

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ

(19) **BG**

(11) **64907 B1**



ОПИСАНИЕ КЪМ ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(51) Int.Cl.

C 07 K 14/47 (2006.01)
C 12 N 15/12 (2006.01)
C 12 Q 1/68 (2006.01)
A 61 K 48/00 (2006.01)
C 12 N 5/10 (2006.01)
C 12 N 15/62 (2006.01)
C 07 K 16/18 (2006.01)
C 12 N 5/06 (2006.01)
G 01 N 15/00 (2006.01)

(21) Регистров № 102973
(22) Заявено на 01.12.1998
(24) Начало на действие
на патента от: 07.05.1997

Приоритетни данни

(31) 60/017,427	(32) 08.05.1996	(33) US
60/019,300	07.06.1996	US
60/021,859	16.07.1996	US
60/043,533	11.04.1997	US

(41) Публикувана заявка в
бюлетин № 8 на 31.08.1999
(45) Отпечатано на 31.08.2006
(46) Публикувано в бюлетин № 8
на 31.08.2006
(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег. №

(73) Патентоприитежател(и):
**BIOGEN IDEC MA INC., CAMBRIDGE, 14
CAMBRIDGE CENTER, MASSACHUSETTS (US)**

(72) Изобретател(и):
**Michele Sanicola-Nadel
Winchester, Massachusetts
Catherine A. Hession
Hingham, Massachusetts
Richard L. Cate
Weston, Massachusetts (US)**

(74) Представител по индустриална
собственост:
**Румяна Стефанова Слабова, 1124 София,
ул. "Леонардо да Винчи" 3**

(86) № и дата на РСТ заявка:
PCT/US1997/007726, 07.05.1997

(87) № и дата на РСТ публикация:
WO1997/044356, 27.11.1997

(54) ИЗОЛИРАНА НУКЛЕИНОВА КИСЕЛИНА, СЪСТАВ И ИЗПОЛЗВАНЕ

(57) Изобретението се отнася до нуклеотидни последователности, които кодират лиганда Ret (RetL), както и до използването им в медицината за лечение и диагностика, като стимулират нервния и бъбречен растеж чрез въздействие върху клетки или бозайници с ДНК за RetL или с белтък. Изолираната и пречистена нуклеинова киселина кодира полипептид с най-малко 80% хомоложна последователност на аминокиселинна последователност, избрана от групата, състояща се от SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 21, при което този полипептид взаимодейства с рецепторен белтък Ret, за да отключи димеризацията на рецепторния белтък Ret или автофосфорилирането на тирозинкиназния домен на рецепторния белтък Ret.

15 претенции, 10 фигури

BG 64907 B1

(54) ИЗОЛИРАНА НУКЛЕИНОВА КИСЕЛИНА, СЪСТАВ И ИЗПОЛЗВАНЕ

Област на техниката

Настоящото изобретение се отнася до нуклеотидни последователности, които кодират лиганда Ret (RetL), като и до използването им в медицината за лечение и диагностика като стимулират нервния и бъбречен растеж чрез въздействие върху клетки или бозайници с ДНК за RetL или с белтък.

Предшестващо състояние на техниката

Една от целите на настоящото изследване върху клетъчното сигнализиране и рецепторно активиране е да направи възможно терапевтичното модулиране на процесите, които участват в клетъчния растеж и преживяемост. Такива процеси определят изхода от различни състояния в медицината, в това число органна недостатъчност, пренатално развитие, туморен растеж и др. Всяко едно от тези състояния е от значение за клиниката в световен мащаб и е с ограничени възможности за ефикасно лечение. Задача на изобретението е да обезпечи препарати и методи за стимулиране на регенерацията или оцеляването на увредена тъкан, както и за лечение на заболявания, които включват увреден растеж или развитие на тъканите.

Загубата на тъкани или органната недостатъчност в краен стадий всяка година засягат милиони хора по света и до голяма степен допринасят за оскъпяване на здравеопазването. Загубата на органи или тъкани обикновено се лекува чрез трансплантация на органи от донори, чрез хирургична реконструкция или чрез механични протези. Всяко едно от тези средства има недостатъци. Трансплантацията се ограничава от проблемите с донорите, хирургичната реконструкция може да създаде други дълготрайни проблеми, а механичните протези не могат да изпълняват всички функции на даден орган и по тази причина не могат да възпрат прогресивното влошаване на състоянието. Следователно, в медицината съществува реална необходимост от ново решение на тези проблеми.

Белтъчните фактори, които въздействат върху растежа, диференциацията и/или преживяемостта на клетките, могат да бъдат от полза в лечението на нарушения в органите, кои-

то съдържат реактивоспособни клетки, факторите или лигандите, които взаимодействат с рецептори от семейството на тирозинкиназните белтъчни рецептори (RPTK) представляват особено интерес в това отношение. Тези рецептори участват в множество клетъчни програми, в това число в клетъчния растеж и диференциация, както и в генезиса на много неоплазии. Ето защо факторите или лигандите, които взаимодействат с тези рецептори, могат да се окажат полезни за лечение на заболявания на определени органи, при които тъканта е била увредена. От друга страна за блокиране на туморния растеж полезно би могло да бъде блокирането на взаимодействието на тези фактори с техните рецептори.

Прото-онкогенът Ret кодира рецепторната тирозинкиназа, която се експресира по време на развитието в различни тъкани, в това число в периферната и централна нервна система и в бъбреците. Аномалии, присъщи на мишките ret null подсказват, че Ret е критичен за миграцията и инервацията на чревните неврони в задните черва, както и за пролиферацията и разклоняването на епитела на уретерния зачатък по време на бъбречното развитие (Nature 367, 380-383, 1994). Търсенето на ключов компонент от пътя за предаването на сигнали посредством Ret, лиганда Ret, представлява област на интензивни изследвания.

Техническа същност на изобретението

Изобретението се отнася до изолирана нуклеинова киселина кодираща полипептид с най-малко 80 % хомоложна последователност на аминокиселинна последователност избрана от групата, състояща се от SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 21, при което този полипептид взаимодейства с рецепторен белтък Ret, за да отключи димеризацията на рецепторния белтък Ret или автофосфорилирането на тирозинкиназния домен на рецепторния белтък Ret.

Пречистената и изолирана молекула ДНК, кодираща RetL, съгласно изобретението, която е с нуклеотидна последователност на който и да е RetL, но по-конкретно включва кДНК за плъши RetL1 (SEQ ID NO: 1), кДНК за част от човешки RetL1 (SEQ ID NO: 8), кДНК за пълноразмерен човешки RetL2 (SEQ ID NO:10), кДНК за човешки RetL2 (SEQ ID NO:12), кДНК за миши RetL3 (SEQ ID NO:16), кДНК за част от човешки RetL3 (SEQ ID NO:18) или кДНК за човешки RetL3 (SEQ ID

NO:20). Освен това изобретението предоставя белтъка RetL с аминокиселинна последователност, включваща тази на плъщи RetL1 (SEQ ID NO: 2), част от човешки RetL1 (SEQ ID NO: 9), пълноразмерен човешки RetL1 (SEQ ID NO:11), човешки RetL2 (SEQ ID NO:13), миши RetL3 (SEQ ID NO:17), част от човешки RetL3 (SEQ ID NO:19) или човешки RetL3 (SEQ ID NO:21).

В друго приложение изобретението включва последователност ДНК, която съдържа последователността кДНК (за част от човешки RetL1 (SEQ ID NO: 8) на ДНК, включена в клон HRL20, която е с ATCC No. 97604 или последователността на ДНК, включена в клон#230-5A-86-17 (кДНК за плъщи RetL1 (SEQ ID NO: 1), която е с ATCC No. 98047.

В друго приложение на изобретението, пречистена и изолирана молекула ДНК, предназначена да се използва за стабилна експресия на полипептиден продукт в прокариотна или еукариотна клетка гостоприемник, има поне част от първичната структурна конформация и биологична активност на RetL; ДНК може да бъде а) молекула ДНК, която включва кДНК за плъщи RetL1, кДНК за част от човешки RetL1, кДНК за пълноразмерен човешки RetL1, кДНК за човешки RetL2, кДНК за миши RetL3 или кДНК за човешки RetL3, или комплементарната верига на кДНК за плъщи RetL1, на кДНК за част от човешки RetL1, на кДНК за пълноразмерен човешки RetL1, на кДНК за човешки RetL2, на кДНК за миши RetL3 или на кДНК за човешки RetL3; б) молекули ДНК, които хибридизират при строги условия с молекулите ДНК, дефинирани в а) или с фрагменти от тях; или с) молекули ДНК, които въпреки дегенерацията на генетичния код биха хибридизирали с молекулите ДНК, дефинирани в а) и б). В границите на изобретението попада също така пречистена и изолирана молекула ДНК, която кодира полипептиден фрагмент или вариант на човешки RetL, притежаващи биологична активност на RetL.

Всяка от рекомбинантните молекули ДНК на изобретението може да бъде оперативно свързана към последователност за контрол върху експресията.

Изобретението включва също така вектори и системи за пренос, които обхващат молекулите ДНК или конструкциите, дефинирани в цялото описание. Векторът може да

включва молекула ДНК, кодираща RetL или вариант на RetL.

Изобретението включва прокариотни или еукариотни клетки гостоприемници, стабилно трансформирани или трансфектирани с вектор, който съдържа молекула ДНК, кодираща нативен RetL или негов вариант.

Характерно за изобретението е, че то включва пречистен и изолиран човешки RetL, по същество несъдържащ други човешки белтъци, както и процедура за получаването на полипептиден продукт, който притежава цялата или част на първичната структурна конформация и биологична активност на RetL. Такава процедура може да включва етапите на отглеждане, при подходящи условия на култивиране, на прокариотни или еукариотни гостоприемни клетки, трансформирани или трансфектирани с която и да е молекула ДНК на изобретението, по начин, който позволява експресията на такъв полипептиден продукт и добиването на RetL. Включва се също така и полипептидният продукт от експресията на ДНК в прокариотна или еукариотна гостоприемна клетка.

Изобретението включва също белтъци и белтъчни фрагменти, варианти и производни, независимо от това дали са разтворими или мембранно свързани. В избрани приложения, белтъкът има аминокиселинна последователност, която включва плъщи RetL1, част от човешки RetL1, пълноразмерен човешки RetL, човешки RetL2, миши RetL3 или човешки RetL3, или представлява вариант на една от тези последователности. В други приложения, белтъкът представлява слят белтък, включващ Ret или RetL, слят с друга молекула или молекулен фрагмент, такъв като имуноглобулин, токсин, контрастно съединение или радионуклид. Включени са също така и химерни молекули на RetL.

Други приложения на изобретението включват специфични моноклонални антитела срещу RetL на изобретението. Едно такова антитяло може да бъде свързано с токсин, контрастно съединение или радионуклид. Изобретението включва също хибридомни клетъчни линии, които произвеждат специфични антитела срещу Ret, в това число AA.FF9, AAE3, AFE9, BAB1, BB.B6, AA.GE7, CD.F11, AH.E3, CD.G4, AG.E7, BD.G6 и BH.G8, както и субклоновете на тези хибриди.

Освен това изобретението включва из-

ползване на съединението за растеж на нова тъкан или за стимулиране оцеляването на увредена тъкан в субект. Съединението може да бъде RetL1, RetL2 или RetL3, фрагмент от пълноразмерен RetL или анти тяло, което се свързва с Ret. Използването на съединението може да бъде заедно с второ съединение, такова като GDNF, неурторин или молекула, родствена на GDNF. Тъканите, при които могат да се използват съединенията, и особено такива, които са предпочитани, са бъбречна тъкан, нервна тъкан, сърце, стомах, тънки черва, гръбначен стълб или бял дроб. Може да се използва RetL, който представлява разтворим RetL. Субектът може да е човек.

При друго използване съгласно изобретението, се потиска предаването на сигнал чрез Ret между първа клетка, експресираща Ret и втора клетка, чрез създаване на условия първата клетка да влезе в контакт с разтворим белтък Ret или с анти тяло срещу Ret. Разтворимият белтък Ret може да бъде слят белтък.

При използване на съединението на изобретението може да се постигне насочване на токсин, контрастно вещество или радионуклид към клетка, която експресираща Ret и включва създаването на контакт между клетката и слят белтък на Ret или анти-Ret анти тяло, конюгирано с токсин, контрастно вещество или радионуклид. RetL може да бъде RetL1, RetL2 или RetL3. При използването на съединението от изобретението може да се потисне растежа на туморна клетка, която експресираща Ret, при което като етап се създава контакт между клетката и слят белтък на RetL с токсин или радионуклид или анти-Ret анти тяло, конюгирано с токсин или радионуклид. Клетката може да бъде в субект и белтъкът или конюгираното анти тяло се въвеждат в субекта.

При използването може да се постигне насочване на токсин, контрастно вещество или радионуклид към клетка, експресираща RetL, при което се създава контакт между клетката и слят белтък включващ Ret и токсин, контрастно вещество или радионуклид или анти-RetL анти тяло, конюгирано с токсин, контрастно вещество или радионуклид. При използването може да се постигне потискане на растежа на туморната клетка, която експресираща RetL, и обхваща създаване на контакт между клетката и слят белтък на Ret и токсин или радионуклид или между клетката и анти-RetL анти тяло, ко-

нюгирано с токсин или радионуклид; клетката може да бъде в субект, върху който се прилага белтъкът.

RetL може да бъде RetL1, RetL2 или RetL3 или вариант или фрагмент на RetL1, RetL2 или RetL3.

Използването може да бъде също за целите на генната терапия. Едно приложение може да бъде за лечение на субект с нарушение в метаболизма на Ret, при което се използва вектор, съдържащ молекула на ДНК, кодираща RetL. При това може да се получи стимулиране на растежа на нова тъкан в субект, както и стимулиране на оцеляването на увредена тъкан в субект.

Кратко описание на приложените фигури

Фигура 1 представлява последователност кДНК (SEQ ID NO: 1) и изведената от нея аминокиселинна последователност (SEQ ID NO: 2) на пълши RetL1. Нуклеотидната последователност се разпростира от базова двойка 201 до базова двойка 1700 на SEQ ID NO: 1 и съдържа цялата отворена рамка за четене.

Фигура 2А представлява частична последователност кДНК (SEQ ID NO: 8) и изведената от нея аминокиселинна последователност (SEQ ID NO: 9) на човешки RetL1. Тази последователност е последователността, включена в клон HRRL20, депозиран като ATCC № 97604.

Фигура 2В представлява комбинирана пълноразмерна последователност ДНК (SEQ ID NO: 10) и изведената от нея аминокиселинна последователност (SEQ ID NO: 11) на човешки RetL1.

Фигура 3А представлява сравняване на нуклеотидна последователност на човешки RetL1 (горният ред на последователността) с последователността на пълши RetL1 (долният ред на последователността). Вертикалните линии между нуклеотидите показват идентичност в позицията, докато точките посочват празнина в тази позиция.

Фигура 3В представлява сравняване на аминокиселинната последователност на човешки RetL1 (горният ред на последователността) с последователността на пълши RetL1 (долният ред на последователността). Вертикалните линии между съответните аминокиселини показват идентичност на остатъка, докато точките посочват консервативна замяна при този остатък.

Фигура 4 представлява схематична диаграма за възможната роля на Ret и RetL1 във взаимодействието между метанефритна мезенхимна клетка и клетка на уретерния зачатък.

Фигура 4B представлява схематична диаграма на метод за търсене на трансфектанти в библиотека кДНК за клонове, които експресират RetL. Наличието на експесиран RetL върху трансфектантите се установява чрез определяне свързването от тези трансфектанти на слетия белтък Ret/IgG или на слетия белтък Ret/алкална фосфатаза.

Фигура 5 представлява схематична диаграма, която показва конструирането на плазмидите, използвани за експресия на слетия белтък плъши RetL/IgG.

Фигура 6 представлява схематична диаграма, която показва конструирането на плазмидите, използвани за експресия на слетия белтък човешки Ret/IgG.

Фигура 7 представлява последователност кДНК (SEQ ID NO: 12) и изведената от нея аминокиселинна последователност (SEQ ID NO: 13) на човешки RetL2, както е намерена в клон DSW240. Белтъчната рамка за четене се намира между нуклеотиди 25 и 1416.

Фигура 8 представлява сравняване на аминокиселинната последователност на човешки RetL2 (горният ред на последователността) с последователността на човешки RetL1 (долният ред на последователността). Вертикалните линии между аминокиселините показват идентичност в позицията, докато точките посочват празнина в тази позиция.

Фигура 9 представлява последователност кДНК (SEQ ID NO: 16) и изведената от нея аминокиселинна последователност (SEQ ID NO: 17) на миши RetL3.

Фигура 10 представлява последователност кДНК (SEQ ID NO: 20) и изведената от нея аминокиселинна последователност (SEQ ID NO: 21) на човешки RetL3.

Подробно описание на изобретението

На нуклеотидните и аминокиселинни последователности, цитирани в описанието, бяха дадени следните идентификационни номера:

SEQ ID NO: 1 - кДНК на плъши RetL1
SEQ ID NO: 2 - ак на плъши RetL1
SEQ ID NO: 3 - олигомер kid-13

SEQ ID NO: 4 - олигомер kid-14

SEQ ID NO: 5 - олигомер kid-15

SEQ ID NO: 6 - кДНК на извънклетъчен плъши RetL1

SEQ ID NO: 7 - ак на извънклетъчен плъши RetL1

SEQ ID NO: 8 - кДНК на част от човешки RetL1

SEQ ID NO: 9 - ак на част от човешки

10 RetL1

SEQ ID NO: 10 - кДНК на човешки RetL1

SEQ ID NO: 11 - ак на човешки RetL1

SEQ ID NO: 12 - кДНК на човешки RetL2

SEQ ID NO: 13 - ак на човешки RetL2

15 SEQ ID NO: 14 - кДНК на част от миши RetL3 (EST AA50083)

SEQ ID NO: 15 - ак на част от миши RetL3

SEQ ID NO: 16 - кДНК на миши RetL3

20 SEQ ID NO: 17 - ак на миши RetL3

SEQ ID NO: 18 - кДНК на част от човешки RetL3

SEQ ID NO: 19 - ак на част от човешки

SEQ ID NO: 20 - кДНК на човешки RetL3

SEQ ID NO: 21 - ак на човешки RetL3

25

Определения

Използваният тук термин "RetL" означава всеки белтък, който взаимодейства специфично с рецепторния белтък Ret и който, когато взаимодейства с Ret, задейства димеризацията и/или автофосфорилирането на тирозинкиназния домен на Ret. Последователностите ДНК, които кодират RetL и Ret, са наречени съответно "RetL" и "Ret". Лигандът може да бъде разтворим или да присъства като мембранно-свързана молекула върху същата или върху друга клетка, върху която е молекулата Ret, чието автофосфорилиране той отключва. В определени приложения или взаимодействия с Ret лигандът може да изисква допълнителни молекули, за да отключи автофосфорилирането. Лигандите на изобретението включват ко-рецептори или допълнителни (аксесоарни) лигандни кофактори. Освен това лигандите на изобретението включват анти-Ret mAbs, които действат като антагонисти на Ret, отключвайки димеризацията и автофосфорилирането на Ret. Лигандите могат също така да бъдат модифицирани по различни начини, като напр. да представляват част от слят белтък, като такъв слят с токсин или радионуклид.

Под "наslagване (alignment) на последователностите" се разбира съпоставяне на една последователност, било то нуклеотидна или аминокиселинна, с друга, което позволява сравняването на последователността в съответен участък от едната с този от другата. Пример за един метод на тази процедура е даден в Needleman et al. (J. Mol. Biol. 48:443-453, 1970). За удобство методът може да се приложи чрез компютърни програми, такива като програмата Align (DNASTar, Inc.). Както ще стане понятно за специалистите от областта на техниката, хомоложните или функционално еквивалентни последователности включват функционално еквивалентно подреждане на цистеиновите остатъци в рамките на консервативния цистеинов скелет, което подреждане включва инсерции или делеции, променящи линейното разположение на тези цистеини, но незасягащи по същество тяхното взаимно разположение в нагънатата структура на белтъка. Ето защо вътрешните празнини или аминокиселинни инсерции във въпросната последователност се пренебрегват с цел да се изчисли равнището на хомология или идентичност в аминокиселинните последователности на въпросната и използваната за сравнение (референтна) последователност. Една характерна особеност, която често се използва за установяване на хомология между белтъците, представлява сходството в броя и разположението на цистеиновите остатъци в единия и другия белтък.

Под "клониране" се разбира използването на рекомбинантни техники *in vitro* за включване на определен ген или на друга последователност ДНК във векторна молекула. За да се клонира успешно желаната последователност, е необходимо да се използват методи за получаване на фрагменти ДНК, за свързване на фрагментите с векторните молекули, за въвеждане на съставната молекула ДНК в гостоприемна клетка, в която тя може да се реплицира, както и за отбор на клона, който има целевия ген измежду реципиентните клетки-гостоприемници.

Под "кДНК" се разбира комплементарна или копие ДНК, получено от матрица РНК чрез действието на РНК-зависима ДНК полимераза (обратна транскриптаза). Така "клон кДНК" означава двойноверижна последователност ДНК, комплементарна на молекулата РНК, която представлява интерес, съдържаща се в клониращ вектор.

Под "библиотека кДНК" се разбира колекция от рекомбинантни молекули ДНК, съдържащи включена кДНК (инсерт), които взети заедно са представителни за молекулите мРНК, присъстващи в целия организъм или тъкан, в зависимост от източника на матриците РНК. Подобна библиотека кДНК може да се получи чрез методи, познати на специалистите, каквито са описани например в Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, по-горе. Най-общо, най-напред се изолира РНК от клетките на организъм, от чиито геном се желае клонирането на определен ген. Предпочетени за целите на настоящото изобретение са клетъчни линии от бозайници и по-конкретно човешки клетъчни линии. Като алтернатива РНК може да се изолира от туморна клетка, получена от животински тумор, а за предпочитане от човешки тумор. Така например библиотека може да се приготви от човешки надбъбречен тумор, но би могъл да се използва и всеки друг тумор.

Използваният тук термин "полиморфизъм на ДНК" се отнася за условия, при които на определено място в ДНК могат да съществуват две или повече различни нуклеотидни последователности.

"Експресионен вектор" включва вектори, които могат да експресират последователностите ДНК, съдържащи се в тях, т.е., кодиращите последователности са оперативно свързани с други последователности, способни да осъществят тяхната експресия. Подразбира се, макар и не винаги да се съдържа като експлицитно твърдение, че тези експресионни вектори трябва да подлежат на репликация в гостоприемния организъм или като епизоми, или като съставна част от хромозомната ДНК. Полезен, но не и необходим елемент на един ефективен експресионен вектор е последователност, която кодира маркер. Такава последователност кодира белтък, който води до фенотипен признак (напр. тетрациклинова устойчивост) на клетката, съдържаща белтъка, което позволява тези клетки да бъдат лесно идентифицирани. Ако обобщим, на "експресионен вектор" се дава функционално определение и в този термин, така както той се прилага към конкретната последователност, се включва и всяка последователност ДНК, която може да влияе върху експресията на съдържащия се конкретно определен ДНК-код.

Такива вектори често са под формата на плазмиди, така че "плазмид" и "експресионен вектор" често се използват като взаимозаменяеми. Изобретението обаче предвижда включването и на други такива форми на експресионните вектори, в това число фаги, които изпълняват еквивалентни функции и които придобиват все по-голяма известност в областта на техниката.

Предвижда се, по подобен начин "функционално производно" на ген за всеки от белтъците на настоящото изобретение да включва "фрагменти", "варианти" и "аналози" на гена, които да бъдат "сходни по същество" по нуклеотидна последователност и които кодират молекула, притежаваща сходна активност.

"Молекула родствена на GDNF" означава всяка молекула, която е най-малко 40% хомоложна на GDNF или неуртурин и е способна специфично да се свързва с RetL.

Терминът "ген" означава полинуклеотидна последователност, кодираща пептид.

Под "хомогенен", когато се отнася за последователност на белтък или ДНК, се разбира, че на практика първичната молекулна структура (т. е. последователността на аминокиселините или нуклеотидите) на всички молекули, присъстващи във въпросния препарат, е идентична.

Терминът "олигонуклеотид", така както се използва тук за означаване на проби, олигомерни фрагменти, които ще се открият, олигомерни контроли, небелязани блокиращи олигомери или праймери за амплификация на последователности, се дефинира като молекула, съставена от повече от три дезоксинуклеотида или рибонуклеотида. Неговата точна големина ще зависи от много фактори, които на свой ред зависят от задължителната функция или приложение на олигонуклеотида.

Терминът "проба" се отнася за лиганд с известни качества, който е способен избирателно да се свързва с прицелния антилиганд. Когато се прилага към нуклеинови киселини, терминът "проба" се отнася за верига на нуклеинова киселина, която има последователност от бази, комплементарна на прицелната верига.

"Рекомбинантна клетка гостоприемник" се отнася за клетка, която е била трансформирана с вектори, конструирани чрез използване на рекомбинантни ДНК-техники. Както се

дефинират тук, анти тяло или негова модификация, произведени от рекомбинантна клетка гостоприемник, са по-скоро резултат от тази трансформация, а не са в такива по-малки количества, или по-общо казано, не са в такива, по-малки от възможните за откриване количества, които биха се произвели от нетрансформиран гостоприемник.

Така, както се използва тук, терминът "рестрикционни ендонуклеази" и "рестрикционни ензими" се отнася за бактериални ензими, всеки от които къса двойноверижна ДНК във или близо до специфична нуклеотидна последователност.

Използваният тук, терминът "полиморфизъм в дължината на рестриктазните фрагменти" ("RFLP") се отнася за различия между индивидите в дължините на определен рестриктазен фрагмент.

Една молекула се нарича "по същество сходна" на друга молекула, ако последователността на аминокиселините в двете молекули е на практика една и съща и ако двете молекули притежават сходна биологична активност. Така при условие, че две молекули притежават сходна активност, те се смятат за варианти, в смисъла, в който този термин се използва тук, дори ако едната от молекулите съдържа допълнителни аминокиселинни остатъци, които не се откриват в другата, или ако последователността от аминокиселинни остатъци не е идентична. Една молекула се нарича "химично производно" в смисъла на използвания тук термин, когато съдържа допълнителни химични групи, които обикновено не са част от молекулата. Такива групи могат да подобрят молекулната разтворимост, абсорбция, биологичен полуживот и т. н. От друга страна, групите могат да понижат токсичността на молекулата, да отстранят или отслабят всеки нежелан страничен ефект на молекулата и т. н. Групи, способни да осъществят такива ефекти, са представени, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th ed., Mack Publishing Co., Easton, Penn. (1980).

Под "вектор" се разбира молекула ДНК, получена от плазмид или бактериофаг, в която могат да се включат или клонират фрагменти от ДНК. Векторът съдържа едно или повече уникални рестриктазни места и може да бъде способен на автономна репликация в определен гостоприемник или организъм-носител, та-

ка че клонираната последователност да се възпроизвежда.

Под "чист по същество" се разбира всеки белтък на настоящото изобретение или всеки ген, кодиращ всеки такъв белтък, който на практика не съдържа други белтъци или гени, съответно, или други примеси, с които той обикновено се открива в природата и като такъв съществува във форма, която не се среща в природата.

Съединения на изобретението

Изобретението включва кДНК, кодираща RetL, каквато е нуклеотидната последователност на кДНК за плъши RetL1, кДНК за част от човешки RetL1, кДНК за пълноразмерен човешки RetL1, кДНК за човешки RetL2, кДНК за миши RetL3 или кДНК за човешки Ret3. Освен това съединенията на изобретението обхващат последователности, които включват горните последователности или са производни на една от тези последователности. Изобретението включва също така вектори, липозоми и други средства за пренос, които съдържат една от тези последователности или производно на една от тези последователности. Изобретението включва също така белтъци, транскрибирани и транслирани от кДНК за плъши RetL1, от кДНК за част от човешки RetL1, от кДНК за пълноразмерен човешки RetL1, от кДНК за човешки RetL2, от кДНК за миши RetL3 или от кДНК за човешки RetL3, включващи, но не ограничаващи се до плъши RetL1, част от човешки RetL1, пълноразмерен човешки RetL1, човешки RetL2, миши RetL3 или човешки RetL3, както и техни производни и варианти.

Едно приложение на изобретението включва разтворими варианти на RetL. Разтворимите варианти не съдържат поне част от вътремембранната област на нативния RetL. В някои примери разтворимият вариант не съдържа фосфатидилинозитолгликановата връзка на нативния RetL. Разтворимите варианти включват слети белтъци, които обхващат производни на RetL, които не съдържат фосфатидилинозитоловия мотив.

Вариантите могат да се различават от срещания се в природата RetL по аминокиселинна последователност или по начини, които не включват последователността, или и по двата начина. Вариантите по аминокиселинна последователност се получават, когато една или повече от аминокиселините на срещания се в природата RetL се замени с друга природна аминокиселина, с аминокиселинно производно или с ненативна аминокиселина. Особено предпочетените варианти включват природен RetL или биологично активни фрагменти на природния RetL, чиито последователности се различават от последователността див тип по една или повече консервативни аминокиселинни замени, които обикновено имат минимален ефект върху вторичната структура и хидрофобната природа на белтъка или пептида. Вариантите могат също така да имат последователности, които се различават по една или повече неконсервативни аминокиселинни замени, делеции или инсерции, които не засягат биологичната активност на RetL. Консервативните замени обикновено включват замествания на една аминокиселина с друга със сходни характеристики, каквито са замените в следните групи: валин, глицин; глицин, аланин, валин, изолевцин; аспарагинова киселина, глутаминова киселина; аспарагин, глутамин; серин, треонин; лизин, аргинин; и фенилаланин, тирозин. Неполярните (хидрофобни) аминокиселини включат аланин, левцин, изолевцин, валин, пролин, фенилаланин, триптофан и метионин. Полярните аминокиселини включват глицин, серин, треонин, цистеин, тирозин, аспарагин и глутамин. Положително заредените (базични) аминокиселини включват аргинин, лизин и хистидин. Отрицателно заредените (кисели) аминокиселини включват аспарагинова киселина и глутаминова киселина.

Другите консервативни замени могат да се вземат от таблицата по-долу, а други са описани от Dayhoff в Atlas of Protein Sequence and Structure (1988).

ТАБЛИЦА 1: КОНСЕРВАТИВНИ АМИНОКИСЕЛИННИ ЗАМЕНИ

Аминокиселина	Код	Се замества с която и да е от
аланин	A	D-Ala, Gly, beta-Ala, L-Cys, D-Cys
аргинин	R	D-Arg, Lys, homo-Arg, D-homo-Arg, Met, D-Met, Ile, D-Ile, Orn, D-Orn
аспарагин	N	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
аспарагинова киселина	D	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
цистеин	C	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr
глутамин	Q	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
глутаминова киселина	E	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
глицин	G	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, Beta-Ala, Asp
изолевцин	I	D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
левцин	L	D-Leu, Val, D-Val, Met, D-Met
лизин	K	D-Lys, Arg, D-Arg, homo-Arg, D-homo-Arg, Met, D-Met, Ile, D-Ile, Orn, D-Orn

метионин	M	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val, Norleu
фенилаланин	F	D-Phe, Tyr, D-Thr, L-Dopa, His, D-His, Trp, D-Trp, Trans 3,4 или 5-фенилпролин, cis 3,4 или 5-фенилпролин
пролин	P	D-Pro, L-I-тиоазолидин-4-карбоксилова киселина, D-или L-1-оксазолидин-4-карбоксилова киселина
серин	S	D-Ser, Thr, D-Thr, allo-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), Val, D-Val
треонин	T	D-Thr, Ser, D-Ser, allo-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), Val, D-Val
тирозин	Y	D-Tyr, Phe, D-Phe, L-Dopa, His, D-His
валин	V	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met

Други варианти в рамките на изобретението представляват тези с модификации, които повишават пептидната стабилност. Такива варианти могат да съдържат, например, една или повече непептидни връзки (които заместват пептидните връзки) в пептидната последователност. Включени са също така: варианти, които включват остатъци, различни от природните L-аминокиселини, каквито са D-аминокиселините или неприродните синтетични аминокиселини, такива като бета или гама аминокиселините и цикличните варианти. Включването на D- на мястото на L-аминокиселините в полипептида може да повиши неговата устойчивост към протеази. Виж, напр., US 5 219 990.

Пептидите на това изобретение могат съ-

що така да бъдат модифицирани чрез различни изменения, каквито са инсерциите, делециите и заместванията, било то консервативни или неконсервативни, когато такива изменения биха допринесли за определени предимства при използването им. В изобретението определено са включени и сплайснгови варианти.

В допълнение към пълноразмерните на практика полипептиди настоящото изобретение предоставя биологично активни фрагменти на полипептидите. Един полипептид RetL или фрагмент е биологично активен, ако той проявява биологична активност на природно срещания RetL. Такива биологични активности включват способността за специфично свързване на извънклетъчния участък на Ret с афи-

нитет, който е най-малко 50% от, а за предпочитане поне равен на, афинитета на природния RetL към извънклетъчния участък на Ret. Друга биологична активност представлява способността за свързване с антияло, което е насочено срещу епитоп, който присъства в природния RetL.

В други приложения желаните производни могат да бъдат резултат от варианти с аминокиселинни замени, които са по-малко консервативни, напр., чрез причиняване на промяна в заряда, конформацията и други биологични свойства. Такива замени биха включвали например, заместване на хидрофилен остатък с хидрофобен, заместване на цистеин или пролин с друг остатък, заместване на остатък с малка странична верига с остатък с масивна странична верига или заместване на остатък със сумарен положителен заряд с остатък със сумарен отрицателен заряд. Когато резултатът от дадено заместване не може да бъде точно предсказан, производните лесно могат да се тестват съгласно методите, представени тук, за да се установи наличието или отсъствието на желаните характеристики.

Най-общо, заместванията, за които може да се очаква, че ще предизвикат изменения във функционалните свойства на полипептидите Ret, са тези, в които: (i) хидрофилен остатък, напр., серин или треонин, се замества с хидрофобен остатък, напр., левцин, изолевцин, фенилаланин или аланин; (ii) цистеинов остатък се замества с (или чрез) който и да е друг остатък; (iii) остатък с електроположителна странична верига, напр., лизин, аргинин или хистидин се замества с (или чрез) остатък с електроотрицателен заряд, напр., глутаминова киселина или аспарагинова киселина; или (iv) остатък с масивна странична верига, напр., фенилаланин се замества с (или чрез) такъв, който няма такава странична верига, напр. глицин.

Вариантите от обхвата на изобретението включват белтъци и пептиди с аминокиселинни последователности, които са най-малко шестдесет процента хомоложни на плъши RetL1 (SEQ ID NO: 2), на част от човешки RetL1 (SEQ ID NO: 9), на пълноразмерен човешки RetL1 (SEQ ID NO: 11), на човешки RetL2 (SEQ ID NO: 13), на миши RetL3 (SEQ ID NO: 16), на част от човешки RetL3 (SEQ ID NO: 19) или на човешки RetL3 (SEQ ID

NO: 21). За по-голямо предпочитане е хомологията между последователностите да бъде най-малко осемдесет, най-малко деветдесет или най-малко деветдесет и пет процента. За целите на определяне на хомологията дължината на сравняваните последователности трябва да бъде по правило най-малко 8 аминокиселинни остатъка, обикновено поне 20 аминокиселинни остатъка. Вариантите на съединенията на изобретението включват също така всеки белтък, който 1) има аминокиселинка последователност, която е най-малко четиредесет процента хомоложна на белтъка RetL на изобретението и още, който 2) след наслагване по оптимален начин спрямо последователността на RetL (както е отбелязано за RetL1 и RetL2 на фигура 8) неговите цистеинови остатъци съвпадат с най-малко 80% от цистеините в белтъка RetL на изобретението.

Точно така, както е възможно да се заместят елементи на скелета, е възможно да се заместят и функционални групи, които са свързани със скелета, с групи, характеризирани се със сходни свойства. Такива модификации не променят първичната структура. Първоначално те ще са консервативни, т. е. заместващата група ще има приблизително същата големина, форма, хидрофобност и заряд, както оригиналната група. Модификациите, незасягащи последователността, могат да включват, например, химична дериватизация *in vivo* или *in vitro* на участъци от природния RetL, както и изменения в ацетилирането, метилирането, фосфорилирането, карбоксилирането или гликозилирането.

В изобретението са включени също така вещества, които се свързват специфично с белтък на изобретението или фрагмент на такъв белтък. Тези вещества включват белтъци слети с имуноглобулин (Ig) и антитела (в това число едноверижни, двойноверижни, Fab-фрагменти и др., било то хуманизирани, приматизирани или химерни). Допълнителни описания на тези категории вещества има в PCT 1995/016709, която е цитирана за справка.

Примери за изпълнение на изобретението

Преглед на стратегията

Общата стратегия, използвана за клониране на RetL1 е показана на Фигури 4А и 4В. Нашата стратегия се основава на предпоставката, че поне RetL се експресира върху мета-

нефритния мезенхим на развиващия се бъбрек като мембранен белтък (макар че е възможно лигандът да се експресира също и в разтворима форма; фигура 4А). RetL взаимодейства с рецептора Ret върху клетката на уретерния зачатък като активира неговия тирозинкиназен цитоплазмен домен и предава сигнал към ядрото, който на свой ред активира гени, участващи в растежа и разклоняването на уретерния зачатък. Ето защо като част от стратегията за клониране на RetL, както е показано на фигура 4В, могат да се използват белтъци, съдържащи извънклетъчния домен на Ret, слят или с Fc-участъка на човешки имуноглобулин G1 (IgG1) или с алкална фосфатаза (AP). Слетите белтъци, експресионните библиотеки и други реактиви, използвани за клониране на RetL1, са описани по-долу.

Най-напред се изолира кДНК за плъши RetL1 и след това се използва като проба за изолиране на кДНК за човешки RetL1. Впоследствие се изолират кДНКи за RetL2 и RetL3.

Получаване на необходимите реактиви за клониране и непосредствена експресия на лигандите Ret

1. Изолиране на кДНК, кодираща извънклетъчния домен на плъши Ret

За идентифицирането на RetL1 се получават слети белтъци, състоящи се от извънклетъчните домени на плъши или човешки Ret, слети с белтък, в един пример с Fc-участъка на човешки IgG1, а в друг случай с алкална фосфатаза. Двата слети белтъка могат лесно да се тестват, за да се детектират клетки, които експресират лиганда, както е илюстрирано на фигура 4В.

Тъй като никога не е била публикувана кДНК, кодираща плъши Ret, ние изолираме кДНК, кодираща извънклетъчния домен на плъшия рецептор Ret като използваме метода Обратна Транскриптаза - Полимеразна Верижна Реакция (RT-PCR), сравняват се двете нуклеотидни последователности за човешки (под кодови номера в генната банка M57464 и X15262) и миши (под кодов номер в генната банка X6812) Ret и се проектират олигонуклеотидни праймери от области в двете последователности, които са до голяма степен идентични. Олигомер от сенс верига, наречен kid-013 (SEQ ID NO: 3; съдържа нуклеотиди 150-169 от последователността X15262 в генната банка) се избира откъм 5'-края на кДНК

за човешки Ret и припокрива инициращия кодон ATG. В своя 5'-край за целта на клонирането той включва нуклеотиди, кодиращи рестриктазно място за Not I. Два олигомера от антисенс верига, наречени kid-014 (SEQ ID NO: 4; комплементарен на нуклеотиди 1819-1839 от последователността M57464 в генната банка) и kid-015 (SEQ ID NO: 5, комплементарен на нуклеотиди 1894-1914 от последователността X67812 в генната банка) се избират, съответно от човешката и миша последователности кДНК, непосредствено 5' спрямо последователностите, които кодират трансмембранните домени. Олигомерите kid-014 и kid-015 съдържат допълнителни нуклеотиди в своите 5'-краища, които за целта на клонирането кодират рестриктазно място за SalI.

Тотална РНК се изолира от 14-дневен ембрионален плъши бъбрек и иРНК се пречиства като се използва хроматография върху олиго-dT. иРНК се превръща в кДНК чрез използването на обратна транскриптаза AMV (от птичи миемоген вирус) и кДНК се превръща в двойноверижна кДНК и се амплифицира чрез използването на Taq-полимераза в стандартна полимеразна верижна реакция с олигомери kid-013 и kid-015. Синтезата на PCR-фрагмент от 1942 бд се потвърждава чрез нанасяне на аликуота от PCR-реакцията върху 1% агарозен гел. Остатъкът от PCR-фрагмента се смила с NotI и Sal I и се клонира в pSAB132, предварително хидролизиран с Not I и Sal I. Полученият плазмид се нарича pJC011. Целият инсерт в плазмид pJC011, който се съдържа между сайтовете Not I и Sal I, се секвенира и е показан като кДНК за извънклетъчен плъши RetL1, SEQ ID NO: 6. Транслацията на тази последователност дава пептидната последователност (SEQ IS NO: 7) на извънклетъчния плъши RetL1. Тъй като олигомерите за PCR са избрани от последователности на човешки и миши Ret, възможно е нуклеотидните последователности, показани като кДНК за извънклетъчен плъши Ret, както и пептидните последователности, показани като извънклетъчен плъши Ret, да се различават от природната нуклеотидна последователност за плъши Ret и от природната пептидна последователност за плъши Ret в областите на последователностите kid-013 и

kid-015. Впоследствие се изолират клонове кДНК за Ret от библиотека кДНК на 18-дневен пълши ембрионален бъбрек като в областта на праймеите се наблюдават няколко нуклеотидни промени, водещи до две аминокиселинни промени. Едно от измененията е в сигналната последователност (аргинин на 5-то място в треонин) и едно изменение е близо до края на извънклетъчния домен (глутаминова киселина в позиция 633 в аланин). И двете изменения не биха засегнали свързването на лигандите.

2. Слети белтъци Ret/IgG

Получават се слети белтъци, състоящи се от извънклетъчните домени на пълши (ак остатъци #1-637) и човешки (ак остатъци #1-636) рецептори Ret, присъединени към Fc-участъка от човешки IgG1.

Конструирването на плазмидите, използвани за експресия на слетия белтък пълши Ret/IgG е показано схематично във фигура 5. За конструирване на ген, кодиращ слетия белтък пълши Ret/IgG се смилат pJC011 (описан по-горе), съдържащ извънклетъчния домен на пълшия Ret, със Sal I и се лигира към Sal I-фрагмента от 700 бд на плазмид 2-4, за да се получи плазмид pJC012. Този Sal I-фрагмент съдържа част от Fc-домена на човешки IgG1, първоначално получен от плазмид pSAB144. Плазмидът 2-4 е получен по-рано чрез лигиране на три фрагмента: NotI-Sall-фрагмент, получен чрез PCR, съдържащ извънклетъчния домен на заешкия рецептор TGF-бета тип II; Sall-NotI-фрагмент от 693 бд от pSAB144, съдържащ част от Fc-домена на човешки IgG1; и pSAB132, смлян с NotI. Както се вижда на фигура 5, от плазмид 2-4 фрагментът, съдържащ Fc-домена, може да се отдели като Sall-фрагмент от 700 бд. pJC012 се трансфектира в COS-клетки и слетия белтък пълши Ret/IgG се пречиства от средата 48 h по-късно чрез използването на хроматография върху сефароза Protein-A. За да се направи стабилна клетъчна линия, произвеждаща слетия белтък пълши Ret/IgG, от pJC012 се изолира NotI-фрагмента от 2612 бд, съдържащ целия слят белтък пълши Ret/IgG и се клонира в мястото за NotI на експресионния вектор pMDR901. Полученият плазмид се нарича pJC022. Плазмидът pJC022 се трансфектира в CHO-клетки, за да се получат стабилни клетъчни линии. Най-високо продуктивната клетъчна линия се адаптира към (растеж в)

суспензия. Типичните добиви на пълши Ret/IgG от CHO-линията са 75 mg/L.

Конструирването на плазмидите, използвани за експресия на слетия белтък човешки Ret/IgG е показано схематично на фигура 6. За да се конструира ген, кодиращ слетия белтък човешки Ret/IgG, се получава плазмид, съдържащ кДНК, кодираща човешкия рецептор Ret от Dr. M. Takahashi (Department of Pathology, Nagoya University, School of Medicine, Nagoya, Japan). От този плазмид се получава PCR-фрагмент чрез използване на олигомерите kid-013 и kid-014. Фрагментът от PCR се обработва с Кленов фрагмент, следван от смилане с NotI, за да се получи леплив NotI-край и един тъп край. Този фрагмент се клонира във вектора pGEM11zf(+), смлян предварително с EcoRI, обработен с Кленов фрагмент и смлян с NotI, за да се получи леплив NotI-край и един тъп край. Полученият плазмид се нарича pJC013. От pJC013 се изолира фрагментът NotI-Sall от 1916 бд след пълно смилане с NotI и частично смилане със Sall и се лигира към фрагмента Sall-NotI от 693 бд на pSAB144, съдържащ част от Fc-домена на човешки IgG1, а експресионният вектор pSAB132 се разгражда с NotI. Полученият плазмид се нарича pJC015. Инсертът в плазмид 2-4 се секвенира и се установява, че той съдържа единична нуклеотидна разлика, която променя една аминокиселина в извънклетъчния домен на човешкия Ret (последователност M57464 от генната банка има С в позиция 812, докато pJC013 има Т на съответната позиция; това води до промяна на аминокиселината от аланин на валин в позиция 294 на последователността за човешкия белтък Ret). Този нуклеотид се коригира обратно в остатък С, характерен за последователността M57464 от генната банка, чрез сайт-специфична мутагенеза на плазмид pJC013, получавайки плазмид pJC023. От pJC023 се изолира фрагментът BstE2 от 585 бд, съдържащ репарирания нуклеотидна последователност и се клонира в плазмид 2-4 pJC023, от който е отстранен фрагментът BstE2 до 585 бд, съдържащ променения нуклеотид. Новият плазмид се нарича pJC024. От pJC024 се изолира NotI-фрагментът от 2609 бд, съдържащ целия слят белтък човешки Ret/IgG и се клонира в мястото на NotI на експресионния вектор pMDR901. Полученият

плазмид се нарича pJC025. Плазмидът pJC025 се трансфектира в СНО-клетки за получаването на стабилни клетъчни линии. Най-високо продуктивната клетъчна линия се адаптира към (растеж в) суспензия. Типичните добиви за човешкия Ret/IgG от СНО-линията са 6 mg/l.

Допълнителни подробности за получаването на векторите, използвани в методите на изобретението, са дадени в PCT 1994/001456 и PCT 1992/002050, които се цитират за справка.

3. Биологична активност на слетите белтъци Ret/IgG

За да се определи дали слетите белтъци Ret/IgG, които се получават, са биологично активни и по тази причина биха били добри скриниращи реактиви за клонирането на RetL, се провеждат няколко теста за биологична активност в органни култури. Тестът в органна култура се състои от култивиране на 13-14-дневни ембрионални плъши бъбреци в органна култура за 3-5 дни в присъствието на слетия белтък Ret/IgG в концентрация 50 mg/ml. Бъбреците се култивират също така в присъствието на LFA-3TIP/IgG или в буферния разтвор. След периода на култивиране някои от бъбреците се оцветяват с флуоресцентен лектин *Dolichos Biflorus Agglutinin* (DB-лектин), който оцветява тъканите на отточните каналчета, представляващи епителни клетки, произлизащи от уретерния зачатък. Тези положителни за "DB" клетки маркират положителните за Ret клетки, тъй като Ret се експресира в уретерния зачатък и неговите епителни производни. Това дава най-обща оценка за ефекта на Ret/IgG върху растежа и развитието на ембрионалния бъбрек. Съществува ясна разлика в морфологията на отточния канал и растежа между бъбреци, които са били култивирани с LFA-3TIP и тези култури със слетия белтък плъши Ret/IgG. Бъбреците, обработени с Ret/IgG имат отточни каналчета, които показват значително по-слабо разклоняване и като цяло са типично по-малки.

За хистохимично изследване се приготвят парафинови срезове от други бъбреци. Ембрионалните бъбреци се обработват с контролен буфер или с Ret/IgG, след това се оцветяват с хематоксилин и еузин. Ембрионалният бъбрек, обработен с Ret/Ig, показва по-слабо разклоняване на отточните каналчета, отколкото ембрионалните бъбреци, обработени

с контролния буфер. Освен това обработените с Ret/IgG бъбреци имат по-малко тубули. Този ефект се наблюдава и със слетия белтък човешки Ret/IgG. Тези наблюдения съответстват на това, че слетите белтъци блокират индуктивния сигнал между мезенхима и уретерния зачатък. Поради това ние заключаваме, че слетият белтък е добър реактив за клониране на RetL.

4. Слят белтък Ret/алкална фосфатаза

Слети белтъци рецептор/алкална фосфатаза (AP) са били използвани успешно за идентифициране и клониране на лиганди за c-kit (Cell 63: 185, 1990), на лиганди за членове на фамилията орфанови рецептори eph (Cell 79:157, 1994) и наскоро за клониране на рецептор за лептин, продукт на гена ob (Cell 83:1263, 1995). Конструират се плаزمиди, кодиращи слетия белтък плъши Ret/AP и белтъкът плъши Ret/AP се произвежда в клетки COS7 в клетъчни биореактори. Впоследствие се получава стабилна клетъчна линия NIH3T3, експресираща средно 10 mg/l слят белтък. Анализ чрез SDS-PAGE (електрофореза в полиакриламиден гел в присъствието на натриев додецилсулфат) на белтъка плъши Ret/AP показва, че неговата големина съответства на предсказаното молекулно тегло, а анализ чрез гел-филтрация показва, че той се образува като димер. Постига се частично пречистване чрез афинитетна хроматография върху анти-AP колона.

5. Анти-Ret антитела

Получава се заешко поликлонално антияло срещу плъши Ret/IgG. Антиятло работи в методите на белтъчен пренос (Western blots), анализ чрез FACS (флуоресцентно активирано клетъчно сортиране) на положителни за Ret клетъчни линии и в имунохистохимията на срези от ембрионални бъбреци.

Получава се серия моноклонални антитела срещу плъши Ret в хамстер. За имунизацията на арменски хамстери се използва слят белтък плъши Ret/IgG, свързан със сефароза Protein-A. Получават се 316 клона и след фузията се скринират за тяхната способност да се свързват със слети белтъци на плъши Ret и/или с човешки IgG в тест ELISA (ензимно-свързан имуносорбентен анализ). 11 клона произвеждат антитела, които

се свързват само с плъши Ret/IgG (и плъши Ret/AP), но не и с човешки IgG. Кръстосаната реакция с човешки Ret се тества чрез FACS; четири клона произвеждат антитела, които могат да се свързват с положителната за Ret 5

човешка клетъчна линия THP-1. Следната таблица обобщава свързващите свойства по отношение на Ret на дванадесет моноклонални антитела.

Клон	ELISA	FACS
	плъши Ret/Ig	човешки THP-1
AA.FF9.5	+	-
AA.HE3.7	+	+
AF.E9.5	+	-
BA.B1.16	+	-
BB.B6	+	-
AA.GE7.3	+	-
CD.F11.2	+	-
AH.E3.11	+	+
CD.G4.2	+	+
AG.E7.9	+	+
BD.G6	+	+
BH.G8	-	-

6. Експресионни библиотеки от кДНК

Приготвят библиотеки кДНК от плъши ембрионален бъбрек, една във вектора CDM8, който използва началото за амплификация на SV40 и една в модифицирания вектор на In Vitrogen, pCER4, който използва началото на репликация на EBV. От този модифициран вектор, CH269, е отстранена последователността EBNA-1. Белтъкът EBNA-1 взаимодейства в началото на EBV, но генът не е необходим във вектора, когато се използват клетки, които стабилно експресират белтъка EBNA. Библиотеката във вектора CDM8 съдържа $1,5 \times 10^6$ клона със средна големина на инсертите от 1,18 кб, докато библиотеката във вектора CH269 съдържа приблизително 1×10^6 клона със средна големина на инсертите от 1,5 кб.

Едновременно клониране и експресия на

35 Ret-лиганда RetL1

А. Клониране на плъши Ret-лиганд RetL1

1. Първоначални опити за едновременно клониране и експресия на Ret-лиганда RetL1

40 За клонирането на RetL1 бяха описани редица методи за директна експресия. Всички тези методи се основават на концепцията, илюстрирана на фигура 4В. кДНКи от библиотеки на кДНК се въвеждат в клетки на бозайници; клетките, приели RetL1, могат да се идентифицират, като се използват слетите белтъци на Ret. Макар че трите подхода, описани по-долу бяха неуспешни, бяха придобити важни знания и опит, използвани в следващ подход, осъществен с вируси.

50 а. Метод за скрининг с Ret/IgG - В опита за изолиране на RetL1 чрез клониране и непосредствена експресия посредством раз-

тилация (panning) метод (Aruffo and Seed, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84:8753-8757 (1987)) метод се използва плъши слят белтък Ret/IgG. За тези усилия се използва кДНК от 18-дневен ембрионален плъши бъбрек в CDM8. Обединени проби кДНК от тази библиотека (5000 - 10 000 кДНК на проба) се въвеждат в клетки COS чрез използване на DEAE-декстрановия метод. След 48 h клетките се отстраняват от плаките с EDTA, инкубират се със слетия белтък и след това се разстилат върху плаки, покрити с анти-човешко IgG1 анти тяло. Изолира се ДНК от клетките, които полепват, трансформира се обратно в *E. coli* и след това се използва за втори цикъл на скрининг. След третия цикъл на скрининг не може да се открият никакви свързани клетки, а след обратната трансформация на Hirt ДНК в *E. coli* се получават много малко клонове. Използваната като положителна контрола библиотека от VCAM кДНК във връзка с анти-VCAM моноклонално анти тяло може да се разрези само до отношение 1:100, така че все още да се детектира, което показва, че обединените проби са вероятно прекалено големи. Анализът на някои от клоновете, получени след втория цикъл на скрининг, посочва че клоновете претърпяват преустройства и делеции.

b. Препаративен FACS-метод с Ret/IgG - 80 000 клоната кДНК от библиотеката от 18-дневен ембрионален плъши бъбрек (вектор CDM8) се въвеждат в клетки COS7 и се подлагат на препаративен FACS чрез използването на белтъка плъши Ret/IgG, следван от второ анти тяло с флуоресцираща опашка. Върховете на пиковите от 0,5% и 0,9% флуоресциращи клетки се събират и плазмидната ДНК се изолира чрез Hirt-лизис. ДНК се въвежда чрез електропорация обратно в *E. coli* за обединената проба от 0,5% се получават 228 клоната и 752 клоната за обединената проба от 0,9%. От бактериалните клонове се изолира ДНК и се провежда втори цикъл на препаративен FACS. Плазмидите, изолирани от бактериалните клонове в края на втория цикъл се анализират и се установява, че те съдържат големи делеции и преустройства.

c. Метод за колориметрична детекция с Ret/AP - клетки COS се трансфектират с 400 обединени проби от клонове кДНК (1000 клоната обединена проба) от библиотеката кДНК от

18-дневен плъши ембрионален бъбрек (вектор CDM8) и се оцветяват с белтъка Ret/AP и колориметричен субстрат за алкалната фосфатаза. Трансфектираните клетки се изследват под микроскоп за положителни сигнали. В един от експериментите се анализират повторно пет потенциално положителни сигнала, но всички се оказват отрицателни.

Като контрола за белтъка Ret/AP се получава белтък VCAM/AP чрез сливане на първите два домена на човешки VCAM с N-края на AP от плацента. (VCAM се свързва с интегрин VLA-4, който се състои от две вериги, алфа-4 и бета-1). Преходни трансфекции на клетките COS произвеждат достатъчно белтък VCAM/AP за контролните експерименти. Белтъкът VCAM/AP се сравнява с VCAM/IgG, директно свързан с AP, както и с VCAM/IgG плюс свързано с AP второ анти тяло, за да се тества тяхната способност да детектират VLA-4 върху клетки COS, трансфектирани с кДНК за веригата алфа-4 (клетките COS вече експресират веригата бета-1). Резултатите показват, че макар белтъкът VCAM/AP да би могъл да детектира VLA4 върху трансфектирани клетки, най-добрата детекция се постига с белтъка VCAM/IgG в комбинация с второ анти тяло, конюгирано с AP.

d. Методологични заключения:

От тези първоначални усилия за клониране изкрystalлизират три главни заключения:

1) Методите, които изискват получаването на плазмидна ДНК за следващи цикли (т. е. разстилане и препаративен FACS) не са подходящи, когато прицелната кДНК е слабо представена, поради преустройства и делеции, които настъпват по време на тези последователни цикли. На основата на слабата експресия на Ret е налице основателна причина да се подозира, че RetL1 също се експресира слабо. Предпочитан е подходът, при който се трансфектира с обединени проби и се използва метод за детекция, позволяващ идентифицирането на положителната обединена проба. След това оригиналната обединена проба се разделя на по-малки проби, без да е необходимо да се изолира преходно експресиращата се ДНК от трансфектираните клетки.

2) Когато белтъкът Ret/IgG се свърже с второ вещество, той придобива по-добра

детектираща способност, отколкото белтъка Ret/AP.

3) Контролни експерименти с контролния белтък VCAM/IgG (и конюгирано с AP второ анти тяло) и с кДНК за алфа-4 на интегрин (разредена с вектора CDM8 и трансфектирана в клетките COS) посочват, че нашата детектираща способност е само около едно на хиляда (т. е. големината на обединената проба не може да надвиши 1000 клона). За да постигнем една по-добра граница на чувствителност, се преминава от вектор на основата на SV40 (експресиращ се в клетки COS) към вектор на основата на EBV (експресиращ се в положителни за EBNA клетъчни линии). Векторите на основата на началото (за репликация) на EBV се запазват като епизоми и не са така токсични за клетката след амплификация, както векторите на основата на началото (за репликация) на SV40. Съществува значително свидетелство за това, че гените в тези вектори могат да се експресират до повисоки равнища и че кДНК може допълнително да се разрежи (т. е. до 1 на 80 000) и все още да се детектира.

2. Скрининг на обединени проби от библиотеката кДНК на основата на началото на EBV

Скринират се обединени проби от клонове на библиотеката кДНК от 18-дневен ембрионален плъши бъбрек (вектор CH269 с началото на EBV) със слетия белтък плъши Ret/IgG. В един от експериментите се получават 256 обединени проби, всяка съдържаща 5000 клона. Накратко, аликувата от библиотеката кДНК се титрува, посяват се 5000 клетки (256 пъти) и се оставят да растат през нощта. Колониите се изстъргват в среда: част от културата се използва за получаване глицеринова култура от обединената проба (съхранявана на -70) и част се използва за получаването на плазмид. ДНКи от 256-те обединени проби се трансфектират поотделно в клетки 293/EBNA (8×10^5 върху 60-милиметрови плаки) чрез използване на метода за липофекция. След 48 h клетките се промиват два пъти с буфер HBNA (0,5 mg/ml BSA; 0,1% NaN_3 , 20 mM HEPES (pH 7,0)) и се инкубират с 20 mg/ml плъши Ret/IgG в буфериран с Трис физиологичен разтвор плюс 1 mM MgCl_2 и CaCl_2 за 60-90 min на стайна температура. След тази инкубация клетките се промиват четири пъти с буфер

HBNA и след това се фиксират с 60% ацетон/3% формалдехид/20 mM HEPES (pH 7,0) за 30 s. След три промивки с буфер HBS (150 mM NaCl, 20 mM HEPES (pH 7,0)) клетките се инкубират с второ анти тяло, конюгирано с AP (козе анти-човешко IgG Fc-гама-специфичен F(ab')_2 (Jackson Immuno Research Laboratories; каталожен # 109-056-098; разреждане 1:5000 в буфериран с Трис физиологичен разтвор плюс 1 mM MgCl_2 и CaCl_2) 60 min на стайна температура. След това клетките се промиват два пъти с буфер HBS и два пъти със субстратен буфер за AP (100 mM Трис-HCl (pH 9,5), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , съдържащ 2X Pierce Immuno Pure[®] фосфатазен супресор (каталожен # 35002). Последната промивка се извършва 15 min. След това в субстратния буфер за AP, съдържащ инхибитора на AP на Pierce, се прибавят субстратите на AP NBT (0,33 mg/ml) и BCIP (0,17 mg/ml) и се инкубират с клетките за 5-20 min. Плаките след това се промиват два пъти с вода. След това плаките се наблюдават под микроскоп за наличието на пурпурно оцветени клетки.

От анализа на 256-те обединени проби при първичния скрининг се идентифицират 17 положителни проби. ДНК от всяка положителна проба се трансфектира отново в клетките 293/EBNA и горната процедура се повтаря заедно с някои допълнителни контролни експерименти, за да се потвърди, че наблюдаваното оцветяване е специфично за Ret/IgG. Само 10 от 17-те положителни обединени проби показват оцветяване със слетия белтък Ret/IgG и не се оцветяват с друг слят белтък на IgG.

3. Разделяне на обединена проба #230 на по-малки проби

Като пример, една от по-горе описаните положителни обединени проби, означена #230, се разделя на по-малки субпроби, за да се идентифицира кДНК в обединената проба, която кодира свързването със слетия белтък Ret/IgG. От глицериновата култура на обединена проба #230 се посяват 600 клетки и се култивират през нощта. Колониите върху тези плаки се изстъргват в среда: една десета от културата се използва за получаване на глицеринова култура, а останалата част се използва за приготвянето на ДНК. Десетте субпроби от 600 клона се означават 230-1A до 230-5A и 2303-1B до 230-5B. ДНК от тези субпроби се трансфектира в клетките 293/

EBNA и описаната по-горе процедура за оцветяване със слетия белтък Ret/IgG се повтаря. Една от субпробите #130-5A се оцветява положително с белтъка Ret/IgG.

Проба #230-5A по-нататък се раздробява, за да се идентифицира кДНК в тази субпроба, която кодира свързването със слетия белтък Ret/IgG. Клетки от глицириновата култура на проба 230-5A се посяват и се култивират през нощта. Колониите се посяват в ямките на седем 96-ямкови биоблокове (Bioblocks^R) и се култивират през нощта. От всеки 96-ямков биоблок се правят 4 проби от 20 клона и 1 проба от 16 клона. Така от седемте биоблока се получават 35 проби, означени 230-5A-71 до 230-5A-105. От всяка от тези проби се изолират ДНКи и се трансфектират в клетките 293/EBNA, като повторно се тестват със слетия белтък Ret/IgG, както е описано по-горе. Проба #230-5A-86 е положителна.

Проба #230-5A-86 се раздробява чрез възвръщане към биоблока и идентифициране на 20-те клона, които бяха смесени заедно за получаването на тази проба. От двадесетте клона се прави ДНК и се трансфектира поотделно в клетките 293/EBNA и отново се тества с Ret/IgG, както е описано по-горе. Установява се, че проба #230-5A-86-17 е положителна.

4. Характеристика на клон #230-5A-86-17

Клон #230-5A-86-17 (наречен клон RetL-17 или клон 17 и депозиран като ATCC 98047) се анализира допълнително чрез секвениране на ДНК. Цялата нуклеотидна последователност на инсерта в този клон е SEQ ID NO: 1 (кДНК плъши RetL1), а част от нуклеотидната последователност е показана на фигура 1. В рамките на тази нуклеотидна последователност се открива отворена рамка за четене, кодираща белтък от 468 аминокиселини (плъши RetL1). Прогнозираният белтък има сигнална последователност с предсказано скъсване след аминокиселина 24 (Von Heijne et al., Nucl. Acid Res. 14:14683)). Хидрофобният С-край посочва, че белтъкът може да се свърже с клетката чрез фосфатидилинозитолгликанова връзка. Налице са три предполагаеми места за N-свързано гликозилиране. Тези свойства съвпадат с очакваните за лиганд на Ret.

Може да се експресират разтворими форми на плъшия белтък RetL1 чрез скъсяване на гена преди хидрофобния С-край. Например,

това би могло да се направи чрез скъсяване след лизин 435 (плъши RetL1). Скъсяването в upstream на тази последователност също би довело до експресия на разтворима форма на плъшия белтък RetL1. Разтворимият плъши белтък RetL1 може да се експресира самостоятелно или като част от сливане с човешки имуноглобулин, с хистидиново удължение или с малък епитоп, който се rozpoзнава от антитяло.

В. Клониране на човешки Ret-лиганд RetL1

кДНК библиотека от човешки ембрионален бъбрек във вектора gt10 се закупува от Clontech (каталожен #HL5004A). Върху 10 плаки NuncTM от изходната фагова суспензия се посяват един милион единици, формиращи фагови петна (plaque forming units). Върху филтри на Schleicher and Schuell OptitranTM се прави реплика на фаговите петна.

Проба се приготвя чрез смилане на плазмида плъши RetL1 с рестриктазния ензим PvuII, следвано от изолиране от агарозен гел на фрагмента от 1,34 кб, който отговаря на nt 242-1582 от нуклеотидната последователност на плъшия RetL (кДНК за плъши RetL1). Пробата от кодиращата област се бележи с ³²P чрез случайно инициране (random priming) (Feinberg and Vogelstein, Anal. Biochem. 137:266-267, 1984). Филтрите се хибридизират една нощ в 300 ml буфер FSB за скриниране на (фаговите) петна (50 mM Трис, pH 7,5; 1 M NaCl; 0,1% натриев пирофосфат; 0,2% PVP (поливинилпиролидон) и 0,2% фикол), съдържащ 10% декстрансулфат, 100 µg/ml tPHK и 6,7 X 10⁷ CPM от плъщата сонда, на 55°C. Те се промиват два пъти с буфера за скрининг на петната и два пъти с 2XSSC/1% SDS на 55°C и се експонират върху филм на -70°C с усилващ екран.

От плаките с образците в SM (100 mM NaCl, 10 mM SO₄, 50 mM Трис pH 7,5) се прехвърлят фаговите реплики, съответстващите на положителните сигнали. 24 от тези положителни проби се пречистват от единични (фагови) петна. Минипрепаративно количество ламбда ДНК от пречистените кандидат-фагови петна се смилва с NotI, провежда се електрофореза в 1% агарозен гел и се прави пренос (Southern blott). Пренесената върху филтри ДНК се хибридизира със сондата от кодиращата област на плъши RetL1. Клон

HRL20 има най-дългия инсерт (4,4 кб), който хибридизира интензивно с плъщата проба. Последователността ДНК (кДНК за част от човешки RetL1; SEQ ID NO: 8; фигура 2A) и изведената от нея пептидна последователност (частичен човешки RetL1; SEQ ID NO: 9; Фигура 2A) се получават от този клон, което потвърждава, че тя е хомолог на човешката. Този клон кодира по-голямата част от кодиращата област, включително и 3'-края на кодиращата област.

За получаване на 5'-края на човешката кДНК от Clontech (каталожен #7423-1) се закупува комплектът кДНК от човешки фетален бъбрек Marathon-Ready™. Синтезират се антисенс олигонуклеотидите Kid-155, съответстващи на нуклеотидите, комплементарни на 62-81 от SEQ ID NO: 8 (кДНК за част от човешки RetL1) и Kid-154, съответстващи на нуклеотидите, комплементарни на 17-43 от SEQ ID NO: 8 (кДНК за част от човешки RetL1). Провежда се PCR като се използва наборът реактиви за PCR на кДНК Advantage™ (Clontech, каталожен #8417-1) в комбинация с реактивите за кДНК Marathon™ и олигонуклеотидите Kid-155 или Kid-154. Първата реакция PCR се залага, както следва: 35,5 µl H₂O; 5 µl 10Xklen Taq буфер; 1,0 µl смес от 10 mM dNTP; 1,0 µl 50X Advantage™ KlenTaq-полимеразна смес. Тези реактиви се обединяват и смесват. След това се прибавят 5,0 µl кДНК от фетален бъбрек Marathon-Ready™; 1,0 µl 10 µM праймер AP1 и 1,5 µl 6,4 µM Kid-155 (краен обем = 50 µl). PCR се провежда в апарат за PCR 480 на Perkin-Elmer Cetus при следните условия на циклите: 1 цикъл от 94°C за 1 min; 30 цикъла от 94°C за 30 s, 55°C за 30 s, 68°C за 4 min. Провежда се PCR с вътрешни за новосинтезираната матрица праймери (nested PCR), като се използва продуктът от първата PCR-реакция. Най-напред 5 µl от продукта на PCR #1 се разреждат 50 пъти с TE (краен обем 250 µl). PCR-реакцията с вътрешните праймери съдържа 35,5 µl H₂O; 5 µl 10XKlen Taq буфер; 1,0 µl смес от dNTP; 1,0 µl 50X Advantage™ KlenTaq-полимеразна смес. Тези реактиви се смесват, както по-горе. След това се прибавят 5,0 µl от разрежения PCR-продукт #1; 1,0 µl 10 µM праймер AR2 и 1,5 µl 6,9 M Kid-154. Условията на циклите са същите, както по-горе. Полученият продукт от приблизително 700 бд се пречиства от 1% агарозен гел, топящ

се при ниска температура, и се екстрахира с фенол. Пречистената ДНК се клонира в мястото за EcoRI на pZerOTM (Invitrogen, каталожен #K2510-01). Информация за последователността се получава от множество клонове, в това число от клоновете, наречени HRL7G6 и HRL7G8.

Установява се, че последователността, получена от клон HRL7G8, се припокрива с последователност на клон HRL20 (кДНК за част от човешки RetL1) и се използва за получаване на пълноразмерната последователност на човешкия RetL1 (кДНК за пълноразмерен човешки RetL1), показана също на фигура 2B. Нуклеотидната последователност, получена от клон HRL7G8, представлява нуклеотиди 1 до 502 от пълноразмерната кДНК за човешки RetL1; нуклеотидната последователност от клон HRL20 представлява нуклеотиди 460-1682 от кДНК за пълноразмерен човешки RetL1. Последователността от клон HRL7G8 се потвърждава чрез секвениране на друг клон кДНК (GJ102), изолиран от библиотеката кДНК от човешки ембрионален бъбрек в ламбда gt10, описана по-горе, чрез използване на сонда, получена от клон HRL7G6. Нуклеотидите от 118 до 1497 обхващат отворената белтъчна рамка за четене на кДНК за пълноразмерен човешки RetL1.

Пълната нуклеотидна последователност за човешки RetL1 е показана на фигура 2B. Както показва анализът BESTFIT, представен на фигура 3A, кДНК за човешкия RetL1 е 88,2% идентична с кДНК за плъщия RetL1. Сравняването на белтъците (фигура 3B) показва, че предполагаемата човешка пептидна последователност е 93,3% идентична и 97,2% сходна с тази на плъщата.

Клониране на Ret-лиганда RetL2

А. Клониране на човешки RetL2

Пептидната последователност на плъщия RetL1 (плъщи RetL1) се използва за търсене в базата данни GenBank чрез програмата BLAST, чрез което да се идентифицират родствени белтъци (т. е. изолати). BLAST или Basic Local Alignment Search Tool, използва метода на Altschul et al., (J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990) за търсене на сходства между въпросната последователност и всички последователности в базата данни на последователностите. Въпросната последователност и базата данни, в която се търси, могат да бъдат или пептидни или

нуклеотидни във всякаква комбинация. Когато белтъчната последователност на плъши RetL1 се сравнява с нуклеотидната база данни Expressed Sequence Tag (EST) се открива, че тя съвпада с две важни последователности. Едната е с кодов # R02249 в GenBank, 229 бд EST от комбинираната библиотека кДНК от човешки фетален черен дроб и далак, а другата е с кодов номер в GenBank H1981, 521 бд EST от библиотека кДНК от човешки детски мозък. Двете EST имат 99% идентичност в областта на припокриване, което показва че те са от една и съща кДНК. Получават се олигонуклеотиди от H12981 EST: KID-228 (GAA TGA CAA CTG CAA GAA GCT GCG CTC CTC; съответстващ на нуклеотиди 38-67, а също и на нуклеотиди 534-563 от SEQ ID NO: 12), и антисенс олигонуклеотидът KID-229 (GTG TAC TCG CTG GGC ACC CG; съответстващ на нуклеотидите, комплементарни на 156-157, а също и на нуклеотидите, комплементарни на 652-671 от SEQ ID NO: 12).

В две повторения върху филтри Optitran™ се скринират 1×10^6 PFU (единици, формиращи фагови петна) от библиотеката кДНК на Clontech от човешки фетален черен дроб 5'-Stretch Plus в ламбда GT10 (кат.# HL5003a). Филтрите се хибридизират с олигонуклеотидите KID-228 и KID-229, белязани с ^{32}P в 400 ml буфер за скриниране на (фагови) петна (50 mM Трис pH 7,5; 1 M NaCl; 0,1% натриев пирофосфат, 0,2% поливинилпиролон и 0,2% фикол), съдържащ 10% декстрансулфат и 100 $\mu\text{g/ml}$ tPHK и 80 mol от всеки белязан с ^{32}P олигонуклеотид на 65°C през нощта. Те се промиват два пъти с 2XSSC/1% SDS и два пъти с 1XSSC/1% SDS и се експонират върху филм. Пречистват се 11 повтарящи се положителни (сигнала). ДНК от всеки от тези клонове се анализира чрез смилане с рестриктазни ензими, следвано от електрофореза в агарозен гел и пренос на ДНК (Southern blotting). Филтрите се хибридизират с KID-228 и KID-229, за да се потвърди, че инсертите хибридизират със сондата. Инсерът на клон DSW240 се секвенира напълно (кДНК за човешки RetL2, SEQ ID NO: 12) и е показана на фигура 7.

Нуклеотидите 25-1416 включват белтъчната рамка за четене на кДНК за човешки RetL2, която кодира белтък от 464 аминокиселини (човешки RetL2; SEQ ID NO: 13), показан на

фигура 7. Както беше показано чрез анализа посредством BESTFIT, представен на фигура 8, човешкият белтък RetL2 е 49,1% идентичен и 63,7% сходен с човешкия белтък RetL1. Подобно на човешкия RetL1 той има хидрофобен N-край, което е указание за сигнална последователност и хидрофобен C-край, показателен за мотив, в който се свързва фосфатидилинозитолгликан. Освен това 30 цистеина от общо 31, присъстващи във всеки белтък, са консервативни.

В. Демонстрация на факта, че RetL2 е лиганд за Ret

Демонстрира се, че RetL2 е лиганд за Ret като се трансфектират клетки 293/EBNA с експресионен плазмид, който съдържа инсера на клон DSW240 и се показва, че клетките могат да свързват разтворим слят белтък Ret/IgG.

Инсерът на DSW240 се отстранява чрез използване на NotI и се клонира в експресионния вектор CH269, който съдържа начало (за репликация) на EBV и позволява висока експресия в положителни за EBNA клетъчни линии. Провеждат се рестриктазни смилания, за да се идентифицират клонове, които имат правилната ориентация (на инсера). От клон с правилна ориентация се приготвя плазмидна ДНК.

Плазмидни ДНКи (експресионният плазмид за RetL2, експресионният плазмид за RetL1 като положителна контрола, както и експресионен плазмид, съдържащ неродствен белтък като отрицателна контрола) се трансфектират в клетките 293/EBNA (8×10^5 върху 60 милиметрови плаки) чрез използване на метода за липофекция. След 48 h клетките се промиват два пъти с буфер HBNA (0,5 mg/ml BSA; 0,1% NaN_3 , 20 mM HEPES (pH 7,0)) и се инкубират с 20 $\mu\text{g/ml}$ плъши Ret/IgG в буфериран с Трис физиологичен разтвор плюс 1 mM MgCl_2 и CaCl_2 за 60-90 min на стайна температура. След тази инкубация клетките се промиват четири пъти с буфер HBNA и след това се фиксират с 60% ацетон/3% формалдехид/20 mM HEPES (pH 7,0) за 30 s. След две промивки с буфер HBS (150 mM NaCl, 20 mM HEPES (pH 7,0)) клетките се инкубират с второ анти тяло, конюгирано с AP (козе античовешки IgG Fc-гама-специфичен F(ab')_2 (Jackson Immuno Research Laboratories: каталожен #109-056-098; 1:5000 разреждане в

буфериран с Трис физиологичен разтвор плюс 1 mM MgCl₂ и CaCl₂) за 60 min на стайна температура. Клетките след това се промиват два пъти с буфер HBS и два пъти със субстратен буфер за AP (100 mM Трис-HCl (pH 9,5), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂), съдържащ 2X от фосфатазния супресор на Pierce Immuno Pure^R (каталожен #35002). Последната промивка се прави за 15 min. Субстратите на AP NBT (0,33 mg/ml) и BCIP (0,17 mg/ml) се добавят след това към субстратния буфер за AP, съдържащ инхибитора на AP на Pierce и се инкубират с клетките 5-20 min. След това плаките се промиват два пъти с вода. Плаките след това се наблюдават под микроскоп за наличието на пурпурно оцветени клетки. Наличието на пурпурно оцветени клетки показва, че слетият белтък на Ret се е свързал с клетките и че белтъкът RetL2 е лиганд за Ret. Пурпурно оцветени клетки се наблюдават също и след трансфекция с експресионния вектор за RetL1, но не и с отрицателната контрола.

Клониране на Ret-лиганда RetL3

А. Миши RetL3

Търсенето в базата данни EST с аминокиселинната последователност на плъшия RetL1 открива две миши EST-последователности, хомоложни на лигандите за RetL. Тези EST-последователности са AA049894 и AA050083 (която е кДНК за част от миши RetL3, SEQ ID NO: 14). От Genome Systems Inc. (каталожен #475791 и #475497) под формата на бактериални култури (трансформирани клетки, посяти в твърда среда - б. пр.) се получават плазмиди, кодиращи тези EST-последователности. Плазмидна ДНК се приготвя от единични колонии, които се получават чрез разсяване на бактериалните култури върху плаки с LB и Amp. Секвенират се целите инсерти в тези плазмиди. Сравняването на тези две последователности показва, че AA049894, която има инсерт от 1,4 kb, се съдържа в AA050083, която има инсерт от 1,9 kb. Транслацията на последователността ДНК от AA050083 показва, че е налице непрекъсната отворена рамка за четене от NT205 до NT1242 (частичен миши RetL3; SEQ ID NO: 15). Тази отворена рамка за четене (ORF) има 37,5% идентичност с тази на плъшия RetL1 и 40,2% идентичност с плъши RetL2. Отворената рамка за четене обаче не кодира Met или сигнална последователност в

5'-края. Ние изследваме отворените рамки за четене в посока 5' пред (upstream) от тази област и намираме Met в контекста на консенсусната последователност на Kozak за инициация на транслацията и потенциална сигнална последователност за повърхностна експресия/секреция. Тази ORF е извън рамката с downstream-ORF, което показва, че EST AA050083 съдържа в своя 5'-край потенциална мутация, такава като инсерция, делеция, интрон или грешка при клонирането.

За да получим правилния 5'-край ние прилагаме Marathon RACE. От Clontech се закупуват кДНК от 11-дневен миши ембрион Marathon-ReadyTM (кат. # 7458-1) и комплекта AdvantageTM (кат. #8417-1). Синтезират се антисенс олигонуклеотиди, Kid-366, съответстващ на нуклеотидите комплементарни на 847-866 от SEQ ID NO: 14 и Kid-365, съответстващ на нуклеотидите, комплементарни на 589-615 от SEQ ID NO: 14. Провежда се PCR чрез използване на набора за PCR на кДНК AdvantageTM (Clontech кат. # 8417-1) в комбинация с реактивите за кДНК Marathon и олигонуклеотида Kid-366. Първата PCR-реакция се залага както следва: 25,3 µl H₂O; 5 µl 10XklenTaq Buffer; 1,0 µl смес от 10 mM dNTP; 1,0 µl 50XAdvantageTMKlenTaq-полимеразна смес. Тези реактиви се обединяват и смесват. След това се добавят 5,0 µl кДНК от 11-дневен миши ембрион Marathon-ReadyTM; 1,0 µl 10 µM праймер AP1 и 1,7 µl 5,88 µM Kid-368 (краен обем = 50 µl). Провежда се PCR в апарат за PCR на Perkin-Elmer Cetus 480 със следните условия на циклите: 1 цикъл от 94°C за 1 min; 5 цикъла от 94°C за 30 s, 72°C за 4 min; 5 цикъла от 94°C за 30 s, 70°C за 4 min; 25 цикъла 94°C за 30 s, 68°C за 4 min. Провежда се PCR (nested) с вътрешен за новосинтезираната матрица праймер, като се използва продуктът от първата PCR-реакция. Първо, 5 µl от PCR-продукта #1 се разрежда 50 пъти с TE (краен обем 250 l). Новата PCR-реакция съдържа 35,5 µl H₂O; 5 µl 10XklenTaq буфер; 1,0 µl смес от 10 mM dNTP; 1,0 µl 50XAdvantageTMKlenTaq-полимеразна смес. Тези реактиви се смесват, както по-горе. След това се добавят 5 µl от разрежения PCR-продукт #1; 1,0 µl 10 µM праймер AP2 и 3,6 µl 2,8 µM Kid-365. Условията на циклите са същите, както по-горе. Полученият продукт от приблизително 665 бд се пречиства от 1%-ен

агарозен гел, топящ се при ниска температура и се екстрахира с Qiaex II (Qiagen, кат.# 20021). Пречистената ДНК се клонира в pNoTA/T7TM, като се използва системата за клониране PRIME PCR CLONER™ (5 Prime > 3 Prime кат.# 1-725029). Информация за последователността се получава от множество клонове в това число и клоновете, наречени DSW252 и DSW253.

Установява се, че последователността на DSW252 се припокрива със SEQ ID NO: 14 с изключение на едно допълнително Т между NT 252 и NT 253 на последователността SEQ ID NO: 14. Това Т присъства също така в другите изолати DSW251 и DSW253. Включването на тази допълнителна база коригира ORF, така че се получава единична ORF (като се започне от първия Met) от 1191 бд, кодираща 397 аминокиселини. Тази ORF кодира Met в контекста на традиционната консенсусна последователност за инициация на транслацията (Kozak) и включва сигнална последователност за повърхностна експресия/секреция.

За получаването на пълноразмерен миши клон, който може да се експресира, се пречистват фрагмент NotI-BamHI от 630 бд от DSW252 и фрагмент BamHI-NotI от 1308 бд на AA050083 и се лигираат към експресионния вектор CH289, смлян с NotI. Лигирането се трансформира в E. coli XL1-Blue (Stratagene кат. #200236). От получените трансформанти се правят минипрепарати (изолира се плазмидна ДНК в малки количества с набор реактиви) Qiawell Ultra. Те се анализират чрез рестриктазно смилане и електрофореза в гел за правилна големина и ориентация. Тази конструкция се нарича DSW254. Инсертът на DSW254 се секвенира изцяло (миши RetL3; SEQ ID NO: 16) и се потвърждава, че ORF кодира белтък от 397 аминокиселини (миши RetL3; SEQ ID NO: 17). Тези последователности са показани също на фигура 9. С-краят на RetL3 е хидрофобен и указва за наличието на мотив за свързване фосфатидилинозитолгликан.

В. Човешки RetL3

За да се намери тъкан, която е кандидат-източник за клониране на човешки RetL3, се използва пренос на РНК (Northern blot) от миши тъкани за определяне профила на експресия на мишия RetL3. От прегледаните тъкани експресията на RetL3 е най-висока в сърдечната тъкан. От Clontech се закупува

кДНК от човешко сърце на възрастен във вектора ламбда gt10 (каталожен# HL3026a). Върху 10 плаки на Nunc от изходната фагова суспензия се посяват един милион единици, формиращи фагови петна. Върху филтри на Schleicher и Schul Optitran™ се правят две реплики на фаговите петна.

Чрез PCR се получава сонда с праймерите Kid-366 и Kid-367, отговарящи на нуклеотиди 397-420 от последователността AA050083. PCR-реакцията се залага, както следва: смесват се 10 µl 10XPFU) буфер; 2,0 µl смес от 10 mM dNTP; 72,1 µl H₂O; 3,1 µl 13,2 µM Kid-367; 6,8 µl 5,88 µM Kid-366; 5,0 µl 0,1 µg/µl ДНК AA050083 и 2,0 µl 2,5 единици/µl PFU (Stratagene, каталожен# 600154). Провежда се PCR с апарата за PCR на Perkin-Elmer Cetus 480 при следните условия: 25 цикъла от 94°C за 1 min, 53°C за 1 min, 72°C за 4 min. Продуктът се пречиства чрез екстракция с фенол, хлороформ, изоамилов алкохол 50:45:1, следвана от електрофореза в агарозен гел, топящ се при ниска температура и пречистване на изрязания фрагмент с QiaexII. Тази сонда от кодиращата област се бележи с ³²P чрез случайна инициация (random priming) (Freinberg and Vogelstein). Филтрите се хибридизират за една нощ в 200 ml буфер за скриниране на фагозите петна (), съдържащ 10% декстрансулфат, 100 µg/ml tPHK и 1,8X10³ CPM от мишата сонда при 65°C. Те се промиват два пъти с буфера за скриниране на фаговите петна, два пъти с 2XSSC/1% SDS, два пъти с 1XSSC/1% SDS на 65°C и се експонират върху филм при -70°C с усилващ екран. Фаговите петна, дали положителен сигнал върху двете реплики, се пречистват. Минипрепаративно количество ламбда ДНК от пречистените фагови петна-кандидати, се смिला с EcoRI, провежда се електрофореза в 1% агарозен гел и се прави пренос на ДНК (Southern blot). Филтрите с пренесената върху тях ДНК се хибридизират с мишата сонда. Клон JC128, който има инсерт от 1,3 kb, хибридизира интензивно с мишата сонда от кодиращата област. От този клон се получават последователността ДНК (кДНК за. част от човешки retL3; SEQ ID NO: 18) и изведената от нея пептидна последователност (частичен човешки RetL3; SEQ ID NO: 19), което потвърждава, че тя (последователността) е хомолог на човешката. Този клон кодира по-

голямата част от кодиращата област в това число и 3'-края на кодиращата област.

Инсерът от 1,3 кб в GJ128 се пречиства, бележи се с ^{32}P и се използва за скриниране на библиотеката на Clontech от сърце на възрастен, за да се получи клон с 5'-края. При скринирането на 2×10^6 фагови петна от тази библиотека не се получават клонове, съдържащи 5'-края. Анализът чрез пренос мРНК (Northern) от тъкан на възрастен (Clontech, каталоген # 7760-1, 7759-1 и 7767-1), хибридирана със същата сонда по протоколите, доставени от производителя, показва, че човешкият RetL3 се експресира във възрастни хора в гръбначния стълб, стомаха, сърцето, задстомашната жлеза, тънките черва, дебелото черво, простатата и тестисите. С инсера на GJ128 се скринира библиотека кДНК на Clontech от гръбначен стълб на възрастен човек (каталоген # 5001 а). Пречистват се три независими клона и най-дългият, GJ135 се секвенира. Последователността на инсера в GJ135 се припокрива с инсера на GJ128, което позволява получаването на съставна последователност на кДНК за пълноразмерния човешки RetL3 (SEQ ID NO: 20) и определянето на пълноразмерния човешки RetL3 (SEQ ID NO: 21). Тези последователности са показани също на фигура 10. Човешкият RetL3 е 34,3% и 34,9% идентичен с човешкия RetL1 и човешкия RetL2 съответно. Той има 76,8% идентичност с мишия RetL3.

Терапевтични приложения на съединенията на изобретението

Нативните форми или вариантите на RetL, анти-RetL антителата, анти-Ret антителата, както и слетите белтъци на Ret и RetL могат да намерят терапевтично приложение в ситуации, при които е желателно да се блокира или активира пътят за предаването на сигнали посредством Ret, за стимулиране растежа на бъбречните и/или нервни клетки или за оцеляването при болестни състояния, при които тези клетки са изгубени или променени, или пък за потискане растежа или за унищожаването на нежелани клетки, такива като туморни клетки, които експресират Ret или RetL.

Най-общо, съединенията на изобретението, които се свързват с Ret, индуцирайки димеризация и/или автофосфорилиране на Ret, са полезни за стимулиране на растежа или за ограничаване на увреждаането на тъкани, кои-

то експресират Ret. Съединенията на изобретението са полезни за стимулиране на растежа и/или оцеляването на бъбречната тъкан като подпомагат функцията на бъбрека, както и за намаляване на увреждането в бъбречната тъкан след различни инсулти. Конкретните състояния, които могат да се лекуват надеждно със съединенията на изобретението, включват бъбречна недостатъчност, остър нефрит, хронична бъбречна недостатъчност, нефротичен синдром, дефекти на бъбречните каналчета, бъбречни присадки, токсични увреждания, хипотоксични увреждания и травма. Дефектите на бъбречните каналчета включват тези с наследствена или придобита природа, такива като полицистично бъбречно заболяване, медуларно цистично заболяване и медуларен спонгиозен бъбрек. Този списък е неограничен и може да включва редица други бъбречни заболявания (виж, напр., Principles of Internal Medicine, 13th ed., 1994, включен тук за справка).

В други приложения гените и белтъците на изобретението могат да се използват за лечение на състояния, при които са желателни растеж и регенерация на нервите. Това би включвало всякакви състояния, в това число невродегенеративни заболявания, такива като болестта на Алцхаймер, на Паркинсон, Хънтингтон, Турет, амиотрофна латерална склероза, както и заболяване на двигателния нерв, демиелиниращо заболяване, такова като множествената склероза, бактериални заболявания, такива като менингит, абсцес или емпиема, вирусни заболявания, такива като HIV-асоциираната миелопатия, прионовни заболявания от рода на болестта на Кройцфелд-Якоб. Включват се също така заболявания на увреждания в нервната тъкан, било то причинени от неопластично вращане, травма или от cerebroваскуларни събития, такива като хеморагия или емболия. Специално се включват заболявания на черепномозъчните нерви и на гръбначния стълб в това число заболявания с травматичен, възпалителен или конгенитален произход, както и заболявания, засягащи автономната нервна система. Включват се също така нервни заболявания на развитието, такива като умствено изоставане, аутизъм, фетален алкохол синдром, синдром на Даун и церебрална парализа. Съединенията на изобретението могат също така да се използват за лече-

ние на синдроми, включващи периферната нервна система. Тези заболявания включват заболявания, причинени от който и да е от факторите, изредени преди, а по-конкретно включват болестта на Лим, HIV-асоциирани невропатии, полимиозит, мускулна дистрофия и миастения гравис (*myastheria gravis*).

Анти-RetL антителата и слетите белтъци на Ret на изобретението, които се свързват специфично с белтъците плъщи RetL, частичен човешки RetL1, пълноразмерен човешки RetL1, човешки RetL2, миши RetL3 или човешки RetL3, или с фрагменти от тези белтъци, са приложими в някои методи. Съединенията могат да се използват терапевтично за инхибиране или блокиране на предаването на сигнали чрез рецептора Ret, например за блокиране растежа на туморите, който зависи от предаването на сигнал за растеж посредством Ret. Тези вещества могат също така да се присъединят към маркери, които могат да се наблюдават, такива като флуороскопски или радиографски плътни вещества и да се въведат в субект, което позволява наблюдаването на тъкани, които експресират RetL. Веществата могат също така да се свържат със субстанции, такива като пероксидаза от хрян, която може да се използва като имунохистохимично багрило, за да се визуализират в хистологични срези области от положителни за RetL клетки. Едно специфично анти тяло би могло да се използва самостоятелно по този начин като местата, където то се свързва, могат да се визуализират в сандвичев тест чрез използвано на антиимуноглобулиново анти тяло, което самото е свързано с маркер, който може да се детектира. Специфичните антитела срещу всеки RetL са полезни също така в имунотестовите за количествено определяне на вещество, към което дадено анти тяло има специфичност. Специфичните антитела срещу RetL могат също така да се свържат към твърди подложки, такива като перли или панички и да се използват за отстраняване на лиганда от разтвор, било то за пречистване на белтъка или за отделянето му от разтвора.

Други методи на изобретението включват модулиране на сигнализирането Ret- RetL чрез създаване на контакт между Ret и анти-Ret моноклонално анти тяло. Ефектът от такъв контакт mAb-Ret може да бъде блокиране или стимулиране активирането на сигналния път на Ret, което зависи от характеристиките на взаи-

модействие на всяко конкретно mAb с Ret. Някои mAbs взаимодействат с Ret като агонисти, при което агонистичното свързване mAb-Ret отключва димеризацията и автофосфорилирането на Ret. Други mAbs действат като антагонисти на Ret. Взаимодействието на Ret с антагонистично mAb преустановява активирането чрез Ret-сигнализиране от други RetL's или от комплекси, съдържащи RetL's, което иначе би активирало Ret-сигналния път.

RetL и/или антитела срещу Ret или срещу слят белтък на Ret могат да се използват за визуализиране на тъкани, които експресират Ret или в имунохистохимичните или препаративни методи, описани по-горе за антителата срещу RetL.

Слети белтъци, обхващащи RetL и/или анти- Ret антитела, могат да се използват за специфично насочване на лекарствата при лечение на рак и тумори, които експресират Ret. Такива тумори биха могли да включват няколкото различни туморни фенотипа, дължащи се на мутации в Ret (N. Engl. J. Med. 335:943-951, 1996; Nature 387:319-320, 1996; Trends Gen, 12:138-144, 1996). Терапевтичните интервенции срещу неоплазии, които експресират RetL, използват слети белтъци, които включват Ret и/или анти-RetL анти тяло. Анти-Ret анти тялото или анти-RetL анти тялото сами могат да бъдат ефективни посредством анти тяло-зависимата и комплемент-зависима цитолиза, която се опосредства от Fc-домена. Такива хибридни лиганди и антитела могат да се направят по-ефективни като медикаменти чрез използването им като средства за целенасочено доставяне на антинеопластични вещества, токсини и цитотоксични радионуклиди, такива като итрий 90. Цитотоксичните ефекторни клетки могат да бъдат насочени към туморните клетки чрез използване на хетерокогногатни антитела, в които едно анти тяло, специфично или за Ret или за RetL, експресирани от тумора, се свързва ковалентно с анти тяло, насочено срещу повърхностен белтък върху цитотоксичните ефекторни клетки, такива като клетките NK (клетки-убийци) или CTLs (цитотоксични Т-лимфоцити).

Един пример за терапия посредством анти- Ret анти тяло или RetL представлява конюгирането на токсичната А-верига на рибина или на модифицирана пълноразмерна форма на рибина (която не може повече да се свързва с

клетките) с RetL или с антитяло, насочено срещу полипептида Ret, който се експресира върху повърхността на малигнените клетки. В друго приложение токсин се конюгира с Ret или с анти-RetL антитяло за избиращелно насочване и унищожаване на положителните за RetL клетки, такива като туморните (клетки), експресиращи RetL. Такъв подход се е оказал успешен с блокиран рицин, конюгиран с моноклонално антитяло срещу антигена CD19, който се експресира от повечето неопластични клетки (Grossbard et al., Blood 79:576, 1992). По същия начин са полезни и други токсини, познати на специалистите от областта на техниката. Такива токсини включват, но не се ограничават до, екзотоксина на псевдомонас, дифтерийния токсин и сапорина. Този подход би се оказал дори още по-успешен чрез използването на RetL или на анти-Ret антитяло, за разлика от известния подход с анти-CD19, тъй като Ret се експресира в много ограничен набор от тъкани.

Горните подходи, използващи свързване на рибина с други токсини, са напълно приложими и към токсичните конюгати на RetL или на анти-Ret антителата; последните са полезни за избиращелно насочване и унищожаване на положителните за Ret клетки, такива като туморни клетки, експресиращи Ret.

Друг подход за такива лекарствени терапии представлява използването на RetL или анти-Ret антитела, белязани с радиоизотоп. Такива радиоактивно белязани съединения ще се насочват предимно към местата на клетките в тумора, експресиращи Ret, предпазвайки нормалните тъкани. В зависимост от използвания радиоизотоп радиацията, излъчена от радиоактивно белязаното антитяло, свързано с туморната клетка, може да убие също и съседните малигнени туморни клетки, които не експресират Ret. Могат да се използват различни радионуклиди. Изотопи, които излъчват бета-частици (например, ^{131}I) са били удачни при използването им с моноклонални антитела срещу CD20, представен върху В-клетъчни лимфоми (Kaminski et al., N. Engl. J. Med. 329:459 (1993); Press et al., N. Engl. J. Med. 329:1219 (1993)). Радионуклидите, излъчващи бета-частици генерират радиоактивни емисии, които са туморицидни на разстояния, обхващащи няколко клетъчни диаметра, което позволява да бъдат унищожени клетки, несъдържащи антиге-

на и да се сведат до минимум последствията от нехомогенното депозиране на антитялото или лиганда в туморите.

Могат да се използват също и радионуклиди, излъчващи алфа-частици. Облъчването с ниска дозова скорост, което се получава при RetL или анти-Ret антителата, белязани с радионуклиди, може да бъде по-ефективно в терапевтично отношение отколкото мигновено то облъчване, което се извършва външно в традиционната лъчева терапия. Ниската дозова скорост може да индуцира апоптоза (програмирана клетъчна смърт) в определени клетъчни линии (Macklis et al., Radiat. Res. 130: 220 (1992); Macklis et al., Radiopharm. 5: 339 (1992)).

Съединенията от изобретението се прилагат в терапевтично ефективни количества, което означава количество от веществото, което произвежда желан медицински резултат или оказва влияние върху определено състояние, което се лекува.

Терминът "субект", използван тук, означава всеки бозайник, към който може да се приложи лиганд на Ret или ген. Субектите, които специално се предвиждат за лечение включват хора, както и други примати, овце, коне, рогат добитък, кози, прасета, кучета, котки, зайци, морски свинчета, хамстери, песчанки (подсем. Gerbillinae), както и органите, туморите и клетките, получени или произхождащи от тези гостоприемници.

Използване на съединенията от изобретението в генна терапия

Гените за RetL на изобретението се въвеждат в увредена тъкан, за да се стимулира синтезата на RetL от трансформирани клетки, която да предизвика растеж и/или оцеляване на клетките, които експресират Ret.

При специфично приложение RetL може да се въведе в избрана бъбречна или нервна целева тъкан. След това RetL би се експресирал стабилно и би стимулирал клетките, положителни за рецептора Ret, да растат, да се делят, диференцират и/или би подпомогнал клетъчното оцеляване. Освен това гените за RetL могат да се въведат в целевата клетка чрез използване на разнообразни добре познати методи, които използват стратегии на базата на вируси или не на вируси.

Невирусните методи включват електропорация, мембранна фузия с липозоми, висо-

коскоростно бомбардиране с микроснаряди, покрити с ДНК, инкубиране с калциево-фосфатен преципитат, опосредствена от DEAE-декстран трансфекция и директно микроинжектиране в единична клетка. Например, ген за RetL може да се въведе в клетка чрез калциево-фосфатна копреципитация (Pillicer et al., *Science*, 209:1414-1422 (1980); механично микроинжектиране и/или ускоряване на частиците (Anderson et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 77:5389-5403 (1980); пренос на ДНК на основата на липозоми (напр., трансфекция, опосредствана от LIPOFECTIN - Fefgner et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 84:471-477, 1987; Gao and Huang, *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, 179: 280-285, 1991; трансфекция, опосредствана от DEAE-декстран; електропорация (US 4 956 288; или методи на основата на полилизин, в които ДНК се конюгира за доставяне на ДНК предимно в чернодробните хепатоцити (Wolff et al., *Science*, 247:465:468, 1990; Curiel et al., *Human Gene Therapy* 3:147-154, 1992).

Прицелните клетки могат да се трансфектират с гените на изобретението чрез директен пренос на гени. Виж, напр., Wolff et al., "Direct Gene Transfer Into Moose Muscle In Vivo", *Science* 247:1465-68, 1990. В много случаи ще е желателна трансфекция, опосредствана от вектори. За включването на полинуклеотидни последователности във вектор може да се използва всеки от методите, известни в областта на техниката. Виж, например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) и Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, J. Wiley & Sonc, NY (1992), и двете са включени за справка. Активирането на промотора може да бъде тъканно специфично или да се индуцира от метаболитен продукт или от въведено вещество. Такива промотори/инхансери включват, но не се ограничават до, нативния промотор на RetL, непосредствено ранният промотор/инхансер на цитомегаловируса (Karasuyama et al., *J. Exp. Med.*, 169:13 (1989)); индуцируемият от глюкокортикоиди промотор, присъстващ в дългия краен повтор на вируса на тумора на млечната жлеза при мишки (MMTV LTR) (Klessig et al., *Mol. Cell Biol.*, 4:1354 (1984); последователностите от дългия краен повтор на вируса на левкемията на Moloney при мишки (MuLV LTR) (Weiss et al., *RNA Tumor Viruses*, Cold Spring Harbor

Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1985)); областта на ранния промотор на SV40 (Bernois and Chambon, *Nature*, 290:304 (1981); промотора на саркомния вирус на Rous (RSV) (Yamamoto et al., *Cell*, 22:787 (1980); тимидинкиназният промотор на вируса herpes simplex (HSV) (Wagner et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 78:1441 (1981)); аденовирусният промотор (Yamada et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 82:3567 (1985)).

Гените за RetL могат също така да се въведат чрез специфични вирусни вектори, използвани в системите за генен пренос, които сега са вече утвърдени. Виж например: Mazdak et al., *J. Gen. Vir.*, 73:1533-36, 1992 (паповавирус SV40); Berkner et al., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 158:39-61, 1992 (аденовирус); Hofman et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 92:10099-10103, 1995 (бакуловирус); Moss et al., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 158:25-38, 1992 (ваксинален вирус); Muzyczka, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 158:97-123, 1992 (адено-асоцииран вирус); Margulskes, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 158:67-93, 1992 (вирус на херпес симплекс (HSV) и вирус на Epstein-Barr (HBV)); Miller, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 158:1-24, 1992 (петровирус); Brandyopadhyay et al., *Mol. Cell Biol.*, 4:749-754, 1984 (петровирус); Miller et al., *Nature*, 357:455-450, 1992 (петровирус); Anderson, *Science*, 256:808-813, 1992 (петровирус), *Current Protocols in Molecular Biology: Sections 9.10-9.14* (Ausubel et al., Eds.), Greene Publishing Associates, 1989, всички които са включени тук за справка.

Предпочитаните вектори представляват ДНК-вируси, които включват аденовируси (за предпочитане вектори на основата на Ad-2 или Ad-5), бакуловирус, херпесни вируси (за предпочитане вектори на основата на вируса на херпес симплекс) и парвовируси (за предпочитане вектори на основата на "дефектни" или неавтономно реплициращи се парвовируси, по-предпочитани са векторите на основата на адено-асоциираните вируси, най-предпочитани са векторите на основата на AAV-2). Виж, напр., Ali et al., *Gene Therapy* 1:367-384, 1994; US 4 797 368 и US 5 399 346 и дискусиата по-долу.

Изборът на определена векторна система за пренос, например, за последователността RetL, ще зависи от редица фактори. Един

важен фактор представлява природата на прицелната клетъчна популация. Въпреки че ретровирусните вектори са обширно изучени и използвани в редица приложения на генната терапия, като цяло те са непригодни за инфектиране на клетки, които не се делят, но могат да бъдат полезни в раковата терапия, тъй като те се интегрират и експресират своите гени само в размножаващи се клетки. Те са полезни за подходи *ex vivo* и в това отношение са привлекателни в резултат на тяхната стабилна интеграция в генома на прицелната клетка.

Аденовирусите са еукариотни ДНК-вируси, които могат да се модифицират за ефективен пренос на терапевтичен или индикаторен трансген в различни клетъчни типове. Основните аденовируси от типове 2 и 5 (Ad2 и Ad5), които причиняват дихателно заболяване у хората, понастоящем са разработени за генна терапия на мускулна дистрофия на Дюшен (DMD) и на циста на гърдата (cystic fibrosis, CF). И Ad2 и Ad5 принадлежат към субклас аденовируси, които не са свързани със злокачествени израждания (малигненост) у хората. Аденовирусите са в състояние да осигурят значително високи нива на трансгенен пренос на практика във всички клетъчни типове, независимо от митотичния статус. Високи титри (1013 единици, формиращи фагови петна/ml) от рекомбинантен вирус могат да се получат лесно в клетки 293 (трансфектирана с аденовирус и допълваща неговите функции човешка клетъчна линия от ембрионален бъбрек: ATCC CRL 1573) и да се съхранят в замразено състояние за продължителни периоди без значителни загуби. Ефективността на тази система за пренос на терапевтичен трансген *in vivo*, който коригира някакъв генетичен дисбаланс, беше демонстрирана в животински модели на различни заболявания. Виж Y. Watanabe, *Atherosclerosis*, 36:261-268 (1986); K. Tanzawa et al., *FEBS Letters*, 118(1):81-84 (1980); J. Clin. Invest., 92:883-893 (1993); и S. Ishibashi et al., *J. Clin. Invest.*, 93:1889-1893 (1994), всички цитати са включени тук за справка. На практика рекомбинантен вирус, дефектен в репликацията и кодиращ трансмембранный регулатор (CFTR) на гръдната циста (CF) е бил одобрен за приложение в най-малко две клинични изпитания на CF у хората. Виж, напр., J. Wilson, *Nature*, 365: 691-692 (Oct., 21, 1993). Богатият опит с живите аденовирусни вакси-

ни в човешката популация представлява друго доказателство за безопасността на рекомбинантните аденовируси в генната терапия.

Човешките аденовируси се състоят от линейен, приблизително 38 кб геном от двойноверижна ДНК, който е разделен на 100 картиращи единици (m. u.), всяка от които е дълга 360 бд. ДНК съдържа къси обратни крайни повтори (ITR) на всеки край от генома, които са необходими за репликацията на вирусната ДНК. Генните продукти са организирани в ранна (E1 до E4) и късна (L1 до L5) област на основата на тяхната експресия преди или след инициацията на синтеза на вирусната ДНК. Виж, напр., Horwitz, *Virology*, 2d edit., ed. B. N. Fields, Raven Press Ltd., New York (1990).

Първото поколение рекомбинантни аденовируси с дефект в репликацията, които бяха разработени за генна терапия на DMD и на други наследствени заболявания, съдържат цялата област E1a и част от E1b. Този вирус, дефектен в репликацията, се размножава в клетки 293, съдържащи функционален аденовирусен ген E1a, който осигурява транс-действащ белтък E1a. Вирусите с делеция на E1 са способни да се реплицират и да произвеждат инфекциозни вируси в клетките 293, които осигуряват генните продукти на областите E1a и E1b *in trans*. Получаващият се при това вирус е в състояние да инфектира редица клетъчни типове и може да експресира въведения ген (при условие, че той носи свой собствен промотор), но не може да се реплицира в клетка, която не съдържа ДНК от областта E1, докато клетката не бъде заразена при много висока множественост на инфекцията. Аденовирусите имат това предимство, че те притежават широк набор от гостоприемници, могат да инфектират недиференциращи се или крайно диференцирани клетки, такива като невроните, и което е особено съществено, проявяват се като неонкогенни. Аденовирусите не се проявяват и като интегриращи се в генома на гостоприемника. Тъй като те съществуват извънхромозомно, рискът от мутагенеза в резултат на внедряването им в генома е съществено намален. Ali et al., p. 373 по-горе. Рекомбинантните аденовируси (rAdV) произвеждат много високи титри, вирусните частици са умерено стабилни, равнищата на експресия са високи и могат да заразяват широк набор от клетки. Техните естествени гостоприемници са клетките

на дихателния епител и следователно те са полезни за лечение на белодробен рак.

Преносът чрез бакуловируси има някои предимства. Посредством бакуловирусите генни могат да се пренасят в реплициращи се и в 5
нереплициращи се клетки, в бъбречни клетки, както и в хепатоцити, нервни клетки, далак, кожа и мускул. Бакуловирусът не се реплицира в клетки на бозайници и е непатогенен. Хората не притежават персистиращи антитела срещу 10
рекомбинантните бакуловируси, които биха могли да блокират инфекцията. Освен това бакуловирусът може да включва и пренася много големи фрагменти ДНК.

Адено-асоциираните вируси (AAV) също 15
са били използвани като вектори за соматична генна терапия. AAV е малък вирус с едноверижна (ss) ДНК и проста геномна организация (4,7 кб), която го прави идеален субстрат за 20
генно инженерство. Две отворени рамки за четене кодират серия от полипептиди гер и сар. Полипептидите гер (гер78, гер68, гер62 и гер 40) участват в репликацията, изрязването и интеграцията на генома на AAV. Белтъците сар (VP1, VP2 и VP3) образуват обвивката на вириона. Отворените рамки за четене на гер и сар са ограничени откъм 5'- и 3'-края от обратни 25
крайни повтори (ITRs) от 145 бд, първите 125 бд от които могат да образуват двойноверижни структури с формата на Y и T. От значение 30
за разработването на вектори на основата на AAV е възможността домените гер и сар да бъдат изцяло отстранени и заменени с терапевтичен или индикаторен трансген. Виж B. J. Carter, in Handbook of Parvoviruses, ed., P. Tijsser, CRC 35
Press, pp. 155-168 (1990). Беше показано, че LTRs представляват минималната последователност, необходима за репликация, изрязване, опаковане и интеграция на генома на AAV.

Жизненият цикъл на AAV е двуфазен, 40
състоящ се от латентен и литичен период. По време на латентната инфекция вирионите на AAV навлизат в клетката като опакована едноверижна ДНК и малко след това попадат в ядрото, където ДНК на AAV се интегрира стабилно в 45
хромозомата на гостоприемника, без видимата необходимост от делене на гостоприемната клетка. В отсъствието на вирус-помощник интегрираният геном на AAV остава латентен, но в състояние да бъде активиран и възстановен 50
(изрязан). Античната фаза от жизнения цикъл започва, когато клетка, носеща провирус на

AAV, се зарази чрез повторна инфекция с херпесен вирус или аденовирус, който кодира помощни функции, които се изземват от AAV, за да спомогнат изрязването му от хроматина на гостоприемника (B. J. Carter, по-горе). Инфектиращата родителска едноверижна ДНК се превръща в репликативна двойноверижна форма (RF) ДНК, което зависи от функцията на гер. Възстановените геноми на AAV се опаковат в предварително образувани белтъчни обвивки (икосоедърна симетрия с приблизително 20 nm в диаметър) и след клетъчния лизис се освобождават като инфекциозни вириони, които са опаковали + или - геномите от едноверижна ДНК.

Адено-асоциираните вируси (AAV) са със значителен потенциал за генната терапия. Вирусните частици са много стабилни, а рекомбинантните AAVs (rAAV) имат "лекарствено-подобни" характеристики в този смисъл, че rAAV могат да се пречистват чрез утаяване или чрез центрофугиране в градиент на CsCl. Те са топлинно устойчиви, могат да се лиофилизират на прах и да се рехидратират до пълно възстановяване на активността. Тяхната ДНК се интегрира стабилно в хромозомите на гостоприемника, така че експресията им е продължителна. Техният набор от гостоприемници е голям и не е известно AAV да причиняват заболявания, поради което рекомбинантните вектори не са токсични.

След като веднъж се въведат в прицелната клетка последователностите, които представляват интерес, могат да се идентифицират чрез традиционни методи, такива като хибридизация на нуклеинови киселини със сонди, включващи последователности, които са хомоложни/комплементарни на включените във вектора генни последователности. В друг подход последователността(ите) може да се идентифицира по наличието или отсъствието на функцията на "маркерен" ген (напр., тимидинкиназна активност, устойчивост към антибиотик и др.), които се дължат на въвеждането на експресионния вектор в прицелната клетка.

Лекарствени форми и приложение

Съединенията на изобретението могат да се прилагат по всякакъв начин, приет от медицината. Това може да включва инжектиране чрез парентерални способи, такива като интравенозни, интраваскуларни, интраартериални, подкожни, мускулни, интратуморни, ин-

траперитонеални, интравентрикуларни, интра-
епидурални и др., както и орални, назални, оф-
талмични, ректални или локални. В изобрете-
нието специално се включва приложение със
забавено освобождаване на субстанцията чрез
такива начини като забавено инжектиране
(depot injections) и разграждащи имплантати
(erodible implants). Има се предвид особено ло-
калното приложение чрез такива способи ка-
то - чрез катетър до една или повече артерии
като бъбречната артерия или до съд, кръвос-
набдяващ локализиран тумор.

Терминът "фармацевтично приемлив но-
сител" означава една или повече органични или
неорганични съставки, природни или синтетич-
ни, с които се комбинира мутантният прото-
онкоген или мутантният онкобелтък, за да се
улесни неговото приложение. Един подходящ
носител включва стерилен физиологичен раз-
твор, макар че за обикновените специалисти
от областта на техниката са познати и други
водни и неводни изотонични стерилни разтво-
ри и стерилни суспензии. В този смисъл тер-
минът "носител" обхваща липозоми и белтъка
на HIV-1 tat (Виж Chen et al., Anal. Biochem,
227:168-175, 1995), както и всеки плазмиден
или вирусен експресионен вектор. "Ефектив-
но количество" се отнася за такова количес-
тво, което е в състояние да подобри или да
забави напредването на болестното, дегенера-
тивно или увредено състояние. Едно ефектив-
но количество може да се определи на инди-
видуална основа, а от части ще се основава и
на отчитане на симптомите, които ще се леку-
ват и резултатите, които се целят. Едно ефек-
тивно количество може да се определи от
обикновения специалист като се позовава на
такива фактори и като използва съвсем рутин-
ни експерименти.

Липозомната система може да представ-
лява всякакъв вариант на еднослойни везику-
ли, многослойни везикули или стабилни раз-
нослойни везикули и може да се приготви и
приложи съгласно методи, които са добре поз-
нати на специалистите от областта на техника-
та, например съгласно техниките, описани в
US 5 169 637, US 4 762 915, US 5 000 958 или
US 5 185 154. Освен това може да бъде жела-

телно новите полипептиди на това изобретение,
както и други избрани полипептиди, да се ек-
спресират под формата на липопротеини, за да
се подсили тяхното свързване с липозомите.
Например, лечението на остра бъбречна недос-
татъчност у хората с включен в липозоми RetL,
когато се налага такова лечение, може да се
извърши in vivo чрез въвеждане на RetL в клет-
ките посредством липозоми. Липозомите мо-
гат да се доставят в реналната артерия чрез ка-
тетър. Рекомбинантният белтък RetL се пречис-
тва, например от клетки CHO, чрез имуноафи-
нитетна хроматография или чрез който и да е
друг удобен метод, след това се смесва с ли-
позоми и се включва в тях с висока ефектив-
ност. Включеният белтък може да се тества in
vitro за какъвто и да е ефект върху стимулаци-
ята на клетъчния растеж.

Това изобретение има също така пред-
вид, че новите полипептиди на това изобрете-
ние могат да се прилагат в животно чрез сис-
тема за липозомна доставка, за да се подсили
тяхната стабилност и/или имуногенност. Дос-
тавянето на новите полипептиди чрез липозо-
ми може да има особени предимства, тъй като
липозомата може да се интернализира от фа-
гоцитиращите клетки в лекуваното животно.
Такива клетки след разграждане на липозом-
ната мембрана представят полипептидите на
имунната система във връзка с други молеку-
ли, необходими да предизвикат силен имунен
отговор.

Всеки от новите полипептиди RetL на то-
ва изобретение може да се използва под фор-
мата на фармацевтично приемлива сол. Под-
ходящите киселини и бази, които могат да об-
разуват соли с полипептидите на настоящото
изобретение са добре познати на специалисти-
те от областта на техниката и включват неор-
ганични и органични киселини и бази.

Макар че за яснота и разбиране пред-
ставеното по-горе изобретение беше описано
подробно чрез илюстрации и примери, за спе-
циалистите от областта на техниката е очевид-
но, че в рамките на изобретението, което се
ограничава единствено от приложените претен-
ции, могат да се направят някои изменения и
модификации.

СПИСЪК НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТИТЕ

(I) ОБЩА ИНФОРМАЦИЯ:

(i) ЗАЯВИТЕЛ: doherty, jodi

(ii) ЗАГЛАВИЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО: заглавие на патентната заявка на Biogen

(iii) БРОЙ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТИТЕ: 21

(iv) АДРЕС ЗА КОРЕСПОНДЕНЦИЯ:

(A) АДРЕСАТ: Biogen, Inc.

(B) УЛИЦА: 14 Cambridge Center

(C) ГРАД: Cambridge

(D) ЩАТ: МА

(E) ДЪРЖАВА: USA

(F) КОД: 02142

(iv) ФОРМА ЗА КОМПЮТЪРНО ЧЕТЕНЕ:

(A) ТИП СРЕДА: Флопи диск

(B) КОМПЮТЪР: IBM PC-съвместим

(C) ОПЕРАЦИОННА СИСТЕМА: PC-DOS/MS-DOS

(D) ПРОГРАМЕН ПРОДУКТ: PatentIn Release #1.0, Версия #1.30

(vi) ДАННИ ЗА НАСТОЯЩАТА ЗАЯВКА:

(A) НОМЕР НА ЗАЯВКАТА:

(B) ДАТА НА ПОДАВАНЕ: 07 май 1997

(C) КЛАСИФИКАЦИЯ:

(vii) ДАННИ ЗА ПРИОРИТЕТНИ ЗАЯВКИ:

(A) НОМЕР НА ЗАЯВКАТА: US 08/999 999

(B) ДАТА НА ПОДАВАНЕ: 01 януари 1996

(viii) ИНФОРМАЦИЯ ЗА ПЪЛНОМОЩНИКА/АГЕНТА:

(A) ИМЕ: Levine, Leslie M.

(B) РЕГИСТРАЦИОНЕН НОМЕР: 35 245

(C) НОМЕР НА УКАЗАТЕЛЯ/РЕГИСТЪРА:

(xi) ИНФОРМАЦИЯ ЗА ТЕЛЕКОМУНИКАЦИЯ

(A) ТЕЛЕФОН: 617-679-2400

(B) ТЕЛФАКС: 617-679-2838

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:1:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

(A) ДЪЛЖИНА: 3616 базози двойки

(B) ТИП: нуклеинова киселина

(C) ВЕРИЖНОСТ: двойноверижна

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(ii) МОЛЕКУЛЕН ТИП: кДНК

(iii) ХИПОТЕТИЧНА: НЕ

(iv) АНТИСЕНС: НЕ

(ix) ОСОБЕНОСТ:

(A) ИМЕ/КЛЮЧ: CDS

(B) ЛОКАЛИЗАЦИЯ: 257..1660

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO: 1:

GCGGCCGCAG GTTGGGTCGG AACTGAACCC CTGAAAGCGG GTCCGCCTCC CGCCCTCGCG	60
CCCGCCCCGA TCTGAGTCGC TGGCGGCGGT GGGCGGACG GCGACGGGGA GTCTGCTCTC	120
ACCCTGGATG GAGCTGAACT TTGAGTGGCC AGAGGAGCGC AGTCGCCCCG GGATCGCTGC	180
ACGCTGAGCT CTCTCCCCGA GACCGGGCGG CGGCTTTGGA TTTTGGGGGG GCGGGGACCA	240
GCTGCGCGGC GGCACC ATG TTC CTA GCC ACT CTG TAC TTC GCG CTG CCA	299
Met Phe Leu Ala Thr Leu Tyr Phe Ala Leu Pro	
1 5 10	
CTC CTG GAT TTG CTG ATG TCC GCC GAG GTG AGT GGT GGA GAC CGT CTG	337
Leu Leu Asp Leu Leu Met Ser Ala Glu Val Ser Gly Gly Asp Arg Leu	
15 20 25	
GAC TGT GTG AAA GCC AGC GAT CAG TGC CTG AAG GAA CAG AGC TGC AGC	385
Asp Cys Val Lys Ala Ser Asp Gln Cys Leu Lys Glu Gln Ser Cys Ser	
30 35 40	
ACC AAG TAC CGC ACA CTA AGG CAG TGC GTG GCG GGC AAG GAA ACC AAC	433
Thr Lys Tyr Arg Thr Leu Arg Gln Cys Val Ala Gly Lys Glu Thr Asn	
45 50 55	
TTC AGC CTG ACA TCC GGC CTT GAG GCC AAG GAT GAG TGC CGT AGC GCC	481
Phe Ser Leu Thr Ser Gly Leu Glu Ala Lys Asp Glu Cys Arg Ser Ala	
60 65 70 75	
ATG GAG GCC TTG AAG CAG AAG TCT CTG TAC AAC TGC CGC TGC AAG CGG	529
Met Glu Ala Leu Lys Gln Lys Ser Leu Tyr Asn Cys Arg Cys Lys Arg	
80 85 90	
GGC ATG AAG AAA GAG AAG AAT TGT CTG CGT ATC TAC TGG AGC ATG TAC	577
Gly Met Lys Lys Glu Lys Asn Cys Leu Arg Ile Tyr Trp Ser Met Tyr	
95 100 105	
CAG AGC CTG CAG GGA AAT GAC CTC CTG GAA GAT TCC CCG TAT GAG CCG	625
Gln Ser Leu Gln Gly Asn Asp Leu Leu Glu Asp Ser Pro Tyr Glu Pro	
110 115 120	
GTT AAC AGC AGG TTG TCA GAT ATA TTC CGG GCA GTC CCG TTC ATA TCA	673
Val Asn Ser Arg Leu Ser Asp Ile Phe Arg Ala Val Pro Phe Ile Ser	
125 130 135	

GAT GTT TTC CAG CAA GTG GAA CAC ATT TCC AAA GGG AAC AAC TGC CTG Asp Val Phe Gln Gln Val Glu His Ile Ser Lys Gly Asn Asn Cys Leu 140 145 150 155	721
GAC GCA GCC AAG GCC TGC AAC CTG GAC GAC ACC TGT AAG AAG TAC AGG Asp Ala Ala Lys Ala Cys Asn Leu Asp Asp Thr Cys Lys Lys Tyr Arg 160 165 170	769
TCG GCC TAC ATC ACC CCC TGC ACC ACC AGC ATG TCC AAC GAG GTC TGC Ser Ala Tyr Ile Thr Pro Cys Thr Ser Met Ser Asn Glu Val Cys 175 180 185	817
AAC CGC CGT AAG TGC CAC AAG GCC CTC AGG CAG TTC TTC GAC AAG GTT Asn Arg Arg Lys Cys His Lys Ala Leu Arg Gln Phe Phe Asp Lys Val 190 195 200	865
CCG GCC AAG CAC AGC TAC GGG ATG CTC TTC TGC TCC TGC CGG GAC ATC Pro Ala Lys His Ser Tyr Gly Met Leu Phe Cys Ser Cys Arg Asp Ile 205 210 215	913
GCC TGC ACC GAG CGG CGG CGA CAG ACT ATC GTC CCC GTG TGC TCC TAT Ala Cys Thr Glu Arg Arg Arg Gln Thr Ile Val Pro Val Cys Ser Tyr 220 225 230 235	961
GAA GAA CGA GAG AGG CCC AAC TGC CTG AGT CTG CAA GAC TCC TGC AAG Glu Glu Arg Glu Arg Pro Asn Cys Leu Ser Leu Gln Asp Ser Cys Lys 240 245 250	1009
ACC AAT TAC ATC TGC AGA TCT CGC CTT GCA GAT TTT TTT ACC AAC TGC Thr Asn Tyr Ile Cys Arg Ser Arg Leu Ala Asp Phe Phe Thr Asn Cys 255 260 265	1057
CAG CCA GAG TCA AGG TCT GTC AGC AAC TGT CTT AAG GAG AAC TAC GCA Gln Pro Glu Ser Arg Ser Val Ser Asn Cys Leu Lys Glu Asn Tyr Ala 270 275 280	1105
GAC TGC CTC CTG GCC TAC TCG GGA CTG ATT GGC ACA GTC ATG ACT CCC Asp Cys Leu Leu Ala Tyr Ser Gly Leu Ile Gly Thr Val Met Thr Pro 285 290 295	1153
AAC TAC GTA GAC TCC ACC AGC CTC AGC GTG GCA CCA TGG TGT GAC TGC Asn Tyr Val Asp Ser Ser Ser Leu Ser Val Ala Pro Trp Cys Asp Cys 300 305 310 315	1201
AGC AAC AGC GGC AAT GAC CTG GAA GAC TGC TTG AAA TTT CTG AAT TTT Ser Asn Ser Gly Asn Asp Leu Glu Asp Cys Leu Lys Phe Leu Asn Phe 320 325 330	1249
TTT AAG GAC AAT ACT TGT CTC AAA AAT GCA ATT CAA GCC TTT GGC AAT Phe Lys Asp Asn Thr Cys Leu Lys Asn Ala Ile Gln Ala Phe Gly Asn 335 340 345	1297
GGC TCA GAT GTG ACC ATG TGG CAG CCA GCC CCT CCA GTC CAG ACC ACC Gly Ser Asp Val Thr Met Trp Gln Pro Ala Pro Pro Val Gln Thr Thr 350 355 360	1345

ACT GCC ACC ACT ACC ACT GCC TTC CGG GTC AAG AAC AAG CCT CTG GGG Thr Ala Thr Thr Thr Thr Ala Phe Arg Val Lys Asn Lys Pro Leu Gly 365 370 375	1393
CCA GCA GGG TCT GAG AAT GAG ATC CCC ACA CAC GTT TTA CCA CCC TGT Pro Ala Gly Ser Glu Asn Glu Ile Pro Thr His Val Leu Pro Pro Cys 380 385 390 395	1441
GCG AAT TTG CAG GCT CAG AAG CTG AAA TCC AAT GTG TCG GGT AGC ACA Ala Asn Leu Gln Ala Gln Lys Leu Lys Ser Asn Val Ser Gly Ser Thr 400 405 410	1489
CAC CTC TCT CTT TCT GAT AGT GAT TTC GGA AAG GAT GGT CTC GCT GGT His Leu Cys Leu Ser Asp Ser Asp Phe Gly Lys Asp Gly Leu Ala Gly 415 420 425	1537
GCC TCC AGC CAC ATA ACC ACA AAA TCA ATG GCT GCT CCT CCC AGC TGC Ala Ser Ser His Ile Thr Thr Lys Ser Met Ala Ala Pro Pro Ser Cys 430 435 440	1585
AGT CTG AGC TCA CTG CCG GTG CTG ATG CTC ACC GCC CTT GCT GCC CTG Ser Leu Ser Ser Leu Pro Val Leu Met Leu Thr Ala Leu Ala Ala Leu 445 450 455	1633
TTA TCT GTA TCG TTG GCA GAA ACG TCG TAGCTGCATC CGGGAAAACA Leu Ser Val Ser Leu Ala Glu Thr Ser 460 465	1680
GTATGAAAAG ACAAAGAGA ACCAAGTATT CTGTCCCTGT CCTCTTGAT ATCTGAAAT	1740
CCAGTTTTAA AAGCTCCGT GAGAAGCAGT TTCACCCAAC TGGAACCTCT TCCTTGTTTT	1800
TAAGAAAGCT TGTGGCCCTC AGGGGCTTCT GTTGAAGAAC TGCTACAGGG CTAATTCCAA	1860
ACCCATAAGG CTCTGGGGCG TGGTGC GGCT TAAGGGGACC ATTTGCACCA TGTAAGCAA	1920
GCTGGGCTTA TCATGTGTTT GATGGTGAGG ATGGTAGTGG TGATGATGAT GGTAATTTTA	1980
ACAGCTTGAA CCCTGTTCTC TCTACTGGTT AGGAACAGGA GATACTATTG ATAAAGATTG	2040
TTCCATGTCT TACTCAGCAG CATTGCCTTC TGAAGACAGG CCCGCAGCCT AGTGTGAATG	2100
ACAAGTGGAG GTTGGCCTCA AGAGTGGACT TGGCAGACTC TACCTGTAG TAATGTTTAC	2160
CTTTCCGTGT ATGGTCTCCA CAGAGTGTTT ATGTATTTAC AGACTGTTCT GTGATCCCCC	2220
AACAACAACA ACCACAAATT CCTTGGTCAC CTCCAAATGT AACC GGTCCT TTAGCCCACT	2280
AGAGGAGGGT GGGTGTGGCC CTGGCACAGC TCCCGGATTG TTGATGGGCA CTCTCCTGAG	2340
CTTTGCTTGA GTGAGAAGCT GAATGTAGCT GAAATCAAC TCTTCTTACA CTTCTTACTG	2400
CTTCGTTTAC TTACGAGGTC ACATATAGAA CAAACATCAC CAACTATTAG CTTACCGTTA	2460

GCTTCCCAAC TATTAGCTTT CTATGTTTGT AAAGCAGTGT TGCTGACCCC ATGTTTAAAT 2520
 GATGGTTTAA TACATGCAGC CCTTTCCTCT CATCGGTAAC ACTAGCTCCA ACATCAACTT 2580
 CATGCATGTG GCTCTCAAAA GCAGGCCCCA AGAAGCCCAG TTCTTTAGGA GAAAGCTGCG 2640
 TCCTGTTTCT GTGGACAGGC AGGAGGAAAC AGAGCAGCCT GCCCGTGGTG TCTTTATCTG 2700
 TTTTGAAATC AAGGCTGCCT GTGTGTAAGG AATGGTTCAA TTCTTATAAA GGGTGCCACT 2760
 GTTGATGCCA CAACTGGCAG TTGGTCTAGC TCCAGGACAC CGGTTTCCAT GTTGCCTGGC 2820
 AGAGACAGCT TTGATTGGGA CTGGCTGGCC ACAAGGGATG GGATGAAGAT GTGCTGCCCT 2880
 CTCTTTCAAA GTTGAGCCCT GCCAGGGCAC ATAGAAGCAT CTTTGCTCCT GACCACAACG 2940
 TAGAACAGCT TGGATTCAAG GTCATCAAGC GTCTCCTGTA CATTGCTCTG TGACCTTCAT 3000
 AACAGACTGT CCCGCACAAA AGGAACGGCA GTTTATGGAT CTAGAGTGGG AGCACAGGGT 3060
 CTGGAAGGT GAACCGATTG GCAAAATACA CAGAACAGGA GGGAGAGTCT CAAGCCGAGA 3120
 CATCTTGCTT ACTAGCCACA CACCATCTCC TGGAGCCCTC CTCTGACCT GGGCAGACCC 3180
 TTAGGTGTAT ATCTAAAGAC CTCTCAATG TTCAGGTTCA GAATCTGTAA ATGGTTCCGT 3240
 CCTGGCACCC ATTCTGAAA ACTGAACAAA GGAGAGGATA TCTTCTCTCC ATTGAGCCCT 3300
 GAAAGTATGA CTGGCTTCTC ACCCTCCCAC AGAGCAGGGA GCCCTGGTGC ACACAGTCTC 3360
 CTGATATCCT CCTGCTCTT TGAGGTTTGC CTGAGGAGAA AATG/ TTCAC CTCGGGAGGG 3420
 GACGCTTTGG TGTCTGAAGT ACGTTTATAT CGAAATGTTA ATGAATACCC ATGTAAAATA 3480
 CTCATAGCC ACCTTTCTTC CCTTCACAAT GTTTTCGAGG GGAATGCATC CAACATCCAA 3540
 GTGTACCTGG TCAGTGGGAA GTTCCATGAA GACTCATACA TTGAATAAAC ATATTGATG 3600
 TGCCGAAAGC GGGCGC 3616

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:2:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 468 аминокиселини
 (B) ТИП: аминокиселина
 (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(ii) МОЛЕКУЛЕН ТИП: белтък

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO: 2:

Met Phe Leu Ala Thr Leu Tyr Phe Ala Leu Pro Leu Leu Asp Leu Leu
 1 5 10 15

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

Ser Ser Leu Ser Val Ala Pro Trp Cys Asp Cys Ser Asn Ser Gly Asn
 305 310 315 320
 Asp Leu Glu Asp Cys Leu Lys Phe Leu Asn Phe Phe Lys Asp Asn Thr
 325 330 335
 Cys Leu Lys Asn Ala Ile Gln Ala Phe Gly Asn Gly Ser Asp Val Thr
 340 345 350
 Met Trp Gln Pro Ala Pro Pro Val Gln Thr Thr Thr Ala Thr Thr Thr
 355 360 365
 Thr Ala Phe Arg Val Lys Asn Lys Pro Leu Gly Pro Ala Gly Ser Glu
 370 375 380
 Asn Glu Ile Pro Thr His Val Leu Pro Pro Cys Ala Asn Leu Gln Ala
 385 390 395 400
 Gln Lys Leu Lys Ser Asn Val Ser Gly Ser Thr His Leu Cys Leu Ser
 405 410 415
 Asp Ser Asp Phe Gly Lys Asp Gly Leu Ala Gly Ala Ser Ser His Ile
 420 425 430
 Thr Thr Lys Ser Met Ala Ala Pro Pro Ser Cys Ser Leu Ser Ser Leu
 435 440 445
 Pro Val Leu Met Leu Thr Ala Leu Ala Ala Leu Leu Ser Val Ser Leu
 450 455 460
 Ala Glu Thr Ser
 465

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:3:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 39 базови двойки
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(ii) МОЛЕКУЛЕН ТИП: кДНК

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO: 3:

AAGGAAAAAA GCGGCCGCCA TGGCGAAGGC GACGTCCGG

39

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:4:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 39 базови двойки
- (B) ТИП: нуклеинова киселина

- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(ii) МОЛЕКУЛЕН ТИП: кДНК

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO: 4:

AGTTTTGTCTG ACCGTGCGGC ACAGCTCGTC GCA

33

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:5:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 33 базови двойки
(B) ТИП: нуклеинова киселина
(C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(ii) МОЛЕКУЛЕН ТИП: кДНК

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO: 5:

AGTTTTGTCTG ACCGTGCGGC ACAGCGCATC ACA

33

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:6:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 1926 базови двойки
(B) ТИП: нуклеинова киселина
(C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(ii) МОЛЕКУЛЕН ТИП: кДНК

(ix) ОСОБЕНОСТ:

- (A) ИМЕ/КЛЮЧ: CDS
(B) ЛОКАЛИЗАЦИЯ: 10..1920

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO: 6:

GCGGCCGCC ATG GCG AAG GCG ACG TCC GGC GCC GCA GGG CTG GGG CTG
Met Ala Lys Ala Thr Ser Gly Ala Ala Gly Leu Gly Leu
470 475 480

48

AAG CTG TTT TTG CTG CTG CCG CTA CTG GGA GAA GCC CCG CTG GGT CTC
Lys Leu Phe Leu Leu Leu Pro Leu Leu Gly Glu Ala Pro Leu Gly Leu
485 490 495

96

TAC TTC TCA AGG GAT GCT TAC TGG GAG AGG CTG TAT GTG GAC CAG CCA Tyr Phe Ser Arg Asp Ala Tyr Trp Glu Arg Leu Tyr Val Asp Gln Pro 500 505 510	144
GCT GGC ACA CCT CTG CTC TAT GTC CAT GCC CTA CGG GAT GCC CCT GGA Ala Gly Thr Pro Leu Leu Tyr Val His Ala Leu Arg Asp Ala Pro Gly 515 520 525	192
GAA GTG CCC AGC TTC CGC CTG GGC CAG TAT CTC TAT GGC GTC TAC CGC Glu Val Pro Ser Phe Arg Leu Gly Gln Tyr Leu Tyr Gly Val Tyr Arg 530 535 540 545	240
ACG CGT CTG CAT GAG AAT GAC TGG ATC CAC ATC GAT GCG GGC ACT GGC Thr Arg Leu His Glu Asn Asp Trp Ile His Ile Asp Ala Gly Thr Gly 550 555 560	288
CTC CTC TAC CTC AAT CAG AGC CTG GAC CAT AGT TCC TGG GAG CAG CTC Leu Leu Tyr Leu Asn Gln Ser Leu Asp His Ser Ser Trp Glu Gln Leu 565 570 575	336
AGC ATC CGA AAT GGC GGC TTC CCC TTG CTC ACC GTC TTC CTC CAG GTC Ser Ile Arg Asn Gly Gly Phe Pro Leu Leu Thr Val Phe Leu Gln Val 580 585 590	384
TTC CTG GGG TCC ACA GCC CAG AGA GAG GGA GAG TGT CAT TGG CCA GGC Phe Leu Gly Ser Thr Ala Gln Arg Glu Gly Glu Cys His Trp Pro Gly 595 600 605	432
TGT GCC CGT GTG TAC TTC TCC TTC ATC AAC GAC ACC TTC CCA AAT TGT Cys Ala Arg Val Tyr Phe Ser Phe Ile Asn Asp Thr Phe Pro Asn Cys 610 615 620 625	480
AGC TCC TTC AAA GCC CGG GAT CTC TGC ACC CCA GAG ACG GGT GTG TCC Ser Ser Phe Lys Ala Arg Asp Leu Cys Thr Pro Glu Thr Gly Val Ser 630 635 640	528
TTC CGC ATC AGG GAG AAC AGG CCC CCT GGC ACC TTC TAC CAG TTC CGC Phe Arg Ile Arg Glu Asn Arg Pro Pro Gly Thr Phe Tyr Gln Phe Arg 645 650 655	576
ATG CTA CCT GTG CAG TTC CTT TGT CCT AAC ATC AGT GTG AAG TAC AAA Met Leu Pro Val Gln Phe Leu Cys Pro Asn Ile Ser Val Lys Tyr Lys 660 665 670	624
CTC TTA GAA GGG GAC GGT CTG CCC TTC CGT TGT GAC CCC GAC TGT CTG Leu Leu Glu Gly Asp Gly Leu Pro Phe Arg Cys Asp Pro Asp Cys Leu 675 680 685	672
GAG GTG AGC ACG CGG TGG GCA CTG GAT CGG GAG CTT CAG GAG AAG TAT Glu Val Ser Thr Arg Trp Ala Leu Asp Arg Glu Leu Gln Glu Lys Tyr 690 695 700 705	720
GTG CTG GAG GCT GAG TGC GCA GTG GCA GGC CCT GGA GCC AAC AAG GAG Val Leu Glu Ala Glu Cys Ala Val Ala Gly Pro Gly Ala Asn Lys Glu 710 715 720	768

AAG GTG GCC GTG TCC TTC CCG GTG ACG GTG TAT GAT GAA GAC GAC TCC Lys Val Ala Val Ser Phe Pro Val Thr Val Tyr Asp Glu Asp Asp Ser 725 730 735	816
CCG CCC ACC TTC TCC GGA GGT GTG GGC ACC GCC AGT GCT GTG GTG GAG Pro Pro Thr Phe Ser Gly Gly Val Gly Thr Ala Ser Ala Val Val Glu 740 745 750	864
TTT AAG CGG AAG GAG GGC ACT GTG GTA GCC ACT CTG CAG GTG TTT GAT Phe Lys Arg Lys Glu Gly Thr Val Val Ala Thr Leu Gln Val Phe Asp 755 760 765	912
GCA GAT GTG GTG CCA GCA TCT GGG GAG CTG GTG AGG CGG TAC ACA AGC Ala Asp Val Val Pro Ala Ser Gly Glu Leu Val Arg Arg Tyr Thr Ser 770 775 780 785	960
ACA CTA CTC TCA GGG GAT TCC TGG GCC CAG CAG ACC TTC CGG GTG GAG Thr Leu Leu Ser Gly Asp Ser Trp Ala Gln Gln Thr Phe Arg Val Glu 790 795 800	1008
CAC ACA CCC AAC GAG ACC TTG GTC CAG TCC AAC AAC AAC TCC GTG CGG His Thr Pro Asn Glu Thr Leu Val Gln Ser Asn Asn Asn Ser Val Arg 805 810 815	1056
GCA ACC ATG CAC AAT TAC AAG CTG GTT CTC AAC AGG AGC CTG TCC ATC Ala Thr Met His Asn Tyr Lys Leu Val Leu Asn Arg Ser Leu Ser Ile 820 825 830	1104
TCA GAG AGC CGA GTC CTG CAG CTA GTA GTC CTG GTC AAT GAC TCA GAC Ser Glu Ser Arg Val Leu Gln Leu Val Val Leu Val Asn Asp Ser Asp 835 840 845	1152
TTC CAG GGG CCT GGG TCA GGT GTT CTC TTC CTC CAT TTC AAC GTG TCT Phe Gln Gly Pro Gly Ser Gly Val Leu Phe Leu His Phe Asn Val Ser 850 855 860 865	1200
GTG CTG CCT GTC ACC CTG AAC CTA CCC ATG GCC TAC TCC TTC CCA GTG Val Leu Pro Val Thr Leu Asn Leu Pro Met Ala Tyr Ser Phe Pro Val 870 875 880	1248
AAT AGG AGA GCC CGC CGT TAT GCC CAG ATT GGG AAA GTT TGC GTG GAG Asn Arg Arg Ala Arg Arg Tyr Ala Gln Ile Gly Lys Val Cys Val Glu 885 890 895	1296
AAC TGC CAG GAG TTC AGC GGT GTC TCC ATC CAG TAC AAG CTG CAG CCC Asn Cys Gln Glu Phe Ser Gly Val Ser Ile Gln Tyr Lys Leu Gln Pro 900 905 910	1344
TCC AGC ACC AAC TGC AGT GCC CTA GGT GTG GTC ACC TCA ACA GAA GAC Ser Ser Thr Asn Cys Ser Ala Leu Gly Val Val Thr Ser Thr Glu Asp 915 920 925	1392

ACC TCA GGG ACC CTA TAT GTA AAT GAC ACG GAG GCC CTG CGG CGA CCT Thr Ser Gly Thr Leu Tyr Val Asn Asp Thr Glu Ala Leu Arg Arg Pro 930 935 940 945	1440
GAG TGT ACC GAG CTT CAG TAC ACA GTG GTA GCC ACT GAC CGG CAG ACC Glu Cys Thr Glu Leu Gln Tyr Thr Val Val Ala Thr Asp Arg Gln Thr 950 955 960	1488
CGC AGG CAG ACC CAA GCT TCG TTA GTC GTC ACA GTG GAG GGG ACA TAC Arg Arg Gln Thr Gln Ala Ser Leu Val Val Thr Val Glu Gly Thr Tyr 965 970 975	1536
ATT GCA GAA GAA GTG GGC TGC CCC AAG TCC TGT GCA GTA AAC AAG AGG Ile Ala Glu Glu Val Gly Cys Pro Lys Ser Cys Ala Val Asn Lys Arg 980 985 990	1584
CGA CCT GAG TGT GAG GAG TGT GGT GGC CTG GGT TCT CCA ACT GGC AGA Arg Pro Glu Cys Glu Glu Cys Gly Gly Leu Gly Ser Pro Thr Gly Arg 995 1000 1005	1632
TGT GAG TGG CGT CAG GGA GAT GGT AAA GGG ATC ACC AGG AAC TTC TCC Cys Glu Trp Arg Gln Gly Asp Gly Lys Gly Ile Thr Arg Asn Phe Ser 1010 1015 1020 1025	1680
ACC TGT TCT CCT AGC ACC AGG ACC TGT CCT GAT GGC CAC TGT GAT GCT Thr Cys Ser Pro Ser Thr Arg Thr Cys Pro Asp Gly His Cys Asp Ala 1030 1035 1040	1728
CTG GAG AGC CGG GAT ATC AAC ATT TGC CCC CAG GAC TGT CTC CGT GGC Leu Glu Ser Arg Asp Ile Asn Ile Cys Pro Gln Asp Cys Leu Arg Gly 1045 1050 1055	1776
CCC ATT GTT GGC GGG CAT GAG CGA GGG GAG CGC CAG GGG ATT AAA GCC Pro Ile Val Gly Gly His Glu Arg Gly Glu Arg Gln Gly Ile Lys Ala 1060 1065 1070	1824
GGC TAT GGC ATC TGC AAC TGT TTC CCT GAT GAG AAG AAG TGC TTC TGC Gly Tyr Gly Ile Cys Asn Cys Phe Pro Asp Glu Lys Lys Cys Phe Cys 1075 1080 1085	1872
GAG CCA GAG GAC AGC CAG GGC CCA TTG TGT GAT GCG CTG TGC CGC ACG Glu Pro Glu Asp Ser Gln Gly Pro Leu Cys Asp Ala Leu Cys Arg Thr 1090 1095 1100 1105	1920
GTCGAC	1926

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:7:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 637 аминокиселини
- (B) ТИП: аминокиселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(ii) МОЛЕКУЛЕН ТИП: белтък

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO: 7:

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

Phe Ser Gly Gly Val Gly Thr Ala Ser Ala Val Val Glu Phe Lys Arg
 275 280 285
 Lys Glu Gly Thr Val Val Ala Thr Leu Gln Val Phe Asp Ala Asp Val
 290 295 300
 Val Pro Ala Ser Gly Glu Leu Val Arg Arg Tyr Thr Ser Thr Leu Leu
 305 310 315 320
 Ser Gly Asp Ser Trp Ala Gln Gln Thr Phe Arg Val Glu His Thr Pro
 325 330 335
 Asn Glu Thr Leu Val Gln Ser Asn Asn Asn Ser Val Arg Ala Thr Met
 340 345 350
 His Asn Tyr Lys Leu Val Leu Asn Arg Ser Leu Ser Ile Ser Glu Ser
 355 360 365
 Arg Val Leu Gln Leu Val Val Leu Val Asn Asp Ser Asp Phe Gln Gly
 370 375 380
 Pro Gly Ser Gly Val Leu Phe Leu His Phe Asn Val Ser Val Leu Pro
 385 390 395 400
 Val Thr Leu Asn Leu Pro Met Ala Tyr Ser Phe Pro Val Asn Arg Arg
 405 410 415
 Ala Arg Arg Tyr Ala Gln Ile Gly Lys Val Cys Val Glu Asn Cys Gln
 420 425 430
 Glu Phe Ser Gly Val Ser Ile Gln Tyr Lys Leu Gln Pro Ser Ser Thr
 435 440 445
 Asn Cys Ser Ala Leu Gly Val Val Thr Ser Thr Glu Asp Thr Ser Gly
 450 455 460
 Thr Leu Tyr Val Asn Asp Thr Glu Ala Leu Arg Arg Pro Glu Cys Thr
 465 470 475 480
 Glu Leu Gln Tyr Thr Val Val Ala Thr Asp Arg Gln Thr Arg Arg Gln
 485 490 495
 Thr Gln Ala Ser Leu Val Val Thr Val Glu Gly Thr Tyr Ile Ala Glu
 500 505 510
 Glu Val Gly Cys Pro Lys Ser Cys Ala Val Asn Lys Arg Arg Pro Glu
 515 520 525
 Cys Glu Glu Cys Gly Gly Leu Gly Ser Pro Thr Gly Arg Cys Glu Trp
 530 535 540
 Arg Gln Gly Asp Gly Lys Gly Ile Thr Arg Asn Phe Ser Thr Cys Ser
 545 550 555 560

Pro Ser Thr Arg Thr Cys Pro Asp Gly His Cys Asp Ala Leu Glu Ser
565 570 575

Arg Asp Ile Asn Ile Cys Pro Gln Asp Cys Leu Arg Gly Pro Ile Val
580 585 590

Gly Gly His Glu Arg Gly Glu Arg Gln Gly Ile Lys Ala Gly Tyr Gly
595 600 605

Ile Cys Asn Cys Phe Pro Asp Glu Lys Lys Cys Phe Cys Glu Pro Glu
610 615 620

Asp Ser Gln Gly Pro Leu Cys Asp Ala Leu Cys Arg Thr
625 630 635

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:8:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 1223 базови двойки
(B) ТИП: нуклеинова киселина
(C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(ii) МОЛЕКУЛЕН ТИП: кДНК

(ix) ОСОБЕНОСТ:

- (A) ИМЕ/КЛЮЧ: CDS
(B) ЛОКАЛИЗАЦИЯ: 1..1038

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO: 8:

CTG CTG GAG GAT TCC CCA TAT GAA CCA GTT AAC AGC AGA TTG TCA GAT	48
Leu Leu Glu Asp Ser Pro Tyr Glu Pro Val Asn Ser Arg Leu Ser Asp	
640 645 650	
ATA TTC CGG GTG GTC CCA TTC ATA TCA GTG GAG CAC ATT CCC AAA GGG	96
Ile Phe Arg Val Val Pro Phe Ile Ser Val Glu His Ile Pro Lys Gly	
655 660 665	
AAC AAC TGC CTG GAT GCA GCG AAG GCC TGC AAC CTC GAC GAC ATT TGC	144
Asn Asn Cys Leu Asp Ala Ala Lys Ala Cys Asn Leu Asp Asp Ile Cys	
670 675 680 685	
AAG AAG TAC AGG TCG GCG TAC ATC ACC CCG TGC ACC ACC AGC GTG TCC	192
Lys Lys Tyr Arg Ser Ala Tyr Ile Thr Pro Cys Thr Thr Ser Val Ser	
690 695 700	
AAC GAT GTC TGC AAC CGC CGC AAG TGC CAC AAG GCC CTC CGG CAG TTC	240
Asn Asp Val Cys Asn Arg Arg Lys Cys His Lys Ala Leu Arg Gln Phe	
705 710 715	

TTT GAC AAG GTC CCG GCC AAG CAC AGC TAC GGA ATG CTC TTC TGC TCC	288
Phe Asp Lys Val Pro Ala Lys His Ser Tyr Gly Met Leu Phe Cys Ser	
720 725 730	
TGC CGG GAC ATC GCC TGC ACA GAG CGG AGG CGA CAG ACC ATC GTG CCT	336
Cys Arg Asp Ile Ala Cys Thr Glu Arg Arg Arg Gln Thr Ile Val Pro	
735 740 745	
GTG TGC TCC TAT GAA GAG AGG GAG AAG CCC AAC TGT TTG AAT TTG CAG	384
Val Cys Ser Tyr Glu Glu Arg Glu Lys Pro Asn Cys Leu Asn Leu Gln	
750 755 760 765	
GAC TCC TGC AAG ACG AAT TAC ATC TGC AGA TCT CGC CTT GCG GAT TTT	432
Asp Ser Cys Lys Thr Asn Tyr Ile Cys Arg Ser Arg Leu Ala Asp Phe	
770 775 780	
TTT ACC AAC TGC CAG CCA GAG TCA AGG TCT GTC AGC AGC TGT CTA AAG	480
Phe Thr Asn Cys Gln Pro Glu Ser Arg Ser Val Ser Ser Cys Leu Lys	
785 790 795	
GAA AAC TAC GCT GAC TGC CTC CTC GCC TAC TCG GGG CTT ATT GGC ACA	528
Glu Asn Tyr Ala Asp Cys Leu Leu Ala Tyr Ser Gly Leu Ile Gly Thr	
800 805 810	
GTC ATG ACC CCC AAC TAC ATA GAC TCC AGT AGC CTC AGT GTG GCC CCA	576
Val Met Thr Pro Asn Tyr Ile Asp Ser Ser Ser Leu Ser Val Ala Pro	
815 820 825	
TGG TGT GAC TGC AGC AAC AGT GGG AAC GAC CTA GAA GAG TGC TTG AAA	624
Trp Cys Asp Cys Ser Asn Ser Gly Asn Asp Leu Glu Glu Cys Leu Lys	
830 835 840 845	
TTT TTG AAT TTC TTC AAG GAC AAT ACA TGT CTT AAA AAT GCA ATT CAA	672
Phe Leu Asn Phe Phe Lys Asp Asn Thr Cys Leu Lys Asn Ala Ile Gln	
850 855 860	
GCC TTT GGC AAT GGC TCC GAT GTG ACC GTG TGG CAG CCA GCC TTC CCA	720
Ala Phe Gly Asn Gly Ser Asp Val Thr Val Trp Gln Pro Ala Phe Pro	
865 870 875	
GTA CAG ACC ACC ACT GCC ACT ACC ACC ACT GCC CTC CGG GTT AAG AAC	768
Val Gln Thr Thr Thr Ala Thr Thr Thr Thr Ala Leu Arg Val Lys Asn	
880 885 890	
AAG CCC CTG GGG CCA GCA GGG TCT GAG AAT GAA ATT CCC ACT CAT GTT	816
Lys Pro Leu Gly Pro Ala Gly Ser Glu Asn Glu Ile Pro Thr His Val	
895 900 905	
TTG CCA CCG TGT GCA AAT TTA CAG GCA CAG AAG CTG AAA TCC AAT GTG	864
Leu Pro Pro Cys Ala Asn Leu Gln Ala Gln Lys Leu Lys Ser Asn Val	
910 915 920 925	
TCG GGC AAT ACA CAC CTC TGT ATT TCC AAT GGT AAT TAT GAA AAA GAA	912
Ser Gly Asn Thr His Leu Cys Ile Ser Asn Gly Asn Tyr Glu Lys Glu	
930 935 940	

GGT CTC GGT GCT TCC AGC CAC ATA ACC ACA AAA TCA ATG GCT GCT CCT 960
 Gly Leu Gly Ala Ser Ser His Ile Thr Thr Lys Ser Met Ala Ala Pro
 945 950 955

CCA AGC TGT GGT CTG AGC CCA CTG CTG GTC CTG GTG GTA ACC GCT CTG 1008
 Pro Ser Cys Gly Leu Ser Pro Leu Leu Val Leu Val Val Thr Ala Leu
 960 965 970

TCC ACC CTA TTA TCT TTA ACA GAA ACA TCA TAGCTGCATT AAAAAATAC 1058
 Ser Thr Leu Leu Ser Leu Thr Glu Thr Ser
 975 980

AATATGGACA TGTA AAAAGA CAAAAACCAA GTTATCTGTT TCCTGTTCTC TTGTATAGCT 1118

GAAATCCAG TTTAGGAGCT CAGTTGAGAA ACAGTTCCAT TCAACTGGAA CATTTTTTTT 1178

TTTTCTTTT AAGAAAGCTT CTTGTGATCC TTCGGGGCTT CTGTG 1223

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:9:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

(A) ДЪЛЖИНА: 346 аминокиселини

(B) ТИП: аминокиселина

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(ii) МОЛЕКУЛЕН ТИП: белтък

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO: 9:

Leu Leu Glu Asp Ser Pro Tyr Glu Pro Val Asn Ser Arg Leu Ser Asp
 1 5 10 15

Ile Phe Arg Val Val Pro Phe Ile Ser Val Glu His Ile Pro Lys Gly
 20 25 30

Asn Asn Cys Leu Asp Ala Ala Lys Ala Cys Asn Leu Asp Asp Ile Cys
 35 40 45

Lys Lys Tyr Arg Ser Ala Tyr Ile Thr Pro Cys Thr Thr Ser Val Ser
 50 55 60

Asn Asp Val Cys Asn Arg Arg Lys Cys His Lys Ala Leu Arg Gln Phe
 65 70 75 80

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

Cys Arg Asp Ile Ala Cys Thr Glu Arg Arg Arg Gln Thr Ile Val Pro
 100 105 110

Val Cys Ser Tyr Glu Glu Arg Glu Lys Pro Asn Cys Leu Asn Leu Gln
 115 120 125

Asp Ser Cys Lys Thr Asn Tyr Ile Cys Arg Ser Arg Leu Ala Asp Phe
 130 135 140
 Phe Thr Asn Cys Gln Pro Glu Ser Arg Ser Val Ser Ser Cys Leu Lys
 145 150 155 160
 Glu Asn Tyr Ala Asp Cys Leu Leu Ala Tyr Ser Gly Leu Ile Gly Thr
 165 170 175
 Val Met Thr Pro Asn Tyr Ile Asp Ser Ser Ser Leu Ser Val Ala Pro
 180 185 190
 Trp Cys Asp Cys Ser Asn Ser Gly Asn Asp Leu Glu Glu Cys Leu Lys
 195 200 205
 Phe Leu Asn Phe Phe Lys Asp Asn Thr Cys Leu Lys Asn Ala Ile Gln
 210 215 220
 Ala Phe Gly Asn Gly Ser Asp Val Thr Val Trp Gln Pro Ala Phe Pro
 225 230 235 240
 Val Gln Thr Thr Thr Ala Thr Thr Thr Thr Ala Leu Arg Val Lys Asn
 245 250 255
 Lys Pro Leu Gly Pro Ala Gly Ser Glu Asn Glu Ile Pro Thr His Val
 260 265 270
 Leu Pro Pro Cys Ala Asn Leu Gln Ala Gln Lys Leu Lys Ser Asn Val
 275 280 285
 Ser Gly Asn Thr His Leu Cys Ile Ser Asn Gly Asn Tyr Glu Lys Glu
 290 295 300
 Gly Leu Gly Ala Ser Ser His Ile Thr Thr Lys Ser Met Ala Ala Pro
 305 310 315 320
 Pro Ser Cys Gly Leu Ser Pro Leu Leu Val Leu Val Val Thr Ala Leu
 325 330 335
 Ser Thr Leu Leu Ser Leu Thr Glu Thr Ser
 340 345

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:10:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 1682 базови двойки
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(ii) МОЛЕКУЛЕН ТИП: кДНК

(ix) ОСОБЕНОСТ:

- (A) ИМЕ/КЛЮЧ: CDS

(B) ЛОКАЛИЗАЦИЯ: 118..1497

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТТА: SEQ ID NO: 10:

GGGCGGCCAG AGCAGCACAG CTGTCCGGGG ATCGCTGCAT GCTGAGCTCC CTCGGCAAGA	60
CCCAGCGGCG GCTCGGGATT TTTTGGGGG GGCGGGGACC AGCCCCGCGC CGGCACC	117
ATG TTC CTG GCG ACC CTG TAC TTC GCG CTG CCG CTC TTG GAC TTG CTC Met Phe Leu Ala Thr Leu Tyr Phe Ala Leu Pro Leu Leu Asp Leu Leu 350 355 360	165
CTG TCG GCC GAA GTG AGC GGC GGA GAC CGC CTG GAT TGC GTG AAA GCC Leu Ser Ala Glu Val Ser Gly Gly Asp Arg Leu Asp Cys Val Lys Ala 365 370 375	213
AGT GAT CAG TGC CTG AAG GAG CAG AGC TGC AGC ACC AAG TAC CAC ACG Ser Asp Gln Cys Leu Lys Glu Gln Ser Cys Ser Thr Lys Tyr Arg Thr 380 385 390	261
CTA AGG CAG TGC GTG GCG GGC AAG GAG ACC AAC TTC AGC CTG GCA TCC Leu Arg Gln Cys Val Ala Gly Lys Glu Thr Asn Phe Ser Leu Ala Ser 395 400 405 410	309
GGC CTG GAG GCC AAG GAT GAG TGC CGC AGC GCC ATG GAG GCC CTG AAG Gly Leu Glu Ala Lys Asp Glu Cys Arg Ser Ala Met Glu Ala Leu Lys 415 420 425	357
CAG AAG TCG CTC TAC AAC TGC CGC TGC AAG CGG GGT ATG AAG AAG GAG Gln Lys Ser Leu Tyr Asn Cys Arg Cys Lys Arg Gly Met Lys Lys Glu 430 435 440	405
AAG AAC TGC CTG CGC ATT TAC TGG AGC ATG TAC CAG AGC CTG CAG GGA Lys Asn Cys Leu Arg Ile Tyr Trp Ser Met Tyr Gln Ser Leu Gln Gly 445 450 455	453
AAT GAT CTG CTG GAG GAT TCC CCA TAT GAA CCA GTT AAC AGC AGA TTG Asn Asp Leu Leu Glu Asp Ser Pro Tyr Glu Pro Val Asn Ser Arg Leu 450 465 470	501
TCA GAT ATA TTC CGG GTG GTC CCA TTC ATA TCA GTG GAG CAC ATT CCC Ser Asp Ile Phe Arg Val Val Pro Phe Ile Ser Val Glu His Ile Pro 475 480 485 490	549
AAA GGG AAC AAC TGC CTG GAT GCA GCG AAG GCC TGC AAC CTC GAC GAC Lys Gly Asn Asn Cys Leu Asp Ala Ala Lys Ala Cys Asn Leu Asp Asp 495 500 505	597
ATT TGC AAG AAG TAC AGG TCG GCG TAC ATC ACC CCG TGC ACC ACC AGC Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser Ala Tyr Ile Thr Pro Cys Thr Thr Ser 510 515 520	645

GTG TCC AAC GAT GTC TGC AAC CGC CGC AAG TGC CAC AAG GCC CTC CGG Val Ser Asn Asp Val Cys Asn Arg Arg Lys Cys His Lys Ala Leu Arg 525 530 535	693
CAG TTC TTT GAC AAG GTC CCG GCC AAG CAC AGC TAC GGA ATG CTC TTC Gln Phe Phe Asp Lys Val Pro Ala Lys His Ser Tyr Gly Met Leu Phe 540 545 550	741
TGC TCC TGC CGG GAC ATC GCC TGC ACA GAG CGG AGG CGA CAG ACC ATC Cys Ser Cys Arg Asp Ile Ala Cys Thr Glu Arg Arg Arg Gln Thr Ile 555 560 565 570	789
GTG CCT GTG TGC TCC TAT GAA GAG AGG GAG AAG CCC AAC TGT TTG AAT Val Pro Val Cys Ser Tyr Glu Glu Arg Glu Lys Pro Asn Cys Leu Asn 575 580 585	837
TTG CAG GAC TCC TGC AAG ACG AAT TAC ATC TGC AGA TCT CGC CTT GCG Leu Gln Asp Ser Cys Lys Thr Asn Tyr Ile Cys Arg Ser Arg Leu Ala 590 595 600	885
GAT TTT TTT ACC AAC TGC CAG CCA GAG TCA AGG TCT GTC AGC AGC TGT Asp Phe Phe Thr Asn Cys Gln Pro Glu Ser Arg Ser Val Ser Ser Cys 605 610 615	933
CTA AAG GAA AAC TAC GCT GAC TGC CTC CTC GCC TAC TCG GGG CTT ATT Leu Lys Glu Asn Tyr Ala Asp Cys Leu Leu Ala Tyr Ser Gly Leu Ile 620 625 630	981
GGC ACA GTC ATG ACC CCC AAC TAC ATA GAC TCC AGT AGC CTC AGT GTG Gly Thr Val Met Thr Pro Asn Tyr Ile Asp Ser Ser Ser Leu Ser Val 635 640 645 650	1029
GCC CCA TGG TGT GAC TGC AGC AAC AGT GGG AAC GAC CTA GAA GAG TGC Ala Pro Trp Cys Asp Cys Ser Asn Ser Gly Asn Asp Leu Glu Glu Cys 655 660 665	1077
TTG AAA TTT TTG AAT TTC TTC AAG GAC AAT ACA TGT CTT AAA AAT GCA Leu Lys Phe Leu Asn Phe Phe Lys Asp Asn Thr Cys Leu Lys Asn Ala 670 675 680	1125
ATT CAA GCC TTT GGC AAT GGC TCC GAT GTG ACC GTG TGG CAG CCA GCC Ile Gln Ala Phe Gly Asn Gly Ser Asp Val Thr Val Trp Gln Pro Ala 685 690 695	1173
TTC CCA GTA CAG ACC ACC ACT GCC ACT ACC ACC ACT GCC CTC CGG GTT Phe Pro Val Gln Thr Thr Thr Ala Thr Thr Thr Thr Ala Leu Arg Val 700 705 710	1221
AAG AAC AAG CCC CTG GGG CCA GCA GGG TCT GAG AAT GAA ATT CCC ACT Lys Asn Lys Pro Leu Gly Pro Ala Gly Ser Glu Asn Glu Ile Pro Thr 715 720 725 730	1269
CAT GTT TTG CCA CCG TGT GCA AAT TTA CAG GCA CAG AAG CTG AAA TCC His Val Leu Pro Pro Cys Ala Asn Leu Gln Ala Gln Lys Leu Lys Ser 735 740 745	1317

AAT GTG TCG GGC AAT ACA CAC CTC TGT ATT TCC AAT GGT AAT TAT GAA Asn Val Ser Gly Asn Thr His Leu Cys Ile Ser Asn Gly Asn Tyr Glu 750 755 760	1365
AAA GAA GGT CTC GGT GCT TCC AGC CAC ATA ACC ACA AAA TCA ATG GCT Lys Glu Gly Leu Gly Ala Ser Ser His Ile Thr Thr Lys Ser Met Ala 765 770 775	1413
GCT CCT CCA AGC TGT GGT CTG AGC CCA CTG CTG GTC CTG GTG GTA ACC Ala Pro Pro Ser Cys Gly Leu Ser Pro Leu Leu Val Leu Val Val Thr 780 785 790	1461
GCT CTG TCC ACC CTA TTA TCT TTA ACA GAA ACA TCA TAGCTGCATT Ala Leu Ser Thr Leu Leu Ser Leu Thr Glu Thr Ser 795 800 805	1507
AAAAAATAC AATATGGACA TGTAAGA CAAAAACCA GTTATCTGTT TCCTGTTCTC	1567
TTGTATAGCT GAAATTCCAG TTTAGGAGCT CAGTTGAGAA ACAGTTCCAT TCAACTGGAA	1627
CATTTTTTTT TTTTCSTTTT AAGAAAGCTT CTTGTGATCC TTCGGGGCTT CTGTG	1682

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:11:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

(A) ДЪЛЖИНА: 460 аминокиселини

(B) ТИП: аминокиселина

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(ii) МОЛЕКУЛЕН ТИП: белтък

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO: 11:

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

Asn Asp Leu Leu Glu Asp Ser Pro Tyr Glu Pro Val Asn Ser Arg Leu
 115 120 125
 Ser Asp Ile Phe Arg Val Val Pro Phe Ile Ser Val Glu His Ile Pro
 130 135 140
 Lys Gly Asn Asn Cys Leu Asp Ala Ala Lys Ala Cys Asn Leu Asp Asp
 145 150 155 160
 Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser Ala Tyr Ile Thr Pro Cys Thr Thr Ser
 165 170 175
 Val Ser Asn Asp Val Cys Asn Arg Arg Lys Cys His Lys Ala Leu Arg
 180 185 190
 Gln Phe Phe Asp Lys Val Pro Ala Lys His Ser Tyr Gly Met Leu Phe
 195 200 205
 Cys Ser Cys Arg Asp Ile Ala Cys Thr Glu Arg Arg Arg Gln Thr Ile
 210 215 220
 Val Pro Val Cys Ser Tyr Glu Glu Arg Glu Lys Pro Asn Cys Leu Asn
 225 230 235 240
 Leu Gln Asp Ser Cys Lys Thr Asn Tyr Ile Cys Arg Ser Arg Leu Ala
 245 250 255
 Asp Phe Phe Thr Asn Cys Gln Pro Glu Ser Arg Ser Val Ser Ser Cys
 260 265 270
 Leu Lys Glu Asn Tyr Ala Asp Cys Leu Leu Ala Tyr Ser Gly Leu Ile
 275 280 285
 Gly Thr Val Met Thr Pro Asn Tyr Ile Asp Ser Ser Ser Leu Ser Val
 290 295 300
 Ala Pro Trp Cys Asp Cys Ser Asn Ser Gly Asn Asp Leu Glu Glu Cys
 305 310 315 320
 Leu Lys Phe Leu Asn Phe Phe Lys Asp Asn Thr Cys Leu Lys Asn Ala
 325 330 335
 Ile Gln Ala Phe Gly Asn Gly Ser Asp Val Thr Val Trp Gln Pro Ala
 340 345 350
 Phe Pro Val Gln Thr Thr Thr Ala Thr Thr Thr Thr Ala Leu Arg Val
 355 360 365
 Lys Asn Lys Pro Leu Gly Pro Ala Gly Ser Glu Asn Glu Ile Pro Thr
 370 375 380
 His Val Leu Pro Pro Cys Ala Asn Leu Gln Ala Gln Lys Leu Lys Ser
 385 390 395 400

Asn Val Ser Gly Asn Thr His Leu Cys Ile Ser Asn Gly Asn Tyr Glu
405 410 415

Lys Glu Gly Leu Gly Ala Ser Ser His Ile Thr Thr Lys Ser Met Ala
420 425 430

Ala Pro Pro Ser Cys Gly Leu Ser Pro Leu Leu Val Leu Val Val Thr
435 440 445

Ala Leu Ser Thr Leu Leu Ser Leu Thr Glu Thr Ser
450 455 460

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:12:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 1888 базови двойки
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(ii) МОЛЕКУЛЕН ТИП: кДНК

(ix) ОСОБЕНОСТ:

- (A) ИМЕ/КЛЮЧ: CDS
- (B) ЛОКАЛИЗАЦИЯ: 25..1416

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO: 12:

AAAAAACGGT GGGATTATT TAAC ATG ATC TTG GCA AAC GTC TTC TGC CTC Met Ile Leu Ala Asn Val Phe Cys Leu 465	51
TTC TTC TTT CTA GAC GAG ACC CTC CGC TCT TTG GCC AGC CCT TCC TCC Phe Phe Phe Leu Asp Glu Thr Leu Arg Ser Leu Ala Ser Pro Ser Ser 470 475 480 485	99
CTG CAG GGC CCC GAG CTC CAC GGC TGG CGC CCC CCA GTG GAC TGT GTC Leu Gln Gly Pro Glu Leu His Gly Trp Arg Pro Pro Val Asp Cys Val 490 495 500	147
CGG GCC AAT GAG CTG TGT GCC GCC GAA TCC AAC TGC AGC TCT CGC TAC Arg Ala Asn Glu Leu Cys Ala Ala Glu Ser Asn Cys Ser Ser Arg Tyr 505 510 515	195
CGC ACT CTG CGG CAG TGC CTG GCA GGC CGC GAC CGC AAC ACC ATG CTG Arg Thr Leu Arg Gln Cys Leu Ala Gly Arg Asp Arg Asn Thr Met Leu 520 525 530	243
GCC AAC AAG GAG TGC CAG GCG GCC TTG GAG GTC TTG CAG GAG AGC CCG Ala Asn Lys Glu Cys Gln Ala Ala Leu Glu Val Leu Gln Glu Ser Pro 535 540 545	291

CTG TAC GAC TGC CGC TGC AAG CGG GGC ATG AAG AAG GAG CTG CAG TGT Leu Tyr Asp Cys Arg Cys Lys Arg Gly Met Lys Lys Glu Leu Gln Cys 550 555 560 565	339
CTG CAG ATC TAC TGG AGC ATC CAC CTG GGG CTG ACC GAG GGT GAG GAG Leu Gln Ile Tyr Trp Ser Ile His Leu Gly Leu Thr Glu Gly Glu Glu 570 575 580	387
TTC TAC GAA GCC TCC CCC TAT GAG CCG GTG ACC TCC CGC CTC TCG GAC Phe Tyr Glu Ala Ser Pro Tyr Glu Pro Val Thr Ser Arg Leu Ser Asp 585 590 595	435
ATC TTC AGG CTT GCT TCA ATC TTC TCA GGG ACA GGG GCA GAC CCG GTG Ile Phe Arg Leu Ala Ser Ile Phe Ser Gly Thr Gly Ala Asp Pro Val 600 605 610	483
GTC AGC GCC AAG AGC AAC CAT TGC CTG GAT GCT GCC AAG GCC TGC AAC Val Ser Ala Lys Ser Asn His Cys Leu Asp Ala Ala Lys Ala Cys Asn 615 620 625	531
CTG AAT GAC AAC TGC AAG AAG CTG CGC TCC TCC TAC ATC TCC ATC TGC Leu Asn Asp Asn Cys Lys Lys Leu Arg Ser Ser Tyr Ile Ser Ile Cys 630 635 640 645	579
AAC CGC GAG ATC TCG CCC ACC GAG CGC TGC AAC CGC CGC AAG TGC CAC Asn Arg Glu Ile Ser Pro Thr Glu Arg Cys Asn Arg Arg Lys Cys His 650 655 660	627
AAG GCC CTG CGC CAG TTC TTC GAC CGG GTG CCC AGC GAG TAC ACC TAC Lys Ala Leu Arg Gln Phe Phe Asp Arg Val Pro Ser Glu Tyr Thr Tyr 665 670 675	675
CGC ATG CTC TTC TGC TCC TGC CAA GAC CAG GCG TGC GCT GAG CGC CGC Arg Met Leu Phe Cys Ser Cys Gln Asp Gln Ala Cys Ala Glu Arg Arg 680 685 690	723
CGG CAA ACC ATC CTG CCC AGC TGC TCC TAT GAG GAC AAG GAG AAG CCC Arg Gln Thr Ile Leu Pro Ser Cys Ser Tyr Glu Asp Lys Glu Lys Pro 695 700 705	771
AAC TGC CTG GAC CTG CGT GGC GTG TGC CGG ACT GAC CAC CTG TGT CGG Asn Cys Leu Asp Leu Arg Gly Val Cys Arg Thr Asp His Leu Cys Arg 710 715 720 725	819
TCC CGG CTG GCC GAC TTC CAT GCC AAT TGT CGA GCC TCC TAC CAG ACG Ser Arg Leu Ala Asp Phe His Ala Asn Cys Arg Ala Ser Tyr Gln Thr 730 735 740	867
GTC ACC AGC TGC CCT GCG GAC AAT TAC CAG GCG TGT CTG GGC TCT TAT Val Thr Ser Cys Pro Ala Asp Asn Tyr Gln Ala Cys Leu Gly Ser Tyr 745 750 755	915
GCT GGC ATG ATT GGG TTT GAC ATG ACA CCT AAC TAT GTG GAC TCC AGC Ala Gly Met Ile Gly Phe Asp Met Thr Pro Asn Tyr Val Asp Ser Ser 760 765 770	963

CCC ACT GGC ATC GTG GTG TCC CCC TGG TGC AGC TGT CGT GGC AGC GGG Pro Thr Gly Ile Val Val Ser Pro Trp Cys Ser Cys Arg Gly Ser Gly 775 780 785	1011
AAC ATG GAG GAG GAG TGT GAG AAG TTC CTC AGG GAC TTC ACC GAG AAC Asn Met Glu Glu Glu Cys Glu Lys Phe Leu Arg Asp Phe Thr Glu Asn 790 795 800 805	1059
CCA TGC CTC CGG AAC GCC ATC CAG GCC TTT GGC AAC GGC ACG GAC GTG Pro Cys Leu Arg Asn Ala Ile Gln Ala Phe Gly Asn Gly Thr Asp Val 810 815 820	1107
AAC GTG TCC CCA AAA GGC CCC TCG TTC CAG GCC ACC CAG GCC CCT CGG Asn Val Ser Pro Lys Gly Pro Ser Phe Gln Ala Thr Gln Ala Pro Arg 825 830 835	1155
GTG GAG AAG ACG CCT TCT TTG CCA GAT GAC CTC AGT GAC AGT ACC AGC Val Glu Lys Thr Pro Ser Leu Pro Asp Asp Leu Ser Asp Ser Thr Ser 840 845 850	1203
TTG GGG ACC AGT GTC ATC ACC ACC TGC ACG TCT GTC CAG GAG CAG GGG Leu Gly Thr Ser Val Ile Thr Thr Cys Thr Ser Val Gln Glu Gln Gly 855 860 865	1251
CTG AAG GCC AAC AAC TCC AAA GAG TTA AGC ATG TGC TTC ACA GAG CTC Leu Lys Ala Asn Asn Ser Lys Glu Leu Ser Met Cys Phe Thr Glu Leu 870 875 880 885	1299
ACG ACA AAT ATC ATC CCA GGG AGT AAC AAG GTG ATC AAA CCT AAC TCA Thr Thr Asn Ile Ile Pro Gly Ser Asn Lys Val Ile Lys Pro Asn Ser 890 895 900	1347
GGC CCC AGC AGA GCC AGA CCG TCG GCT GCC TTG ACC GTG CTG TCT GTC Gly Pro Ser Arg Ala Arg Pro Ser Ala Ala Leu Thr Val Leu Ser Val 905 910 915	1395
CTG ATG CTG AAA CTG GCC TTG TAGGCTGTGG GAACCGAGTC AGAAGATTTT Leu Met Leu Lys Leu Ala Leu 920	1446
TGAAAGCTAC GCAGACAAGA ACAGCCGCCT GACGAAATGG AAACACACAC AGACACACAC	1506
ACACCTTGCA AAAAAAAT TGTTTTTCCC ACCTTGTCGC TGAACCTGTC TCCTCCAGG	1566
TTTCTTCTCT GGAGAAGTTT TTGTAAACCA AACAGACAAG CAGGCAGGCA GCCTGAGAGC	1626
TGGCCCAGGG GTCCCCTGGC AGGGGAACT CTGGTGCCCG GGAGGGCACG AGGCTCTAGA	1686
AATGCCCTTC ACTTTCTCCT GGTGTTTTTC TCTCTGGACC CTTCTGAAGC AGAGACCGGA	1746
CAAGAGCCTG CAGCGGAAGG GACTCTGGGC TGTGCCTGAG GCTGGCTGGG GGCAGGACAA	1806
CACAGCTGCT TCCCCAGGCT GCCCACTCTG GGGACCCGCT GGGGGCTGGC AGAGGGCATC	1866

GGTCAGCGGG GCAGCGGGC TG

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:13:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

(A) ДЪЛЖИНА: 464 аминокиселини

(B) ТИП: аминокиселина

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(ii) МОЛЕКУЛЕН ТИП: белтък

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO: 13:

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

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

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:14:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 1878 базови двойки
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(ii) МОЛЕКУЛЕН ТИП: кДНК

(ix) ОСОБЕНОСТ:

(A) ИМЕ/КЛЮЧ: CDS

(B) ЛОКАЛИЗАЦИЯ: 25..1416

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO: 14:

CGCGGCGCCC AGCGCAGGCA GAGCGCTGTC GCATCCCGGG CGTCCACCCG CCATGGGGCT	60
CTCCTGGAGC CCGCGACCTC CACTGCTGAT GATCCTGCTA CTGGTCTGT CGTTGTGGCT	120
GCCACTTGGA GCAGGAAACT CCCTTGCCAC AGAGAACAGG TTTGTGAACA GCTGTACCCA	180
GGCCAGAAAG AAATGCGAGG CTAA TCC CGC TTG CAA GGC TGC CTA CCA GCA	231
Ser Arg Leu Gln Gly Cys Leu Pro Ala	
465 470	
CCT GGG CTC CTG CAC CTC CAG TTA AGC AGG CCG CTG CCC TTA GAG GAG	279
Pro Gly Leu Leu His Leu Gln Leu Ser Arg Pro Leu Pro Leu Glu Glu	
475 480 485	
TCT GCC ATG TCT GCA GAC TGC CTA GAG GCA GCA GAA CAA CTC AGG AAC	327
Ser Ala Met Ser Ala Asp Cys Leu Glu Ala Ala Glu Gln Leu Arg Asn	
490 495 500 505	
AGC TCT CTG ATA GAC TGC AGG TGC CAT CGG CGC ATG AAG CAC CAA GCT	375
Ser Ser Leu Ile Asp Cys Arg Cys His Arg Arg Met Lys His Gln Ala	
510 515 520	
ACC TGT CTG GAC ATT TAT TGG ACC GTT CAC CCT GCC CGA AGC CTT GGT	423
Thr Cys Leu Asp Ile Tyr Trp Thr Val His Pro Ala Arg Ser Leu Gly	
525 530 535	
GAC TAC GAG TTG GAT GTC TCA CCC TAT GAA GAC ACA GTG ACC AGC AAA	471
Asp Tyr Glu Leu Asp Val Ser Pro Tyr Glu Asp Thr Val Thr Ser Lys	
540 545 550	
CCC TGG AAA ATG AAT CTT AGC AAG TTG AAC ATG CTC AAA CCA GAC TCG	519
Pro Trp Lys Met Asn Leu Ser Lys Leu Asn Met Leu Lys Pro Asp Ser	
555 560 565	
GAC CTC TGC CTC AAA TTT GCT ATG CTG TGT ACT CTT CAC GAC AAG TGT	567
Asp Leu Cys Leu Lys Phe Ala Met Leu Cys Thr Leu His Asp Lys Cys	
570 575 580 585	
GAC CGC CTG CGC AAG GCC TAC GGG GAG GCA TGC TCA GGG ATC CGC TGC	615
Asp Arg Leu Arg Lys Ala Tyr Gly Glu Ala Cys Ser Gly Ile Arg Cys	
590 595 600	
CAG CGC CAC CTC TGC CTA GCC CAG CTG CGC TCC TTC TTT GAG AAG GCA	663
Gln Arg His Leu Cys Leu Ala Gln Leu Arg Ser Phe Phe Glu Lys Ala	
605 610 615	

GCA GAG TCC CAC GCT CAG GGT CTG CTG CTG TGT CCC TGT GCA CCA GAA Ala Glu Ser His Ala Gln Gly Leu Leu Leu Cys Pro Cys Ala Pro Glu 620 625 630	711
GAT GCG GGC TGT GGG GAG CGG CGG CGT AAC ACC ATC GCC CCC AGT TGC Asp Ala Gly Cys Gly Glu Arg Arg Arg Asn Thr Ile Ala Pro Ser Cys 635 640 645	759
GCC CTG CCT TCT GTA ACC CCC AAT TGC CTG GAT CTG CGG AGC TTC TGC Ala Leu Pro Ser Val Thr Pro Asn Cys Leu Asp Leu Arg Ser Phe Cys 650 655 660 665	807
CGT GCG GAC CCT TTG TGC AGA TCA CGC CTG ATG GAC TTC CAG ACC CAC Arg Ala Asp Pro Leu Cys Arg Ser Arg Leu Met Asp Phe Gln Thr His 670 675 680	855
TGT CAT CCT ATG GAC ATC CTT GGG ACT TGT GCA ACT GAG CAG TCC AGA Cys His Pro Met Asp Ile Leu Gly Thr Cys Ala Thr Glu Gln Ser Arg 685 690 695	903
TGT CTG CGG GCA TAC CTG GGG CTG ATT GGG ACT GCC ATG ACC CCA AAC Cys Leu Arg Ala Tyr Leu Gly Leu Ile Gly Thr Ala Met Thr Pro Asn 700 705 710	951
TTC ATC AGC AAG GTC AAC ACT ACT GTT GCC TTA AGC TGC ACC TGC CGA Phe Ile Ser Lys Val Asn Thr Thr Val Ala Leu Ser Cys Thr Cys Arg 715 720 725	999
GGC AGC GGC AAC CTA CAG GAC GAG TGT GAA CAG CTG GAA AGG TCC TTC Gly Ser Gly Asn Leu Gln Asp Glu Cys Glu Gln Leu Glu Arg Ser Phe 730 735 740 745	1047
TCC CAG AAC CCC TGC CTC GTG GAG GCC ATT GCA GCT AAG ATG CGT TTC Ser Gln Asn Pro Cys Leu Val Glu Ala Ile Ala Ala Lys Met Arg Phe 750 755 760	1095
CAC AGA CAG CTC TTC TCC CAG GAC TGG GCA GAC TCT ACT TTT TCA GTG His Arg Gln Leu Phe Ser Gln Asp Trp Ala Asp Ser Thr Phe Ser Val 765 770 775	1143
GTG CAG CAG CAG AAC AGC AAC CCT GCT CTG AGA CTG CAG CCC AGG CTA Val Gln Gln Gln Asn Ser Asn Pro Ala Leu Arg Leu Gln Pro Arg Leu 780 785 790	1191
CCC ATT CTT TCT TTC TCC ATC CTT CCC TTG ATT CTG CTG CAG ACC CTC Pro Ile Leu Ser Phe Ser Ile Leu Pro Leu Ile Leu Leu Gln Thr Leu 795 800 805	1239
TGG TAGCTGGGCT TCCTCAGGGT CCTTTGTCCT CTCCACCACA CCCAGACTGA Trp 810	1292
TTTGACGCCT GTGGTGGGAG AGAACTCGCC AGCCTGTGGA AGAAGACGCA GCGTGCTACA	1352

CAGCAACCCG GAACCAACCA GGCATTCCGC AGCACATCCC GTCTGCTCCA GAAGAGGTCT 1412
 TAGAAGTGAG GGCTGTGACC CTTCCGATCC TGAGCGGCTA GTTTTCAAAC CTCCTTGCC 1472
 CCTGCTTCCT TCTGGCTCAG GCTGCTCCTC CTTAGGACTT TGTGGGTCCA GTTTTGCCCT 1532
 CTGTCTGAT GGTGATTAGC GGCTCACCTC CAGCGCTTCT TCCTGTTTCC CAGGACCACC 1592
 CAGAGGCTAA GGAATCAGTC ATTCCCTGTT GCCTTCTCCA GGAAGGCAGG CTAAGGGTTC 1652
 TGAGGTGACT GAGAAAAATG TTTCCCTTGT GTGGAAGGCT GGTGCTCCAG CCTCCACGTC 1712
 CCTCTGATG GAAGATAAAA ACCTGCTGCT GTCTTGACTG CTCTGCCAGG CACTCTTGAA 1772
 CATTGGGCA TGAAGAGCTA AAGTCTTTGG GTCTTGTTTA ACTCCTATTA CTGTCCCCAA 1832
 ATTCCCTAG TCCCTGGGT CATGATTAAA CATTTTGA CTAAAA 1878

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:15:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

(A) ДЪЛЖИНА: 346 аминокиселини

(B) ТИП: аминокиселина

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(ii) МОЛЕКУЛЕН ТИП: белтък

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO: 15:

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

Gly Glu Ala Cys Ser Gly Ile Arg Cys Gln Arg His Leu Cys Leu Ala
 130 135 140
 Gln Leu Arg Ser Phe Phe Glu Lys Ala Ala Glu Ser His Ala Gln Gly
 145 150 155 160
 Leu Leu Leu Cys Pro Cys Ala Pro Glu Asp Ala Gly Cys Gly Glu Arg
 165 170 175
 Arg Arg Asn Thr Ile Ala Pro Ser Cys Ala Leu Pro Ser Val Thr Pro
 180 185 190
 Asn Cys Leu Asp Leu Arg Ser Phe Cys Arg Ala Asp Pro Leu Cys Arg
 195 200 205
 Ser Arg Leu Met Asp Phe Gln Thr His Cys His Pro Met Asp Ile Leu
 210 215 220
 Gly Thr Cys Ala Thr Glu Gln Ser Arg Cys Leu Arg Ala Tyr Leu Gly
 225 230 235 240
 Leu Ile Gly Thr Ala Met Thr Pro Asn Phe Ile Ser Lys Val Asn Thr
 245 250 255
 Thr Val Ala Leu Ser Cys Thr Cys Arg Gly Ser Gly Asn Leu Gln Asp
 260 265 270
 Glu Cys Glu Gln Leu Glu Arg Ser Phe Ser Gln Asn Pro Cys Leu Val
 275 280 285
 Glu Ala Ile Ala Ala Lys Met Arg Phe His Arg Gln Ile Phe Ser Gln
 290 295 300
 Asp Trp Ala Asp Ser Thr Phe Ser Val Val Gln Gln Gln Asn Ser Asn
 305 310 315 320
 Pro Ala Leu Arg Leu Gln Pro Arg Leu Pro Ile Leu Ser Phe Ser Ile
 325 330 335
 Leu Pro Leu Ile Leu Leu Gln Thr Leu Trp
 340 345

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:16:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 18, 89базови двойки
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(ii) МОЛЕКУЛЕН ТИП: кДНК

(ix) ОСОБЕНОСТ:

- (A) ИМЕ/КЛЮЧ: CDS

(B) ЛОКАЛИЗАЦИЯ: 41..1231

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТТА: SEQ ID NO: 16:

CGCAGGCAGA GCGCTGTCGC ATCCCGGGCG TCCACCCGCC ATG GGG CTC TCC TGG	55
Met Gly Leu Ser Trp	
350	
AGC CCG CGA CCT CCA CTG CTG ATG ATC CTG CTA CTG GTG CTG TCG TTG	103
Ser Pro Arg Pro Pro Leu Leu Met Ile Leu Leu Leu Val Leu Ser Leu	
355 360 365	
TGG CTG CCA CTT GGA GCA GGA AAC TCC CTT GCC ACA GAG AAC AGG TTT	151
Trp Leu Pro Leu Gly Ala Gly Asn Ser Leu Ala Thr Glu Asn Arg Phe	
370 375 380	
GTG AAC AGC TGT ACC CAG GCC AGA AAG AAA TGC GAG GCT AAT CCC GCT	199
Val Asn Ser Cys Thr Gln Ala Arg Lys Lys Cys Glu Ala Asn Pro Ala	
385 390 395	
TGC AAG GCT GCC TAC CAG CAC CTG GGC TCC TGC ACC TCC AGT TTA AGC	247
Cys Lys Ala Ala Tyr Gln His Leu Gly Ser Cys Thr Ser Ser Leu Ser	
400 405 410 415	
AGG CCG CTG CCC TTA GAG GAG TCT GCC ATG TCT GCA GAC TGC CTA GAG	295
Arg Pro Leu Pro Leu Glu Glu Ser Ala Met Ser Ala Asp Cys Leu Glu	
420 425 430	
GCA GCA GAA CAA CTC AGG AAC AGC TCT CTG ATA GAC TGC AGG TGC CAT	343
Ala Ala Glu Gln Leu Arg Asn Ser Ser Leu Ile Asp Cys Arg Cys His	
435 440 445	
CGG CGC ATG AAG CAC CAA GCT ACC TGT CTG GAC ATT TAT TGG ACC GTT	391
Arg Arg Met Lys His Gln Ala Thr Cys Leu Asp Ile Tyr Trp Thr Val	
450 455 460	
CAC CCT GCC CGA AGC CTT GGT GAC TAC GAG TTG GAT GTC TCA CCC TAT	439
His Pro Ala Arg Ser Leu Gly Asp Tyr Glu Leu Asp Val Ser Pro Tyr	
465 470 475	
GAA GAC ACA GTG ACC AGC AAA CCC TGG AAA ATG AAT CTT AGC AAG TTG	487
Glu Asp Thr Val Thr Ser Lys Pro Trp Lys Met Asn Leu Ser Lys Leu	
480 485 490 495	
AAC ATG CTC AAA CCA GAC TCG GAC CTC TGC CTC AAA TTT GCT ATG CTG	535
Asn Met Leu Lys Pro Asp Ser Asp Leu Cys Leu Lys Phe Ala Met Leu	
500 505 510	
TGT ACT CTT CAC GAC AAG TGT GAC CGC CTG CGC AAG GCC TAC GGG GAG	583
Cys Thr Leu His Asp Lys Cys Asp Arg Leu Arg Lys Ala Tyr Gly Glu	
515 520 525	

GCA TGC TCA GGG ATC CGC TGC CAG CGC CAC CTC TGC CTA GCC CAG CTG Ala Cys Ser Gly Ile Arg Cys Gln Arg His Leu Cys Leu Ala Gln Leu 530 535 540	631
CGC TCC TTC TTT GAG AAG GCA GCA GAG TCC CAC GCT CAG GGT CTG CTG Arg Ser Phe Phe Glu Lys Ala Ala Glu Ser His Ala Gln Gly Leu Leu 545 550 555	679
CTG TGT CCC TGT GCA CCA GAA GAT GCG GGC TGT GGG GAG CGG CGG CGT Leu Cys Pro Cys Ala Pro Glu Asp Ala Gly Cys Gly Glu Arg Arg Arg 560 565 570 575	727
AAC ACC ATC GGC CCC AGT TGC GCC CTG CCT TCT GTA ACC CCC AAT TGC Asn Thr Ile Ala Pro Ser Cys Ala Leu Pro Ser Val Thr Pro Asn Cys 580 585 590	775
CTG GAT CTG CGG AGC TTC TGC CGT GCG GAC CCT TTG TGC AGA TCA CGC Leu Asp Leu Arg Ser Phe Cys Arg Ala Asp Pro Leu Cys Arg Ser Arg 595 600 605	823
CTG ATG GAC TTC CAG ACC CAC TGT CAT CCT ATG GAC ATC CTT GGG ACT Leu Met Asp Phe Gln Thr His Cys His Pro Met Asp Ile Leu Gly Thr 610 615 620	871
TGT GCA ACT GAG CAG TCC AGA TGT CTG CGG GCA TAC CTG GGG CTG ATT Cys Ala Thr Glu Gln Ser Arg Cys Leu Arg Ala Tyr Leu Gly Leu Ile 625 630 635	919
GGG ACT GCC ATG ACC CCA AAC TTC ATC AGC AAG GTC AAC ACT ACT GTT Gly Thr Ala Met Thr Pro Asn Phe Ile Ser Lys Val Asn Thr Thr Val 640 645 650 655	967
GCC TTA AGC TGC ACC TGC CGA GGC AGC GGC AAC CTA CAG GAC GAG TGT Ala Leu Ser Cys Thr Cys Arg Gly Ser Gly Asn Leu Gln Asp Glu Cys 660 665 670	1015
GAA CAG CTG GAA AGG TCC TTC TCC CAG AAC CCC TGC CTC GTG GAG GCC Glu Gln Leu Glu Arg Ser Phe Ser Gln Asn Pro Cys Leu Val Glu Ala 675 680 685	1063
ATT GCA GGT AAG ATG CGT TTC CAC AGA CAG CTC TTC TCC CAG GAC TGG Ile Ala Ala Lys Met Arg Phe His Arg Gln Leu Phe Ser Gln Asp Trp 690 695 700	1111
GCA GAC TCT ACT TTT TCA GTG GTG CAG CAG CAG AAC AGC AAC CCT GCT Ala Asp Ser Thr Phe Ser Val Val Gln Gln Gln Asn Ser Asn Pro Ala 705 710 715	1159
CTG AGA CTG CAG CCC AGG CTA CCC ATT CTT TCT TTC TCC ATC CTT CCC Leu Arg Leu Gln Pro Arg Leu Pro Ile Leu Ser Phe Ser Ile Leu Pro 720 725 730 735	1207
TTG ATT CTG CTG CAG ACC CTC TGG TAGCTGGGCT TCCTCAGGGT CCTTTGTCCT Leu Ile Leu Leu Gln Thr Leu Trp 740	1261

```

CTCCACCACA CCCAGACTGA TTTGCAGCCT GTGGTGGGAG AGAACTCGCC AGCCTGTGGA 1321
AGAAGACGCA GCGTGCTACA CAGCAACCCG GAACCAACCA GGCATTCCGC AGCACATCCC 1381
GTCTGCTCCA GAAGAGGTCT TAGAAGTGAG GGCTGTGACC CTTCCGATCC TGAGCGGCTA 1441
GTTTTCAAAC CTCCCTTGCC CCTGCTTCCT TCTGGCTCAG GCTGCTCCTC CTTAGGACTT 1501
TGTGGGTCCA GTTTTGCTT CTGTTCTGAT GGTGATTAGC GGCTCACCTC CAGCGCTTCT 1561
TCCTGTTTTCC CAGGACCACC CAGAGGCTAA GGAATCAGTC ATTCCTGTG GCCTTCTCCA 1621
GGAAGGCAGG CTAAGGGTTC TGAGGTGACT GAGAAJAATG TTTCTTTGT GTGGAAGGCT 1681
GGTGCTCCAG CCTCCAGTC CCTCTGAATG GAAGATAAAA ACCTGCTGGT GTCTTGACTG 1741
CTCTGCCAGG CAATCCTGAA CATTGGSCTA TGAAGAGCTA AATCTTTGG GTCTTGTTTA 1801
ACTCCTATTA CTGTCCCCAA ATTCCCTAG TCCCTTGGGT CATGATTAAA CATTGACT 1861
TAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 1889

```

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:17:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

(A) ДЪЛЖИНА: 397 аминокиселини

(B) ТИП: аминокиселина

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(ii) МОЛЕКУЛЕН ТИП: белтък

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO: 17:

```

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

```

Ile Tyr Trp Thr Val His Pro Ala Arg Ser Leu Gly Asp Tyr Glu Leu
 115 120 125
 Asp Val Ser Pro Tyr Glu Asp Thr Val Thr Ser Lys Pro Trp Lys Met
 130 135 140
 Asn Leu Ser Lys Leu Asn Met Leu Lys Pro Asp Ser Asp Leu Cys Leu
 145 150 155 160
 Lys Phe Ala Met Leu Cys Thr Leu His Asp Lys Cys Asp Arg Leu Arg
 165 170 175
 Lys Ala Tyr Gly Glu Ala Cys Ser Gly Ile Arg Cys Gln Arg His Leu
 180 185 190
 Cys Leu Ala Gln Leu Arg Ser Phe Phe Glu Lys Ala Ala Glu Ser His
 195 200 205
 Ala Gln Gly Leu Leu Leu Cys Pro Cys Ala Pro Glu Asp Ala Gly Cys
 210 215 220
 Gly Glu Arg Arg Arg Asn Thr Ile Ala Pro Ser Cys Ala Leu Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Thr Pro Asn Cys Leu Asp Leu Arg Ser Phe Cys Arg Ala Asp Pro
 245 250 255
 Leu Cys Arg Ser Arg Leu Met Asp Phe Gln Thr His Cys His Pro Met
 260 265 270
 Asp Ile Leu Gly Thr Cys Ala Thr Glu Gln Ser Arg Cys Leu Arg Ala
 275 280 285
 Tyr Leu Gly Leu Ile Gly Thr Ala Met Thr Pro Asn Phe Ile Ser Lys
 290 295 300
 Val Asn Thr Thr Val Ala Leu Ser Cys Thr Cys Arg Gly Ser Gly Asn
 305 310 315 320
 Leu Gln Asp Glu Cys Glu Gln Leu Glu Arg Ser Phe Ser Gln Asn Pro
 325 330 335
 Cys Leu Val Glu Ala Ile Ala Ala Lys Met Arg Phe His Arg Gln Leu
 340 345 350
 Phe Ser Gln Asp Trp Ala Asp Ser Thr Phe Ser Val Val Gln Gln Gln
 355 360 365
 Asn Ser Asn Pro Ala Leu Arg Leu Gln Pro Arg Leu Pro Ile Leu Ser
 370 375 380
 Phe Ser Ile Leu Pro Leu Ile Leu Leu Gln Thr Leu Trp
 385 390 395

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:18:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 1271 базови двойки
 (B) ТИП: нуклеинова киселина
 (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
 (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(ii) МОЛЕКУЛЕН ТИП: κДНК

(ix) ОСОБЕНОСТ:

- (A) ИМЕ/КЛЮЧ: CDS
 (B) ЛОКАЛИЗАЦИЯ: 2..946

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO: 18:

C GGC TAC TGT GAA ACA CCT CAA CTC AGG AAC AGC TCT CTG ATA GGC Gly Tyr Cys Glu Thr Pro Gln Leu Arg Asn Ser Ser Leu Ile Gly 400 405 410	46
TGC ATG TGC CAC CGG CGC ATG AAG AAC CAG GTT GCC TGC TTG GAC ATC Cys Met Cys His Arg Arg Met Lys Asn Gln Val Ala Cys Leu Asp Ile 415 420 425	94
TAT TGG ACC GTT CAC CGT GCC CGC AGC CTT GGT AAC TAT GAG CTG GAT Tyr Trp Thr Val His Arg Ala Arg Ser Leu Gly Asn Tyr Glu Leu Asp 430 435 440	142
GTC TCC CCC TAT GAA GAC ACA GTG ACC AGC AAA CCC TCG AAA ATG AAT Val Ser Pro Tyr Glu Asp Thr Val Thr Ser Lys Pro Trp Lys Met Asn 445 450 455 460	190
CTC AGC AAA CTG AAC ATG CTC AAA CCA GAC TCA GAC CTC TGC CTC AAG Leu Ser Lys Leu Asn Met Leu Lys Pro Asp Ser Asp Leu Cys Leu Lys 465 470 475	238
TTT GCC ATG CTG TGT ACT CTC AAT GAC AAG TGT GAC CGG CTG CGC AAG Phe Ala Met Leu Cys Thr Leu Asn Asp Lys Cys Asp Arg Leu Arg Lys 480 485 490	286
GCC TAC GGG GAG GCG TGC TCC GGG CCC CAC TGC CAG CGC CAC GTC TGC Ala Tyr Gly Glu Ala Cys Ser Gly Pro His Cys Gln Arg His Val Cys 495 500 505	334
CTC AGG CAG CTG CTC ACT TTC TTC GAG AAG GCC GCC GAG CCC CAC GCG Leu Arg Gln Leu Leu Thr Phe Phe Glu Lys Ala Ala Glu Pro His Ala 510 515 520	382
CAG GGC CTG CTA CTG TGC CCA TGT GCC CCC AAC GAC CGG GGC TGC GGG Gln Gly Leu Leu Leu Cys Pro Cys Ala Pro Asn Asp Arg Gly Cys Gly 525 530 535 540	430

GAG CGC CGG CGC AAC ACC ATC GCC CCC AAC TGC GCG CTG CCG CCT GTG Glu Arg Arg Arg Asn Thr Ile Ala Pro Asn Cys Ala Leu Pro Pro Val 545 550 555	478
GCC CCC AAC TGC CTG GAG CTG CGG CGC CTC TGC TTC TCC GAC CCG CTT Ala Pro Asn Cys Leu Glu Leu Arg Arg Leu Cys Phe Ser Asp Pro Leu 560 565 570	526
TGC AGA TCA CGC CTG GTG GAT TTC CAG ACC CAC TGC CAT CCC ATG GAC Cys Arg Ser Arg Leu Val Asp Phe Gln Thr His Cys His Pro Met Asp 575 580 585	574
ATC CTA GGA ACT TGT GCA ACA GAG CAG TCC AGA TGT CTA CGA GCA TAC Ile Leu Gly Thr Cys Ala Thr Glu Gln Ser Arg Cys Leu Arg Ala Tyr 590 595 600	622
CTG GGG CTG ATT GGG ACT GCC ATG ACC CCC AAC TTT GTC AGC AAT GTC Leu Gly Leu Ile Gly Thr Ala Met Thr Pro Asn Phe Val Ser Asn Val 605 610 615 620	670
AAC ACC AGT GTT GCC TTA AGC TGC ACC TGC CGA GGC AGT GGC AAC CTG Asn Thr Ser Val Ala Leu Ser Cys Thr Cys Arg Gly Ser Gly Asn Leu 625 630 635	718
CAG GAG GAG TGT GAA ATG CTG GAA GGG TTC TTC TCC CAC AAC CCC TGC Gln Glu Glu Cys Glu Met Leu Glu Gly Phe Phe Ser His Asn Pro Cys 640 645 650	766
CTC ACG GAG GCC ATT GCA GCT AAG ATG CGT TTT CAC AGC CAA CTC TTC Leu Thr Glu Ala Ile Ala Ala Lys Met Arg Phe His Ser Gln Leu Phe 655 660 665	814
TCC CAG GAC TGG CCA CAC CCT ACC TTT GCT GTG ATG GCA CAC CAG AAT Ser Gln Asp Trp Pro His Pro Thr Phe Ala Val Met Ala His Gln Asn 670 675 680	862
GAA AAC CCT GCT GTG AGG CCA CAG CCC TGG GTG CCC TCT CTT TTC TCC Glu Asn Pro Ala Val Arg Pro Gln Pro Trp Val Pro Ser Leu Phe Ser 685 690 695 700	910
TGC ACG CTT CCC TTG ATT CTG CTC CTG AGC CTA TGG TAGCTGGACT Cys Thr Leu Pro Leu Ile Leu Leu Leu Ser Leu Trp 705 710	956
TCCCCAGGGC CCTCTTCCCC TCCACCACAC CCAGGTGGAC TTGCAGCCCA CAAGGGGTGA	1016
GGAAAGGACA GAGCAGGAA GGAGGTGCAG TGCGCAGATG AGGGCACAGG AGAAGCTAAG	1076
GGTTATACC TCCAGATCCT TACTGGTCCA GTCCTCATTC CCTCCACCCC ATCTCCACTT	1136
CTGATTCATG CTGCCCCCTCC TTGGTGGCCA CAATTTAGCC ATGTCATCTG GTGCCTGTGG	1196
GCCTTGCTTT ATTCTATTA TTGTCCTAAA GTCTCTCTGG GCTCTTGAT CATGATTAAA	1256
CCTTTGACTT AAAAA	1271

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:19:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

(A) ДЪЛЖИНА: 315 аминокиселини

(B) ТИП: аминокиселина

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(ii) МОЛЕКУЛЕН ТИП: белтък

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO: 119:

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

Thr Ser Val Ala Leu Ser Cys Thr Cys Arg Gly Ser Gly Asn Leu Gln
 225 230 235 240
 Glu Glu Cys Glu Met Leu Glu Gly Phe Phe Ser His Asn Pro Cys Leu
 245 250 255
 Thr Glu Ala Ile Ala Ala Lys Met Arg Phe His Ser Gln Leu Phe Ser
 260 265 270
 Gln Asp Trp Pro His Pro Thr Phe Ala Val Met Ala His Gln Asn Glu
 275 280 285
 Asn Pro Ala Val Arg Pro Gln Pro Trp Val Pro Ser Leu Phe Ser Cys
 290 295 300
 Thr Leu Pro Leu Ile Leu Leu Leu Ser Leu Trp
 305 310 315

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:20:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 1699 базови двойки
 (B) ТИП: нуклеинова киселина
 (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
 (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(ii) МОЛЕКУЛЕН ТИП: кДНК

(ix) ОСОБЕНОСТ:

- (A) ИМЕ/КЛЮЧ: CDS
 (B) ЛОКАЛИЗАЦИЯ: 175..1374

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO: 20:

TGTGGACGCG CGCTTCGGAG TTGGAGGGCG GCGCCCAGGA CCCTGGTGGG AGAGTGTGTG 60
 CGTCGCGCTG GAGGGCGGGA GGCGGGGGCG GGAGGTGCCG GTCGAGGGAG CCCCCTCTC 120
 AGAGCTCCAG GGGAGGAGCG AGGGGAGCGC GGAGCCCGGC GCCTACAGCT CGCC ATG 177
 Met
 GTG CGC CCC CTG AAC CCG CGA CCG CTG CCG CCC GTA GTC CTG ATG TTG 225
 Val Arg Pro Leu Asn Pro Arg Pro Leu Pro Pro Val Val Leu Met Leu
 320 325 330
 CTG CTG CTG CTG CCG CCG TCG CCG CTG CCT CTC GCA GCC GGA GAC CCC 273
 Leu Leu Leu Leu Pro Pro Ser Pro Leu Pro Leu Ala Ala Gly Asp Pro
 335 340 345
 CTT CCC ACA GAA AGC CGA CTC ATG AAC AGC TGT CTC CAG GCC AGG AGG 321
 Leu Pro Thr Glu Ser Arg Leu Met Asn Ser Cys Leu Gln Ala Arg Arg
 350 355 360

AAG TGC CAG GCT	...	GAT CCC ACC TGC AGT GCT GCC TAC CAC CAC CTG GAT	369
Lys Cys Gln Ala	Asp	Pro Thr Cys Ser Ala Tyr His His Leu Asp	
365		370 375 380	
TCC TGC ACC TCT AGC ATA AGC ACC CCA CTG CCC TCA GAG GAG CCT TCG			417
Ser Cys Thr Ser	Ser Ile Ser Thr Pro Leu Pro Ser Glu Glu Pro Ser		
	385 390 395		
GTC CCT GCT GAC TGC CTG GAG GCA GCA CAG CAA CTC AGG AAC AGC TCT			465
Val Pro Ala Asp Cys Leu Glu Ala Ala Gln Gln Leu Arg Asn Ser Ser			
	400 405 410		
CTG ATA GGC TGC ATG TGC CAC CGG CGC ATG AAG AAC CAG GTT GCC TGC			513
Leu Ile Gly Cys Met Cys His Arg Arg Met Lys Asn Gln Val Ala Cys			
	415 420 425		
TTG GAC ATC TAT TGG ACC GTT CAC CGT GCC CGC AGC CTT GGT AAC TAT			561
Leu Asp Ile Tyr Trp Thr Val His Arg Ala Arg Ser Leu Gly Asn Tyr			
	430 435 440		
GAG CTG GAT GTC TCC CCC TAT GAA GAC ACA GTG ACC AGC AAA CCC TGG			609
Glu Leu Asp Val Ser Pro Tyr Glu Asp Thr Val Thr Ser Lys Pro Trp			
	445 450 455 460		
AAA ATG AAT CTC AGC AAA CTG AAC ATG CTC AAA CCA GAC TCA GAC CTC			657
Lys Met Asn Leu Ser Lys Leu Asn Met Leu Lys Pro Asp Ser Asp Leu			
	465 470 475		
TGC CTC AAG TTT GCC ATG CTG TGT ACT CTC AAT GAC AAG TGT GAC CGG			705
Cys Leu Lys Phe Ala Met Leu Cys Thr Leu Asn Asp Lys Cys Asp Arg			
	480 485 490		
CTG CGC AAG GCC TAC GGG GAG GCG TGC TCC GGG CCC CAC TGC CAG CGC			753
Leu Arg Lys Ala Tyr Gly Glu Ala Cys Ser Gly Pro His Cys Gln Arg			
	495 500 505		
CAC GTC TGC CTC AGG CAG CTG CTC ACT TTC TTC GAG AAG GCC GCC GAG			801
His Val Cys Leu Arg Gln Leu Leu Thr Phe Phe Glu Lys Ala Ala Glu			
	510 515 520		
CCC CAC GCG CAG GGC CTG CTA CTG TGC CCA TGT GCC CCC AAC GAC CGG			849
Pro His Ala Gln Gly Leu Leu Leu Cys Pro Cys Ala Pro Asn Asp Arg			
	525 530 535 540		
GGC TGC GGG GAG CGC CGG CGC AAC ACC ATC GCC CCC AAC TGC GCG CTG			897
Gly Cys Gly Glu Arg Arg Arg Asn Thr Ile Ala Pro Asn Cys Ala Leu			
	545 550 555		
CCG CCT GTG GCC CCC AAC TGC CTG GAG CTG CGG CGC CTC TGC TTC TCC			945
Pro Pro Val Ala Pro Asn Cys Leu Glu Leu Arg Arg Leu Cys Phe Ser			
	560 565 570		

GAC CCG CTT TGC AGA TCA CGC CTG GTG GAT TTC CAG ACC CAC TGC CAT Asp Pro Leu Cys Arg Ser Arg Leu Val Asp Phe Gln Thr His Cys His 575 580 585	993
CCC ATG GAC ATC CTA GGA ACT TGT GCA ACA GAG CAG TCC AGA TGT CTA Pro Met Asp Ile Leu Gly Thr Cys Ala Thr Glu Gln Ser Arg Cys Leu 590 595 600	1041
CGA GCA TAC CTG GGG CTG ATT GGG ACT GCC ATG ACC CCC AAC TTT GTC Arg Ala Tyr Leu Gly Leu Ile Gly Thr Ala Met Thr Pro Asn Phe Val 605 610 615 620	1089
AGC AAT GTC AAC ACC AGT GTT GCC TTA AGC TGC ACC TGC CGA GGC AGC Ser Asn Val Asn Thr Ser Val Ala Leu Ser Cys Thr Cys Arg Gly Ser 625 630 635	1137
GGC AAC CTG CAG GAG GAG TGT GAA ATG CTG GAA GGG TTC TTC TCC CAC Gly Asn Leu Gln Glu Glu Cys Glu Met Leu Glu Gly Phe Phe Ser His 640 645 650	1185
AAC CCC TGC CTC ACG GAG GCC ATT GCA GCT AAG ATG CGT TTT CAC AGC Asn Pro Cys Leu Thr Glu Ala Ile Ala Ala Lys Met Arg Phe His Ser 655 660 665	1233
CAA CTC TTC TCC CAG GAC TGG CCA CAC CCT ACC TTT GCT GTG ATG GCA Gln Leu Phe Ser Gln Asp Trp Pro His Pro Thr Phe Ala Val Met Ala 670 675 680	1281
CAC CAG AAT GAA AAC CCT GCT GTG AGG CCA CAG CCC TGG GTG CCC TCT His Gln Asn Glu Asn Pro Ala Val Arg Pro Gln Pro Trp Val Pro Ser 685 690 695 700	1329
CTT TTC TCC TGC ACG CTT CCC TTG ATT CTG CTC CTG AGC CTA TGG Leu Phe Ser Cys Thr Leu Pro Leu Ile Leu Leu Leu Ser Leu Trp 705 710 715	1374
TAGCTGGACT TCCCCAGGGC CCTCTTCCCC TCCACCACAC CCAGGTGGAC TTGCAGCCCA 35	1434
CAAGGGGTGA GGAAAGGACA GCAGCAGGAA GGAGGTGCAG TGCGCAGATG AGGGCACAGG	1494
AGLAGCTAAG GGTATGACC TCCAGATCCT TACTGGTCCA GTCCTCATTC CCTCCACCCC	1554
ATCTCCACTT CTGATTCATG CTGCCCCCTCC TTGGTGGCCA CAATTTAGCC ATGTCATCTG 40	1614
GTGCCTGTGG GCSTTGCTTT ATTCSTATTA TTGTCTSTAAA GTCTCTCTGG GCTCTTGGAT	1674
CATGATTAAA CSTTTGACTT AAAAA	1699

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:21₄₅

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

(A) ДЪЛЖИНА: 400 аминокиселини

(B) ТИП: аминокиселина

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна 50

(ii) МОЛЕКУЛЕН ТИП: БЕЛТЪК

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO: 21:

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

His Pro Met Asp Ile Leu Gly Thr Cys Ala Thr Glu Gln Ser Arg Cys
275 280 285

Leu Arg Ala Tyr Leu Gly Leu Ile Gly Thr Ala Met Thr Pro Asn Phe
290 295 300

Val Ser Asn Val Asn Thr Ser Val Ala Leu Ser Cys Thr Cys Arg Gly
305 310 315 320

Ser Gly Asn Leu Gln Glu Glu Cys Glu Met Leu Glu Gly Phe Phe Ser
325 330 335

His Asn Pro Cys Leu Thr Glu Ala Ile Ala Ala Lys Met Arg Phe His
340 345 350

Ser Gln Leu Phe Ser Gln Asp Trp Pro His Pro Thr Phe Ala Val Met
355 360 365

Ala His Gln Asn Glu Asn Pro Ala Val Arg Pro Gln Pro Trp Val Pro
370 375 380

Ser Leu Phe Ser Cys Thr Leu Pro Leu Ile Leu Leu Ser Leu Trp
385 390 395 400

Патентни претенции

1. Изолирана нуклеинова киселина, кодираща полипептид с най-малко 80 % хомоложна последователност на аминокиселинна последователност, избрана от групата, състояща се от SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 21, при което този полипептид взаимодейства с рецепторен белтък Ret, за да отключи димеризацията на рецепторния белтък Ret или автофосфорилирането на тирозинкиназния домен на рецепторния белтък Ret.

2. Нуклеинова киселина съгласно претенция 1, при която аминокиселинната последователност на кодиращия полипептид запазва най-малко 80 % от цистеините, когато е съпоставена със SEQ ID NO: 21.

3. Нуклеинова киселина съгласно претенция 1, при която кодиращият полипептид има най-малко 90 % хомоложна последователност на аминокиселинна последователност, избрана от групата, състояща се от SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 21.

4. Нуклеинова киселина съгласно претенция 3, при която кодиращият полипептид е SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 21.

5. Изолирана нуклеинова киселина, включваща нуклеотидна последователност, избрана от група, състояща се от SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 20.

6. Вектор, включващ инсерт, съдържащ нуклеиновата киселина съгласно всяка от претенциите от 1 до 5.

7. Гостоприемна клетка, включваща вектора съгласно претенция 6.

8. Метод за получаване на полипептид, характеризиращ се с това, че включва етапите: култивиране на гостоприемна клетка съгласно претенция 7 и изолиране на полипептида, експресиран от инсера в тези гостоприемни клетки.

9. Полипептид, кодиран от нуклеиновата киселина съгласно всяка от претенциите от 1 до 5.

10. Изолирано моноклонално антитяло, което се свързва към полипептид, избран от групата, състояща се от SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 21.

11. Антитяло съгласно претенция 10, при което антитялото се свързва към полипептида на SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 21.

12. Антитяло съгласно претенция 11, при което антитялото се произвежда от хибридома AA.FF9 или хибридома AA.GE7.3.

13. Състав, включващ (а) антитяло съгласно всяка от претенциите от 10 до 12, свързано към (b) токсин, контрастно съединение или радионуклид.

14. Слят белтък, включващ полипептид съгласно претенция 9, слят с имуноглобулин, токсин, контрастно съединение или радионуклид.

15. Използване на нуклеинова киселина съгласно всяка от претенциите от 1 до 5, полипептид съгласно претенция 9, вектор съгласно претенция 6, антитяло съгласно всяка от претенциите от 10 до 12, състав съгласно претенция 13 или слят белтък съгласно претенция 14 за лечение или диагностика.

Приложение: 10 фигури

201	AGACCGGGCGGCGGGCTTTGGATTTTGGGGGGGCGGGGACCAGCTGCGCGG	250
251	CGGCACCATGTTCTAGCCACTCTGTACTTCGCGCTGCCACTCCTGGATT	300
	M F L A T L Y F A L P L L D L	
301	TGCTGATGTCCGCCGAGSTGAGTGGTGGAGACCGTCTGGACTGTGTGAA	350
	L M S A E V S G G D R L D C V K	
351	GCCAGCGATCAGTGCCTGAAGGAACAGAGCTGCAGCACCAAGTACCGCAC	400
	A S D Q C L K E Q S C S T K Y R T	
401	ACTAAGGCAGTGCCTGGCGGGCAAGGAAACCAACTTCAGCCTGACATCCG	450
	L R Q C V A G K E T N F S L T S G	
451	GCCTTGAGGCCAAGGATGAGTGCCTGAGCGCCATGGAGGCCCTTGAAGCAG	500
	L E A K L E C R S A M E A L K Q	
501	AAGTCTCTGTACAACTGCCGCTGCAGCGGGGCGCATGAAGAAAGAGAAGAA	550
	K S L Y N C R C K R G M H K E H N	
551	TTGTCTGCGTATCTACTGGAGCATGTACCAGAGCCTGCAGGGAAATGACC	600
	C L R I Y W S M Y Q S L Q G N D L	
601	TCCTGGAAGATTCCCCGATGAGCGCGTTAACAGCAGGTTGTTCAGATATA	650
	L E D S P Y E P V N S R L S D I	
651	TTCCGGGCAAGTCCCGTTTCATATCAGATGTTTTCCAGCAAGTGGAAACACAT	700
	F R A V P F I S D V F Q Q V E H I	
701	TTCCAAAGGGAACAACTGCCCTGGAGCGCAGCCAAAGGCCTGCACCTGGAGC	750
	S K G N N C L E A A K A C K L D D	
751	ACACCTGTAAGAAGTACAGGTCCGCGCTACATCACCGCCTGCAGCACCAGC	800
	T C K K Y R S A Y I T L P C T T S	
801	ATGTCCAACGAGGTCTGCAACCGCGCTAAGTGGCACAAGGCCCTCAGGCA	850
	M S N E V C N R R K C H K A L R Q	
851	GTTCTTCGACAAGGTTCCGGCCAAGCACAGCTACGGGATGCTCTTCTGCT	900
	F F D K V P A K H S Y G M L F C S	
901	CCTGCCGGGACATCGCCTGCACCGAGCGGCGGCGACAGACTATCGTCCCC	950
	C R D I A C T E R R R Q T I V P	
951	GTGTGCTCCTATGAAGAACGAGAGAGGCCCAACTGCCTGAGTCTGCAAGA	1000
	V C S Y E E R E R P N C L S L Q D	
1001	CTCCTGCAAGACCAATTACATCTGCAGATCTCGCCTTGCAGATTTTTTTA	1050
	S C K T N Y I C R S R L A D F F T	
1051	CCAACTGCCAGCCAGAGTCAAGGTCTGTCAGCAACTGTCTTAAGGAGAAC	1100
	N C Q P E S R S V S N C L K E N	
1101	TACGCAGACTGCCTCCTGGCCTACTCGGGACTGATTGGCACAGTCATGAC	1150
	Y A D C L L A Y S G L I G T V M T	

ФИГ. 1a

1151	TCCCAACTACGTAGACTCCAGCAGCCTCAGCGTGGCACCATGGTGTGACT	1200
	P N Y V D S S S L S V A P W C D C	
1201	GCAGCAACAGCGGCAATGACCTGGAAGACTGCTTGAAATTTCTGAATTTT	1250
	S N S G N D L E D C L K F L N F	
1251	TTTAAGGACAATACTTGTCTCAAAAATGCAATTCAAGCCTTTGGCAATGG	1300
	F K D N T C L K E A I Q A F G N G	
1301	CTCAGATGTGACCATGTGGCAGCCAGCCCTCCAGTCCAGACCACCACTG	1350
	S D V T M W Q P A P P V Q T T T A	
1351	CCACCACTACCACTGCCTTCCGGGTCAAGAACAGCCTCTGGGGCCAGCA	1400
	T T T T A F R V K N K P L G P A	
1401	GGGTCTGAGAATGAGATCCCCACACAGCTTTTACCACCCCTGTGCGAATTT	1450
	G S E N E I P T H V L P P C A K L	
1451	GCAGGCTCAGAAGCTGAAATCCAAATGTGTGGGTAGCACACACCTCTGTC	1500
	Q A Q K L K S N V S G S T H L C L	
1501	TTTCTGATAGTGATTTCCGAAAGGATGCTCTCCCTGGTGCCTCCAGCCAC	1550
	S D S D F G K D G L A G A S S H	
1551	ATAACCACAAAATCAATGGCTGCTCCTCCAGCTGCAGTCTGAGCTCACT	1600
	I T T K S M A A P P S C S L S S L	
1601	GCCGGTGCTGATGCTCACCCGCCCTTGCCTGCCCTGTTATCTGTATCGTTGG	1650
	P V L M L T A L A A L L S V S L A	
1651	CAGAAACGTGCTAGCTGCATCCGGGAAACAGTATGAAAAGACAAAAGAG	1700
	E T S	

ФИГ. 1b

1	CTGCTGGAGGATTCCCATATGAACCACTTAACAGCAGATTGTCAGATAT	50
	L L E D S P Y E P V N S R L S D I	
51	ATTCCGGGTGGTCCCATTATATCAGTGGAGCACATTCCCAAAGGGAACA	100
	F R V V P F I S V E H I P K G N N	
101	ACTGCCTGGATGCAGCGAAGGCCTGCAACCTCGACGACATTTGCAAGAAG	150
	C L D A A K A C N L D D I C K K	
151	TACAGGTCGGCGTACATCACCCCGTGCACCACCAGCGTGTCCAACGATGT	200
	Y R S A Y I T P C T T S V S N D V	
201	CTGCAACCGCCGCAAGTGCCACAAGGCCCTCCGGCAGTTCTTTGACAAGG	250
	C N R R K C H K A L R Q F F D K V	
251	TCCCGGCCAAGCACAGCTACGGAATGCTCTTCTGCTCCTGCCGGGACATC	300
	P A K H S Y G M L F C S C R D I	
301	GCCTGCACAGAGCGGAGGCGACAGACCATCGTGCCTGTGTGCTCTTATGA	350
	A C T E R E R Q T I V P V C S Y E	
351	AGAGAGGGAGAGCCCAACTGTTTGAATTTGCAGGACTCCTGCAGACGA	400
	E R E K P N C L N L Q D S C K T N	
401	ATTACATCTGCAGATCTCGCCTTGCGGATTTTTTTTACCAACTGCCAGCCA	450
	Y I C R S R L A D F F T N C Q F	
451	GAGTCAAGGTCTGTGAGCAGCTGTCTAAGGAAACTACGCTGACTGCCT	500
	E S R S V S S C L K E N Y A D C L	
501	CCTCGCCTACTCGGGGCTTATTTGGCAGAGTCATGACCCCCAACTACATAG	550
	L A Y S G L I G T V M T P N Y I D	
551	ACTCCAGTAGCCTCAGTGTGGCCCCATGGTGTGACTGCAGCAACAGTGGG	600
	S S S L S V A F W C D C S N S G	
601	AACGACCTAGAAGAGTGCCTTGAATTTTTTGAATTTCTTCAAGGACAATAC	650
	N D L E E C L K F L N F F K D N T	
651	ATGTCTTAAAAATGCAATTCAAGCCTTTGGCAATGGCTCCGATGTGACCG	700
	C L K N A I Q A F G N G S D V T V	
701	TGTGGCAGCCAGCCTTCCCAGTACAGACCACCACTGCCACTACCACCACT	750
	W Q P A F P V Q T T T A T T T T	
751	GCCCTCCGGGTTAAGAACAAAGCCCCTGGGGCCAGCAGGGTCTGAGAATGA	800
	A L R V K N K P L G P A G S E N E	
801	AATTCCCACTCATGTTTTTGCCACCGTGTGCAAATTTACAGGCACAGAAGC	850
	I P T H V L P P C A N L Q A Q K L	
851	TGAAATCCAATGTGTGCGGGCAATACACACCTCTGTATTTCCAATGGTAAT	900
	K S N V S G N T H L C I S N G N	

ФИГ. 2А-1

901	TATGAAAAAGAAGGTCTCGGTGCTTCCAGCCACATAACCAAAAATCAAT	950
	Y E K E G L G A S S H I T T K S M	
951	GGCTGCTCCTCCAAGCTGTGGTCTGAGCCCACTGCTGGTCCTGGTGGTAA	1000
	A A P P S C G L S P L L V L V V T	
1001	CCGCTCTGTCCACCCTATTATCTTTAACAGAAACATCATAGCTGCATTAA	1050
	A L S T L L S L T E T S	
1051	AAAAATACAATATGGACATGTAAAAAGACAAAAACCAAGTTATCTGTTTC	1100
1101	CTGTTCTCTTGTATAGCTGAAATTCAGTTTAGGAGCTCAGTTGAGAAAC	1150
1151	AGTTCCATTCAACTGGAACATTTTTTTTTTTTCTTTTAAGAAAGCTTCT	1200
1201	TGTGATCCTTCGGGGCTTCTGTG	1223

ФИГ. 2А-2

1	GGGCGGCCAGAGCAGCACAGCTGTCCGGGGATCGCTGCATGCTGAGCTCC	50
51	CTCGGCAAGACCCAGCGGCGGCTCGGGATTTTTTTGGGGGGGGCGGGGACC	100
101	AGCCCCGCGCGCGGACCATGTTCCCTGGCGACCCTGTACTTCGCGCTGCCG M F L A T L Y F A L P	150
151	CTCTTGGACTTGTCTCCTGTCCGCCGAAGTGAGCGGCGGAGACCGCCTGGA L L D L L L S A E V S G G D R L D	200
201	TTGCGTGAAGGCCAGTGATCAGTGCCTGAAGGAGCAGAGCTGCAGCACCA C V K A S D Q C L K E Q S C S T K	250
251	AGTACCCACGCTTAAGCAGTGCCTGGCGGGCAAGGAGACCAACTTCAGC Y R T L R Q C V A G K E T N F S	300
301	CTGGCATCCGGCTGGAGGCCAAGGATGAGTGCCTGCAGCGCCATGGAGGC L A S G L E A K D E C R S A M E A	350
351	CCTGAAGCAGAACTGCCTGTACAACTGCCGCTGCAGCGGGGTATGAAGA L K Q K S L Y N C R C K R G M K K	400
401	AGGAGAAAGAACTGCCTGCCGATTACTGGAGCATGTACCAGAGCCTGCAG E K N C L R I Y W S M Y Q S L Q	450
451	GGAAATGATCTGCTGGAGGATTCGCCATATGAACCACTTAACAGCAGATT G N D L L E D S P Y E P V N S R L	500
501	GTCAGATATATTCCGGGTGCTCCCATTCATATCAGTGGAGCACATTCCCA S D I F R V V P F I S V E H I P K	550
551	AAGGGAACAACTGCCTGGATGCAGCGAAGGCCTGCAACCTGCAGCAGATT G N K C L D A A K A C N L D D I	600
601	TGCAAGAAAGTACAGCTCGGCGTACATCACCCCGTGCACCAACCAGCGTGT C K K Y R S K Y I T P C T T S V S	650
651	CAACGATGTCTGCAACCGCCGCAAGTGCCACAAGGCCCTCCGGCAGTTCT N D V C N R R K C H K A L R Q F F	700
701	TTGACAAGSTCCCGGCCAAGCACAGCTACGGAATGCTCTTCTGCTCCTGC D K V P A K H S Y G M L F C S C	750
751	CGGGACATCGCCTGCACAGAGCGGAGGCGACAGACCATCGTGCCTGTGTG R D I A C T E R R R Q T I V P V C	800
801	CTCCTATGAAGAGAGGGGAGAAGCCCAACTGTTTGAATTTGCAGGACTCCT S Y E E R E K P N C L N L Q D S C	850
851	GCAAGACGAATTACATCTGCAGATCTCGCCTTGCGGATTTTTTTACCAAC K T N Y I C R S R L A D F F T N	900
901	TGCCAGCCAGAGTCAAGGTCTGTGAGCAGCTGTCTAAAGGAAAACCTACGC C Q P E S R S V S S C L K E N Y A	950

ФИГ. 2В-1

951	TGACTGCCTCCTCGCCTACTCGGGGCTTATTGGCACAGTCATGACCCCCA D C L L A Y S G L I G T V M T P N	1000
1001	ACTACATAGACTCCAGTAGCCTCACTGTGGCCCCATGGTGTGACTGCAGC Y I D S S S L S V A P W C D C S	1050
1051	AACAGTGGGAACGACCTAGAAGAGTGCTTGAAATTTTTGAATTTCTTCAA N S G N D L E E C L K F L N F F K	1100
1101	GGACAATACATGTCTTAAAAATGCAATTCAAGCCTTTGGCAATGGCTCCG D N T C L K N A I Q A F G N G S D	1150
1151	ATGTSACCGTGTGGCAGCCAGCCTTCCCACTACAGACCACCACTGCCACT V T V W Q P A F P V Q T T T A T	1200
1201	ACCACCACTGCCCTCCGGGTTAAGAACAAGCCCCCTGGGGCCAGCAGGCTC T T T A L R V K N K F L S F A G S	1250
1251	TGAGAATGAAATTCCTCACTCATGTTTTGCCACCGTGTGCAATTTACAGG E N E I F T H V L P P C A N L Q A	1300
1301	CACAGAAGCTGAAATCCAATGTGTGGGGCAATACACACCTCTGTATTTCC Q K L K S N V S G N T H L C I S	1350
1351	AATGGTAATTATGAAAAAGAAGGTCTCGGTGCTTCCAGCCACATAACCA N G N Y E K E G L G A S S H I T T	1400
1401	AAAATCAATGGCTGCTCCTCCAAGCTGTGGTCTGAGCCCCACTGCTGGTCC K S M A A P P S C G L S P L L V L	1450
1451	TGGTGSTAACCGCTCTGTCCACCCCTATTATCTTTAACAGAAACATCATAG V V T A L S T L L S L T E E S	1500
1501	CTGCATTAAAAAATACAATATGGACATGTAAAAAGACAAAAACCAAGTT S	1550
1551	ATCTGTTTCCTGTTCTCTTGTATAGCTGAAATTCAGTTTAGGAGCTCAG	1600
1601	TTGAGAAACAGTTCCATTCAACTGGAACATTTTTTTTTTTTCTTTTAAG	1650
1651	AAAGCTTCTTGTGATCCTTCGGGGCTTCTGTG	1682

ФИГ. 25-2

```

1  GGGCGGCCAGAGCAGCACAGCTGTCCGGGGATCGCTGCATGCTGAGCTCC 50
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
143 GAGTGGCCAGAGGAGCGCAGTCGCCCCGGGGATCGCTGCACGCTGAGCTCT 192
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
51  CTCGGCAAGACCCAGCGGCGGCTCGGGATTTTTTTGGGGGGGCGGGGACC 100
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
193 CTCCCCGAGACCGGGCGGCGGCTTTGGA...TTTTGGGGGGGCGGGGACC 239
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
101 AGCCCCGCGCCGGCACCATGTTCTTGGCGACCCTGTACTTTCGCGCTGCCG 150
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
240 AGCTGCGCGGCGGCGCACCATGTTCTTAGCCACTCTGTACTTTCGCGCTGCCA 289
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
151 CTCTTGGACTTGCTCCTGTGGGCCGAAGTGAGCGCGGAGACCGCCTGGA 200
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
290 CTCTTGGATTTCTGTATGTCCGCGGAGGTGAGTGCTGAGACCGCTCTGGA 339
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
201 TTGCGTGAAAGCCAGTGATCACTGCGCTGAAGGAGCGAGCTGCAGCAGCA 250
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
340 CTGTGTGAAAGCCAGCGATCACTGCGCTGAAGGAGCGAGCTGCAGCAGCA 389
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
251 AGTACCGCACGCTAAGGCAGTGCGTGGCGGGCAAGGAGCGAGCTGCAGC 300
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
390 AGTACCGCACGCTAAGGCAGTGCGTGGCGGGCAAGGAGCGAGCTGCAGC 439
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
301 CTGGCATCCGGCCTGGAGGCCAAGGATGAGTGCGCGCAGCGCCATGGAGGC 350
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
440 CTGACATCCGGCCTGGAGGCCAAGGATGAGTGCGCGCAGCGCCATGGAGGC 489
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
351 CCTGAAGCAGAAGTCGCTCTACAACCTGCCGCTGCAGCGCGGGTATGAAGA 400
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
490 CTTGAAGCAGAAGTCTCTGTACAACCTGCCGCTGCAGCGCGGGTATGAAGA 539
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
401 AGGAGAAGAACTGCGCTGCGCATTTACTGGAGCATGTACCAAGAGCCTGCAG 450
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
540 AAGAGAAGAAATTGTCTGCGTATCTACTGGAGCATGTACCAAGAGCCTGCAG 589
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
451 GGAAATGATCTGCTGGAGGATTCCCCATATGAACCAAGTTAACAGCAGATT 500
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
590 GGAAATGACCTCCTGGAAGATTCCCCGTATGAGCCGCTTAACAGCAGGTT 639
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
501 GTCAGATATATTCCGGGTGGTCCCATTTCATATC.....AG 535
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
640 GTCAGATATATTCCGGGCAGTCCCGTTTCATATCAGATGTTTTCCAGCAAG 689
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
536 TGGAGCACATTCCCAAAGGGAACAACCTGCCTGGATGCAGCGAAGGCCTGC 585
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
690 TGGAACACATTTCCAAAGGGAACAACCTGCCTGGACGCAGCCAAGGCCTGC 739
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
586 AACCTCGACGACATTTGCAAGAAGTACAGGTGGGCGTACATCACCCCGTG 635
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
740 AACCTGGACGACACCTGTAAGAAGTACAGGTGGGCGTACATCACCCCGTG 789
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
636 CACCACCAGCGTGTCCAACGATGTCTGCAACCGCCGCAAGTGCCACAAGG 685
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
790 CACCACCAGCATGTCCAACGAGGTCTGCAACCGCCGTAAGTGCCACAAGG 839
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||

```

ФИГ. 3А-1

```

686 CCCTCCGGCAGTTCTTTGACAAGGTCCCGGCCAAGCACAGCTACGGAATG 735
      |||||
840 CCCTCAGGCAGTTCTTCGACAAGGTCCCGGCCAAGCACAGCTACGGGATG 889
      |||||
736 CTCTTCTGCTCCTGCCGGGACATCGCCTGCACAGAGCGGAGGCGACAGAC 785
      |||||
890 CTCTTCTGCTCCTGCCGGGACATCGCCTGCACCGAGCGGCGGCGACAGAC 939
      |||||
786 CATCGTGCCTGTGTGCTCCTATGAAGAGAGGGAGAAGCCCCAACTGTTTGA 835
      |||||
940 TATCGTCCCCGTGTGCTCCTATGAAGAACGAGAGAGGGCCCCAACTGCCTGA 989
      |||||
836 ATTTGCAAGGACTCCTGCAAGACGAATTACATCTGCAGATCTCGCCTTGCG 885
      |||||
990 GTCTGCAAGACTCCTGCAAGACCAATTACATCTGCAGATCTCGCCTTGCA 1039
      |||||
886 GATTTTTTTTACCAACTGCCAGCCAGAGTCAAGGTCTGTGAGCAGCTGTCT 935
      |||||
1040 GATTTTTTTTACCAACTGCCAGCCAGAGTCAAGGTCTGTGAGCAACTGTCT 1089
      |||||
936 AAAGGAAAACCTACGCTGACTGCCTCCTCGCCTACTCGGGCTTATTGGCA 985
      |||||
1090 TAAGGAGAACTACGCAGACTGCCTCCTGGCCTACTCGGGACTGATTGGCA 1139
      |||||
986 CAGTCATGACCCCAACTACATAGACTCCAGTAGCCTCAGTGTGGCCCCA 1035
      |||||
1140 CAGTCATGACTCCCAACTACATAGACTCCAGTAGCCTCAGCCTGGCACC 1189
      |||||
1036 TGGTGTGACTGCAGCAACAGTGGGAACGACCTAGAAGAGTGTCTGAAATT 1085
      |||||
1190 TGGTGTGACTGCAGCAACAGCGGCAATGACCTGGAAGACTGTCTGAAATT 1239
      |||||
1086 TTTGAATTTCTTCAAGGACAATACATGTCTTAAAAATGCAATTCAAGCCT 1135
      |||||
1240 TCTGAATTTTTTAAAGGACAATACTTGTCTCAAAAATGCAATTCAAGCCT 1289
      |||||
1136 TTGGCAATGGCTCCGATGTGACCGTGTGGCAGCCAGCCTTCCCAGTACAG 1185
      |||||
1290 TTGGCAATGGCTCAGATGTGACCATGTGGCAGCCAGCCCCTCCAGTCCAG 1339
      |||||
1186 ACCACCACTGCCACTACCACCACTGCCCTCCGGGTAAAGAACAAGCCCCT 1235
      |||||
1340 ACCACCACTGCCACTACCACCACTGCCCTCCGGGTCAAGAACAAGCCTCT 1389
      |||||
1236 GGGGCCAGCAGGGTCTGAGAATGAAATTCCCACTCATGTTTTGCCACCGT 1285
      |||||
1390 GGGGCCAGCAGGGTCTGAGAATGAGATCCCCACACACGTTTTACCACCCT 1439
      |||||
1286 GTGCAAATTTACAGGCACAGAAGCTGAAATCCAATGTGTGCGGCAATACA 1335
      |||||
1440 GTGCGAATTTGCAGGCTCAGAAGCTGAAATCCAATGTGTGCGGTAGCACA 1489
      |||||
1336 CACCTCTGTATTTCCAATGGTAATTATGAAAAAGAAGGTCTC...GGTGC 1382
      |||||
1490 CACCTCTGTCTTTCTGATAGTGATTTTCGGAAGGATGGTCTCGCTGGTGC 1539
      |||||

```

ФИГ. 3А-2


```

1383 TTCCAGCCACATAACCACAAAATCAATGGCTGCTCCTCCAAGCTGTGGTC 1432
      |||||
1540 CTCCAGCCACATAACCACAAAATCAATGGCTGCTCCTCCCAGCTGCAGTC 1589
      |||||
1433 TGAGCCCACTGCTGCTCCTGGTGGTAACCGCTCTGTCCACCCTATTATCT 1482
      |||||
1590 TGAGCTCACTGCCGGTGCTGATGCTACCGCCCTTGCTGCCCTGTTATCT 1639
      |||||
1483 .....TTAACAGAAACATCATAGCTGCATTAAAAAAATACAATATGGAC 1526
      |||||
1640 GTATCGTTGGCAGAAACGTCGTAGCTGCATCCGGGAAA.ACAGTATG... 1685
      |||||
1527 ATGTAAAAGACAAA....AACCAAGTTATCTGTTTCCTGTTCTCTTGTA 1572
      |||||
1686 .....AAAAGACAAAAGAGAACCAAGTATTCTG.TCCCTGTCTCTTGTA 1729
      |||||
1573 TAGCTGAAATTCCAG.TTTAGGAGCTCAGTTGAGAAACAGTTCCATTCAA 1621
      |||||
1730 TATCTGAAAATCCAGTTTTTAAAGCTCCGTTGAGAAGCAGTTTCACCCAA 1779
      |||||
1622 CTGGAACATTTTTTTTTTTTCCTTTTAAAGAAAGCTTCTTGTGATCCTTCG 1671
      |||||
1780 CTGGAAC....TCTTTCTCTGTTTTTAAAGAAAG...CTTGTGGCCCTCAG 1822
      |||||
1672 GGGCTTCTGT 1681
      |||||
1823 GGGCTTCTGT 1832

```

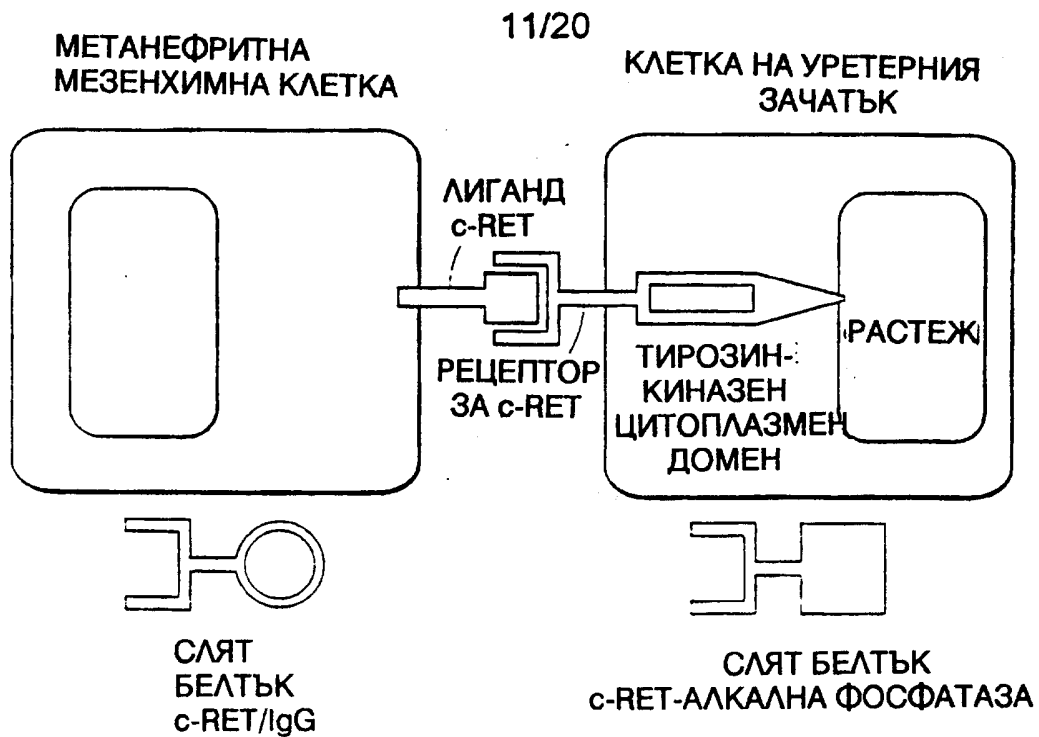
ФИГ. 3А-3

```

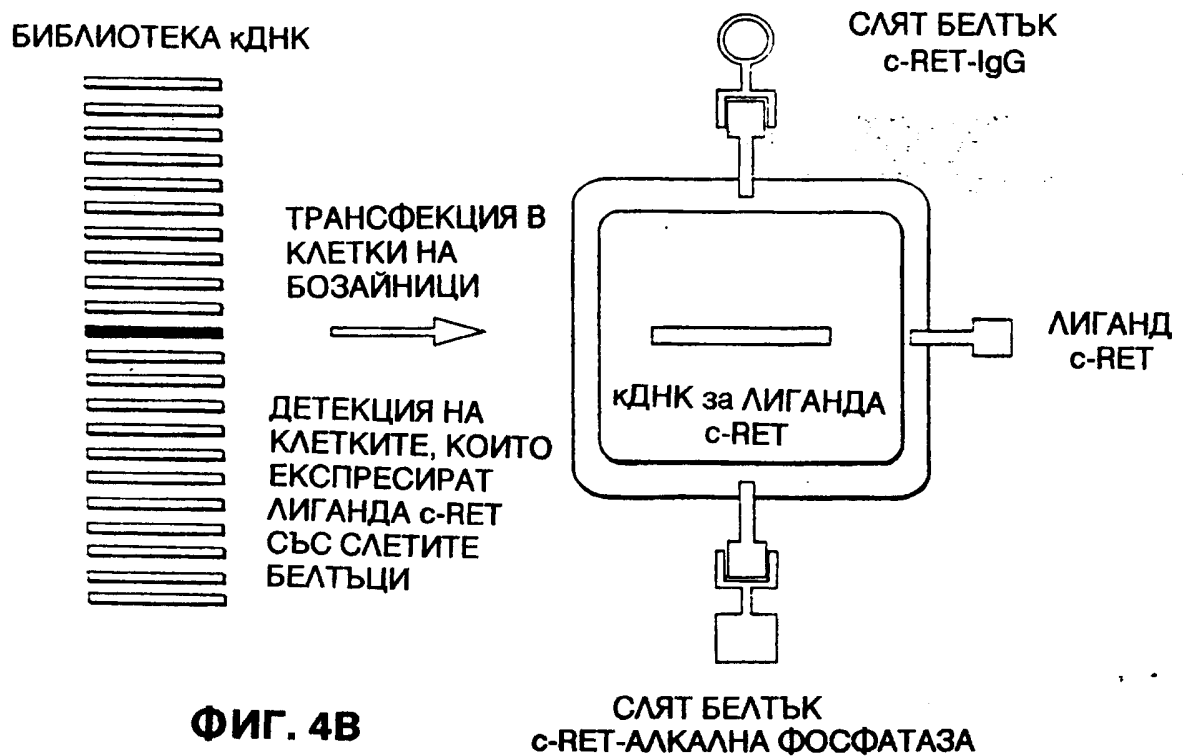
1 MFLATLYFALPLDLLLSAEVSGGDRLCDVKASDQCLKEQSCSTKYRTL 50
1 MFLATLYFALPLDLLMSAEVSGGDRLCDVKASDQCLKEQSCSTKYRTL 50
51 QCVAGKETNFSLASGLEAKDECRSAMEALKQKSLYNCRCKRGMKKEKNCL 100
51 QCVAGKETNFSLSGLEAKDECRSAMEALKQKSLYNCRCKRGMKKEKNCL 100
101 RIYWSMYQSLQGNLLEDSPYEPVNSRLSDIFRVVPFIS.....VEHIPK 145
101 RIYWSMYQSLQGNLLEDSPYEPVNSRLSDIFRAVPFISDVFOQVEHISK 150
146 GNNCLDAAKACKLEDDCKHYRSAYITPCTTSVSNVNCNRKCHKALRQFF 195
151 GNNCLDAAKACKLEDDCKHYRSAYITPCTTSMNEVNCNRKCHKALRQFF 200
196 DKVPAKHSYGMKFCSCRDIACTERRRQTIVPVCSYEEREKPNCLNLQDSC 245
201 DKVPAKHSYGMKFCSCRDIACTERRRQTIVPVCSYEERERPNCLSLQDSC 250
246 KTNVICRSRLADFFTNQQPESRSVSSCLKENYADCLLAYSGLIGTVMTPN 295
251 KTNVICRSRLADFFTNQQPESRSVSNCLKENYADCLLAYSGLIGTVMTPN 300
296 YIDSSSLSVAPWDCSNSGNDLEELKFLNFFKDNCLKNAIQAFNGSD 345
301 YVDSSSLSVAPWDCSNSGNDLEDCLKFLNFFKDNCLKNAIQAFNGSD 350
346 VTWVQPAFPVQTTTATTTTALRVKNKPLGPAGSENEIPTHVLPPCANLQA 395
351 VTWVQPAFPVQTTTATTTTAFRVKNKPLGPAGSENEIPTHVLFPKANLQA 400
396 QKLKSNVSGNTHLCLSNQNYEKEGLGASSHITTKSMAAPPSCGLSPLL 444
401 QKLKSNVSGSTHLC LSDSDFGKDGLAGASSHITTKSMAAPPSCSLSSLPV 450
445 LVVTALSTLL..SLTETS 460
451 LMLTALAALLSVSLAETS 468

```

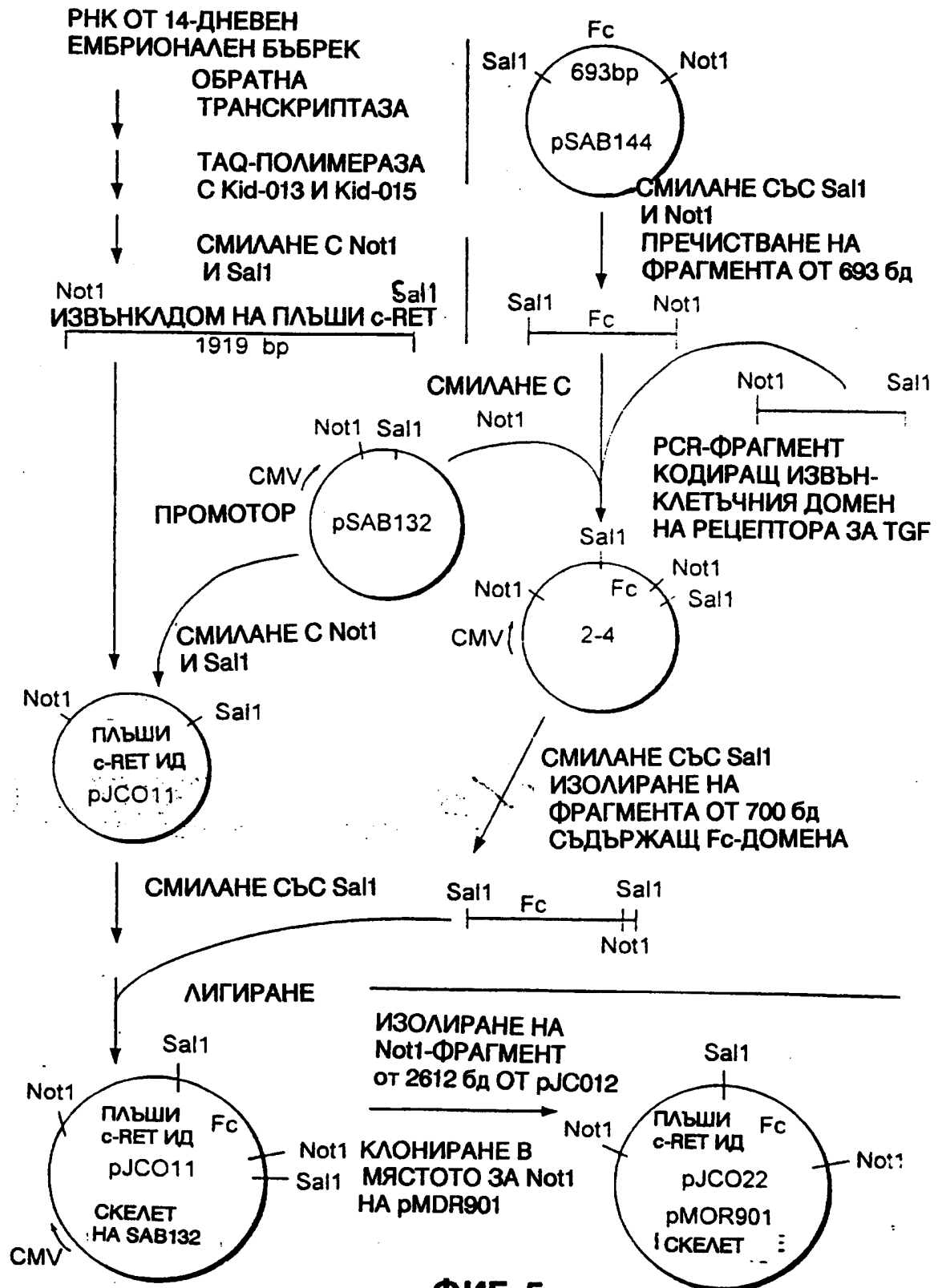
ФИГ. 3В



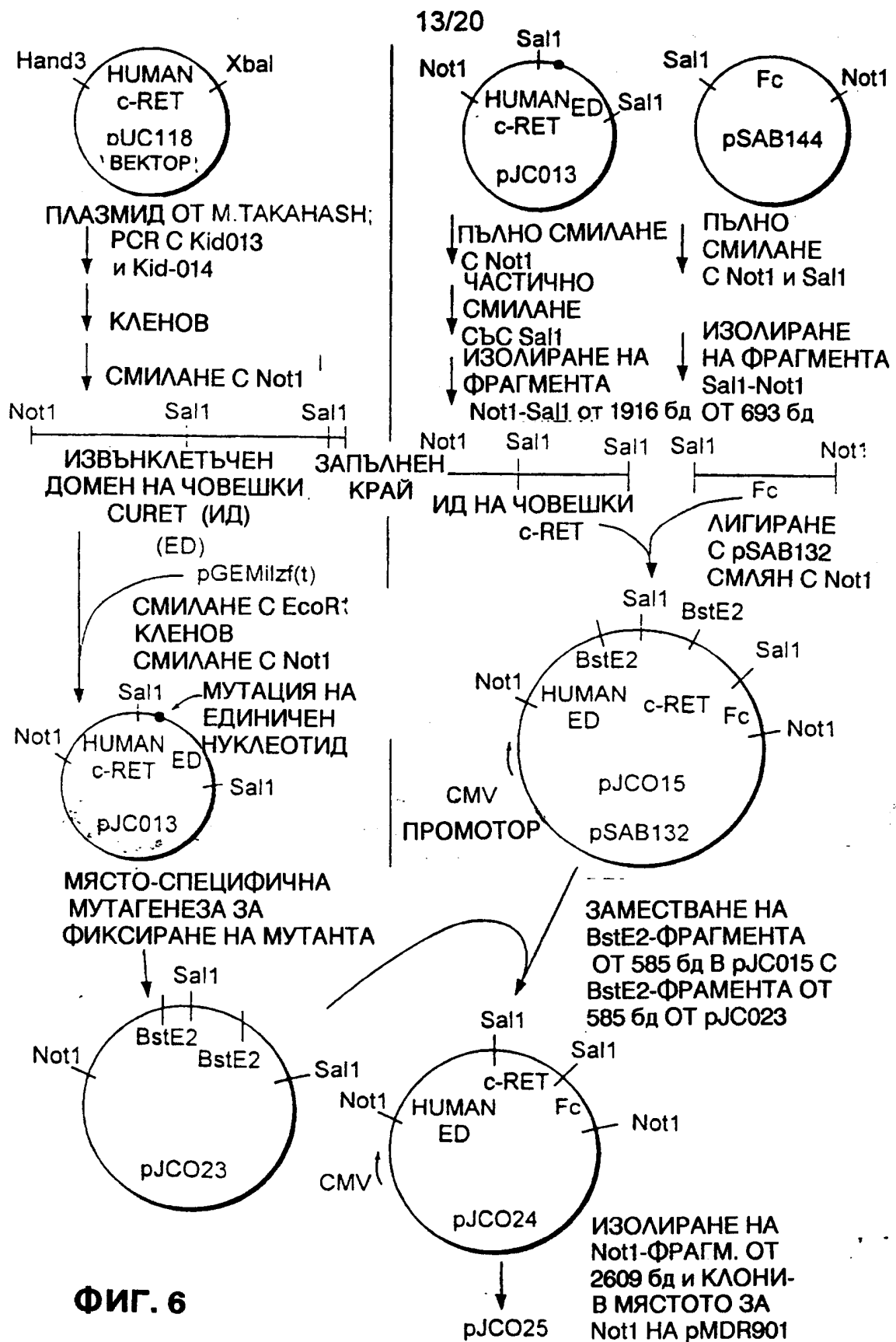
ФИГ. 4А



ФИГ. 4В



ФИГ. 5



ФИГ. 6

1	AAAAAACGGTGGGATTTATTTAACATGATCTTGGCAAACGTCTTCTGCCT	50
	M I L A N V F C L	
51	CTTCTTCTTTCTAGACGAGACCCTCCGCTCTTTGGCCAGCCCTTCCTCCC	100
	F F F L D E T L R S L A S P S S L	
101	TGCAGGGCCCCGAGCTCCACGGCTGGCGCCCCCAGTGGACTGTGTCCGG	150
	Q G P E L H G W R P P V D C V R	
151	GCCAATGAGCTGTGTGCCGCCGAATCCAACCTGCAGCTCTCGCTACCGCAC	200
	A N E L C A A E S N C S S R Y R T	
201	TCTGCGGCAGTGCCTGGCAGGCCGCGACCGCAACACCATGCTGGCCAACA	250
	L R Q C L A G R D R N T M L A N K	
251	AGGAGTGCCAGGCGGCCCTTGGAGGTCTTGCAGGAGAGCCCCGCTGTACGAC	300
	E C Q A A L E V L Q E S P L Y D	
301	TGCCGCTGCAAGCGGGGCATGAAGAAGGAGCTGCAGTGTCTGCAGATCTA	350
	C R C K R G M K K E L Q C L Q I Y	
351	CTGGAGCATCCACCTGGGGCTGACCGAGGGGTGAGGAGTTCTACGAAGCCT	400
	W S I H L G L T E G E E F Y E A S	
401	CCCCCTATGAGCCGGTGACCTCCCGCCTCTCGGACATCTTCAGGCTTGCT	450
	P Y E P V T S R L S D I F R L A	
451	TCAATCTTCTCAGGGACAGGGGCAGACCCGGTGGTCAGCGCCAAGAGCAA	500
	S I F S G T G A D P V V S A K S N	
501	CCATTGCCTGGATGCTGCCAAGGCCTGCAACCTGAATGACAACTGCAAGA	550
	H C L D A A K A C N L N D N C K K	
551	AGCTGCGCTCCTCCTACATCTCCATCTGCAACCCGAGATCTCGCCCAAC	600
	L R S S Y I S I C N R E I S P T	
601	GAGCGCTGCAACCGCCGCAAGTGCCACAAGGCCCTGCGCCAGTTCTTCGA	650
	E R C N R R K C H K A L R Q F F D	
651	CCGGGTGCCCAGCGAGTACACCTACCGCATGCTCTTCTGCTCCTGCCAAG	700
	R V P S E Y T Y R M L F C S C Q D	
701	ACCAGGCGTGCGCTGAGCGCCGCGGCAAACCATCCTGCCAGCTGCTCC	750
	Q A C A E R R R Q T I L P S C S	
751	TATGAGGACAAGGAGAAGCCCAACTGCCTGGACCTGCGTGCGTGTGCCG	800
	Y E D K E K P N C L D L R G V C R	
801	GACTGACCACCTGTGTGGTCCCGGCTGGCCGACTTCCATGCCAATTGTC	850
	T D H L C R S R L A D F H A N C R	

ФИГ. 7а

851	GAGCCTCCTACCAGACGGTCACCAGCTGCCCTGCGGACAATTACCAGGCG	900
	A S Y Q T V T S C P A D N Y Q A	
901	TGTCTGGGCTCTTATGCTGGCATGATTGGGTTTGACATGACACCTAACTA	950
	C L G S Y A G M I G F D M T P N Y	
951	TGTGGACTCCAGCCCCACTGGCATCGTGGTGTCCCCCTGGTGCAGCTGTC	1000
	V D S S P T G I V V S P W C S C R	
1001	GTGGCAGCGGGAACATGGAGGAGGAGTGTGAGAAGTTCCTCAGGGACTTC	1050
	G S G N M E E E C E K F L R D F	
1051	ACCGAGAACCCATGCCTCCGGAACGCCATCCAGGCCTTTGGCAACGGCAC	1100
	T E N P C L R N A I Q A F G N G T	
1101	GGACGTGAACGTGTCCCCAAAAGGCCCTCGTTCCAGGCCACCCAGGCC	1150
	D V N V S P K G P S F Q A T Q A P	
1151	CTCGGGTGGAGAAGACGCCCTTCTTTGCCAGATGACCTCAGTGACAGTACC	1200
	R V E K T P S L P D D L S D S T	
1201	AGCTTGGGGACCAAGTGTATCACCACCTGCACGTCTGTCCAGGAGCAGGG	1250
	S L G T S V I T T C T S V Q E Q G	
1251	GCTGAAGGCCAACAACCTCCAAAGAGTTAAGCATGTGCTTCACAGAGCTCA	1300
	L K A N N S K E L S M C F T E L T	
1301	CGACAAATATCATCCCAGGGAGTAACAAGGTGATCAAACCTAACTCAGGC	1350
	T N I I P G S N K V I K P N S G	
1351	CCCAGCAGAGCCAGACCGTCCGCTGCCTTGACCGTGCTGTCTGTCTCTGAT	1400
	P S R A R P S A A L T V L S V L M	
1401	GCTGAAACTGGCCTTGTAGGCTGTGGGAACCGAGTCAGAAGATTTTTTGAA	1450
	K L A L	
1451	AGCTAAGCAGACAAGAACAGCCGCTGACGAAATGGAACACACACAGAC	1500
1501	ACACACACACCTTGCAAAAAAAAAAATTGTTTTTCCCACCTTGTCTGCTGAA	1550
1551	CCTGTCTCTCTCCAGSTTTCTTCTCTGGAGAAGTTTTTGTAAACCAACA	1600
1601	GACAAGCAGGCAGGCAGCCTGAGAGCTGGCCCAGGGGTCCCCCTGGCAGGG	1650
1651	GAAACTCTGGTGCCGGGGAGGGCACGAGGCTCTAGAAATGCCCTTCACTT	1700
1701	TCTCCTGGTGTTTTTCTCTCTGGACCTTCTGAAGCAGAGACCGGACAAG	1750
1751	AGCCTGCAGCGGAAGGGACTCTGGGCTGTGCCTGAGGCTGGCTGGGGGCA	1800
1801	GGACAACACAGCTGCTTCCCCAGGCTGCCCACTCTGGGGACCCGCTGGGG	1850
1851	GCTGGCAGAGGGCATCGSTCAGCGGGGCAGCGGGGCTG	1886

ФИГ. 7b

88

1	CGCAGGCAGAGCGCTGTCGCATCCCGGGCGTCCACCCGCCATGGGGCTCT	50
	M G L S	
51	CCTGGAGCCC CGGACCTCCACTGCTGATGATCCTGCTACTGGTGCTGTG	100
	W S P R P P L L M I L L L V L S	
101	TTGTGGCTGCCACTTGGAGCAGGAAACTCCCTTGCCACAGAGAACAGGTT	150
	L W L P L G A G N S L A T E N R F	
151	TGTGAACAGCTGTACCCAGGCCAGAAAGAAATGCGAGGCTAATCCCGCTT	200
	V N S C T Q A R K K C E A N P A C	
201	GCAAGGCTGCCTACCAGCACCTGGGCTCCTGCACCTCCAGTTTAAGCAGG	250
	K A A Y Q H L G S C T S S L S R	
251	CCGCTGCCCTTAGAGGAGTCTGCCATGTCTGCAGACTGCCTAGAGGCAGC	300
	P L P L E E S A M S A D C L E A A	
301	AGAACAACCTCAGGAACAGCTCTCTGATAGACTGCAGGTGCCATCGGCGCA	350
	E Q L R N S S L I D C R C H R R M	
351	TGAAGCACCAAGCTACCTGTCTGACATTTTATTGGACCGTTCCACCTGCC	400
	K H Q A T C L D I Y W T V H P A	
401	CGAAGCCTTGGTGAAGTACGAGTTGGATGTCTCACCCCTATGAAGACACAGT	450
	R S L G D Y E L D V S P Y E D T V	
451	GACCAGCAAACCCTGGAATGAATCTTAGCAAGTTGAACATGCTCAAAC	500
	T S K P W K M N L S K L N M L K P	
501	CAGACTCGGACCTCTGCCTCAAATTTGCTATGCTGTGTACTCTTCACGAC	550
	D S D L C L K F A M L C T L H D	
551	AAGTGTGACCGCCTGCGCAAGGCTACGGGGAGGCATGCTCAGGGATCCG	600
	K C D R L R K A Y G E A C S G I R	
601	CTGCCAGCGCCACCTCTGCCTAGCCCAGCTGCGCTCCTTCTTTGAGAAGG	650
	C Q R H L C L A Q L R S F F E K A	
651	CAGCAGAGTCCCACGCTCAGGGTCTGCTGCTGTGTCCCTGTGCACCAGAA	700
	A E S H A Q G L L L C P C A P E	
701	GATGCGGGCTGTGGGGAGCGGCGCGTAACACCATCGCCCCAGTTGCGC	750
	D A G C G E R R R N T I A P S C A	
751	CCTGCCTTCTGTAAACCCCCAATTGCCTGGATCTGCGGAGCTTCTGCCGTG	800
	L P S V T P N C L D L R S F C R A	
801	CGGACCCTTTGTGCAGATCACGCTGATGGACTTCCAGACCCACTGTCTAT	850
	D P L C R S R L M D F Q T H C H	
851	CCTATGGACATCCTTGGGACTTGTGCAACTGAGCAGTCCAGATGTCTGCG	900
	P M D I L G T C A T E Q S R C L R	

ФИГ. 9a

901	GGCATACTGGGGCTGATTGGGACTGCCATGACCCCAA [·] ACTTCATCAGCA [·]	950
	A Y L G L I G T A M T P N F I S K	
951	AGGTCAACACTACTGTTGCCTTAAGCTGCACCTGCCGAGGCAGCGGCAAC [·]	1000
	V N T T V A L S C T C R G S G N	
1001	CTACAGGACGAGTGTGAACAGCTGGAAAGGTCCTTCTCCCAGAACCCTG [·]	1050
	L Q D E C E Q L E R S F S Q N P C	
1051	CCTCGTGGAGGCCATTGCAGCTAAGATGCGTTTCCACAGACAGCTCTTCT [·]	1100
	L V E A I A A K M R F H R Q L F S	
1101	CCCAGGACTGGGCAGACTCTACTTTTTTCAGTGGTGCAGCAGCAGAACAGC [·]	1150
	Q D W A D S T F S V V Q Q Q N S	
1151	AACCCTGCTCTGAGACTGCAGCCAGGCTACCCATTCTTTCTTTCTCCAT [·]	1200
	N P A L R L Q P R L P I L S F S I	
1201	CCTTCCCTTGATTCTGCTGCAGACCCTCTGCTAGCTGGGCTTCCTCAGGG [·]	1250
	L P L I L L Q T L W	
1251	TCCTTTGTCCTCTCCACCACACCCAGACTGATTTGCAGCCTGTGGTGGGA [·]	1300
1301	GAGAACTCGCCAGCCTGTGGAAGAAGACGCAGCGTGCTACACAGCAACCC [·]	1350
1351	GGAAACCAACCAGGCATTCCGCAGCACATCCCGTCTGCTCCAGAAGAGGTC [·]	1400
1401	TTAGAAGTGAGGGCTGTGACCCTTCGGATCCTGAGCGGCTAGTTTTCAA [·]	1450
1451	CCTCCCTTGCCCCTGCTTCCTTCTGGCTCAGGCTGCTCCTCCTTAGGACT [·]	1500
1501	TTGTGGSTCCAGTTTTGCCTTCTGTTCTGATGGTGATTAGCGGCTCACCT [·]	1550
1551	CCAGCGCTTCTTCCTGTTTCCAGGACCACCCAGAGGCTAAGGAATCAGT [·]	1600
1601	CATTCCCTGTTGCCTTCTCCAGGAAGGCAGGCTAAGGGTTCTGAGGTGAC [·]	1650
1651	TGAGAAAAATGTTTCCTTTGTGTGGAAGGCTGGTGCTCCAGCCTCCACGT [·]	1700
1701	CCCTCTGAATGGAAGATAAAAACCTGCTGGTGTCTTGACTGCTCTGCCAG [·]	1750
1751	GCAATCCTGAACATTTGGGCATGAAGAGCTAAAGTCTTTGGGTCTTGTTT [·]	1800
1801	AACTCCTATTACTGTCCCCAAATTCCTTAGTCCCTTGGGTCATGATTAA [·]	1850
1851	ACATTTTGACTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	1889

ФИГ. 9b

1	TGTGGACGCGCGCTTCGGAGTTGGAGGGCGGCGCCCAGGACCCTGGTGGG	50
51	AGAGTGTGTGCGTTCGCGCTGGAGGGCGGGAGGCGGGGGCGGGAGGTGCCG	100
101	GTCGAGGGAGCCCCGCTCTCAGAGCTCCAGGGGAGGAGCGAGGGGAGCGC	150
151	GGAGCCCGGCGCCTACAGCTCGCCATGGTGCGCCCCCTGAACCCGCGACC	200
	M V R P L N P R P	
201	GCTGCCGCCCCGTAGTCCTGATGTTGCTGCTGCTGCTGCCGCCCTCGCCGC	250
	L P P V V L M L L L L L P P S P L	
251	TGCCTCTCGCAGCCGCGAGACCCCTTCCCACAGAAAGCCGACTCATGAAC	300
	P L A A G D P L P T E S R L M N	
301	AGCTGTCTCCAGGCCAGGAGGAAGTGCCAGGCTGATCCCACCTGCAGTGC	350
	S C L Q A R R K C Q A D P T C S A	
351	TGCCTACCAACCTGSAATTCCTGCACCTCTAGCATAAGCACCCCACTGC	400
	A Y H H L D S C T S S I S T P L P	
401	CCTCAGAGGAGCCTTCGGTCCCTGCTGACTGCCTGGAGGCAGCACAGCAA	450
	S E E P S V P A D C L E A A Q Q	
451	CTCAGGAACAGCTCTCTGATAGGCTGCATGTGCCACCGGCGCATGAAGAA	500
	L R N S S L I G C M C H R R M K N	
501	CCAGGTTGCCTGCTTGGACATCTATTGGACCGTTACCGTGCCTGCGAGCC	550
	Q V A C L D I Y W T V H R A R S L	
551	TTGGTAACTATGAGCTGATGTCTCCCCCTATGAAGACACAGTGACCAGC	600
	G N Y E L D V S P Y E D T V T S	
601	AAACCCCTGGAAAATGAATCTCAGCAAACTGAACATGCTCAAACCCAGATC	650
	K P W K M N L S K L N M L K P D S	
651	AGACCTCTGCCTCAAGTTTGCCATGCTGTGTACTCTCAATGACAAGTGTG	700
	D L C L K F A M L C T L N D K C D	
701	ACCGGCTGCGCAAGGCCTACGGGGAGGCGTGCTCCGGGCCCCACTGCCAG	750
	R L R K A Y G E A C S G P H C Q	
751	CGCCACGTCTGCCTCAGGCAGCTGCTCACTTTCTTCGAGAAGGCCGCGGA	800
	R H V C L R Q L L T F F E K A A E	
801	GCCCCACGCGCAGGGCCTGCTACTGTGCCCATGTGCCCCAACGACCGGG	850
	P H A Q G L L L C P C A P N D R G	
851	GCTGCGGGGAGCGCCGGCGCAACACCATCGCCCCCACTGCGCGCTGCCG	900
	C G E R R R N T I A P N C A L P	
901	CCTGTGGCCCCCAACTGCCTGGAGCTGCGGCGCCTCTGCTTCTCCGACCC	950
	P V A P N C L E L R R L C F S D P	

ФИГ. 10а

951	GCTTTGCAGATCACGCCTGGTGGATTTCCAGACCCACTGCCATCCCATGG L C R S R L V D F Q T H C H P M D	1000
1001	ACATCCTAGGAACTTGTGCAACAGAGCAGTCCAGATGTCTACGAGCATA I L G T C A T E Q S R C L R A Y	1050
1051	CTGGGCTGATTGGGACTGCCATGACCCCCAACTTTGTCAATGTCAA L G L I G T A M T P N F V S N V N	1100
1101	CACCACTGTTGCCTTAAGCTGCACCTGCCGAGGCAGTGGCAACCTGCAGG T S V A L S C T C R G S G N L Q E	1150
1151	AGGASTGTGAAATGCTGGAAGGGTTCTTCTCCCACAACCCCTGCCTCAG E C E M L E G F F S H N P C L T	1200
1201	GAGGCCATTGCAGCTAAGATGCGTTTTTCACAGCCAACTCTTCTCCCAGGA E A I A A K M R F H S Q L F S Q D	1250
1251	CTGGCCACACCCCTACCTTTGCTGTGATGGCACACCAGAATGAAAACCCCTG W F H P T F A V M A H Q N E N P A	1300
1301	CTGTGAGGCCACAGCCCTGGGTGCCCTCTCTTTTCTCCTGCACGCTTCCC V R P Q P W V P S L F S C T L P	1350
1351	TTGATTCTGCTCCTGAGCCTATGGTAGCTGGACTTCCCCAGGGCCCTCTT L I L L L S L W	1400
1401	CCCCCTCCACCACACCCAGGTGGACTTGCAGCCCACAAGGGGTGAGGAAAG L I L L L S L W	1450
1451	GACAGCAGCAGGAAGGAGGTGCAGTGCAGCAGATGAGGGCAGGAGAAGC L I L L L S L W	1500
1501	TAAGGGTTATGACCTCCAGATCCTTACTGGTCCAGTCCCTCATTCCTCCA L I L L L S L W	1550
1551	CCCCCTCTCCACTTCTGATTTCATGCTGCCCTCCTTGGTGGCCACAATTT L I L L L S L W	1600
1601	AGCCATGTCATCTGGTGCCTGTGGGCCTTGCTTTATTCCTATTATTGTCC L I L L L S L W	1650
1651	TAAAGTCTCTCTGGGCTCTTGGATCATGATTAAACCTTTGACTTAAAAA	1699

ФИГ. 10b

Издание на Патентното ведомство на Република България
1113 София, бул. "Д-р Г. М. Димитров" 52-Б

Експерт: Д. Кацарова

Редактор: Е. Синкова

Пор. №

Тираж: 40 СР