 Y N V S R S T T E D F P L R L L S A A P S Q T S V Y F C A S S
 Y V G N T G E L F F G E G S R L T V L E D L K N V F P P E V A
 V F E P S E A E I S H T Q K A T L V C L A T G F Y P D H V E L
 S W W V N G K E V H S G V C T D P Q P L K E Q P A L N D S R Y
 A L S S R L R V S A T F W Q D P R N H F R C Q V Q F Y G L S E
 N D E W T Q D R A K P V T Q I V S A E A W G R A D G S G G G
 Stopp

57/81

Figur 87

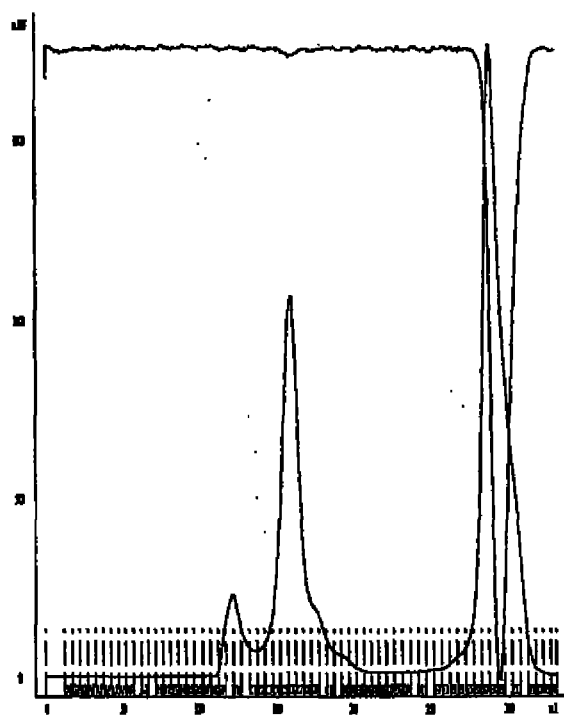


Figur 88

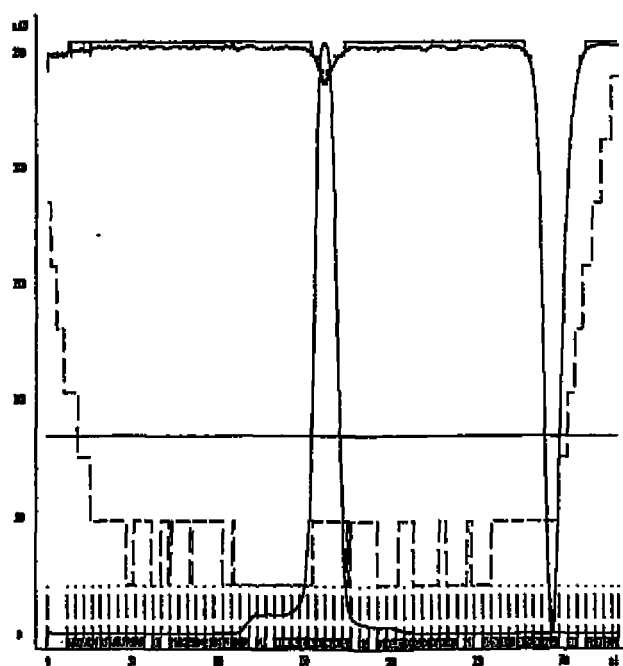


58/81

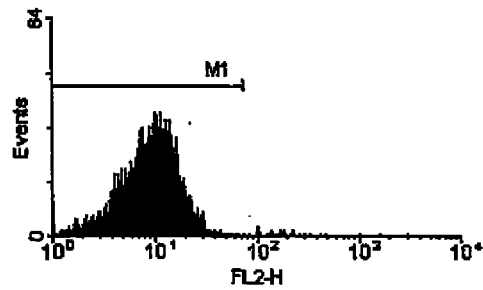
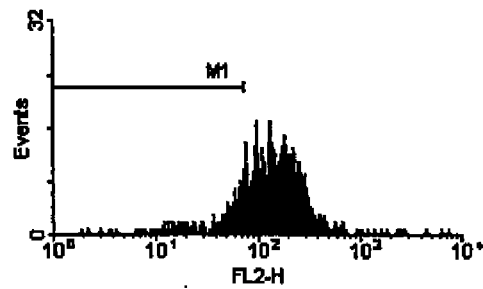
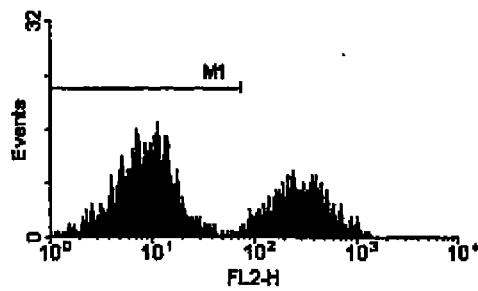
Figur 89



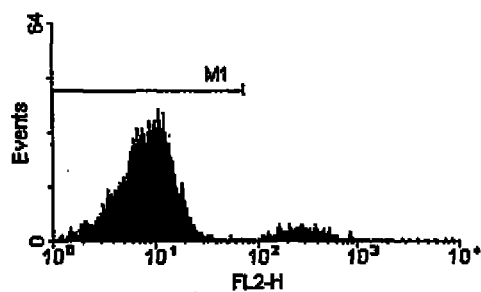
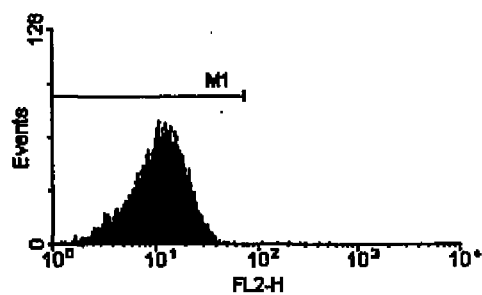
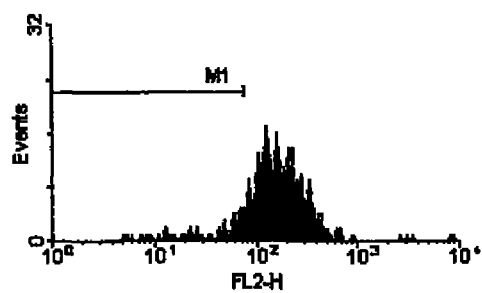
Figur 90



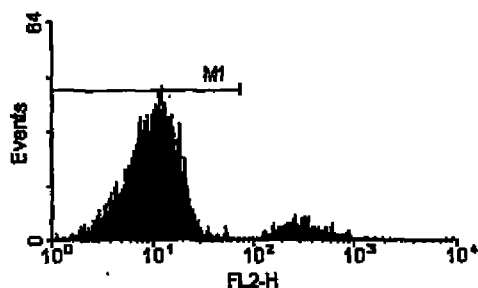
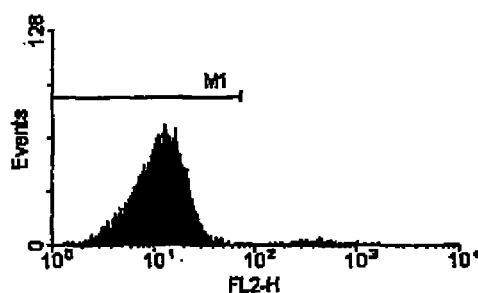
59/81

**Figur 91a. PP LCL NYESO 0 TCR 5 μ g****Figur 91b. PP LCL NYESO 10^{-4} M TCR 5 μ g****Figur 91c. PP LCL NYESO 10^{-5} M TCR 5 μ g**

60/81

**Figur 91d. PP LCL NYESO 10^{-6} M TCR $5\mu\text{g}$** **Figur 91e. PP LCL NYESO 0 TCR $10\mu\text{g}$** **Figur 91f. PP LCL NYESO 10^{-4} M TCR $10\mu\text{g}$**

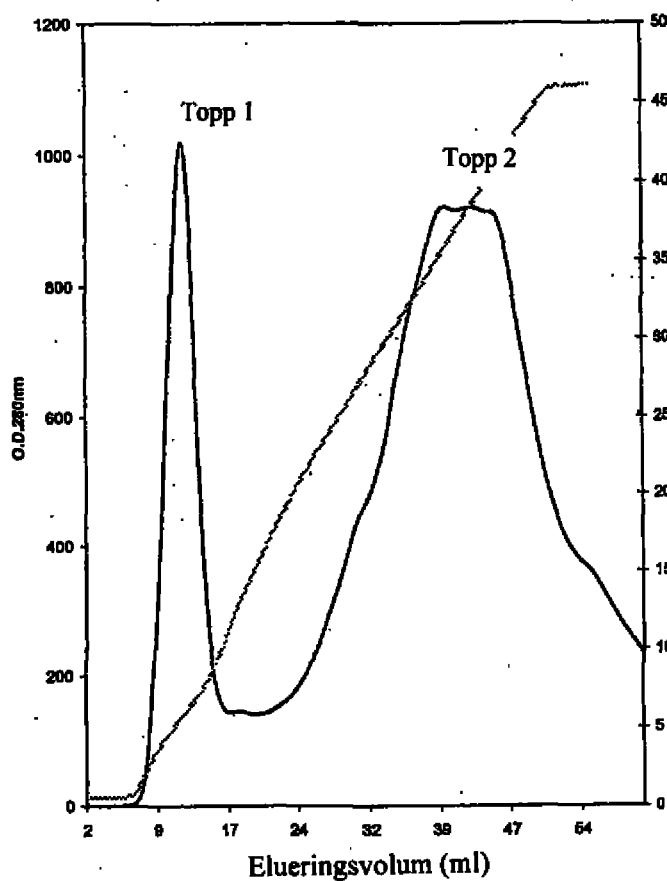
61/81

Figur 91g. PP LCL NYESO 10^{-5} M TCR $10\mu\text{g}$ Figur 91h. PP LCL NYESO 10^{-6} M TCR $10\mu\text{g}$

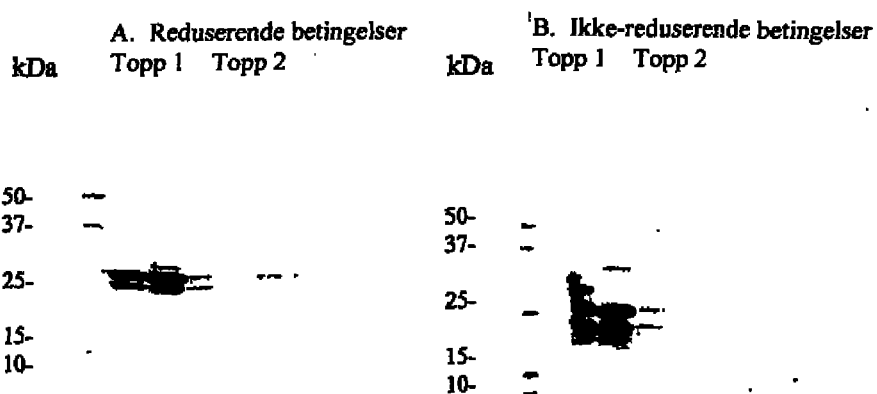
atgaacgctgggtgtcactcagacccccaaaattccaggtcctgaagacaggacagagc
 atgacactgcagtgtgccaggatatgaaccatgaatacatgtcctggtatcgacaa
 gaccaggcatggggctgaggctgattcattactcagttgggtgctggtatcactgac
 caaggagaagtcccaatggctacaatgtctccagatcaaccacagaggatttcccg
 ctgaggtgctgtcggctgtccctcccagacatctgtgtacttctgtgccagcagg
 ccgggactagcgggagggcgaccagagcagtaacttcgggcccgggcaccagggtcaog
 gtcacagaggacctgaacaagggtgttcccacccgaggtcgctgtgtttgagccatca
 gaagcagagatctcccacacccaaaaggccacactgggtgtgcctggccacagggttc
 tccccgaccacgtggagctgagctgggtgggtgaatgggaaggaggtgcacagtggg
 gtctgcacagacccgcagccctcaaggagcagcccgccctcaatgactccagatac
 tctctgagcagccgcctgagggtctcgggcaccttctggcaggacccccgcaaccac
 ttcgctgtcaagtccagttctacgggctctcgagaaatgacgagtggaccaggat
 agggccaaacccgtcaccagatcgtcagcgcggaggcctggggtagagcagactaa

Figur 92

62/81
Figur 93

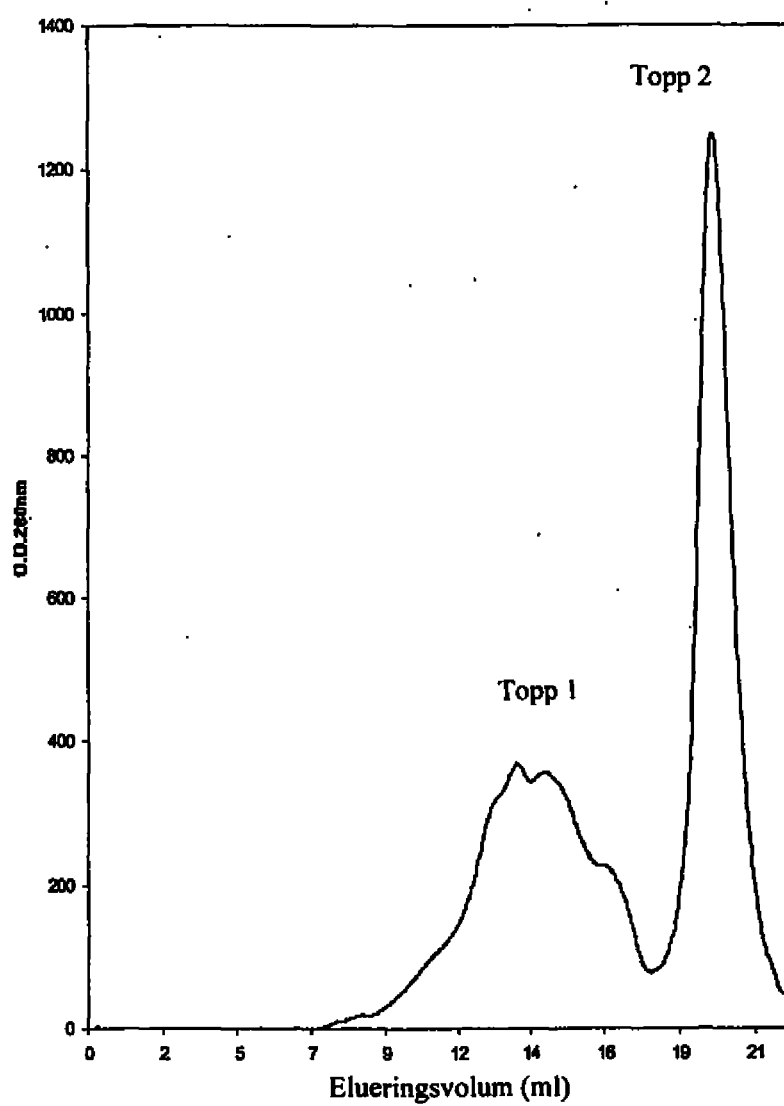


Figur. 94



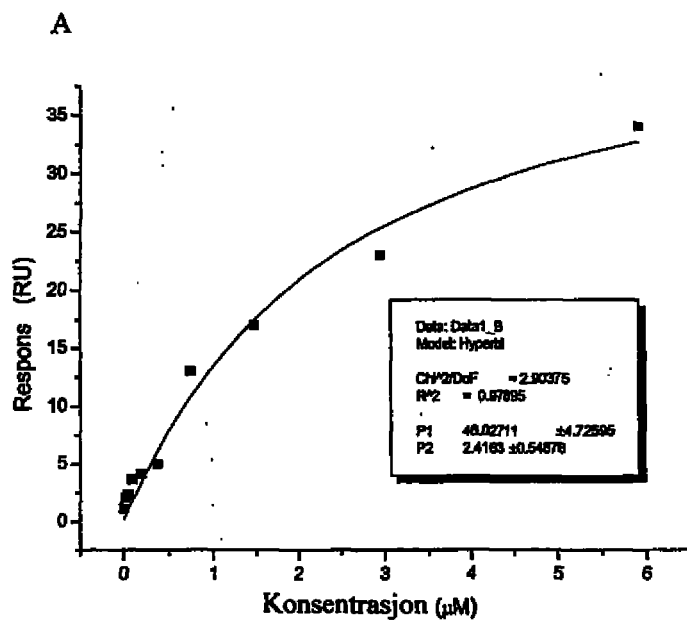
63/81

Figur 95

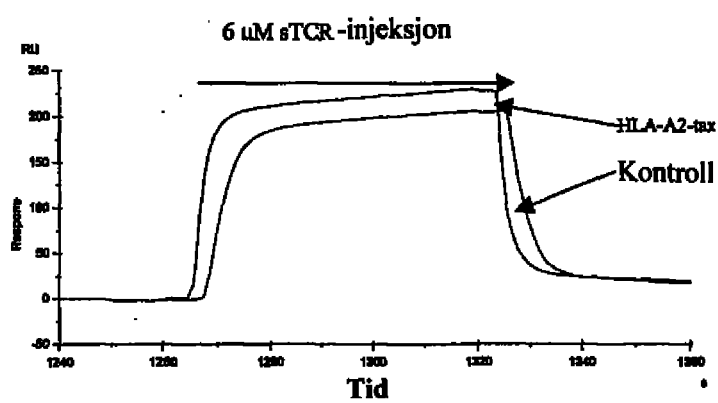


64/81

Figur 96



B



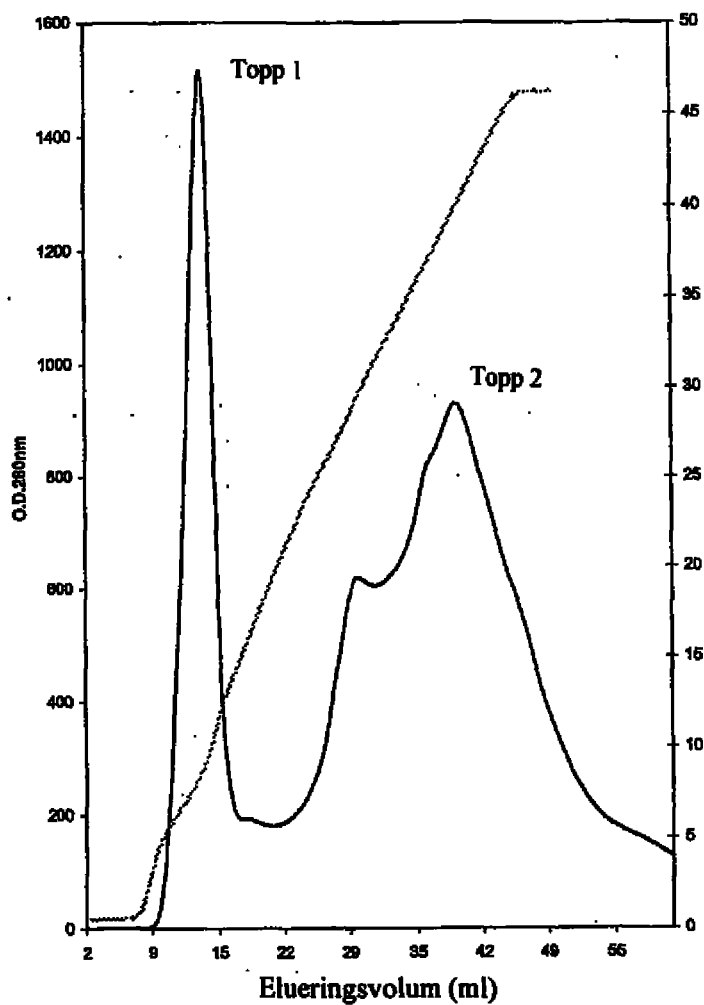
65/81

Figur 97

atgaacgctggtgtcactcagacccccaaaattccaggtcctgaagacaggacagagc
atgacactgcagtgtgcccaggatatgaaccatgaatacatgtcctggtatcgacaa
gaccagcatggggctgaggctgattcattactcagttggtgctggtatcactgac
caaggagaagtccccaatggctacaatgtctccagatcaaccacagaggatttcccg
ctcaggctgctgtcggtgtctccctccagacatctgtgtacttctgtgccagcagg
ccgggactagcgggagggcgaccagagcagtaacttcgggccgggcaccaggctcacg
gtcacagaggacctgaaaaacgtgttcccacccgaggtcgctgtgtttgagccatca
gaagcagagatctcccacacccaaaaggccacactggtgtgcctggccacaggcttc
taccgccaccacgtggagctgagctggtgggtgaatgggaaggaggtgcacagtggg
gtctgcacagaccgcagccctcaaggagcagcccgccctcaatgactccagatac
tgtctgagcagccgcctgagggtctcggccaccttctggcaggacccccgcaaccac
ttccgctgtcaagtccagttctacgggctctcggagaatgacgagtggaccaggat
agggccaaaccogtcacccagatcgtcagcgccgaggcctggggtagagcagactaa

66/81

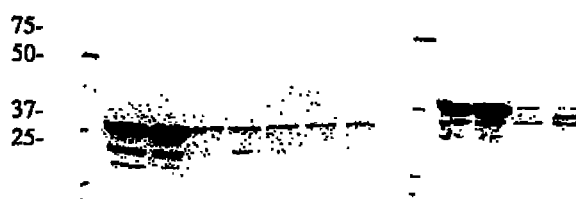
Figur 98



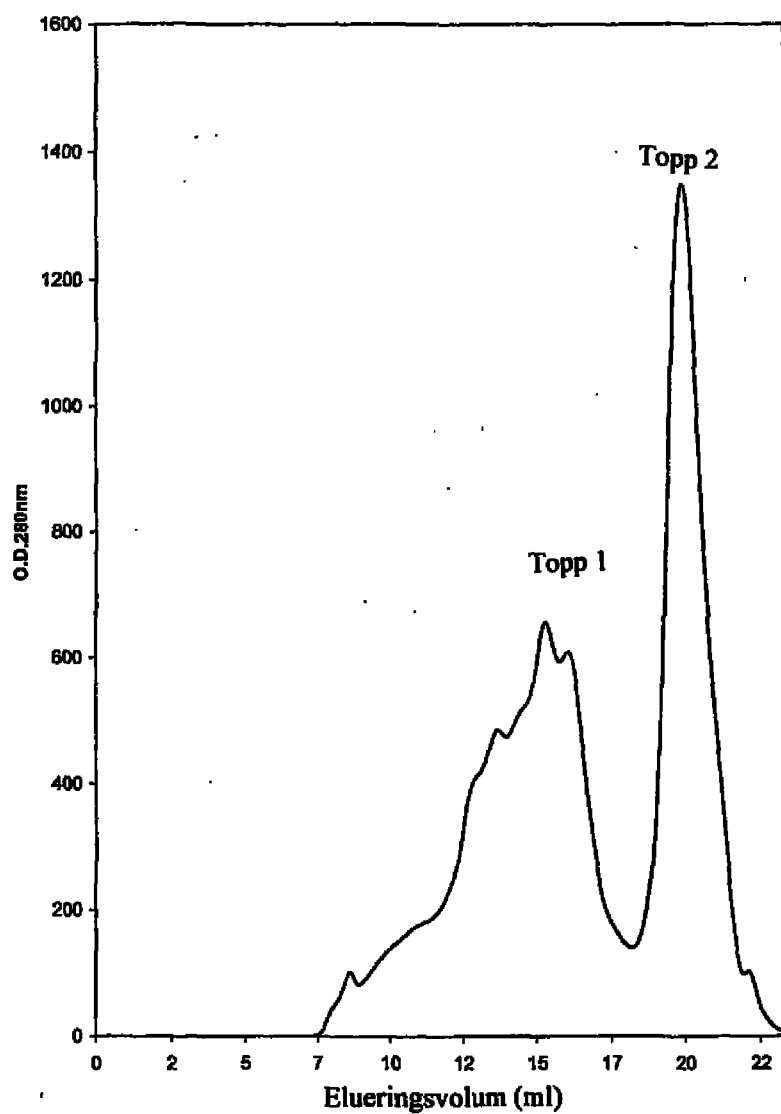
Figur 99

A. Reduserende betingelser B. Ikke-reduserende betingelser

KDa Topp 1 Topp 2 Topp 1 Topp 2



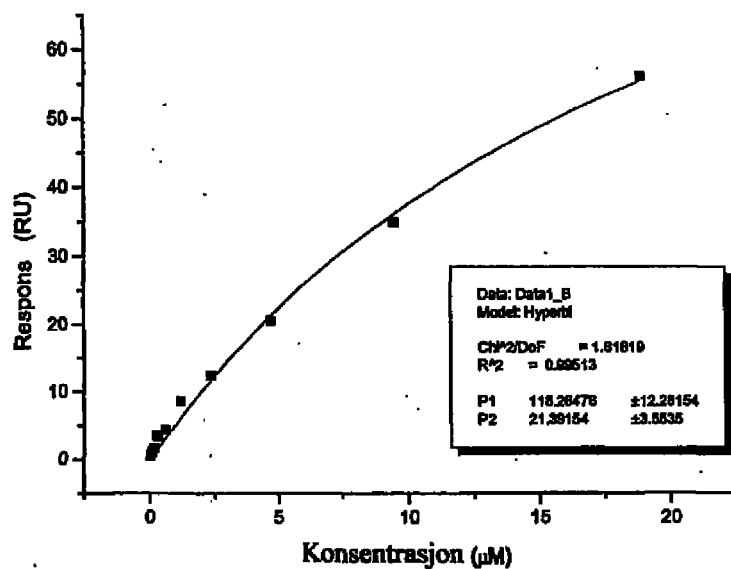
67/81
Figur 100



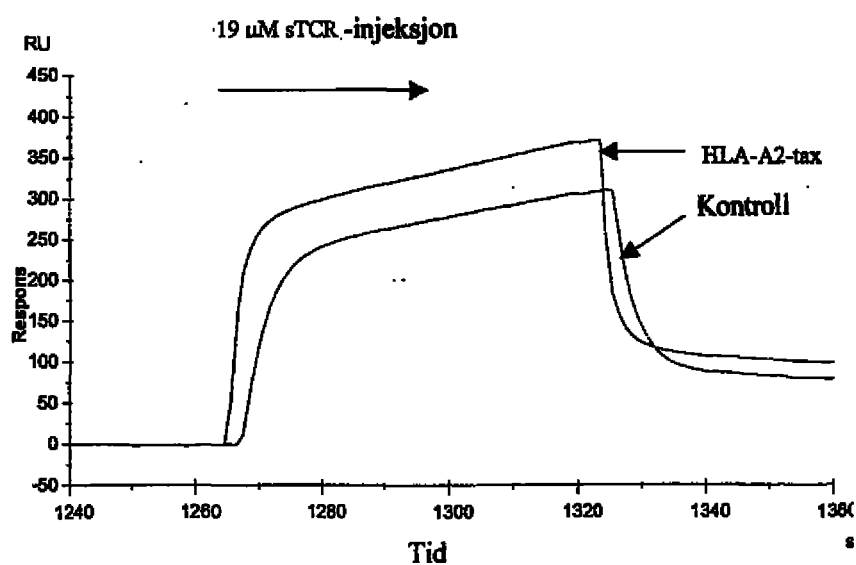
68/81

Figur 101

A



B

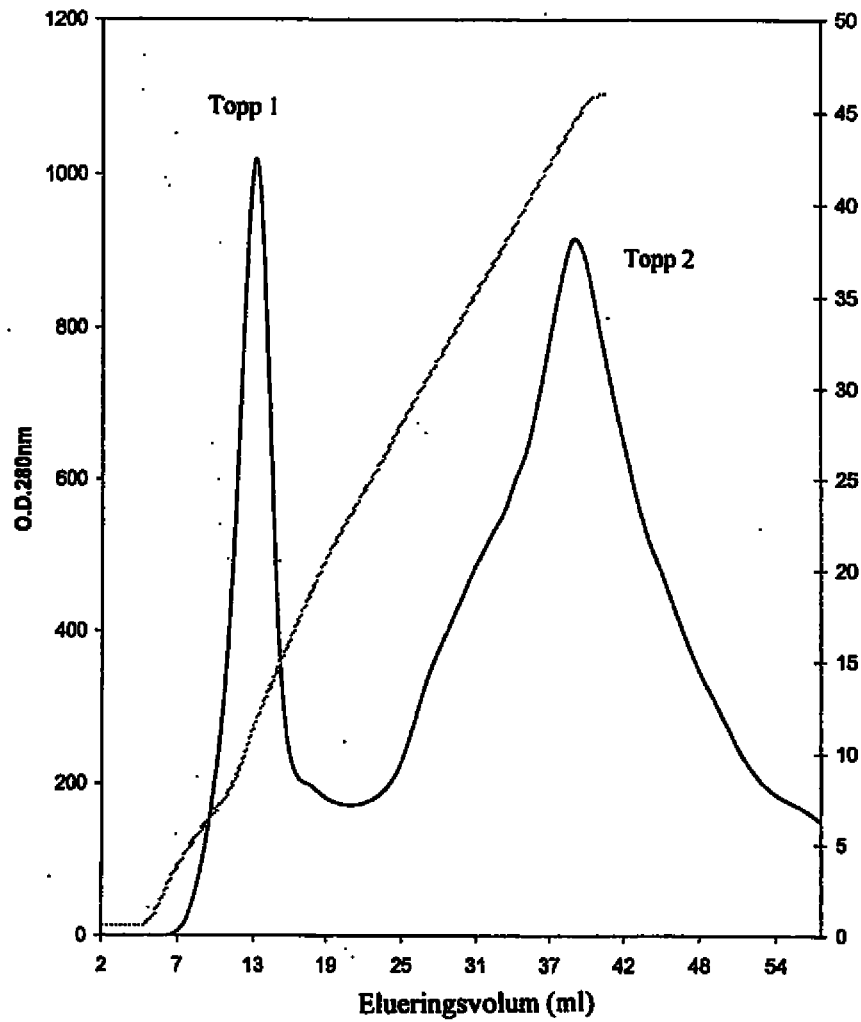


69/81

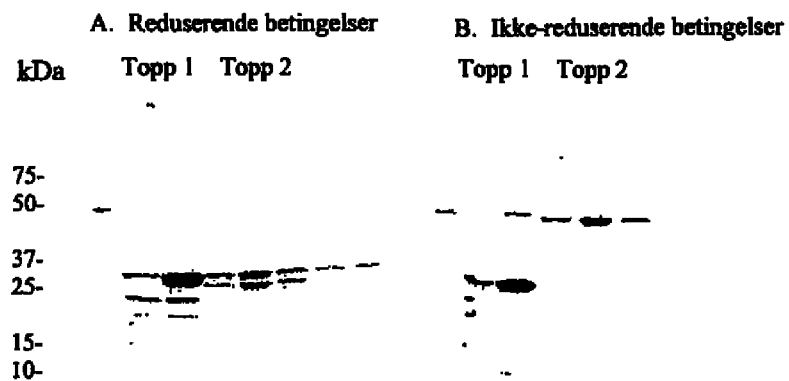
Figur 102

atgaacgctggtgtcactcagacccccaaaattccaggtcctgaagacaggacagagc
atgacactgcagtgtgcccaggatatgaaccatgaatacatgtcctggtatcgacaa
gacccaggcatggggctgaggctgattcattactcagttggtgctggtatcactgac
caaggagaagtccccaatggctacaatgtctccagatcaaccacagaggatttcccg
ctcaggctgctgtcggctgctccctcccagacatctgtgtacttctgtgccagcagg
ccgggactagcgggagggcgaccagagcagtaacttcgggcccgggcaccaggctcacg
gtcacagaggacctgaaaaacgtgttcccacccgaggtcgctgtgtttgagccatca
gaagcagagatctcccacacccaaaaggccacactggtgtgcctggccacaggcttc
taccocgaccacgtggagctgagctggtgggtgaatgggaaggaggtgcacagtggg
gtctgcacagacccgcagcccctcaaggagcagcccgcctcaatgactccagatac
tctctgagcagccgcctgaggggtctcgggcaccttctggcaggacccocgcaaccac
ttccgctgtcaagtccagttctacgggctctcggagaatgacgagtggacccaggat
agggccaaacccgtcaccacagatcgtcagcgccgaggcctggggtagagcagactaa

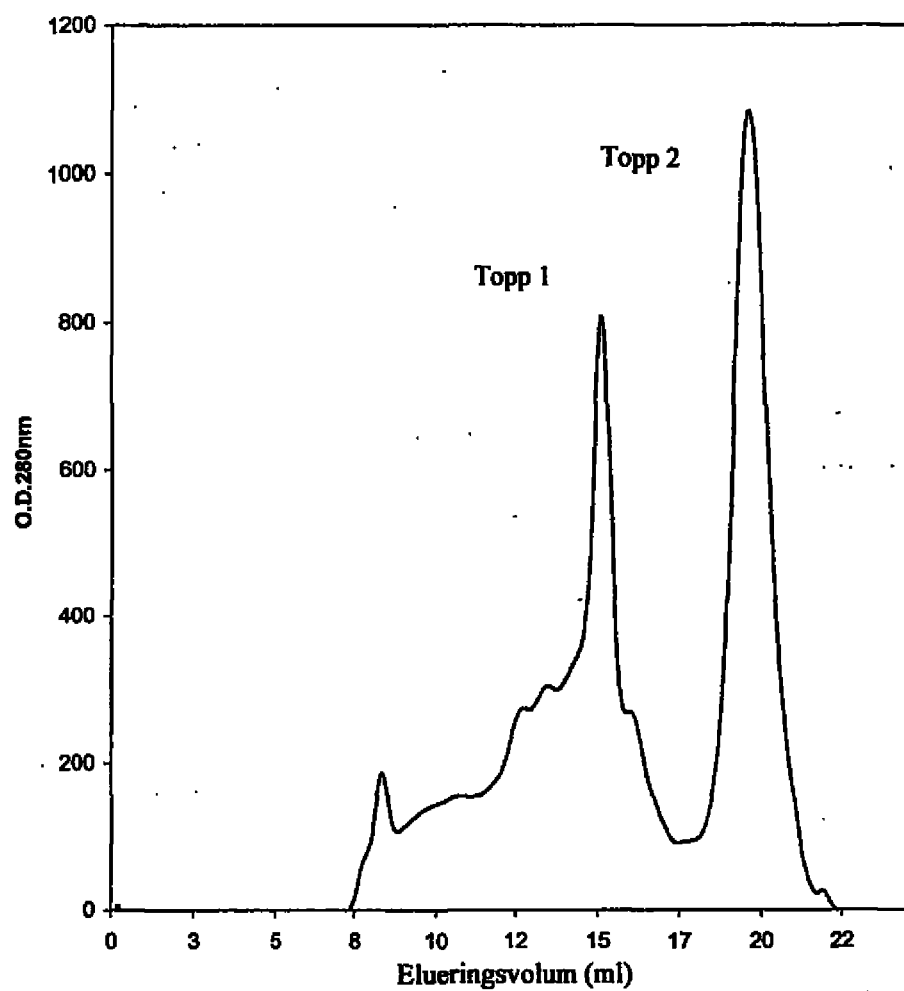
70/81
Figur 103



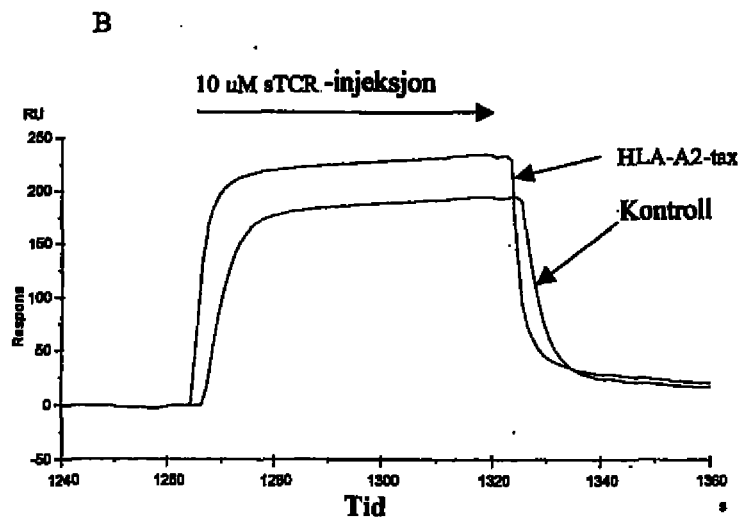
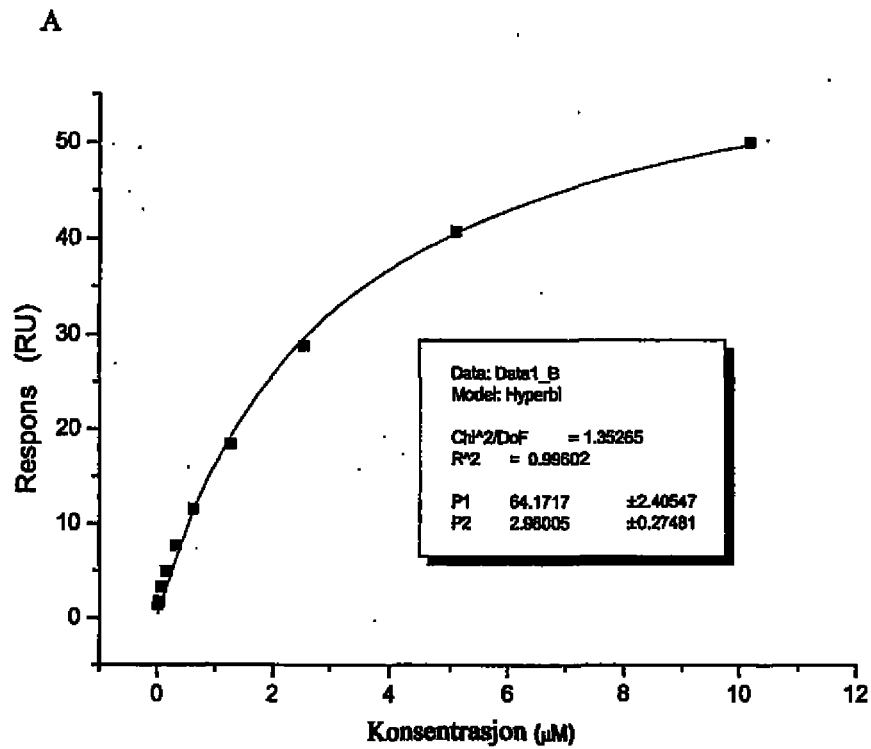
Figur 104



71/81
Figur 105



72/81
Figur 106



Figur 107

1	GAATTACCA	TGGATCCCTAG	GGCCACACAG	CTTACGGGTC	GACCCGGGTA	TCCGTATGAT	GTGCTGACT	AGCATGATA	TCTCGAGCTC	AGCTAGCTAA
101	CTGAATAGG	AACAATGAC	GTATTTCCT	TCTCTGTTC	CTAGATATA	TGACTGACG	ATACATCCCT	TTTTTTTT	GTCTTTGT	AGCTCCAGT
201	TTTGTTCCT	TTAGTGAGG	TTAATTCAT	TCTCTGCGC	TGGTTTACA	AGCTGTGAC	TGGGAAAC	TTTGTTCCT	CCAACTTAAT	CGCTTGACG
301	CACATCCCT	TTTCCGAGG	TTCGCTAAT	TGCTGAGG	TGGCTTACA	CGCTCTCC	ACAGTTGG	CAGCTGAAT	CGCGAATGG	CGGACGCGC
401	CTGTAGCGC	GCATTAGCG	CGCGGGTGT	GGTGGTTAG	CGCTACACT	CGCTACACT	TGCCAGGCG	CTAGCGCGG	CTTCTTTCC	TTTCTTCCCT
501	TCTTTCTCG	CCAGTTTCG	CGCTTTCC	CGTCAAGTC	TAAATCGGG	CTTCTTTTA	GGTTCGAT	TTAGTGTGT	AGGCACTC	GACCCCAAA
601	AACCTGATTA	GGGTGATGGT	TCAGTAGTG	GGCCATGCC	CTGATAGAG	GTTTTCGCC	CTTGACGTT	GGATGCCAG	TCTTTAATA	TGGGACTCTT
701	GTTCCTAACT	GGACACAC	TCACCTTAT	CTCGTCTAT	TCTTTGAT	TATAGGGAT	TTTCCGAT	TTGCGCTAT	GGTAAATA	TGAGCTGAT
801	TACCAAAAT	TTAGCGGGA	TTTAAACAA	ATATTAAGT	TTCAATTC	CTGATGGGT	ATTTCTCT	TACGATCTG	TGCGGTAT	CACACCGAT
901	AGGTATATA	CTGATATAT	TAAATGAG	CTCTAATTG	TGAGTTAGT	ATACATGCT	TTACTATTA	TACAGTTTT	TAGTTTTGT	GGCCGATCT
1001	TCTCAATAT	GCTTCCAGC	CTGCTTTCT	GTACGTTCA	CGCTGATCT	TAGATCCCT	TCCCTTGA	ATAGTCTCT	TTCCAACTAT	AAATATCTA
1101	GATCTGTAG	AGACACATC	ATCCAGGTT	CTATACGTT	GACCTAATG	GTCTCCCTG	TCATCTAAC	CCACACCGG	TGTCATATC	AACCAATCGT
1201	AACCTTCAT	CTTTCACCC	ATGCTCTTT	GAGCAATAA	GGCGATAAC	AAATCTTGT	CGCTTTCG	ATGTCACA	GTACCTTAG	TATATCTCC
1301	AGTAGATAG	GAGCCCTTG	ATGACAAAT	TGCTAACAT	AAAGGCTC	TAGGTTCCT	TGTTACTCT	TCTGCGGCT	GCTTCAACC	GCTAACATA
1401	CCTGCCCCA	GCACACGTT	ATGACAAAT	ATGCTGCTC	ATTCGCTAT	TCTGTATAC	CCCGAGAT	ACTGCAAT	GACTGTAT	CCATGTCAG
1501	CAATTTTCT	GTCTTCGAG	AGTAAATA	TGTAGTCTC	GGTAAATG	GTAAATCTC	GGTGTACGA	ACATCAAT	AGCACACA	GTATGTTGC
1601	ATGTTTCTT	AGTAAACAA	TTTGGGACC	TAAATGCTC	ACTAACTCA	GTAAATCTC	GGTGTACGA	ACATCAAT	AGCACACA	GTATGTTGC
1701	TTTTCGTGA	TGATATATA	TAGCTTGCA	GCACACGAC	TAGATGAT	AGCAGCAGT	TCCTATATG	TAGCTTCTA	CATGATTTAT	CTTGTCTTC
1801	TGCAAGTTT	GTCTCTGTC	AGTGGGTTA	AGATACATC	GCATTTCT	GTTCCTTCA	CATCAATAT	GGTATATAT	ACCAATCTA	GTCTGTCTC
1901	CITTCCTCGT	TCCTCTTCT	GTTCGAGAT	TACCGATCA	AAAAATTC	AAAGAACCG	AAATCAAAA	AAAGATATA	AAAAAATGA	TGAATTTGAT
2001	TGAAAGCTG	TGGTATGGT	CACCTCTAG	ACATCTGCT	CTGATGCGC	ATAGTTAAG	CAGCCCGAC	ACCGCGAC	ACCGCTGAC	GGCCCTGAC
2101	GGCTTGCT	GCTCCGCGA	TCCCTTACA	CACAGCTGT	GACCTCTCC	GGAGTCTCC	TGCTCAGAG	GTTCACCG	TCATCACGA	AACGCGGAG
2201	ACGAAAGGC	CTCCTGATC	GCTTATTTT	ATAGTTAAT	TACTCTGCT	TATGTTTCT	TTAGACGGA	TGCTTGGCT	GTAACTTACA	CGCGCTCGT
2301	ATCTTTTAT	GATGGAATA	TTTGGGAAT	TACTCTGCT	TTATTTAT	TATGTTTCT	TATTTGGAT	TTAGAACGA	ATATAAGAG	GTAGAGAGT
2401	TACGGAATGA	AGAAATAAA	ATAAACAAG	GTTAATAAA	TTTCAACAA	AAAGTACTT	TACATATAT	TTTATTAGC	AGAAAGCA	GATTAATAG
2501	ATATACATTC	GATTAACGAT	AGTAAATAT	TAAATCACA	TTTCAACAA	AAAGTACTT	CTACACAGC	AGATGAAAC	AAATGCGAT	TAATACCTGA
2601	GAGCAGGAG	AGCAAGATA	AGTAAATAT	TAAATCACA	TTTCAACAA	AAAGTACTT	CTACACAGC	AGATGAAAC	AAATGCGAT	TAATACCTGA
2701	TTTACTTTCT	ATTTTAAAT	TATATATTA	TATTAATAA	TTTCAACAA	AAAGTACTT	CTACACAGC	AGATGAAAC	AAATGCGAT	TAATACCTGA
2801	GAATGTGCG	CGGAACCCCT	ATTTGTTAT	TTTCTAAT	TTTCTAAT	TTTCTAAT	TTTCTAAT	TTTCTAAT	TTTCTAAT	TTTCTAAT
2901	AAAAAGGAG	AGTATGATTA	TTCAACAT	CGCTGCTCC	CTTATTCCT	TTTTCGCG	ATTTGCTCT	TTTTCGCG	ATTTGCTCT	TTTTCGCG
3001	AAAGTAAAG	ATGCTGAGA	TCAGTTGGT	GCAGAGTGG	GTACATGGA	ATGCTGCTC	ACAGCGGTA	AGATCTTGA	AGATCTTGA	AGATCTTGA
3101	GTTTTCCAAT	GATGAGCACT	TTTAAAGTT	TGCTATGAG	CGCTGATTA	TCCGTTATG	ACGCGGCA	AGATCTTGA	AGATCTTGA	AGATCTTGA
3201	TCAGATGAC	TTGGTTGAT	ACTCACCAT	CACAGAAAG	CACTTACGG	ATGCTGCTC	ACAGCGGTA	AGATCTTGA	AGATCTTGA	AGATCTTGA
3301	AACACTGCG	CCAATCTACT	TCTGACACG	ATGCTGAGC	CGAGGAGCT	AAAGTACTT	TTGGAACAA	TGGGGATCA	TGTAACTGCG	CTGATGAT
3401	GGGAACTCGA	GCTGATGAA	GCCATACCA	ACGACGAGG	TGACACACG	ATGCTGCTC	CAATGCGAC	AACTTGGCG	AACTTGGCG	AACTTGGCG
3501	ACTTACTCTA	GCTTCCGGC	AACATATAT	AGACTGAGT	AGCTGAGTA	AAAGTACTT	ACGCTCTG	CGCTGCGCG	TTCCGGTGG	CTGCTTAT
3601	GCTGATATAT	CTGGAGCGG	TGAGGCTGG	TCTGCGGTA	TCATGAGC	ACTGAGGCA	GATGTAAGC	CTTCCGAT	CGTATGATC	TACACGAGG
3701	GGATTCAGGC	AACATATGAT	GACGAAATA	GACAGATCG	TGAGTAGGT	GCCTCAGTA	TTAGCATTT	GTAACATTT	GACCAAGTT	ACTCATATAT

74/81

Figur 107 forts.

3801 ACTTTAGATT GATTAAAC TTCAATTTTA ATTAAAGG ATCTAGTGA AGTCTCTTTT TGATAATCTC ATGACCAAAA TCCCTTAACG TGAGTTTTCG
 3901 TTCACATGAG CGTCAGACCC CGTAGAAGG ATCAANGAT CTCTTTTGA GCTTTTGAAG TCTGTGCTT CCAACAAAA AAACCTCCAGC
 4001 TACCAAGGGT GGTGTGTTG CGGATCAAG AGCTACCAAC TCCTTTTCG AGCTTAAGT GCTTCAGCAG AGCCAGATG CCAATACATG TCCTTCTAGT
 4101 TTAGCCGTAG TTAGCCACC ACTTCAGAA CTCTAGAA CTCTGATC CCGCTACAT ACCTGCTCT GCTAATCTTG TTACACAGTG CTGCTGCCAG TGGCGATAAG
 4201 TCGTGTCTTA CCGSTTGA CTCAGACGA TAGTTACCG GTAGCTAAG AGAAGGCC GCTGTGCGG TGAACGGGG GTTCGTGCAC ACAGCCACAG TTGGAGCGAA
 4301 CGACTACAC CGAATGAGA TACTACAGC GTAGCTAAG AGAAGGCC GCTGTGCGG AGAAGGCC AGCTTCCG TATCCGGTAA GCGCGAGGGT
 4401 CGAACAGGA GAGCCACGA GGGGCTTCC AGGGGHAAC GCTGTGATC TTATAGTCC TGTGAGGTTT GGCACCTCTT TTTGCTCAC TCGATTTTGG
 4501 TGATGCTCGT CAGGGGGCG GAGCTATGG AAAACGCCA GCAAGCGCG GCTTTTACGG TTCTGGGCTT TTTGCTGCGC TTTGCTGCTC ATGTTCTTTC
 4601 CTGGCTTATC CCCTGATCT GTGATTAAC GTATTACGC CTGTGATGA CTGTGATGA GTGCGCGCAG CCGAACGACC CCGACGACG AGTCAGTGAG
 4701 CAGGAAGCG GAAGAGCGC CAATACGAA ACCGCTCTC CTTCGATC TACTGATGA TTAATGATCA TTAATGATCA TTAATGATCA CTGAAAGCG
 4801 GGCAGTGAGC GAAGCGCAT TAATGTAGT TACCTCACT TACCTCACT GCTTCATC AGCTCCGCTT OCCACGATC AGGCGAGT ACATGATCC CCGATGTTGG
 4901 GCGATTAACA ATTTCACGA GGAACGACT ATGACCATGA TTACGCCAG GCTTCATC AGCTCCGCTT GCTTCATC AGCTCCGCTT TTTGCTGCTC TTTGCTGCTC
 5001 AGCTTGATGG CATCGTGGG TCAGCTCGT CGTTTGGTAT GAGTGAAGT GAGTGAAGT AGCTCCGCTT GCTTCATC AGCTCCGCTT TTTGCTGCTC TTTGCTGCTC
 5101 ANAAAAAGCG GTTAGCTCTT CAGCTCTCG ATGCTCTCG ATGCTCTCG ATGCTCTCG ATGCTCTCG ATGCTCTCG ATGCTCTCG ATGCTCTCG ATGCTCTCG
 5201 ACTGTCATGC CATCCGTAG ATGCTCTCTT GTGCTCTCT GTGCTCTCT GTGCTCTCT GTGCTCTCT GTGCTCTCT GTGCTCTCT GTGCTCTCT GTGCTCTCT
 5301 TCACACCGG ATATACCGG GCCACATAGC AGAATGTTGA ATACTATAC TTCTCTCTT TCAATATAT TGAAGCATTT GGCACCTGAC GTCTAAGAAA CCAATATAT
 5401 TGAGATCCAG TTGATGTAA CCGACTCGG CACCACTG ATCTTCAGA TCTTTTACTT TCACCAGCTT TCTGCTTCCG GCGGAAAACT CTGAGGATC TTACCGCTGT
 5501 TGCGCAAAA AAGGGAATAA GCGCGACAG GAAATGTTGA ATACTATAC TTCTCTCTT TCAATATAT TGAAGCATTT GGCACCTGAC GTCTAAGAAA CCAATATAT
 5601 AGCATACAT ATTGAATGT ATTTAGAAA ATAAACAAAT AGGGTTCG CACACATTC CCGGAAAACT GATCTACGTA TGGTATGCG AGAATGCTG TAATCTCTT
 5701 CATGACATTA ACCTATATAA ATAGGCGTAT CAGAGGCC CCGGAAAACT GATCTACGTA TGGTATGCG AGAATGCTG TAATCTCTT
 5801 GAATGCGGC AGATGTATAT GACAGATCG CAGATTTCCA AGAGACTTA TTCCGACT TTCCGACT TTCCGACT TTCCGACT TTCCGACT TTCCGACT TTCCGACT
 5901 CCTAGTTACA CATGTTATTT ATTCAGAT ATTCAGAT ATTCAGAT ATTCAGAT ATTCAGAT ATTCAGAT ATTCAGAT ATTCAGAT ATTCAGAT
 6001 GTAATGTTGA TGGAACTGA CAAATCATC AATAGATAG TCCTGAGGAC CBTGCTACCC AAATGACTG AATGACTG AATGACTG AATGACTG AATGACTG
 6101 TAAAGATTAC ACATTTCTGA CBTGCTACCC CBTGCTACCC CBTGCTACCC CBTGCTACCC CBTGCTACCC CBTGCTACCC CBTGCTACCC CBTGCTACCC
 6201 ATACATTACG ACATTTCTGA CBTGCTACCC CBTGCTACCC CBTGCTACCC CBTGCTACCC CBTGCTACCC CBTGCTACCC CBTGCTACCC CBTGCTACCC
 6301 TTGAGCTTCC TCTATTTGAT TTACACTCG ACACCCCTTT TCTGGCATCC AGTTTTAAT TTTTCTCTT TTTTCTCTT TTTTCTCTT TTTTCTCTT
 6401 ATCACACAT TCTCTCGAT ACCACTCGG TTGAACCTGA CAGTGGTTT GTTACCATG GTTACCATG GTTACCATG GTTACCATG GTTACCATG GTTACCATG
 6501 TACAGGGAA TATAAGGCG AGCATTAAT AGGATTTAG TGAATGCA ACATTTACTA TTTTCTCTT TTTTCTCTT TTTTCTCTT TTTTCTCTT
 6601 ATCATCTTTT TTCAATTTT TGTGTTGAT CTTTCTCTG TTAATCTAT AACTACAAA AACATACA G

Figur 108

1	GAATTCACCA	TGGATCCTAG	GGCCACACAG	CTTACGCGTC	GACCCGGTA	TCCGTATGAT	GTGCTGACT	AGCAGATATA	TCTGGAGCTC	AGCTAGCTAA
101	CTGAATAGG	AACATGAA	GTCTTCTCT	TCTCTGTTC	CTAGATATTA	TGACGTACCG	ATACATCCCT	TTTTTTTTT	GTCTTTGTCT	AGCTCCAGCT
201	TTTGTTCCCT	TTAGTGAGG	TTAATTCAT	TCAGTGCGG	TCGTATTACA	ACGTGTTGAC	TGGGAAACCC	CTGGCGTTAC	CCACTTANT	CGCTGTCAG
301	CAGATCCCC	TTTCGCCAG	TGGCGTATA	CGGAGAGCG	CGGACCGAT	CGCCCTTCCC	ACGAGTTGCG	GGGATGATG	GGGATGATG	GGGATGATG
401	CTGTAGCGG	GCATTAAGC	CGGCGGTGT	GGTGTAGC	CGGCGGTGA	CGGCTACACT	TGCAGCGCC	CTAGCGCGG	CTCTTTCCG	TTTCTTCCCT
501	TCCTTTCTCG	CCAGTTTGC	CGGCTTCCC	CGTCAAGTC	TAAATCGGG	GCTCCCTTGA	GGGTCCGAT	TTAGTGGTTT	ACGGCACCTC	GACCCCAAAA
601	AACCTTGATA	GGGTGATGT	TCAGGTAGT	GGCCATCGC	CTGATAGAC	GTTTGTGGC	CTTTGACGT	GGATCCAG	TTCTTTAATA	GTGGACTCTT
701	GTTCCAACT	GGACACAC	TCACCCCTAT	CTGGTCTAT	TCTTTGAT	TATAAGGAT	TTTGGCGAT	TGGGCTCAT	GGTAAAAA	TGAGCTGAT
801	TAACAAAT	TTAAGCGAA	TTTTAACAA	ATATTACAT	TTACATTC	CTGATGCGT	ATTTCTCT	TAGGCACTG	TGCGGTATTT	CACACCGCAT
901	AGATCCGTG	AGTTCAAG	AAAAAAG	AAAAACAA	AAAAAAG	GAAGCGCG	CTGGTTGAG	ATGACAGTA	TAGAATGAT	CATTACCTG
1001	TCATCTTCAG	TATCATACT	TTGCTATCA	TACTTACTG	CATTATAGG	TATACATATA	TACACATGTA	TATATATCGT	ATGTCGAGC	TTTAATATAT
1101	CGGTGTCACT	ACATAAGAC	ACCTTTGGT	GAGGGACAT	CGTTGGTCC	ATTGGCGAG	GTGGCTTCT	TTATGGCAG	CGCAAGGCC	TTGAAGGCAC
1201	TCTCACTAG	GTGATGATCA	TTCTTGCTC	GCAGACATC	AACGTGGAG	GTATTTCTG	TTGCCCTG	AAACTTTCA	AGAAATGCG	GGATCATCTC
1301	GCAGAGAGA	TCTCTACTT	TCTCCCTTG	CAACCAAGT	TGACACTG	CGTACGGCT	GTTGGAAGA	TCTACACCG	CTCTGGAAG	TGCCCTCATCC
1401	AAAGGCGCA	ATCTGATCC	AAACTTTT	ACTCCAGCG	CCAGTAGGC	CTCTTTAAT	GCTTGACCGA	GAGCAATCCC	GCAGCTTCA	GTGGTGTGAT
1501	GGTGTCTAT	GTGTAAGTCA	CCATGCACT	CAACGATAG	CGACAGCGG	GAATGCTTG	CCAGAGCATG	TATCATATCG	TCCAGAAAC	CTATACCTGT
1601	GTGGACGTTA	ATCAGTTGCG	ATTGTTGCG	CTGTTCTGT	ACGTGTTG	CTCTTTTTC	TGGGAGATC	GGTGTCTTA	TGCGTAGGG	ACGACCTTT
1701	AAGAGATCG	CAATCTGAT	CTTGGTTCA	TTTGTATAC	GCTTTACTAG	GGCTTCTG	TCGTCTACT	TTAICTTGG	TTAICTTGG	TGCTCATTTT
1801	TTAGTATAT	CTTCGAAGA	ATCACATAC	TTTATATA	GTATATATCA	TTATGTGATA	ATGCCAATCG	CTAGAAANA	AAAGAGTCA	TCCGCTAGGG
1901	GAATAAANA	ATGAAATC	ATTACCGAG	CATAAANA	TATAGAGTG	ACTAGGGAG	GCCAGAGTA	ATAGAAANA	AAAATTGCG	GAAGAGACTG
2001	TGTTATGACT	TCCCTGACT	ATGCCGTGT	CAACGATAC	CTGCGAGTA	CTCTTAGCG	TCACCAAGT	CTTAACAGG	GAATTTATGG	TGCATCTCA
2101	GTACAATCG	CTCTGATGC	GCATAGTTA	GCCAGCCCG	ACACCGCCA	ACACCGCTG	ACGGCTTGT	CTGCTCCCG	CTGCTCCCG	CATCCGCTTA
2201	CAGACAAGT	GTGACCGCT	CGGGAGCTG	CATGTCTCG	AGGTTTTCAC	CGTCACTACC	GAACGCGCG	AGACGGAAGG	GCCTCGTGT	ACGCTATTT
2301	TTATAGGTA	ATGTCATGAT	ATAATGTTT	TCTTAGGAG	GATCGCTG	CTGTAACTTA	CACGCGCTC	GTATCTTTA	ATGATGGAAT	AAATTGGGA
2401	TTTACTCTGT	GTATTATAT	TTTATGTTT	TGTAATTGA	TTTAGAAG	TAAATAAGA	AGGTAGAGA	GTACGGAAT	GAAGAAANA	AAATAAACAA
2501	AGGTTTAAA	AAATTCACA	AAAGGTATC	TTTACATATA	TATTTATAG	ACAGAAAG	CAGATTAAT	AGATATACAT	TGATTTAACG	ATAAGTAAA
2601	TGTAATATCA	CAGGATTTTC	GTGTGTGTC	TTCTACACAG	ACAAGATGA	ACATTTGCG	ATTAATACCT	GGAGCAGGA	AGAGCAAGT	AAAAGTATG
2701	ATTGTGTC	GATCCCTTA	GAGTCTTTA	CATCTCGGA	AAACAAAC	TATTTTCT	TTAATTTCT	TTTTTACTT	CTATTTTAA	TTTTATATTT
2801	TATATTAAA	AATTTAAT	ATAATTAT	TTATAGCAG	TGATGAAG	GAACCAAGT	GCATTTTTC	GGGAATGTC	CGCGGAACCC	CTATTTGTTT
2901	ATTTTCTAA	ATACATCAA	ATATGATCC	GCTCATAGA	CAATACCGT	GATAATGCT	TCATATAT	TGAAGAAGA	AGAGTATGAG	TATTCACAT
3001	TTCCGTGTC	CCCTTATTC	CTTTTGTG	GCATTTGCG	TTCTTTTTC	TGCTCACCA	GAACGCTGG	TGAAGTAAA	AGATGCTGA	GATCAGTTGG
3101	GTGCACGAT	GGTTACATC	GAATCGATC	TCAACGCGG	TAGATCTTT	GAGGTTCG	GGCCGAGTA	ACGTTTCCA	ATGATGAGCA	CTTTTAAAGT
3201	TCTGCTATG	GGCGCGTAT	TATCCGTAT	TATCCGTAT	CAACGCGG	TCGTCGCGT	CATACACTT	TCTCAGGAT	ACTTGTGTA	GTACTCACCA
3301	GTACACAGAA	AGCATCTTAC	GGATGCGAT	ACAGTAGAG	AATTATGCG	TGCTGCCATA	ACCATGATG	ATAACACTG	GGCCAACTTA	CTTCTGACAA
3401	CGATCGGAG	ACCGAGAGG	CTAACCGCTT	TTTGTGACA	CATGCGGAT	CATGTATCT	GGCTGTATG	TTGGGAATG	GAGCTGAATG	AAGCCATACC
3501	AAACGACAG	CGTGACACCA	CGATGCTGT	AGCAATGCG	ACAAGTTG	GCAACTAT	AACTGGCGA	TAGCTTCCC	TAGCTTCCC	GCACACATTA
3601	ATAGACTGGA	TGGAGCGGA	TAAAGTTGCA	GGACCACTTC	TGCGCTGCG	CCCTCCGCT	GGCTGGTTA	TGCTGATTA	ATCTGGAGC	GGTGAGCTG
3701	GGTCTCGCG	TATCNTTGA	GCATGCGGC	CAGATGTTA	GGCTTCCGT	ATCGTAGTTA	TCTACACGAC	GGGAGTCA	GCACTATGG	ATGACGAAA

76/81

Figur 108 forts.

3801 TAGACAGATC GCTGAGATAG GTGCTCACT GATTAAGCAT TGGTAAGTGT CAGACCAAGT TTAATCATAT ATACTTTAGA TTGATTATAA ACTTCATTTT
 3901 TAATTTAANA GGATCTAGGT GAGATCCCTT TTTGTAATATC TCATGACCAA AATCCCTTAA CGTGAGTTTT CGTTCCACTG AGCCTCAGAC CCGGTAGAAA
 4001 AGACTAAAGG ATCTTCTTGA GATCCCTTTT TTCTGCGGT AGATGCTGTC TACCAACACG AAAAAACACC GTTAGCCGCT GTGGTTTGTG TGCCGNTCA
 4101 AGAGCTAACG ACTCTTTTTC CGAGSTAAC TGGCTTCAGC AGAGCGCAGA TACCANAATAC TTGCTTCTTA GTGTAGCCGT AGTTAGGCCA CCACCTTCAG
 4201 AACTCTGTAG CACCGCTTAC ATACCTGCTT CTGCTAATCC TGTATACCAAT GGTCTGCTCC AGTGGGATA AGTCGTGCTT TACCGGGTTC GACTCAGAGC
 4301 GATAGTTACC GGATAAGCG CAGCGTGG CGTGAACGGG GGGTTCTGTC ACACAGCCCA GGTATCCGAT CAGCGGAGG GCTTGGAGCG AACGACTAC ACCGACTGA GATACCTTAC
 4401 GGTGAGCTA TGAAGAGCG CCACGCTTC CBAAGGGA AGGCGGACA GGTATCCGAT CAGCGGAGG GCTTGGAGCG GGTATCCGAT CAGCGGAGG GGTATCCGAT
 4501 CCAGGGGAA ACGCTTGGTA TCTTTATAGT CTTGTGCTGG TTGCGCACTT CTGACTTGG CAGCGGAGG GCTTGGAGCG GGTATCCGAT CAGCGGAGG GGTATCCGAT
 4601 GGAAGAACGC CAGCAGCGG GCTTTTAT GGTTCCTGTC CTTTGTGTC ACATGTTCTT TCTGCTGTTA TCCCTGAT TCCCTGAT TCTGCTGTTA
 4701 CCGTATTACC GCTTTTGA GTGCTGATAC CAGTGGGAT TTGCGGAT TACTATTAT GCTTGGAGG CAGCGGAGG GCTTGGAGCG GGTATCCGAT CAGCGGAGG
 4801 AAACCGCTC TCCCGCGCG TTGCGGAT CATTAAATGA GCTGGCAGA CAGTTTCC CAGTGGAGG CAGCGGAGG GCTTGGAGCG GGTATCCGAT CAGCGGAGG
 4901 GTTACCTCAC TCATTAGGCA CCGCAGGCTT TACTATTAT GCTTGGAGG CAGCGGAGG GCTTGGAGCG GGTATCCGAT CAGCGGAGG GGTATCCGAT
 5001 CTATGACCAT GATTAGCCA AGCTGGAAT ACAGTCACT ATAGGCGGAA TTGCTGTC CAGTGGAGG CAGCGGAGG GCTTGGAGCG GGTATCCGAT CAGCGGAGG
 5101 GTGCTTGTGT ATGGCTTCAT TCAGCTCGG TTGCGGCG CAGTGGAGG CAGCGGAGG GCTTGGAGG CAGCGGAGG GCTTGGAGCG GGTATCCGAT CAGCGGAGG
 5201 CGATCGTGT CAGAGTAGG TTGCGGCG CAGTGGAGG CAGCGGAGG GCTTGGAGG CAGCGGAGG GCTTGGAGG CAGCGGAGG GCTTGGAGCG GGTATCCGAT CAGCGGAGG
 5301 CTGTGACTGG TGTACTCAAC CAGTCAATC TGAATATAGT GTATGCGCG ACCGAGTTC CAGCGGAGG CAGCGGAGG GCTTGGAGG CAGCGGAGG GGTATCCGAT CAGCGGAGG
 5401 GCAGACTTT AAAAGTCTC ATCATTGGA AACGTTCTT GGGCGGAAA CTCTCAGGA TCTTACGCT GTTACGCT AGTTGCTGTT AACCCACTG
 5501 TGCACCCAAC TGATCTCAG CATCTTTTAC TTTCACGCG GTTCTGCGT GAGCAAAAC AGGAGGCA AATGCGCAA AAGGGAAT AAGGCGACA
 5601 CGGAATGTT GAATACTCAT ACTCTTCTT TTTCACGCG GTTCTGCGT GAGCAAAAC AGGAGGCA AATGCGCAA AAGGGAAT AAGGCGACA
 5701 AAATAACAA ATAGGGGTTT CCGGACATTT TCCCGGAAA GTGCGACCTT ACCTCTAGA AACCATTT ATCATGACAT TAACCTATTA AATAGGCGT
 5801 ATCAGAGGC CTTTCTGCT TCAGAGATG GGGATCTAG TATGCTCAT CTCTCTAGA TTCCCTCAT GAGAGTGGC GCAGATGTAT ATGACAGAT
 5901 CGCCAGTTTC CAGAGACTT TATTCAGGCA CTTTCATGAT AGGCAAGGA GAGACCCGAG AGATGTTGTT CTCTAGTTA CACATGGTAT TTATCCAGA
 6001 GTATTCCTGA TGAATGTT TGAATGACA TACGAGAGT TTGATCGTT TACCAATGTT CCTAACGGA GCCTAATGTT GATGGAATG GAGGATCCA
 6101 TCAATAGATA CGTCTGAGG ACCGTGCTAC CCAATGGAC TGAATGAG GTGAGGCG GAGACCTTA CTACATGTT TTTAAGATT ACGGATTTT AACTTACTTA
 6201 GAATATGCC ATTTTCTGA GTTATATTA TCCATAGTTA GTGAGGCG GAGTAACT GTGAGGACTT CAAATACAT CAAATACAT GACGTTATCA
 6301 CCCTACTTAT TCCCTTGGAG ATTATCTA GGAACCATC AGGTTGGTGG AGATTTACC GTTCTAGAC TTTCTAGCTT CCTCTATTGA TGTACACTC
 6401 GACACCCCT TTTCTGGCAT CCAATTTTGA TCTCTAGT GCAATGAGA TTCTCCGAAA TTAATTAAG CAAATACAT ATTCTCTG ATACCACCTC
 6501 GGTGAACT GACAGGTGT TTGTTACGCA TGTATATGCA AAGAGCCTA TATACCTTTG GCTGCGTGC TGTACAGG AATATAAG GCAGCATAT
 6601 TTAGGATTT AGTGAATCT CAACTTTAC TATTTCCCT TCTACGTA AATATTTCT TTTTATCT TTTTCAAT TTTTATCT
 6701 TTCTTTTCTT GCTTAATCT ATRACTA AAAAAACA CAG

77/81

Figur 109

MetArg PheProSer IlePheThr AlaValLeuPhe AlaAlaSer SerAlaLeu AlaAlaProVal AsnThrThr ThrGluAsp GluThrAlaGln.
 1 GAATTC
 ..IleProIle GluAlaVal IleGlyTyrIleu AspleuGlu GlyAspPhe AspValAlaVal LeuProPhe SerAsnSer ThrAsnAsngly LeuLeuPhe.
 101
 ..IleAsnThr ThrIleAlaSer IleAlaAla LysedluGlu GlyValSerLeu AsplysArg GluAlaGlu AlagInGluVal ThrGlnIle ProAlaAla
 201
 LeuSerValPro GluGlyGlu AsnLeuVal LeuAsnCysSer PheThrAsp SerAlaIle TyrAsnleuGln TrpPheArg GlnAspPro GlyLysGlyLeu.
 301
 CTGAGTGTCC CAGAGGAGA AACTTGGTT CTCAACTGCA GTTCACTGTA TAGGCTATT TACAACCTCC AGTGGTTAG GCAGGACCTT GGGAAGGTC
 ..ThrSerLeu LeuLeuIle GlnSerSerGln ArgGluGln ThrSerGly ArgLeuAsnAla SerLeuAsp LysSerSer GlyArgSerThr LeuTyrIle.
 401
 TCACATCTCT GTTGCTTATT CAGTCAAGTC AGAGAGAGCA AACAGGTGGA AGACTTAATG CCTCGCTGGA TAAATCATCA GGACGTAGTA CTTATACAT
 .AlaAlaSer GlnProGlyAsp SerAlaThr TyrLeuCys AlaValArgPro ThrSerGly GlySerTyr IleProThrPhe GlyArgGly ThrSerLeu
 501
 TGCAGCTTCT CAGCTGGTG ACTCAGCCAC CTACTCTGTT GCTGTGAGC CCACATCAGG AGGAAGCTAC ATACTACAT TTGGAGAGAG AACGAGCCTT
 IleValHisPro TyrIleGln AsnProAsp ProAlaValTyr GlnLeuArg AspSerLys SerSerAspLys SerValCys LeuPheThr AspPheAspSer.
 601
 ATTGTTCATC CGTATATCCA GAACCGGAT CCTGCGTGT ACCAGCTGAG AGACTCTAAA TCCAGTGACA AGTCTGCTG CCTATTTCACC GATTITGATT
 ..GlnThrAsn ValSerGln SerLysAspSer AspValTyr IleThrAsp LysCysValLeu AspMetArg SerMetAsp PheLysSerAsn SerAlaVal.
 701
 CTCAACAAA TGTGTACAA AGTAAGGATT CTGATGTGTA TATCACAGAC AAATGTGTC TAGACATGAG GTCTATGGAC TTCAAGAGCA ACAGTGTCTGT
 .AlaTrpSer AsnLysSerAsp PheAlaCys AlaAsnAla PheAsnAsnSer IleIlePro GluAspThr PhePheProSer ProGluSer Ser++
 801
 GGCCTGGAGC AACAAATCTG ACTTTGCATG TGCAACGCGC TTCAACACACA GCATTATTCC AGAAGACACC TTCTTCCCCA GCCCAGAAAG TTCTTAACTC
 901
 GAG

Pre-pro-paringsfaktor-alfa-sekvensen er uthævet. BamHI-sete er understreket

Figur 110

[illegible]

Pre-pro-paringsfaktor-alfa-sekvensen er uthevet

79/81

Figur 111



Figur 112

ggatccagcatggtgtgtctgaagctccctggaggctcctgcatgacagcgctgaca
 gtgacactgatggtgctgagctccccactggctttgtccggagacaccggtggcgga
 tctctagttccacgcggtagtggaggcggtggttccggagacacgcgtagtaggtc
 gacggaggcggtgggggtagaatcgcccggtggaggaaaaagtgaaaacctgaaa
 gctcagaactcggagctggcgtccacggccaacatgctcagggaacagggtggcacag
 cttaaacagaaagtcataactactaggatcc

Figur 113

BamHI	AgeI	Sall	BamHI
DR β -leder — GDT	TCR-kjede Stopp	Glidelås	

80/81

Figur 114

ggatccagcatggtgtgtctgaagctccctggaggctcctgcatgacagcgctgaca
 gtgacactgatggtgctgagctccccactggctttgtccggagacaccggagacacc
 ggacagaaggaagtggagcagaactctggaccctcagtgttcagagggagccatt
 gcctctctcaactgcacttacagtgaccgaggttccagtccttcttctggtacaga
 caatattctgggaaaagccctgagttgataatgtccatatactccaatggtgacaaa
 gaagatggaaggtttacagcacagctcaataaagccagccagtatgtttctctgctc
 atcagagactcccagcccagtgattcagccacctacctctgtgccgttacaactgac
 agctgggggaaattgcagtttggagcagggaccaggttgtggtcaccgccagatatc
 cagaaccctgaccctgccgtgtaccagctgagagactctaaatccagtgacaagtct
 gtctgcctattcacccgattttgattctcaaacaaatgtgtcacaaagtaaggattct
 gatgtgtatatcacagacaaatgtgtgctagacatgaggtctatggacttcaagagc
 aacagtgctgtggcctggagcaacaaatctgactttgcatgtgcaaacgccttcaac
 aacagcattattccagaagacaccttcttccccagcccagaaagttcctaagtcgac
 ggaggcggtgggggtagaatcgcccggtggaggaaaaagtgaacaccttgaaagct
 cagaactcgagctggcgtccacggccaacatgctcagggaaacaggtggcacagctt
 aaacagaaagtcataactactaggatcc

Figur 115

ggatccagcatggtgtgtctgaagctccctggaggctcctgcatgacagcgctgaca
 gtgacactgatggtgctgagctccccactggctttgtccggagacaccggagacacc
 ggaaacgctggtgtcactcagacccccaaaattccaggtcctgaagacaggacagagc
 atgacactgcagtggtgccaggatataaaccatgaatacatgtcctggtatcgacaa
 gaccagggcatggggctgaggtgattcattactcagttggtgctggtatcactgac
 caaggagaagtccccaatggctacaatgtctccagatcaaccacagaggatttcccg
 ctcaggctgctgtcggtgctccctcccagacatctgtgtacttctgtgccagcagg
 ccgggactagcgggagggcgaccagagcagtaacttcgggcccgggcaccaggctcacg
 gtcacagaggacctgaaaaacgtgttcccacccgaggtcgctgtgtttgagccatca
 gaagcagagatctcccacacccaaaaggccacactggtgtgctggccacaggcttc
 taccgccaccacgtggagctgagctggtgggtgaatgggaaggaggtgcacagtggg
 gtctgcacagacccgcagcccctcaaggagcagcccgcctcaatgactccagatac
 gctctgagcagccgcctgagggctctcgccacacctctggcaggacccccgcaaccac
 ttccgctgtcaagtccagttctacgggctctcgagagaatgacgagtggaaccaggat
 agggccaaaccctcaccacagatcgctcagcgcgaggcctggggtagagcagactaa
 gtcgacggaggcggtgggggtagaatcgcccggtggaggaaaaagtgaacaccttg
 aaagctcagaactcgagctggcgtccacggccaacatgctcagggaaacaggtggca
 cagcttaaacagaaagtcataactactaggatcc

81/81

Figur 116

