

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2006.12.27**

(30) Prioridade(s): **2005.12.27 EP 05028501**

(43) Data de publicação do pedido: **2008.09.10**

(45) Data e BPI da concessão: **2011.04.20**
121/2011

(73) Titular(es):

SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE
RIUNITE S.P.A.

VIALE SHAKESPEARE 47 00144 ROMA

TECNOGEN S.P.A.

IT

IT

(72) Inventor(es):

OLGA MINENKOVA

EMILIANO PAVONI

IT

IT

(74) Mandatário:

LUISA MARIA FERREIRA GUERREIRO

PRACETA FERNANDO NAMORA, Nº 7, 3º ESQ. 2820-598

CHARNECA DA CAPARICA

PT

(54) Epígrafe: **VECTOR PARA A SELECÇÃO EFICIENTE E/OU MATURAÇÃO DE UM ANTICORPO E SUA UTILIZAÇÃO**

(57) Resumo:

É DESCRITO UM MÉTODO PARA MELHORAR A CAPACIDADE DE SELECÇÃO DE UM ANTICORPO NUMA BIBLIOTECA DE DEMONSTRAÇÃO DE BACTERIÓFAGOS, EM QUE AS DITAS MELHORIAS SÃO OBTIDAS ATRAVÉS DA REDUÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DOS ANTICORPOS PRODUZIDOS NA DITA BIBLIOTECA.

DESCRIÇÃO

VECTOR PARA A SELECÇÃO EFICIENTE E/OU MATURAÇÃO DE UM ANTICORPO E SUA UTILIZAÇÃO

A presente invenção refere-se a um método de melhorar a capacidade de selecção de anticorpos na biblioteca de macrófagos, na qual a dita melhoria é obtida através da redução dos níveis de expressão dos anticorpos produzidos na referida biblioteca.

Campo da invenção

A tecnologia de ADN recombinante oferece uma alternativa barata e útil para a produção de anticorpos monoclonais. A Exibição de anticorpos recombinantes em capsídeo bacteriófago, conhecida como a exposição do fago, não só permite a geração de bibliotecas de anticorpos humanos para a selecção de ligadores específicos, fornecendo anticorpos úteis para a terapia que não induz uma resposta imune prejudicial nos pacientes, mas também facilita a maturação de afinidade de anticorpos através da construção de bibliotecas de anticorpos mutantes, dando clones com maior afinidade.

A possibilidade de encontrar ligantes de alta afinidade numa biblioteca de anticorpos recombinantes caracteriza a sua qualidade, que depende de vários factores, como o tamanho da biblioteca, a diversidade e a fonte de genes de imunoglobulinas.

É sabido que vários tecidos linfóides de doadores imunizados ou não imunizados, como os linfócitos do sangue periférico, baço e medula óssea e até mesmo o tecido de nódulos linfáticos metastáticos ou drenados de indivíduos

acometidos por tumores podem servir como fonte de repertório de anticorpos específicos.

Embora as bibliotecas de anticorpos simples sejam mais diversificadas e levem ao isolamento das especificidades de anticorpos mais vastas, é razoável sugerir que a construção de uma biblioteca de anticorpos recombinantes de um repertório Ig de um paciente afectado por uma doença específica pode fornecer os fragmentos de anticorpos de maior afinidade de ligação contra antígenos específicos.

Vários estudos publicados descrevem a construção de bibliotecas de anticorpos recombinantes a partir de nódulos linfáticos associados a tumores (Clin. Exp. Immunol. 1997 109 (1):166-74; Int. J. Mol. Med. 2004 14 (4):729-35; World J. Gastroenterol. 2004 10 (18):2619-23). Estes estudos são baseados na ideia geral de que o tecido do nódulo linfático de pacientes com cancro é infiltrado com células B activadas, que podem servir como fonte de anticorpos específicos do tumor.

É muito difícil obter nódulos linfáticos metastáticos ou drenados de pacientes com cancro de mama como material cirúrgico fresco. De acordo com a prática médica recente, o cirurgião remove apenas o nódulo linfático sentinela ou um pequeno grupo de nós (nódulo linfático sentinela e aqueles mais próximos dele), realizando assim uma cirurgia menos invasiva e reduzindo os efeitos secundários, ao invés da remoção de dezenas de nódulos linfáticos de acordo com a técnica cirúrgica anterior. Após a dissecação do nódulo linfático sentinela, praticamente todo o nódulo é estudado para a presença de micrometástases ou de células cancerosas individuais. Assim, na cirurgia do cancro da mama o nódulo linfático metastático é praticamente descartado como material cirúrgico indisponível.

A evidência que os infiltrantes de linfócitos B no tumor (TIL-B) derivados de anticorpos podem também reconhecer as células tumorais foi obtida através da produção de hibridomas humanos, obtidos a partir de TIL, capazes de segregar anticorpos específicos do tumor (Lancet. 1982 1 (8262):11-4; Br. J. Cancer, 1983 47 (1):135-45); pela expansão de células B de TIL de biópsias de tumores humanos (Cancer Immunol. Immunother. 1994 38 (4):225-32); pela expansão de células B do melanoma derivado de TIL e seguindo a clonagem de anticorpos scFv a partir do clone célula B simples com melanoma de reactividade específica (Cancer Res. 1995 55:3584-91); e pelo transplante subcutâneo do tecido do cancro do pulmão humano em ratos imunodeficientes produzindo anticorpos humanos provenientes da TIL-B, que reconhecem duas proteínas específicas do tumor (Cancer Invest. 2000, 18 (6):530-6; Cancer Res. 2002 62 (6):1751-6), sugerindo uma função específica da TIL-B no tumor.

Recentemente, o carcinoma do colo do útero e um tipo raro de cancro da mama, classificado como carcinoma medular (MCB) foram mostrados ser caracterizados por infiltrado linfoplasmocitário que se correlacionam com a melhoria do prognóstico e sobrevivência do paciente. Essas doenças, foram investigadas para compreender a natureza dos linfócitos B infiltradas no tumor (TIL-B) usando métodos também de demonstração de bacteriófagos. O estudo da estrutura molecular das regiões variáveis de anticorpos deu provas de respostas imunes conduzidas por antígenos humorais em carcinomas da mama medulares, bem como em tumores cervicais. A predominância de oligoclonais encontrada justamente nos genes de anticorpos derivados de TIL indica uma selecção clonal possível das moléculas de Ig contra neoantígenos específicos sobre-expressos, ou especificamente expressos no tecido do tumor (Cancer Immunol. Immunother. 2001 50 (10):523-32; Cancer Res. 2001 61 (21):7889-99; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2001 98 (22):12659-64; J. Immunol. 2002 169 (5):2701-11).

Apesar das fortes indicações acima mencionadas que o tecido do tumor é infiltrada com células B activadas, que podem servir como fonte de anticorpos específicos do tumor, vários grupos de pesquisa, nas experiências de filtração realizadas com bibliotecas de demonstração de bacteriófagos derivados de TIL contra antígenos tumorais purificados conhecidos ou células tumorais vivas, ou cortes de tecido congelado, falharam na selecção de um anticorpo específico discriminando entre o tumor e as células normais, ou uma reactiva com células da superfície dos antígenos do tumor (Cancer Res. 2001 61 (21):7889-99; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2001 98 (22):12659-64; Int. J. Cancer 2001 93:832-40). Só mais tarde, dois grupos diferentes conseguiram identificar anticorpos específicos reconhecendo as células tumorais com este tipo de bibliotecas de demonstração de bacteriófagos (J. Immunol. 2002 169:1829-36; J Immunol. 2005 175 (4):2278-85).

Uma abordagem alternativa, baseada numa biblioteca de expressão de bacteriófagos derivada de um tumor e protocolos de rastreio directo da placa, que evitou as limitações do sistema de demonstração de bacteriófagos permitiu que Wu e colegas (Cancer Immunother Immunol. 2002 51 (2):79-90) isolassem anticorpos múltiplos vinculados especificamente às células tumorais em cultura. Este estudo indica que as dificuldades observadas na selecção de anticorpos anti-tumoral da TIL derivadas das bibliotecas de demonstração de bacteriófagos resultam da imperfeição dos vectores de demonstração conhecidos na técnica. No entanto, a análise directa também não é um método excelente para a selecção de anticorpos recombinantes a partir de grandes bibliotecas. Na verdade, é um processo trabalhoso exigindo grandes gastos de tempo e de meios, em relação à tecnologia de demonstração de bacteriófagos. Barbas et al. (Phage Display: a laboratory manual, ISSN: 0-87969-546-3, (2001) páginas I-XVI, 1.1) divulga vectores de demonstração de bacteriófagos (pComb3H e pComb3X) em que os fragmentos scFv estão ligados ao aminoácido 180 C-terminal da proteína capsidial gpIII (aa230-460) dos bacteriófagos filamentosos. Também divulga fasmídeos compreendendo baixa eficiência ou promotores repressores (plac) no vector fasmídeo e métodos para usar os ditos vectores na selecção e maturação de

scFv. O pedido de patente europeia EP 1 452 599 descreve vectores de demonstração de bacteriófagos, fasmídeos e bibliotecas de demonstração de bacteriófagos que exibem vários peptídeos epítomos ou domínios de proteína com potencial para vincular a um material alvo de interesse. A WO 92/01047 divulga um método para produzir um membro multimérico de um par de ligação específica (sbp), que compreende expressar num organismo hospedeiro recombinante uma primeira cadeia polipeptídica do membro sbp ou uma população geneticamente diversificada desse tipo de membro sbp fundido a um componente de um pacote de demonstração replicável genético segregado (rgdp), que assim apresenta o polipeptídeo na superfície do pacote e expressa no organismo hospedeiro recombinante uma segunda cadeia polipeptídica do multímero e causa ou permite que as cadeias polipeptídicas se unam para formar o multímero como parte do rgdp, sendo pelo menos uma das cadeias polipeptídicas expressa a partir do ácido nucléico que é capaz de ser compactado usando o componente pelo qual o material genético de cada rgdp codifica uma cadeia polipeptídica. Também descreve vectores fasmídeos em que as sequências de nucleotídeos scFv são fundidas para as proteínas GIII de um bacteriófago filamentoso e a preparação do dito scFv. A WO 93/11236 divulga um método para fornecer uma biblioteca de pacotes de demonstração genéticos replicáveis (rgdps), cada um exibindo, na sua superfície, um par de membros de ligação específica (sbp), e cada um contendo ácido nucleico com sequências derivadas das espécies de mamíferos, codificando a cadeia polipeptídica que é componente do membro sbp exibido na superfície; e (b) selecção pela ligação com o antígeno próprio (Ag), um ou mais membros sbp com especificidade para o auto-antígeno.

A Requerente realizou uma triagem de bibliotecas de demonstração de bacteriófagos de anticorpos recombinantes derivados de TIL-B, utilizando novos vectores fasmídeos pKM19 e demonstraram uma eficiente selecção de anticorpos específicos do tumor contra antígenos tumorais desejáveis bem como contra células vivas do carcinoma da mama.

Resumo da invenção

Os autores descobriram que é possível melhorar a eficiência da selecção e/ou da maturação de anticorpos recombinantes a partir de bibliotecas usando o sistema de demonstração de bacteriófagos, após modificações adequadas de vectores da técnica anterior. Os vectores da técnica anterior são, ou seja, vectores fasmídeos como em "Antibody Enginerring - A practical approach (McCafferty, J. Hoogenboom, H. & Chiswell D., eds), pp.325, Oxford University Press, 1996)".

Por isso, é um objecto da presente invenção um vector apropriado para a selecção eficiente e/ou maturação de um anticorpo recombinante pertencente ao grupo de: scFv, fragmentos activos de Abs, sequências humanizadas de Abs, o dito vector caracterizado em que i) contém pelo menos um elemento capaz de reduzir o nível de expressão do anticorpo recombinante pertencente ao grupo de: a) um códon de parada suprimido dentro quer do peptídeo líder ou da sequência de codificação do anticorpo; b) um promotor de baixa eficiência que conduz a transcrição da referida sequência de codificação do anticorpo; e ii) tem uma eficiência melhorada de exibição dos referidos anticorpos recombinantes por meio de: a) fusão da sequência de codificação do anticorpo recombinante para uma sequência de codificação para a parte carboxi-terminal da proteína PIII; e b) utilizando como peptídeo líder do anticorpo recombinante o peptídeo líder da fosfatase alcalina de *E. Coli*-, e c) eliminando qualquer códon âmbar entre a sequência de codificação do anticorpo recombinante e a sequência de codificação PIII, em que o nível de expressão do anticorpo recombinante pode ser reduzido por um inibidor do promotor da transcrição da dita sequência de codificação do anticorpo.

O vector da invenção pode ser um plasmídeo, um fasmídeo, um bacteriófago, ou quaisquer outros vectores conhecidos pelos peritos na técnica.

Barbas et al. (Phage Display: a laboratory manual, ISSN: 0-87969-546-3, (2001) páginas I-XVI, 1.1) divulga vectores de demonstração de bacteriófagos (pComb3H e pComb3X) em que os fragmentos scFv estão ligados ao aminoácido 180 C-terminal da proteína capsidial gpIII (aa230-460) dos bacteriófagos filamentosos. Também divulga fasmídeos compreendendo baixa eficiência ou promotores repressores (plac) no vector fasmídeo e métodos para usar os ditos vectores na selecção e maturação de scFv.

O pedido de patente europeia EP 1 452 599 descreve os vectores de demonstração de bacteriófagos, fasmídeos e bibliotecas de demonstração de bacteriófagos que exibem vários peptídeos epítipo ou domínios de proteína com potencial para vincular a um material alvo de interesse.

A WO 92/01047 divulga um método para produzir um membro multimérico de um par de ligação específica (sbp), que compreende expressar num organismo hospedeiro recombinante uma primeira cadeia polipeptídica do membro sbp ou de uma população geneticamente diversificada desse tipo de membro sbp fundido a um componente de um pacote de demonstração replicável genético segregado (rgdp), que assim apresenta o polipeptídeo na superfície do pacote e expressa no organismo hospedeiro recombinante uma segunda cadeia polipeptídica do multímero e causa ou permite que as cadeias polipeptídicas se unam para formar o multímero como parte do rgdp, sendo pelo menos uma das cadeias polipeptídicas expressa a partir do ácido nucléico que é capaz de ser compactado usando o componente pelo qual o material genético de cada rgdp codifica uma cadeia polipeptídica. Também descreve vectores fasmídeos em que as sequências de nucleotídeos scFv são fundidas para as proteínas gIII de um bacteriófago filamentoso e a preparação do dito scFv. A WO 93/11236 divulga um método para fornecer bibliotecas de pacotes de demonstração genéticos replicáveis (rgdps), cada um exibindo, na sua superfície, um par de membros de ligação específica (sbp), e cada um contendo ácido nucleico com uma sequência derivada das espécies de mamíferos, codificando a cadeia

polipeptídica que é componente do membro sbp exibido na superfície; e (b) selecção pela ligação com o antígeno próprio (Ag), um ou mais membros sbp com especificidade para o auto-antígeno.

Por isso, é um objecto da presente invenção um vector apropriado para a selecção eficiente e/ou maturação de um anticorpo recombinante, pertencente ao grupo de: scFv, fragmentos activos de Abs, sequências humanizadas de Abs, sendo o dito vector caracterizado por

i) conter pelo menos um elemento capaz de reduzir o nível de expressão do anticorpo recombinante pertencente ao grupo de: a) um códon de parada suprimido dentro quer do peptídeo líder ou da sequência de codificação do anticorpo; b) um promotor de baixa eficiência conduzindo a transcrição da referida sequência de codificação do anticorpo; e

ii) ter uma eficiência melhorada de exibição dos referidos anticorpos recombinantes por meio de: a) fusão da sequência de codificação do anticorpo recombinante para uma sequência de codificação para a parte carboxi-terminal da proteína pIII; e b) utilização como peptídeo líder do anticorpo recombinante o peptídeo líder da fosfatase alcalina de *E. coli*-, e c) eliminação de qualquer códon âmbar entre a sequência de codificação do anticorpo recombinante e a sequência de codificação pIII,

em que o nível de expressão do anticorpo recombinante pode ser reduzido por um inibidor do promotor da transcrição da dita sequência de codificação do anticorpo.

Promotores de baixa eficiência são conhecidos na técnica e são exemplificados em Biochem J. 1970 117: 741-746). Inibidores apropriados para os promotores são conhecidos na técnica e são exemplificados em J. Bacteriol. 1979.138 (1):40-7.

É um objecto adicional da presente invenção um vector fasmídeo tendo a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 1.

Esse vector, chamado pKM19, é concebido para a exibição de anticorpos recombinantes em formato de cadeia única sobre a superfície de bacteriófagos filamentosos.

É um objecto adicional da invenção uma biblioteca de demonstração de bacteriófagos de anticorpos obtida por clonagem de cADNs no vector da invenção. De preferência, a biblioteca é obtida por clonagem no vector de cADNs da invenção a partir de células produtoras de anticorpos, mais de preferência de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) ou linfócitos de sangue periférico (PBLs). Num aspecto preferido tais anticorpos produtores de células são isolados de um sujeito afectado por um tumor, de preferência a partir de um sujeito afectado por cancro da mama. Em alternativa, a biblioteca é composta por bibliotecas de anticorpos sintéticos ou semi-sintéticos, também mutantes para a maturação de afinidade dos anticorpos.

É um objecto adicional da presente invenção uma célula hospedeira transformada com o vector da invenção. É um objecto adicional da presente invenção um método para melhorar a selecção e/ou maturação de um anticorpo recombinante compreendendo a etapa de clonagem e expressão de cADNs, ou sequências de anticorpos sintéticos ou semi-sintéticos, mesmo mutados para a maturação de afinidade de anticorpos para o vector, como descrito acima.

A invenção será agora descrita por meio de exemplos não limitativos referindo-se aos desenhos seguintes:

Descrição detalhada dos desenhos

Figura 1. É descrito esquematicamente os elementos essenciais do plasmídeo pKM16 útil para a produção de anticorpos solúveis em formato scFv e os elementos essenciais de plasmídeos pKM17, pKM18 e pKM19 úteis para a produção de anticorpos de demonstração de bacteriófagos. Estes plasmídeos direccionam a expressão de anticorpo sob controlo do promotor plac. Os únicos sítios de clonagem Nco I e Not I permitem a inserção de um gene de anticorpo para expressar anticorpos de cadeia única com um peptídeo líder da enzima bacteriana periplásmica, fosfatase alcalina (líder PhoA). O plasmídeo pKM17 codifica a proteína inteira pIII (406 aa) e os plasmídeos pKM18 e pKM19 codificam a parte carboxi-terminal de pIII (197 aa). O plasmídeo pKM19 contém o códon âmbar em líder PhoA.

Figura 2. É descrita a estrutura detalhada do vector fasmídeo pKM19. A modificação específica feita é relatada na figura e descrita no texto.

Figura 3. Produção de scFv Solúvel usando o plasmídeo pKM16. Três clones independentes obtidos por clonagem antígeno anti-carcino-embrionário scFv (CEA) no gene em pKM16 foram testados para a produção de scFv solúveis (linhas gel 1-3). As fracções proteicas periplásmicas foram purificadas de bactérias pelo método de congelação e descongelação. O marcador do tamanho da proteína está incluído. A membrana de Western blot foi desenvolvida com um anticorpo secundário conjugado anti-FLAG AP. As bandas correspondentes aos anticorpos scFv solúveis (de peso molecular esperado kDa 26) migram entre as bandas de 24,5 e 35,9 kDa.

Figura 4. Mostrar a eficiência dos plasmídeos pKM17, pKM18 e pKM19 em comparação com um sistema de fasmídeos clássico. Os anticorpos anti-CEA scFv apresentados pelos três plasmídeos diferentes, foram analisados por ELISA contra a proteína CEA e comparados com bacteriófagos MA39 (anti-CEA/pDN322). O bacteriófago auxiliar, M13K07, que não apresenta fragmentos de anticorpos, foi incluído como controlo negativo. Os dados reportados são valores médios dos ensaios realizados em duplicado. A maior concentração de bacteriófago, marcado por asterisco, corresponde a 10"

TU para todos os bacteriófagos e 3×10^{10} TU para anti-CEA/pKM17. O teste de ELISA foi realizado utilizando o anti-M13 (painel A) ou, alternativamente, o anticorpo secundário anti-FLAG (painel B).

Figura 5. Filtração de amostras de bacteriófagos. Sobre 2×10^{11} TU/poço de cada preparação ou a quantidade correspondente de amostras de filtrado foram testadas em ELISA e desenvolvidas como anticorpos secundários anti-M13 (painel A) ou anti-FLAG (painel B). Os dados reportados são valores médios dos ensaios realizados em duplicado. Os dados mostram que a reactividade dos filtrados contra a CEA como percentual da reactividade original de amostras não-filtradas (100%).

Figura 6. Concorrência com anti-CEA scFv solúvel. Sobrenadantes preparados recentemente de MA39 (10 μ L) e bacteriófagos anti-CEA/pKM19 (5 mL) competiram com várias quantidades do anticorpo anti-CEA purificado solúvel. Os dados são expressos em percentagem de reactividade dos sobrenadantes sem concorrentes. O anti-SP2 scFv solúvel irrelevante foi utilizado como controlo negativo.

Figura 7. Competição com sobrenadantes filtrados bacteriófagos. Sobrenadantes preparadas recentemente de MA39 (10 μ L) e bacteriófagos anti-CEA/pKM19 (5 μ L) competiram com 10 μ L ou 50 μ L dos filtrados dos sobrenadantes do mesmo bacteriófago. Os dados são expressos em percentagem da reactividade dos sobrenadantes sem concorrentes.

Figura 8. Western blot de bacteriófago PEG recombinante purificado. Extractos de proteína de cerca de 5×10^9 PFU de bacteriófagos MA39, anti-CEA/pKM18 e anti-CEA/pKM19 e 1×10^9 PFU de anti-CEA/pKM17 foram fraccionados por SDS-PAGE e transferidos para uma membrana de nitrocelulose. As faixas de membrana foram desenvolvidas com um anticorpo conjugado anti-FLAG AP-. O marcador do tamanho da proteína está incluído (última faixa). As proteínas scFv-PIII (66,1 kDa) e scFv- Δ pIII (45,2 kDa) migram como bandas de peso molecular mais elevado por causa de uma porção da proteína pIII anómala descrito anteriormente (Goldsmith e Konigsberg, 1977).

Figura 9. Selecção contra a proteína GST-SP2. É mostrada a reactividade dos tanques de bacteriófagos derivados dos primeiro e segundo turnos da biblioteca scFvEC23. GST (glutathione S-transferase), leite e estreptavidina, presentes no sistema de selecção, são incluídos como controlos negativos. Os dados reportados são valores médios dos ensaios realizados em duplicado. A entrada do bacteriófago foi normalizada uma vez que 3×10^9 TU por cada poço de cada preparação foi testado em ELISA.

Figura 10. Selecção de afinidade de gene maturado anti-CEA de uma biblioteca de maturação. Neste ensaio, imunoreacções positivas foram desenvolvidas por um anticorpo secundário conjugado anti-FLAG AP, a fim de moderar os sinais positivos e tornar visível o aumento da reactividade durante o processo de selecção. O bacteriófago auxiliar, M13K07, que não apresenta fragmentos de anticorpos, foi incluído como controlo negativo. A reactividade do anticorpo anti-CEA original em pKM19 (anti-CEA/pKM19), biblioteca de maturação (Lib.), tanques de bacteriófago depois da primeira e segunda ronda de selecção (ronda I, ronda II) e clones individuais (cl.1, cl.2) do tanque de bacteriófagos após a segunda ronda de selecção de afinidade, testado no CEA e proteína GST irrelevante, são mostrados. Os dados reportados são valores médios dos ensaios realizados em duplicado. A entrada do bacteriófago foi normalizada. Cerca de 3×10^{10} TU por poço de cada preparação foi testado em ELISA.

Figura 11. Reactividade de ELISA de solúveis scFvs maturados. Várias quantidades de anticorpos solúveis foram testadas em placas CEA revestidas. As ligações scFvs foram desenvolvidas usando um anticorpo secundário anti-FLAG. Os dados reportados são valores médios dos ensaios realizados em duplicado. O anticorpo anti-SP2 irrelevante e o anticorpo anti-CEA E8 maturado, obtido anteriormente (Pavoni et al., 2006), foram incluídos como controlos.

Figura 12. Especificidade de clones maturados. Cerca de 250 ng por poço de anticorpos originais e maturados na forma solúvel foram analisados com CEA e várias proteínas irrelevantes. O anticorpo anti-SP2 irrelevante foi incluído como controlo negativo. Os dados reportados são valores médios dos ensaios realizados em duplicado.

Figura 13. Análise V(D) J de genes derivados de anticorpos TIL. cADNs SMART provenientes de 10 amostras diferentes do tumor (pacientes B84, B85, B87, B89, B90, B91, B92, B93, B95, B96), a partir da mama normal, testículo normal e linfócitos de quatro doadores saudáveis (L1, L2, L3, L4), foram utilizados como molde para a amplificação das regiões de anticorpos V(D)J. As amostras dos cADNs foram normalizadas pela amplificação do gene β -actina de limpeza. Os fragmentos V(D)J foram bem amplificados de todos os modelos excepto do cADN do testículo normal. B. Os mesmos produtos de PCR foram fraccionados por PAGE dando uma maior resolução para as bandas de ADN.

Figura 14. Distribuições de subclasses do anticorpo. Amostras da mama normal amplificadas por PCR e amostras B84 de ADN, não apresentando bandas oligoclonais no teste V(D)J, têm uma prevalência de bandas de IgA em comparação com IgG1 e IgG2 (painel esquerdo), enquanto três amostras, mostrando bandas oligoclonais fortes no teste anterior (B91, B92 e B93), têm prevalência das bandas IgG1 ou ambas IgG1 e IgG2 em comparação com a IgA (painel direito).

Figura 15. Sequências de aminoácidos das regiões variáveis de 30 clones aleatórios obtidos por clonagem da cadeia de genes de anticorpos γ provenientes de cADNs B92 e B93. A sequência de peptídeo é relatada com o código de uma única letra. Aminoácidos idênticos em clones semelhantes são representados por um traço.

Figura 16. Selecção de proteínas ED-B, MUC1 e CEA. Foi testada a reactividade dos tanques de bacteriófago derivados da segunda e terceira rondas em comparação com as bibliotecas originais. GST é incluído como controlo negativo. O controlo negativo adicional, a proteína D possuindo cauda 6His como uma proteína alvo usada na selecção foi utilizado no caso de ED-B. Os dados reportados são valores médios dos ensaios realizados em duplicado. A biblioteca ScFvEC23 deriva de PBL. MixTIL é uma mistura de quatro bibliotecas derivadas de TIL (ScFvB87, ScFvB95, ScFvB96 e ScFvmix), como indicado na tabela 1.

Figura 17. Reactividade de ELISA de clones bacteriófagos individuais exibindo anticorpos scFv. Foi testada a

reactividade dos clones bacteriófagos individuais seleccionados contra ED-B (clones EDE1, EDE3, EDE5, EDB5, tabela 5), MUC1 (clones ME 1, ME2, MB5, tabela 5) e CEA (clones CB3, CB37, CB40, CB41, CB53, CB60, tabela 5) após a terceira ronda de selecção usando as respectivas proteínas. Os dados reportados são valores médios dos ensaios realizados em duplicado. Diversas proteínas irrelevantes e um anticorpo bacteriófago anti-SP2 irrelevante são incluídos como controlos negativos.

Figura 18. Foi testada a reactividade das células baseadas em digitalização contra as células de tanques de bacteriófagos de cancro da mama fixo (MCF7) e fibroblastos humanos (HFF) derivadas da quarta e quinta rondas de digitalização em comparação com as bibliotecas originais. Os dados reportados são valores médios dos ensaios realizados em triplicado. As bibliotecas scFvB96 e mixLIB são definidas na Tabela 2.

Figura 19. Reactividade de células ELISA contra células fixas de clones bacteriófagos individuais. Os dados reportados são valores médios dos ensaios realizados em triplicado. O desenvolvimento celular com o anticorpo anti-SP2 irrelevante é incluído como controlo negativo. MCF7 e MDA-MB-468: células de carcinoma de mama fixo; HFF: fibroblastos humanos e MCF10-2A: células epiteliais normais da mama.

Figura 20. Origem dos anticorpos anti-MCF7 scFv. Um μ L de cada biblioteca de bacteriófago scFv foi amplificado por PCR usando oligonucleotídeos iniciadores específicos para os genes de anticorpos analisados. O bacteriófago PEG purificado correspondente foi utilizado como controlo positivo (*última linha*). O gene anticorpo anti-SP2 irrelevante de origem conhecida, escolhido anteriormente da biblioteca scFvEC23 derivado de PBL, também foi testado. O anticorpo anti-MUC1 MB5 e o anticorpo anti-CEA CB37 foram seleccionados a partir da mistura de bibliotecas derivadas TIL. Os anticorpos mix 11, mix 12, mix 17 e mix 39 foram seleccionados a partir da mistura de bibliotecas derivadas de TIL e derivadas de PBL. Os anticorpos são definidos na Tabela 5.

Figura 21. Coloração fluorescente do carcinoma da mama MCF7 não-permeabilizado e células do epitélio da mama normal MCF10-2A fixadas pelos anticorpos de demonstração de bacteriófagos scFv (mix17 (A), mix7 (B)).

Figura 22. A. Coloração fluorescente de células do carcinoma mamário MCF7, antígenos tumorais SKBr3 expressando MUC1 e células do epitélio mamário normal MCF10-2A, utilizando anticorpo de demonstração de bacteriófago anti-MUC1 MB5 scFv; B. Coloração de células de adenocarcinoma colo-rectal LoVo expressando CEA por anticorpo de demonstração de bacteriófago anti-CEA CB37 scFv. A coloração das células de controlo negativo MCF10-2A é incluída. Os exemplos a seguir ilustram a invenção.

Exemplo 1: Construção do novo vector fasmídeo pKM19 para exibição de anticorpos de cadeia única em bacteriófagos filamentosos.

Introdução

Este trabalho descreve a construção de um novo vector fasmídeo pKM19 para a exibição de anticorpos de cadeia única em bacteriófagos filamentosos. Esse vector é caracterizado por várias diferenças em relação aos sistemas canónicos.

a) Códon Âmbar

Os fasmídeos clássicos contêm um códon âmbar entre os genes *scFv* e *gpIII*, direccionando a produção de scFvs livres e fusão de anticorpos scFv-pIII em supressor de bactérias, tais como TG1, ou DH5 α F', ou XL1-Blue, geralmente utilizados para amplificação de bacteriófagos. Essas estirpes bacterianas, levando a mutação *SupE*, são

supressoras de glutamina inserida com a eficiência de supressão dependente do códon após o TAG (J. Mol. Biol. 1983 164 (1):59-71; Mol. Gen. Genet. 1987 207 (2-3):517-518). Em tal sistema, a produção de anticorpos scFv livres solúveis é segregada no périplasma e depois vazada do périplasma para o meio. Nos termos do protocolo padrão da purificação de bacteriófago por PEG/NaCl, os anticorpos livres scFv são co-precipitados com partículas de bacteriófago. Como resultado, a concentração de anticorpos livres em suspensão de bacteriófago pode ser cinco a dez vezes maior que a concentração de proteínas de fusão scFv-PIII montadas na partícula do bacteriófago. Numa selecção posterior, os anticorpos livres abundantes competem com os anticorpos de demonstração de bacteriófagos para uma vinculação alvo. Isto interfere com a eficiência da digitalização e retarda o processo de selecção, especialmente:

- i) quando a concentração de antígeno é limitada (por exemplo bio-digitalização em células vivas, células ex-vivo),
- ii) nas rondas tardias de digitalização, onde a concentração de um bacteriófago específico é relativamente elevada, ou
- iii) em bibliotecas de maturação, que contêm muitos anticorpos relativos com a mesma especificidade.

Portanto os fasmídeos clássicos precisam ser modificados para uma selecção melhorada e/ou maturação dos anticorpos.

Como esperado a partir de dados da literatura, a presença de um códon âmbar posicionado numa sequência de codificação para um peptídeo líder de fosfatase alcalina em pKM19, leva a um nível relativamente baixo de expressão de anticorpos recombinantes em bactérias supressoras de âmbar abrigando este plasmídeo.

Foi mostrado (Gene 1999 228:23-31) que a inibição do promotor lac apenas por repressão catabólica com a glicose não é suficiente para equilibrar as taxas de crescimento dos diferentes clones, com ou sem códons de parada. A menor expressão de scFv conseguida usando pKM19, reduz a toxicidade dos anticorpos recombinantes para o hospedeiro bacteriano e não tem qualquer influência sobre a eficácia da exibição.

Usando pKM 19 os autores demonstraram:

(i) que o actual nível de expressão do anticorpo é suficiente para produzir anticorpos bacteriófagos altamente reactivos, dando um sinal semelhante no teste de ELISA em comparação com o bacteriófago pKM18 sem códon âmbar;

(ii) que os anticorpos específicos podem ser facilmente isolados de uma biblioteca scFv construída a partir de linfócitos do sangue periférico de um paciente com anticorpos contra uma proteína alvo depois de apenas duas rondas de selecção;

(iii) que a maturação do anticorpo anti-CEA leva ao isolamento dos clones melhorados scFv sem códons de parada, em comparação com a maturação realizada por meio de vectores canónicos (BMC Cancer 2006 06:41).

b) Proteína do gene III

O vector pKM19 permite a clonagem de fragmentos scFv como a fusão amino terminal da proteína do gene suprimido III.

Comummente utilizados os vectores de demonstração de bacteriófagos levam à incorporação das partículas do bacteriófago no pIII completo fundido com o fragmento de anticorpo (em Antibody Engineering - A practical approach: McCafferty, J. Hoogenboom, H. & Chiswell D., eds, pp.325,

Oxford University Press, 1996), enquanto que no caso do plasmídeo pComb3 utilizado para exibir Fab (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991 88 (18):7978-7982), o fragmento de anticorpo é fundido à metade carboxi terminal do pIII. A infecciosidade desses bacteriófagos recombinantes é obtida durante a sua propagação, uma vez que a super-infecção com um bacteriófago auxiliar fornece a proteína do gene nativo III.

De acordo com os dados actuais, a fusão de anticorpo de cadeia única com a parte C-terminal de pIII melhora a produção e a eficiência da demonstração dos bacteriófagos de um anticorpo em comparação com o peso da proteína de fusão pIII. Esses dados estão de acordo com dados anteriores do Kretzschmar (Gene 1995 155 (1):61-65). A eficiência melhorada da demonstração em combinação com a eliminação de anticorpos scFv a partir da mistura de incubação facilita a selecção de afinidade e resulta em enriquecimento rápido dos tanques do bacteriófago para clones específicos. Isso também pode contribuir para a redução dos códons de parada em clones seleccionados uma vez que um menor número de rondas de digitalização/amplificação são necessárias para completar a selecção. O crescimento rápido de clones defeituosos tem menores hipóteses de ser isolado.

c) Peptídeo líder PhoA

Em bactérias abrigando o vector pKM19, após a síntese de proteínas recombinantes, o peptídeo líder PhoA é clivado pela peptidase líder em translocação de membrana, e o scFv-pIII é instalado na partícula bacteriófago. Desta forma, o sítio de clivagem total da fosfatase alcalina, uma proteína periplásmica verdadeira de *E. coli*, é preservado para garantir o processamento eficiente e correcto e a instalação dos anticorpos. Como resultado, a proteína madura contém dois aminoácidos adicionais na extremidade N-terminal de scFv. No sistema descrito, é necessário

reclonar o gene do anticorpo no plasmídeo adequado para a posterior produção de anticorpos solúveis. Nesta fase, os aminoácidos adicionais podem ser conservados ou eliminados de acordo com requisitos específicos.

Em conclusão, a combinação da expressão relativamente baixa dos anticorpos exibidos pela introdução do códon âmbar antes do gene do anticorpo com eficiência de demonstração melhorada torna o novo plasmídeo pKM19 útil tanto para a selecção dos anticorpos scFv recombinantes contra os alvos desejados a partir de grandes bibliotecas, como para a sua maturação de afinidade. O plasmídeo garante eficiente demonstração e permite a redução do preconceito biológico contra anticorpos "difíceis" na etapa delicada de selecção inicial. Além disso, este vector é particularmente útil para a maturação de afinidade dos anticorpos, uma vez que os níveis de expressão elevada podem aumentar a avidéz de partículas bacteriófagos exibindo Ab, levando à selecção de anticorpos com apenas afinidade modesta.

Métodos

Estirpes de bactérias e bacteriófagos

A estirpe bacteriana DH5 α F' (*supE44* Δ *lac* U169 (ϕ 80 *lacZ* Δ M15) *hsdR* 17 *recA1* *endA* *gyrA96* *thi-1* *relA1* F'[*traD36* *ProAB*⁺ *LacI*^q *lacZ* Δ M15]) foi utilizada para a produção de anticorpos bacteriófagos e solúveis. O bacteriófago auxiliar M13 KO7 (Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989) foi utilizado para a preparação de bacteriófagos.

O anticorpo bacteriófago anti-CEA, MA39 (BMC Cancer 2006 6: 41), em plasmídeo pDN322 (J. Biol. Chem. 1998 273 (34): 21769-21776) foi utilizado como fonte de gene do anticorpo anti-CEA.

Construção de plasmídeos

O plasmídeo pC89 (J. Mol. Biol. 1991 222 (2):301-310) foi amplificado por PCR inversa com os oligonucleotídeos KM161, KM162, contendo os sítios *Hind* III e *Not*I (sublinhado) (KM161 5'-GAGG AAGCTT CCATTAAACGGGTAAAATAC-3' (SEQ ID 78); KM162 5'-TGCAATG GCGGCCGC TAATATTGTTCTGGATATTACCAGC-3' [SEQ ID 79]). Na PCR inversa foi utilizada uma mistura de polimerase Taq polimerase com *Pfu* ADN para aumentar a fidelidade da síntese de ADN. Foram feitos vinte e cinco ciclos de amplificação (95°C-30s, 55°C-30s, 72°C-20min). O produto da PCR foi digerido com endonucleases *Hind* III e *Not*I e ligado com um oligonucleotídeo duplo KM163 KM164 codificando o peptídeo FLAG e a cauda His (KM163 5'-AGCTTCCTC ATG TAG GCG GCC GCA GGA GAC TAC AAA GAC GAC GAC GAC AAA CAC CAC CAT CAC CAC CAT TAA-3' [SEQ ID.80]; KM164 ATT 5'-GGCC TTA ATG GTG GTG ATG GTG TTT GTC GTC GTC GTC TTT GTA GTC TCC TGC GGC CGC CTA CAT GAGGA-3' [SEQ ID 81]). O duplex de ADN clonado continha um sítio *Not*I interno, a montante da sequência de codificação do peptídeo FLAG, enquanto o sítio *Not*I, usado para clonagem do duplex, não foi restaurado. O plasmídeo pKM15 resultante foi recém digerido com *Hind*III, endonucleases *Not*I e ligado com o duplex KM175 KM176 codificando a sequência líder e os dois primeiros aminoácidos da proteína bacteriana PhoA, contendo o sítio de clonagem *Nco*I (KM175 5'-AGC TTA TAA AGG AGG AAA TCC TCA TGA AAC AGA GCA CCA TCG CAC TGG CAC TGT TAC CGT TAC TGT TCA CCC CGG TTA CCA AAG CAC GTA CCA TGG TTT CCC TTGC-3' [SEQ ID 82]; KM176 5'-GGC CGC AAG GGA AAC GGT CAT GGT ACG TGC TTT GGT AAC CGG GGT AAC CGG GGT GAA CAG TAA CGG TAA CAG GGT TGC CAG TGC GGT GCT TTT CAT GAG GAT TTC CTC CTT TATA-3' [SEQ ID 83]). Este plasmídeo pKM16 novo foi destinado para a produção de anticorpos de cadeia única solúveis (Figura 1).

O plasmídio pKM16 foi amplificado por PCR inversa com os oligonucleotídeos KM181, KM182, apresentando os sítios de restrição *EcoRI* e *BamHI*, respectivamente (KM181 5'-GTG GTG ATG GAA TTC TTT GTC GTC GTC GTC TTT GTA GTC-3'[SEQ ID 84]; KM182 5'-CAC CAT TAA GGA TCC TAA TAT TGT TCT GGA TAT TAC CAG C-3'[SEQ ID 85]). O gene III de comprimento total (Número de Adesão V00604) e a parte 3' do gene que codifica o último 197 aa do pIII foram amplificados usando os oligonucleotídeos KM183, KM185, KM184, KM185 contendo os sítios *BamHI* e *EcoRI* (sublinhado) e ligados em pKM16 digerido, dando os novos plasmídeos pKM17 e pKM18, respectivamente (KM183 5'-TC TAT TCT GAA TTC GCT GAA ACT GTT GAA AGT TGT TTA GC-3'[SEQ ID 86]; KM184 5'-GC CAA TCG GAA TTC CTG CCT CAA CCT CCT GTG AAT GCT-3'[SEQ ID 87]; KM185 5'- GAA CTG GGA TCC TTA AGA CTC CTT ATT ACG CAG TAT G-3' [SEQ ID 88]).

Um pequeno fragmento do plasmídeo pKM18 codificando a sequência líder foi amplificado por PCR com os iniciadores KM186-KM180, introduzindo uma mutação âmbar no gene do peptídeo líder PhoA (KM186 5'-ACC CGT AAG CTT ATA AAG GAG GAA ATC CTC ATG AAA TAG AGC ACC ATC GC-3'[SEQ ID 89]; KM180 5'-TAG CCC CCT TAT TAG CGT TTG-3' [SEQ ID 90]). O produto da PCR resultante foi digerido com *HinIII* e *NotI* e clonado em pKM18, digerido com *HindIII* e *NotI* e purificado a partir de agarose, para a construção do plasmídeo pKM19.

Produção de anticorpos solúveis

Uma única colônia foi inoculada em 50 mL de LB contendo 100 µg/mL Ap e 2% de glicose. A cultura foi realizada a 37°C por 2-3 horas até DO=0,8. As células recuperadas por centrifugação, foram ressuspensas em 50 mL de LB com Ap e 1 mM IPTG e incubadas durante a noite a 30-32°C. O sedimento celular foi ressuspenso em 500 µL de PBS. Após três ciclos de congelamento e descongelamento, os restos

celulares foram pelotizadas por centrifugação. O sobrenadante resultante foi utilizado para ELISA ou Western Blot.

Purificação de linfócitos do sangue periférico e síntese do ADN

Os linfócitos foram isolados a partir de 10 mL de sangue periférico fresco da paciente EC23 (com estágio avançado de cancro da mama), com um anticoagulante usando Ficoll-Paque Plus (Amersham Pharmacia Biotech, Suécia), de acordo com as instruções do fabricante. O mRNA foi isolado dos linfócitos usando o Kit Dynabeads mRNA DIRECT (Dynal, Noruega). O mRNA foi isolado dos linfócitos usando o Kit Dynabeads mRNA DIRECT (Dynal, Oslo, Noruega). Um µg de ARN poli (A)⁺ dos linfócitos foi usado para sintetizar o cADN completo usando o Kit SMART cADN Library Construction (Clontech, Palo Alto, CA).

Construção da biblioteca ScFv

O repertório de anticorpos do gene foi amplificado utilizando um conjunto de iniciadores concebidos para a amplificação dos domínios de anticorpos VH e VL, enquanto os fragmentos scFv inteiros foram instalados *in vitro* como foi descrito em [Pope, AR, Embleton, MJ & Mernaugh R. (1996) Construction and use of antibody gene repertoires. Em: Antibody Engineering - A practical approach (McCafferty, J. Hoogenboom, H. & Chiswell D., eds), pp.325, Oxford University Press]. Os últimos foram amplificados por PCR com iniciadores de extensão apropriados, incorporando os sítios de restrição NcoI, NotI, e permitindo a clonagem de genes scFv num vector pKM19. Os produtos resultantes da PCR foram purificados em 1% de gel de agarose de baixo ponto de fusão (NuSieve 3:1 agarose, Rockland, ME), cortados com NcoI/NotI e inseridos num plasmídeo digerido.

A biblioteca transformada scFvEC23 contendo 1.77×10^7 clones independentes, com inserto de scFv de comprimento total. A biblioteca scFvEC23 deriva da PBL obtida a partir de um único paciente EC23 com estágio avançado de cancro da mama.

Construção de biblioteca de mutantes anti-CEA scFv

A biblioteca de maturação para o anti-CEA scFv foi construída como descrito anteriormente (BMC Cancer 2006 06:41). Resumidamente, os fragmentos de genes mutados scFv foram gerados por PCR com os iniciadores: KM144-KM143 (KM143, 5'-GTCATCGTCGGAATCGTCATCTGC-3' [SEQ ID 91]; KM144, 5'-TGTGCGAAAAGTAATGAGTTTCTT TTTGACTACTGGGGC-3' [SEQ ID 92]) e KM148-KM145 (KM148, 5'-CTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGA-3' [SEQ ID 93]; KM145, 5'-TCCGCCGAATACCAC ATAGGGCAACCACGGATAAGAGGAGTT ACAGTAATAGT CAGCC-3' [SEQ ID 94]), que introduz mutações aleatórias nas regiões CDR3 de cadeias leves ou pesadas com baixa frequência. Cada sublinhado base de oligonucleotídeos KM144 e KM145 foi substituído com uma mistura de G/A/T/C com uma frequência de 10%. As partes dos genes de anticorpos scFv em falta foram amplificadas com iniciadores KM148-KM157 e KM158-KM143 para o HC e CL, respectivamente (KM157 5'-TTT CGC ACA GTA ATA TAC GG-3' [SEQ ID 95]; KM158 5'- TAT GTG GTA TTC GGC GGA-3' [SEQ ID 96]). A fim de reconstruir todo o gene, os fragmentos correspondentes foram combinados e ampliados num processo de PCR semelhante sem oligonucleotídeos. O produto resultante foi utilizado para amplificar o gene inteiro com iniciadores externos KM148, KM143. O fragmento de ADN de agarose final foi purificado, digerido com enzimas de restrição NcoI e NotI, e ligado com o plasmídeo pKM19 digerido. A biblioteca resultante continha 2.2×10^6 clones mutantes de anticorpos.

Concorrência com scFv solúveis

Placas de ELISA foram revestidas, bloqueadas e lavadas como descrito acima. Diversas quantidades de anticorpos solúveis anti-CEA MA39 (BMC Cancer 2006 6: 41) em 100 µL de tampão de bloqueio foram adicionadas aos poços e incubadas por 30 min a 37°C. Então, 10 µL (4.5×10^9 TU) do bacteriófago sobrenadante MA39 ou 5 µL (3×10^8 TU) de sobrenadante anti-CEA/pKM19 foram adicionados aos poços e incubados por mais 1 h, a 37°C. As placas foram lavadas e os bacteriófagos ligados detectados por um anticorpo conjugado anti-M13 HRP. Um scFv anti-SP2 solúvel irrelevante (Tabela 5), foi utilizado numa concentração elevada (400 ng/poço) como controlo negativo. Uma menor quantidade de bacteriófagos anti-CEA/pKM19, em comparação com MA39, foi utilizado para a reactividade moderada de ELISA deste bacteriófago.

No caso da concorrência com os filtrados do sobrenadante do bacteriófago, 10 µL ou 50 µL de filtrados MA39 ou pKM19/anti-CEA em 100 µL de tampão de bloqueio foram utilizados como concorrentes. Os bacteriófagos filtrados foram obtidos a partir de preparações do sobrenadante do bacteriófago frescas usando uma coluna de filtração Microcon 100.

Western blot de bacteriófagos PEG purificados

O bacteriófago foi purificado de acordo com o padrão de precipitação PEG/NaCl (J Sambrook, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989). Os extractos de proteína de amostras de bacteriófagos foram fraccionados por SDS-PAGE e transferidos para uma membrana de nitrocelulose. As faixas da membrana foram desenvolvidas com um anticorpo conjugado anti-FLAG AP.

Bacteriófago ELISA

Placas multi-poços (Immunoplate Maxisorb, Nunc, Roskilde, Dinamarca) foram revestidas a 4°C com uma solução de proteína na concentração de 10 mg/mL em 50 mM de NaHCO₃, pH 9.6. Após descartar a solução de revestimento, as placas foram bloqueadas por 1 hora a 37°C com tampão de bloqueio ELISA (5% de leite seco magro, 0,05% Tween-20 em PBS). As placas foram lavadas várias vezes com tampão de lavagem (0,05% Tween-20 em PBS). O bacteriófago PEG purificado num tampão de bloqueio (1:1) foi adicionado a cada poço e incubado por 1 hora a 37°C. As placas foram lavadas e o bacteriófago ligado foi detectado por um anticorpo secundário conjugado anti-M13 HRP (27-9421-01, Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia), ou anti-FLAG HRP (A9044, Sigma, St. Louis, MO), ou anti-FLAG AP (A9469, Sigma). No caso dos conjugados PRH, a imunorreatividade foi desenvolvida pela incubação com substrato líquido TMB (Sigma) por 15 min e interrompida pela adição de 25 µL 2 M H₂SO₄. Os resultados foram expressos como a diferença entre as absorbâncias a 450 e 620 nm, determinadas por um leitor ELISA automático. O conjugado de anticorpo AP foi detectado através da incubação com 1 mg/mL de solução de fosfato de *p*-nitrofenil em tampão substrato (10% de tampão de dietanolamina, 0,5 mM MgCl₂, pH 9,8) por 60 min. Os resultados foram expressos como a diferença entre as absorbâncias a 405 e 620 nm.

Os anticorpos são definidos na tabela 5.

Resultados

O plasmídeo pKM16 (Figura 1) utilizado para a produção de anticorpos solúveis na configuração scFv é construído como descrito acima. Este plasmídeo dirige a expressão da proteína sob o controlo do promotor *lacP*. Os sítios de

clonagem *NcoI* e *NotI* únicos permitem a inserção de um gene de anticorpo capaz de expressar anticorpos de cadeia única, com um peptídeo líder da enzima bacteriana periplásmica, fosfatase alcalina (AP), e com os dois primeiros aminoácidos da proteína madura AP, em amino-terminal do anticorpo; e FLAG/His no carboxiterminal do anticorpo. A fim de confirmar as qualidades práticas do plasmídeo, um gene de um anticorpo de cadeia única de especificidade conhecida, o anti-CEA MA39, foi amplificado por PCR e clonado no vector pKM16. Os autores analisaram então o congelamento e descongelamento de proteínas purificadas periplásmicas em Western blot desenvolvido com um anticorpo secundário anti-FLAG (Figura 3). As bandas de anticorpos de cadeia única migrados como proteínas com peso molecular esperado. A sequência de proteínas N-terminal por degradação de Edman confirma o processamento correcto do peptídeo líder.

Fasmídeos para exibição de anticorpos scFv

Um fasmídeo clássico (pDN322) exibindo o anticorpo anti-CEA de cadeia simples, MA39, foi comparado com vectores pKM17, pKM18 e pKM19 exibindo o mesmo anticorpo, para a produção de partículas bacteriófagas e demonstração de eficiência. Os plasmídeos pKM17 e pKM18 (Figura 1) permitem a visualização de fragmentos de anticorpos numa partícula de bacteriófagos por fusão, respectivamente, o pIII inteiro (1-406 aa) ou apenas o domínio carboxi terminal (210-406 aa) da proteína. O plasmídeo pKM19, derivado do pKM18, abriga um códon âmbar na sequência líder, levando à menor produção de proteínas de fusão scFv-pIII, em comparação com pKM18. Isto está de acordo com os dados mostrando que em bactérias *supE*, a eficiência da supressão deste códon TAG, que depende do contexto de nucleotídeos, é de cerca de 10-15% (J. Mol. Biol. 1983 164 (1):59-71; Mol. Gen. Genet. 1987 207 (2-3):517-518).

Os autores realizaram testes funcionais através da clonagem do gene do anticorpo anti-CEA de cadeia simples em três novos plasmídeos e confrontaram-nos com o clone MA39 original (anti-CEA em pDN322).

Três colónias isoladas para cada clone foram incubadas em 10 mL de meio e o bacteriófago foi ampliada, conforme descrito no Exemplo 2. Após o resgate do fasmídeo phagemid os sobrenadantes foram titulados. Os autores obtiveram uma faixa entre 5 a 1×10^{11} TU/mL para MA39, pKM18 e pKM19, exibindo o anticorpo anti-CEA, enquanto o anti-CEA/pKM17 gerou cinco a dez vezes títulos mais baixos (Tabela 1).

Tabela 1. Produção de bacteriófagos por diferentes vectores fasmídeos codificando o mesmo gene anti-CEA

Bacteriófago	Clone	Título	Bacteriófago	Clone	Título
MA39	1	1.5×10^{11}	anti-CEA/pKM18	1	2.52×10^{11}
	2	2.55×10^{11}		2	2.5×10^{11}
	3	5.1×10^{11}		3	1.75×10^{11}
anti-CEA/pKM17	1	6×10^{10}	anti-CEA/pKM19	1	3×10^{11}
	2	4.1×10^{10}		2	1.8×10^{11}
	3	1.95×10^{10}		3	2.8×10^{11}

As preparações bacteriófagas foram testadas em ELISA, onde o desenvolvimento foi realizado utilizando o anti-M13, ou, alternativamente, o anticorpo secundário anti-FLAG. Aplicando quantidades diferentes dos bacteriófagos por poço ELISA, os autores demonstraram uma maior eficiência de exibição para os bacteriófagos pKM18 e pKM19 em comparação com pKM17 e muito maior quando comparado ao MA39 (Figura 4). É interessante notar que o clone MA39, que produz um nível mais elevado de anticorpos do que anti-CEA/pKM17, como mostrado pelo desenvolvimento, com o anticorpo anti-FLAG (Figura 4B), tem um sinal mais fraco quando o ELISA é desenvolvido com o anticorpo secundário anti-M13 (Figura 4A).

Isso indica que os scFvs livres, produzidos pelo sistema de fasmídeo clássico, vazam para o meio e co-precipitam

partículas de bacteriófago, consequentemente competindo com os anticorpos de demonstração de bacteriófagos para o alvo vinculativo. Este fenómeno é devido à presença de um códon âmbar entre os genes scFv e pIII.

A fim de diversificar essa hipótese, os autores filtraram preparações frescas de MA39 e bacteriófago anti-CEA/pKM19 usando o filtro de centrifugação Microcon 100 (Millipore Corporation, Bedford, MA), capaz de reter as partículas bacteriófagas grandes e passar o scFvs solúvel. O teste de ELISA de preparações bacteriófagas, antes e depois da filtração, desenvolvido com anticorpos anti-M13 ou anti-FLAG, mostra que:

- (i) filtrados de ambos MA39 e pKM19 praticamente perderam os anticorpos exibidos nas partículas do bacteriófago, como esperado;
- (ii) os anticorpos livres estão presentes em ambas as preparações (Figura 5).

No entanto, o nível de anticorpos livres na amostra anti-CEA/pKM19 é significativamente menor. Os anticorpos livres na amostra são o resultado de queda de anticorpos, inevitável durante a preparação do bacteriófago e que poderia aumentar como resultado do contacto com os componentes do sistema de filtração; enquanto os anticorpos livres em amostras MA39 são o resultado da expressão do anticorpo livre e infiltrações no meio juntamente com o derramamento.

Para testar a capacidade competitiva dos anticorpos livres no sobrenadante bacteriófago tivemos os sobrenadantes bacteriófagos MA39 e anti-CEA/pKM19 fagos a competir quer com o anticorpo solúvel anti-CEA de concentração conhecida (Figura 6) ou com diferentes quantidades de sobrenadantes filtrados de ambos os bacteriófagos (Figura 7). Estas duas experiências mostram que os scFvs livres competem

eficientemente com os anticorpos do bacteriófago. Dez µL do filtrado MA39 já concorre com 10 µL do seu próprio sobrenadante bacteriófago e 5 µL de sobrenadante anti-CEA/pKM19, enquanto a mesma quantidade de anti-CEA/pKM19 filtrado não tem efeito. Concorrência marcada é observada apenas por um excesso de dez vezes de filtrado anti-CEA/pKM19 com o mesmo sobrenadante bacteriófago (50 µL do filtrado para 5 µL do sobrenadante). A análise Western blot (Figura 8) de vários bacteriófagos purificados PEG desenvolvidos com um anticorpo anti-FLAG detectou: (i) a banda superior de cada amostra correspondente à fusão scFv-pIII em caso de MA39 e bacteriófagos anti-CEA/pKM17 e scFv-ΔpIII em caso de anti-CEA/pKM18 ou anti-CEA/pKM19; (ii) uma presença notável de anticorpos livres na amostra MA39; (iii) a presença de produtos de degradação nas amostras de bacteriófagos como descrito anteriormente (Gene 1995 155 (1):61-65).

Geração de biblioteca de demonstração de anticorpos scFv e isolamento das especificidades de ligação usando o novo plasmídeo pKM19

O plasmídeo pKM19, um derivado de pKM18, abrigando o códon âmbar na sequência líder foi utilizado para a geração de bibliotecas scFv para estudar se a baixa produção de anticorpos fundidos permite uma selecção eficiente de um anticorpo específico contra uma molécula-alvo.

Uma biblioteca de anticorpos scFv foi construída a partir de linfócitos do sangue periférico humano, tal como descrito em Materiais e Métodos. A biblioteca foi seleccionada contra a fusão GST do polipeptídeo SP2 168 aa-longas de *Streptococcus pneumoniae* (FEMS Microbiol. Lett. 2006 262 (1):14-21), que foi reactiva com a amostra de sangue utilizada para a construção da biblioteca scFv.

Um processo de selecção foi concebido para criar uma elevada concentração da proteína-alvo em pequeno volume de incubação, com proteínas biotiniladas para digitalizar e revestir estreptavidina Dynabeads para o isolamento de bacteriófagos ligados, como descrito no Exemplo 2. Após a conclusão dos dois turnos de digitalização, foi testada a reactividade dos tanques do bacteriófago no teste de ELISA (Figura 9). O tanque de bacteriófagos, após a segunda ronda de selecção de afinidade, foi altamente reactivo com a proteína de fusão e negativo com as proteínas irrelevantes, como GST, leite e estreptavidina, que apresentou como proteína transportadora ou componentes do sistema de selecção e todas utilizadas como controlos negativos no teste de ELISA, indicando selecção sucessiva de anticorpos específicos.

Finalmente, os autores isolaram e sequenciaram um número de clones positivos para confirmar a sequência scFv correcta. Um dos genes identificados *scFv* foi clonado em pKM16 para a produção de anticorpos anti-SP2 solúveis (Tabela 5), que foi usado como um controlo de anticorpo irrelevante em experiências descritas nas Figuras 6, 11 e 12.

Maturação do anticorpo anti-CEA scFv usando o vector pKM19

A selecção de afinidade de uma biblioteca de maturação foi realizada conforme descrito em BMC Cancer 2006 06:41. A Figura 10 mostra que a reactividade do bacteriófago contra a proteína CEA cresce a cada ronda de selecção sucessiva. Os clones bacteriófagos únicos com reactividade melhorada foram isolados (Figura 10). Os autores sequenciaram 19 clones aleatórios a partir do tanque de bacteriófagos após a segunda ronda de selecção. Nenhum dos clones sequenciados do tanque de bacterió tendo afinidade aumentada (0 de 19) apresentou códons de parada na sua sequência, enquanto 70% (9 de 13) dos clones do sistema de fasmídeos clássico continha tais mutações ($P=0,00002$, calculada de acordo com o teste qui quadrado). Assim, o uso do vector pKM19 para a

maturação de um anticorpo anti-CEA melhora significativamente os resultados da selecção.

Dois genes de anticorpo isolados da biblioteca de maturação (clones 1 e 2), foram clonados em pKM16 e anticorpos solúveis foram produzidos e comparados com o original anti-CEA MA39 solúvel e o anticorpo E8 maturado obtido com fasmídeo canónico (Pavoni et al. 2006). A Figura 11 confirma a maior afinidade dos anticorpos maturados.

O teste de especificidade, em scFvs recém seleccionados mostra a sua baixa reactividade com proteínas irrelevantes, comparável com a do anticorpo original (Figura 12).

EXEMPLO 2: Construção das bibliotecas derivadas da selecção de anticorpos e TIL

Introdução

A identificação dos anticorpos recombinantes específicos do tumor a partir de bibliotecas de exibição derivadas de gânglios linfáticos de pacientes com cancro é descrita em [Clin. Exp. Immunol. 1997 109 (1):166-74; Int. J. Mol. Med. 2004 14 (4):729-35; World J. Gastroenterol. 2004 10 (18):2619-23].

Sabe-se que cerca de 7% dos nódulos linfáticos derivados, e entre 18-68% das sequências de anticorpos de cadeia pesada TIL derivados pertencem a grupos clonais (Cancer Immunol. Immunother. 2003 52 (12):715-738). Isso indica que os nódulos linfáticos de drenagem do tumor e os linfócitos infiltrantes do tumor são promissoras fontes de anticorpos específicos do tumor. Os autores mostraram, através de

amplificação por PCR de regiões específicas do gene de anticorpos decorrentes de dez tumores primários da mama (nenhum sendo do tipo histológico raro MBC) de pacientes com idade entre 49-79 anos, que 7 de 10 dessas amostras (70%) têm um destaque de expressão de anticorpos IgG, comparado com a subclasse IgA, que se correlaciona com a oligoclonalidade da região hiper-variável de anticorpos de cadeia pesada, sugerindo uma resposta imune específica para antígenos de tumor expressos. A clonalidade de anticorpos derivados do tumor foi confirmada pela sequenciação.

Os autores identificaram um painel de anticorpos específicos do tumor de bibliotecas descritas que foram reactivas com o domínio ED-B, células do carcinoma mamário MUC1, CEA e MCF7 usadas nas selecções respectivas. É interessante que na selecção baseada em células sem a etapa de digitalização subtractiva no epitélio mamário normal, em contraste com os inúmeros protocolos de selecção descritos anteriormente [Int J Mol Med. 2004 14 (4):729-35; World J Gastroenterol. 2004 10 (18):2619-23; Int J Oncol. 2000 16 (1):187-95; Cancer Res. 1999 59 (11):2718-23; Biochem Biophys Commun Res. 2001 280 (2):548-52], os autores isolaram apenas um scFv de 10 que não foi de um tumor específico e epitélio mamário normal, assim reconhecido. Isso provavelmente indica que as nossas bibliotecas de porte modesto contêm um muito restrito repertório de anticorpos de ocorrência natural fornecidos por TIL-B, ao invés de um vasto repertório de anticorpos criado pela mistura da cadeia de anticorpo. Além disso, a selecção de anticorpos a partir de uma mistura de PBL e bibliotecas derivadas TIL mostra claramente que as bibliotecas desta última são mais eficientes em células baseadas em digitalização. Na verdade, todos os anticorpos de cadeia única isolados anti-MCF7 parecem ser derivados de linfócitos infiltrantes do tumor. Em resumo, as bibliotecas TIL derivadas deram bons resultados em todas as selecções realizadas, fornecendo um painel de anticorpos humanos específicos do tumor, que reconhecem os antígenos do tumor da superfície celular úteis para a terapia e diagnóstico do cancro.

Neste estudo, demonstrou-se que a aplicação de novos vectores pKM19 bacteriófagos de demonstração melhorados levou ao isolamento de um grande painel de anticorpos derivados de pedaços de tecido do tumor removido na cirurgia do tumor, contra antígenos de tumor e células tumorais inteiras conhecidas, e que são potencialmente úteis na terapia do cancro. Estes resultados são semelhantes aos resultados obtidos pela selecção directa de bibliotecas de expressão TIL derivadas de anticorpos solúveis (Cancer Immunol. Immunother. 2002 51 (2):79-90). A selecção directa é uma estratégia de rastreio imparcial que não depende das etapas de amplificação do bacteriófago e resulta mais eficiente em relação à selecção de afinidade realizada com vectores de exibição canónica, que falharam na selecção de anticorpos específicos do tumor em trabalhos similares (Cancer Res. 2001 61 (21):7889-99; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2001 98 (22):12659-64; Int. J. Cancer 2001 93:832-40). Os nossos resultados indicam que o vector pKM19 melhora os resultados da selecção, em comparação com os vectores de exibição clássicos e, ao mesmo tempo, fornece a possibilidade de aplicar metodologias de selecção de afinidade, facilitando a manipulação de grandes bibliotecas.

Em conclusão, os nossos resultados indicam que respostas imunes que ocorrem naturalmente a antígenos tumorais relacionados existem na maioria dos pacientes com cancro da mama, não só no MCB histologicamente definido. Amostras do tumor tão pequenas quanto 0,2 g obtidas como material cirúrgico, podem ser exploradas como uma fonte adequada para a geração de bibliotecas de demonstração de bacteriófagos recombinantes enriquecidos para a detecção de anticorpos específicos do tumor: Isolamento de um painel de scFvs antitumoral através da selecção contra alvos da proteína desejada, bem como contra células vivas do carcinoma da mama, mostram que esta abordagem será muito promissora para o desenvolvimento de anticorpos terapêuticos humanos. Além disso, a investigação da proteína alvo provocando a produção de anticorpos específicos de células tumorais num micro-ambiente do tumor pode (i) fornecer detalhes importantes sobre a imunoreactividade individual de um dado paciente,

oferecendo um prognóstico valioso; (ii) abrir uma perspectiva ampla para a descoberta de novos antígenos específicos do tumor.

Métodos

Tecidos e amostras de sangue

As amostras de carcinoma de mama e sangue periférico fresco de pacientes de cancro da mama (B81-B96, EC23) foram obtidos a partir M.G. Vannini Hospital, Roma. Todas as amostras biológicas humanas foram obtidas mediante consentimento informado.

Linhas celulares

As linhas celulares de carcinoma da mama MCF-7 (Número ATCC: HTB-22), MDA-MB-468 (Número ATCC: HTB-132) e SKBr3 (Número ATCC: HTB-30), e linhas celulares do adenocarcinoma do cólon LoVo (Número ATCC: CCL-229) foram mantidas de acordo com as instruções do fabricante. Os fibroblastos do prepúcio humano (HFF) foram cultivados em DMEM suplementado com 10% de FSB e 1% de L-glutamina. Células epiteliais da mama imortais MCF10-2A (número ATCC CRL-10781) [Cancer Res. 1990 50 (18):6075-86] foram propagadas de acordo com as instruções do fabricante, e usadas como controlo negativo em testes ELISA.

Proteínas do antígeno do tumor purificadas

Proteína CEA humana, purificada a partir de metástases de carcinoma do cólon e do fígado, foi adquirida da USBiological (#C1300-16, United States Biological, Swampscott, MA).

O domínio recombinante biotinilatado ED-B de fibronectina foi obtido da Sigma-Tau SpA (Pomezia, Roma).

A proteína recombinante MUC1 foi obtida em várias etapas. Dois oligonucleotídeos sobrepostos KM358 5'-ACT TCA GCT CCG GAC ACC CGT CCG GCT CCG GGT TCC ACC GCT CCG CCG GCT CAC GGT GTC-3'[SEQ ID 97] e KM359 5'-CGG AGC CGG ACG GGT GTC CGG AGC TGA AGT GAC ACC GTG AGC CGG CGG AGC GGT GGA ACC-3'[SEQ ID 98] codificados para 20-aa MUC1 repetido, foram montados em processo semelhante a PCR, em que 25 ciclos de amplificação PCR foram realizados com 0,2 pM/μl de KM358 e KM359. A banda de ADN de peso elevado foi, então, cortada de gel de agarose e ligada com um adaptador curto, obtido por tratamento térmico de um oligonucleotídeo KM328 5'-CT AGT TCG TCG GGT TCG TCG GGA-3'[SEQ ID 99] e um fosforilatado: KM329 5'-TCC CGA CGA ACC CGA CGA A-3'[SEQ ID 100]. O fragmento de ADN resultante foi purificado a partir de excesso do adaptador, fosforilado e clonado em pGEX-SN digerido e defosforilatado [Int J Cancer. 2003 106 (4):534-44], derivado do plasmídeo pGEX-3X [Gene 1988 67:31-40]. A proteína recombinante GST fundida MUC1, contendo uma sequência de 107-aa MUC1, contendo 5,3 repetições, foi purificada de acordo com métodos padrão [Gene 1988 67:31-40].

Purificação de linfócitos de sangue periférico

Os linfócitos foram isolados a partir de 10 mL de sangue periférico fresco misturado com o anticoagulante por Ficoll-Paque Plus (Amersham Pharmacia Biotech, Suécia), de acordo com as instruções do fabricante. O mRNA foi isolado dos linfócitos usando o kit Dynabeads mRNA DIRECT (Dynal, Noruega).

Extração de ARN e síntese de ADN

Amostras do tumor de cerca de 200 mg de pacientes com carcinoma da mama foram obtidas como amostras cirúrgicas descartadas, e imediatamente congeladas em azoto líquido. O ARN total foi preparado pela Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI) e purificado a um poli⁺ ARN usando PolyATract mRNA Isolation Systems (Promega). Quinhentos ng de poli (A)⁺ ARN de carcinomas da mama ou 1 µg de poli (A)⁺ ARN a partir dos linfócitos foram usados para sintetizar cADNs completos usando o kit de construção de biblioteca SMART cADN (Clontech, Palo Alto, CA) .

Análise da expressão de gene de anticorpos pela técnica de PCR

A região de anticorpos hiper-variável V(D)J foi amplificada por PCR de modelos cADN usando iniciadores específicos do sítio 5'-GGACACGGCT (G/C) TGTATTACTG-3'[SEQ ID 101] e 5'-GCTGAGGAGACGGTGACC-3' [SEQ ID 102] concebidos num estudo realizado por Hansen e seus colegas [Proc Natl Acad Sci USA 2001 98 (22):12659-64]. A determinação das subclasses IgG1, IgG2 e IgA foi feita como descrito em [J Immunol. 2002 169 (5):2701-11] por combinação individual constante de iniciadores de regiões específicas para genes de IgG1,

IgG2 e IgA (CG1d, CG2a e CA1, respectivamente) com um conjunto de iniciadores variáveis de cadeia pesada: VH135, VH3a, VH3f, VH4, VH4b. Estes iniciadores foram concebidos para a construção de bibliotecas humanas Fab [Barbas CF III, Burton DR (1994) de anticorpos monoclonais a partir de bibliotecas combinatórias. Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual].

Construção da biblioteca ScFv

O repertório do anticorpo de genes foi amplificado usando o conjunto de iniciadores concebidos desenhados para a amplificação dos domínios de anticorpo VH e VL [Pope, A.R., Embleton, M.J. & Mernaugh R. (1996) Construction and use of antibody gene repertoires. Em: Antibody Engineering - A practical approach (McCafferty, J., Hoogenboom, H. & Chiswell D., eds), pp.325, Oxford University Press] e os fragmentos scFv foram montados *in vitro*, conforme descrito anteriormente [Pope A.R. et al. 1996]. Os fragmentos scFv foram amplificados por PCR com iniciadores de extensão apropriados, incorporando os sítios de restrição *NcoI* e, *NotI*, que permitam a clonagem dos genes scFv no vector pKM19. Os produtos resultantes da PCR foram purificados em 1% de gel de agarose de baixa fusão (NuSieve 3:1 agarose, Rockland, ME). Os fragmentos de ADN foram digeridos com *NcoI/NotI* e inseridos no vector pKM19. O ADN ligado foi usado para transformar células bacterianas competentes DH5 α F' (*supE44* Δ lacU 169 (ϕ 80 lacZ Δ M15) *hsdR* 17 *recA1* *EndA1* *gyrA* 96 *thi-1* *relA1* F'[*traD36* *ProAB*⁺ *lac*/^q*lacZ* Δ M15]) por electroporação.

As células transformadas foram semeadas em 20 placas de ágar (ø 15 cm), contendo ágar LB, 100 µg/mL de ampicilina e 1% de glucose. Após a incubação durante a noite a 37°C, as colónias bacterianas foram raspadas das placas e ressuspendidas em LB, contendo 10% de glicerol. Alíquotas desta suspensão de células foram armazenadas a -80°C e utilizadas para amplificação de bacteriófagos.

Amplificação de bacteriófagos

Quarenta μL de raspado de células bacterianas foram incubados em 40 mL de LB contendo ampicilina e 1% de glicose até $\text{OD}=0,2$. As bactérias foram recolhidas por centrifugação e ressuspendidas em 40 mL de LB com ampicilina, sem glicose. Cerca de 6×10^9 pfu de M13K07 auxiliar foi adicionado a cada mL de suspensão de células, incubadas por 15 min a 37°C sem agitação e mais 2 h num agitador. Foi adicionado canamicina à concentração final de $20 \mu\text{g/mL}$ e as células foram incubadas a 32°C . O bacteriófago foi purificado de acordo com o padrão de precipitação PEG/NaCl [Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989].

Seleção de anticorpos baseada na célula de demonstração de biblioteca de bacteriófago

Células semi-confluentes MCF-7 (cerca de 2×10^7) foram lavadas três vezes com tampão PBS e incubadas com 2 mL de 2 mM EDTA em PBS por 15 min a 37°C . Dez mL de PBS contendo 10 mM de MgCl_2 foram adicionados às células, e removidos cuidadosamente por pipetagem. As células foram recolhidas por centrifugação, lavadas uma vez com 10 mL de PBS/ MgCl_2 e finalmente ressuspendas em 1 mL de tampão de bloqueio fresco: 4% de leite magro, 0,05% de Tween 20, 5×10^{11} pfu de f1 UV-bacteriófago morto. As células foram bloqueadas por 30 min à temperatura ambiente girando em roda, em seguida, recolhidas e incubadas por 1 h a 37°C na roda com cerca de 5×10^{11} TU de biblioteca de anticorpos scFv ampliada recentemente em 1 mL de tampão de bloqueio. As células foram lavadas 5 vezes com PBS/Tween. O bacteriófago ligado foi eluído pela adição de $400 \mu\text{L}$ de 0,1 M HCl, pH 2,2 (ajustado pela glicina). A suspensão celular foi incubada com solução de eluição por 10 min à temperatura ambiente, neutralizada em $40 \mu\text{L}$ de 2M Tris-HCl, pH 9,6 e utilizada para a infecção de células bacterianas. As bactérias foram

semeadas em duas placas de ágar LB (ø 15 cm), contendo 100 µg/mL de ampicilina e 1% de glicose. As bactérias raspadas foram utilizadas para amplificação de bacteriófagos.

Seleção de afinidade em alvos da proteína purificada.

CEA e MUC1 foram biotinilados como descrito em [Harlow E.& Lane D. Antibody: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1988]. Cerca de 5×10^{11} TU de bibliotecas de anticorpos scFv recentemente ampliadas foram pré-incubadas com 50 µl de extracto bacteriano AD202 em tampão de bloqueio por 30 minutos a 37°C. Vinte γ de uma proteína biotinilada foram adicionados à mistura de reacção e incubados por outra hora a 37°C, sob agitação suave. O bacteriófago vinculado foi capturado usando estreptavidina revestida Dynabeads M-280 (112,05, Dynal, Oslo, Noruega), de acordo com as instruções do fabricante, lavado 5-10 vezes com PBS/Tween, e, depois, eluído e amplificado como descrito acima.

Experiências ELISA

As células foram cultivadas numa placa de 96 poços até quase confluentes. Após descartar o meio de crescimento, 100 µL de 4% de paraformaldeído recém preparado (# 15710, Electron Microscopy Science, Hatfield, PA) em PBS foram rapidamente adicionados por 10 min. A solução fixadora foi removida por pipetagem e as células foram incubadas com tampão de bloqueio (5% de leite, 0,05% de Tween 20 em PBS) por 30 minutos à temperatura ambiente. O bacteriófago purificado PEG em tampão de bloqueio (1:1) foi adicionado às células e incubado por 1 h a 37°C, sob agitação suave. As células foram lavadas três vezes e um anticorpo conjugado anti-M13 HRP (Pharmacia) foi utilizado para o desenvolvimento da reacção. Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

Coloração por Imunofluorescência

As células foram cultivadas numa placa de 24 poços para cultura de células (Nunc, Roskilde, Dinamarca), fixadas como acima descrito e bloqueadas com 3% BSA em PBS por 1 h à temperatura ambiente. O bacteriófago purificado PEG em 1% BSA/PBS foi adicionado às células e incubado por 1 h sob agitação suave a 37°C. As células foram lavadas três vezes com 1% PBS/BSA e incubadas com um anticorpo monoclonal anti-M13 rato (27-9420-01, Amersham Biosciences) por 30 min a 37°C. As células foram lavadas como descrito acima e então incubadas com um anticorpo de cabra conjugado com FITC policlonal anti-rato (554001, BD Biosciences PharMingen, San Jose, CA) na concentração de 5 µg/mL por 30 min a 37°C, sob agitação suave. Após a última incubação, as células foram lavadas cinco vezes, secas no escuro, montadas com meio Vectashield (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) e vidros de cobertura, e analisadas utilizando um microscópio invertido de fluorescência.

Todos os anticorpos são definidos na tabela 5.

Resultados

Caracterização da célula linfoplasmática infiltrada em amostras de tumor da mama

Dez amostras de tumores de pacientes com cancro da mama (com idade entre 47-79 anos) foram examinadas para a existência e natureza do TIL-B por amplificação PCR de segmentos de anticorpos V(D)J (CDR3) e pela comparação da representação das classes de anticorpos IgG e IgA.

Os padrões de expressão dos genes de fragmentos de anticorpos foram analisados por PCR semi-quantitativa do modelo SMART de cADN. O painel de cADNs de dez carcinomas da mama, a partir de amostras de tecido mamário normal, testículo normal e linfócitos do sangue periférico de doadores saudáveis foi normalizado pela amplificação de um gene de limpeza, β -actina e são mostrados na Figura 13A.

Regiões de anticorpos de cadeia pesada hipervariáveis (V(D)J) foram amplificadas como descrito em Materiais e Métodos. Após a análise por eletroforese em agarose, os mesmos produtos de PCR foram fracionados por 10% PAGE de alta resolução (Figura 13B). Na aplicação desta técnica, os autores observam que 7 de 10 amostras de tumores resultantes contêm vários números de bandas discretas, caracterizando oligoclonalidade da resposta imune nestes pacientes, enquanto os fragmentos de ADN da mama normal e linfócitos periféricos bem amplificados não contêm bandas intensiva e formam um esfregaço, que consiste em bandas de diferentes comprimentos. O oligoclonalidade observada das imunoglobulinas não está correlacionada com a idade dos pacientes.

A fim de analisar a distribuição das subclasses de anticorpos foi amplificado genes Ig de cADNs de carcinoma mamário e da mama normal, utilizando os iniciadores de subclasse específicos. De acordo com o teste anterior, a 3 amostras de cADN do tumor, sem adição de bandas oligoclonais nas regiões de PCR amplificado V(D)J, têm uma prevalência da faixa de IgA em comparação com as bandas IgG1 e IgG2, assim como numa amostra de tecido mamário normal onde IgA geralmente representa a classe Ig principal (Br. Med. J. 1976 2 (6034):503-506). Por outro lado, as amostras mostrando oligoclonalidade no primeiro ensaio contêm IgG1, ou ambos IgG1 e IgG2 como bandas de anticorpos dominantes, em contraste com a mama normal. A Figura 14 mostra quatro exemplos mais característicos, juntamente com amostra de tecido mamário normal.

A oligoclonalidade de anticorpos derivados de TIL-B em pacientes com cancro da mama foi confirmada pela sequenciação

Os autores optaram por duas amostras de cADN (B92, B93), dando bandas de teste únicas mais fortes em V(D)J, para sequenciação. As sequências de nucleotídeos de clones 17 e 13 escolhidos aleatoriamente contendo genes de anticorpos γ provenientes de B92 e B93 cADN, respectivamente, foram determinados e as suas sequências de aminoácidos foram deduzidas. Todos os 30 clones codificados em quadro correcto organizaram cadeias pesadas. Os anticorpos isolados mais frequentemente (B92-A e B93-A1) continham as regiões V(D)J do comprimento exacto correspondente às faixas anteriores fortes observadas na Figura em 13B (linhas com amostras B92 e B93) (Figura 15), indicando que tanto a amplificação com iniciadores variáveis de cadeia pesada e a etapa de clonagem não introduzem qualquer inconveniente particular interferindo com as frequências da cadeia pesada na biblioteca construída.

Como a Figura 15 indica, seis mutações somáticas foram identificados em fragmentos de anticorpos. Estas mutações estão localizadas em CDRs variáveis da cadeia γ da mesma especificidade, enquanto apenas uma mutação foi encontrada fora das regiões variáveis ($P=0,0002$). Portanto, a oligoclonalidade do repertório de anticorpos derivados do tecido do tumor é uma resposta imune natural que ocorre no tecido tumoral dirigido por antígenos tumorais, e não um artefacto introduzido pela amplificação PCR.

Construção da biblioteca

Quatro bibliotecas de anticorpos scFv foram construídas usando sete cADNs como modelo, caracterizado pela oligoclonalidade da resposta imune (ver lista de

bibliotecas na Tabela 2). Apenas a biblioteca scFvEC23 (descrito no Exemplo 1) foi construída a partir de linfócitos do sangue periférico, obtidos a partir de um único paciente em estágio avançado de cancro da mama.

Tabela 2. Lista de bibliotecas de anticorpos ScFv

Biblioteca	Fonte de genesIg	Paciente (idade)	Complexidade da biblioteca
ScFvB87	TIL	B87 (55)	4.7×10^5
ScFvB95	TIL	B95 (73)	1.1×10^7
ScFvB96	TIL	B96 (72)	2.6×10^7
ScFvmix	TIL	B85 (47), B91 (70), B92 (79), B93 (66)	2.4×10^7
ScFvEC23	PBL	EC23 (65)	1.8×10^7
mixTIL	TIL		ScFvB87 + ScFvB95 + ScFvB96 + ScFvmix
mixLIB	TIL + PBL		scFvB87 + scFvB95 + scFvmix + scFvEC23

Seleção de anticorpos anti-tumor específicos de bibliotecas de demonstração de bacteriófagos geradas a partir TIL-B e PBL

Os autores examinaram directamente a possibilidade de selecção de fragmentos de anticorpos específicos de bibliotecas de bacteriófagos contra antígenos do cancro comuns, incluindo o do domínio ED-B de fibronectina [EMBO J. 1987 6 (8):2337-42], MUC1 [Cancer Res. 1992 52 (22):6365-70; Hum Pathol. 1995 26 (4):432-9] e CEA [J. Clin. Lab. Anal. 5:344-366; Semin Cancer Biol. 1999 9:67-81; Cancer Res. 2002 62:5049-5057]. Sob condições descritas em Materiais e Métodos uma mistura de quatro TIL derivados de bibliotecas de demonstração de anticorpos scFv (scFvB87, scFvB95, scFvB96 e scFvmix) denominada biblioteca mixTIL (Tabela 2) e a biblioteca scFvEC23 foram digitalizados em separado contra três alvos de proteína em várias rondas. Em todos os casos observou-se que grupos de bacteriófagos já eram positivos contra a selecção do antígeno após a segunda e terceira rondas de digitalização (Figura 16). Clones escolhidos aleatoriamente foram testados para a reactividade de ligação contra os

antígenos. Os resultados do teste de clones de bacteriófago aleatórios da terceira ronda de tanques de bacterió fago estão resumidos na Tabela 3. Os clones positivos foram analisados por impressão digital usando dupla digestão *Hae* III e *Alu* I e os clones de anticorpo individuais foram sequenciados. A Figura 17 representa ELISA de bacteriófagos scFv individuais seleccionados em antígenos purificados. Os clones individuais analisados vinculam fortemente os respectivos antígenos e não reagem com proteínas irrelevantes. Este resultado indica que o vector pKM19 é uma ferramenta adequada para a selecção de anticorpos anti-tumorais de bibliotecas derivadas de TIL e PBL.

Tabela 3. Resultado da selecção através da utilização de três antígenos tumorais purificados.

Antígeno alvo	Biblioteca	Clones positivos/clones testados	Genes de anticorpos isolados
ED-B	mixTIL	10/10	1
	scFvEC23	10/10	3
MUC1	mixTIL	2/16	1
	scFvEC23	6/8	2
CEA	mixTIL	17/20	4
	scFvEC23	15/20	3

Seleção baseada em de células de tumor com anticorpos monoclonais específicos.

Os autores testaram a funcionalidade de uma única biblioteca derivada TIL (scFvB96), seleccionando os anticorpos específicos do cancro da mama por meio de células baseadas em digitalização da linhagem de células de carcinoma da mama MCF-7. Quatro bibliotecas, incluindo scFvB87, scFvB95, scFvmix e scFvEC23, foram agrupadas juntamente (biblioteca denominada mixLIB, tabela 2) e digitalizadas no mesmo tipo de células. Foram necessárias quatro ou cinco rondas de selecção de células MCF-7 para bibliotecas mixLIB ou scFvB96, respectivamente, a fim de enriquecer os tanques de bacteriófagos para aglutinantes de células específicos (Figura 18). Então, clones escolhidos aleatoriamente foram analisados para presença de anticorpos

scFv inteiros. Os clones de comprimento total scFv bacteriófagos foram testados por ELISA baseada em células, e analisados por impressão digital, e vários clones positivos foram sequenciados. As sequências de aminoácidos foram deduzidas a partir de sequências de ADN, confirmadas serem as correctas, em estruturas de anticorpos. Os dados da análise dos clones estão resumidos na Tabela 4.

Tabela 4 Resultado da selecção de células do carcinoma da mama humano MCF7 intactas/vivas.

Biblioteca	Seleccção MCF-7	
	scFvB96	mixLIB
Ronda de selecção	5	4
scFv de comprimento total/clones testados	12/40	30/40
Clones positivos/clones de comprimento total testados	5/12	22/30
Genes de anticorpos isolados	2	8

A reactividade e especificidade de células seleccionadas de anticorpos foram verificadas por ELISA em ambas as linhas de células de carcinoma da mama: MCF-7, MDA-MB-468, e as células normais, como controlo negativo: MCF10-2A (epitélio da mama humano), a HFF (fibroblastos humanos) (Figura 19). Entre os 10 anticorpos scFv seleccionados diferentes pertencentes a sete grupos de especificidade, os anticorpos mix7, mix12, Mix25) têm a mesma sequência de cadeia pesada e diferentes cadeias leves; os anticorpos mix8 e mix39 têm sequências similares com pequenas diferenças), 9 são específicos para células de carcinoma da mama, enquanto apenas o anticorpo B96/4F scFv liga também células epiteliais normais.

Anticorpos seleccionados de células derivados de TIL

Os anticorpos Mix11, mix12, mix17, mix23 e mix39 scFv (Tabela 4) foram seleccionados a partir de uma mistura de

PBL e bibliotecas TIL derivadas. Os autores investigaram a origem desses anticorpos, a fim de ver qual tipo de biblioteca que funciona melhor em condições de selecção iguais. Um μ L de cada biblioteca amplificada foi usado como modelo para a amplificação por PCR com o par de iniciadores oligonucleotídeos específicos para cada anticorpo (Figura 20). Esta análise mostra que os cinco anticorpos scFv testados, isolados de uma mistura de bibliotecas, pertencem aos anticorpos TIL derivados. Os genes de anticorpos mix7 e mix25 (tendo a mesma cadeia pesada como mix12, tabela 5), e mix8 (semelhante ao mix39, tabela 5) crê-se terem uma origem semelhante. Para o anticorpo anti-SP2 irrelevante, que foi seleccionado a partir da biblioteca scFvEC23, a sua origem da biblioteca de PBL derivada foi confirmada. Os anticorpos anti-MUC1 MB5 e anti-CEA CB37, os quais foram seleccionados a partir da mistura de quatro bibliotecas TIL derivadas (mixTIL) foram mostrados para derivar das bibliotecas scFvmix e scFvB96, respectivamente.

Coloração fluorescente de células tumorais

As especificidades de ligação de diversos clones, incluindo mix17, mix7 (Figura 21), e anticorpos anti-MUC1 MB5 e anti-CEA CB37 (figura 22) foram testadas por coloração de imunofluorescência de células tumorais directamente com anticorpos scFvs exibidos no bacteriófago. Mix17 scFv reconheceram grande parte das células do carcinoma mamário MCF7 não-permealizadas nesta experiência (Figura 21A), enquanto mix7 manchou uma baixa percentagem de células, provavelmente células apoptóticas.

O anticorpo MB5 manchou intensamente as células MCF7, conhecidas pela expressão alta de MUC1, e reagiu bem também com uma outra linha de células do carcinoma mamário, SKBr3 (Figura 22). Os anticorpos CB37 mancharam as células LoVo. Não foi observado coloração de fundo para o epitélio mamário normal em ambos os anticorpos MB5 e CB37.

EXEMPLO 3: Maturação de anticorpos anti-MUC1 e anti-CEA scFv

Para aumentar a afinidade de anticorpos específicos de tumores CB37 MB5 realizamos a maturação de afinidade dos anticorpos *in vitro*. As novas bibliotecas de maturação foram criadas pela combinação de genes de cadeias simples VH derivados de CB37 e MB5, respectivamente, com vários genes das cadeias VL derivados de TIL e PBL de pacientes com tumor. As bibliotecas foram construídas como descrito nos Exemplos 1 e 2.

Métodos

Seleccção de afinidade

A selecção de afinidade foi realizada usando as proteínas biotiniladas, conforme descrito no Exemplo 2, com a diferença que na primeira ronda de selecção de afinidade foram utilizados 10 µg de proteína e para a segunda apenas 50 ng. Os clones com resultados positivos no teste de ELISA foram seleccionados por PCR e as impressões digitais com enzimas de restrição *AluI* e *HaeIII* para identificar os diferentes clones. Foi determinada a sequência de ADN dos clones. Os genes de anticorpos a partir de clones com reactividade contra proteínas alvo maior do que os anticorpos originais foram clonados em pKM16 para produzir scFvs na forma solúvel, como descrito no Exemplo 1.

Caracterização dos anticorpos maturados

Os fragmentos de anticorpos maturados foram caracterizados pela ligação do antígeno.

Os novos anticorpos anti-MUC1 MB5/C'1 e MB5/C'3 e anticorpos maturados anti-CEA CB37/3B e CB37/9C (Tabela 5) na forma solúvel foram caracterizados por Surface Plasmon Resonance (Biacore), conforme descrito em BMC Cancer 2006 06:41. Os resultados são mostrados na tabela 6.

Tabela 5. Anticorpos seleccionados. MixTIL e MixLIB são misturas de bibliotecas definidas na tabela 2

Antibody	Antigen	Library used for selection	Nucleotide/Amino acid sequence
EDE1	ED-B	scFvEC28	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAG CCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGA TACACCTTCACCGGCTACTATATGCACCTGGGTGCGACAG GCCCTTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGATGGATCAAC CCTAACAGTGGTGGCACAACCTATGCACAGAAGTTTCAG GGCAGGGTCACCATGACCAGGGACACGTCCTATCAGCACA GCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACG GCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATTGCGCACAAAATTGT ACTAATGGTGTATGCCACCGGGGAGTATGTCCACTAC TACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGCACCGCTGGTCACC GTCTCTTCAGGTGGGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCT GGCGGTGGCGGATCGCAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCC TCCGCGGCCGGTCTCCTGGACAGTCACTCACCATCTCC TGCACTGGAACCAGCAGTGTGTGCTGTTATAACTAT GTCTCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAAGCCCCAAA CTCATGATTTATGACGTCAATAAGCGGCCCTCAGGGGTC CCTGATCGCTTCTCTGCCCTCCAAGTCTGGCAACACGGCC TCCCTGACCGTCTCTGGGCTCCAGGCTCAGATGAGGCT GATTACTACTGCGCTTCATATGCAGGCACCTACAGTTAT GTCTTCGGAACTGGGACCCAGCTCACCCTTTAGGTGCG GCCGCAGGAGA [Seq ID 22] QVQLQESGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMHVVRQ APGQGLEWMGNINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSIST AYMELSRRLRSDDTAVYYCARDSPQNCNTNGVCHRGSHVHY YGMDEVWGQGLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGSALTQPA SAAGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPK LMIYDVNKRPSGVPDRFSASKSGNTASLTVSLQADDEA DYICASYAGTYSYVFGTGTQLTVLGAAA [Seq ID 23]

Antibody	Antigen	Library used for selection	Nucleotide/Amino acid sequence
EDE3	ED-B	scFvEC23	GAGTGCAGCTGTTGCAGTCTGGGGCCGAGGTGAAGAAG CCTGGGCTCAGTGAAGTCTCTCTGCAAGGCTTCTGGA TACACCTTCACCGGCTACTATATGCACTGGGTGCGACAG GCCCCGGACAAAGGCTTGAGTGGATGGATGGATCAAC CCTAACAGTGGTGCACAAACTATGCACAGAAGTTTCAG GGCAGGTCACCATGACCCAGGGACACGTCCATCAGCACA GCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACG GCCGTGATTTACTGTGCGAGAGATTCCGCCAATAATTGT ACTAATGGTGTATGCCACCGGGGAGTCAATGTCCACTAC TACGGTATGGACGCTCTGGGGCCAGGGAACCTGGTCAAC GTCTCCTCAGGTGGGGCGGTTTCAGCGGAGGTGGCTCT GGCGTGGCGGATCGCAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCC TCCGCGCGCGGTGTCTTGGACAGTCAGTCACCATCTCC TGCACCTGGAACCAAGCAGTGTGTGGTGTATAAATAT GTCTCCTGTGTACCAACAGCACCCAGCAAGCCCCCAAA CTCATGATTTATGACGTCAATAAGCGGCCCTCAGGGTC CCTGATCGCTTCTTTGCCCTCCAAAGTCTGGCAACACGGCC TCCCTGACCGTCTCTGGGCTCCAGGCTGACGATGAGGCT GATTACTACTGCGCTTCATATGCAGGCACCTACAGTTAT GTCTTCGGAACTGGGACCCAGCTCACCGTTTAGGTGCG GCCGCA [Seq ID: 24] EVQLQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFYGYMHWVRQ APQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFGQGRVTMTRDTSIST AYMELSLRSDDTAVYYCARDSPQNTNGVCHRGSVHY YGMVWGQGTLLVTVSSGGSGSGGGSGGSQSALTQPA SAAGCLGQSVTI SCTGTSSDVGKYVSVWYQHPGKAPK LMIYDVNKRPSGVDPDRFFASKSGNTASLTVSGLQADDEA DYVCASYAGTYSVVFGTGTQLTVLGAA [Seq ID 25]

Antibody	Antigen	Library used for selection	Nucleotide/Amino acid sequence
EDE5	ED-B	scFvEC23	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAG CCTGGGGCTCAGTGAAGGTCTCTGCAAGGCTTCTGGA TACACCTTCAACGGCTACTATATGCACTGGTGGACAG GCCCCGGACAAAGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAAC CCTAACAGTGGTGGACAAACTATGCCACAGAAATTTGAG GGCAGGGTCAACATGACCCAGGGACACGTCCTCAGCACA GCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACG GCCGTGATTAATCTGTGTGAGAGGTTGCCACAAATTTGT ACTAATGGTGTATGCCACCGGGGAGTCAATGTCCACTAC TACGGTATGGACGCTGGGGCCAAAGGACCAACGGTCACC GTCTCCTCAGGTGGGGCGGTTCAAGCGGAGGTGGCTCT GGCGTGGCGGATCGCAGTCTGCCCTGACTCAGCCCTGCC TCCGTGCTGGGTCTCCTGGACAGTCGATCACCATCTCC TGCACTGGAACCAAGCAGTGTGTTGGGAGTTATAACCTT GTCTCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAGCCCCCAA CTCATGATTTATGAGTCAAGTATCGGCCCTCAGGGGTT TGTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCC TCCCTGACCAATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGAGGCT GATTATTACTGCAGCTCATATACAAAGCAGCAGCACTCTC GAGGTGTTCTGGCGGAGGACCCAGCTCACCGTTTAGGT GCGGCCGCA [Seq ID 26] EVQLVESGAEVKPKQASVKVSKASGYFTFTGYMHWRQ APGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTDTSIST AYMELSLRLSDDTAVYYCVRGSPQNTNGVCHRSHVHY YGMDFVWGQGTITVSSGGSGGGSGGGSGQSALTQPA SVSGSPGQSI TISCTGTSSDVGSYNLVSQYQHPGKAPK LMIYEVSNRPSGVNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA DYICSSYTSSTLEVPFGGTQTLTVLGAAG [Seq ID 27]

Antibody	Antigen	Library used for selection	Nucleotide/Amino acid sequence
EDB5	ED-B	mixTIL	CAGGAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGTGGCTTGGTC CAGCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCTCTGTGACGCTCT GGATTCACTCTCAGTAGCTATGCTATGCACTGGGTCCGC CAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGGTCTCAACTATT AGTGGTGGTGGTGGTAGCAATACATACGACAGACTCCGTG AAGGCGCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAAC ACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC ACGCGCGTATATTACTGTGCGAGACGGGGCGGGCTTTT GATATCTGGGCGCAAGGACACGGTCACTCTCTCTCTTA GGTGAGGCGGTTCAGGCGAGGTGGCTCTGGCGGTGGC GGATCGCAGTCTGTGTGACGAGCGCGCTCAGTGTCT GGGCGCCAGGCGAGAGGCTCACCATCTCTGCACTGGG AGCAGCTCCAACATCGGGCGGGGTATGATGTACACTGG TACCAGCAGCTCCAGGAACAGCCCCCAACTCTCATTT TATGGTAACAGCAATCGGCGCTCAGGGTCCCTGACCGA TTCTCTGGCTCCAAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCC ATCACTGGGCTCCAGGCTGAGGATGAGGCTGATTATTAT TGCTCCAGTCTATGATCAGCAGCCTGAGTGGTCAITG GTATTGGCGGAGGACCAAGGTGACCGTCTCTAGGTGG GCCGCA [Seq ID 28] QEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSSYAMHWVR QAPKGLEWVSTISGGGSGTYYADSVKGRFTISRDNKRN TLYLQMNLSRAEDTAVYYCARRGRAFDIWGGTITVTVSL GGGSGGGGGGGGSGVLTQPPSVSCAPGQRTVTSCTG SSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNRNRPSPGVPDR FSGSKSGTASLAITGLQAEDEADYYCSPMISLSSGHV VFGGCTKVTVLGAAA [Seq ID 29]

Antibody	Antigen	Library used for selection	Nucleotide/Amino acid sequence
ME1	MUC1	scFvEC23	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAG CCTGGGGCCCTCAGTGAAGGTCTCTGCAAGGCTTCTGGA TACACCTTCACCGGCTACTATATGCACTGGGTGCGACAG GCCCCGTGAGCAAGGGCTTGGTGGATGGGATGGATCAAC CCTAACAGTGGTGGCACAACACTATGCACAGAAAGTTCCAG GGCAGGTCAACCATGACAGGGACACGTCCTCATTTGSCACA GTCTACATGGAGTTGAGCAGCCTGACATCTGACGACACAG GCCATGTATTTATTTGGCGAGAAACAATGTTGCTATGGGT TATACTATGGACGCTTGGGGCCCAAGGACAATGGTCACC GTCTCTTCAAGTGGAGCGGTTTCAGCGGAGGTGGCTCT GGCGGTGGCGGATCGCAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCC TCCGCTCCGGGTCTCTGGACAGTCACTCAGTCACCATCTCC TGCACTGGAACACAGCAGTGAAGTGGTGGTTTAACTAT GTCTCTGGTACCAACAGCAGCAGCCAGGCAAAACCCCAAA CTCTTGATTTATGAGTCACTAGTCTGGCCCTCAGGGGTT TCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGCTGGCAACACGGCC TCCCTGACCATCTCTGGTCTCCAGGCTGAGGACGAGGCT GATTATTACTGCATCTCATATACAAGCAGCAACACTTGG GTGTTGGCGGAGGACCCAGCTCACCGTTTGTAGGTGCG GCCGCA [Seq ID 30] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYMHNVRO APQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFGQGRVTMTSDTISIGT VYMESSLTSDDTAMYICARNNVAMGYTMDVWQGTMTVT VSSGGGSGGGGGGSGQSALTQPASASGSPGQSVTIS CTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKTPKLLIYEVSSRPSGV SNRFGSKPGNTASLTISGLQAEDEADYCYISYSSNTW VFGGGTQLTVLGAAA [Seq ID 31]

Antibody	Antigen	Library used for selection	Nucleotide/Amino acid sequence
ME2	MUC1	scFvEC23	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGCGGAGGTGAAGAAG CCTGGGGCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGA TACACCTTCACCGGCTACTATATGCACTGGTGGACAG GCCCCGGACAAAGGCTTGAGTGGATGGATGATCAAC CCTAACAGTGGTGGACAAACTATGCACAGAAGTTTCAG GGCAGAGTCACCATGACCCAGGAACACCTCCATAAGCACA GCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACG GCCGTGTATTACTGTGGGGTCAAGGAGGCACATGGGGAC GGTATGGACGCTCTGGGGCAAGGACACACGGTCACCGTC TCCTCGGTGGAGCGGTTGGCTCTGGGGTGGCGGATCG CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCCTCCGGTCCGGGTCT CCTGGACAGTCGATCACCATCTCCTGCACTGGAACCCAGC GGTGACGTTGGTGGTTAATACTATGTCCTCTGGTACCAA CAGCACCCAGGCAAGCCCCCAAACTCATGATTTATGAA GTCAGTAATCGGCCCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCT GGCTCCAAAGTCTGGCAGCACGGCCTCCCTGACCATCTCT GGCTCCAGSCTGAGGACGAGGCTGATTAATGCTGCGTC TCATATACAAGCAGAAACACTTATGCTTTCGGATCCGGG ACCCAGCTCACCGTTTGTAGGTGGGGCCCGGA [Seq ID 32] EVQLQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMHWRQ APGQGLEWMGWINENSGGTNYAQKFGQGRVTMRNTSIST AYMELSLRSEDYAVYYCAGQEAHGDGMDVWGQGTITVTV SSVERGGSGGSGQSALTQPASASGSPGQITISCTGTS GDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIEVSNRPSGVSNRFS GSKSGSTASLTISGLQAEDEADYYCVSYTSRNTYVFGSG TQLTVLGAAA [Seq ID 33]

Antibody	Antigen	Library used for selection	Nucleotide/Amino acid sequence
MB5	MUC1	mixTIL	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAG CCCGGGCCCTCAGTGAAGGTCTCTGCAAGGCTTCTGGA TACACCTTCAACCGCTCTCTATATGCACTGGGTGCGACAG GCCCCGTGACAAAGGCTTGAAGTGGATGGATGGTTCAAC CCTAATAGTGGTGGCACAACTATGCACAGAAGTTTCAG GGCAGGTCACCATGACCGGGGACACGTCCACCAGCACAC GGCTATATGGAGCTGAGCAGGCTGACATCTGACGACGCG NCCGTGTATTATTGTGCGAGAGATCGGGCTCTGCTATG GGGCTCTGGGCCCCAAGCACCCCTGGTCAACCGTCTCTCA GGTGGAGCGGCTTCAAGCGGAGGTGGCTCTGGCGGNGGC GGATCGCAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCCTCCGCTCC GGTCTCTCTGGACAGTCAGTCACCATCTCTGTCACCTGGA ACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATACTATGCTCTCTCTGG TACCAACAGCACCCAGGCAAGCCCCCAAACTCATGATT TATGACGTCAATAAGCGGCCCTCAGGGTCCCTGATCGC TTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCTCCCTGACC GTCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGATGAGGCTGATTATTAC TGCAGCTCATATGCAGGTAGTAACACTTCTCTATTCTGGC GGAGGGACCCAGCTCACCGTTTATTAGGTGCGGCGCGCA [seq ID 2] EVQLVESGAEVKPGASVKVCKASGYTFATSYMHWVRQ APGQGLEWMGWENPNSGGTNYAQKFGQGRVTMTGDTSTST GYMELSRITSDDAIVYCARDRASAMGVWGQGLIVTVSS GGGSGGGGGGGGSGQSALTQPASASGSPGQSVTISCTG TSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIDVNRKRPSPGVPDR FSGSKSGNTASLTIVSGLQAEDEADYYCSSYAGSNFTFLFG GGTQLTVLGAAG [seq ID 3]

Antibody	Antigen	Library used for selection	Nucleotide/Amino acid sequence
MB5/ C'1	MUC1	Biblioteca de maturação baseada no clone MB5, como descrito no Exemplo 3	ATGGAGGAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGAGCTGAGGTG AAGAAGCCCGGGGCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCT TCTGGATACACCTTCACCGCCTCCTATATGCACTGGGTG CGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGG TTCAACCCTAATAGTGGTGGCACAACCTATGCACAGAAG TTTCAGGGCAGGGTCACCATGACCGGGACACGTCCACC AGCACAGGCTATATGAGCTGAGCAGGCTGACATCTGAC GACGCGCCGTGTATTATTGTCCGAGAGATCGGGCCTCT GCTATGGGCGTCTGGGGCAAGGAACCTTGGTCACCGTC TCCTCAGGTGGAGGCGGTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGC GGTGGCGGATCCCAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCC GTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGATCACCATCTCCTGC ACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTATGTC TCCTGGTACCAACAGCAGCAGGCAAGCCCCAAACTC ATGATTTATGATGTCAGTCATCGGCCCTCAGGGATTTCT AATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCC CTGACCATCTCTAGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGAT TATTACTGCAGCTCATATACAAGCAGTAACACTTTCATC TTCGGAAGTGGGAGCCAGCTCACCCTTTTAGGTGCGGCC GC [Seq ID 4] MEEVQLQESGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTASYMHNV RQAPGQGLEWMGWFNPNSSGGTINYAQKFQGRVTMTGDTST STGYMELSRLTSDDAVYYCARDRASAMGVWGQGLVTV SSGGGSGGGGSGGGGSSQALTQPASVSGSPGQSITISC TGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSHRPSGIS NRFSGSKSGNTASLTISRLQAEDEADYYCSSYTSSNTFI FGTGTQLTVLGAA [Seq ID 5]

Antibody	Antigen	Library used for selection	Nucleotide/Amino acid sequence
MB5/ C'3	MUC1	Biblioteca de maturação baseada no clone MB5, como descrito no Exemplo 3	ATGGAGCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTG AAGAAGCCCGGGGCCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCC TCTGGATACACCTTCACCGCCTCCTATATGCACTGGGTG CGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGG TTCAACCCTAATAGTGGTGGCACAACCTATGCACAGAAG TTTCAGGGCAGGGTCACCATGACCGGGGACAGTCCACC AGCACAGGCTATATGGAGCTGAGCAGGCTGACATCTGAC GACGCGCCCGTGTATTATTGTGCGAGAGATCGGGCCTCT GCTATGGGCGTCTGGGGCCAAGGCACCCTGGTCACCGTC TCCTCAGGTGGAGGCGGTTCAGCGGAGGCGGCTCTGGC GGTGGCGGATCGCAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCC GTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGATCACCATCTCCTGC ACTGGAACCAGCAGTCAGCTTGGTGGTTATAACTATGTC TCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAAGCCCCAAACTC ATGATTATGATGTCACTAATCGGCCTTCAGGGGTTCT AGTCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCC CTGACCATCTCTGGACTCCAGACTGAGGACGAGGCTGAT TATTACTGCAACTCATTTCACAAGCAGCAACACTTATGTC TTCGGAAC TGGGACCCAGCTCACCGTTTTAGGTGCGGCC GC [Seq ID 6] MEQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTASYMHWV RQAPGQGLEWMGWFNPNSSGGTNYAQKFQGRVTMTGDTST STGYMELSRITSDDAVYYCARDRASAMGVWGQGLVTV SSGGGGSGGGSGGGGSQSALTQPASVSGSPQSITISC TGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIDVTNRP SGVS SRFSGSKSGNTASLTISGLQTEDEADYYCNSFTSSNTYV FGTGTQLTVLGAA [Seq ID 7]

Antibody	Antigen	Library used for selection	Nucleotide/Amino acid sequence
CB3	CEA	mixTIL	GAGGTGCAGCTGTTCAGTCTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAG CCTGGGGCCTCAGTGAAGTCTCTCTGCAAGGCTTCTGGA TACACCTTCACCGGCTCCTATATTCACCTGGGTGCGACAG GCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGACGGATGAAC CCTAACAGTGGTGACACAACTATGCACAGAAATTCAG GGCCGGGTCAACATGACCAAGGACACGTCCATCAGCACA GCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACG GCCGTGTACTACTGTGCGACGAGGAGGTGCTTTACGT CCCGGTGCTTTTGTATTTCTGGGGCCCAAGGACCCAGCTC ACCGTTTATAGGTGCGGGCCCA [Seq ID 34] EVQLLOSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGSIYHWVRQ APGQGLEWMGRMNPNSGDTNYAQKFQGRVTMTRDTSIST AYMELSLRLRSDDTAVYYCATEGVALRPGAFDFWGQGTQL TVLGAAA [Seq ID 35]

Antibody	Antigen	Library used for selection	Nucleotide/Amino acid sequence
CB37	CEA	mixTIL	GAGGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTG3AGGAGGCTTGATC CAGCCGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTTGTGTAGCCTCT GAGTTCAACGTCAAGCAACTACATGAGCTGGGTCCGC CAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGTCTCAGTTATG TATGACGGGGTAGTACATACACGAGACTCCGTGAAG GGCCGATTCAACCATCTCCAGAGACAAATCTAAGAACACG GTGTATCTTCAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACG GCCGTCTATTACTGTGCGAGAGCGGATTTGGGTTGCCT ACAAATCGCGTCTTGGGAGATCTGGGGCCAAAGGACAAATG GTCACCGTCTCTTCAAGGTGGAGCGGTTCTGGCGGAGGT GGCTCTGGCGGTGGCGGATCGTCTTATGTGCTGACTCAG CCACCTCGGTGTGAGTGGCCCCCAGGAAAGACGGCCACG ATTACCTGTGCGGAAACAAATATAGGAAGTAAACAGTGTA TACTGTACAGCAGAAACCCAGGCTTGGCCCCCTGTACTG GTGCTCTATGATGATAGAGACCGGCCCTCAGGGATCCCT GAGCGATTCTCTGGCTCCAAATCCGGGAACACGGCCACC CTGACCATCAGCAGGCTCGAGGCGGGGATGAGGCGGAC TATTCTTGTGAGGTGGGATCCTAGTAGTATCACCTC TATGCTCTCGGAACCTGGGACCCAGCTCACCGTTTAGGT GGGCGCGCA [seq id 8] EEVQLVQSGGGLIQPGSSRLSCVASEFNVRSNYSWVR QAPKGLEWVSVMYDGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNT VYQMNSLRATEDAVYICARGGLGLPTIASWEIWGQGTW VTVSSGGGGSGGGSGGGSSVLTQPPSVSVAPGKTAT ITCAGNNIGSNVYQYQKPLAPVLVYDDRRDRPSGIP ERFSGSKSGNTATLTISRVEAGDEADYSCQVWDPSSDHL YVFGTGTQLTVLGA [seq id 9]
CB40	CEA	mixTIL	=CB37

Antibody	Antigen	Library used for selection	Nucleotide/Amino acid sequence
CB41	CEA	mixTIL	GAGGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTC CAGCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGACGCTCT GGATTCAACCGTCAGTAGCAACTACATGAGCTGGGTCCGC CAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGGTCTCAGTTGTT TATAGCGGTGGTAGCACATACTACGACAGACTCCGTGAAG GGCCGATTCAACATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG CTGTATCTTCAAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACG GCTGTGATTACTGTGCGAGAGACCTAGGGGGGACTACA GTTTGGCGCTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCCAAGGG ACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGAGGGGTTCAAGGC GGAGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGTCTATGTGTG ACTCAGCCACCCCTCGGTGTAGTGGCCCGAGGAAGACG GCCACGATTACCTGTGCGGGAACAATATAGGAAGTAAC AGTGATACCTGTTACCGAGCAGAAACCAGGCTTGGCCCT GTACTGGTGTCTATGATGATAGAGACCGGCCCTCAGGG ATCCCTGGGCGATTCTCTGGCTCCAAATCCGGGAACACG GCCACCTGACCATCAGCAGGTCGAGGCCGGGATGAG GCCGACTATTCTGTGAGGTGTGGATCCCTAGTAGTGAT CACCTCTATGTCTTTCGGAACCTGGGACCCAGCTCACCGTT TTAGGTGCGGCCGCA [Seq ID 36] EEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVR QAPGKGLEWVSIVYSGSTYYADSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLGGTTVWRYYGMDVWGQG TITVTVSSGGGGGGGGGGSSVLTQPPPSVAPGKT ATITCAGNNIGSNVYVYQKPGAPLVVYDDDRDRPSG IPGRFSGSKSGNTATLTISRVEAGDEADYSCQVWDPPSSD HLVYFGTGTQLTVLGAAG [Seq ID 37]

Antibody	Antigen	Library used for selection	Nucleotide/Amino acid sequence
CB53	CEA	mixTIL	GAGGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGACTTGATC CAGCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCCTCT GGGTTTACCGTCGGTAGCAACTACATGAGCTGGTCCGC CAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAATGGTCTCAGTTATT TATAGCGGTGGTAGTACATACTACGAGACTCCGTGAAG GGCGGATTCAACATCTCCAGAGACAATTCCAGAACACG CTGTATCTTCAATGAACAGCTGAGAGCCGAGGACACG GCCGTGTAATTA CTGTGTGAGAGATAGGGGTGATGCTTTT GATATCTGGGGCCAGGAGACAATGGTCACCGTCTCTTCA GGTGAGGCGTTCCAGGGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGC GGATCGTCTATGCGTGA CTGAGCCACCCCTCGGTGTCA GTGGCCCCAGGAAAGACGGCCACGATTACCTGTGCGGGA AACAAATATAGGAAGTAACAGTGTATCTGTGTAACACAG AAACAGGCTGGCCCTGTACTGTGCTGTCTATGATGAT
CB60	CEA	mixTIL	AGCGACCGGCCCTCAGGGATGTCTGAGCGGATCTCTGGC TCCAAATCCGGGAACACGGCCACCTGACCATCAGCAGG GTCGAGGCGGGGATGAGGCCGACTATCTTGTTCAGGTG TGGATCCTTAGTAGTGTATCACCCTCTATGTCTTCGGAAC GGACCCAGCTCACCGTTTGTAGGTGCGGCCCA [Seq ID 38] EEVQLVESGGDLIQPGGSLRLSCAASGFTVGSNYSWVR QAPKGLEWVSIVYSGGSTYYADSVKGRFTISRDNISKNT LYLQMNSLRAEDTAVYCVDRGDADFQGWTVTVSS GGVPGGGGGGGSSYALTQPPSVAPGKTATITCAG NNIGNSVYWYQQKPGAPLVIVYDDSDRPSGMSERFSG SKSGNTATLTISRVEAGDEADYSCQVMDPSDHLVYVFGT GTQLTVLGAAG [Seq ID 39] =CB41

Antibody	Antigen	Library used for selection	Nucleotide/Amino acid sequence
CB37/3B	CEA	Biblioteca de maturação baseada no clone CB37, como descrito no Exemplo 3	ATGGAGGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGGAGGCTTG ATCCAGCCGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTTGTGTAGCC TCTGAGTTCAACGTGAGAAGCAACTACATGAGCTGGGTC CGCCAGGCTCCAGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGTT ATGTATGACGGCGGTAGTACATACTACGCAGACTCCGTG AAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCTAAGAAC ACGGTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC ACGGCCGTCTATTACTGTGCGAGAGCGGATTGGGGTTG CCTACAATCGGCCCTTGGGAGATCTGGGGCCAAGGGACA ATGGTCACCGTCTCTTCAGGTGGAGCGGTTTCAGGCGGA GGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGTCCTATGTGCTGACT CAGCCACCCCTCGGTGTCTAGTGGCCCCAGGAAGACGGCC ACGATTACCTGTGCGGGAACAATATAGGAAGTAACAGT GTATACTGGTACCAACAAAAACCAGGCCTGGCCCCCTGTA CTGGTCGTCTATGATGATAGAGACCGGCCCTCAGGGATC CATGAGCGATTCTCTGGCTCCAAATCCGGGAACACGGCC ACCTTGACCATCAGCAGGCTCGAGGCCGGGATGAGGCC GACTATTCTTGTGTCAGGTGTGGGATCCTAGTAGTGATCAC CTCTATGTCTTCGGAACGGGACCCAGCTCACCGTTTTA GGTGGCGCCGC [Seq ID 10] MEEVQLVQSGGGLIQPGSLRLSCVASEFNVRSNYMSWV RQAPGKGLEWVSVMYDGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKN TVYLQMNSLR AEDTAVYYCARGGLGLPTIAPWEIWGQGT MVTIVSSGGGSGGGSGGGSSYVLTQPPSVSVAPGKTA TITCAGNNIGSNSVYWYQQKPLAPLVVYDDRD RPSGI HERFSGSKSGNTATLTISRVEAGDEADYSCQVWDPSSDH LYVFGTGTQLTVLGAA [Seq ID 11]

Antibody	Antigen	Library used for selection	Nucleotide/Amino acid sequence
CB37/9C	CEA	Biblioteca de maturação baseada no clone CB37, como descrito no Exemplo 3	ATCGAGGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGGAGGCTTG ATCCAGCCGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTTGTGTAGCC TCTGAGTTCAACGTCAGAAGCAACTACATGAGCTGGGTG CGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGTT ATGTATGACGGCGGTAGTACATACTACGCAGACTCCGTG AAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCTAAGAAC ACGGTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC ACGGCCGTCTATTACTGTGCGAGAGCGGATTGGGGTTG CCTACAATCGCGTCTTGGGAGATCTGGGGCCAAGGACA ATGGTCACCGTCTCTTCAGGTGGAGGCGGTTCAGGCGGA GGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGTCTATGTGCTGACT CAGCCACCCCTCGGTGTCACTGGCCCCAGGAAAGACGGCC ACGATTACCTGTGCGGGAACAATATAGGAAGTAACAGT GTATACTGGTACCAGCAGAAACCAGGCCTGGCCCCCTGTA CTGGTCGTCTATGATGATAGAGACCGGCCCTCAGGCTC CCCGGGCGATTCTCTGGCTCCAAATCCGGGAACACGGCC ACCCTGACCATCAGCAGGGTCGAGGCCGGGATGAGGCC GACTATTCTTGTGAGGTGTGGGATCCTAGTAGTGATCAC CTCTATGTCTTCGGAAGTGGGACCCAGCTCACCGTTTAA GGTGGCGCCGC [Seq ID 12] MEEVQLVQSGGGLIQPGGSLRLSCVASEFNVRSNYMSWV RQAPGKGLEWVSVMYDGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKN TVYLQMNSLRARED TAVYYCARGGLGLPTIASWEIWQGT MVTVSSGGGSGGGSGGGSSVLTQPPSVSVAPGKTA TITCAGNNIGSNSVYWYQQKPG LAPVLVYDDRDRPSGL PGRFSGSKSGNTATLTISRVEAGDEADYSCQVWDPSSDH LYVFGTGTQLTVLGAA [Seq ID 13]

Antibody	Antigen	Library used for selection	Nucleotide/Amino acid sequence
anti-SP2	SP2	scFV _{EC23}	ATGAGGAGGTCCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGCCCTTG GTACAGCCTGGGGGTCCCTGAGAAATCTCTTGTGTAGGC TCTGGATTACCTTCCGACAGCATGACATGAGCTGGGTC CGCAGGCTCCTGGGAAGGGCTGGAGTGGGTCCGAACT ATAAGTGAAGTGTCTGATAAACACATTTTACGCAGACTCC GTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCGAAG AACACGCTGTATCTGCAGATGAACACCCCTGAAAGCCGAC GACACGGCCGTATATTAATCTGCGAAGAAATATATAGAA CCAGGTGCTACCCGATTGACTACTGGGGCCAGAGAAC CTGGTCAACGCTCTCCTCAGGTGGAGCGGTTACGGCGGA GGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGGATGTTGTGATGACT CAGTCTCACCTCTCTGTCTCCGTACCCCTGGACAGCCG GCCTCATCTCTGCAAGTCTAGTCAGAGCCTCCTGTCAT AGTGAAGGAAAGACCTATTGTATTGGTACCTGCAGAAAG CCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGTATCTATGAAGTTTCC AACCGGTTCTCTGGAGTCCAGATAGGTTTCAGTGGCAGC GGTCAAGGACAGATTTCACACTGAAATCAGCCCGGTG GAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCCAAAGT ATACAGCTCCCGATCACCTTCGGCCCAAGGGACACGACTG GAGATTAAACGTGGGCGCG [Seq ID 40] MEEVQLVESGGALVQPGGSLRISCVSGFTFRQHDMSWV RQAPGKGLEWVATISGADNTFYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNLTAKADDTAVYCAKYLEPGATRFDYWGRT LVTSSGGGGSGGGSGGGSDVMTQSPSLSVTPGP ASISCKSSQSLHSDGKTYLYWYLOKPGQSPOLLIEVS NRFSGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGVYCMQS IQLPITFGQGRLEIKRAA [Seq ID 41]
mix7	MCF7	mixLib	GAGCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCGGAGGTGAAG

Antibody	Antigen	Library used for selection	Nucleotide/Amino acid sequence
		células	AAGCCTGGGGCCTCAGTGAGAGTTTCCTGCCAGGCATCT GGATACACATTCAGCAGGTACCATATGCACTGGGTGCGA CAGGCCCTTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGTGATC GACCCCAATAGTGGTAGAGTAAGTTACTCACAGAAGTTC CAGGACAGAGTTACCATGACCAGGGACACGTCCACGAGC ACAGTATACATGGAGCTGAACAGCCCGAGATCTGAGGAC ACGGCCGTTTATTATTGTGCGAGAGATCGAGGATATTGT AATGGTGGCAGGTGCTTTATGGATGCATTTGACTACTGG GGCCAGGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCAGGTGGAGGC GGTTTAGGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGTCC TATGTGCTGACTCACCACCCCTCATTGTCTGGGGCCCCA GGGCAGAGCATCACCATCTCCTGCACTGGGAGCAGTTCC AACATCGGGGCAGGTTTTTCATATACACTGGTACCAGCAG TTTCCAAAACAGCCCCCAAACCTCTTATCTATGGTAGT AGTAATCGACCCTCAGGGGTCCCTGACCGCTTCTCTGGC TCCAGGTCTGGCTCCTCAGGCTCCCTGGCCATCACTGGG CTCCAGGCAGACGATGAGGCTGATTATTACTGTGTGGGA TGGGATGGCAGCCTGAGTGGTTATGTCTTCGGAACCTGG ACCCAGCTCACCGTTTTAGGTGCCGCCGCA [Seq ID 16] EQVQLVQSGAEVKKPGASVRVSCQASGYTFSTRYHMHWR QAPGQGLEWMGVIDPNSGRVSYSQKFQDRVIMTRDTSTS TVYMEINSPREDAVYVCARDRGYCNGGRCFMDAFDYW GQGTMTVTVSSGGGGLGGGSGGGSSYVLTHPPSLGAP GQSITISCTGSSSNIGAGFHIHWYQQFPKTPAKLLIYGS SNRPSGVPDRFSGSRSGSSGLAITGLQADDEADYYCVG WDGSLSGYVFGTGTQLTVLGAA [Seq ID 17]

Antibody	Antigen	Library used for selection	Nucleotide/Amino acid sequence
mix8	MCF7 cells	mixLIB	GAGCAGGTGCAGCTGGTGCACTCTGGGGAGGGGTGGTC CAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT GGATTGAGCTTCAGTAACTATGTATGCACTGGGTCCGC CAGGCTCCAGSCAAGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATA TCACATGATGGAAGCAATAATATACTACGACAGCTCCGTG AAGGGCCGATTCACTCTCCAGAGACAATTCACAGAAC ACGCTATATCTGCAAAATGAAGCTGAGACCTGAGGAC ACGGCTGTGTAATTACTGTGCGAGAAAGTAGTGGTGGTAC CTTCTCTTTGAGCTTTTGATATCTGGGGCCCAAGGGACA ATGGTCACCGTCTCTTCAGGTGGAGGGGTTTCAGGCGGA GGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGGACATCCAGATGACC CAGTCTCCAGACTCCCTGCTGCTGTCTCTGGGGGAGAGG GCCACCATCACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTTATAC AGTCCAAACAATAAGAACTACTAGCTTGTGTAACAGCAG AAACCAGGACAGCTCTTAAGCTGCTCATTTACTGGGCA TCTACCCGGGAATCCGGTGTCCCTGACCCGATTCAGTGGC AGCGGCTCTGGGACAGATTTCACCTCACCACATCAGCAGC CTGCAGGCTGAAGATGTCGACGTTTATTTACTGTCAGCAA TATTATAGGATTCGGTGGACGTTCCGGCCCAAGGACGAAAG GTGGAATCAAAACGTGCGGGCCCA [Seq ID 42] EQVQLVQSGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFSFSNYVMHWVR QAPGKLEWVAVISHDGSNKYIADSVKGRFTISRDNKSN TLYLQMKSLRPEDTAVYCARSSGWYLLFDADFQWQGT MVTVSSGGGGSGGGGGGGSDIQMTQSPDSLPSLGER ATINCRSSQSVLYSSNNKYLAWYQKPGQPPKLLIYWA STRESGVDPDRFSGSGGTDFLTISLQAEADVAVYCCQ YYRIPWTFGGQTKVEIKRAA [Seq ID 43]

Antibody	Antigen	Library used for selection	Nucleotide/Amino acid sequence
mix11	MCF7 cells	mixLib	GAGGAGGTGCAGCTGTGTGACATCTGGGGGAGGTGTGGTA CGGCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT GGATTCACTTTGATGATTATGSCATGACCTGGTCCGC CAGGCTCCAGGAAGGGCTGGAGTGGTCTCAGCTATT AGTGGTAGTGTGTGTAGCACATCTACGAGACTCCGTG AAGGCCGGTTCGCCATCTCCAGAGACAATCCAGAAG ACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC ACGGCCGTATATTACTGTGCGAAATCTCGTACTATGAT AGTAGTGGTTATTACTACACCGTGGACCTGATGCTTTT GATATCTGGGCCAAGGGCAATGTTACCGTCTCTTCA GGTGAAGCGGTGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCG TCTTCTGAGCTGACTCAACACCTCAGTGTCCGTGTCC CCAGGACAGACAGCCATCATCACCTGCTCTGGAGATAAA TTGGGGGATAAATATGCTTCTCTGGTATCAGCACAGGCCA GGCCAGTCGCTGTCTTGGTCACTATCAGGATTCAGG CGGCTTCAGACATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAAAC TCTGGGAACACAGCCACTCTGACCATCACCGAGGCCAG GCTTTGGATGAGGCTGACTATTATTGTGAGGCTGGGCC GGCAGATCTGTGTCTTCGGCGGGGACCCAGCTCACC GTTTAGGTGCGGCCCA [Seq ID 44] EEVQLQLQSGGVVRPGLSLRLSCAASGFTFDDYGMWVR QAPGKLEWVSAISGSGSTYYADSVKGRFAISRDNKRN TLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKSRYYDSSGYVYTVRPDAF DIWQQAMVTVSSGGGGGGGGSSSELTQPPSVSVS PGQTAIITCSGDKLGDKYASWYQHRPGQSPVLVIYQDSR RPSDIPERFSGSNSGNTATLTITEAQLDEADYYCQAWA GRSVFVGGGTQLTVLGAAA [Seq ID 45]

Antibody	Antigen	Library used for selection	Nucleotide/Amino acid sequence
mix12	MCF7 cells	mixLIB	GAGGAGGTGCAGCTGTTGCAGTCTGGGGCGGAGGTGAAG AAGCCTGGGSCCTCAGTGAGAGTTTCTGCCAGGCATCT GGATACACATTCAGCAGGTACCATATGCACTGGGTGCGA CAGCCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGAGTGTATC GACCCCAATAGTGGTAGAGTAAGTTACTCACAGAAAGTTC CAGGACAGAGTCAACATGACACAGGGACACGTTACAGGAC ACAGTATACATGGAGCTGAACAGCCTGAGATCTGAGGAC ACGGCCGTTTATTTATGTCGAGAGATCGAGGATATTGT AATGGTGGCAGGTGCTTTATGATGCAATTGACTACTTGG GGCCAGGGACCAAGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGC GGTTCAGGGGAGGTGGCCCTGGCGGTGGCGGATCGTCC TATGTGCTGACTCAGCCACCCCTCAGCGTCTGGGGCCCCC GGACAGAGGGTCAACATCTCTTGTCTGGAAGCAACTCC AACATCGGACGTAATTGGGTATCTGTTACCGACCAACTC CCAGGAACGGCCCCCAAACTCCTCATGTTTAGGAATAAT GAACGGTCTCTCAGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCC AAGACTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTC CGGTCTGAGGATGAGGGTGATTACTACTGTGCATCATGG GATGACAGTCTGCATGCTTGGGTGTTCTGGCGGGGGACC CAGCTCACCGTTTATAGGTGGGGCCGCA [Seq ID 46] EEVQLQLQSGAEVKKPGASVRVSQASGYTFSRVYHMHVVR QAPGQGLEWMGVIDPNSGRVSYSQKFDQDRVTMTTRDTFTS TVYMEINSLRSEDYAVYCARDRGYCNNGRCFMDAFDYW GQGTTVTVSSGGGGGGGGGGSSVYVLTQPPPSASGAP GQRTVISCSSGNSNIGRNWVYVYQQLPGTAPKLLMFRNN ERSGVPDRFSGSKTGTSLAI SGLRSEDEGDYVCASW DDSLHAWVFGGTQLTVLGAAA [Seq ID 47]

Antibody	Antigen	Library used for selection	Nucleotide/Amino acid sequence
mix17	MCF7 cells	mixLIB	GAGCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGAGGCTTGGTA CAGCCTGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT GGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGC CAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGTCTCAGCTATT AGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTAGCAGACTCCGTG AAGGCCGGTTACCAATCTCCAGAGAGAAATCCAAGAAC ACGCTATATCTGCAAAATGAATAGCTGAGAGCCGAGGAC ACGGCTGTATTAATCTGTGGGCAAGGACAAACAGAGTCCGT GCTTTGATATCTGGGGCCAAAGGACAAATGGTCAACGTC TCTTCAGGTGGAGCGGTTTCAGGGGAGGTGGCTCTGGC GGTGGCGGATCGGACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCC GCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGGCAGAGTCACCATCACT TGCCGGCAAGTCAGAGCACTAGTAGCGATTAAATGG TATCAGCAAGAACAGGGAAGCCCTAAACTCCTGATC TCTGTTCATCCACTTTACAAAGTGACGTCCCATCAAGG TTCAGTGGCAGTGGTCTCTGGACAGATTTCACTCTCACC ATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGACTTTGCAACTTACTTC TGTCACACAGAGTTACAGCACCCCGTACACTTTTGGCCAG GGGACCAAAGTGGATATCAAAACGTGCGGCCGCA [Seq ID 18] EQVQLVQSGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVR QAPKGLEWVSAISGSGSTYYADSVKGRFTISRENSKN TLYLQMNSLRATEDTAVYCARQTRVRAFDIWQGTMTV SSGGSGSGGGSGGGSDIQMTQSPSALSASVGGRTIT CRASQSTSSDLNWKYQORPGKAPKLLISVASTLQSDVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQSYSTPYTFGQ GTKVDIKRAAA [Seq ID 19]

Antibody	Antigen	Library used for selection	Nucleotide/Amino acid sequence
mix23	MCF7 cells	mixLIB	GAGGAGGTGACAGCTGAGTGGAGTCTGGGGGAAACTTGGTCT CAGCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGACGCCTCT GGATTCACTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGC CAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAATGGGTCTCAGCTATT AGTGCTAGTGGTGGCACCACATACACGAGATTCCGCTG AAGGCCGGTTCAACATCTCCAGAGACAATTCCAAGAAC ACGCTGTATCTTCAATGAACAGCCTGAGAACTGAGGAC ACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGACAGCCGTGCATAC AGCTATGGTTACCTCTACGTCTTTGACTACTGGGGCCAG GGCACCTGGTCAACCGTCTCTCAGGTGGAGGCGGTCA 3GCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGAGTCTGCC CTGACTCAGCCTGCCCTCCGTGTCTGGGTCTCTCTGGACAG TCGATCACCATCTCCTGCACCTGGAACCCAGCAATGATGTT 3GGAGTTATAACCTTGCTCTCCTGGTACCAACAACACCCA 3GCAAAGCCCCCAAACTCCTGATTTATGAGGGCAGTAAG CGCCCTCAGGGATTCTTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAG TCGGCAACACCGCCTCCCTGACCACTCTCTGGGCTCCAG 3CTGAGGACGAGGTGATTATTACTGCAATGTCATATACG AGCAGTGGCACTCCTTATGTCTTCGGAACCTGGGACCCAG CTCACCGTTTTAGGTGCGGCGCA [Seq ID 48] EEVQLVESGNNLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR QAPKGLEWVSAISASGGTTYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNLSLRTEDEVYCARDSPRAYSYGYLYVFDYWGQ GTLVTVSSGGGGGGGGGGGGGSSQSAITQPASVSGSPGQ SITISCTGTSNDVGSYNLVSWYQQHPKAPKLLIYEGSK RPSGISNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCMST SSGTPYVFGTGTLTVLGAAA [Seq ID 49]

Antibody	Antigen	Library used for selection	Nucleotide/Amino acid sequence
mix25	MCF7 cells	mixLIB	GAGGAGGTGAGCTGGTGGAGTCTGGGGCTGAGGTGAAG AAGCCTGGGGCCTCAGTGAGAGTTCCTGCCAGGCATCT GGATACACATTACCCAGGTACCATATACACTGGGTGCGA CAGGCCCTGGACAAGGGCTGAGTGGATGGGAGTGATC GACCCCAATAGTGGTAGAATAAGTTACTCACAGAAAGTTC CAGGACAGAGTCACCATGACAGGGGACACGTCCACGAGC ACAGTCTACATGGAGCTGAACAGCCTGAGATCTGAGGAC ACAGCCATTATTACTGTGCGAGAGATCGAGGATATTGT AATGTTGGCAGGTGCTTTATGGATGCAATTGACTACTGG GGCCAGGGGACCAAGGTACCGTCTCCTCAGGTGGAGGC GGTTCAGGGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGCAG TCTGTGTTGACGAGCGGCCCTCAGCGTCTGGGACCCCC GGCAGAGGGTCACCATCGCTGTGTTCTGGAAGCAGCTCC AACATCGGAATTAATACTGTAACTGTTACCCAGCAGATC CCAGGAACGGCCCCCAACTCCTCATCTATAATAATGAT CAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCC AAGTCTGCCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGGCTC CAGGTTGACGATGAGGCTGATTATTACTGCCAGTCCCTAT GACAGCAGCCTGGGTGTTATGTTCTTCGGAACCTGGGACC CAGCTCACCGTTTAGGTGGGGCCGCA [Seq ID 50] EEVQLVESGAEVKKPGASVRVSCQASGYTFTRYHHWVR QAPGQGLEWMGVDPNSGRISYSQKFDQDRVTWTRDTS TVYMEINSLRSEDTAIYYCARDRGYCNIGRCFMDAFDYW GQGTIVTVSSGGGGSGGGGGSGQSQSVLTQPPSASGTP GQRTIACSGSSSNIGINTVNWYQIIPGTAPKLLIYNND QRPSPVDFRFSKSKSATSLAITGLQVDDEADYYCQSY DSSLGGYVFGTGTQLTVLGA [Seq ID 51]

Antibody	Antigen	Library used for selection	Nucleotide/Amino acid sequence
mix39	MCF7 cells	mixLIB	GAGGAGGTGCAGCTGTTGCAGTCTGCGGGAGGCGTGGTC CAGCCTGGGAGGTCCTGAGACTCTCTCTGTGACGCTCT GGATTGAGCTTCACTAATCTATGTTATGCACTGGGTCCGC CAGGCTCCAGGCAAGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATA TCATATGATGGAAGCAATAAATACTACGCAGACTCCGTG AAGGCCGATTCAACCAATCTCCAGAGACAATTCGAAGAAC ACGCTATATCTGCAAAATGAAGGCTGAGACCTGAGGAC ACGCTGTGTATTAATCTGTCGAGAGTAGTGGCTGGTAC CTTCTCTTTGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAAGGACA ATGGTCACCGTCTCTTCAGGTGGAGCGGCTTCAGCGGA GGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGGATGTTGTGATGACA CAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTCTGCTGGCGGAGAGG GCCACCATCAACTGCGAGTCCAGCCAGAGTGTTTTATTC AGCTCCAACAATAAGAACTACTTAGCTTGGTACCAGCAG AAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCAATTAATGCGCA TCTACCCGGGAATCCGGGTCCCTGACCGATTCACTGGC AGCGGTCTGAGACAGATTCTACTCTCACCATCAGCAGC CTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTAATCTGTCAGCAA TATTATAGGATTCCGTGGACGTTCCGGCCCAAGGACCAAA GTGATATCAAAACGTGCGGGCCCA [Seq ID 20] EEVQLQSGGTVQPGRLRLSLCAASGFSFNSVYMHVVR QAPKGLEWVAVISYDGSNKYVADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMKGLRPEDTAVYYCARSSGWYLLFDAPDIWGQGT MVTVSSGGSGSGSGSGSGSDVMTQSPDSLAVSLGER ATINCESSQSVLFSSNNKNYLAWYQQKPKPPKLLIYWA STRESGVPRFSGSGSETDFTLTISLQAEDEVAVYCCQ YYRIPWTFGGTKVDIKRAAA [Seq ID 21]

Antibody	Antigen	Library used for selection	Nucleotide/Amino acid sequence
B96/4F	MCF7 cells	scFvB96	ATGCAGCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTTG GTACAGCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCTCTGTGCAGCC TCTGGATTACCTTTAGTACTTATGCCATGAGCTGGGTC CGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGTCTCAGTT ATTAGTGGTAGTGGTCAATACAACAATACCCGACTCC GTGAAGGGCCGCTCACCATATCCAGAGACAATCCCAAG AACACACTATATCTGCAAAATCAACAGCTGAGAGCCGAC GACACGGCCGTGTTACTGTGCGAGAGATGTGTAGTC CTACAGAAATGCTTTTGTATATCTGGGGCCAAAGGACCAAG GTCACCGTCTCTCAGGTGGAGGTGTTTCAGGCGGAGGT GGCTCTGGGGTGGCGGATCGGATGTGTGATGACCCAG TCTCCATCTCTCACTGTCTGCACTCTGTAGGAGACAGATC ACCATCACTTGTGGGGGAGTCAGGTTATTAGCAGGTGG TTAGCCTGGTATCAACACAAACAGGGAAAGCCCTAAG CTCCTGATCTACGCTGCATCCAGTTTGCAAAAGTGGGTC CCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTC ACTCTCACCATPCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTGTGCA ACTTACATCTGTCAACAGAGTTACAGTAGGCGGCTCACT TTCGGCGGAGGACCAAGGTGGAATCAAAACGTGCGGCC GCA [Seq ID 52] MEQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYAMSWV RQAPGKGLEWVSIVSGSGHTINPADSVKGRVITSRDNSK NTLYLQINSRLRADDYAVYCARDVFLVQNADFINGQGT VTVSSGGGGGGGGGGSDVMTQSPSSLSASVGRV TITCRASQGISRWLAWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGV PSRFGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYICQQSYSRPLT EGGTTKVEIKRAAA [Seq ID 53]

Antibody	Antigen	Library used for selection	Nucleotide/Amino acid sequence
B96/11L	MCF7 cells	scFvB96	GAGCAGGTGCAGCTCCAGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTA CAGCCTGGGGGTCCTGAGACTCTCTGTGAGCCTCT GGATTCACTTTAGTACTTATGCCATGAGCTGGGTCCGC CAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGTCTCAGTTATT AGTGGTAGTGGTCATACAACTACCCGACTCCGTG AAGGCCCGGTCCATATCCAGAGACAAATCCAGAAGAC ACACTATATCTGCAATCAACAGCCTGAGCCGACGAC ACGGCCGTGATTAATCTGTCGAGAGATGTGTAGTCTTA CAGATGCTTTTGTATATCTGGGCCAAGGACCCAGGTC ACGTCCTCAGGTGGAGTGGTTCAGCGGAGGTGGC TCTGGCGTGGCGGATCGGATGTTGTGATGACCCAGTCT CCATCCTCACTGCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC ATCACTTGTGGGGAGTCAGGGTATTAGCAGGTGGTTA GCCTGGTATCAACAGAAACAGGGAAGCCCTAAGCTC CTGATCTACGCTGCATCCAGTTTGCAAGTGGGTCCCA TCAAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGACAGATTCACT CTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCACT TACATCTGTCAACAGAGTTACAGTAGGCGCTCACTTC GGCGAGGGACCAAGGTGGAATCAAAACGTGGCGCCGCA [Seq ID 14] EQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYAMSWVR QAPKGLEWVSVISGSGHTINYADSVKGRVTVISRDNSKN TLYLQINSLRADDITAVYCARDVLVQLQNAFDIWGGTTV TVSSGGGSGGGGGSGGSDVMTQSPSSLSASVGDRTI ITCRASQGISRWLAHWYQQKPGKAPKLLIYAASLSQGV SRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYICQQSYSRPLTF GGGTKEIKRAAA [Seq ID 15]

Tabela 6. Valores cinéticos de anticorpos de cadeia única parentais ou de afinidade maturada. O anticorpo anti-CEA parental CB37 não é estável na forma solúvel. Os anticorpos de cadeia única maturados têm afinidade nanomolar. K_a = constante de associação, K_d = constante de dissociação, $K_D = K_a/K_d$, SE = erro padrão. Os dados estão expressos em Molar.

scFv	k_a (+/-SE)	k_d (+/-SE)	K_D
MB5	2.13E+04 (2.45E+02)	8.55E-03 (6.25E-05)	4.01E-07
MB5/C'1	1.53E+05 (4.15E+02)	1.45E-03 (1.29E-05)	9.46E-09
MB5/C'3	7.11E+04 (4.33E+02)	1.64E-03 (2.46E-05)	2.31E-08
CB37	-	-	-
CB37/3B	1.27E+05 (9.79E+02)	1.42E-04 (3.23E-05)	3.66E-09
CB37/9C	1.00E+05 (5.75E+02)	4.65E-04 (2.54E-05)	1.42E-09

Este estudo com Biacore fornece medidas quantitativas do de ligação antígeno scFv e cinéticas de dissociação. O Quadro 6 mostra os valores cinéticos do scFvs parentais e de afinidade maturados. Os anticorpos antiMUC1 MB5/C'1 e MB5/C'3 maturados têm mais de 42 vezes e 17 vezes maior afinidade ao antígeno, em comparação com MB5, respectivamente. Os anticorpos anti-CEA maturados CB37/3B e CB37/9C têm afinidade nanomolar. Além disso, os anticorpos maturados são mais estáveis que o CB37 original, que não é reactivo na forma solúvel. Estes resultados indicam que o vector pKM19 é uma ferramenta adequada para a maturação dos anticorpos scFv.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> SIGMA-TAU Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.A TECHNOGEN S.C.p.A MINENKOVA, Olga PAVON Emiliano

<120> vector for efficient selection and/or maturation of an antibody and uses thereof

<130> PCT 96530

<150> EP0 502 8501.4 <151> 2005-12-27

<160> 102

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 3770

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 1

gcccatacgc caaacgcct cccccgcgc gttggccgat tcattaatgc agctggcacg	60
acaggtttcc cgactggaaa gcgggcagtg agcgcaacgc aattaatgtg agttagctca	120
ctcattaggc accccaggct ttacacttta tgcctccggc tcgtatgttg tgtggaattg	180
tgagcggata acaatttcac acaagatcta gctattctag agattacgcc aagccccgta	240
ttttacccgt ttaatggaag cttataaagg aggaaatcct catgaaatag agcaccatcg	300
cactggcact gttaccgtta ctgttcaccc cggttaccaaa agcacgtacc atggtttccc	360
ttgcgccgc aggagactac aaagacgacg acgacaaaga attcctgcct caacctcctg	420
tcaatgctgg cggcggctct ggtggtggtt ctggtggcgg ctctgagggt ggcggctctg	480
agggtggcgg ttctgagggt ggcggctctg aggggtggcgg ttccggtggc ggctccggtt	540
ccggtgattt tgattatgaa aaaatggcaa acgctaataa gggggctatg accgaaaatg	600
ccgatgaaaa cgcgctacag tctgacgcta aaggcaaaact tgattctgtc gctactgatt	660
acggtgctgc tatcgatggt ttcatgggtg acgtttccgg ccttgctaataa ggtaatgggtg	720
ctactggtga ttttgctggc tctaattccc aaatggctca agtcggtgac ggtgataatt	780
cacctttaat gaataatttc cgtcaatatt taccttcttt gcctcagtcg gttgaatgtc	840
gcccttatgt ctttggcgtt ggtaaaccat atgaattttc tattgattgt gacaaaataa	900
acttattccg tgggtgtcttt gcgtttcttt tatatgttgc cacctttatg tatgtatttt	960
cgacgtttgc taacatactg cgtaataagg agtccttaagg atcctaataat tgttctggat	1020
attaccagca aggccgatag tttgagttct tctactcagg caagtgatgt tattactaat	1080
caaagaagta ttgcgacaac ggttaatttg cgtgatggac agactctttt actcgggtggc	1140
ctcactgatt ataaaaacac ttctcaggat tctggcgtac cgttcctgtc taaaatccct	1200
ttaatcggcc tcctgttttag ctcccgctct gattctaacg aggaaagcac gttatacgtg	1260
ctcgtcaaag caaccatagt acgcgccctg tagcggcgca ttaagcgcgg cgggtgtggt	1320

ggttacgcgc agcgtgaccg ctacacttgc cagcgcccta gcgcccgtc ctttcgcttt	1380
cttcccttcc tttctcgcca cgttcgccgg ctttccccgt caagctctaa atcgggggct	1440
cccttttaggg ttccgattta gtgctttacg gcacctcgac cccaaaaaac ttgattaggg	1500
tgatggttca cgtagtgggc catcgccctg atagacgggt tttcgccctt tgacgttga	1560
gtccacgttc tttaatagtg gactcttggt ccaaactgga acaacactca accctatctc	1620
ggctctattct tttgatttat aagggaattt gccgatttcg gcctattggt taaaaaatga	1680
gctgatttaa caaaaattta acgcgaattt taacaaaata ttaacgttta caatttaa	1740
atttgcttat acaatcttcc tgtttttggg gcttttctga ttatcaaccg gggtagatat	1800
gattgacatg ctagttttac gattaccgtt catcgagggt ggcacttttc ggggaaatgt	1860
gcgcggaacc cctatttggt tatttttcta aatacttca aatatgtatc cgctcatgag	1920
acaataaccc tgataaatgc ttcaataata ttgaaaagg aagagtatga gtattcaaca	1980
tttccgtgtc gcccttattc ctttttttgc ggcattttgc cttcctgttt ttgctcacc	2040
agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat	2100
cgaactggat ctcaacagcg gtaagatcct tgagagtttt cgcgccgaag aacgttttcc	2160
aatgatgagc acttttaag ttctgctatg tggcgcggtta ttatcccgtta ttgacgccg	2220
gcaagagcaa ctcggtcgcc gcatacacta ttctcagaat gacttggttg agtactcacc	2280
agtcacagaa aagcatctta cggatggcat gacagtaaga gaattatgca gtgctgccat	2340
aaccatgagt gataacactg cggccaactt acttctgaca acgatcggag gaccgaagga	2400
gctaaccgct tttttgcaca acatggggga tcatgtaact cgccttgatc gttgggaacc	2460
ggagctgaat gaagccatac caaacgacga gcgtgacacc acgatgcctg tagcaatggc	2520
aacaacgttg cgcaactat taactggcga actacttact ctagcttccc ggcaacaatt	2580
aatagactgg atggaggcgg ataaagtgc aggaccactt ctgcgctcgg ccttccggc	2640
tggctggttt attgctgata aatctggagc cggtagcgt gggctctcgg gtatcattgc	2700
agcactgggg ccagatggta agccctcccg tatcgtagtt atctacacga cggggagtca	2760
ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca	2820
ttggtaactg tcagaccaag ttactcata tatacttttag attgatttaa aacttcattt	2880
ttaatttaaa aggatctagg tgaagatcct ttttgataat ctcatgacca aaatccctta	2940
acgtgagttt tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg	3000
agatcctttt tttctgcgg taatctgctg cttgcaaaca aaaaaaccac cgctaccagc	3060
ggtggtttgt ttgccggatc aagagctacc aactctttt cgaaggtaa ctggcttcag	3120
cagagcgag ataccaata ctgtccttct agtgtagccg tagttaggcc accacttcaa	3180
gaactctgta gcaccgcta catacctcgc tctgctaate ctgttaccag tggctgctgc	3240
cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc	3300
gcagcggtcg ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttggagc gaacgaccta	3360

caccgaactg agatacctac agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc ccgaagggag	3420
aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag ggtcgggaaca ggagagcgca cgagggagct	3480
tccaggggga aacgcctggt atctttatag tcctgtcggg ttctgccacc tctgacttga	3540
gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc	3600
ggccttttta cggttcctgg ccttttgctg gccttttgct cacatgttct ttctgcgtt	3660
atccccctgat tctgtggata accgtattac cgcctttgag tgagctgata ccgctcgccg	3720
cagccgaacg accgagcgca gcgagtcagt ggcgaggaa gcggaagagc	3770

<210> 2
 <211> 738
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(738)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (274)..(274)
 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (387)..(387)
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 2

```

caccgaactg agatacctac agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc ccgaagggag 3420
aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag ggtcgggaaca ggagagcgca cgagggagct 3480
tccaggggga aacgcctggt atctttatag tcctgtcggg ttctgccacc tctgacttga 3540
gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc 3600
ggccttttta cggttcctgg ccttttgctg gccttttgct cacatgttct ttctgcgtt 3660
atccccctgat tctgtggata accgtattac cgcctttgag tgagctgata ccgctcgccg 3720
cagccgaacg accgagcgca gcgagtcagt ggcgaggaa gcggaagagc 3770

```

```

<210> 2
<211> 738
<212> DNA
<213> Escherichia coli

```

```

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(738)

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (274)..(274)
<223> n is a, c, g, or t

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (387)..(387)
<223> n is a, c, g, or t

```

```

<400> 2

```

gag gtg cag ctg gtg gag tct gga gct gag gtg aag aag ccc ggg gcc Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala 1 5 10 15	48
tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc acc gcc tcc Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ala Ser 20 25 30	96
tat atg cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met 35 40 45	144
gga tgg ttc aac cct aat agt ggt ggc aca aac tat gca cag aag ttt Gly Trp Phe Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe 50 55 60	192
cag ggc agg gtc acc atg acc ggg gac acg tcc acc agc aca gcc tat Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Gly Asp Thr Ser Thr Ser Thr Gly Tyr 65 70 75 80	240
atg gag ctg agc agg ctg aca tct gac gac gcg gcc gtg tat tat tgt Met Glu Leu Ser Arg Leu Thr Ser Asp Asp Ala Xaa Val Tyr Tyr Cys 85 90 95	288
gcg aga gat cgg gcc tct gct atg ggc gtc tgg ggc caa gcc acc ctg Ala Arg Asp Arg Ala Ser Ala Met Gly Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu 100 105 110	336
gtc acc gtc tcc tca ggt gga gcc ggt tca gcc gga ggt gcc tct gcc Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly 115 120 125	384
ggh ggc gga tcg cag tct gcc ctg act cag cct gcc tcc gcg tcc ggg Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Ala Ser Gly 130 135 140	432
tct cct gga cag tca gtc acc atc tcc tgc act gga acc agc agt gac Ser Pro Gly Gln Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp 145 150 155 160	480
gtt ggt ggt tat aac tat gtc tcc tgg tac caa cag cac cca gcc aaa Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys 165 170 175	528
gcc ccc aaa ctg atg att tat gac gtc aat aag cgg ccc tca ggg gtc Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val 180 185 190	576
cct gat cgc ttc tct ggc tcc aag tct ggc aac acg gcc tcc ctg acc Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr 195 200 205	624
gtc tct ggg ctg cag gct gag gat gag gct gat tat tac tgc agc tca Val Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser 210 215 220	672
tat gca ggt agt aac act ttc cta ttc ggc gga ggg acc cag ctg acc Tyr Ala Gly Ser Asn Thr Phe Leu Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr 225 230 235 240	720
gtt tta ggt gcg gcc gca Val Leu Gly Ala Ala Ala 245	738

<210> 3

<211> 248

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<220>

<221> misc_feature

<222> (92)..(92)

<223> The 'Xaa' at location 92 stands for Thr, Ala, Pro, or Ser.

<400> 3

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

Ala Arg Asp Arg Ala Ser Ala Met Gly Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Ala Ser Gly
130 135 140

Ser Pro Gly Gln Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp
145 150 155 160

Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys
165 170 175

Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val
180 185 190

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr
195 200 205

Val Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser
210 215 220

Tyr Ala Gly Ser Asn Thr Phe Leu Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr
225 230 235 240

Val Leu Gly Ala Ala Ala
245

<210> 4
<211> 743
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(741)

<400> 4

atg gag gag gtg cag ctg cag gag tct gga gct gag gtg aag aag ccc	48
Met Glu Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro	
1 5 10 15	
ggg gcc tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc acc	96
Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr	
20 25 30	
gcc tcc tat atg cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag	144
Ala Ser Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu	
35 40 45	
tgg atg gga tgg ttc aac cct aat agt ggt ggc aca aac tat gca cag	192
Trp Met Gly Trp Phe Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln	
50 55 60	

aag ttt cag ggc agg gtc acc atg acc ggg gac acg tcc acc agc aca Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Gly Asp Thr Ser Thr Ser Thr 65 70 75 80	240
ggc tat atg gag ctg agc agg ctg aca tct gac gac gcg gcc gtg tat Gly Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Thr Ser Asp Asp Ala Ala Val Tyr 85 90 95	288
tat tgt gcg aga gat cgg gcc tct gct atg ggc gtc tgg gcc caa gga Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Ala Ser Ala Met Gly Val Trp Gly Gln Gly 100 105 110	336
acc ctg gtc acc gtc tcc tca ggt gga ggc ggt tca ggc gga ggt ggc Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly 115 120 125	384
tct ggc ggt ggc gga tcc cag tct gcc ctg act cag cct gcc tcc gtg Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val 130 135 140	432
tct ggc tct cct gga cag tct atc acc atc tcc tgc act gga acc agc Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser 145 150 155 160	480
agt gac gtt ggt ggt tat aac tat gtc tcc tgg tac caa cag cac cca Ser Asp Val Gly Tyr Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro 165 170 175	528
ggc aaa gcc ccc aaa ctc atg att tat gat gtc agt cat cgg ccc tca Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Ser His Arg Pro Ser 180 185 190	576
ggg att tct aat cgc ttc tct gcc tcc aag tct ggc aac acg gcc tcc Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser 195 200 205	624
ctg acc atc tct agg ctc cag gct gag gac gag gct gat tat tac tgc Leu Thr Ile Ser Arg Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys 210 215 220	672
agc tca tat aca agc agt aac act ttc atc ttc gga act ggc acc cag Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Asn Thr Phe Ile Phe Gly Thr Gly Thr Gln 225 230 235 240	720
ctc acc gtt tta ggt gcg gcc gc Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala 245	743

<210> 5

<211> 247

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 5

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

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

Ala Ser Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Met Gly Trp Phe Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln
50 55 60

Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Gly Asp Thr Ser Thr Ser Thr
65 70 75 80

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

Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Ala Ser Ala Met Gly Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val
130 135 140

Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser
145 150 155 160

Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro
165 170 175

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Ser His Arg Pro Ser
180 185 190

Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser
195 200 205

Leu Thr Ile Ser Arg Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
210 215 220

Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Asn Thr Phe Ile Phe Gly Thr Gly Thr Gln
225 230 235 240

Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala
245

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(741)

<600> 6

```
atg gag cag gtg cag ctg gtg cag tct gga gct gag gtg aag aag ccc
Met Glu Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
1      5      10      15
```

48

ggg gcc tca gtg aag gtc tcc tgc aag gcc tct gga tac acc ttc acc Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr 20 25 30	96
gcc tcc tat atg cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag Ala Ser Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu 35 40 45	144
tgg atg gga tgg ttc aac cct aat agt ggt ggc aca aac tat gca cag Trp Met Gly Trp Phe Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln 50 55 60	192
aag ttt cag ggc agg gtc acc atg acc ggg gac acg tcc acc agc aca Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Gly Asp Thr Ser Thr Ser Thr 65 70 75 80	240
ggc tat atg gag ctg agc agg ctg aca tct gac gac gcg gcc gtg tat Gly Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Thr Ser Asp Asp Ala Ala Val Tyr 85 90 95	288
tat tgt gcg aga gat cgg gcc tct gct atg ggc gtc tgg ggc caa ggc Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Ala Ser Ala Met Gly Val Trp Gly Gln Gly 100 105 110	336
acc ctg gtc acc gtc tcc tca ggt gga ggc ggt tca ggc gga ggc ggc Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly 115 120 125	384
tct ggc ggt ggc gga tcg cag tct gcc ctg act cag cct gcc tcc gtg Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val 130 135 140	432
tct ggg tct cct gga cag tcg atc acc atc tcc tgc act gga acc agc Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser 145 150 155 160	480
agt gac gtt ggt ggt tat aac tat gtc tcc tgg tac caa cag cac cca Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro 165 170 175	528
ggc aaa gcc ccc aaa ctc atg att tat gat gtc act aat cgg cct tca Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Thr Asn Arg Pro Ser 180 185 190	576
ggg gtt tct agt cgc ttc tct ggc tcc aag tct ggc aac acg gcc tcc Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser 195 200 205	624
ctg acc atc tct gga ctc cag act gag gac gag gct gat tat tac tgc Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys 210 215 220	672
aac tca ttt aca agc agc aac act tat gtc ttc gga act ggg acc cag Asn Ser Phe Thr Ser Ser Asn Thr Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Gln 225 230 235 240	720
ctc acc gtt tta ggt gcg gcc gc Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala 245	743

<210> 7

<211> 247

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 7

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

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

Ala Ser Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Met Gly Trp Phe Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln
50 55 60

Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Gly Asp Thr Ser Thr Ser Thr
65 70 75 80

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

Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Ala Ser Ala Met Gly Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val
130 135 140

Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser
145 150 155 160

Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro
165 170 175

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Thr Asn Arg Pro Ser
180 185 190

Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser
195 200 205

Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
210 215 220

Asn Ser Phe Thr Ser Ser Asn Thr Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Gln
225 230 235 240

Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala
245

<210> 8

<211> 750

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (750)

<400> 8

gag gag gtg cag ctg gtg cag tct gga gga ggc ttg atc cag ccg ggg Glu Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly 1 5 10 15	48
ggg tcc ctg aga ctc tct tgt gta gcc tct gag ttc aac gtc aga agc Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Glu Phe Asn Val Arg Ser 20 25 30	96
aac tac atg agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg Asn Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp 35 40 45	144
gtc tca gtt atg tat gac ggc ggt agt aca tac tac gca gac tcc gtg Val Ser Val Met Tyr Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val 50 55 60	192
aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tct aag aac acg gtg tat Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr 65 70 75 80	240
ctt caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gtc tat tac tgt Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95	288
ggc aga ggc gga ttg ggg ttg cct aca atc gcg tct tgg gag atc tgg Ala Arg Gly Gly Leu Gly Leu Pro Thr Ile Ala Ser Trp Glu Ile Trp 100 105 110	336
ggc caa ggg aca atg gtc acc gtc tct tca ggt gga ggc ggt tct ggc Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly 115 120 125	384
gga ggt ggc tct ggc ggt ggc gga tcc tcc tat gtg ctg act cag cca Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro 130 135 140	432
ccc tcg gtg tca gtg gcc cca gga aag acg gcc acg att acc tgt gcg Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys Thr Ala Thr Ile Thr Cys Ala 145 150 155 160	480
gga aac aat ata gga agt aac agt gta tac tgg tac cag cag aaa cca Gly Asn Asn Ile Gly Ser Asn Ser Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro 165 170 175	528
ggc ctg gcc cct gta ctg gtc gtc tat gat gat aga gac cgg ccc tca Gly Leu Ala Pro Val Leu Val Val Tyr Asp Asp Arg Asp Arg Pro Ser 180 185 190	576
ggg atc cct gag cga ttc tct ggc tcc aaa tcc ggg aac acg gcc acc Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Thr 195 200 205	624
ctg acc atc agc agg gtc gag gcc ggg gat gag gcc gac tat tct tgt Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Ser Cys 210 215 220	672
cag gtg tgg gat cct agt agt gat cac ctc tat gtc ttc gga act ggg Gln Val Trp Asp Pro Ser Ser Asp His Leu Tyr Val Phe Gly Thr Gly 225 230 235 240	720
acc cag ctc acc gtt tta ggt gcg gcc gca	750

Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala
245 250

<210> 9

<211> 250

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 9

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

225

230

235

240

Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala
 245 250

<210> 10

<211> 752
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(750)

<400> 10

atg gag gag gtg cag ctg gtg cag tct gga gga ggc ttg atc cag cgg Met Glu Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro 1 5 10 15	48
ggg ggg tcc ctg aga ctc tct tgt gta gcc tct gag ttc aac gtc aga Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Glu Phe Asn Val Arg 20 25 30	96
agc aac tac atg agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag Ser Asn Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu 35 40 45	144
tgg gtc tca gtt atg tat gac ggc ggt agt aca tac tac gca gac tcc Trp Val Ser Val Met Tyr Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser 50 55 60	192
gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tct aag aac acg gtg Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val 65 70 75 80	240
tat ctt caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gtc tat tac Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr 85 90 95	288
tgt gcg aga ggc gga ttg ggg ttg cct aca atc gcg cct tgg gag atc Cys Ala Arg Gly Gly Leu Gly Leu Pro Thr Ile Ala Pro Trp Glu Ile 100 105 110	336
tgg ggc caa ggg aca atg gtc acc gtc tct tca ggt gga ggc ggt tca Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser 115 120 125	384
ggc gga ggt ggc tct ggc ggt ggc gga tcg tcc tat gtg ctg act cag Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Tyr Val Leu Thr Gln 130 135 140	432
cca ccc tcg gtg tca gtg gcc cca gga aag acg gcc acg att acc tgt Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys Thr Ala Thr Ile Thr Cys 145 150 155 160	480
gcg gga aac aat ata gga agt aac agt gta tac tgg tac caa caa aaa Ala Gly Asn Asn Ile Gly Ser Asn Ser Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys 165 170 175	528
cca ggc ctg gcc cct gta ctg gtc gtc tat gat gat aga gac cgg ccc Pro Gly Leu Ala Pro Val Leu Val Val Tyr Asp Asp Arg Asp Arg Pro 180 185 190	576
tca ggg atc cat gag cga ttc tct ggc tcc aaa tcc ggg aac acg gcc Ser Gly Ile His Glu Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala 200 205 210 215 220 225 230 235 240	624

195					200					205						
acc	ctg	acc	atc	agc	agg	gtc	gag	gcc	ggg	gat	gag	gcc	gac	tat	tct	672
Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Gly	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Ser	
210					215					220						
tgt	cag	gtg	tgg	gat	cct	agt	agt	gat	cac	ctc	tat	gtc	ttc	gga	act	720
Cys	Gln	Val	Trp	Asp	Pro	Ser	Ser	Asp	His	Leu	Tyr	Val	Phe	Gly	Thr	
225					230					235					240	
ggg	acc	cag	ctc	acc	gtr	tta	ggg	gcg	gcc	gc						752
Gly	Thr	Gln	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Ala	Ala							
					245					250						

<210> 11

<211> 250

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 11

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

<210> 12
 <211> 752

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(750)

<400> 12

atg gag gag gtg cag ctg gtg cag tct gga gga ggc ttg atc cag ccg	48
Met Glu Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro	
1 5 10 15	
ggg ggg tcc ctg aga ctc tct tgt gta gcc tct gag ttc aac gtc aga	96
Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Glu Phe Asn Val Arg	
20 25 30	
agc aac tac atg agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag	144
Ser Asn Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu	
35 40 45	
tgg gtc tca gtt atg tat gac ggc ggt agt aca tac tac gca gac tcc	192
Trp Val Ser Val Met Tyr Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser	
50 55 60	
gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tct aag aac acg gtg	240
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val	
65 70 75 80	
tat ctt caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gtc tat tac	288
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr	
85 90 95	
tgt gcg aga ggc gga ttg ggg ttg cct aca atc gcg tct tgg gag atc	336
Cys Ala Arg Gly Gly Leu Gly Leu Pro Thr Ile Ala Ser Trp Glu Ile	
100 105 110	
tgg ggc caa ggg aca atg gtc acc gtc tct tca ggt gga ggc ggt tca	384
Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser	
115 120 125	
ggc gga ggt ggc tct ggc ggt ggc gga tcc tcc tat gtg ctg act cag	432
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Tyr Val Leu Thr Gln	
130 135 140	
cca ccc tcg gtg tca gtg gcc cca gga aag acg gcc acg att acc tgt	480
Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys Thr Ala Thr Ile Thr Cys	
145 150 155 160	

gcg gga aac aat ata gga agt aac agt gta tac tgg tac cag cag aaa	528
Ala Gly Asn Asn Ile Gly Ser Asn Ser Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys	
165 170 175	
cca ggc ctg gcc cct gta ctg gtc gtc tat gat gat aga gac cgg ccc	576
Pro Gly Leu Ala Pro Val Leu Val Val Tyr Asp Asp Arg Asp Arg Pro	
180 185 190	
tca ggg ctc ccc ggg cga ttc tct ggc tcc aaa tcc ggg aac acg gcc	624
Ser Gly Leu Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala	
195 200 205	
acc ctg acc atc agc agg gtc gag gcc ggg gat gag gcc gac tat tct	672
Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Ser	
210 215 220	
tgt cag gtg tgg gat cct agt agt gat cac ctc tat gtc ttc gga act	720
Cys Gln Val Trp Asp Pro Ser Ser Asp His Leu Tyr Val Phe Gly Thr	
225 230 235 240	
ggg acc cag ctc acc gtt tta ggt gcg gcc gc	752
Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala	
245 250	

<210> 13

<211> 250

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 13

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

<210> 14
 <211> 741
 <212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(741)

<400> 14

gag cag gtg cag ctg cag gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg	48
Glu Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly	
1 5 10 15	
ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttt agt act	96
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr	
20 25 30	
tat gcc atg agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg	144
Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp	
35 40 45	
gtc tca gtt att agt ggt agt ggt cat aca aca aac tac gcc gac tcc	192
Val Ser Val Ile Ser Gly Ser Gly His Thr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser	
50 55 60	
gtg aag ggc cgc gtc acc ata tcc aga gac aat tcc aag aac aca cta	240
Val Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu	
65 70 75 80	
tat ctg caa atc aac agc ctg aga gcc gac gac acg gcc gtg tat tac	288
Tyr Leu Gln Ile Asn Ser Leu Arg Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr	
85 90 95	
tgt gcg aga gat gtg tta gtc cta cag aat gct ttt gat atc tgg gcc	336
Cys Ala Arg Asp Val Leu Val Leu Gln Asn Ala Phe Asp Ile Trp Gly	
100 105 110	

caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca ggt gga ggt ggt tca ggc gga Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly	384
115 120	
ggt ggc tct ggc ggt ggc gga tcg gat gtt gtg atg acc cag tct cca Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro	432
130 135 140	
tcc tca ctg tct gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act tgt cgg Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg	480
145 150 155 160	
gcg agt cag ggt att agc agg tgg tta gcc tgg tat caa cag aaa cca Ala Ser Gln Gly Ile Ser Arg Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro	528
165 170 175	
ggg aaa gcc cct aag ctg atc tac gct gca tcc agt ttg caa agt Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser	576
180 185 190	
ggg gtc cca tca agg ttc agt ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr	624
195 200 205	
ctc acc atc agc agt ctg caa cct gaa gat ttt gca act tac atc tgt Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Ile Cys	672
210 215 220	
caa cag agt tac agt agg ccg ctc act ttc ggc gga ggg acc aag gtg Gln Gln Ser Tyr Ser Arg Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val	720
225 230 235 240	
gaa atc aaa cgt gcg gcc gca Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala	741
245	

<210> 15

<211> 247

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 15

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

Cys Ala Arg Asp Val Leu Val Leu Gln Asn Ala Phe Asp Ile Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro
 130 135 140
 Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg
 145 150 155 160
 Ala Ser Gln Gly Ile Ser Arg Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 165 170 175
 Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 180 185 190
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 195 200 205
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Ile Cys
 210 215 220
 Gln Gln Ser Tyr Ser Arg Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
 225 230 235 240
 Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala
 245

<210> 16
 <211> 771
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(771)

<400> 16

gag cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gcg gag gtg aag aag cct ggg	48
Glu Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly	
1 5 10 15	
gcc tca gtg aga gtt tcc tgc cag gca tct gga tac aca ttc agc agg	96
Ala Ser Val Arg Val Ser Cys Gln Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Arg	
20 25 30	
tac cat atg cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg	144
Tyr His Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp	
35 40 45	
atg gga gtg atc gac ccc aat agt ggt aga gta agt tac tca cag aag	192
Met Gly Val Ile Asp Pro Asn Ser Gly Arg Val Ser Tyr Ser Gln Lys	
50 55 60	
ttc cag gac aga gtt acc atg acc agg gac acg tcc acg agc aca gta	240

Phe Gln Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val	
65 70 75 80	
tac atg gag ctg aac agc ccg aga tct gag gac acg gcc gtt tat tat	288
Tyr Met Glu Leu Asn Ser Pro Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr	
85 90 95	
tgt gcg aga gat cga gga tat tgt aat ggt ggc agg tgc ttt atg gat	336
Cys Ala Arg Asp Arg Gly Tyr Cys Asn Gly Gly Arg Cys Phe Met Asp	
100 105 110	
gca ttt gac tac tgg ggc cag ggg aca atg gtc acc gtc tct tca ggt	384
Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly	
115 120 125	
gga ggc ggt tta ggc gga ggt ggc tct ggc ggt ggc gga tgc tcc tat	432
Gly Gly Gly Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Tyr	
130 135 140	
gtg ctg act cac cca ccc tca ttg tct ggg gcc cca ggg cag agc atc	480
Val Leu Thr His Pro Pro Ser Leu Ser Gly Ala Pro Gly Gln Ser Ile	
145 150 155 160	
acc atc tcc tgc act ggg agc agt tcc aac atc ggg gca ggt ttt cat	528
Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Phe His	
165 170 175	
ata cac tgg tac cag cag ttt cca aaa aca gcc ccc aaa ctg ctt atc	576
Ile His Trp Tyr Gln Gln Phe Pro Lys Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile	
180 185 190	
tat ggt agt agt aat cga ccc tca ggg gtc cct gac cgc ttc tct ggc	624
Tyr Gly Ser Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly	
195 200 205	
tcc agg tct ggc tcc tca ggc tcc ctg gcc atc act ggg ctg cag gca	672
Ser Arg Ser Gly Ser Ser Gly Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala	
210 215 220	
gac gat gag gct gat tat tac tgt gtg gga tgg gat ggc agc ctg agt	720
Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Val Gly Trp Asp Gly Ser Leu Ser	
225 230 235 240	
ggt tat gtc ttc gga act ggg acc cag ctg acc gtt tta ggt gcg gcc	768
Gly Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala	
245 250 255	
gca	771
Ala	

<210> 17

<211> 257

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 17

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

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

Ala

<210> 18
 <211> 795
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(735)

<400> 18

gag cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg Glu Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly 1 5 10 15	48
ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttt agc agc Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser 20 25 30	96
tat gcc atg agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp 35 40 45	144
gtc ica gct att agt ggt agt ggt ggt agc aca tac tac gca gac tcc Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser 50 55 60	192
gtg aag ggc cgg ttc acc atc tcc aga gag aat tcc aag aac acg cta Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ser Lys Asn Thr Leu 65 70 75 80	240
tat ctg caa atg aat agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr 85 90 95	288
tgt gcg aga caa aca aga gtc cgt gct ttt gat atc tgg ggc caa ggg Cys Ala Arg Gln Thr Arg Val Arg Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly 100 105 110	336
aca atg gtc acc gtc tct tca ggt gga ggc ggt tca ggc gga ggt ggc Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly 115 120 125	384
tct ggc ggt ggc gga tgg gac atc cag atg acc cag tct cct tcc gcc Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala 130 135 140	432
ctg tct gca tct gta gga ggc aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt Leu Ser Ala Ser Val Gly Gly Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser 145 150 155 160	480
cag agc act agt agc gat tta aat tgg tat cag caa aga cca ggg aaa Gln Ser Thr Ser Ser Asp Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys 165 170 175	528
gcc cct aaa ctc ctg atc tct gtt gca tcc act tta caa agt gac gtc Ala Pro Lys Leu Leu Ile Ser Val Ala Ser Thr Leu Gln Ser Asp Val 180 185 190	576
cca tca agg ttc agt ggc agt ggt tct ggg aca gat ttc agt ctc acc Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr 195 200 205	624
atc agc agt ctg caa cct gaa gac ttt gca act tac ttc tgt caa cag Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln 210 215 220	672
agt tac agc acc ccg tac act ttt ggc cag ggg acc aaa gtg gat atc Ser Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile 225 230 235 240	720
aaa cgt gcg gcc gca Lys Arg Ala Ala Ala 245	735

<210> 18

<211> 245

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 19

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

<210> 20

<211> 785

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(785)

<400> 20

gag gag gtg cag ctg ttg cag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg	48
Glu Glu Val Gln Leu Leu Gln Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly	
1 5 10 15	
agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc agc ttc agt aac	96
Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Asn	
20 25 30	
tat gtt atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg	144
Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp	
35 40 45	
gtg gca gtt ata tca tat gat gga agc aat aaa tac tac gca gac tcc	192
Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser	
50 55 60	
gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg cta	240
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu	
65 70 75 80	
tat ctg caa atg aaa ggc ctg aga cct gag gac acg gct gtg tat tac	288
Tyr Leu Gln Met Lys Gly Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr	
85 90 95	
tgt gcg aga agt agt ggc tgg tac ctt ctc ttt gat gct ttt gat atc	336
Cys Ala Arg Ser Ser Gly Trp Tyr Leu Leu Phe Asp Ala Phe Asp Ile	
100 105 110	
tgg ggc caa ggg aca atg gtc acc gtc tct tca ggt gga ggc ggt tca	384
Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser	
115 120 125	
ggc gga ggt ggc tct ggc ggt ggc gga tcg gat gtt gtg atg aca cag	432
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln	
130 135 140	
tct cca gac tcc ctg gct gtg tcg ctg ggc gag agg gcc acc atc aac	480
Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn	
145 150 155 160	
tgc gag tcc agc cag agt gtt tta ttc agc tcc aac aat aag aac tac	528
Cys Glu Ser Ser Gln Ser Val Leu Phe Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr	
165 170 175	
tta gct tgg tac cag cag aaa cca gga cag cct cct aag ctg ctc att	576
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile	
180 185 190	
tac tgg gca tct acc cgg gaa tcc ggg gtc cct gac cga ttc agt ggc	624
Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly	
195 200 205	
agc ggg tct gag aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag gct	672
Ser Gly Ser Glu Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala	
210 215 220	

```

gaa gat gtg gca gtt tat tac tgt cag caa tat tat agg att ccg tgg      720
Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Arg Ile Pro Trp
225                               230                235                240

acc ttc ggc caa ggg acc aaa gtg gat atc aaa cgt gcg gcc gca      765
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala Ala Ala
                245                               250                255

```

<210> 21

<211> 255

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 21

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

<210> 22

<211> 793

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(786)

<400> 22

cag gtg cag ctg cag gag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg gcc	48
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	
1 5 10 15	
tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc acc ggc tac	96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr	
20 25 30	
tat atg cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg	144
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	
35 40 45	
gga tgg atc aac cct aac agt ggt ggc aca aac tat gca cag aag ttt	192
Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe	
50 55 60	
cag ggc agg gtc acc atg acc agg gac acg tcc atc agc aca gcc tac	240
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	
atg gag ctg agc agg ctg aga tct gac gac acg gcc gtg tat tac tgt	288
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
gcg aga gat tgg cca caa aat tgt act aat ggt gta tgc cac cgg ggg	336
Ala Arg Asp Ser Pro Gln Asn Cys Thr Asn Gly Val Cys His Arg Gly	
100 105 110	
agt cat gtc cac tac tac ggt atg gac gtc tgg ggc caa ggc acc ctg	384
Ser His Val His Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu	
115 120 125	
gtc acc gtc tct tca ggt ggg ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc	432
Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly	
130 135 140	
ggt ggc gga tgg cag tct gcc ctg act cag cct gcc tcc gcg gcc ggg	480
Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Ala Ala Gly	
145 150 155 160	
tct cct gga cag tca gtc acc atc tcc tgc act gga acc agc agt gat	528
Ser Pro Gly Gln Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp	
165 170 175	

gtt ggt ggt tat aac tat gtc tcc tgg tac caa cag cac cca ggc aaa 576
Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys
180 185 190

gcc ccc aaa ctc atg att tat gac gtc aat aag cgg ccc tca ggg gtc 624
Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val
195 200 205

cct gat cgc ttc tct gcc tcc aag tct ggc aat acg gcc tcc ctg acc 672
Pro Asp Arg Phe Ser Ala Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr
210 215 220

gtc tct ggg ctc cag gct gac gat gag gct gat tac tac tgc gct tca 720
Val Ser Gly Leu Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser
225 230 235 240

tat gca ggc acc tac agt tat gtc ttc gga act ggg acc cag ctc acc 768
Tyr Ala Gly Thr Tyr Ser Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Gln Leu Thr
245 250 255

gtt tta ggt gcg gcc gca ggaga 791
Val Leu Gly Ala Ala Ala
260

<210> 23
<211> 262
<212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 23

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

ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Ser Pro Gln Asn Cys Thr Asn Gly Val Cys His Arg Gly
100 105 110

ser His Val His Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu
115 120 125

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Ala Ala Gly
 145 150 155 160
 Ser Pro Gly Gln Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp
 165 170 175
 Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys
 180 185 190
 Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val
 195 200 205
 Pro Asp Arg Phe Ser Ala Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr
 210 215 220
 Val Ser Gly Leu Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser
 225 230 235 240
 Tyr Ala Gly Thr Tyr Ser Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Gln Leu Thr
 245 250 255
 Val Leu Gly Ala Ala Ala
 260

<210> 24
 <211> 788
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(788)

<400> 24

gag gtc cag ctg ttg cag tct ggg gcc gag gtg aag aag cct ggg gcc Glu Val Gln Leu Leu Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala 1 5 10 15	48
tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc acc ggc tac Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr 20 25 30	96
tat atg cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met 35 40 45	144
gga tgg atc aac cct aac agt ggt ggc aca aac tat gca cag aag ttt Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe 50 55 60	192
cag ggc agg gtc acc atg acc agg gac acg tcc atc agc aca gcc tac Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr 65 70 75 80	240
atg gag ctg agc agg ctg aga tct gac gac acg gcc gtg tat tac tgt Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95	288
gcg aga gat tgc cca caa aat tgt act aat ggt gta tgc cac cgg ggg	336
Ala Arg Asp Ser Pro Gln Asn Cys Thr Asn Gly Val Cys His Arg Gly 100 105 110	
agt cat gtc cac tac tac ggt atg gac gtc tgg ggc cag gga acc ctg Ser His Val His Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu 115 120 125	384
gtc acc gtc tcc tca ggt ggg ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly 130 135 140	432
ggt ggc gga tgc cag tct gcc ctg act cag cct gcc tcc gcg gcc ggg Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Ala Ala Gly 145 150 155 160	480
tgt ctt gga cag tca gtc acc atc tcc tgc act gga acc agc agt gat Cys Leu Gly Gln Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp 165 170 175	528
gtt ggt ggt tat aaa tat gtc tcc tgg tac caa cag cac cca gcc aaa Val Gly Gly Tyr Lys Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys 180 185 190	576
gcc ccc aaa ctg atg att tat gac gtc aat aag cgg ccc tca ggg gtc Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val 195 200 205	624
cct gat cgc ttc ttt gcc tcc aag tct ggc aac acg gcc tcc ctg acc Pro Asp Arg Phe Phe Ala Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr 210 215 220	672
gtc tct ggg ctg cag gct gac gat gag gct gat tac tac tgc gct tca Val Ser Gly Leu Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser 225 230 235 240	720
tat gca ggc acc tac agt tat gtc ttc gga act ggg acc cag ctg acc Tyr Ala Gly Thr Tyr Ser Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Gln Leu Thr 245 250 255	768
gtt tta ggt gcg gcc gca Val Leu Gly Ala Ala Ala 260	786

<210> 25
<211> 262
<212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 25

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

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

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

<210> 26
<211> 789
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<220>
<221> CDS
<222> {1}..(789)

<400> 26

gag	gtg	cag	ctg	gtg	gag	tct	ggg	gct	gag	gtg	aag	aag	cct	ggg	gcc	48
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	
1				5					10					15		
tca	gtg	aag	gtc	tcc	tgc	aag	gct	tct	gga	tac	acc	ttc	acc	ggc	tac	96
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Gly	Tyr	

20										25										30										
tat	atg	cac	tgg	gtg	cga	cag	gcc	cct	gga	caa	ggg	ctt	gag	tgg	atg	144														
Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met															
		35					40					45																		
gga	tgg	atc	aac	cct	aac	agt	ggt	ggc	aca	aac	tat	gca	cag	aag	ttt	192														
Gly	Trp	Ile	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe															
	50					55					60																			
cag	ggc	agg	gtc	acc	atg	acc	agg	gac	acg	tcc	atc	agc	aca	gcc	tac	240														
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr															
	65				70					75					80															
atg	gag	ctg	agc	agg	ctg	aga	tct	gac	gac	acg	ggc	gtg	tat	tac	tgt	288														
Met	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys																
			85					90					95																	
gtg	aga	ggt	tcg	cca	caa	aat	tgt	act	aat	ggt	gta	tgc	cac	cgg	ggg	336														
Val	Arg	Gly	Ser	Pro	Gln	Asn	Cys	Thr	Asn	Gly	Val	Cys	His	Arg	Gly															
			100				105						110																	
agt	cat	gtc	cac	tac	tac	ggt	atg	gac	gtc	tgg	ggc	caa	ggg	acc	acg	384														
Ser	His	Val	His	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr															
		115				120						125																		
gtc	acc	gtc	tcc	tca	ggt	ggg	ggc	ggt	tca	ggc	gga	ggt	ggc	tct	ggc	432														
Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly															
	130				135					140																				
ggt	ggc	gga	tcg	cag	tct	gcc	ctg	act	cag	cct	gcc	tcc	gtg	tct	ggg	480														
Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ser	Ala	Leu	Thr	Gln	Pro	Ala	Ser	Val	Ser	Gly															
	145				150					155					160															
tct	cct	gga	cag	tcg	atc	acc	atc	tcc	tgc	act	gga	acc	agc	agt	gat	528														
Ser	Pro	Gly	Gln	Ser	Ile	Thr	Ile	Ser	Cys	Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Asp															
			165					170					175																	
ggt	ggg	agt	tat	aac	ctt	gtc	tcc	tgg	tac	caa	cag	cac	cca	ggc	aaa	576														
Val	Gly	Ser	Tyr	Asn	Leu	Val	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	His	Pro	Gly	Lys															
			180					185				190																		
gcc	ccc	aaa	ctc	atg	att	tat	gag	gtc	agt	aat	cgg	ccc	tca	ggg	ggt	624														
Ala	Pro	Lys	Leu	Met	Ile	Tyr	Glu	Val	Ser	Asn	Arg	Pro	Ser	Gly	Val															
		195				200						205																		
tgt	aat	cgc	ttc	tct	ggc	tcc	aag	tct	ggc	aac	acg	gcc	tcc	ctg	acc	672														
Cys	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Ser	Leu	Thr															
	210				215						220																			
atc	tct	ggg	ctc	cag	gct	gag	gac	gag	gct	gat	tat	tac	tgc	agc	tca	720														
Ile	Ser	Gly	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Ser															
	225				230					235					240															
tat	aca	agc	agc	agc	act	ctc	gag	gtg	ttc	ggc	gga	ggg	acc	cag	ctc	768														
Tyr	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Leu	Glu	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Gln	Leu															
				245				250					255																	
acc	gtt	tta	ggt	gcg	gcc	gca										789														
Thr	Val	Leu	Gly	Ala	Ala	Ala																								
			260																											

<210> 27

<211> 263

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 27

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

<210> 28
 <211> 747
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(747)

<400> 28

cag gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg ggt ggc ttg gtc cag cct ggg Gln Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly 1 5 10 15	48
ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ctc agt agc Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Ser 20 25 30	96
tat gct atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp 35 40 45	144
gtc tca act att agt ggt ggt ggt ggt agc aca tac tac gca gac tcc Val Ser Thr Ile Ser Gly Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser 50 55 60	192
gtg aag ggc cgg ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu 65 70 75 80	240
tat ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gta tat tac Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr 85 90 95	288
tgt gcg aga cgg ggg cgg gct ttt gat atc tgg ggc caa ggg acc acg Cys Ala Arg Arg Gly Arg Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr 100 105 110	336
gtc acc gtc tcc tta ggt gga ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc Val Thr Val Ser Leu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly 115 120 125	384
ggt ggc gga tgg cag tct gtg ttg acg cag ccg ccc tca gtg tct ggg Gly Gly Gly Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly 130 135 140	432
gcc cca ggg cag agg gtc acc atc tcc tgc act ggg agc agc tcc aac Ala Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn 145 150 155 160	480
atc ggg gcg ggg tat gat gta cac tgg tac cag cag ctt cca gga aca Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr 165 170 175	528
gcc ccc aaa ctc ctc att tat ggt aac agc aat cgg ccc tca ggg gtc Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val 180 185 190	576
cct gac cga ttc tct ggc tcc aag tct ggc acc tca gcc tcc ctg gcc Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala 195 200 205	624
atc act ggg ctc cag gct gag gat gag gct gat tat tat tgc tcc agt Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser 210 215 220	672

cct	atg	atc	agc	agc	ctg	agt	ggt	cat	gtg	gta	ttc	ggc	gga	ggg	acc	720
Pro	Met	Ile	Ser	Ser	Leu	Ser	Gly	His	Val	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	
225					230					235					240	

aag	gtg	acc	gtc	cta	ggt	gcg	gcc	gca								747
Lys	Val	Thr	Val	Leu	Gly	Ala	Ala	Ala								
				245												

<210> 29

<211> 249

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 29

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

<210> 30

<211> 747

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(747)

<400> 30

cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg gcc Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala 1 5 10 15	48
tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc acc ggc tac Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr 20 25 30	96
tat atg cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met 35 40 45	144
gga tgg atc aac cct aac agt ggt ggc aca aac tat gca cag aag ttc Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe 50 55 60	192
cag ggc agg gtc acc atg acc agg gac acg tcc att ggc aca gtc tac Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Gly Thr Val Tyr 65 70 75 80	240
atg gag ttg agc agc ctg aca tct gac gac acg gcc atg tat tat tgt Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys 85 90 95	288
gcg aga aac aat gtt gct atg ggt tat act atg gac gtc tgg ggc caa Ala Arg Asn Asn Val Ala Met Gly Tyr Thr Met Asp Val Trp Gly Gln 100 105 110	336
ggg aca atg gtc acc gtc tct tca ggt gga ggc ggt tca ggc gga ggt Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly 115 120 125	384
ggc tct ggc ggt ggc gga tcc cag tct gcc ctg act cag cct gcc tcc Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser 130 135 140	432
gcg tcc ggg tct cct gga cag tca gtc acc atc tcc tgc act gga acc Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr 145 150 155 160	480
agc agt gac gtt ggt ggt tat aac tat gtc tcc tgg tac caa cag cac Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His 165 170 175	528

cca ggc aaa acc ccc aaa ctc ttg att tat gag gtc agt agt cgg ccc	576
Pro Gly Lys Thr Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Ser Arg Pro	
180 185 190	
tca ggg gtt tct aat cgc ttc tct ggc tcc aag cct ggc aac acg gcc	624
Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Pro Gly Asn Thr Ala	
195 200 205	
tcc ctg acc atc tct ggt ctc cag gct gag gac gag gct gat tat tac	672
Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr	
210 215 220	
tgc atc tca tat aca agc agc aac act tgg gtg ttc ggc gga ggg acc	720
Cys Ile Ser Tyr Thr Ser Ser Asn Thr Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr	
225 230 235 240	
cag ctc acc gtt tta ggt gcg gcc gca	747
Gln Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala	
245	

<210> 31

<211> 249

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 31

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

<210> 32

<211> 783

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(732)

<400> 32

gag gtg cag ctg ttg cag tct ggg gcg gag gtg aag aag cct ggg gcc	48
Glu Val Gln Leu Leu Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	
1 5 10 15	
tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc acc ggc tac	96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr	
20 25 30	
tat atg cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg	144
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	
35 40 45	
gga tgg atc aac cct aac agt ggt ggc aca aac tat gca cag aag ttt	192
Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe	
50 55 60	
cag ggc aga gtc acc atg acc agg aac acc tcc ata agc aca gcc tac	240
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asn Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	
atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg tat tac tgt	288
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
gcg ggt cag gag gca cat ggg gac ggt atg gac gtc tgg ggc caa ggg	336
Ala Gly Gln Glu Ala His Gly Asp Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly	
100 105 110	
acc acg gtc acc gtc tcc tcg gtg gag cga ggt ggc tct ggc ggt ggc	384
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Val Glu Arg Gly Gly Ser Gly Gly Gly	
115 120 125	
gga tcg cag tct gcc ctg act cag cct gcc tcc gcg tcc ggg tct cct	432

Gly	Ser	Gln	Ser	Ala	Leu	Thr	Gln	Pro	Ala	Ser	Ala	Ser	Gly	Ser	Pro		
130						135					140						
gga	cag	tcg	atc	acc	atc	tcc	tgc	act	gga	acc	agc	ggt	gac	gtt	ggt	480	
Gly	Gln	Ser	Ile	Thr	Ile	Ser	Cys	Thr	Gly	Thr	Ser	Gly	Asp	Val	Gly		
145					150				155					160			
ggt	tat	aac	tat	gtc	tcc	tgg	tac	caa	cag	cac	cca	ggc	aaa	gcc	ccc	528	
Gly	Tyr	Asn	Tyr	Val	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	His	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro		
				165					170					175			
aaa	ctc	atg	att	tat	gaa	gtc	agt	aat	cgg	ccc	tca	ggg	gtt	tct	aat	576	
Lys	Leu	Met	Ile	Tyr	Glu	Val	Ser	Asn	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Ser	Asn		
			180					185					190				
cgc	ttc	tct	ggc	tcc	aag	tct	ggc	agc	acg	gcc	tcc	ctg	acc	atc	tct	624	
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Ser	Thr	Ala	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser		
		195				200						205					
ggg	ctc	cag	gct	gag	gac	gag	gct	gat	tat	tac	tgc	gtc	tca	tat	aca	672	
Gly	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Val	Ser	Tyr	Thr		
	210					215					220						
agc	aga	aac	act	tat	gtc	ttc	gga	tcc	ggg	acc	cag	ctc	acc	gtt	tta	720	
Ser	Arg	Asn	Thr	Tyr	Val	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Gln	Leu	Thr	Val	Leu		
225					230				235						240		
ggt	gcg	gcc	gcg	a												733	
Gly	Ala	Ala	Ala														

<210> 33

<211> 244

<212> PPT

<213> Escherichia coli

<400> 33

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

<210> 34

<211> 372

<212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(372)

<400> 34

```

gag gtg cag ctg ttg cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg gcc      48
Glu Val Gln Leu Leu Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1      5      10      15

tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc acc ggc tcc      96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Ser
      20      25      30

tat att cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg      144
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
      35      40      45

gga cgg atg aac cct aac agt ggt gac aca aac tat gca cag aag ttt      192
Gly Arg Met Asn Pro Asn Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
      50      55      60

cag ggc cgg gtc acc atg acc agg gac acg tcc atc agc aca gcc tac      240
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
      65      70      75      80

atg gag ctg agc agg ctg aga tct gac gac acg gcc gtg tac tac tgt      288
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

```

```

      85      90      95
ggg acg gag gga gtg gct tta cgt ecc ggt gct ttt gat ttc tgg ggc      336
Ala Thr Glu Gly Val Ala Leu Arg Pro Gly Ala Phe Asp Phe Trp Gly
      100      105      110

caa ggg acc cag ctc acc gtt tta ggt gcg gcc gca      372
Gln Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala
      115      120

```

<210> 35
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 35

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

<210> 86

<211> 756

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(756)

<400> 36

gag gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gtc cag cct ggg	48
Glu Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly	
1 5 10 15	
ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc gtc agt agc	96
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser	
20 25 30	

aac tac atg agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg Asn Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp 35 40 45	144
gtc tca gtt gtt tat agc ggt ggt agc aca tac tac gca gac tcc gtg Val Ser Val Val Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val 50 55 60	192
aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr 65 70 75 80	240
ctt caa atg aac agc ctg aga gct gag gac acg gct gtg tat tac tgt Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95	288
gcg aga gac cta ggg ggg act aca gtt tgg cgc tac tac ggt atg gac Ala Arg Asp Leu Gly Gly Thr Thr Val Trp Arg Tyr Tyr Gly Met Asp 100 105 110	336
gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca ggt gga ggc ggt Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly 115 120 125	384
tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt ggc gga tcg tcc tat gtg ctg act Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Tyr Val Leu Thr 130 135 140	432
cag cca ccc tgg gtg tca gtg gcc cca gga aag acg gcc acg att acc Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys Thr Ala Thr Ile Thr 145 150 155 160	480
tgt gcg gga aac aat ata gga agt aac agt gta tac tgg tac cag cag Cys Ala Gly Asn Asn Ile Gly Ser Asn Ser Val Tyr Trp Tyr Gln Gln 165 170 175	528
aaa cca ggc ctg gcc cct gta ctg gtc gtc tat gat gat aga gac cgg Lys Pro Gly Leu Ala Pro Val Leu Val Val Tyr Asp Asp Arg Asp Arg 180 185 190	576
ccc tca ggg atc cct ggg cga ttc tct ggc tcc aaa tcc ggg aac acg Pro Ser Gly Ile Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr 195 200 205	624
gcc acc ctg acc atc agc agg gtc gag gcc ggg gat gag gcc gac tat Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr 210 215 220	672
tct tgt cag gtg tgg gat cct agt agt gat cac ctc tat gtc ttc gga Ser Cys Gln Val Trp Asp Pro Ser Ser Asp His Leu Tyr Val Phe Gly 225 230 235 240	720
act ggg acc cag ctc acc gtt tta ggt gcg gcc gca Thr Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala 245 250	756

<210> 87

<211> 252

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 87

Glu Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly 1 5 10 15
--

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

<210> 38
 <211> 735
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> CDS

<222> (1)..(735)

<400> 38

gag gag gtc cag ctg gtc gag tct gga gga gac ttg atc cag cct ggg Glu Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Ile Gln Pro Gly 1 5 10 15	48
ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct ggg ttt acc gtc ggt agc Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Gly Ser 20 25 30	96
aac tac atg agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gaa tgg Asn Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp 35 40 45	144
gtc tca gtt att tat agc ggt ggt agt aca tac tac gca gac tcc gtc Val Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val 50 55 60	192
aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acc ctg tat Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr 65 70 75 80	240
ctt caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gtg tat tac tgt Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95	288
gtg aga gat agg ggt gat gct ttt gat atc tgg ggc caa ggg aca atg Val Arg Asp Arg Gly Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met 100 105 110	336
gtc acc gtc tct tca ggt gga ggc gtt cca ggc gga ggt ggc tct gcc Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Val Pro Gly Gly Gly Ser Gly 115 120 125	384
ggt ggc gga tcc tcc tat gcg ctg act cag cca ccc tcc gtg tca gtc Gly Gly Gly Ser Ser Tyr Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val 130 135 140	432
gcc cca gga aag acg gcc acg att acc tgt gcg gga aac aat ata gga Ala Pro Gly Lys Thr Ala Thr Ile Thr Cys Ala Gly Asn Asn Ile Gly 145 150 155 160	480
agt aac agt gta tac tgg tac cag cag aaa cca ggc ctg gcc cct gta Ser Asn Ser Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Leu Ala Pro Val 165 170 175	528
ctg gtc gtc tat gat gat agc gac cgg ccc tca ggg atg tct gag cga Leu Val Val Tyr Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Met Ser Glu Arg 180 185 190	576
ttc tct ggc tcc aaa tcc ggg aac acg gcc acc ctg acc atc agc agg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg 195 200 205	624
gtc gag gcc ggg gat gag gcc gac tat tct tgt cag gtc tgg gat cct Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Ser Cys Gln Val Trp Asp Pro 210 215 220	672
agt agt gat cac ctc tat gtc ttc gga act ggg acc cag ctc acc gtt Ser Ser Asp His Leu Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Gln Leu Thr Val 225 230 235 240	720
tta ggt gcg gcc gca Leu Gly Ala Ala Ala 245	735

<210> 38
<211> 245
<212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 38

Glu Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Ile Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Gly Ser
20 25 30

Asn Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Val Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Val Arg Asp Arg Gly Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Val Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Ser Tyr Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val
130 135 140

Ala Pro Gly Lys Thr Ala Thr Ile Thr Cys Ala Gly Asn Asn Ile Gly
145 150 155 160

Ser Asn Ser Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Leu Ala Pro Val
165 170 175

Leu Val Val Tyr Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Met Ser Glu Arg
180 185 190

Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg
195 200 205

Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Ser Cys Gln Val Trp Asp Pro
210 215 220

Ser Ser Asp His Leu Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Gln Leu Thr Val
225 230 235 240

Leu Gly Ala Ala Ala
245

<210> 40
 <211> 761
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(758)

<400> 40

atg gag gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga gcc ttg gta cag cct Met Glu Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ala Leu Val Gln Pro 1 5 10 15	48
ggg ggg tcc ctg aga atc tct tgt gta ggc tct gga ttc acc ttc cga Gly Gly Ser Leu Arg Ile Ser Cys Val Gly Ser Gly Phe Thr Phe Arg 20 25 30	96
cag cat gac atg agc tgg gtc cgc cag gct cct ggg aag ggg ctg gag Gln His Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu 35 40 45	144
tgg gtc gca act ata agt gga agt gct gat aac aca ttt tac gca gac Trp Val Ala Thr Ile Ser Gly Ser Ala Asp Asn Thr Phe Tyr Ala Asp 50 55 60	192
tcc gtg aag ggc cgg ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr 65 70 75 80	240
ctg tat ctg cag atg aac acc ctg aaa gcc gac gac acg gcc gta tat Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Lys Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr 85 90 95	288
tac tgt gcg aag aaa tat ata gaa cca ggt gct acc cga ttt gac tac Tyr Cys Ala Lys Lys Tyr Ile Glu Pro Gly Ala Thr Arg Phe Asp Tyr 100 105 110	336
tgg ggc cag aga acc ctg gtc acc gtc tcc tca ggt gga ggc ggt tca Trp Gly Gln Arg Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser 115 120 125	384
ggc gga ggt ggc tct ggc ggt ggc gga tcg gat gtt gtg atg act cag Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln 130 135 140	432
tct cca ctc tct ctg tcc gtc acc cct gga cag ccg gcc tcc atc tcc Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser 145 150 155 160	480
tgc aag tct agt cag agc ctc ctg cat agt gat gga aag acc tat ttg Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu 165 170 175	528
tat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct cca cag ctc ctg atc tat Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr 180 185 190	576
gaa gtt tcc aac cgg ttc tct gga gtg cca gat agg ttc agt ggc agc Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser 195 200 205	624
ggg tca ggg aca gat ttc aca ctg aaa atc agc cgg gtg gag gct gag	672

Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu		
210						215					220						
gat	gtt	ggg	gtt	tat	tac	tgc	aig	caa	agt	ata	cag	ctc	ccg	atc	acc	720	
Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Met	Gln	Ser	Ile	Gln	Leu	Pro	Ile	Thr		
225					230					235					240		
ttc	ggc	caa	ggg	aca	cga	ctg	gag	att	aaa	cgt	gcg	gcc	gc			761	
Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Arg	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ala	Ala					
			245						250								

<210> 41

<211> 253

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 41

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

Gly Gly Ser Leu Arg Ile Ser Cys Val Gly Ser Gly Phe Thr Phe Arg
20 25 30

Gln His Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Val Ala Thr Ile Ser Gly Ser Ala Asp Asn Thr Phe Tyr Ala Asp
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Lys Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Lys Lys Tyr Ile Glu Pro Gly Ala Thr Arg Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Arg Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln
130 135 140

Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser
145 150 155 160

Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu
165 170 175

Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr
180 185 190

Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser

195

200

205

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
210 215 220

Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser Ile Gln Leu Pro Ile Thr
225 230 235 240

Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala
245 250

<210> 42

<211> 786

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(788)

<400> 42

gag cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg Glu Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly 1 5 10 15	48
agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc agc ttc agt aac Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Asn 20 25 30	96
tat gtt atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp 35 40 45	144
gtg gca gtt ata tca cat gat gga agc aat aaa tac tac gca gac tcc Val Ala Val Ile Ser His Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser 50 55 60	192
gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg cta Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu 65 70 75 80	240
tat ctg caa atg aaa agc ctg aga cct gag gac acg gct gtg tat tac Tyr Leu Gln Met Lys Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr 85 90 95	288
tgt gcg aga agt agt ggc tgg tac ctt ctc ttt gat gct ttt gat atc Cys Ala Arg Ser Ser Gly Trp Tyr Leu Leu Phe Asp Ala Phe Asp Ile 100 105 110	336
tgg ggc caa ggg aca atg gtc acc gtc tct tca ggt gga ggc ggt tca Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser 115 120 125	384
ggc gga ggt ggc tct ggc ggt ggc gga tgc gac atc cag atg acc cag Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln 130 135 140	432
tct cca gac tcc ctg cct gtg tct ctg ggc gag agg gcc acc atc aac Ser Pro Asp Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn 145 150 155 160	480
tgc agg tcc agc cag agt gtt tta tac agc tcc aac aat aag aac tac Cys Arg Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr 165 170 175 180 185 190	528

	165	170	175	
tta gct tgg tac cag cag aaa cca gga cag cct cct aag ctg ctc att				576
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile				
	180	185	190	
tac tgg gca tct acc cgg gaa tcc ggt gtc cct gac cga ttc agt ggc				624
Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly				
	195	200	205	
agc ggg tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag gct				672
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala				
	210	215	220	
gaa gat gtg gca gti tat tac tgt cag caa tat tat agg att ccg tgg				720
Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Arg Ile Pro Trp				
	225	230	235	240
acg ttc ggc caa ggg acg aag gtg gaa atc aaa cgt gcg gcc gca				765
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala				
	245	250	255	

<210> 43

<211> 255

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 43

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

Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Asn
20 25 30

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

Val Ala Val Ile Ser His Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser
50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Lys Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ser Ser Gly Trp Tyr Leu Leu Phe Asp Ala Phe Asp Ile
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln
130 135 140

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

Cys Arg Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr
165 170 175

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
180 185 190

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
195 200 205

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
210 215 220

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Arg Ile Pro Trp
225 230 235 240

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala
245 250 255

<210> 44

<211> 759

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(759)

<400> 44

gag gag gtg cag ctg ttg cag tct ggg gga ggt gtg gta cgg cct ggg Glu Glu Val Gln Leu Leu Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly 1 5 10 15	48
ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttt gat gat Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp 20 25 30	96
tat ggc atg acc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg Tyr Gly Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp 35 40 45	144
gtc tca gct att agt ggt agt ggt ggt agc aca tac tac gca gac tcc Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser 50 55 60	192
gtg aag ggc cgg ttc gcc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg Val Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu 65 70 75 80	240
tat ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gta tat tac Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr 85 90 95	288
tgt gcg aaa tct cgc tac tat gat agt agt ggt tat tac tac acc gtg Cys Ala Lys Ser Arg Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Thr Val 100 105 110	336
cga cct gat gct ttt gat atc tgg ggc caa ggg gca atg gtc acc gtc Arg Pro Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Ala Met Val Thr Val 115 120 125	384

tct tca ggt gga ggc ggt gga ggt ggc tct ggc ggt ggc gga tcg tct Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser	432
130 135 140	
tct gag ctg act caa cca ccc tca gtg tcc gtg tcc cca gga cag aca Ser Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln Thr	480
145 150 155 160	
gcc atc atc acc tgc tct gga gat aaa ttg ggg gat aaa tat gct tcc Ala Ile Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Ser	528
165 170 175	
tgg tat cag cac agg cca ggc cag tcg cct gtc ttg gtc atc tat cag Trp Tyr Gln His Arg Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr Gln	576
180 185 190	
gat tcc agg cgg ccc tca gac atc cct gag cga ttc tct ggc tcc aac Asp Ser Arg Arg Pro Ser Asp Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn	624
195 200 205	
tct ggg aac aca gcc act ctg acc atc acc gag gcc cag gct ttg gat Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Thr Glu Ala Gln Ala Leu Asp	672
210 215 220	
gag gct gac tat tat tgt cag gcc tgg gcc ggc aga tct gtg gtc ttc Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Ala Gly Arg Ser Val Val Phe	720
225 230 235 240	
ggc ggg ggg acc cag ctc acc gtt tta ggt gcg gcc gca Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala	759
245 250	

<210> 45

<211> 253

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 45

Glu Glu Val Gln Leu Leu Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp
20 25 30

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

Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
65 70 75 80

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

Cys Ala Lys Ser Arg Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Thr Val
100 105 110

Arg Pro Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Ala Met Val Thr Val
115 120 125

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
130 135 140

Ser Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln Thr
145 150 155 160

Ala Ile Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Ser
165 170 175

Trp Tyr Gln His Arg Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr Gln
180 185 190

Asp Ser Arg Arg Pro Ser Asp Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn
195 200 205

Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Thr Glu Ala Gln Ala Leu Asp
210 215 220

Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Ala Gly Arg Ser Val Val Phe
225 230 235 240

Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala
245 250

<210> 46

<211> 768

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(768)

<430> 46

gag gag gtg cag ctg ttg cag tct ggg gcg gag gtg aag aag cct ggg	48
Glu Glu Val Gln Leu Leu Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly	
1 5 10 15	
gcc tca gtg aga gtt tcc tgc cag gca tct gga tac aca ttc agc agg	96
Ala Ser Val Arg Val Ser Cys Gln Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Arg	
20 25 30	
tac cat atg cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg	144
Tyr His Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp	
35 40 45	
atg gga gtg atc gac ccc aat agt ggt aga gta agt tac tca cag aag	192
Met Gly Val Ile Asp Pro Asn Ser Gly Arg Val Ser Tyr Ser Gln Lys	
50 55 60	
ttc cag gac aga gtc acc atg acc agg gac acg ttc acg agc aca gta	240
Phe Gln Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Phe Thr Ser Thr Val	
65 70 75 80	

tac atg gag ctg aac agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtt tat tat	288
Tyr Met Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr	
85 90	
tgt gcg aga gat cga gga tat tgt aat ggt ggc agg tgc ttt atg gat	336
Cys Ala Arg Asp Arg Gly Tyr Cys Asn Gly Gly Arg Cys Phe Met Asp	
100 105 110	
gca ttt gac tac tgg ggc cag ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca ggt	384
Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly	
115 120 125	
gga ggc ggt tca ggc gga ggt ggc cct ggc ggt ggc gga tgc tcc tat	432
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Pro Gly Gly Gly Ser Ser Tyr	
130 135 140	
gtg ctg act cag cca ccc tca gcg tct ggg gcc ccc gga cag agg gtc	480
Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ala Pro Gly Gln Arg Val	
145 150 155 160	
acc atc tct tgt tct gga agc aac tcc aac atc gga cgt aat tgg gta	528
Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Asn Ser Asn Ile Gly Arg Asn Trp Val	
165 170 175	
tac tgg tac cag caa ctc cca gga acg gcc ccc aaa ctc ctc atg ttt	576
Tyr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Met Phe	
180 185 190	
agg aat aat gaa cgg tcc tca ggg gtc cct gac cga ttc tct ggc tcc	624
Arg Asn Asn Glu Arg Ser Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser	
195 200 205	
aag act ggc acc tca gcc tcc ctg gcc atc agt ggg ctc cgg tct gag	672
Lys Thr Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg Ser Glu	
210 215 220	
gat gag ggt gat tac tac tgt gca tca tgg gat gac agt ctg cat gct	720
Asp Glu Gly Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Trp Asp Asp Ser Leu His Ala	
225 230 235 240	
tgg gtg ttc ggc ggg ggg acc cag ctc acc gtt tta ggt ggc gcc gca	768
Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala	
245 250 255	

<210> 47

<211> 256

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 47

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

Phe Gln Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Phe Thr Ser Thr Val
 65 70 75 80
 Tyr Met Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Asp Arg Gly Tyr Cys Asn Gly Gly Arg Cys Phe Met Asp
 100 105 110
 Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Pro Gly Gly Gly Gly Ser Ser Tyr
 130 135 140
 Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ala Pro Gly Gln Arg Val
 145 150 155 160
 Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Asn Ser Asn Ile Gly Arg Asn Trp Val
 165 170 175
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Met Phe
 180 185 190
 Arg Asn Asn Glu Arg Ser Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 195 200 205
 Lys Thr Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg Ser Glu
 210 215 220
 Asp Glu Gly Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Trp Asp Asp Ser Leu His Ala
 225 230 235 240
 Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala
 245 250 255

<210> 48

<211> 766

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(766)

<400> 48

gag gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga aac ttg gtt cag cct ggg 48
 Glu Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asn Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttt agc agt 96
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser
 20 25 30
 tat gcc atg agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gaa tgg 144

 Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 gtc tca gct att agt gct agt ggt ggc acc aca tac tac gca gat tcc 192
 Val Ser Ala Ile Ser Ala Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
 50 55 60
 gtg aag ggc cgg ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg 240
 Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
 65 70 75 80
 tat ctt caa atg aac agc ctg aga act gag gac acg gct gtg tat tac 288
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 tgt gcg aga gac agc cgt gca tac agc tat ggt tac ctc tac gtc ttt 336
 Cys Ala Arg Asp Ser Arg Ala Tyr Ser Tyr Gly Tyr Leu Tyr Val Phe
 100 105 110
 gac tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca ggt gga ggc 384
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
 115 120 125
 ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt ggc gga tgg cag tct gcc ctg 432
 Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala Leu
 130 135 140
 act cag cct gcc tcc gtg tct ggg tct cct gga cag tgg atc acc atc 480
 Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile
 145 150 155 160
 tcc tgc act gga acc agc aat gat gtt ggg agt tat aac ctt gtc tcc 528
 Ser Cys Thr Gly Thr Ser Asn Asp Val Gly Ser Tyr Asn Leu Val Ser
 165 170 175
 tgg tac caa caa cac cca ggc aaa gcc ccc aaa ctc ctg att tat gag 576
 Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu
 180 185 190
 ggc agt aag cgg ccc tca ggg att tct aat cgc ttc tct ggc tcc aag 624
 Gly Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys
 195 200 205
 tct ggc aac acg gcc tcc ctg acc atc tct ggg ctc cag gct gag gac 672
 Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp
 210 215 220
 gag gct gat tat tac tgc atg tca tat acg agc agt ggc act cct tat 720
 Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Met Ser Tyr Thr Ser Ser Gly Thr Pro Tyr
 225 230 235 240
 gtc ttc gga act ggg acc cag ctc acc gtt tta ggt gcg gcc gca 765
 Val Phe Gly Thr Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala
 245 250 255

<210> 49

<211> 255

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 49

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser

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

<210> 50
 <211> 768
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> CDS

<222> (1) (788)

<400> 50

gag gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg Glu Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly 1 5 10 15	48
gcc tca gtg aga gtt tcc tgc cag gca tct gga tac aca ttc acc agg Ala Ser Val Arg Val Ser Cys Gln Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg 20 25 30	96
tac cat ata cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg Tyr His Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp 35 40 45	144
atg gga gtg atc gac ccc aat agt ggt aga ata agt tac tca cag aag Met Gly Val Ile Asp Pro Asn Ser Gly Arg Ile Ser Tyr Ser Gln Lys 50 55 60	192
ttc cag gac aga gtc acc atg acc agg gac acg tcc acg agc aca gtc Phe Gln Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val 65 70 75 80	240
tac atg gag ctg aac agc ctg aga tct gag gac aca gcc att tat tac Tyr Met Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr 85 90 95	288
tgt gcg aga gat cga gga tat tgt aat ggt ggc agg tgc ttt atg gat Cys Ala Arg Asp Arg Gly Tyr Cys Asn Gly Gly Arg Cys Phe Met Asp 100 105 110	336
gca ttt gac tac tgg ggc cag ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca ggt Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly 115 120 125	384
gga ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt ggc gga tcc cag tct Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ser Gln Ser 130 135 140	432
gtg ttg acg cag ccg ccc tca gcg tct ggg acc ccc ggg cag agg gtc Val Leu Thr Gln Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln Arg Val 145 150 155 160	480
acc atc gct tgt tct gga agc agc tcc aac atc gga att aat act gta Thr Ile Ala Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ile Asn Thr Val 165 170 175	528
aac tgg tac cag cag atc cca gga acg gcc ccc aaa ctc ctc atc tat Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr 180 185 190	576
aat aat gat cag cgg ccc tca ggg gtc cct gac cga ttc tct ggc tcc Asn Asn Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser 195 200 205	624
aag tct gcc acc tca gcc tcc ctg gcc atc act ggg ctc cag gtt gac Lys Ser Ala Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Val Asp 210 215 220	672
gat gag gct gat tat tac tgc cag tcc tat gac agc agc ctg ggt ggt Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Gly Gly 225 230 235 240	720
tat gtc ttc gga act ggg acc cag ctc acc gtt tta ggt gcg gcc gca Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala 245 250 255	768

<210> 51

<211> 255

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 51

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

<210> 52
 <211> 744
 <212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(744)

<400> 52

atg gag cag gtg cag ctg cag gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct Met Glu Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro 1 5 10 15	48
ggg ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttt agt Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser 20 25 30	96
act tat gcc atg agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag Thr Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu 35 40 45	144
tgg gtc tca gtt att agt ggt agt ggt cat aca aca aac tac gcc gac Trp Val Ser Val Ile Ser Gly Ser Gly His Thr Thr Asn Tyr Ala Asp 50 55 60	192
tcc gtg aag ggc cgc gtc acc ata tcc aga gac aat tcc aag aac aca Ser Val Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr 65 70 75 80	240
cta tat ctg caa atc aac agc ctg aga gcc gac gac acg gcc gtg tat Leu Tyr Leu Gln Ile Asn Ser Leu Arg Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr 85 90 95	288
tac tgt gcg aga gat gtg tta gtc cta cag aat gct ttt gat atc tgg Tyr Cys Ala Arg Asp Val Leu Val Leu Gln Asn Ala Phe Asp Ile Trp 100 105 110	336
ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca ggt gga ggt got tca ggc Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly 115 120 125	384
gga ggt ggc tct ggc ggt ggc gga tcc gat gtt gtg atg acc cag tct Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser 130 135 140	432
cca tcc tca ctg tct gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act tgt Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys 145 150 155 160	480
cgg gcg agt cag ggt att agc agg tgg tta gcc tgg tat caa cag aaa Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Arg Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys 165 170 175	528
cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc tac gct gca tcc agt ttg caa Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln 180 185 190	576
agt ggg gtc cca tca agg ttc agt ggc agt gga tct ggg aca gat ttc Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe 195 200 205	624
act ctc acc atc agc agt ctg caa cct gaa gat ttt gca act tac atc Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Ile 210 215 220	672

tgt caa cag agt tac agt agg ccg ctc act ttc ggc gga ggg acc aag 720
 Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Arg Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 225 230 235 240

gtg gaa atc aaa cgt gcg gcc gca 744
 Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala
 245

<210> 53

<211> 248

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 53

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

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30

Thr Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Val Ser Val Ile Ser Gly Ser Gly His Thr Thr Asn Tyr Ala Asp
 50 55 60

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

Leu Tyr Leu Gln Ile Asn Ser Leu Arg Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Asp Val Leu Val Leu Gln Asn Ala Phe Asp Ile Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
 130 135 140

Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 145 150 155 160

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Arg Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
 165 170 175

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln
 180 185 190

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 195 200 205

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Ile
 210 215 220

Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Arg Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 225 230 235 240

Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala
 245

<210> 54
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 54

Ser Asn Ser Ala Ala Trp Ser
 1 5

<210> 55
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 55

Ser Tyr Tyr Trp Ser
 1 5

<210> 56
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 56

Gly Ser Ser Asn Tyr Trp Gly
 1 5

<210> 57
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 57

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

Lys Ser

<210> 58
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli
 <400> 58

Arg Ile Tyr Ala Ser Gly Arg Pro Lys Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 59
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli
 <400> 59

Ser Ile His Tyr Ile Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Phe Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 60
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli
 <400> 60

Ser Thr His Tyr Ile Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Phe Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 61
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli
 <400> 61

Trp Lys Ala Phe Thr Ala Val Ala Gly Pro Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met
 1 5 10 15

Asp Val

<210> 62
 <211> 17

<212> PRT
 <213> Escherichia coli
 <400> 62

Val Tyr Ser Ser Ser Leu Thr Asp Phe Asp Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp
 1 5 10 15

Val

<210> 63
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli
 <400> 63

Val Cys Ser Ser Ser Leu Thr Asp Phe Asp Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp
 1 5 10 15

Val

<210> 64
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli
 <400> 64

Arg Thr Arg Trp Cys Trp Phe Asp Pro
 1 5

<210> 65
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli
 <400> 65

Asn Tyr Ser Leu Asn
 1 5

<210> 66
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli
 <400> 66

Asn Tyr Ser Phe Asn
1 5

<210> 67
<211> 5
<212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 67

Ser Tyr Trp Ile Asp
1 5

<210> 68
<211> 5
<212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 68

Asn Tyr Trp Ile Asp
1 5

<210> 69
<211> 5
<212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 69

Ser Tyr Ala Met Asn
1 5

<210> 70
<211> 17
<212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 70

Ala Ile Ser Ser Ser Gly Thr Tyr Arg Phe Tyr Ala Asp Ser Leu Arg
1 5 10 15

Gly

<210> 71
<211> 17
<212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 71

Ala Ile Ser Arg Ser Gly Thr Tyr Arg Phe Tyr Ala Asp Ser Leu Arg
1 5 10 15

Gly

<210> 72

<211> 17

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 72

Ile Ile Tyr Pro Asp Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 73

<211> 17

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 73

Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ile Gly Thr Tyr Tyr Ala Asn Ser Val Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 74

<211> 13

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 74

Asp Leu Gly Asp Leu Glu Trp Leu His Ser Pro Asp Pro
1 5 10

<210> 75

<211> 13

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 75

Asp Leu Gly Asp Leu Asp Trp Leu His Ser Pro Asp Pro
 1 5 10

<210> 76
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli
 <400> 76

Arg Gly Asp Ser Gly Thr Leu Trp Gly Asp
 1 5 10

<210> 77
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli
 <400> 77

Asp Glu Leu Asn Gln Leu Pro Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 78
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> synthetic primer

<400> 78
 gaggaagcct caattaaag ggtaaaatac 30

<210> 79
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> synthetic primer

<400> 79
 tgcacggcg gcgcataa tggctcga taaccaggc 40

<210> 80
 <211> 72
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> synthetic primer

<400> 80

```
agcttccctca tctaggcggc cgcaggagac tacaagacg acgacgaca acaccaccat    60
caccaccatt aa                                                              72
```

<210> 81

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic primer

<400> 81

```
ggccttaatg gtggtgatgg tgggtgttgg cgtcgtcgtc ttgtagtct cctgcggcgg    60
cctacatgag ga                                                              72
```

<210> 82

<211> 106

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic primer

<400> 82

```
agcttataaa ggaggaaatc ctcatgaaac agagcaccat cgcactggca ctgttacgt    60
tactgttcac ccggttacc aaagcacgta ccattggttc ccttgc                    106
```

<210> 83

<211> 106

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic primer

<400> 83

```
ggccgcaagg gaaaccatgg tacgtgcttt ggtaaccggg gigaacagta acggtaacag    60
tgccagtgcg atggtgctct gtttcatgag gatttccctc ttata                    106
```

<210> 84

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic primer

<400> 84

gtggtgaagg aattcttctg cgtctctgc ttgttagc 39

<210> 85

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic primer

<400> 85 caccattaag gctcctaata ttgtctgga tattaccaga 40

<210> 86

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primers

<400> 86

tcattctga attgcctgaa actgttgaaa gttgtttagc 40

<210> 87

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primers

<400> 87

gcacatcgga attctgccc caacctctg tcaatgct 38

<210> 88

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 88

gaactgggat ccttaagact ccttaaacg cagatg 37

<210> 89

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 89

accctgaagc ttataaagga ggaaatcttc atgaatatga gcaccaatgc 50

<210> 90
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer

<400> 90
 tagcccccct atagcggtt g 21

<210> 91
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer

<400> 91
 gtcacgtgtcg gaacgtgcat ctgc 24

<210> 92
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer

<400> 92
 tctgcgcacaa gtaacgagtt tcttttgac tactggggc 39

<210> 93
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer

<400> 93
 ctattgccta cggcagccgc tggc 24

<210> 94
 <211> 58
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer

<400> 94
 tccgccgaat accacatagg gcacccacgg atagaggag ttacagtaat agtccgac 58

<210> 95
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 95

tttgcacag teatatacgg 20

<210> 96

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 96

tatgttggtat tggggga 18

<210> 97

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 97 acttcagctc eggacaccgc tccggctcgc gggtccaccg ctccgcgcgc taccgggtgc 60

<210> 98

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer <400> 98 cggagacggga cgggtgtccg gactgtgaagt gacacccgtga gaaggcggag cgttggagac 60

<210> 99

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 99 ctatgttcgc gggtttgtgc ggc 23

<210> 100

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer <400> 100 tccgcacgaa ccgcacgaa 19

<210> 101

<211> 22

<212> DNA <213> Artificial <220>

<223> primer <400> 101 ggacacggct gctgtattac tg 22

<210> 102

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 102

gctgaggaga cggtagcc 18

REIVINDICAÇÕES

1. Vector adequado para a selecção eficiente e/ou maturação de um anticorpo recombinante, pertencente ao grupo de: scFv, fragmentos activos de Abs, sequências humanizada de Abs, sendo o dito vector caracterizado por
 - i) conter pelo menos um elemento capaz de reduzir o nível de expressão de anticorpos recombinantes pertencentes ao grupo de: a) um códon de parada suprimido dentro tanto do peptídeo líder ou da sequência de codificação de anticorpos; b) um promotor de baixa eficiência conduzindo a transcrição da referida sequência de codificação de anticorpos; e
 - ii) ter uma melhor eficiência de exibição dos referidos anticorpos recombinantes por meio de: a) fusão da sequência de codificação do anticorpo recombinante para uma sequência de codificação para a parte carboxi-terminal da proteína pIII; e b) utilização como peptídeo líder do anticorpo recombinante o peptídeo líder da fosfatase alcalina de *E. coli*; e c) eliminação de qualquer códon âmbar entre a sequência de codificação do anticorpo recombinante e a sequência de codificação pIII, em que o nível de expressão do anticorpo recombinante pode ser reduzido por um inibidor do promotor da transcrição da dita sequência de codificação do anticorpo.
2. Vector de acordo com a reivindicação 1 em que o vector é um plasmídeo, um fasmídeo ou um bacteriófago.
3. Vector fasmídeo de acordo com a reivindicação 2 tendo a sequência de nucleotídeos da SEQ ID NO: 1.
4. Biblioteca de demonstração de anticorpos bacteriófagos que consiste no vector de acordo com as reivindicações 1 a 3 e cADNs, ou sequências de anticorpos sintéticos ou semi-sintéticos, mesmo mutados para a maturação de afinidade dos anticorpos clonados no dito vector.

5. Biblioteca de acordo com a reivindicação 4 em que os cADNs são derivados de células produtoras de anticorpos.
6. Biblioteca de acordo com a reivindicação 5 em que os anticorpos produtores de células são linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) ou linfócitos do sangue periférico (PBLs).
7. Biblioteca de acordo com a reivindicação 6 em o anticorpo produtor de células é isolado a partir de um tumor que afecta um sujeito.
8. Biblioteca de acordo com a reivindicação 7 em que o sujeito afectado pelo tumor é um sujeito afectado por cancro da mama.
9. Célula hospedeira transformada com o vector de acordo com as reivindicações 1 a 3.
10. Método para melhorar a selecção e/ou a maturação de um anticorpo recombinante compreendendo a etapa de clonagem e expressão de cADNs, ou sequências de anticorpos sintéticos ou semi-sintéticos, mesmo mutados para a maturação de afinidade de anticorpos para o vector de acordo com as reivindicações 1 a 3.

RESUMO

VECTOR PARA A SELECÇÃO EFICIENTE E/OU MATURAÇÃO DE UM ANTICORPO E SUA UTILIZAÇÃO

É descrito um método para melhorar a capacidade de selecção de um anticorpo numa biblioteca de demonstração de bacteriófagos, em que as ditas melhorias são obtidas através da redução dos níveis de expressão dos anticorpos produzidos na dita biblioteca.

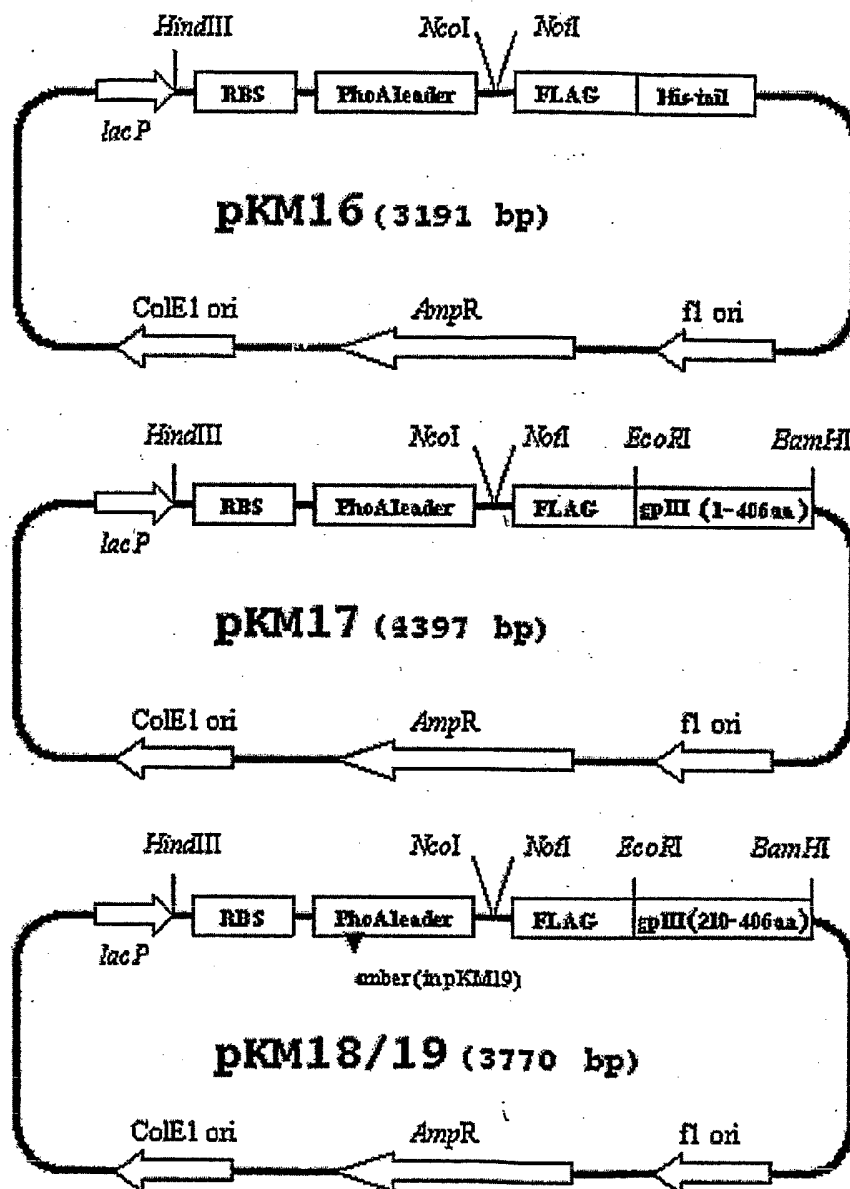


Fig. 1

```

1  GCCCAATACG CAAACCGCCT CTCGCCGCGC GTTGGCCGAT TCATTAATG
                                     >Plac<
                                     C

51  AGCTGGCAAG ACAGGTTTCC CGACTGGAAA GCGGCGAGTG AGCGCAACGC
101  AATTAATGTG AGTTAGCTCA CTCATTAGGC ACCCCAGGCT TTACACTTTA
151  TGCTTCCGCG TCCTATGTTG TGTGGA
                                     <Plac<
                                     ATTG TGAGCGGATA ACRATTTTAC
201  ACAAGATCTA GCTATTCTAG AGATTA
                                     >alpha-peptide>
                                     CGCC AAGCCCC
                                     >fl.seq>
                                     GTA TTTTACCCGT

251  TTAATGG
                                     M K q S T I A L A L L
AAGCTT ATAAAGGAGGAAATCCTC ATG AAA TAG AGC ACC ATC GCA CTG GCA CTG TTA
HindIII RBS amb

P L L P T P V T K A R T N V S L A
CCG TTA CTG TTC ACC CCG GTT ACC AAA GCA CGT ACC ATG GTT TCC CTT GCG
                                     -1 +1
                                     NcoI
A A G D Y K D D D D K
GCC GCA GGA GAC TAC AAA GAC GAC GAC GAC AAA GAA TTC
NotI EcoRI

                                     >spIII (C-terminal part)
                                     C TGCCCTCAACC TCCTGTCAAT

426  GCTGGCGGCG GCTCTGCTGG TGGTCTGCTT GCGCGCTCTG AGGGTGGCGG
476  CTCGAGGGGT GCGGCTTCTG AGGGTGGCGG CTCGAGGGGT GCGGCTTCCG
526  GTGGCGGCTC CGGTTCGGGT GATTTTGATT ATGAAAAAAT GGCRAACGCT
576  AATAAGGGGG CTATGACCGA AAATGCCGAT GAAACGCGC TACAGTCTGA
626  CGCTAAAGGC AAACCTGATT CTGTCGCTAC TGATTACGGT GCTGCTATCG
676  ATGTTTTCAT TGGTGACGTT TCCGGCCTTG CTAATGGTAA TGGTGTACT
726  GGTGATTTTG CTGGCTCTAA TTCCCAAATG GCTCAAGTCG GTGACGGTGA
776  TAATTCACCT TTAATGAATA ATTTCCGTCR ATATTACCT TCTTTGCCCTC
826  AGTCGGTTGA ATGTGCGCCT TATGTCTTTG GCGCTGGTAA ACCATATGAA
876  TTTTCTATTG ATTGTGACAA AATAAACTTA TTCCGTGGTG TCTTTGCCGT
926  TCTTTTATAT GTTGCCACCT TTATGTATGT ATTTTCGACG TTTGCTAACA
                                     spIII end>
976  TACTGCGTAA TAAGGACTCT TAAGGATCC
                                     BamHI

```

Fig. 2

```

>...gpIV
                                TAATA TTGTTCTGGA TATTACCAGC
1030 AAGGCCGATA GTTTGAGTTC TTCTACTCAG GCAAGTGATG TTATTACTAA
1080 TCAAAGAAGT ATTGCGACAA CGGTTAATTT GCGTGATGGA CAGACTCTTT
1130 TACTCGGTGG CCTCACTGAT TATAAAAACA CTTCTCAGGA TTCTGGCGTA
1180 CCGTTCCTGT CTAAAATCCC TTTAATCGGC CTCCTGTTTA GCTCCCGCTC
1230 TGATTCTAAC GAGGAAAGCA CGTTATACGT GTCGTCAAA GCAACCATAG
      end gpIV stop >fl-ori
1280 TACGCGCCCT GTAGCGCGC ATTAAGCGCG GCGGGTGTGG TGGTTACGCG
1330 CAGCGTGACC GCTACACTTG CCAGCGCCCT AGCGCCCGCT CCTTTCGCTT
1380 TCTTCCCTTC CTTTCTCGCC ACGTTCGCGG GCTTTCCCGG TCAAGCTCTA
1430 AATCGGGGGC TCCCTTTAGG GTTCCGATTT AGTGCTTTAC GGCACCTCGA
1480 CCCCAGAAAA CTTGATTAGG GTGATGGTTC ACGTAGTGGG CCATCGCCCT
1530 GATAGACGGT TTTTCGCCCT TTGACGTTGG AGTCCACGTT CTTTAATAGT
1580 GGACTCTTGT TCCAACTGG AACAACTC AACCCATCT CCGTCTATTC
1630 TTTTGATTTA TAAGGGATTT TGCCGATTTG GGCCTATTGG TTAAGAAATG
1680 AGCTGATTTA ACAAAATTT AACGCGAATT TTAACAAAT ATTAACGTTT
1730 ACAATTTAAA TATTTGCTTA TACAATCTC CTGTTTTTGG GGCTTTTCTG
      <fl-ORI>
1780 ATTATCAACC GGGGTACAT
                                gpII start
                                A TGATTGACAT GCTAGTTTTA CGATTACCGT
1830 TCATCGCAGG TGGCACTTTT CGGGGAAATG TCGCGGGAAC CCCTATTTGT
1880 TTATTTTTCT AAATACATTC AAATATGTAT CCGCTCATGA GACAATAACC
1930 CTGATAAATG CTTCAATAAT ATTGAAAAAG GAAGAGTATG AGTATTCAAC
1980 ATTTCCGTGT CGCCCTTATT CCCTTTTTTG CGGCATTTTG CCTTCCTGTT
2030 TTGCT
      >beta-lactamase>
      CACC CAGAAACGCT GGTGAAAGTA AAAGATGCTG AAGATCAGTT
2080 GGGTGCACGA GTGGGTTACA TCGAACTGGA TCTCAACAGC GGTAAGATCC
2130 TTGAGAGTTT TCGCCCCGAA GAAAGTTTTT CAATGATGAG CACTTTTAAA
2180 GTTCTGCTAT GTGGCGCGGT ATTATCCCGT ATTGACGCCG GGCAAGAGCA
2230 ACTCGGTCGC CGCATACACT ATTCTCAGAA TGACTTGGTT GAGTACTCAC
2280 CAGTCACAGA AAAGCATCTT ACGGATGGCA TGACAGTAAG AGAATTATGC
2330 AGTGCTGCCA TAACCATGAG TGATAACACT GCGGCCAACT TACTTCTGAC

```

Fig. 2

2380 AACGATCGGA GGACCGAAGG AGCTAACCGC TTTTTCAC AACATGGGGG

2430 ATCATGTAAC TCGCCTTGAT CGTTGGGAAC CGGAGCTGAA TGAAGCCATA

2480 CCAAACGACG AGCGTGACAC CACGATGCCT GTAGCAATGG CAACAACGTT

2530 GCGCAAACTA TTAACCTGGC AACTACTTAC TCTAGCTTCC CGGCAACAAT

2580 TAATAGACTG GATGGAGGCG GATAAAGTTG CAGGACCACT TCTGGCGCTCG

2630 GCCCTTCCGG CTGGCTGGTT TATTGCTGAT AAATCTGGAG CCGGTGAGCG

2680 TGGGTCTCGC GGTATCATTG CAGCACTGGG GCCAGATGGT AAGCCCTCCC

2730 GTATCGTAGT TATCTACACG ACGGGGAGTC AGGCAACTAT GGATGAACGA

2780 AATAGACAGA TCGCTGAGAT AGGTGCCTCA CTCATTAAAC ATTGG
<beta-lactamase< TAACCT

2830 GTCAGACCAA GTTTACTCAT ATATACTTTA GATTGATTTA AAACTTCATT

2880 TTTAATTTA
<colE1-ori<
A AAGGATCTAG GTGAAGATCC TTTTGTATAA TCTCATGACC

2930 AAAATCCCTT AACGTGAGTT TCGTTCCAC TGAGCGTCAG ACCCGTAGA

2980 AAAGATCAAA GGATCTCTT GAGATCCTTT TTTTCTGGCG GTAATCTGCT

3030 GCTTGCAAAC AAAAAAACC CCGCTACCAG CGGTGGTTTG TTTGCCGGAT

3080 CAAGAGCTAC CAACTCTTTT TCCGAAGGTA ACTGGCTTCA GCAGAGCGCA

3130 GATACCAAAT ACTGTCTTC TAGTGTAGCC GTAGTTAGGC CACCACTTCA

3180 AGAACTCTGT AGCACCGCCT ACATACCTCG CTCTGCTAAT CCTGTTACCA

3230 GTGGCTGCTG CCAGTGGCGA TAAGTCGTGT CTTACCGGGT TGGACTCAAG

3280 ACGATAGTTA CCGGATAAGG CGCAGCGGTC GGGCTGAACG GGGGGTTGCT

3330 GCACACAGCC CAGCTTGGAG CGAACGACCT ACACCGAACT GAGATACCTA

3380 CAGCGTGAGC TATGAGAAAG CGCCACGCTT CCCGAAGGGA GAAAGGCGGA

3430 CAGGTATCCG GTAAGCGGCA GGGTCGGAAC AGGAGAGCGC ACGAGGGAGC

3480 TTCCAGGGGG AAACGCCTGG TATCTTTATA GTCTGTGCG GTTTCGCCAC

3530 CTCTGACTTG AGCGTCGATT TTTGTGATGC TCCTCAGGGG GCGCGAGCCT

3580 ATG
<ColE1-ori<
GAAAAAC GCCAGCAACG CGGCCTTTTT ACGGTTCTTG GCCTTTTGCT

3630 GGCTTTTTCG TCACATGTTT TTCTCTGCGT TATCCCTTGA TTCTGTGGAT

3680 AACCGTATTA CCGCCTTTGA GTGAGCTGAT ACCGCTCGCC GCAGCCGAAC

3730 GACCGAGCGC AGCGAGTCAG TGAGCGAGGA AGCGGAAGAG C

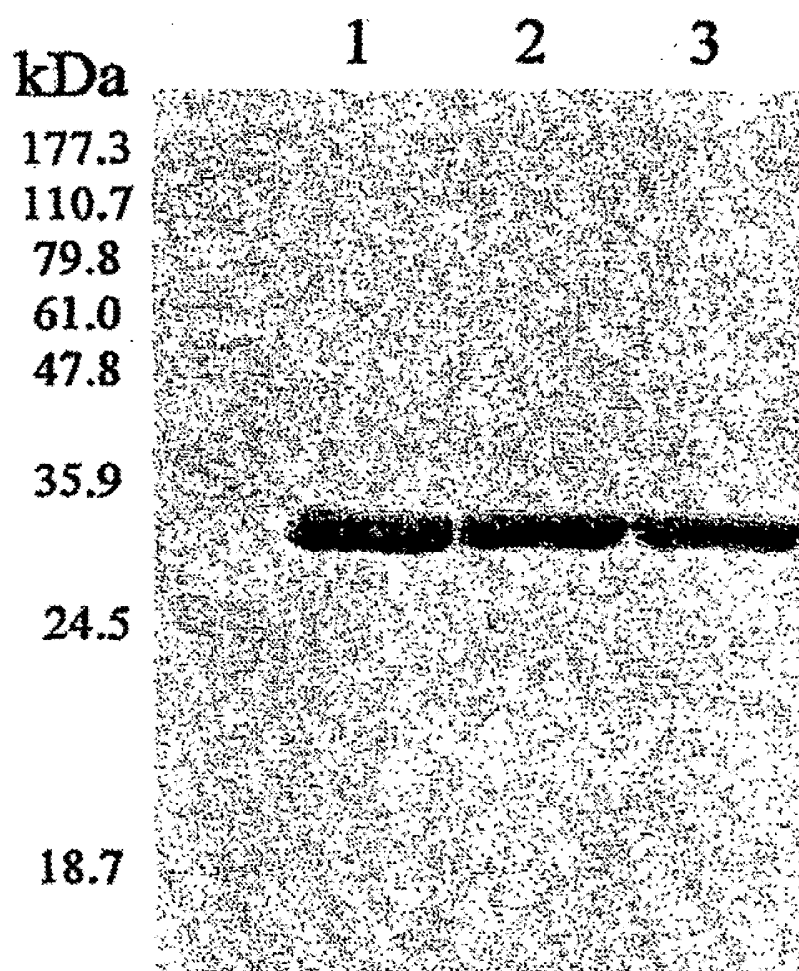


Fig. 3

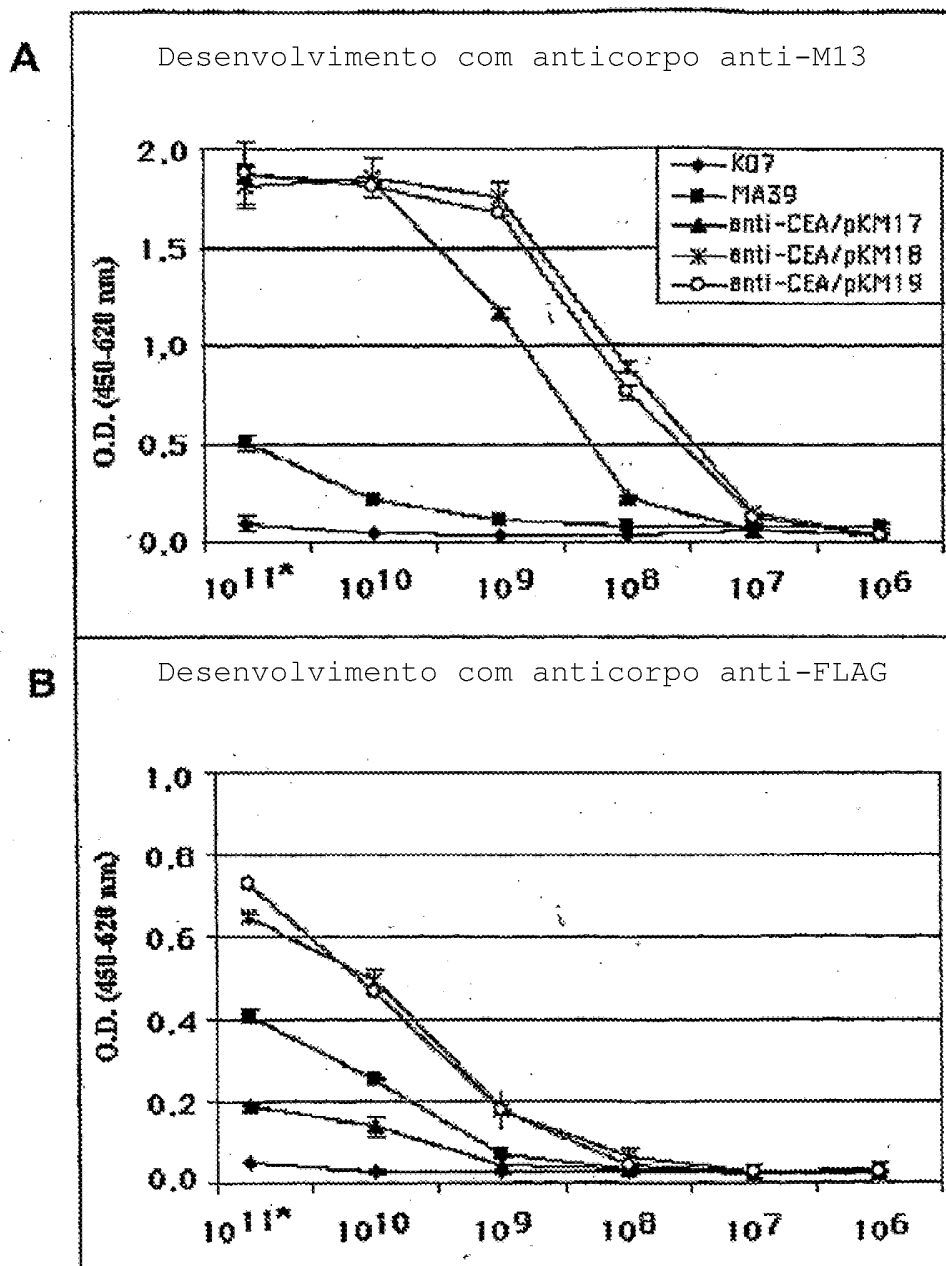


Fig. 4

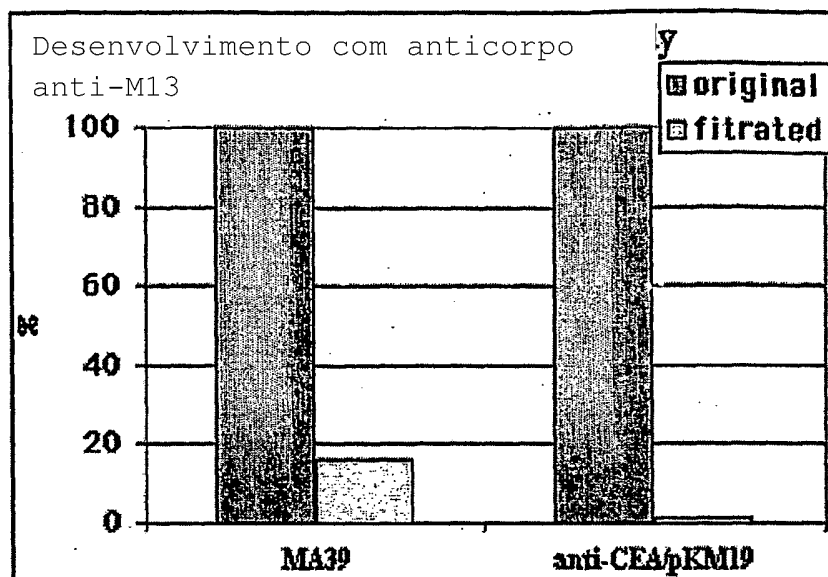
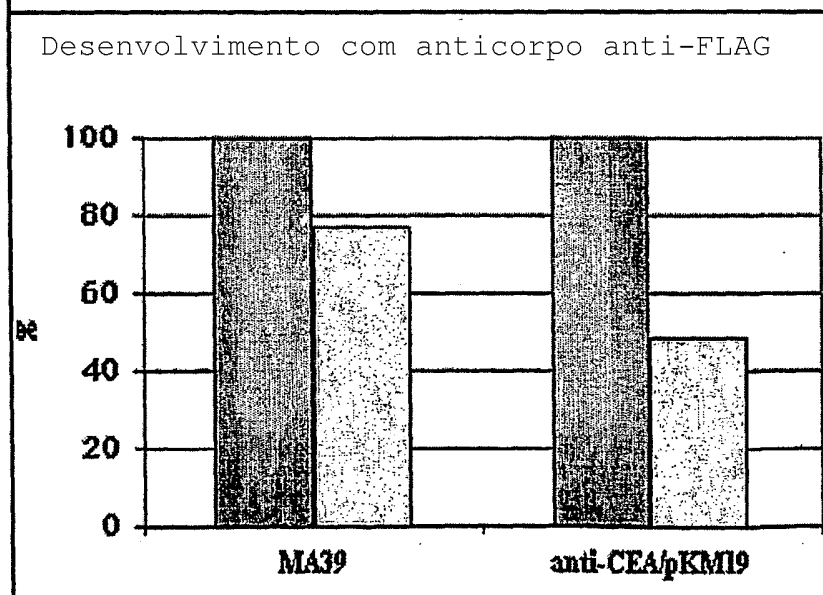
A**B**

Fig. 5

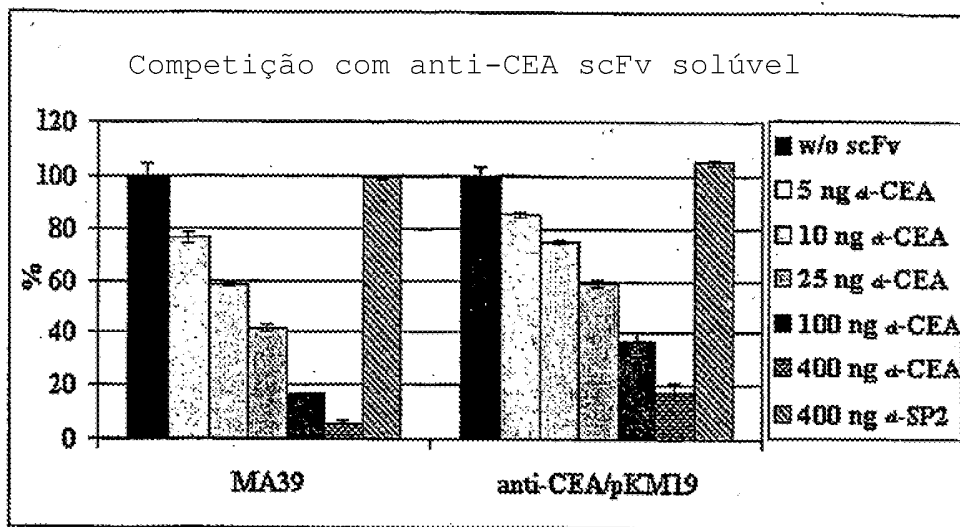


Fig. 6

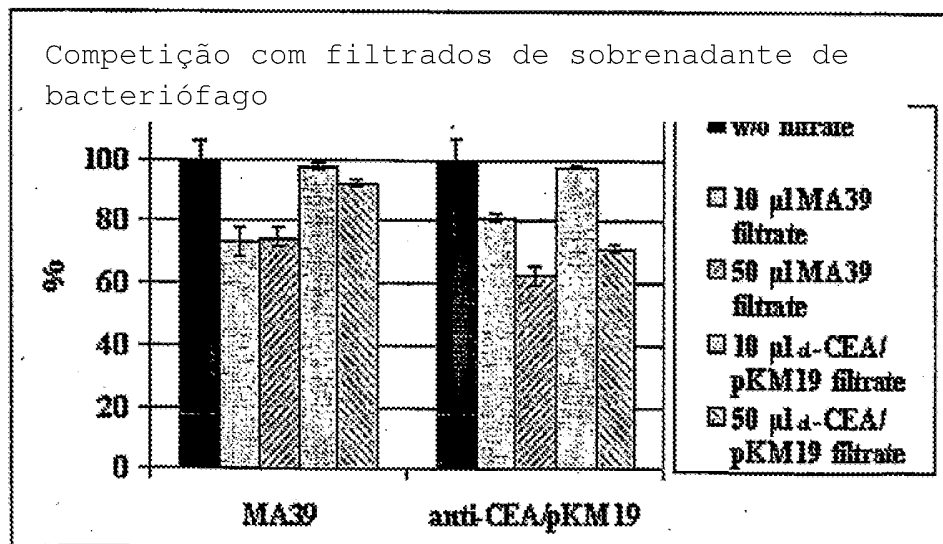


Fig. 7

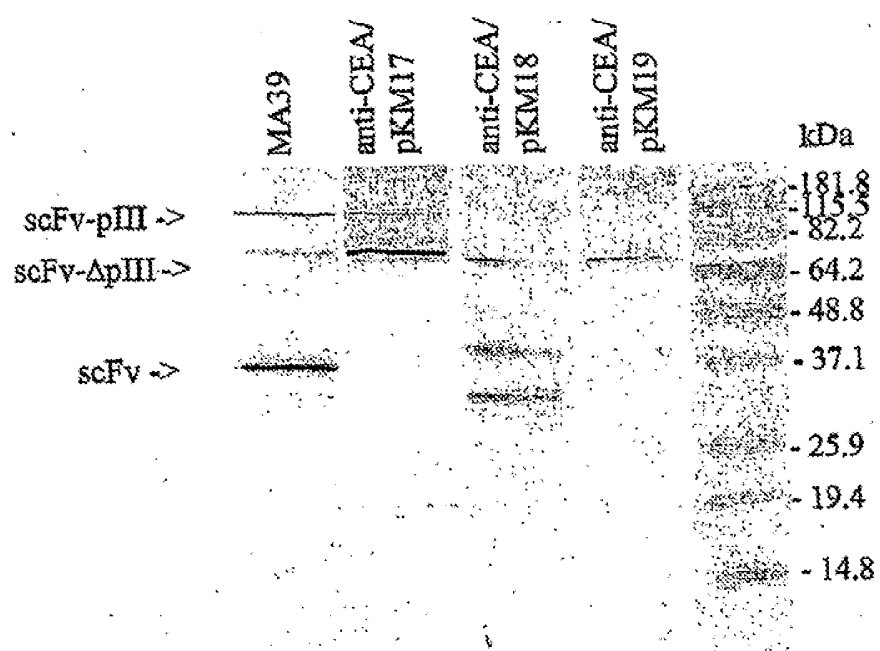


Fig. 8

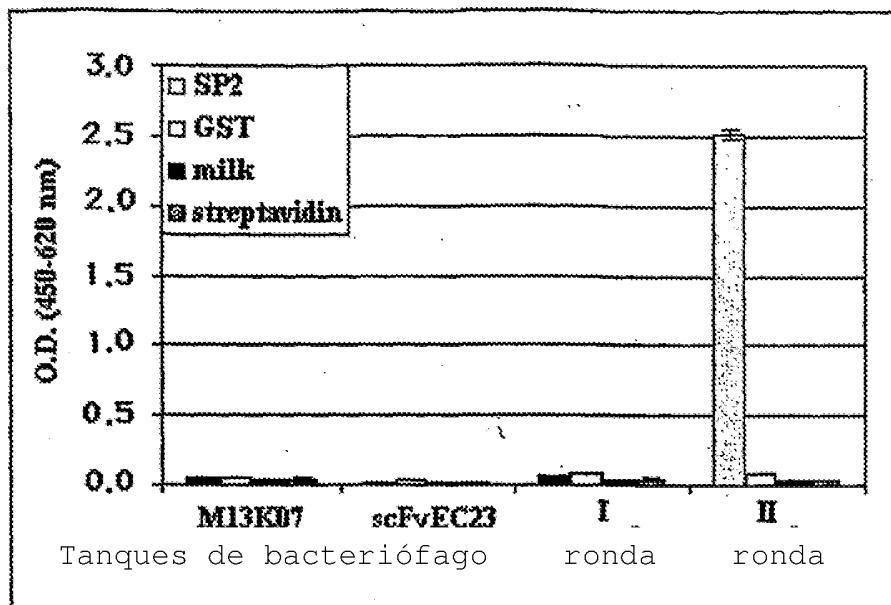


Fig. 9

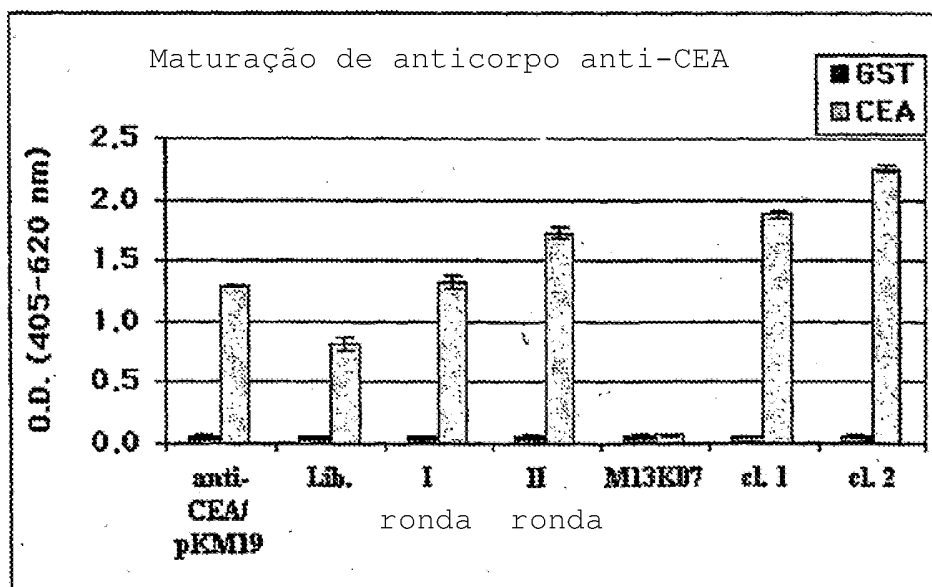


Fig. 10

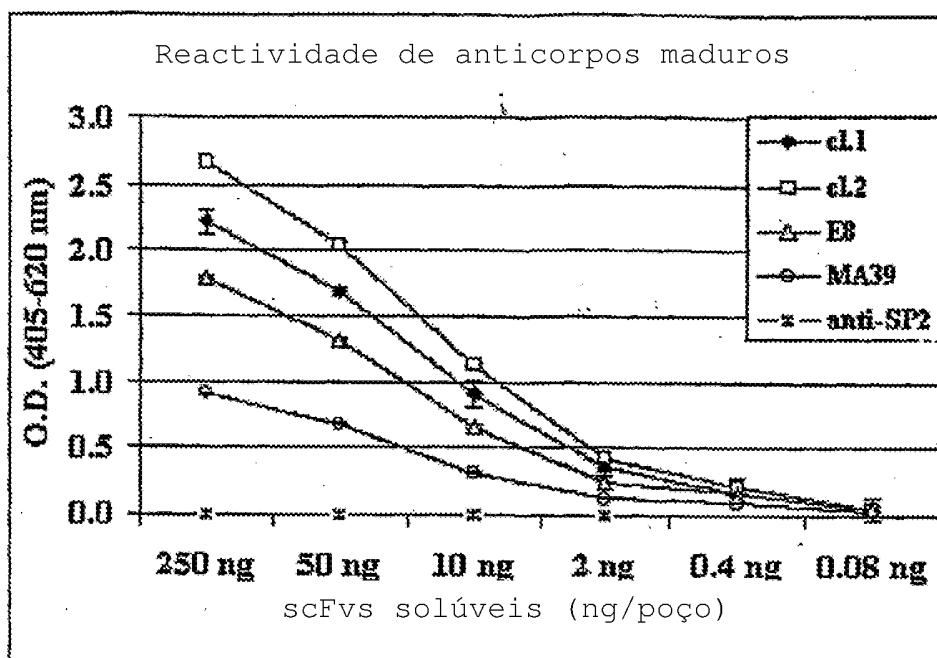


Fig. 11

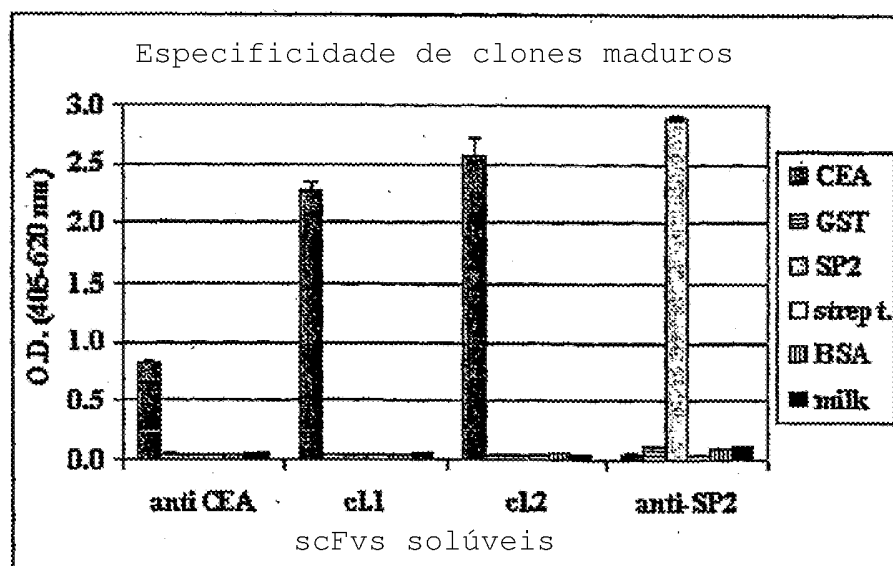


Fig. 12

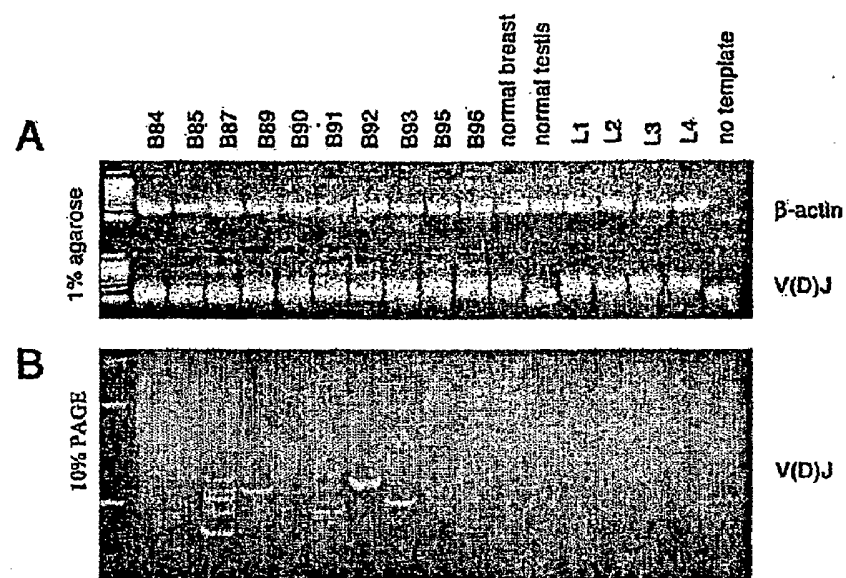


Fig. 13

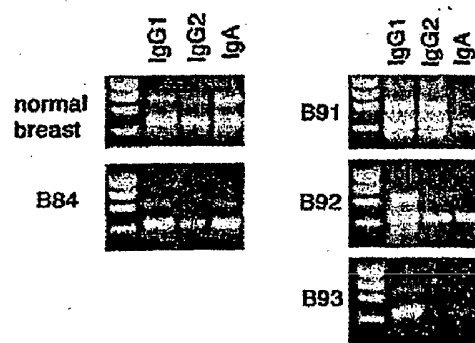


Fig. 14

B92 heavy chain

VH	number of clones	CDR1	CDR2	CDR3
B92-A	8	ENSAAWS	TRYRSKWINDYALSVKS	WEAFTAVAGFNYYTGMDV
B92-B1	5	SYINS	RIYASGRPKYNPSLKS	VYSSSLTDFDYVGLDV
B92-B2	1	-----	-----	-C-----
B92-C1	2	GSSNYWG	SINVIQTYYNPSFKS	RTKWCWEDP
B92-C2	1	-----	-T-----	-----

B93 heavy chain

VH	number of clones	CDR1	CDR2	CDR3
B93-A1	5	NYSLN	AISSSGTYRPFYADSLRG	DLGDLFWLHSPDP
B93-A2	1	---P-	---R-----	-----D-----
B93-B1	5	SIWID	IIYPDSDTRYSPSFQG	RGDSGTLWGD
B93-B2	1	N----	-----	-----
B93-C	1	SYAMN	SISGSGTGTYYANEVQG	DSLNQLPGTYFDY

Fig. 15

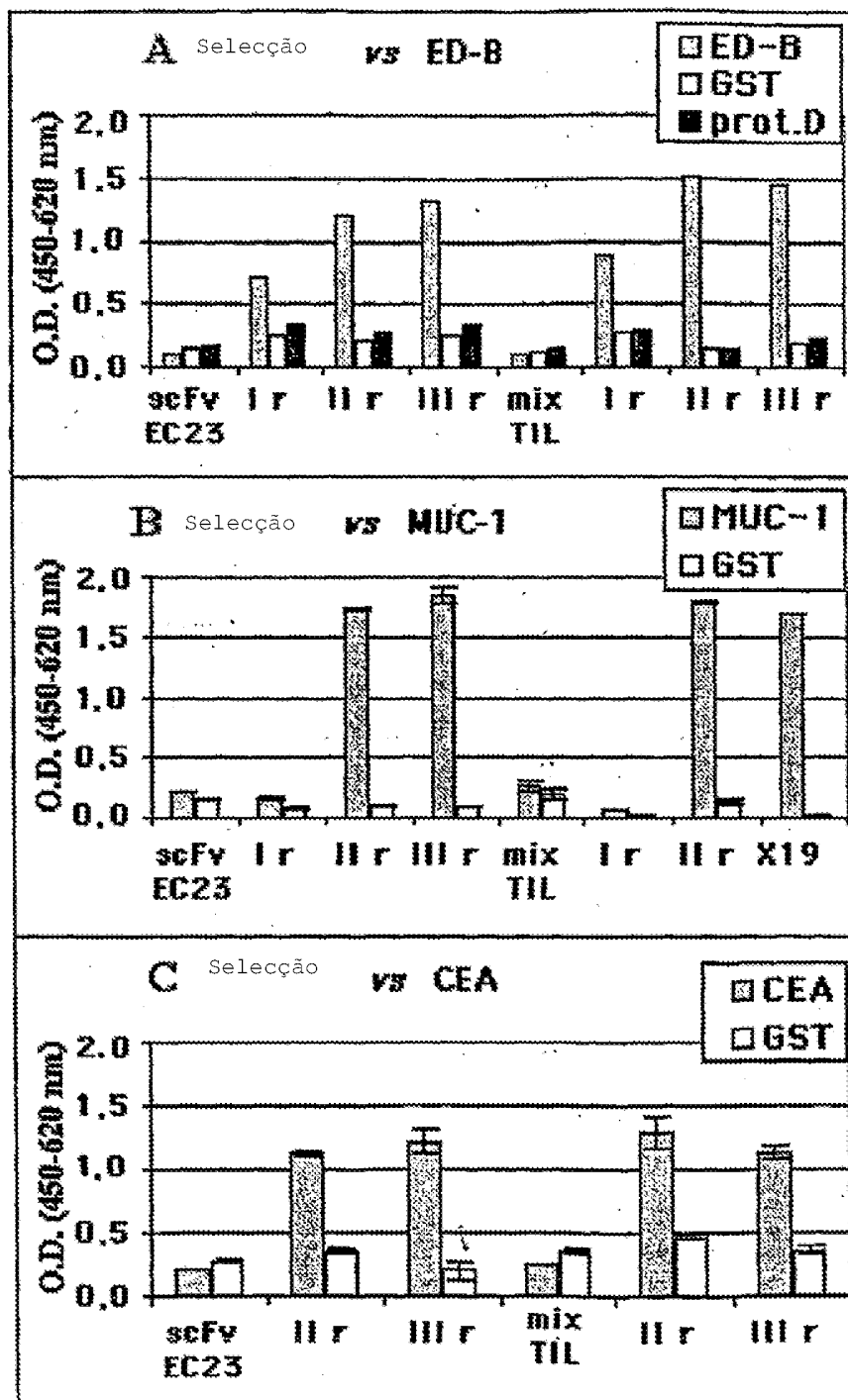


Fig. 16

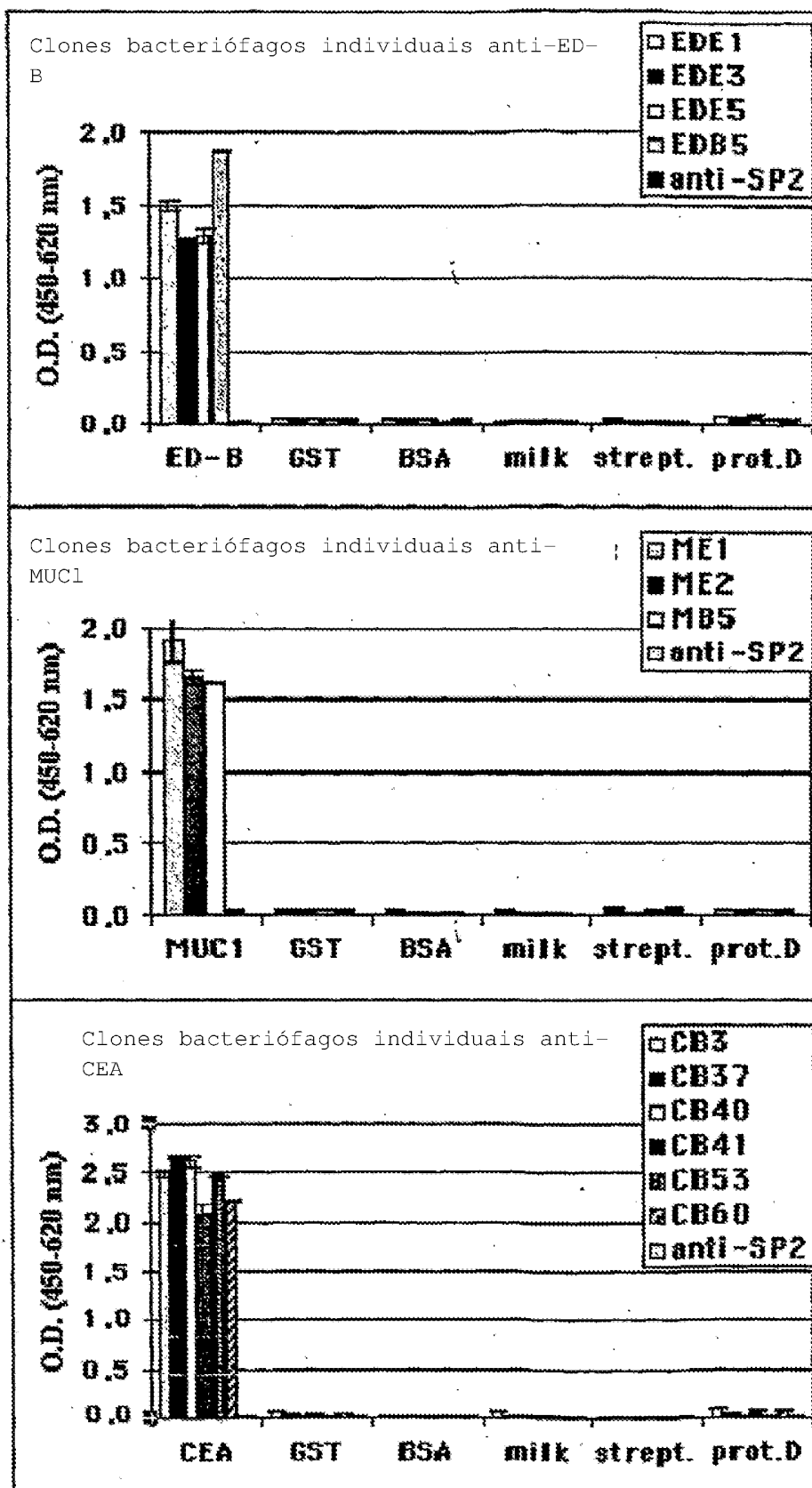


Fig. 17

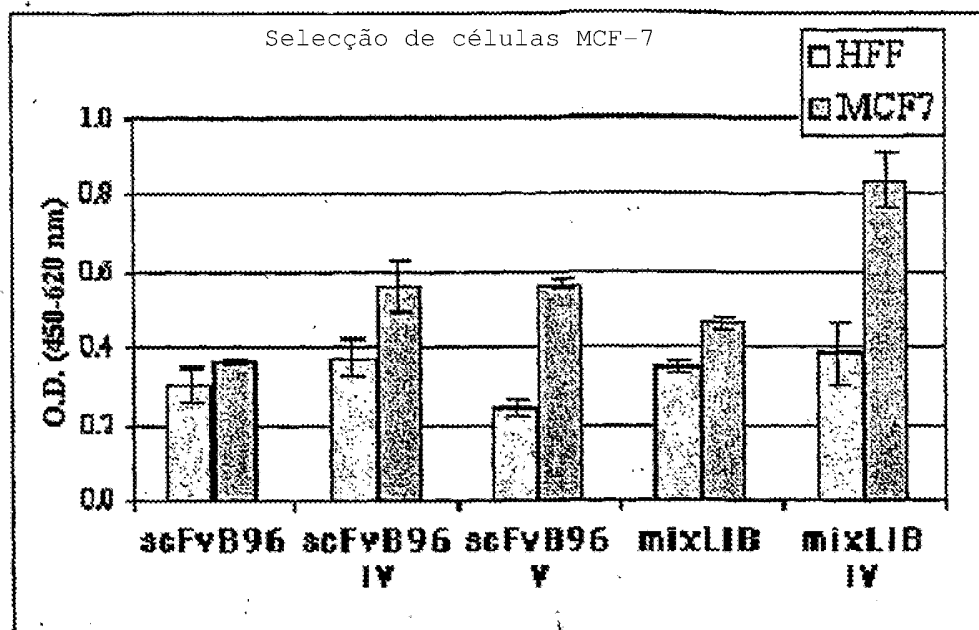


Fig. 18

average	HFF	MCF10-2A	MCF7	MDA-MB468
mix 7	0.119	0.192	0.490	0.383
mix 8	0.462	0.548	2.241	1.149
mix 11	0.254	0.350	0.424	0.507
mix 12	0.282	0.291	0.673	0.414
mix 17	0.118	0.179	0.606	0.435
mix 23	0.157	0.223	0.585	0.393
mix 25	0.236	0.318	0.622	0.382
mix 39	0.168	0.237	1.527	0.497
B96/4F	0.222	1.711	0.497	0.376
B96/11L	0.142	0.206	1.148	0.501
α SP2	0.110	0.192	0.149	0.183

Fig. 19

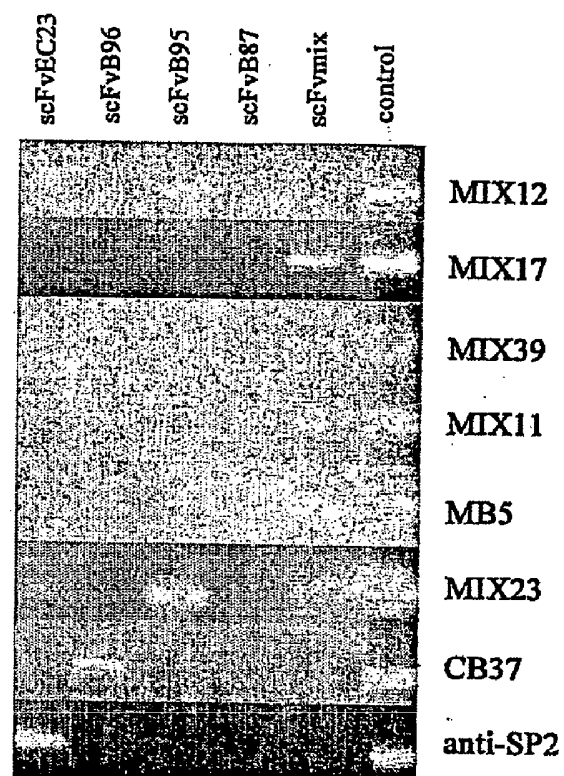


Fig. 20

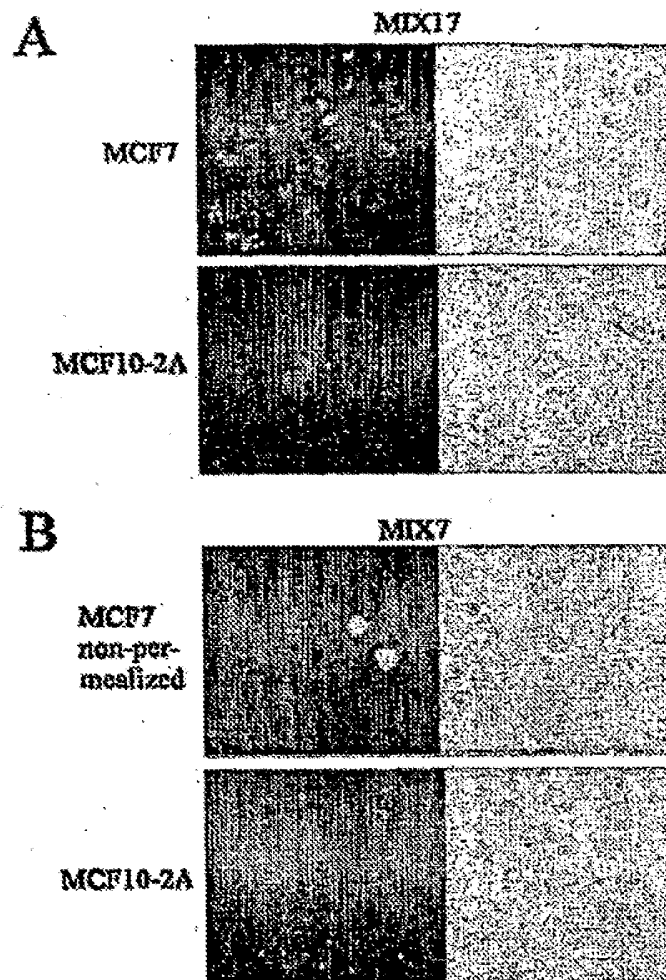


Fig. 21

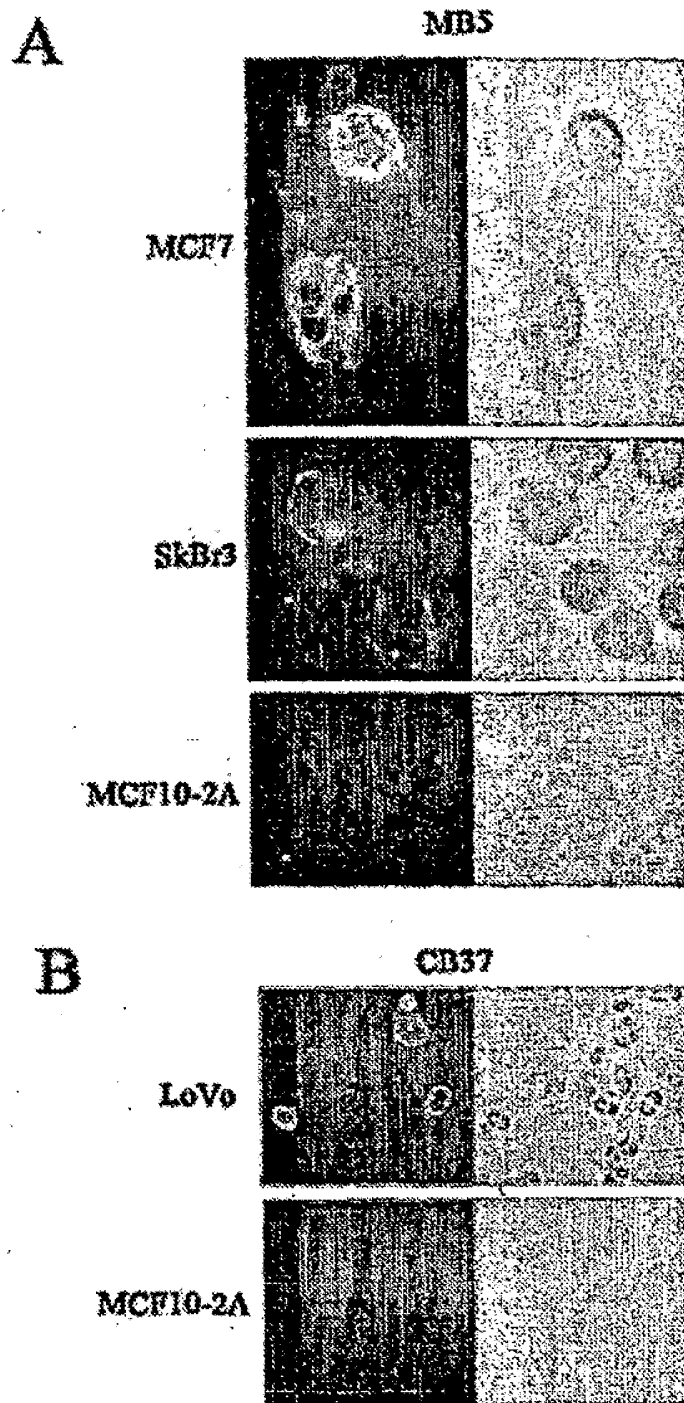


Fig. 22



European Patent Office
Postbus 5818
2280 HV RIJSWIJK
NETHERLANDS
Tel. +31 (0)70 340-2040
Fax +31 (0)70 340-3016



Capasso, Olga
De Simone & Partners S.p.A.
Via Vincenzo Bellini, 20
00198 Roma
ITALIE

**For any questions about
this communication:**
Tel.: +31 (0)70 340 45 00

Date

24.03.11

Reference BE 103284	Application No./Patent No. 06842807.7 - 1222 / 1966375
Applicant/Proprietor SIGMA-TAU Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.A., et al	

Decision to grant a European patent pursuant to Article 97(1) EPC

Following examination of European patent application No. 06842807.7 a European patent with the title and the supporting documents indicated in the communication pursuant to Rule 71(3) EPC dated 20.12.10 is hereby granted in respect of the designated Contracting States.

Patent No. : 1966375
Date of filing : 27.12.06
Priority claimed : 27.12.05/EPA 05028501

Designated Contracting States
and Proprietor(s)

: AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IS IT LI LT LU
LV MC NL PL PT RO SE SI SK TR
SIGMA-TAU
Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.A.
Viale Shakespeare 47
00144 Roma/IT

AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IS IT LI LT LU
LV MC NL PL PT RO SE SI SK TR
TECNOGEN S.P.A.
Località La Fagianeria
81013 Piana di Monte Verna/IT

This decision will take effect on the date on which the European Patent Bulletin mentions the grant (Art. 97(3) EPC).

The mention of the grant will be published in European Patent Bulletin 11/16 of 20.04.11.