

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2002-3953**
(22) Přihlášeno: **12.10.1995**
(30) Právo přednosti: **13.10.1994 US 1994/323340**
13.10.1994 US 1994/323475
07.06.1995 US 1995/487825
(40) Zveřejněno: **14.10.1998**
(Věstník č. 10/1998)
(47) Uděleno: **29.09.2006**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **15.11.2006**
(Věstník č. 11/2006)
(86) PCT číslo: **PCT/IB1995/000971**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1996/011949**

(11) Číslo dokumentu:

297 329

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. CL.:
C07K 14/50 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:
WO 95/01534; WO 90/0877; WO 95/03881; EP 0510662.

(73) Majitel patentu:
AMGEN INC., Thousand Oaks, CA, US
(72) Původce:
Morris Charles F., Newbury Park, CA, US
Kenney William C., Thousand Oaks, CA, US
Chen Bao-lu, San Ramon, CA, US
Hsu Eric W., Thousand Oaks, CA, US
(74) Zástupce:
JUDr. Karel Čermák jr., Ph.D., Národní třída 32, Praha
1, 11000

virové hepatitidy, toxických napadení jater, abraze rohovky,
progresivní choroby dásní a poškození ušního bubínku.
Způsob in vitro stimulace produkce těchto buněk podáním
tohoto analogu.

(54) Název vynálezu:
**Analog nativního keratinocytového růstového
faktoru kovalentně připojený k
polyethylenglykolu nebo příbuznému
vodorozpustnému organickému polymeru, jeho
použití a in vitro způsob stimulace produkce
nefibroblastových epitelových buněk**

(57) Anotace:
Analog nativního keratinocytového růstového faktoru KGF,
odpovídající aminokyselinám 32 až 194 SEQ ID NO: 2,
popřípadě spolu se signální sekvencí, kterým je deltaN23,
odpovídající SEQ ID NO: 58, v kteréžto sekvenci je počáteční
methioninový zbytek považován za zbytek v poloze "0" a
jedná se o zbytek fakultativní, přičemž tento analog je
kovalentně připojen k polyethylenglykolu nebo příbuznému
vodorozpustnému organickému polymeru. Použití tohoto
analogu pro výrobu léčiva pro stimulaci produkce
nefibroblastových epitelových buněk u pacienta, který to
potřebuje, přičemž tyto buňky jsou zvoleny z adnexálních
struktur, jaterních buněk, mukosálního epitelu respiračního
traktu nebo tympanových epitelových buněk nebo pro
stimulaci produkce takových buněk u pacienta za účelem
prevence nebo léčení stavu zvoleného ze souboru sestávajícího
z popálenin a jiných poranění v části nebo celé tloušťce tkáně,
epidermolysis bullosa, alopecie indukované chemoterapií,
plešatosti mužského typu, progresivní ztráty vlasů u mužů a
žen, žaludečních a dvanáctíkových vředů, zánětlivých chorob
střev, jako je Crohnova choroba a vředová kolitida, toxicity
spojené s radiačním a chemoterapeutickým ošetřením,
choroby hyalinní membrány, akutního a chronického
poškození plic, cirhózy jater; prudkého selhání jater, akutní

CZ 297329 B6

Analog nativního keratinocytového růstového faktoru kovalentně připojený k polyethylen-glykolu nebo příbuznému vodorozpustnému organickému polymeru, jeho použití a *in vitro* způsob stimulace produkce nefibroblastových epitelových buněk

5

Oblast techniky

Vynález se týká analogu nativního keratinocytového růstového faktoru, KGF, kovalentně připojeného k polyethylen-glykolu nebo příbuznému vodorozpustnému organickému polymeru, jeho použití a *in vitro* způsobu stimulace produkce nefibroblastových epitelových buněk.

10

Komplexní proces vytváření a regenerace pletiv je zprostředkován řadou proteinových faktorů, které jsou někdy označovány jako faktory růstu měkkých pletiv. Tyto molekuly jsou obecně uvolňovány jedním typem buněk a ovlivňují proliferaci jiných typů buněk. (Rubin et al. (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:802–806). Některé růstové faktory měkkých pletiv jsou vylučovány specifickými typy buněk a ovlivňují proliferaci, diferenciaci a/nebo zrání cílových buněk při vývoji vícebuněčných organismů. (Finch et al. (1989), Science, 245: 752–755). Navíc kromě jejich úlohy ve vyvíjejících se organismech jsou některé důležité pro udržení zdravého stavu vyzrálých systémů. Například u savců je mnoho systémů, kde dochází k rychlé obměně buněk. Takovéto systémy zahrnují kůži a gastrointestinální trakt, které jsou oba tvořeny epitelovými buňkami.

15

Do této skupiny růstových faktorů měkkých pletiv patří také rodina fibroblastových růstových faktorů (FGF).

25

V současné době je známo osm členů rodiny FGF (fibroblast growth factors), které vykazují příbuznost v primární struktuře: základní fibroblastový růstový faktor (basic fibroblast growth factor), bFGF (Abraham et al., (1986), EMBO J., 5:2523–2528); kyselý fibroblastový růstový faktor (acidic fibroblast growth factor), aFGF (Jaye et al. (1986), Science, 233–541–545); produkt int-2 genu, int-2 (Dickson & Peters (1987), Nature, 326:833); hst/kFGF (Delli-Bovi et al. (1987), Cell, 50:729–737 a Yoshida et al. (1987), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:7305–7309); FGF-5 (Zhan et al. (1988), Mol. Cell. Biol., 8:3487–3495), FGF-6 (Marics et al. (1989), Oncogene, 4:335–340); keratinocytový růstový faktor (keratinocyte growth factor) (Finch et al. (1989) Science, 24:752–755) a hisactophilin (Habazzetti et al. (1992), Nature, 359:855–858).

30

V rodině FGF proteinů je keratinocytový růstový faktor („KGF“) specifickým efektem proliferace nefibroblastových epitelových (zejména keratinocytových) buněk odvozených z mesenchymálních pletiv. Pojem „nativní KGF“ se vztahuje k přírodnímu lidskému (hKGF) nebo rekombinantnímu (rKGF) polypeptidu (se signální sekvencí nebo bez ní), jak je znázorněno sekvencí aminokyselin uvedených v SEQ ID NO:2 nebo v její alelické variantě. [Pokud není uvedeno jinak, číslování aminokyselin pro molekuly popsané v tomto dokumentu bude odpovídat prezentované konečné formě přirozené molekuly (tj. bez signální sekvence), jak je znázorněno aminokyselinami 32–194 SEQ ID NO:2.]

35

Přirozený KGF může být izolován z přirozených lidských zdrojů (hKGF) nebo produkován technikami rekombinantní DNA (rKGF) (Finch et al. (1989), viz předchozí text; Rubin et al. (1989), viz předchozí text; Ron et al. (1993), The Journal of Biological Chemistry, 268 (4): 2984–2988 a Yan et al. (1991), In Vitro Cell. Dev. Biol., 27A: 437–438.

45

Je známo, že přirozený KGF je ve vodném stavu poměrně nestabilní a že podléhá chemické a fyzikální degradaci, mající za následek ztrátu biologické aktivity během zpracování a skladování (Chen et al. (1994), Pharmaceutical Research, 11: 1582–1589). Přirozený KGF je také při zvýšených teplotách náchylný k agregaci a v kyselém prostředí se inaktivuje (Rubin et al. (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 802–806). Agregace nativního KGF ve vodných roztocích má za následek inaktivaci proteinu. To je nevýhodné, protože takováto ztráta aktivity činí skladování

50

vodných přípravků proteinů nativního KGF po delší časové období nebo manipulaci s proteiny v průběhu dalšího období nepraktickým. Navíc tento fakt způsobuje problémy při přípravě farmaceutických přípravků, protože agregované proteiny působí jako imunogeny (Cleland et al. (1993), Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems, 10: 307–377; Robbins et al. (1987), Diabetes, 36: 838–845 a Pinckard et al. (1967), Clin. Exp. Immunol., 2: 331–340).

Přirozený KGF obsahuje pět cysteinových zbytků – konkrétně se jedná o aminokyseliny 1, 15, 40, 102 a 106 (Finch et al. (1989), Science, 24: 752–755). Ačkoliv byl popsán obsah cysteinu v přirozeném KGF, nebyla dosud popsána role, kterou mají cysteinové zbytky na aktivitu (tzn. jejich nezbytnost pro biologickou aktivitu) a terciární strukturu (tzn. náchylnost k tvorbě nežádoucích disulfidových vazeb mezi molekulami nebo uvnitř molekul). Není proto žádný vzor, ze kterého by šlo odvodit, který cysteinový zbytek (jestli vůbec nějaký) je nezbytný, nebo jestli se účastní při tvorbě nežádoucích disulfidových vazeb, které způsobují náchylnost proteinu k nežádoucí agregaci a/nebo nestabilitě.

Pro vylepšení nebo změnu jedné nebo více charakteristik přirozeného KGF se může použít proteinové inženýrství. Pro modifikaci sekvence přirozeného KGF byla použita technologie rekombinantní DNA.

Ron et al. (1993), (J. Biol. Chem., 268(4): 2984–2988) popsali modifikované KGF polypeptidy bez 3, 8, 27, 38 nebo 49 aminokyseliny od N-konce. Peptidy postrádající 3, 8 nebo 27 residuum na N-konci byly plně aktivní, zatímco forma postrádající 27 residuum byla 10–20x méně mitogenní a formy bez aminokyselin 38 nebo 49 neměly mitogenní aktivitu. Stabilita modifikovaných polypeptidů nebyla diskutována nebo jinak popsána.

Publikovaná PCT přihláška WO 90/08771, viz předchozí text popisuje také tvorbu chimérického proteinu, kde zhruba prvních 40 aminokyselin z N-konce konečné formy přirozeného KGF bylo zkombinováno s částí C-konce aFGF (asi 140 aminokyselin). Bylo popsáno působení chiméry na keratinocyty jako u KGF, ale chiméra nebyla citlivá na heparin, což je charakteristická vlastnost aFGF, ale ne KGF. Stabilita chiméry nebyla diskutována nebo jinak popsána.

Literatura tedy nepopisuje modifikovanou KGF molekulu s významně zlepšenou stabilitou v porovnání s přirozenou molekulou KGF. Navíc literatura nepopisuje dostatečné údaje nebo důkazy, které by opravňovaly očekávání, že tvorba molekul KGF s těmito žádoucími vlastnostmi bude úspěšná.

Obecně účinky změny aminokyselin na biologickou aktivitu proteinu budou záviset na řadě faktorů, včetně třírozměrné struktury proteinu a tom, jestli se modifikace dotknou vazebné oblasti pro receptor primární sekvence proteinu. Protože ani třírozměrná struktura ani oblast pro vázání receptoru v primární struktuře přirozeného KGF nebyly publikovány, znalosti v této oblasti neumožňují zevšeobecnění účinku změn aminokyselin přirozeného KGF a dokonce ani vliv modifikace proteinu u lépe charakterizovaných proteinů.

Je známo, že polypeptidy mohou být dále modifikovány, aby obsahovaly přídavné chemické struktury, které nejsou obvyklou součástí proteinů. Modifikací tohoto typu se sleduje zlepšení takových vlastností, jako je rozpustnost, absorpce, biologický poločas rozpadu a podobné vlastnosti proteinu. Struktury mohou případně eliminovat nebo zeslabit jakékoliv nežádoucí vedlejší účinky proteinu. Struktury schopné zprostředkovat takovéto účinky jsou uvedené například v REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990). Do molekuly mohou být včleněny kovalentní modifikace reakcí cílového aminokyselinového zbytku peptidu s organickým pozměňovacím činidlem, které je schopné reakce s vybraným postranním řetězcem nebo terminálním zbytkem (T. E. Creghton (1983), PROTEINS: STRUCTURE AND MOLECULE PROPERTIES, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79–86). Polyethylenglykol („PEG“) je jednou takovou chemickou strukturou, které bylo použito při přípravě terapeutických proteinových produktů. U některých produktů bylo ukázáno, že při-

pojení polyethylenglykolu je chráněno před proteolýzou (Sada et al. (1991), J. Fermentation Bioengineering, 71:137–139); metody pro připojení určitých polyethylenglykolových struktur jsou k dispozici. Viz US Patent 4 179 337, Davis et al., „Non-Imunogenic Polypeptides,“ vydaný 18. prosince 1979 a US Patent 4 002 531, Royer, „Modifying enzymes with Polyethylene Glycol and Product Produced Theraby,“ vydaný 11. ledna 1977. Přehled obsahuje práce Abuchowski et al., v Enzymes as Drugs. (Holcerberg and Roberts, (eds.) pp. 367–383 (1981)). Pro připojení molekuly PEG k proteinu byla použita řada metod. Obecně jsou molekuly polyethylenglykolu připojené k proteinu přes reaktivní skupinu nacházející se na proteinu. Vhodné aminoskupiny pro takovéto připojení jsou například na lysinových zbytcích nebo na N-konci. Například Royer (US Pat. 4 002 531, viz výše) použil pro připojení polyethylenglykolových molekul k enzymu redukující alkylaci. Podle EP 0 539 167, publikovaného 28. dubna 1993, Wright, „Peg Imdates and Protein Derivatives Thereof“ peptidy a organické sloučeniny s volnou aminoskupinou (či aminoskupinami) jsou modifikovány odvozeninou PEGu nebo příbuzného ve vodě rozpustného organického polymeru. K modifikaci řady lysinových zbytků v proteinech pro připojení PEG molekuly přes reaktivní aminoskupinu se vztahuje US Patent 4 904 584 Shaw, vydaný 27. února 1990.

Cílem tohoto vynálezu je poskytnout polypeptidové molekuly kódující taková analoga, která vykazují zvýšenou stabilitu (například při vystavení působení typickému pH, teplotním a/nebo skladovacím podmínkám) při srovnání s přirozeným KGF.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je analog nativního keratinocytového růstového faktoru KGF, odpovídající aminokyselinám 32 až 194 SEQ ID NO:2, popřípadě spolu se signální sekvencí, kterým je deltaN23, odpovídající SEQ ID NO:58, v kteréžto sekvenci je počáteční methioninový zbytek považován za zbytek v poloze 0 a jedná se o zbytek fakultativní, přičemž tento analog je kovalentně připojen k polyethylenglykolu nebo příbuznému vodorozpustnému organickému polymeru.

Kovalentní připojení výše uvedeného analogu nativního keratinocytového růstového faktoru KGF k polyethylenglykolu nebo příbuznému vodorozpustnému organickému polymeru je považováno za obligatorní znak aspektu vynálezu charakterizovaného v předchozím odstavci. Analogy, které polymerem modifikovány nejsou, nespádají do rozsahu ochrany vymezeného připojením látkovým nárokem.

Předmětem vynálezu je dále také použití analogu kovalentně připojeného k polyethylenglykolu nebo příbuznému vodorozpustnému organickému polymeru, popsaného výše pro výrobu léčiva pro stimulaci produkce nefibroblastových epithelových buněk u pacienta, který to potřebuje, přičemž nefibroblastové buňky epithelu jsou zvoleny z adnexálních struktur, jaterních buněk, mukosálního epithelu respiračního traktu nebo tympanových epithelových buněk.

Dále je předmětem vynálezu také použití analogu kovalentně připojeného k polyethylenglykolu nebo příbuznému vodorozpustnému organickému polymeru popsaného výše pro výrobu léčiva pro stimulaci produkce nefibroblastových epithelových buněk u pacienta za účelem prevence nebo léčení stavu zvoleného ze souboru sestávajícího z popálenin a jiných poranění v části nebo celé tloušťce tkáně, epidermolysis bullosa, alopecie indukované chemoterapií, plešatosti mužského typu, progresivní ztráty vlasů u mužů a žen, žaludečních a dvanáctníkových vředů, zánětlivých chorob střev, jako je Crohnova choroba a vředová kolitida, toxicity spojené s radiačním a chemoterapeutickým ošetřením, choroby hyalinní membrány, akutního a chronického poškození plic, cirrhosy jater; prudkého selhání jater, akutní virové hepatitidy, toxických napadení jater, abraze rohovky, progresivní choroby dásní a poškození ušního bubínku.

Konečně je předmětem vynálezu také in vitro způsob stimulace produkce nefibroblastových epithelových buněk, jehož podstata spočívá v tom, že zahrnuje podání účinného množství analogu kovalentně připojeného k polyethylenglykolu nebo příbuznému vodorozpustnému

organickému polymeru, popsaného výše, nebo farmaceutického prostředku na jeho bázi, přičemž nefibroblastové buňky epithelu jsou zvoleny z adnexálních struktur, jaterních buněk, mukosálního epithelu respiračního traktu nebo tympanových epithelových buněk.

- 5 Odpovídající pozice aminokyseliny mezi dvěma sekvencemi aminokyselin může být určena přiřazením dvou sekvencí tak, aby se maximalizovala shoda residuí, včetně posunu amino a/nebo karboxy konce, zavedení potřebných mezer a/nebo odstranění residuí přítomných ve formě insertů u možných kandidátů. Vyhledávání v databázích, analýza sekvence a manipulace se může provést s použitím některého dobře známého algoritmu – programu běžně používaného pro
- 10 prohledávání na homologie/totožnost v sekvenci. (například Pearson a Lipman (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85:2444–2448; Altschul et al. (1990), J. Mol. Biol., 215–403–410; Lipman and Pearson (1985), Science, 222:1435 nebo Deveraux et al. (1984), Nuc. Acids. Res., 12:387–395).
- 15 Stringentní podmínky (týkající se hybridizace) se dosáhnou kombinací koncentrace solí, teploty, organických rozpouštědel a ostatních parametrů běžně kontrolovaných v hybridizačních reakcích. Vzorové hybridizační podmínky představuje hybridizace v 4x SSC při 62 až 67 °C, následovaná promýváním v 0,1x SSC při 62 až 67 °C po dobu zhruba jedné hodiny. Jiné vzorové hybridizační podmínky představuje hybridizace v 45 až 55% formamidu, 4x SSC při 40 až 45 °C. [viz T.
- 20 Maniatis et al., Molecular Cloning (A laboratory manual); Cold Spring Harbor Laboratory (1982), stránky 387 – 389].

Proteiny zahrnují variace alel, nebo delecí (delece), substituci (substituce) nebo inzerci (inzerce) aminokyselin, včetně fragmentů, chimérických nebo hybridních molekul přirozeného KGF. Jeden

25 příklad KGF zahrnuje proteiny se změněným nábojem, kde je jeden nebo více aminokyselinových zbytků na pozicích 141–154 nativního KGF (nejlépe residua Arg⁴¹, Gln⁴³, Lys⁵⁵, Lys⁹⁵, Lys¹²⁸, Asn¹³⁷, Gln¹³⁸, Lys¹³⁹, Arg¹⁴⁴, Lys¹⁴⁷, Gln¹⁵², Lys¹⁵³ nebo Thr¹⁵⁴) odstraněn nebo vyměněn neutrálním nebo negativně nabitým zbytkem s cílem ovlivnit protein redukováním pozitivního náboje (jak je uvedeno v běžně přístupném U.S.S.N. 08/323, 337, zařazeným 13. října 1994).

30 Příkladem je například R(144)Q, což je KGF mající nahrazený glutamin za arginin na aminokyselinové pozici 144 přirozeného KGF. Jiný příklad KGF představuje proteiny vytvořené substituováním alespoň jedné aminokyseliny s velkým potenciálem tvořit smyčku, nebo alespoň jedné aminokyseliny uvnitř oblasti tvořící smyčku (Asn¹¹⁵ – His¹¹⁶ – Tyr¹¹⁷ – Asn¹¹⁸ – Thr¹¹⁹) u nativního KGF (jak je uvedeno v běžně přístupném U.S.S.N. 08/323, 473, zařazeným 13. října

35 1994). Konkrétně je to např. H(116)G, KGF s glycinem nahrazeným histidinem na aminokyselinové pozici 116 přirozeného KGF. Další příklad zahrnuje proteiny mající jednu nebo více aminokyselin uvnitř oblasti 123–133 (aminokyseliny 154–164 SEQ ID NO:2) nativního KGF nahrazenou, odstraněnou nebo přidanou; tyto proteiny mohou mít agonistickou nebo antagonistickou aktivitu.

40 Překvapující bylo zjištění, že když má molekula KGF (tj. rodičovská molekula) cysteinový zbytek odpovídající (jak bylo určeno s použitím technik popsaných výše) Cys¹ a Cys¹⁵ přirozeného KGF (cysteinové zbytky 32 a 46 SEQ ID NO:2) modifikován nahrazením odpovídajícího cysteinu, má výsledný analog KGF ve srovnání s rodičovskou molekulou zlepšenou

45 stabilitu. Vynález je navíc přednostně zaměřen na ta analoga, která kromě zlepšené stability vykazují plnou biologickou aktivitu (tj. minimálně značně podobnou vazbu na receptor nebo afinitu k němu) při porovnání s přirozeným KGF.

Dalším aspektem vynálezu je popis purifikovaných a izolovaných molekul nukleových kyselin,

50 kódujících různá biologicky aktivní peptidová analoga KGF. V jednom případě takovéto nukleové kyseliny zahrnují DNA molekuly klonované do biologicky funkčních plasmidů nebo virových vektorů. V jiném případě mohou být konstrukty nukleových kyselin použity pro stabilní transformaci prokaryontních nebo eukaryontních hostitelských buněk. V dalším případě vynález popisuje proces, kde buď prokaryotická (nejlépe *E. coli*) nebo eukaryotická hostitelská buňka,

55 stabilně transformovaná molekulou nukleové kyseliny, vyrůstá za vhodných nutričních podmínek

způsobem umožňujícím expresi analoga KGF. Po expresi může následovat izolace a purifikace rekombinantního polypeptidu.

5 Další aspekt vynálezu se zabývá farmaceutickými formami, které zahrnují terapeuticky účinná množství analoga KGF a přijatelného farmaceutického nosiče. Takovéto formy budou užitečné při léčení pacientů postižených epiteliálním onemocněním nebo poškozením.

10 V tomto duchu se další aspekt vztahuje k metodám stimulace růstu epiteliálních buněk podáváním terapeuticky účinných dávek analoga KGF pacientům. V jednom praktickém případě jsou to nefibroblastové epiteliální buňky, které jsou stimulovány. Takovéto epiteliální buňky zahrnují různé sousední buňky, pankreatické buňky, jaterní buňky a mukózní epitel v respiračním a gastrointestinálním traktu.

15 Přehled obrázků na výkresech

Obrázek 1 ukazuje nukleotidové (SEQ ID NO:1) a aminokyselinové (SEQ ID NO:2) sekvence nativního KGF (nukleotidy kódující konečnou formu nativního KGF jsou popsány bázemi 201 až 684 SEQ ID NO:1 a konečná forma KGF je určena aminokyselinovými zbytky 32 až 194 SEQ ID NO:2).

Obrázky 2A, 2B a 2C ukazují mapy plasmidů pCFM1156, pCFM1656 a pCFM3102.

25 Obrázek 3 ukazuje nukleotidovou (SEQ ID NO:3) a aminokyselinovou (SEQ ID NO:4) sekvenci konstruktů obsaženého v konstruktu RSH-KGF.

Obrázek 4 ukazuje nukleotidovou (SEQ ID NO:5) a aminokyselinovou (SEQ ID NO:6) sekvenci konstruktů obsaženého v plasmidu KGF.

30 Obrázek 5 ukazuje chemicky syntetizované OLIGA (OLIGO č. 6 až OLIGO č. 11; SEQ ID NO:12–17) použité k náhradě DNA sekvence mezi místy *KpnI* a *EcoRI* v konstruktu plasmidu KGF (pozice aminokyselin 46 až 85 v SEQ ID NO:6), aby se vytvořil konstrukt v plasmidu KGF (dsd).

35 Obrázek 6 ukazuje chemicky syntetizované OLIGA (OLIGO č. 12 až 24; SEQ ID NO:18–30) použité pro tvorbu KGF (optimalizovaný kodon).

40 Obrázek 7 ukazuje nukleotidovou (SEQ ID NO:31) a aminokyselinovou (SEQ ID NO:32) sekvenci C(1,15)S, analogu KGF se substitucí serinu místo cysteinu v pozici aminokyselin 1 až 15 nativního KGF.

45 Obrázek 8 ukazuje nukleotidovou (SEQ ID NO:33) a aminokyselinovou (SEQ ID NO:34) sekvenci ΔN3/C(15)S, analogu KGF s delecí prvních třech aminokyselin na N-konci a náhradou serinu za cystein na aminokyselinové pozici 15 přirozeného KGF.

Obrázek 9 ukazuje nukleotidovou (SEQ ID NO:35) a aminokyselinovou (SEQ ID NO:36) sekvenci ΔN3/C(15)–, analogu KGF s delecí prvních třech aminokyselin na N-konci a delecí cysteinu na aminokyselinové pozici 15 přirozeného KGF.

50 Obrázek 10 ukazuje nukleotidovou (SEQ ID NO:37) a aminokyselinovou (SEQ ID NO:38) sekvenci ΔN8/C(15)S, analogu KGF s delecí prvních osmi aminokyselin na N-konci a náhradou serinu za cystein na aminokyselinové pozici 15 přirozeného KGF.

Obrázek 11 ukazuje nukleotidovou (SEQ ID NO:39) a aminokyselinovou (SEQ ID NO:40) sekvenci $\Delta N8/C(15)-$, analogu KGF s delecí prvních osmi aminokyselin na N-konci a delecí cysteinu na aminokyselinové pozici 15 přirozeného KGF.

- 5 Obrázek 12 ukazuje nukleotidovou (SEQ ID NO:41) a aminokyselinovou (SEQ ID NO:42) sekvenci $\Delta N15$, analogu KGF s delecí prvních patnácti aminokyselin na N-konci přirozeného KGF.

Obrázek 13 ukazuje nukleotidovou (SEQ ID NO:43) a aminokyselinovou (SEQ ID NO:44) sekvenci $\Delta N16$, analogu KGF s delecí prvních šestnácti aminokyselin na N-konci přirozeného KGF.

10

Obrázek 14 ukazuje nukleotidovou (SEQ ID NO:45) a aminokyselinovou (SEQ ID NO:46) sekvenci $\Delta N17$, analogu KGF s delecí prvních sedmnácti aminokyselin na N-konci přirozeného KGF.

- 15 Obrázek 15 ukazuje nukleotidovou (SEQ ID NO:47) a aminokyselinovou (SEQ ID NO:48) sekvenci $\Delta N18$, analogu KGF s delecí prvních osmnácti aminokyselin na N-konci přirozeného KGF.

Obrázek 16 ukazuje nukleotidovou (SEQ ID NO:49) a aminokyselinovou (SEQ ID NO:50) sekvenci $\Delta N19$, analogu KGF s delecí prvních devatenácti aminokyselin na N-konci přirozeného KGF.

20

Obrázek 17 ukazuje nukleotidovou (SEQ ID NO:51) a aminokyselinovou (SEQ ID NO:52) sekvenci $\Delta N20$, analogu KGF s delecí prvních dvaceti aminokyselin na N-konci přirozeného KGF.

- 25 Obrázek 18 ukazuje nukleotidovou (SEQ ID NO:53) a aminokyselinovou (SEQ ID NO:54) sekvenci $\Delta N21$, analogu KGF s delecí prvních jednadvaceti aminokyselin na N-konci přirozeného KGF.

Obrázek 19 ukazuje nukleotidovou (SEQ ID NO:55) a aminokyselinovou (SEQ ID NO:56) sekvenci $\Delta N22$, analogu KGF s delecí prvních dvaadvaceti aminokyselin na N-konci přirozeného KGF.

30

Obrázek 20 ukazuje nukleotidovou (SEQ ID NO:57) a aminokyselinovou (SEQ ID NO:58) sekvenci $\Delta N23$, analogu KGF s delecí prvních třiaadvaceti aminokyselin na N-konci přirozeného KGF.

35

Obrázek 21 ukazuje nukleotidovou (SEQ ID NO:59) a aminokyselinovou (SEQ ID NO:60) sekvenci $\Delta N24$, analogu KGF s delecí prvních čtyřiaadvaceti aminokyselin na N-konci přirozeného KGF.

40

Obrázek 22 ukazuje nukleotidovou (SEQ ID NO:61) a aminokyselinovou (SEQ ID NO:62) sekvenci C(1,15)S/R(144)E analogu KGF se substitucí serinu místo cysteinu v pozicích aminokyselin 1 a 15 a substitucí glutamové kyseliny za arginin na aminokyselinové pozici 144 nativního KGF.

45

Obrázek 23 ukazuje nukleotidovou (SEQ ID NO:63) a aminokyselinovou (SEQ ID NO:64) sekvenci C(1,15)S/R(144)Q, analogu KGF se substitucí serinu za cystein na pozicích 1 a 15 a substitucí glutaminu za arginin na aminokyselinové pozici 144 nativního KGF.

- 50 Obrázek 24 ukazuje nukleotidovou (SEQ ID NO:65) a aminokyselinovou (SEQ ID NO:66) sekvenci $\Delta N23/R(144)Q$, analogu KGF s delecí prvních 23 aminokyselin na N-konci a náhradou glutaminu za arginin na aminokyselinové pozici 144 nativního KGF.

Obrázek 25 ukazuje množství zbývajících rozpustného proteinu, když byl přirozený KGF a C(1,15) skladován v 20 mM fosforečnanu sodném, 0,15 M NaCl, pH 7,0 při 37 °C po dobu 27 hodin.

- 5 Obrázek 26 ukazuje množství zbývajících rozpustného proteinu, když byl přirozený KGF a C(1,15)S skladován v 0,15 M NaCl, 20 mM NaPO₄, 0,15 M NaCl, pH 7,0 při 37 °C po dobu 27 hodin.

- 10 Obrázek 27 ukazuje množství zbývajících rozpustného proteinu, když byl přirozený KGF, ΔN15 a C(1,15)S skladován v 50 mM NaPO₄, 0,15 M NaCl, pH 7,0 při 37 °C po dobu 27 hodin.

Obrázek 28 ukazuje množství rozpustného proteinu stanoveného pomocí HPLC (size exclusion) v závislosti na čase při 37 °C.

- 15 Obrázek 29 ukazuje předpokládanou denaturační teplotu (T_m) jako funkci pH pro přirozený KGF, C(1,15)S/R(144)Q a C(1,15)S/R(144)E.

- 20 Obrázek 30 ukazuje typický průběh mitogenní aktivity C(1,15)S stanovené měřením inkorporace [³H]–thymidinu během syntézy DNA porovnáním se standardní křivkou pro přirozený KGF.

Obrázek 31 ukazuje typický průběh mitogenní aktivity ΔN15 stanovené měřením inkorporace [³H]–thymidinu během syntézy DNA porovnáním se standardní křivkou pro přirozený KGF.

- 25 Obrázek 32 ukazuje typický průběh mitogenní aktivity ΔN23 stanovené měřením inkorporace [³H]–thymidinu během syntézy DNA porovnáním se standardní křivkou pro přirozený KGF.

- 30 Obrázek 33 ukazuje typický průběh mitogenní aktivity ΔN23/R(144)Q stanovené měřením inkorporace [³H]–thymidinu během syntézy DNA porovnáním se standardní křivkou pro přirozený KGF.

- 35 Obrázek 34 ukazuje typický průběh mitogenní aktivity C(1,15)S/R(144)Q stanovené měřením inkorporace [³H]–thymidinu během syntézy DNA porovnáním se standardní křivkou pro přirozený KGF.

Obrázek 35 ukazuje typický průběh mitogenní aktivity C(1,15)S/R(144)E stanovené měřením inkorporace [³H]–thymidinu během syntézy DNA porovnáním se standardní křivkou pro přirozený KGF.

- 40 Obrázek 36 ukazuje vliv C(1,15)S a ΔN 23 na chemické vlastnosti séra.

Obrázek 37 ukazuje nukleotidovou (SEQ ID NO:77) a aminokyselinovou (SEQ ID N:78) sekvenci C(1,15,40)S, analoga KGF se substitucí serinu za cystein na pozicích aminokyselin 1, 15 a 40 přirozeného KGF.

- 45 Obrázek 38 ukazuje nukleotidovou (SEQ ID NO:79) a aminokyselinovou (SEQ ID N:80) sekvenci C(1,15,102)S, analoga KGF se substitucí serinu za cystein na pozicích aminokyselin 1, 15 a 102 přirozeného KGF.

- 50 Obrázek 39 ukazuje nukleotidovou (SEQ ID NO:81) a aminokyselinovou (SEQ ID N:82) sekvenci C(1,15,102,106)S, analoga KGF se substitucí serinu za cystein na pozicích aminokyselin 1, 15, 102 a 106 přirozeného KGF.

Obrázek 40 ukazuje nukleotidovou (SEQ ID NO:83) a aminokyselinovou (SEQ ID N:84) sekvenci Δ N23/N(137)E, analoga KGF s delecí prvních 23 aminokyselin na N-konci a substitucí glutamové kyseliny za asparagin na aminokyselinové pozici 137 přirozeného KGF.

- 5 Obrázek 41 ukazuje nukleotidovou (SEQ ID NO:85) a aminokyselinovou (SEQ ID N:86) sekvenci Δ N23/K(139)E, analoga KGF s delecí prvních 23 aminokyselin na N-konci a substitucí glutamové kyseliny za lysin na aminokyselinové pozici 139 přirozeného KGF.

- 10 Obrázek 42 ukazuje nukleotidovou (SEQ ID NO:87) a aminokyselinovou (SEQ ID N:88) sekvenci Δ N23/K(139)Q, analoga KGF s delecí prvních 23 aminokyselin na N-konci a substitucí glutamové kyseliny za lysin na aminokyselinové pozici 139 přirozeného KGF.

- 15 Obrázek 43 ukazuje nukleotidovou (SEQ ID NO:89) a aminokyselinovou (SEQ ID N:90) sekvenci Δ N23/R(144)A, analoga KGF s delecí prvních 23 aminokyselin na N-konci a substitucí alaninu za arginin na aminokyselinové pozici 144 přirozeného KGF.

- 20 Obrázek 44 ukazuje nukleotidovou (SEQ ID NO:91) a aminokyselinovou (SEQ ID N:92) sekvenci Δ N23/R(144)E, analoga KGF s delecí prvních 23 aminokyselin na N-konci a substitucí glutamové kyseliny za arginin na aminokyselinové pozici 144 přirozeného KGF.

- Obrázek 45 ukazuje nukleotidovou (SEQ ID NO:93) a aminokyselinovou (SEQ ID N:94) sekvenci Δ N23/R(144)L, analoga KGF s delecí prvních 23 aminokyselin na N-konci a substitucí leucinu za arginin na aminokyselinové pozici 144 přirozeného KGF.

- 25 Obrázek 46 ukazuje nukleotidovou (SEQ ID NO:95) a aminokyselinovou (SEQ ID N:96) sekvenci Δ N23/R(144)E, analoga KGF s delecí prvních 23 aminokyselin na N-konci a substitucí glutamové kyseliny za lysin na aminokyselinové pozici 147 přirozeného KGF.

- 30 Obrázek 47 ukazuje nukleotidovou (SEQ ID NO:97) a aminokyselinovou (SEQ ID N:98) sekvenci Δ N23/K(147)Q, analoga KGF s delecí prvních 23 aminokyselin na N-konci a substitucí glutaminu za lysin na aminokyselinové pozici 147 přirozeného KGF.

- 35 Obrázek 48 ukazuje nukleotidovou (SEQ ID NO:99) a aminokyselinovou (SEQ ID N:100) sekvenci Δ N23/K(1534)E, analoga KGF s delecí prvních 23 aminokyselin na N-konci a substitucí glutamové kyseliny za lysin na aminokyselinové pozici 153 přirozeného KGF.

- Obrázek 49 ukazuje nukleotidovou (SEQ ID NO:101) a aminokyselinovou (SEQ ID N:102) sekvenci Δ N23/K(153)Q, analoga KGF s delecí prvních 23 aminokyselin na N-konci a substitucí glutaminu za lysin na aminokyselinové pozici 153 přirozeného KGF.

- 40 Obrázek 50 ukazuje nukleotidovou (SEQ ID NO:103) a aminokyselinovou (SEQ ID N:104) sekvenci Δ N23/Q(152)E/K(153)E, analoga KGF s delecí prvních 23 aminokyselin na N-konci a substitucí glutamové kyseliny za lysin na aminokyselinové pozici 153 přirozeného KGF.

- 45 Obrázek 51 ukazuje vliv Δ N23 na diabetes indukovaný streptozotocinem u Sprague-Dawley krys.

Detailní popis vynálezu

50

V souladu s tímto vynálezem jsou předkládána nová analoga KGF. Zjistilo se, že čtyři z cysteinových residuí přirozeného KGF (Cys¹ a Cys¹⁵, Cys¹⁰² a Cys¹⁰⁶) se účastní tvorby dvou disulfidových vazeb. Cys⁴⁰ se neúčastní disulfidových vazeb uvnitř molekuly. Proto obsahuje KGF dvě malé disulfidové smyčky oddělené téměř 90 aminokyselinami. Tak je možné určit, který cystei-

nový zbytek se účastní na disulfidových vazbách a který je volný pro tvorbu nežádoucích vazeb uvnitř molekuly. Tyto vazby způsobují vytvoření nežádoucí terciární struktury (tj. konformace, která snižuje aktivitu proteinu).

- 5 Překvapující bylo zjištění, že modifikace KGF delecí nebo substitucí aminokyselinových zbytků odpovídajících v KGF pozici 1 a 15 (pozice 32 a 46 SEQ ID NO:2) vede ke vzniku analogů KGF s podstatně zlepšenou stabilitou (tj. s menšími problémy způsobenými nesprávným prostorovým uspořádáním, tvorbou disulfidových útvarů a/nebo agregací proteinu). Například analoga KGF budou obecně purifikována s větším výtěžkem rozpustného proteinu se správnou konfigurací.
- 10 Navíc jakmile je materiál purifikován, bude odolnější vůči pH, teplotě atd. při porovnání se stabilitou rodičovské molekuly. I když není cílem zabývat se příliš teorií, předpokládá se, že Cys¹ a Cys¹⁵ KGF kromě tvorby intramolekulárního disulfidového můstku, existují za určitých podmínek i ve formě volných cysteinů, které jsou schopné tvořit mezimolekulární disulfidové vazby, vedoucí k nestabilitě proteinu a k tvorbě agregátů. Navíc bylo zjištěno, že delece disulfidové
- 15 smyčky na N-konci není významná pro vázání receptoru nebo mitogenní aktivitu.

V tomto vynálezu výraz „analog KGF“ nebo „polypeptidový analog KGF“ označuje jakýkoliv popsany přirozeně nebo uměle se vyskytující polypeptid lišící se strukturou od KGF díky modifikaci peptidové sekvence odpovídající 24 aminokyselinovému N-konci KGF (aminokyseliny 32 až 55 SEQ ID NO:2), kde Cys¹ a Cys¹⁵ v KGF (aminokyseliny 32 až 64 SEQ ID NO:2) jsou vyměněny nebo odstraněny. Způsob, kterým jsou cysteiny odstraněny nebo změněny není důležitý a zahrnuje například polypeptidová analoga obsahující delecí a/nebo substituci jedné nebo více aminokyselin. Vynález tedy poskytuje rodinu nových proteinů keratinocytových růstových faktorů. Tato rodina zahrnuje několik skupin proteinů.

25 Jedna skupina analogů KGF zahrnuje molekuly, ve kterých je cystein na pozicích KGF 1 a 15 nahrazen aminokyselinami, včetně těch, které se v proteinu normálně nevyskytují. Strategie pro tvorbu substitučních analogů zahrnuje místně zaměřenou tvorbu mutací (Ho et al. (1989), Gene, 77:51–59; Innis et al. „PCR Protocols“, Academic Press, Inc., San Diego, CA). [analoga KGF zahrnující náhradu aminokyseliny jsou uvedena podle zbytku nacházejícím se na té které pozici v hotovém proteinu (bez signální sekvence) uvedeném v SEQ ID NO:2, následovaném aminokyselinovou pozicí v závorkách a novou aminokyselinou. Například analog zahrnující náhradu cysteinu za serin na aminokyselinové pozici 15 KGF (pozice 46 SEQ ID NO:2) je uváděn jako „C(15)S“.]

30 Cystein je přednostně změněn na neutrální aminokyselinu jako je například glycin, valin, alanin, leucin, izoleucin, tyrosin, fenylalanin, histidin, tryptofan, serin, threonin a methionin (přednostně serinem threoninem a alaninem pro jejich chemickou podobnost s cysteinem). Příklad 1 podrobně popisuje tvorbu C(1,15)S použitím částečné syntézy genu (ve spojení s ostatními rekombinantními technikami) a s následnou expresí konstruktů v stabilně transformovaném bakteriálním hostiteli.

40 Jiná skupina analogů KGF zahrnuje molekuly které mají cysteiny v pozici 1 a 15 z molekuly KGF odstraněny. K tvorbě takovýchto analogů KGF mohou být použity různé strategie, jako například zkrácení N-konce, místní specifické delece či kombinace obou metod.

45 Pojem „zkrácení N-konce“ označuje takovou modifikaci KGF, kde jsou N-koncová aminokyselinová residua KGF 1 až 24 (aminokyseliny 32 až 55 SEQ ID NO:2) odstraněna, včetně Cys¹ a Cys¹⁵ [analoga KGF zahrnující zkrácení aminokyselin budou uváděna odstraněným residuem na pozici hotového proteinu (bez signální sekvence) uvedené v SEQ ID NO:2, začínající místem delece a počtem odstraněných residuí. Například analog KGF se zkrácením na N-konci o 24 zbytků (zbytky 1–55 v SEQ ID NO:2) bude označován jako analog „ΔN24“]. Konkrétně jsou v této skupině analoga ΔN23 přirozeného KGF, kde jsou jeden nebo více aminokyselinových zbytků 41–154 [(aminokyseliny 72–185 SEQ ID NO:2), včetně aminokyselinových zbytků 123–133 (aminokyseliny 154–164 SEQ ID NO:2)], odstraněny nebo nahrazeny neutrálními zbytky nebo negativně nabitými zbytky vybranými tak, aby se zmenšil pozitivní náboj. Přednostně se pro modifikaci používají Arg⁴¹, Gln⁴³, Lys⁵⁵, Lys⁹⁵, Lys¹²⁸, Asn¹³⁷, Gln¹³⁸, Lys¹³⁹, Arg¹⁴⁴, Lys¹⁴⁷,

55

Gln¹⁵², Lys¹⁵³ nebo Thr¹⁵⁴, které jsou nahrazené přednostně Gln¹³⁸, Lys¹³⁹, Arg¹⁴⁴, Lys¹⁴⁷, Gln¹⁵² nebo Lys¹⁵³, přičemž Arg¹⁴⁴ je nejpreferovanější. V této skupině jsou také zahrnuta Δ N23 analoga přirozeného KGF s modifikací uvnitř oblasti vytvářející smyčku Asn¹¹⁵–His¹¹⁶–Tyr¹¹⁷–Asn¹¹⁸–Thr¹¹⁹ (aminokyseliny 146–150 SEQ ID NO:2) v přirozeném KGF.

Příklad 1 uvádí podrobnosti o systematickém zkracování N–konce provedeném částečnou syntézou genu ve spojení s ostatními rekombinantními technikami a následující expresi konstruktů ve stabilně transformovaném bakteriálním hostiteli. Příkladem může být zkracování N–konce u Δ N15 až Δ N24. Navíc příklad 3 uvádí podrobnosti o expresi DNA kódující přirozený KGF a různorodé na N–konci glykosylované izoformy v kultuře savčích buněk a purifikaci zejména glykosylovaných izoform s N–koncem zkráceným o aminokyseliny 1–23 konečné formy přirozeného KGF.

Naproti tomu místně specifická delece se vztahují na modifikace KGF, kde je odstraněn jeden nebo více aminokyselinových zbytků (například Cys¹ nebo Cys¹⁵). Když je v KGF specificky odstraněn Cys¹ nebo Cys¹⁵, je analog o jednu aminokyselinu kratší než KGF. [Analogy KGF se delecí aminokyseliny jsou uváděna podle zbytku nacházejícího se v dané pozici v hotovém proteinu (bez signální sekvence) uvedeném v SEQ ID NO:2, následovaném pozicí aminokyseliny v závorkách a negativním znaménkem. Například analog v této skupině s delecí cysteinu na pozici 15 KGF (pozice 36 SEQ ID NO:2) je označen jako „C(15)–„.] Místně specifické delece mohou být generovány s použitím místně zaměřené mutageneze, jak je to popsáno výše.

Do této skupiny také patří analoga, kde je Cys¹ a Cys¹⁵ KGF odstraněn díky zkrácení nebo delecí. například charakteristická analoga KGF zahrnují zkrácení KGF o první tři aminokyselinové zbytky (Cys–Asn–Asp) nebo zkrácení KGF o osm prvních aminokyselin (Cys–Asn–Asp–Met–Thr–Pro–Glu–Gln) spojených s delecí cysteinu na aminokyselinové pozici KGF 15 (tato analoga jsou uváděna jako Δ N3/C(15)– a Δ N8/C(15)–). Protože se methioninový zbytek objevuje přirozeně na čtvrté a deváté aminokyselinové pozici v přirozeném KGF, není nutný další Met kodon pro správnou iniciaci translace.

Jiná skupina zahrnuje molekuly u kterých jsou cysteiny na pozicích 1 a 15 KGF nahrazeny díky zkrácení a substitucí. Například charakteristickými analogy KGF jsou Δ N3/C(15)S a Δ N8/C(15)S. Takováto analoga zahrnují zkrácení tří prvních koncových aminokyselinových zbytků KGF nebo odstranění prvních osmi koncových amino zbytků KGF společně s náhradou cysteinu na aminokyselinové pozici 15 jinou aminokyselinou, například serinem.

Když jsou analoga KGF tvořena biologicky, tj. jsou produkty exprese v buňkách a ne výsledky syntézy na pevné fázi, proteolytické nebo enzymatické úpravy přirozeně se vyskytujících produktů atd., nukleové kyseliny kódující takovéto polypeptidy se liší v jednom nebo více nukleotidech ve srovnání s přirozenou nukleotidovou sekvencí KGF. Tyto nukleosidy mohou být exprimovány a výsledný polypeptid purifikován jednou z mnoha metod rekombinantní technologie, které jsou odborníkovi známy.

DNA sekvence, kódující celý nebo část analogů KGF, mohou zahrnovat kromě jiných věcí inkorporaci kodonů „preferovaných“ pro expresi ve vybraných hostitelských buňkách (např. „expresní kodony *E. coli*“); zajišťujících místa pro štěpení restričními enzymy; zajišťujících další inicializační, koncové nebo mezilehlé nukleotidové sekvence (např. inicializační methioninový aminokyselinový zbytek pro expresi v buňkách *E. coli*) pro usnadnění konstrukce snadno exprimovatelných vektorů.

Předkládaný vynález také poskytuje rekombinantní molekuly nebo vektory pro použití v metodách pro expresi polypeptidů. Takovéto vektory se mohou skládat z DNA nebo RNA a mohou být kruhové, lineární, jednopramenné nebo dvoupramenné a mohou se vyskytovat přirozeně, nebo mohou být složeny z řady komponent a vyskytovat se pak přirozeně nebo mohou být syntetické.

Je známo mnoho příkladů takovýchto expresních vektorů. Komponenty vektorů, tj. replikony, selekční geny, zesilovače (enhancers), promotory a podobné komponenty mohou být získány z přírodních zdrojů nebo známými postupy syntetizovány. V každém případě expresní vektory užitečné v tomto vynálezu obsahují alespoň jeden prvek řídící expresi, funkčně spjatý s vloženou molekulou nukleové kyseliny kódující polypeptidový analog KGF. Tyto řídící elementy jsou odpovědné za regulaci exprese polypeptidu z molekul nukleových kyselin tohoto vynálezu. Užitečné řídící elementy zahrnují například lac systém, trp systém, operátory a promotory z fága lambda, glykolytický kvasinkový promotor, promotor z kvasinkového genu pro kyselou fosfatázu, kvasinkový faktor pro alfa párování (alpha mating factor) a promotory odvozené z adenovirů, viru Epstein-Barové, polyomy, opičích virů a rozličných retrovirů. Pro účely tohoto vynálezu může být ale použita řada jiných vektorů a řídících prvků vhodných pro expresi v prokaryontech nebo eukaryontech.

Příklady vhodných prokaryontních klonovacích vektorů zahrnují plasmidy z *E. coli* (např. pBR322, col E1, pUC a F-faktor), přičemž preferovány jsou plasmidy pCFM1156 (ATCC 69702), pCFM1656 (ATCC 69576) a pCFM3102 (popsaný dále v části Příklady). Pro tyto účely může být také použita řada dalších vhodných expresních vektorů, z nichž jsou mnohé známy ze savců, hmyzů, kvasinkové, houbové nebo bakteriální exprese. Transfekce příslušných hostitelských buněk těmito vektory může vést k expresi polypeptidových analogů KGF.

Hostitelské mikroorganismy užitečné pro tento vynález mohou být buď prokaryontní nebo eukaryontní. Mezi vhodné prokaryontní hostitele patří *E. coli* (např. FM5, HB101, PH5α, DH10 a MC1061), kmeny *Pseudomonas*, *Bacillus* a *Streptomyces*, přičemž preferovaným organismem je *E. coli*. Mezi vhodné eukaryontní hostitelské buňky patří kvasnice a jiné houby, hmyzí buňky, rostlinné buňky a živočišné buňky, jako například COS (tj. COS-1 a COS-7) a opičí buněčné linie CV-1, dále 3T3 linie odvozené od Swiss, Balb-c nebo NIH buňky, myši HeLa a L-929 buňky, a křeččí CHO, BHK nebo HaK buňky. V závislosti na použitém hostiteli bude produkován rekombinantní polypeptid glykosylovaný savčími nebo jinými eukaryontními uhlovodíky nebo může být neglykosylovaný.

Preferovaná produkční metoda bude záviset na mnoha faktorech a úvahách; optimální produkční postup pro danou situaci bude odborníkům pro minimálních experimentech jasný. Výsledný produkt exprese může být potom purifikován do téměř homogenního stavu s použitím známých technik. Typická purifikační procedura při produkci v prokaryontních buňkách zahrnuje rozrušení buněčné stěny vysokým tlakem nebo jinými způsoby, centrifugaci nebo filtraci k odstranění buněčných zbytků s následnou iontoměničovou chromatografií supernatantu nebo filtrátu a nakonec hydrofóbní chromatografií. Jestliže je analog produkován v nerozpustné formě, používá se jiná purifikační technika skládající se z rozpuštění příslušných částic obsahujících analoga s následnou iontoměničovou chromatografií, dále rekonformaci proteinu a nakonec chromatografií využívající hydrofóbní interakce. Vzorové purifikační techniky jsou uvedeny v běžně přístupném U.S.S.N 08/323, 329, uvedeném 13. října 1994. Obecně U.S.S.N 08/323, 329 ukazuje metodu pro purifikaci keratinocytových růstových faktorů zahrnující: (a) získání roztoku obsahujícího KGF; (b) navázání KGF z roztoku z části a) na kationtový výměnný nosič; (c) vymytí KGF z kationtového iontového nosiče (d) průchod eluovaného roztoku z (c) vhodnou kolonou s molekulárním sítem nebo provedení hydrofóbní chromatografie vymytého roztoku z (c); a (e) získání KGF z molekulárního síta nebo po hydrofóbní chromatografií.

Pochopitelně, že u analogů může být provedena rychlá analýza jejich fyzikálních vlastností. Část Příklady, uvádí různé dobře známé zkoušky stability, ačkoliv specifický test pro analoga není kritický. Navíc úroveň biologické aktivity (např. vazba receptoru a/nebo afinita mitogenní buněčné proliferace a/nebo *in vivo* aktivita) může být také testována s použitím různých zkoušek, z nichž jsou některé popsány v části Příklady. Pro zjištění, jestli analoga KGF vykazují dostatečnou biologickou aktivitu, se může použít řada dobře známých testů. Jeden takovýto test specificky zjišťuje u analogů KGF jejich schopnost kompetičně se vázat na receptor KGF

(KGFR) s navázaným ^{125}I -KGF (Bottaro et al. (1990), J. Biol. Chem., 265:12767–12770; Ron et al. (1993), J. Biol. Chem., 268:2984–2988). Alternativní metoda pro testování interakce KGFR s analogy KGF zahrnuje použití technik jako je analýza biospecifických interakcí v reálném čase (BIA) (Felder et al., (1993), Molecular & Cellular Biology, 13:1449–1455). Navíc mohou být pro testování schopnosti analogů KGF stimulovat syntézu DNA použity mitogenní testy (Rubin et al. (1989), viz předchozí text). Konečně můžou být analoga KGF testována na schopnost stimulovat buněčnou proliferaci pomocí proliferačních testů (Falco et al., 1988), Oncogene, 2:573–578). Použitím jakéhokoli shora zmíněného testovacího systému můžou být analoga KGF rychle otestována na jejich biologickou aktivitu.

V předkládaném vynálezu je pozornost zaměřena především na analoga, která si zachovávají plnou biologickou aktivitu KGF (tj. minimálně značně podobnou) *in vitro* nebo *in vivo*. Příklady KGF analogů s těmito vlastnostmi (jak bylo určeno jedním nebo více výše zmíněnými testy) jsou C(1,15)S, $\Delta\text{N3/C(15)S}$, $\Delta\text{N3/C(15)}$ –, $\Delta\text{N8/C(15)S}$, $\Delta\text{N8/C(15)}$ –, ΔN15 , ΔN16 , ΔN17 , ΔN18 , ΔN19 , ΔN20 , ΔN21 , ΔN22 , ΔN23 , ΔN24 nebo $\Delta\text{N23/R(144)Q}$.

Předkládaný vynález je dále zaměřený na složení jedné dávky účinné látky, která může být bezpečně aplikována orálně nebo neorálně pro léčení chorob u teplokrevných živočichů (jako například člověka). Takováto účinná látka může být ve formě lyofilizovaného nebo jinak dehydratovaného terapeutika nebo diagnostika, které může být rekonstituováno přidáním fyziologicky vhodného rozpouštědla. Tím může být jakéhokoli médium, jako je sterilní voda, fyziologický roztok, glukózový roztok, nebo jiný vodný uhlovodík (např. polyoly, jako manitol, xylitol, nebo glycerol), které je schopno rozpustit suchou směs, které je slučitelné s vybraným aplikačním způsobem a které neinterferuje negativně s aktivními principy a použitými rekonstitučními stabilizátory. Ve specifickém případě je předkládaný vynález zaměřen na soupravu pro produkci jednodávkové aplikační jednotky. Souprava obsahuje jednak obal se sušeným proteinem a pak druhý obal, s vodnou složkou, která obsahuje také rekonstituční stabilizátor. Co se týče koncentrace proteinu v roztoku – množství roztoku v každém obalu a obsah obalů (jedná se o vzájemně závislé parametry, které můžou být vhodně upraveny v závislosti na požadované koncentraci aktivní látky v aplikované jednotce dávky) může kolísat v širokém rozsahu, který bude jasný odborníkům.

Podle vynálezu mohou být KGF analoga užitečná jako terapeutické nebo diagnostické látky a nebo jako činidla pro výzkum. Mohou být tedy použita v *in vitro* a/nebo *in vivo* diagnostických testech pro kvantifikaci KGF ve vzorcích pletiv nebo orgánů, nebo určení a/nebo izolaci buněk, které produkují KGFR (Bottaro et al. (1990), J. Biol. Chem., 265:12767–12770; Ron et al., (1993), J. Biol. Chem., 268:2984–2988). Při testech pletiv nebo orgánů se zjistí méně radioaktivity ^{125}I -KGF analogu vázajícího se na KGFR (při srovnání se standardní vazebnou křivkou analoga ^{125}I -KGF) a to díky vazbě přirozeného KGF na KGFR. ^{125}I -KGF analog může být podobně použit pro detekci přítomnosti KGFR v různých typech buněk.

Tento vynález také předpokládá použití analoga KGF pro tvorbu protilátek proti peptidu – protilátek, které se také váží na přirozená KGF. V tomto případě se jedná o monoklonální nebo polyklonální protilátky, které jsou připraveny proti analogu KGF. Výsledné protilátky váží přednostně přirozený KGF, zejména když je tento protein ve své přírodní (biologicky aktivní) konformaci. Tyto protilátky se můžou použít pro detekci nebo purifikaci přírodního KGF.

Vynález navíc předpokládá použití analogů KGF pro nalezení molekul vázajících s vysokou nebo nízkou afinitou KGF (využitelných pro terapeutické aplikace) například pro účinné dodání KGF nebo jako inhibitor KGF aktivity. Pro identifikaci takovýchto vazebních molekul za fyziologických podmínek (tj. při 37 °C) je důležitá teplotní stabilita analogů KGF, protože jejich afinita vůči KGF může být silně závislá na teplotě a může se lišit oproti afinitě pozorované při 4 °C.

Pro použití *in vivo* mohou být KGF analoga doplněna aditivami. Mezi ně patří puify, nosiče, stabilizátory, excipienty, ochranné látky, látky upravující tonus, antioxidanty atd. (např. látky ovlivňující viskozitu nebo plnidlo). Výběr konkrétních aditiv bude záviset na skladovací formě

(tekutá nebo lyofilizovaná) a způsobu aplikace analogu KGF. Vhodnou formu je možné nalézt v REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (poslední vydání), Mack Publishing Company, Easton, PA.

- 5 Analoga KGF mohou být aplikována v terapeuticky účinných dávkách na konkrétně poškozená pletiva, nebo při klinicky nedostatečném počtu nefibroblastových epiteliálních buněk. Oblasti, kde mohou být analoga KGF úspěšně použita zahrnují (ale nejsou omezena pouze na ně):
 - stimulace, proliferace a diferenciací adnexálních struktur (adnexal structures), jako jsou například vlasové folikuly, potní žlázy nebo tukové žlázy u pacientů s popáleninami a jinými částečnými nebo vážnými poškozeními
 - urychlená reepitelizace lézí způsobených (epidermolysis bullosa), což je defekt v přilnavosti epidermis na vespod ležící kůži (dermis), vedoucí často k otevřeným bolestivým puchýřům, které
 - 15 mohou způsobit vážná onemocnění
 - k prevenci vypadávání vlasů způsobeném chemoterapií a k ošetření mužské plešatosti nebo progresivní ztrátě vlasů u mužů i žen
 - 20 – pro ošetření žaludečních a dvanáctníkových vředů
 - pro ošetření zánětlivých střevních onemocnění, jako např. Crohnova choroba (postihující především tenké střevo) a kolitidy vyvolávající vředy (postihující především tlusté střevo)
 - 25 – prevenci nebo zmírnění toxických vlivů radičních nebo chemoterapeutických ošetření (tj. předběžné ošetření a/nebo ošetření po vlastním léčení) pro indukci faktorů působících na ochranu buněk nebo regeneraci nebo oboje
 - stimulace produkce slizu v celém gastrointestinálním traktu
 - 30 – indukce proliferace a diferenciací pneumocytů typu II, což může pomoci při léčbě nebo prevenci chorob jako je například „sklovitá“ membrána (hyaline membrane disease), tj. syndrom kojeneckých dýchacích problémů a průduškové a plicní displasie (infant respiratory distress syndrome and bronchopulmonary dysplasia) u nedonošených dětí
 - 35 – stimulace proliferace a diferenciací průduškového a/nebo alveolárního epitelu s akutním nebo chronickým poškozením plic nebo insuficiencí díky dýchacím potížím (včetně vysokých hladin kyslíku), rozedmě plic (emphysema) nebo užívání chemoterapeutik poškozujících plíce, traumatům způsobeným respirátorem (ventilator trauma) nebo jiným činitelům poškozujícím
 - 40 plíce
 - zvýšená činnost jater k léčbě nebo prevenci hepatické cirrhosy, akutní selhání jater, škody způsobené akutní virovou hepatitidou a/nebo toxické poškození jater
 - 45 – indukce regenerace buněk rohovky, například při léčbě odřenin rohovky
 - indukce regenerace epiteliálních buněk při léčbě pokračující chorobě dásní (progressive gum disease)
 - 50 – indukce regenerace bubínkových epiteliálních buněk při léčbě poškození ušního bubínku a léčbě nebo prevenci počátku diabetes mellitus nebo jako doplněk úpravy při transplantaci ostrůvku buněk (an adjunct in the setting of islet cell transplantation).

55 Pacient, který potřebuje proliferující nefibroblastové epiteliální buňky bude ošetřen účinným množstvím analogu KGF. Pojem „účinné množství“ je takové množství analogu KGF, které je

nezbytné pro vyvolání požadované odpovědi u ošetřeného pacienta a bude zpravidla určeno ošetřujícím lékařem. Mezi faktory ovlivňující množství aplikovaného analoga KGF bude patřit věk, všeobecný stav pacienta, léčená choroba atd. Typická dávka se bude pohybovat v rozmezí 0,001 mg až 500 mg na 1 kg tělesné hmotnosti.

Analog KGF může být podán teplokrevným živočichům (kam patří i člověk) ne-orálně (tj. IV, IT, IM, SC nebo IP cestou), orálně nebo lokálně. Analog KGF může být použit jednorázově nebo opakovaně v závislosti na nemoci a stavu pacienta. V některých případech může být analog KGF podáván jako adjuvans k jiné léčbě a také v kombinaci s jinými farmaceutickými preparáty.

Následující příklady slouží k lepší ilustraci předkládaného vynálezu. Je jasné, že uvedené postupy mohou být modifikovány bez toho, aby byl ovlivněn „duch vynálezu“.

Příklady provedení vynálezu

Standardní metody používající postupy v následujících příkladech (nebo vhodné alternativní postupy) jsou uvedeny v běžně používaných manuálech pro molekulární biologii, jako například Molecular Cloning, Second Edition, Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1987) a Current Protocols in Molecular Biology, Ausabel et al., Greene Publishing Associates/Wiley-Interscience, New York (1990).

Příklad 1: Příprava DNA kódující KGF a analoga KGF

Klonování celého genu lidského KGF (kódujícího polypeptid se sekvencí nativního KGF) bylo provedeno jednak polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) s RNA z živočišných buněk a pomocí PCR chemicky syntetizovaných (optimalizovaný kodon *E. coli*) oligonukleotidů („OLIGA“). Obě procedury jsou popsány dále:

Byla provedena amplifikace s použitím RNA izolovaných z buněk (o kterých víme že produkují polypeptid) pomocí PCR. Nejprve se provede rozrušení buněk z buněčné linie lidských fibroblastů AG1523A (získané od Human Genetic Mutant Cell Culture, Repository Institute For Medical Research, Camden, New Jersey) pomocí guanidin thiokyanátu; pak následuje extrakce (podle metody popsané v práci Chomzynski et al. (1987), Anal. Biochem., 172:156). S použitím standardního protokolu pro reversní transkripci z celkové RNA byla vytvořena cDNA pro KGF. PCR amplifikace (PCR č. 1) genu KGF byla provedena s použitím cDNA KGF jako templátu a primerů OLIGO č. 1 a OLIGO č. 2, které kódují DNA sekvence bezprostředně na 5' a 3' genu KGF [teplotní cyklátor model 9600 (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT); 28 cyklů, každý zahrnující denaturaci – jednu minutu při 94 °C, annealing – dvě minuty při 60 °C a elongaci – tři minuty při 72 °C]. Malé alikvótní části produktu první PCR reakce byly potom použity jako templát pro druhou KGF PCR amplifikaci (PCR č. 2) za podmínek shodných s první reakcí kromě teploty pro annealing, která byla 50 °C. Pro expresní klonování genu KGF byly dále použity primery pro „nested PCR“ generující vhodná restrikční místa na obou koncích genu KGF – k modifikaci KGF DNA produktu z PCR č. 2 byly tak použity OLIGO č. 3 a OLIGO č. 4 (začlenění restrikčních míst pro *MluI* a *BamHI* na 5' a 3' konci genu) [PCR 3; 30 cyklů, každý zahrnující denaturaci – jedna minuta při 94 °C, annealing – dvě minuty při 60 °C a elongaci – tři minuty při 72 °C]. Tato DNA byla následovně štěpena restrikčními enzymy *MluI* a *BamHI*, extrahovaná fenolem a precipitována etanolem. Poté byla resuspendována a ligoována (s použitím T4 ligázy) do plasmidu pCFM1156 (obrázek 2A), který obsahuje „RHS“ signální sekvenci, čímž vznikl konstrukt RSH-KGF (obrázek 3).

Tímto ligačním produktem byly transformovány (podle metody popsané Hanahanem (1983) J. Mol. Biol., 166:557) buňky z *E. coli* (kmen FM5 – ATCC:53911) a následně vysety na LB médium s kanamycinem při 28 °C. Několik vybraných transformantů bylo dále pěstováno

- v malých tekutých kulturách obsahujících kanamycin v koncentraci 20 µg/ml. Z každé kultury byl izolován RSH–KGF plasmid a jeho DNA byla sekvenována. Vzhledem k vnitřnímu *NdeI* restrikčnímu místu v genu KGF nebylo možné přímo klonovat nativní sekvenci genu do příslušného expresního vektoru do míst ohraničených *NdeI* a *BamHI*. Toho se dosáhlo trojcestnou ligací.
- 5 Plasmid RSH–KGF byl štěpen v jedinečných restrikčních místech *BsmI* a *SstI* a fragment DNA asi 3 kb velký (obsahující 3' konec KGF genu) byl izolován následnou elektroforézou v 1% agarózovém gelu. Další PCR (PCR č. 4) byla provedena za stejných podmínek jako PCR č. 3 s primerem OLIGO č. 5 místo OLIGO č. 3. DNA produkt PCR reakce byl pak štěpen enzymy *NdeI* a *BsmI* a pomocí elektroforézy v 4% agaróze byl izolován DNA fragment 311 párů bází dlouhý.
- 10 Třetí fragment použitý v ligaci byl fragment DNA 1,8 kilobázi dlouhý z pCFM1156 vyštěpený s *NdeI* a *SstI* a izolovaný elektroforézou v 1% agarózovém gelu. Po následující ligaci (T4 ligáza), transformaci, selekci na kanamycinu a sekvenování DNA (jak je popsáno výše) byl vybrán klon obsahující konstrukt na obrázku 4 a tento plasmid byl označený jako KGF. Vzhledem k internímu ribosomálnímu vazebnému místu, které vede k tvorbě zkrácených produktů,
- 15 byla sekvence KGF DNA mezi jedinečnými *KpnI* a *EcoRI* místy nahrazena chemicky syntetizovanými OLIGO (OLIGO 6 až OLIGO 11) tak, aby se minimalizovalo použití interního startovacího místa (obrázek 5).

```

OLIGO#1 (SEQ ID NO:7):      5'-CAATGACCTAGGAGTAACAATCAAC-3'
OLIGO#2 (SEQ ID NO:8):      5'-AAAACAAACATAAATGCACAAGTCCA-3'
OLIGO#3 (SEQ ID NO:9):      5'-ACAACGCGTGCAATGACATGACTCCA-3'
OLIGO#4 (SEQ ID NO:10):
    5'-ACAGGATCCTATTAAGTTATTGCCATAGGAA-3'
OLIGO#5 (SEQ ID NO:11):
    5'-ACACATATGTGCAATGACATGACTCCA-3'
OLIGO#6 (SEQ ID NO:12):
    5'-CTGCGTATCGACAAACGCGGCAAAGTCAAGGGCACCC-3'
OLIGO#7 (SEQ ID NO:13):
    5'-AAGAGATGAAAAACAACACTACAATATTATGGAAATCCGTACTGTT-3'
OLIGO#8 (SEQ ID NO:14):
    5'-GCTGTTGGTATCGTTGCAATCAAAGGTGTTGAATCTG-3'
OLIGO#9 (SEQ ID NO:15):
    5'-TCTTGGGTGCCCTTGACTTTGCCGCGTTTGTGCGATACGCAGGTAC-3'
OLIGO#10 (SEQ ID NO:16):
    5'-ACAGCAACAGTACGGATTTCCATAATATTGTAGTTGTTTTTCATC-3'
OLIGO#11 (SEQ ID NO:17):
    5'-AATTCAGATTCAACACCTTTGATTGCAACGATACCA-3'

```

- OLIGA byla fosforylována T4 polynukleotid kinázou a poté tepelně denaturována. Jednopramen-
 20 né (ss – single stranded) OLIGA potom byla ponechána vytvořit dvoupramenné (ds) fragmenty DNA pomalým snížením teploty na úroveň laboratoře. Poté byla použita T4 ligáza ke kovalentnímu připojení jak interních OLIGO shodných (sticky) konců tak celého ds OLIGO fragmentu do KGF plasmidu štěpeného enzymy *KpnI* a *EcoRI*. Nový plasmid byl označen jako KGF(dsd).
- 25 KGF gen s úplně optimalizovaným *E. coli* kodonem byl vytvořen amplifikací pomocí PCR s chemicky syntetizovanými OLIGO č. 12 až 24.

OLIGO#12 (SEQ ID NO:18): 5'-AGTTTGTGATCTAGAAGGAGG-3'

OLIGO#13 (SEQ ID NO:19): 5'-TCAAACTGGATCCTATTAA-3'

OLIGO#14 (SEQ ID NO:20):

5'-AGTTTGTGATCTAGAAGGAGGAATAACATATGTGCAACGACATGAC-

TCCGGAACAGATGGCTACCAACGTTAAGTCTCCAGCCCGGAACGT-3'

OLIGO#15 (SEQ ID NO:21):

5'-CACACCCGTAGCTACGACTACATGGAAGGTGGTGACATCCGTGTTC-

GTCGTCTGTTCTGCCGTACCCAGTGGTACCTGCGTATCGACAAA-3'

OLIGO#16 (SEQ ID NO:22):

5'-CGTGGTAAAGTTAAAGGTACCCAGGAAATGAAAAACAATA-

CAACATCATGGAAATCCGTACTGTTGCTGTTGGTATCGTTGCAATCAAA-3'

OLIGO#17 (SEQ ID NO:23):

5'-GGTGTGAATCTGAATTCTACCTGGCAATGAACAAAGAAGGTAAAC-

TGTACGC GAATGCAACGAAGACTGCAACTTCAAAGAA-3'

OLIGO#18 (SEQ ID NO:24):

5'-CTGATCCTGGAAAACCACTACAACACCTACGCATCTGCTAAATGGA-

CCCACAACGGTGGTGAAATGTTGCTCTGAACCAGAAAGGT-3'

OLIGO#19 (SEQ ID NO:25):

5'-ATCCCGGTTTCGTGGT CCAAAAAAGAACAGAAAACCGCT-

CACTTCCTGCCGATGGCAATCACTTAATAGGATCCAGTTTTGA-3'

OLIGO#20 (SEQ ID NO:26): 5'-TACGGGTGTGACGTTCCGGG-3'

OLIGO#21 (SEQ ID NO:27): 5'-CTTTACCACGTTTGTGCGATA-3'

OLIGO#22 (SEQ ID NO:28): 5'-ATTCAACACCTTTGATTGCA-3'

OLIGO#23 (SEQ ID NO:29): 5'-CCAGGATCAGTTCTTTGAAG-3'

OLIGO#24 (SEQ ID NO:30): 5'-GAACCGGGATACCTTTCTGG-3'

OLIGA 12 až 24 byla navržena tak, aby celá DNA sekvence kódující nativní KGF byla reprezentována OLIGY z „Watsonova“ nebo „Crickova“ pramene a aby po PCR by poskytla žádanou dvoupramennou DNA sekvenci (obrázek 6) [PCR č. 5, teplotní cyklátor model 9600 (Perkin-Elmer Cetus); 21 cyklů skládajících se z denaturace – 31 vteřin při 94 °C, annealingu – 31 vteřin při 50 °C a elongace – 73 °C po 31 vteřin; po těchto 21 cyklech byla PCR reakce zakončena závěrečným sedmi minutovým elongačním krokem]. Po PCR amplifikaci byl výsledný DNA fragment štěpen enzymy *XbaI* a *BamHI* a fragment 521 bp byl ligován do expresního plasmidu pCFM1156, který byl štěpen stejnými enzymy. PCR č. 5 používala vnější primery (100 pmolů/100 μl rxn) OLIGO č. 12 a OLIGO č. 13 a 1ul/100 μl rxn KGF templátu odvozeného ligací (T4 ligázou) OLIGO č. 14 až 19 (OLIGO č. 15 až 18 byly fosforylovány T4 polynukleotid kinázou) s použitím OLIGO č. 20 až 24 jako pomocný oligonukleotidů (band-aid oligos) pro ligaci (Jayraman et al. (1992), Biotechniques, 12:392). Konečný produkt byl označen jako KGF (optimalizovaný kodon).

Všechna zde popsaná analoga KGF jsou složena z části DNA sekvencí nalézajících se v KGF (dsd) nebo KGF (optimalizovaný kodon) nebo z kombinace obou. Tyto sekvence jsou dále modifikované inzercí do vhodných restričních míst DNA sekvencí, které kódují specifická

aminokyselinová KGF analoga, s použitím jedné nebo více technik pro syntézu DNA fragmentů popsaných výše. Jakýkoliv analog může být vytvořen v celém svém rozsahu jednou z výše popsaných technik. Obecně se při konstrukci OLIGO používali optimalizované *E. coli* kodony tam, kde to bylo vhodné, i když přítomnost optimalizovaných *E. coli* kodonů (v části nebo v celku jakéhokoliv z genů, kde byl tento vliv zjišťován) nezvýšila významně výnos proteinu, který mohl být získán z kultivovaných bakteriálních buněk. Obrázky 7–24 a 37–50 jsou uvedené jako vhodný příklad specifické nukleotidové a aminokyselinové sekvence konstruktů analoga KGF: C(1,15)S, (obrázek 7).

10

Příklad 2: Produkce v *E. coli*

Při klonování analogů genu KGF byly použity tři různé expresní plasmidy. Jednalo se o pCFM1156 (ATCC 69702), pCFM1656 (ATCC 69576) a pCFM3102 (obrázky 2A, 2B a 2C). Plasmid p3102 může být odvozen z plasmidu pCFM1656 sérií místních mutagenéz (změn bází) pomocí PCR s přesahujícími oligo (PCR overlapping oligo mutagenesis). Začíná se na *Bgl*III místě (v plasmidu pCFM1656, 180 pár bází) bezprostředně u 5' replikačního promotoru plasmidu, PcopB, a pokračuje se směrem ke genům replikace plasmidu, přičemž dochází k těmto změnám:

pCFM1656 bp #	bp in pCFM1656	bp changed to in pCFM3102
# 204	T/A	C/G
# 428	A/T	G/C
# 509	G/C	A/T
# 617	--	insert two G/C bp
# 677	G/C	T/A
# 978	T/A	C/G
# 992	G/C	A/T
# 1002	A/T	C/G
# 1005	C/G	T/A
# 1026	A/T	T/A
# 1045	C/G	T/A
# 1176	G/C	T/A
# 1464	G/C	T/A
# 2026	G/C	bp deletion
# 2186	C/G	T/A
# 2479	A/T	T/A
# 2498–2501	AGTG TCAC	GTCA CAGT
# 2641–2647	TCCGAGC AGGCTCG	bp deletion
# 3441	G/C	A/T
# 3452	G/C	A/T
# 3649	A/T	T/A
# 4556	--	insert bps
(SEQ ID NO:43) 5'-GAGCTCACTAGTGTGACCTGCAG-3'		
(SEQ ID NO:44) 5'-CTCGAGTGATCACAGCTGGACGTC-3'		

20 Jak je vidět z výše uvedeného, plasmidy pCFM1156, pCFM1656 a pCFM3102 jsou si vzájemně velmi podobní a obsahují mnoho stejných restričních míst. Plasmidy byly vybrány podle jejich vhodnosti a části vektorové DNA mohou být jednoduše změněny pro potřeby nových konstruktů. Hostitelským organismem použitým pro všechna klonování byla *E. coli*, kmen FM5

(ATCC: 53911) a transformace byla prováděna podle metody Hanahana (1983, viz předchozí text) nebo elektroelucí s použitím přístroje Gene Pulser transfection apparatus (BioRad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA), podle protokolu dodaného výrobcem.

- 5 Nejprve bylo připraveno malé čerstvé inokulum žádaného rekombinantního klonu *E. coli*, obsahujícího na jednom ze tří pCFM vektorů žádaný konstrukt. Do dvoulitrové lahve obsahující 500 ml Luriova bujónu bylo přeneseno 0,1 ml zmražené zásobní kultury vhodného kmene v glycerolu. Kultura byla třepána při 30 °C po 16 hodin. Poté byla kultura přenesena do 15 l fermentoru obsahujícího 8 l sterilního média používaného pro fermentace ve větších objemech
10 (Tsai, et al. (1987), J. Industrial Microbiol., 2:181–187).

- Na začátku fermentace bylo dodáváno živné médium Feed #1 (Tsai, et al. (1987), viz předchozí text). V okamžiku, kdy hodnota OD600 dosáhla hodnoty 35, byla rychlým zvýšením teploty kultury na 37 °C indukována exprese žádaného analoga KGF. Při této teplotě se plasmid
15 amplifikuje. Po dvou hodinách při 37 °C byla teplota kultury dále rychle zvýšena na 42 °C, čímž byl denaturován CI represor. Přidávání Feed 1 bylo přerušeno a místo něj bylo poté přidáváno živné médium Feed 2 v množství 300 ml za hodinu. Feed 2 obsahovalo 175g/l peptonu (trypticase–peptone), 87,5g/l kvasničného extraktu a 250g/l glukosy. Po jedné hodině kultivace při 42 °C byla teplota kultury snížena na 36 °C a tato teplota byla dále udržována po
20 následujících šest hodin.

- Fermentor byl poté zastaven a buňky byly koncentrovány centrifugací v plastických pytlících vložených do jednolitrových centrifugačních kyvet. Médium bylo centrifugováno 60 minut při
25 400 otáčkách za minutu. Supernatant by poté odebrán a pelet (sedimentované buňky) byl zmražen při –90 °C.

- Následujícím způsobem byla purifikována tato analoga KGF (získána expresí v *E. Coli*): přirozený KGF, C(1,15)S, C(1,15)S/R(144)E, C(1,15)S/R(144)Q, ΔN15, ΔN23 a ΔN23/R(144)Q. Pelet (hustá buněčná suspenze) získaný z vysokohustotní fermentace byl resuspendován pomocí vhodného výkonného (poskytujícího velké střížné síly) mixeru při 4 °C v roztoku 0,2 M NaCl
30 v 20 mM NaPO₄, pH 7,5, tak, aby výsledná suspenze byla 10 až 20% (hm./obj.). Resuspendované buňky byly poté lysovány trojitým homogenizováním v homogenizátoru (APV Gaulin, Inc., Everett, MA, USA). Homogenát vytékající z homogenizátoru byl ochlazován na 4 až 8 °C pomocí vhodného chladicího zařízení. Zbytky buněk byly odstraněny centrifugací lysátu při
35 4200 otáčkách za minutu, 4 °C, po dobu 30 až 60 minut v centrifuze J–6B (Beckman Instruments, Inc., Brea, CA, USA, použitý rotor JS 4.2). Supernatant byl poté opatrně dekantován a nanesen na předem připravenou kolonu (450ml, 5 cm x 23 cm) S–Sepharosy Fast Flow (Pharmacia, Piscataway, NJ, USA). Kolona byla ekvilibrována roztokem 0,2 M NaCl v 20 mM NaPO₄, pH 7,5, při 4 °C. Poté byla kolona promyta 2250 ml (pětinásobný objem kolony) roztoku
40 0,4 M NaCl v 20 mM NaPO₄, pH 7,5, při 4 °C. Purifikovaný protein byl eluován z kolony 5 l roztoku 0,5 M NaCl v 20 mM NaPO₄, pH 7,5. Absorbance eluátu při 280nm byla kontinuálně zaznamenávána a eluát byl jímán do frakcí o objemu 50 ml. Frakce obsahující eluované látky (identifikované pomocí absorbance při 280 nm) byly dále analyzovány pomocí SDS–PAGE elektroforézy (14% gel). Touto metodou byla potvrzena přítomnost požadovaného proteinu ve
45 frakcích.

- Frakce obsahující požadované proteiny byly spojeny a následně k nim byla přidána destilovaná voda v poměru 1:1. Zředěný roztok byl poté nanesen na předem připravenou kolonu (450ml, 5 cm x 23 cm) S–Sepharosy Fast Flow ekvilibrovanou roztokem 0,4 M NaCl v 20 mM NaPO₄,
50 pH 6,8, při 4 °C. Kolona byla poté promyta 2250 ml roztoku 0,4 M NaCl v 20 mM NaPO₄, pH 6,8. Proteiny byly poté eluovány dvacetinásobným objemem kolony pomocí lineárního gradientu roztoku NaCl v 20 mM NaPO₄, pH 6,8. Koncentrace NaCl se pohybovala od 0,4 M do 0,6 M. Opět byly jímány 50 ml frakce, při současném měření absorbance eluátu při 280nm. Frakce obsahující purifikovaný protein (stanoveno pomocí 14% SDS PAGE) byly spojeny a zkoncentro-

vány filtrací přes membránu (YM-10, 10000 molecular weight cutoff) v 350 ml nádobách za současného míchání (Amicon, Inc. Mayberry, MA, USA) na výsledný objem 30–40 ml.

5 Koncentrát byl poté nanesen na předem připravenou kolonu (1300 ml, 4,4 cm x 85 cm) Superdex-75 (Pharmacia) ekvilibrovanou pufrém obsahujícím 1X PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, „D-PBS“, bez obsahu vápenatých a hořečnatých iontů) nebo 0,15 M roztokem NaCl v 20 mM NaPO₄, pH 7,0. Po nanesení vzorku byly proteiny eluovány z kolony použitím kolonového pufru. Byly jímány desetimililitrové frakce a ty, které obsahovaly požadovaný analog (stanoveno pomocí 14% SDS-PAGE) byly spojeny. Koncentrace proteinů v takto získané 10 frakci byla běžně asi 5 až 10 mg/ml. Pokud není uvedeno jinak byly všechny výše uvedené kroky prováděny při 4 až 8 °C.

Alternativní postup purifikace byl použit v případě přirozeného KGF, C(1,15)S a ΔN23. Pokud 15 není uvedeno jinak byly všechny kroky prováděny při 23 ± 5 °C; tuto teplotu měly i veškeré použité roztoky a zařízení.

Po dokončení produkční fáze bakteriální fermentace byla buněčná kultura ochlazená na 4 až 8 °C a buňky byly izolovány centrifugací či jiným podobným způsobem. Na základě očekávaného 20 výtěžku proteinu na jednotku buněčné hmoty a množství požadovaného purifikovaného proteinu bylo přiměřené množství buněčné hmoty resuspendováno v pětinasobku (váhově) slabého pufru (0,2 M NaCl, 20 mM NaPO₄, pH 7,5). Buňky byly resuspendovány na homogenní suspenzi pomocí vysokoobrátkového (high shearing) mixeru. Teplota buněčné suspenze byla během homogenizace udržována na 4 až 8 °C.

25 Buňky byly poté lysovány tlakem, např. dvojnásobnou homogenizací buněčné suspenze ve vhodně velkém buněčném homogenizátoru. Homogenát byl udržován chladný (5 ± 3 °C). K vyčištění buněčného lysátu byl použit předem připravený „hluboký“ filtr (depth filter housing, Cuno, Inc., Meriden, CT, USA) vybavený filtrem s odpovídající plochou. Filtr byl ekvilibrován přiměřeným množstvím 0,2 M NaCl, připraveného v 20 mM NaPO₄, pH 7,5. Ekvilibrace a promytí bylo 30 prováděno při 5 ± 3 °C. Po vyčištění lysátu filtrací přes vhodně upravený filtr byl tento promyt roztokem 0,2 M NaCl v 20 mM NaPO₄, pH 7,5. Filtrát a všechny další promývací roztoky byly jímány do chlazené nádoby odpovídajícího objemu. Všechny operace byly prováděny při teplotě nižší než 10 °C.

35 Lysát byl dále přečištěn na předem připravené koloně SP-Sepharosy Fast Flow obsahující minimálně 1 ml Sepharosy na 2 g buněk. Kolona SP-Sepharosy Fast Flow byla ekvilibrována vychlazeným (5 ± 3 °C) 0,2 M roztokem NaCl v 20 mM NaPO₄, pH 7,5. Teplota kolony byla udržována na hodnotě nižší než 10 °C. Přečištěný lysát (5 ± 3 °C) byl poté nanesen na kolonu iontoměniče a absorbance eluátu při 280 nm byla kontinuálně monitorována. Po nanesení vzorku 40 byla kolona promyta vychlazeným 0,2 M roztokem NaCl v 20 mM NaPO₄, pH 7,5 a následně ještě promyta 0,3 M roztokem NaCl v 20 mM NaPO₄, pH 7,5 při teplotě 23 ± 5 °C.

Požadovaný protein byl eluován pomocí lineárního gradientu NaCl o koncentraci 0,2–1 M, připraveného v 20 mM NaPO₄, pH 7,5. Převážná část produktu byla sebrána v několika frakcích na 45 základě měření absorbance při 280 nm.

K oxidaci volných SH skupin byl proveden oxidační krok. U proteinů se změněným obsahem cysteinu, (v porovnání s přírodním KGF) bylo přidáno oxidační činidlo (např. cystamin dihydrochlorid, nebo jiné vhodné oxidační činidlo, například cystein, oxidovaný glutathion nebo ionty 50 Cu²⁺) tak, aby výsledná koncentrace byla 1–20 mM a pH bylo upraveno na 7 až 9,5. V případě, že byl použit cystamin dihydrochlorid, bylo pH upraveno na 9,0 ± 0,3. Oxidace byla prováděna při 10 až 30 °C po vhodnou dobu. V případě přírodního KGF byla oxidace provedena přidávkou vhodného množství (NH₄)₂SO₄, např. 1–2 M (NH₄)₂SO₄ a pH bylo upraveno na hodnotu 7,5–9,5, přičemž teplota byla udržována na 23 ± 5 °C po přiměřenou dobu.

55

Po oxidaci bylo pH upraveno na hodnotu pohybující se mezi 6,5 a 9,5. V případě potřeby byl do roztoku přidán pevný $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ tak, aby jeho výsledná koncentrace nepřesáhla 2 M koncentraci. Roztok byl zbaven pevných částic přečištěním filtrací přes vhodný filtr.

- 5 Filtrát – oxidovaný produkt, byl dále dělen pomocí HIC (hydrophobic interaction chromatography). Jako matrice pro HIC byl použit Butyl–650M Toyopearl (Tosohas, Inc., Montgomeryville, PA, USA). Roztok obsahující protein byl nanesen na kolonu, která byla předem ekvilibrována roztokem obsahujícím 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,15 M NaCl, 20 mM NaPO_4 , pH 7,0. Po nanesení vzorku byla kolona promyta roztokem 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,15 M NaCl a 20 mM NaPO_4 ,
10 pH 7,0. Požadovaný protein byl poté eluován snižujícím se lineárním gradientem 2 až 0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, který byl rozpuštěn v roztoku 0,15 M NaCl a 20 mM NaPO_4 , pH 7,0. V okamžiku, kdy se začal požadovaný protein z kolony vymývat, což bylo indikováno zvyšující se absorbcí eluátu při 280 nm, byly jímány frakce. Část každé frakce byla poté analyzována pomocí SDS–PAGE. Frakce obsahující požadovaný protein byly spojeny, dobře promíchány a byl stanoven
15 objem takto získané spojené frakce a koncentrace proteinů v této spojené frakci.

Spojený eluát po HIC, obsahující protein, byl poté zkoncentrován a eluční pufr vyměněn. Běžně byly proteiny zkoncentrovány na 5,0–10,0 mg/ml. Ultrafiltrace byla provedena s použitím ultrafiltračního zařízení vybaveného kazetovým systémem PTGC Pellicon (Millipore, Inc., Bedford, MA, USA) s membránami o vhodné velikosti pórů.
20

Po zkoncentrování byl vzorek diafiltrován proti vhodnému pufru. Vzorek vyšlý z koncentračního kroku byl diafiltrován proti roztoku obsahujícím 0,15 M NaCl a 20 mM NaPO_4 , pH 7,0, a to tak dlouho, dokud se nelišila vodivost koncentráту od vodivosti roztoku 0,15 M NaCl a 20 mM
25 NaPO_4 , pH 7,0 o méně než 5%.

Kromě toho byl koncentrovaný a diafiltrován vzorek obsahující proteiny přefiltrován přes filtry Posidyne s velikostí pórů 0,1 μm (Pall, Inc., Cortland, NY, USA). Důvodem bylo odstranění vysráženého materiálu a bakteriálních endotoxinů, které se mohou ve vzorku vyskytovat. Po
30 stanovení koncentrace proteinů v roztoku a na základě požadavku na konečnou koncentraci produktu byl roztok zředěn roztokem 0,15 M NaCl a 20 mM fosforečnanu draselného, pH 7,0. Závěrem byla provedena sterilizace filtrací přes 0,22 μm filtr. Konečný produkt byl přenesen do apyrogenní nádoby ke skladování (cca při 5 °C) před dalším zpracováním.

35 B. Analýza

Analýza byla provedena s použitím přirozeného KGF, C(1,15)S, C(1,15)S/R(144)Q, ΔN15 , ΔN23 a $\Delta\text{N23/R(144)Q}$. Všechny tyto látky byly připraveny s použitím *E-coli*.

40 Konformační stabilita

Polypeptidy byly porovnávány vzhledem ke své stabilitě během skladování, teplotě „tepelného rozbalení“ (thermal unfolding transition temperatures) T_m a stabilitě v širokém spektru pH.

Stabilita během skladování

- 45 Nativní KGF a C(1,15)S byly inkubovány při 37 °C po dobu cca 24 hodin a poté byl stanoven obsah zbylých proteinů. Výsledky jsou shrnuty na obrázcích 24 až 26.

Na obrázku 25 je porovnáván nativní KGF s C(1,15)S při skladování v 20 mM roztoku fosforečnanu sodného, 0,15 M NaCl, pH 7,0 při 37 °C po 27 hodin. C(1,15) vykazuje signifikantní nárůst
50 množství rozpuštěného proteinu relativně vůči nativnímu KGF.

Na obrázku 26 je porovnáván nativní KGF s C(1,15)S při skladování v 0,15 M NaCl, 20 mM NaPO_4 , 0,15 M NaCl, pH 7,0 při 37 °C. Opět zde C(1,15)S vykazuje relativně zvýšenou stabilitu vůči nativnímu KGF.

Na obrázku 27 je porovnávána stabilita nativní KGF, ΔN15 a C(1,15)S při skladování v PBS a v 50 mM NaPO₄, 0,15 M NaCl, pH 7,0 při 37 °C po 18 hodin. Množství rozpuštěného proteinu je mnohem vyšší v roztoku s vysokým obsahem fosforečnanu než v roztoku PBS (100 versus 65%).

5 ΔN15 a také C(1,15)S vykazují jasně zvýšenou stabilitu v porovnání s nativním KGF. ΔN15 a C(1,15)S dával také 100% výtěžnost v roztoku s vysokým obsahem fosforečnanů, jak lze očekávat z výsledků s nativním KGF.

Bylo též provedeno jedno předběžné srovnání stability během skladování mezi C(1,15,40)S a C(40)S (který je kódován bázemi 201 až 684 sekvence SEQ ID NO:1, s výjimkou, že Ser⁴⁰ je kódován AGA) a mezi C(1,15,102) a C(102)S (který je kódován bázemi 201 až 684 sekvence SEQ ID NO:1, s výjimkou, že Ser¹⁰² je kódován AGG). Výsledky (data nejsou ukázána) naznačují sníženou stabilitu (např. méně rozpustného proteinu po inkubaci při 37 °C). Nicméně množství rozpustného správně sbaleného C(1,15,40)S proteinu, který byl purifikován z média bylo vyšší než množství C(40)S, což předpokládá, že C(1,15,40)S může být ve skutečnosti stabilnější a že výsledky porovnávacího pokusu jsou neprůkazné. Předkládaný vynález zahrnuje přednostně analoga KGF, která mají jiné substituce než substituce na Cys⁴⁰, Cys¹⁰² a Cys¹⁰⁶ a přednostně vylučují C(1,5,40)S, C(1,15,102)S a C(1,15,40,104,016).

20 Schopnost C(1,15)S/R(144)Q a ΔN23/R(144)Q zamezit agregaci při zvýšené teplotě byla též testována. Vzorek obsahující 0,5 mg/ml proteinu byl připraven v D-PBS. 0,5 ml každého ze vzorků bylo přeneseno do třímililitrových skleněných lahvíček typu 1 (type-1 glass vials). Lahvičky byly uzavřeny gumovou zátkou a 13 mm hliníkovým snadno vyjímatelným těsněním (flip-off aluminium seal). Tyto lahvičky byly poté vloženy do inkubátoru s teplotou 37 °C. V předem stanovené časové intervaly byly lahvičky odebrány a vzorky byly analyzovány vzhledem ke ztrátě rozpustných proteinů. Viditelná sraženina byla odstraněna centrifugací 250μl každého vzorku přes 0,22 μm filtr Spin-XTM (Costar, Cambridge, MA, USA). Rozpustné proteiny ve z filtrovaném roztoku byly následně analyzovány pomocí HPLC (size exclusion). Množství rozpustného proteinu bylo stanoveno integrací plochy píků na chromatogramu HPLC a vynesením výsledků jako funkce závislosti na době inkubace při 37 °C. Výsledky jsou ukázány na obrázku 27.

Poločasy ztráty rozpustných monomerních proteinů byly odhadnuty z těchto kinetických křivek. Tabulka 1 ukazuje poločasy „rozpadu“ pro zbývající rozpustné KGF při skladování při 37 °C pro tyto proteiny.

Tabulka 1

Poločas rozpadu rozpustných, monomerních proteinů

Protein	t _{1/2} (dny)
Nativní KGF	0,6
ΔN23	1,1
C(1,15)	1,2
C(1,15)S/R(144)Q	13,3
ΔN23/R144Q	22,3
C(1,15)S/R(144)E	38,0

Jak je vidět z výše uvedené tabulky 1 a obrázku 28, je nativní KGF agregován nejrychleji s poločasem rozpustnosti 0,6 dne. C(1,15)S/R(144)Q, ΔN23/R(144)Q a C(1,15)S/R(144)E vykazují značný nárůst rozpustného poločasu a to 13,3, 22,3 a 38 dní.

5 Teplotní rozbalení

Teplotní rozvinutí bylo monitorováno pomocí cirkulárního dichroismu (CD) při 230 nm s použitím spektropolarimetru J-720 (Jasco, Inc., Easton, MD, USA) vybaveného teplotním kontrolním systémem typu PTC-343 Peltier. Pro analýzu CD byly jednotlivé vzorky obsahující 0,1 mg/ml polypeptidu, které měly být analyzovány, připraveny v D-PBS (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY, USA). 2,5 ml každého ze vzorků bylo přeneseno do pravoúhlé křemenné (Suprasil – Hereaus Quarzschmelze, GmbH, Hnau, Germany) desetimilimetrové fluorescenční kyvety (Hellma Cells, Inc., Jamaica, NY, USA). Kyveta byla vložena do teplotně kontrolovaného systému spektropolarimetru typu Peltier. Teplotní rozvinutí bylo prováděno rychlostí 50 °C za hodinu. Změny v elipticitě byly monitorovány při 230 nm jako indikátoru rozvinutí. Teplota T_m byla pro každý vzorek stanovena změřením teploty při které bylo 50% molekul proteinu v roz-
toku rozvinutých (Biophysical Chemistry, Cantor and Schimmel (eds), W. H. Freeman and Co. San Francisco (1980). Hodnoty T_m každého ze tří proteinů jsou uvedeny v tabulce 2.

20 Tabulka 2

Hodnoty bodů tání (melting temperature)

Protein	T_m (°C)
Nativní KGF	54,0
ΔN15	55,0
C(1,15)	55,0
ΔN23	56,0
C(1,15)S/R(144)Q	62,5
ΔN23/R144Q	63,0
C(1,15)S/R(144)E	63,5

Jak ukazují tyto výsledky, C(1,15)S a ΔN15 mají hodnotu T_m o jeden stupeň vyšší v porovnání s nativním KGF. ΔN23 má T_m opět o jeden stupeň vyšší. Nicméně substituce R144Q na C(1,15)S/R(144)Q či ΔN23 přidá zvýšení T_m o více než 6 °C a více než 7 °C v porovnání s nativním KGF. Kromě toho je T_m u C(1,15)S/R(144)E o více než 9 °C vyšší než T_m nativního KGF.

pH

30 Stabilita v rozmezí pH byla porovnávána u C(1,15)S/R(144)Q a C(1,15)S/R(144)E s nativním pH. Rozdílné pH bylo upravováno v roztocích D-PBS přidavkem koncentrované HCl nebo NaOH. Přibližně 2,35 ml D-PBS s rozdílnou hodnotou pH bylo smícháno s 100 μl 2,45 mg/ml proteinu KGF v křemenné kyvety. Tyto vzorky byly teplotně rozvinuty rychlostí 50 °C za hodinu a monitorovány s použitím CD při 230 nm. Obrázek 29 ukazuje T_m jako funkci pH pro nativní
35 KGF, C(1,15)S/R(144)Q a C(1,15)S/R(144)E. V testovaném rozmezí pH mají C(1,15)S/R(144)Q a C(1,15)S/R(144)E vždy vyšší T_m než nativní KGF.

Biologická aktivita *in vitro*

40 Mitogenní aktivita C(1,15)S, ΔN15, ΔN23, ΔN23/R144Q, C(1,15)S/R(144)Q a C(1,15)S/R(144)W byla stanovena *in vitro* jako funkce koncentrace proteinů a polovičky maximálních

koncentrací. Tato funkce byla stanovena měřením příjmu [³H] thymidinu buňkami Balb/MK (podle metody Rubina et al. (1989, viz předchozí text). Obecně byla koncentrace každého z analogů KGF stanovena s použitím *in vitro* biologického testu a vztažena vůči známému standardu nativního KGF. Každý analog KGF byl poté zředěn a testován na biologickou aktivitu s použitím Balb/MK biologického testu. Vzorky byly nejdříve naředěny pomocí média složeného z 50% Eagle's MEM média (přípraveného na zakázku), 50% F12 takéž připraveného na zakázku, 5 µg/ml transferrinu, 5 ng/ml seleničitanu sodného, 0,0005% HSA a 0,005% Tween 20. Vzorky KGF byly poté přidány do 96 jamkových destiček Falcon Primeria, v kterých byly již Balb/MK buňky. Bylo měřeno zabudovávání [³H]thymidinu během syntézy DNA. Tato inkorporace byla poté přepočítána na vliv přirozeného KGF porovnáním se standardní křivkou pro přirozený KGF. Výsledky jsou prezentovány na obrázcích 30 až 35. Jak je z těchto obrázků vidět, testovaná analoga KGF popsaná na obrázcích 29 až 34 mají s nativním KGF srovnatelnou aktivitu.

15 Příklad 3: Produkce v savčích buněčných kulturách.

Tento příklad popisuje expresi, izolaci a charakterizaci dvou biologicky aktivních rekombinantních KGF (rKGF), produkovaných v savčím expresním systému.

20 Lidský gen pro KGF byl izolován pomocí PCR, amplifikací cDNA získané z buněk normálních kožních lidských fibroblastů (Clonetec, Inc., Palo Alto, CA, USA). cDNA byla připravena pomocí reverzní transkriptázy a poté byla použita PCR k amplifikaci genu pro KGF. OLIGO#25 a OLIGO#26 byly použity k amplifikaci genu z cDNA a OLIGO#27 a OLIGO#28 byly pomocí druhé PCR amplifikace použity k vnesení restričních míst *HindIII* a *BglII* na konce fragmentu, tak jak je vidět na obrázku 1.

OLIGO#25 (SEQ ID NO:69): 5'-CAATCTACAATTCACAGA-3'
 OLIGO#26 (SEQ ID NO:70): 5'-TTAAGTTATTGCCATAGG-3'
 OLIGO#27 (SEQ ID NO:71): 5'-AACAAAGCTTCTACAATTCACAGATAGGA-3'
 OLIGO#28 (SEQ ID NO:72): 5'-AACAAAGATCTTAAGTTATTGCCATAGG-3'

Následovalo klonování a potvrzení sekvence DNA. Poté byl gen pro KGF použit. Amplifikace byla provedena s použitím OLIGO#29 a OLIGO#30.

OLIGO#29 (SEQ. ID. NO:73):
 5'-CGGTCTAGACCACCATGCACAAATGGATACTGACATGG-3'
 OLIGO#30 (SEQ. ID. NO:74):
 5'-GCCGTCGACCTATTAAGTTATTGCCATAGGAAG-3'

30 Primer – OLIGO#29 – (sense primer) obsahoval místo *XbaI* a Kozakovu translační sekvenci (5'-CCACC-3') (consensus Kozak translationn sequence) před startovacím kodonem ATG ve směru k 5' konci. Antisense primer – OLIGO#30 – obsahoval klonovací místo *Sall* a další sto kodon. Po 18 cyklech amplifikace PCR (30 sekund denaturace při 94 °C, 40 sekund annealing při 55 °C a 40 sekund elongace při 72 °C) byl produkt štěpen *XbaI* a *Sall* a ligován se stejně vyštěpenou DNA z pDSRα2 (podle metody Bourdrela et al. (1993), Protein Exp. and Purif, 4:130–140 a Lu et al. (1992), Arch. Biochem. Biophys. 298: 150–158). Výsledkem byl plasmid KGF/pDSRα2, v kterém byl lidský gen pro KGF umístěn mezi časný promotor SV40 a α-FSH polyadenylovou sekvencí. Byly vybrány dva klony a analýzou sekvence DNA se potvrdila konstrukce žádaného vektoru.

Dva mikrogramy DNA KGF/pDSR α 2 byly poté linearizovány s použitím *PvuI*. CHO buňky (Chinese hamster ovary cells) byly den před použitím vysety v množství $0,8 \times 10^6$ buněk na 60 mm petriho misku. Takto připravená vajíčka byla transfekována připravenou DNA s použitím standardní metody vysrážením pomocí vápenatých a fosfátových iontů (Bourdrel et al., viz předchozí text). Po dvou týdnech byly vybrány jednotlivé kolonie a přeneseny na 24 jamkové destičky. Upravená média se po dosažení konfluence považovala za prostá séra a aliquoty byly analyzovány s využitím Western blotů a s použitím polyklonálního králičího antiséra proti lidskému KGF exprimovanému v *E-coli*.

Western bloty byly provedeny nanesením vzorku na 12,5 % (hm./obj.) SDS polyakrylamidové gely a následnou elektroforézou. Poté následovalo přenesení proteinů pomocí semidry elektroblovovacího zařízení (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA) na nitrocelulózovou membránu. Přenesení probíhalo jednu hodinu při 400 mA. Jako přenosový pufr byl použit 20 mM Tris, 150 mM glycín a 20% methanol. Nitrocelulózové membrány byly blokovány inkubací v roztoku 10% normálního kozího séra v PBS. Jako primární protilátky bylo použito králičího antiséra připravené proti KGF z *E-coli*. Pro použití byly protilátky ředěny 1:10000 v normálním kozím séru v PBS a inkubovány 12 hodin při pokojové teplotě s blokovými nitrocelulózovými membránami. Nenavázané protilátky byly poté odstraněny třemi třicetiminutovými promytími v PBS.

Nitrocelulózové membrány byly poté inkubovány ve 100 ml roztoku 1% normálního kozího séra v PBS obsahujícího sekundární protilátky (Vectastain biotinylované kozí protilátky proti králičímu IgG, Vector Labs, Burlingame, USA). Inkubace probíhala 30 minut při pokojové teplotě. Následovalo trojnásobné desetiminutové promytí v PBS a poté 30 minutová inkubace při pokojové teplotě s 100 ml roztoku 1% normálního kozího séra obsahujícího streptavidin a biotinylovanou peroxidázu, připravenou podle návodu výrobce (Vector Labs). Opět následovalo trojnásobné promytí v PBS. Látky křížově reagující s protilátkami proti KGF byly vizualizovány inkubací membrán ve směsi 60 μ l 30% (hm./obj.) H_2O_2 ve 100 ml PBS a 50 mg 4-chlornaftolu ve 20 ml methanolu. Reakce byla zastavena po 10 minutách, opláchnutím membrán ve vodě.

Analýza blotů ukázala, že specifické protilátky proti KGF reagují se třemi zřetelně oddělenými proužky proteinů. Dva z nich byly blízko sebe s molekulovou hmotností okolo 25–29 kDa a jeden měl přibližnou molekulovou hmotnost 17 kDa, přičemž předpokládaná molekulová hmotnost konečného proteinu o 163 aminokyselinách byla 18,8 kDa. Několik vysoce exprimovaných klonů sekretujících více než 2,0 mg rKGF na litr (jak bylo možné odhadnout z analýzy Western blotů), bylo dále vyčleněno a přeneseno (podle metody Lu, et al., viz předchozí text) do lahví, kde byly pěstovány tak, aby výsledkem bylo velké množství média bez séra, vhodného k purifikaci KGF pomocí iontoměničové chromatografie s využitím katexu a následně gelové chromatografie podle postupu popsáno dále.

KGF bylo purifikováno ze třech litrů upraveného bezsérového média tak, že médium bylo přímo nanášeno na iontoměničovou kolonu (5 x 24 cm) naplněnou 450 ml sulfoethyl SP–Sepharosy Fast Flow (Pharmacia), ekvilibrovanou 20 mM fosforečnanem sodným, pH 7,5. Po promytí kolony pětinasobným objemem kolony roztokem 20 mM fosforečnanu sodného, 0,2M NaCl, pH 7,5 byl rKGF vymyt lineárním gradientem od 0,2 do 1,0 M NaCl rozpuštěného v 20 mM fosforečnanu sodném (pH 7,5). Objem použitého roztoku se rovnal dvacetinasobku objemu kolony. Byly sbírány 50 ml frakce a byla průběžně monitorována absorbance při 280 nm. Protein KGF byl detekován analýzou částí každé frakce pomocí SDS–PAGE, SDS–PAGE byla prováděna s použitím elektroforetického systému (Novex, San Diego, CA, USA) a s použitím předpřipravených 14% Tris–glycín gelů (podle metody Laemliho (1970), Nature, 227:680–685). Vzorky byly smíchány s neredukujícím SDS vzorkovým pufrem bez zahřívání před nanášením. Proteiny byly detekovány barvením Coomassie blue nebo barvením stříbrem. Dva píky, které byly eluovány později, obsahovaly proteinové proužky odpovídající molekulové hmotnosti 25–29 kDa a proužek o hmotnosti 17 kDa, který byl detekován Western blotem. Frakce obsahu-

jící každý z těchto dvou píků byly separátně koncentrovány na objem menší než 1 ml a poté byly dále děleny gelovou filtrací.

Ke gelové filtraci byly použity kolony Superdex-75 (HR 10/30, Pharmacia) ekvilibrované PBS o pH 7,2. Kolona byla nekalibrována s použitím následujících známých standardů molekulových vah (BioRad, San Francisco, CA, USA): thyroglobulin (670 kDa), gama-globulin (158 kDa), ovalbumin (44 kDa), myoglobin (17 kDa) a vitamín B-12 (1,4 kDa). Tyto purifikační kroky vedly k přibližně 2000 násobnému obohacení o rKGF, zvláště o 17 kDa a 30kDa proteiny, jak ukázalo barvení stříbrem.

V případě látky s vyšší molekulovou hmotností, byl rKGF eluován jako velký symetrický pík (dle absorbance při 280nm), který byl nazýván KGF-a. Jestliže bylo pomocí SDS-PAGE analyzováno menší množství látek z této frakce (3μg/linii oproti 6μg/linii) objevily se dva proužky s rozdílem molekulových vah cca 1–3kDa. V případě látek s nižší molekulovou vahou, které byly nazývány KGF-b, vedla gelová filtrace k přípravě proteinu majícího předpokládanou pohyblivost. Pro oba typy proteinů (KGF-a i KGF-b) byla celková výtěžnost purifikace asi 30 až 40%.

Dále bylo analyzováno aminokyselinové složení KGF-a i KGF-b. Tyto analýzy byly provedeny na automatickém sekvenátoru (Model 477A nebo 470A, Applied Biosystem. Inc., Foster City, CA, USA) vybaveném on-line PTH aminoanalyzátozem (Model 120A) a systémem sběru dat (Model 900A) (podle metody Lu et al., (1997), J. Biol. Chem., 266: 8102–8107). Edmanovy sekvenční analýzy KGF-a ukázaly N-terminální sekvenci X₁-N-D-M-T-P-E-Q-M-A-T-A-V-X₂-X₃-S- (SEQ ID NO:75). Minoritní sekvence začínající od třetí N-terminální aminokyseliny – kyseliny aspartamové – byly přítomny v množství 1,6% celkového sekvenovatelného proteinu. X₁, X₂ a X₃ nebyly určeny z důvodů nepřítomnosti PTH (phenylthiohydantoinyl) aminokyselinového signálu během sekvenční analýzy.

Je zajímavé, že analýza sekvence N-terminálního konce KGF-b odhalila sekvenci S-Y-D-Y-M-E-G-G-D-I-R-V- (SEQ ID NO:76), naznačující, že se jedná o formu KGF zkrácenou na N-terminálním konci, kde byl KGF proteolyticky rozštěpen v peptidové vazbě Arg²³-Ser²⁴.

K další charakterizaci purifikovaných KGF-a a KGF-b byly proteiny za použití známých technik vystaveny působení glykosidáz (neuraminidáze, O-glycanáze a/nebo N-glykanáze) (Sasaki et al. (1987), J. Biol. Chem., 262:12059–12076; Takuchi et al. (1988), J. Biol. Chem., 263:3657–3663, Zsebo et al. (1990), Cell. 63:195–201). Výsledky ukazují, že KGF-a obsahuje N- a O- vázané cukry, ačkoliv forma KGF-a s nižší molekulovou hmotností obsahuje pravděpodobně pouze N-vázané cukry. Použití glykosidáz nezpůsobilo snížení molekulové hmotnosti u KGF-b, což naznačuje, že molekula není glykosilovaná.

Glykosilace KGF-a byla dále charakterizována pomocí hmotové spektrometrie peptidů vzniklých působením endoproteasy Glu-C. Objasnění cukerné struktury glykopeptidů pomocí metody hmotové spektrometrické analýzy (stepped orifice method) bylo s úspěchem použito na další proteiny (Huddleston et al. (1993), Anal. Chem., 65: 877–884; Carr et al. (1993), Prot. Sci., 2:183–196). Zdá se, že Thr³² je částečně glykosilovaný, což bylo potvrzením izolací neglykosylovaných peptidů. Podobná hmotová spektrometrická analýza Asn¹⁴ předpokládá mikroheterogenitu v glykosilaci s bi, tri a tetra anténními strukturami, s různým stupněm sialylace.

Tabulka 3 shrnuje koncentrace KGF stimulující inkorporaci [³H]thymidinu keratinocytů právě poloviční rychlostí maximální rychlosti (podle metody Rubina et al. (1989, viz předchozí text). Interakce s receptory pro KGF byla stanovena s použitím membránové frakce obsahující receptory pro KGF. Tato frakce byla připravena z myších (Balb/MK) epidermálních keratinocytů (podle postupu popsaného Massaguem (1932), J. Biol. Chem., 258: 13614–13620). Konkrétně byly různé formy KGF zředěny 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, obsahujícím 0,2% hovězího serumalbuminu tak, aby koncentrace KGF byla v rozmezí od 0,8 ng do 100 ng na 50 μl. Poté byly jednotlivě inkubovány s membránovou frakcí (75 ng/ml) a KGF získaným z *E-coli* a značeným

- ¹²⁵I (1,5 ng). Experimenty s vazbou na receptor a kompetiční experimenty byly prováděny při 4 °C po dobu 16 hodin. Po této době byly vzorky odebrány, centrifugovány a promyty dvakrát výše uvedeným zřed'ovacím pufrem. Účelem tohoto promytí bylo odstranění nenavázaného a nespecificky vázaného značeného KGF. Poté byla ve vzorcích měřena zbylá radioaktivita.
- 5 Kompetiční křivky pro vazbu mezi KGF a značeným KGF byly vyneseny jako množství nevytěsněného KGF (v procentech) versus koncentrace každého vzorku KGF. Tabulka 3B shrnuje koncentrace KGF (v ng/ml) potřebné k dosažení 60% nevytěsnění proti značenému KGF (připravenému z *E-coli*).

10

Tabulka 3A

Koncentrace KGF stimulující inkorporaci [³H] thymidinu do keratinocytů při rychlosti rovnající se polovině rychlosti maximální

Formy	ng/ml
<i>E-coli</i> KGF	10
KGF - a	30
KGF - b	30

15

Tabulka 3B

Koncentrace KGF potřebné k dosažení 60% nevytěsnění proti značenému KGF získanému z *E-coli*.

Forma	ng/ml
KGF z <i>E. coli</i>	65,8
KGF-a	93,5
KGF-b	89,1

- 20 Jak je vidět v tabulce 3A KGF-a a KGF-b stimulují zabudovávání [³H] thymidinu srovnatelně přičemž koncentrace potřebná k dosažení poloviční rychlosti maximální rychlosti zabudovávání je pro oba analogy cca 30 ng/ml. Znamená to, že zkrácení molekuly nesnižuje její biologickou aktivitu. Tato dvě analoga mají přibližně třikrát nižší aktivitu než KGF získané z *E-coli* – KGF plné délky. Jak je vidět v tabulce 3B, kompetiční experimenty s použitím radioreceptorového
- 25 testu ukazují, že KGF získané z *E-coli*, KGF-a a KGF-b mají podobnou vazebnou aktivitu na receptor.

- 30 Příklad 4: Biologický test *in vivo* KGF polypeptidů produkovaných v savcích buněčných kulturách a buněčných kulturách *E. coli*.

Bylo ukázáno, že jedna subkutánní dávka KGF vede u myši během čtyřiašesti hodin ke zvýšení koncentrace cholesterolu v séru a to v závislosti na velikosti dávky. Také nativní KGF, KGF-a, C(1,15)S, ΔN15 a ΔN23 zvyšují sérový cholesterol v závislosti na výšce dávky.

35

Každá testovací skupina obsahovala pět samic Balb/c myši (18–20 gm) získaných z CRL. Proteiny byly naředěny pomocí 0,9% izotonického roztoku tak, aby výsledný injektovaný objem byl 100 μl na myš. Každá myš byla ošetřena jednou podkožní injekcí obsahující následující dávky:

Skupina	Injekovaná látka	Velikost dávky (mg/kg)
1	Nativní KGF	0,1
	Nativní KGF	0,25
	Nativní KGF	0,5
	Nativní KGF	1
	Nativní KGF	5
2	C(1,15)S	0,1
	C(1,15)S	0,25
	C(1,15)S	0,5
	C(1,15)S	1
	C(1,15)S	5
3	ΔN15	0,25
	ΔN15	0,5
	ΔN15	1
	ΔN15	5
4	ΔN23	0,1
	ΔN23	0,5
	ΔN23	1
	ΔN23	5
5	KGF-a	0,01
	KGF-a	0,05
	KGF-a	0,1
	KGF-a	0,5
6	Kontrola (izoton. roztok)	-

Čtyřicet hodin po injekci byly myši usmrceny a vykrváčeny propíchnutím srdce. Ve vzorcích krve byl stanoven sérový cholesterol. Jak je vidět z obrázku 35, každý z testovaných analogů KGF měl účinek na zvýšení sérového cholesterolu v závislosti na velikosti dávky. Nebyl nalezen zřejmý rozdíl v bioaktivitě mezi kterýmkoliv z testovaných analogů KGF.

In vivo model diabetu

Chemicky indukované modely diabetes mellitus v různých živočišných druzích byly klasicky používány ke studiu této nemoci a k její ošetření. Streptozotocin indukuje diabetes u myši, krysy, křečka, psa a opice, ačkoliv studie používající krysy a myši jsou nejčastěji (Junod et al., Proc. Soc. Exp. Bio. Med. 126: 210–205 (1967); Rerup, Pharm. Rev. 22:485–518 (1970); Rossini et al., P.N.A.S. 74:2485–2489 (1977); Ar'Rajab and Ahren, Pancreas 8:50–57 (1993). Dávka streptozotocinu (45 až 70 mg/kg) podaná jako jedna podkožní injekce vyvolává u krys stabilní onemocnění. Dávky pod 45 mg/kg vyvolávají přechodný stav, který je vratný. Během jednoho

dne po podání streptozotocinu je indukován hyperglykemický stav. Hladina inzulinu v krvi zůstává v podstatě nezměněna v porovnání s normálními krysami, ale celkový obsah inzulinu a C-peptidu v pankreasu je velice snížen. Krysy manifestují klasické znaky a symptomy diabetu lidí: zvýšená hladina glukózy v krvi (hyperglykémie), glukóza v moči (glukosurie), zvýšená žíznivost (polydipsie), zvýšená tvorba moči (polyurie), zvýšená chuť k jídlu (hyperphagie).

Studie popisované v tomto vynálezu byly prováděny na modelových krysách Sprague–Dawley s streptozotocinem indukovaným diabetem. Na počátku pokusu byly použity samci krys vážící 200–260 gramů. Diabetes byl indukován jedinou intravenózní injekcí streptozotocinu rozpuštěného v citrátovém pufru (sodná sůl kys. citronové) (dávka byla 50 mg streptozotocinu na kg tělesné váhy). Zdravé kontrolní krysy byly ošetřeny jednou intravenózní injekcí pufru citrátu sodného jako kontroly. KGF byl podáván denně jako podkožní injekce. Dávka byla 3 nebo 5 mg/kg/den v závislosti na experimentu. V prvním experimentu byla terapie pomocí KGF započata dva dny před indukcí diabetu a pokračovala po indukcí až do celkového množství osmi injekcí. Ve druhém a třetím experimentu byla KGF terapie (podávána podkožně) započata jeden den po indukcí diabetu streptozotocinem. Ve čtvrtém experimentu byla sedmidenní KGF terapie zahájena sedm dní po aplikaci streptozotocinu a zvířata byla poté sledována dalších 12 týdnů. Ve všech experimentech s výjimkou čtvrtého experimentu byly pro analýzy určeny hladina glukózy v krvi, hladina glukózy v moči a množství moči. Navíc byly v některých experimentech sledovány příjem vody, hladina C-peptidu v moči nebo celkové množství inzulinu nebo C-peptidu v pankreasu. Ve čtvrtém experimentu byla jako jediná hodnota sledována hladina glukózy v krvi. Protože je velká frakce inzulinu odstraněna z krevního oběhu játry je měření koncentrací periferního inzulinu odrazem dějů post-hepatitického metabolismu, spíše než sekrece inzulinu z pankreasu. Proto je měření C-peptidu často děláno a používáno jako periferní marker sekrece inzulinu. C-peptid je produkován při procesu tvorby inzulinu z pro-inzulinu. Inzulin a C-peptid jsou extrahovány játry.

Tato studie se zabývala vlivem rKGF na diabetes indukovaný streptozotocinem u krys Sprague–Dawley. V den 0 byla skupina krys exponována dávce 45 nebo 50 mg/kg streptozotocinu (STZ). Po tomto zákroku byla u krys denně sledována hladina glukózy s cílem stanovit rozsah indukce diabetes. Pátý den byla zvířata ošetřená STZ rozdělena do dvou skupin v závislosti na rozsahu hyperglykémie. Dělicí bod byl stanoven na hladinu glukózy v krvi rovnající se 300 mg/dl. Skupina zvířat nevystavených působení STZ sloužila jako kontrolní. Sedmý den byla deseti zvířatům z každé hyperglykemické skupiny podána dávka Δ N23 (3 mg/kg/den) nebo PBS ve formě podkožní injekce. Hladina glukózy byla poté sledována denně, každý druhý den nebo týdně (výsledky jsou zobrazeny na obrázku 51). Je vidět, že u zvířat vystavených působení STZ z obou skupin signifikantně poklesla hladina glukózy po dobu podávání Δ N23. Je důležité, že průměrná hladina glukózy poklesla u zvířat, která měla na počátku hladiny glukózy vyšší než 300 mg/dl na stabilní hodnotu okolo 150 mg/dl, kdežto u zvířat, která měla na počátku hladinu glukózy nižší než 300 mg/dl, klesla hladina glukózy pouze přechodně. Je třeba si též všimnout, že denní rozsah není lineární.

Předkládaný vynález byl výše popsán obecně i na konkrétních příkladech. Je zřejmé, že odborníci odhalí další obměny a modifikace výše popsaných postupů.

Seznam sekvencí

(1) Základní informace:

- 5 (i) Žadatel: Amgen Inc.
- (ii) Název vynálezu: Analoga keratinocytových růstových faktorů
- 10 (iii) Počet sekvencí: 104
- (iv) Korespondenční adresa:
- (A) Adresát: Amgen Inc.
- (B) Ulice: 1840 Dehavilland Drive
- (C) Město: Thousand Oaks
- 15 (D) Stát: California
- (E) Země: U.S.A.
- (F) ZIP: 91320-1789
- (v) Forma vhodná pro počítačové zpracování
- 20 (A) Typ média: Floppy disk
- (B) Počítač: IBM PC kompatibilní
- (C) Operační systém: PC-DOS/MS-DOS
- (D) Software: PatentIn Release #1.0, Version #1.30
- 25 (vi) Současné údaje o žádosti
- (A) Číslo žádosti: PCT/IB95/00971
- (B) Datum registrace: 12. 10. 1995
- (C) Klasifikace:
- 30 (vii) Předchozí údaje z žádosti
- (A) Číslo žádosti: 08,487,825
- (B) Datum registrace: 7. 6. 1995
- (C) Klasifikace:
- 35 (vii) Předchozí údaje o žádosti
- (A) Číslo žádosti: 08/323,475
- (B) Datum registrace: 13. 10. 1994
- (C) Klasifikace:
- 40 (vii) Předchozí údaje o žádosti
- (A) Číslo žádosti: 08/323,340
- (B) Datum registrace: 13. 10. 1994
- (C) Klasifikace:
- 45 (viii) Právní zástupce/zástupce pro informace
- (A) Jméno: Zindrick, Thomas D.
- (B) Registrační číslo: 32,185
- (C) Číslo spisu: A-315

50

Informace o SEQ ID NO:1:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 862 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:1:

CAATCTACAA TTCACAGATA GGAAGAGGTC AATGACCTAG GAGTAACAAT CAACTCAAGA 60
 TTCATTTTCA TTATGTTATT CATGAACACC CGGAGCACTA CACTATAATG CACAAATGGA 120
 TACTGACATG GATCCTGCCA ACTTTGCTCT ACAGATCATG CTTTCACATT ATCTGTCTAG 180
 TGGGTACTAT ATCTTTAGCT TGCAATGACA TGACTCCAGA GCAAAATGGCT ACAAATGTGA 240
 ACTGTTCCAG CCCTGAGCGA CACACAAGAA GTTATGATTA CATGGAAGGA GGGGATATAA 300
 GAGTGAGAAG ACTCTTCTGT CGAACACAGT GGTACCTGAG GATCGATAAA AGAGGCAAAG 360
 TAAAAGGGAC CCAAGAGATG AAGAATAATT ACAATATCAT GGAAATCAGG ACAGTGGCAG 420
 TTGGAATTGT GGCAATCAAA GGGGTGGAAG GTGAATTCTA TCTTGCAATG AACAAGGAAG 480
 GAAAACCTCTA TGCAAAGAAA GAATGCAATG AAGATTGTAA CTTCAAAGAA CTAATTCTGG 540
 AAAACCATTA CAACACATAT GCATCAGCTA AATGGACACA CAACGGAGGG GAAATGTTTG 600
 TTGCCTTAAA TCAAAAGGGG ATTCTGTAA GAGGAAAAAA AACGAAGAAA GAACAAAAAA 660
 CAGCCCACTT TCTTCCTATG GCAATAACTT AATTGCATAT GGTATATAAA GAACCCAGTT 720
 CCAGCAGGGA GATTTCTTTA AGTGGACTGT TTTCTTTCTT CTCAAAATTT TCTTTCCTTT 780
 TATTTTTTTAG TAATCAAGAA AGGCTGGAAG AACTACTGAA AACTGATCA AGCTGGACTT 840
 GTGCATTTAT GTTTGTTTTA AG 862

(2) Informace o SEQ ID NO:2:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 194 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:2:

```

Met His Lys Trp Ile Leu Thr Trp Ile Leu Pro Thr Leu Leu Tyr Arg
1           5           10           15

Ser Cys Phe His Ile Ile Cys Leu Val Gly Thr Ile Ser Leu Ala Cys
20           25           30

Asn Asp Met Thr Pro Glu Gln Met Ala Thr Asn Val Asn Cys Ser Ser
35           40           45

Pro Glu Arg His Thr Arg Ser Tyr Asp Tyr Met Glu Gly Gly Asp Ile
50           55           60

Arg Val Arg Arg Leu Phe Cys Arg Thr Gln Trp Tyr Leu Arg Ile Asp
65           70           75           80

Lys Arg Gly Lys Val Lys Gly Thr Gln Glu Met Lys Asn Asn Tyr Asn
85           90           95

Ile Met Glu Ile Arg Thr Val Ala Val Gly Ile Val Ala Ile Lys Gly
100          105          110

Val Glu Ser Glu Phe Tyr Leu Ala Met Asn Lys Glu Gly Lys Leu Tyr
115          120          125

Ala Lys Lys Glu Cys Asn Glu Asp Cys Asn Phe Lys Glu Leu Ile Leu
130          135          140

Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr Ala Ser Ala Lys Trp Thr His Asn Gly
145          150          155          160

Gly Glu Met Phe Val Ala Leu Asn Gln Lys Gly Ile Pro Val Arg Gly
165          170          175

Lys Lys Thr Lys Lys Glu Gln Lys Thr Ala His Phe Leu Pro Met Ala
180          185          190

Ile Thr

```

(2) Informace o SEQ ID NO:3:

- 5 (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 595 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá
- 10 (ii) Typ molekuly: cDNA
- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:3:


```

ATCGATTTGA TTCTAGAAGG AGGAATAACA TATGAAAAAG CGCGCACGTG CTATCGCCAT      60
TGCTGTGGCT CTGGCAGGTT TCGCAACTAG TGCACACGCG TGCAATGACA TGA CTCCAGA      120
GCAAATGGCT ACAAATGTGA ACTGTTCCAG CCCTGAGCGA CACACAAGAA GTTATGATTA      180
CATGGAAGGA GGGGATATAA GAGTGAGAAG ACTCTTCTGT CGAACACAGT GGTACCTGAG      240
GATCGATAAA AGAGGCAAAG TAAAAGGGAC CCAAGAGATG AAGAATAATT ACAATATCAT      300
GGAAATCAGG ACAGTGGCAG TTGGAATTGT GGCAATCAAA GGGGTGGAAA GTGAATTCTA      360
TCTTGCAATG AACAAGGAAG GAAAACCTCTA TGCAAAGAAA GAATGCAATG AAGATTGTAA      420
CTTCAAAGAA CTAATTCTGG AAAACCATTA CAACACATAT GCATCAGCTA AATGGACACA      480
CAACGGAGGG GAAATGTTTG TTGCCTTAAA TCAAAAGGGG ATTCCTGTAA GAGGAAAAAA      540
AACGAAGAAA GAACAAAAAA CAGCCCACTT TCTTCCTATG GCAATAACTT AATAG          595

```

(2) Informace o SEQ ID NO:4:

- 5 (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 186 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

- 10 (ii) Typ molekuly: protein

- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:4:

```

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

```

(2) Informace o SEQ ID NO:5:

- 5 (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 499 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

- 10 (ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:5:

```

TATGTGCAAT GACATGACTC CAGAGCAAAT GGCTACAAAT GTGAACTGTT CCAGCCCTGA      60
GCGACACACA AGAAGTTATG ATTACATGGA AGGAGGGGAT ATAAGAGTGA GAAGACTCTT      120
CTGTCGAACA CAGTGGTACC TGAGGATCGA TAAAAGAGGC AAAGTAAAAG GGACCCAAGA      180
GATGAAGAAT AATTACAATA TCATGGAAAT CAGGACAGTG GCAGTTGGAA TTGTGGCAAT      240
CAAAGGGGTG GAAAGTGAAT TCTATCTTGC AATGAACAAG GAAGGAAAAC TCTATGCAAA      300
GAAAGAATGC AATGAAGATT GTAAC TTCAA AGAACTAATT CTGGAAAACC ATTACAACAC      360
ATATGCATCA GCTAAATGGA CACACAACGG AGGGGAAATG TTTGTTGCCT TAAATCAAAA      420
GGGGATTCCCT GTAAGAGGAA AAAAAACGAA GAAAGAACAA AAAACAGCCC ACTTTCTTCC      480
TATGGCAATA ACTTAATAG                                          499

```

15

(2) Informace o SEQ ID NO:6:

- 20 (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 164 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

- 25 (ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:6:

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

(2) Informace o SEQ ID NO:7:

- 5 (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 25 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

- 10 (ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:7:

CAATGACCTA GGAGTAACAA TCAAC

25

15 (2) Informace o SEQ ID NO:8:

- 20 (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 26 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:8:

AAAACAAACA TAAATGCACA AGTCCA

26

5

(2) Informace o SEQ ID NO:9:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 26 párů bází

10 (B) Typ: nukleová kyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

15

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:9:

ACAACGCGTG CAATGACATG ACTCCA

26

(2) Informace o SEQ ID NO:10:

20

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 31 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

25 (C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:10:

ACAGGATCCT ATTAAGTTAT TGCCATAGGA A

30

31

(2) Informace o SEQ ID NO:11:

(i) Charakteristika sekvence

35 (A) Délka: 27 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

40

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:11:

ACACATATGT GCAATGACAT GACTCCA

27

(2) Informace o SEQ ID NO:12:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 37 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:12:

CTGCGTATCG ACAACGCGG CAAAGTCAAG GGCACCC

37

(2) Informace o SEQ ID NO:13:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 44 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:13:

AAGAGATGAA AAACAACACTAC AATATTATGG AAATCCGTAC TGTT

44

(2) Informace o SEQ ID NO:14:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 37 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:14:

GCTGTTGGTA TCGTTGCAAT CAAAGGTGTT GAATCTG

37

(2) Informace o SEQ ID NO:15:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 45 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:15:

TC TTGGGTGC CCTTGACTTT GCCGCGTTTG TCGATACGCA GGTAC

45

5 (2) Informace o SEQ ID NO:16:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 45 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

10 (C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

15 (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:16:

ACAGCAACAG TACGGATTTC CATAATATTG TAGTTGTTTT TCATC

45

(2) Informace o SEQ ID NO:17:

20 (i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 36 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

25

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:17:

AATTCAGATT CAACACCTTT GATTGCAACG ATACCA

36

30

(2) Informace o SEQ ID NO:18:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 20 párů bází

35 (B) Typ: nukleová kyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

40

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:18:

AGTTTTGATC TAGAAGGAGG

20

(2) Informace o SEQ ID NO:19:

45 (i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 20 párů bází

- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Počet řetězců: neznámý
- (D) Topologie: neznámá

5 (ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:19:

TCAAAACTGG ATCCTATTAA

20

10 (2) Informace o SEQ ID NO:20:

- (i) Charakteristika sekvence
 - (A) Délka: 91 párů bází
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Počet řetězců: neznámý
 - (D) Topologie: neznámá

15

(ii) Typ molekuly: cDNA

20 (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:20:

AGTTTGTATC TAGAAGGAGG AATAACATAT GTGCAACGAC ATGACTCCGG AACAGATGGC

60

TACCAACGTT AACTGCTCCA GCCCGGAACG T

91

(2) Informace o SEQ ID NO:21:

- (i) Charakteristika sekvence
 - (A) Délka: 90 párů bází
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Počet řetězců: neznámý
 - (D) Topologie: neznámá

25

30

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:21:

CACACCCGTA GCTACGACTA CATGGAAGGT GGTGACATCC GTGTTCGTCTG TCTGTCTCTG

60

CGTACCCAGT GGTACCTGCG TATCGACAAA

90

35 (2) Informace o SEQ ID NO:22:

- (i) Charakteristika sekvence
 - (A) Délka: 90 párů bází
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Počet řetězců: neznámý
 - (D) Topologie: neznámá

40

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:22:

CGTGGTAAAG TTAAAGGTAC CCAGGAAATG AAAACAACT ACAACATCAT GGAAATCCGT 60
ACTGTTGCTG TTGGTATCGT TGCAATCAAA 90

(2) Informace o SEQ ID NO:23:

5

- (i) Charakteristika sekvence
 - (A) Délka: 90 párů bází
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Počet řetězců: neznámý
 - (D) Topologie: neznámá

10

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:23:

GGTGTGAAT CTGAATTCTA CCTGGCAATG AACAAAGAAG GTAACTGTA CGCAAAAAAA 60
GAATGCAACG AAGACTGCAA CTTCAAAGAA 90

15

(2) Informace o SEQ ID NO:24:

- (i) Charakteristika sekvence
 - (A) Délka: 90 párů bází
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Počet řetězců: neznámý
 - (D) Topologie: neznámá

20

(ii) Typ molekuly: cDNA

25

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:24:

CTGATCCTGG AAAACCACTA CAACACCTAC GCATCTGCTA AATGGACCCA CAACGGTGGT 60
GAAATGTTTCG TTGCTCTGAA CCAGAAAGGT 90

30 (2) Informace o SEQ ID NO:25:

- (i) Charakteristika sekvence
 - (A) Délka: 88 párů bází
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Počet řetězců: neznámý
 - (D) Topologie: neznámá

35

(ii) Typ molekuly: cDNA

40 (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:25:

ATCCCGGTTT GTGGTAAAAA AACCAAAAAA GAACAGAAAA CCGCTCACTT CCTGCCGATG 60

GCAATCACTT AATAGGATCC AGTTTTGA 88

(2) Informace o SEQ ID NO:26:

- 5 (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 20 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

10

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:26:

TACGGGTGTG ACGTTCGGG 20

15

(2) Informace o SEQ ID NO:27:

- (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 20 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

20

(ii) Typ molekuly: cDNA

25

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:27:

CTTTACCACG TTTGTCGATA 20

(2) Informace o SEQ ID NO:28:

- 30 (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 20 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

35

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:28:

ATTCAACACC TTTGATTGCA 20

40

(2) Informace o SEQ ID NO:29:

- (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 20 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina

45

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

5

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:29:

CCAGGATCAG TTCTTTGAAG

20

(2) Informace o SEQ ID NO:30:

10

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 20 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

15

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:30:

20

GAACCGGGAT ACCTTTCTGG

20

(2) Informace o SEQ ID NO:31:

25

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 495 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

30

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:31:

ATGTCTAATG ATATGACTCC GGAACAGATG GCTACCAACG TTAACCTCTC CTCCCCGGAA 60

CGTCACACGC GTTCCTACGA CTACATGGAA GGTGGTGACA TCCGCGTACG TCGTCTGTTC 120

TGCCGTACCC AGTGGTACCT GCGTATCGAC AAACGCGGCA AAGTCAAGGG CACCCAAGAG 180

ATGAAAAACA ACTACAATAT TATGGAAATC CGTACTGTTG CTGTTGGTAT CGTTGCAATC 240

AAAGGTGTTG AATCTGAATT CTACCTGGCA ATGAACAAAG AAGGTAAACT GTACGCAAAA 300

AAAGAATGCA ACGAAGACTG CAACTTCAAA GAACTGATCC TGGAAAACCA CTACAACACC 360

TACGCATCTG CTAAATGGAC CCACAACGGT GGTGAAATGT TCGTTGCTCT GAACCAGAAA 420

GGTATCCCGG TTCGTGGTAA AAAAACCATA AAAGAACAGA AAACCGCTCA CTTCCTGCCG 480

ATGGCAATCA CTTAA 495

(2) Informace o SEQ ID NO:32:

- (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 164 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:32:

```

Met Ser Asn Asp Met Thr Pro Glu Gln Met Ala Thr Asn Val Asn Ser
1          5          10          15

Ser Ser Pro Glu Arg His Thr Arg Ser Tyr Asp Tyr Met Glu Gly Gly
20          25          30

Asp Ile Arg Val Arg Arg Leu Phe Cys Arg Thr Gln Trp Tyr Leu Arg
35          40          45

Ile Asp Lys Arg Gly Lys Val Lys Gly Thr Gln Glu Met Lys Asn Asn
50          55          60

Tyr Asn Ile Met Glu Ile Arg Thr Val Ala Val Gly Ile Val Ala Ile
65          70          75          80

Lys Gly Val Glu Ser Glu Phe Tyr Leu Ala Met Asn Lys Glu Gly Lys
85          90          95

Leu Tyr Ala Lys Lys Glu Cys Asn Glu Asp Cys Asn Phe Lys Glu Leu
100         105         110

Ile Leu Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr Ala Ser Ala Lys Trp Thr His
115        120        125

Asn Gly Gly Glu Met Phe Val Ala Leu Asn Gln Lys Gly Ile Pro Val
130        135        140

Arg Gly Lys Lys Thr Lys Lys Glu Gln Lys Thr Ala His Phe Leu Pro
145        150        155        160

Met Ala Ile Thr

```

(2) Informace o SEQ ID NO:33:

- (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 483 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:33:

```

ATGACTCCGG AACAGATGGC TACCAACGTT AACTCCTCCT CCCCAGGAACG TCACACGCGT      60
TCCTACGACT ACATGGAAGG TGGTGACATC CGCGTACGTC GTCTGTTCTG CCGTACCCAG      120
TGGTACCTGC GTATCGACAA ACGCGGCAAA GTCAAGGGCA CCCAAGAGAT GAAAAACAAC      180
TACAATATTA TGGAAATCCG TACTGTTGCT GTTGGTATCG TTGCAATCAA AGGTGTTGAA      240
TCTGAATTCT ACCTGGCAAT GAACAAAGAA GGTAACTGT ACGCAAAAAA AGAATGCAAC      300
GAAGACTGCA ACTTCAAAGA ACTGATCCTG GAAAACCACT ACAACACCTA CGCATCTGCT      360
AAATGGACCC ACAACGGTGG TGAAATGTTT GTTGCTCTGA ACCAGAAAGG TATCCCGGTT      420
CGTGGTAAAA AAACCAAAAA AGAACAGAAA ACCGCTCACT TCCTGCCGAT GGCAATCACT      480
TAA                                                                                   483

```

(2) Informace o SEQ ID NO:34:

5

(i) Charakteristika sekvence

10

- (A) Délka: 160 aminokyselin
- (B) Typ: aminokyselina
- (C) Počet řetězců: neznámý
- (D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

15

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:34:

```

Met Thr Pro Glu Gln Met Ala Thr Asn Val Asn Ser Ser Ser Pro Glu
1           5           10           15

Arg His Thr Arg Ser Tyr Asp Tyr Met Glu Gly Gly Asp Ile Arg Val
20           25           30

Arg Arg Leu Phe Cys Arg Thr Gln Trp Tyr Leu Arg Ile Asp Lys Arg
35           40           45

Gly Lys Val Lys Gly Thr Gln Glu Met Lys Asn Asn Tyr Asn Ile Met
50           55           60

Glu Ile Arg Thr Val Ala Val Gly Ile Val Ala Ile Lys Gly Val Glu
65           70           75           80

Ser Glu Phe Tyr Leu Ala Met Asn Lys Glu Gly Lys Leu Tyr Ala Lys
85           90           95

Lys Glu Cys Asn Glu Asp Cys Asn Phe Lys Glu Leu Ile Leu Glu Asn
100          105          110

His Tyr Asn Thr Tyr Ala Ser Ala Lys Trp Thr His Asn Gly Gly Glu
115          120          125

Met Phe Val Ala Leu Asn Gln Lys Gly Ile Pro Val Arg Gly Lys Lys
130          135          140

Thr Lys Lys Glu Gln Lys Thr Ala His Phe Leu Pro Met Ala Ile Thr
145          150          155          160

```

(2) Informace o SEQ ID NO:35:

- (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 480 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:35:

```

ATGACTCCGG AACAGATGGC TACCAACGTT AACTCTTCTC CTGAACGTCA TACGCGTTCC      60
TACGACTACA TGGAAGGTGG TGACATCCGC GTACGTCGTC TGTTCGTCCG TACCCAGTGG      120
TACCTGCGTA TCGACAAACG CGGCAAAGTC AAGGGCACCC AAGAGATGAA AAACAACCTAC      180
AATATTATGG AAATCCGTAC TGTGCTGTT GGTATCGTTG CAATCAAAGG TGTGAATCT      240
GAATTCTACC TGGCAATGAA CAAAGAAGGT AACTGTACG CAAAAAAGA ATGCAACGAA      300
GACTGCAACT TCAAAGAACT GATCCTGGAA AACCCTACA ACACCTACGC ATCTGCTAAA      360
TGGACCCACA ACGGTGGTGA AATGTTGTT GCTCTGAACC AGAAAGGTAT CCCGGTTCGT      420
GGTAAAAAAA CCAAAAAAGA ACAGAAAACC GCTCACTTCC TGCCGATGGC AATCACTTAA      480

```

(2) Informace o SEQ ID NO:36:

- (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 159 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:36:

```

Met Thr Pro Glu Gln Met Ala Thr Asn Val Asn Ser Ser Pro Glu Arg
1           5           10           15
His Thr Arg Ser Tyr Asp Tyr Met Glu Gly Gly Asp Ile Arg Val Arg
                20                25                30

```

Arg Leu Phe Cys Arg Thr Gln Trp Tyr Leu Arg Ile Asp Lys Arg Gly
 35 40 45
 Lys Val Lys Gly Thr Gln Glu Met Lys Asn Asn Tyr Asn Ile Met Glu
 50 55 60
 Ile Arg Thr Val Ala Val Gly Ile Val Ala Ile Lys Gly Val Glu Ser
 65 70 75 80
 Glu Phe Tyr Leu Ala Met Asn Lys Glu Gly Lys Leu Tyr Ala Lys Lys
 85 90 95
 Glu Cys Asn Glu Asp Cys Asn Phe Lys Glu Leu Ile Leu Glu Asn His
 100 105 110
 Tyr Asn Thr Tyr Ala Ser Ala Lys Trp Thr His Asn Gly Gly Glu Met
 115 120 125
 Phe Val Ala Leu Asn Gln Lys Gly Ile Pro Val Arg Gly Lys Lys Thr
 130 135 140
 Lys Lys Glu Gln Lys Thr Ala His Phe Leu Pro Met Ala Ile Thr
 145 150 155

(2) Informace o SEQ ID NO:37:

- 5 (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 486 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

10

- (ii) Typ molekuly: cDNA

- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:37:

ATGGCTACTA ATGTTAACTC CTCTTCTCCT GAACGTCATA CGCGTTCCTA CGACTACATG 60
 GAAGGTGGTG ACATCCGCGT ACGTCGTCTG TTCTGCCGTA CCCAGTGGTA CCTGCGTATC 120
 GACAAACGCG GCAAAGTCAA GGGCACCCAA GAGATGAAAA ACAACTACAA TATTATGGAA 180
 ATCCGTACTG TTGCTGTTGG TATCGTTGCA ATCAAAGGTG TTGAATCTGA ATTCTACCTG 240
 GCAATGAACA AAGAAGGTAA ACTGTACGCA AAAAAAGAAT GCAACGAAGA CTGCAACTTC 300
 AAAGAACTGA TCCTGGAAAA CCACTACAAC ACCTACGCAT CTGCTAAATG GACCCACAAC 360
 GGTGGTGAAA TGTTTCGTTGC TCTGAACCAG AAAGGTATCC CGGTTTCGTGG TAAAAAACC 420
 AAAAAAGAAC AGAAAACCGC TCACTTCCTG CCGATGGCAA TCACTTAA 468

15

(2) Informace o SEQ ID NO:38:

- (i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 155 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

5

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:38:

```

Met Ala Thr Asn Val Asn Ser Ser Ser Pro Glu Arg His Thr Arg Ser
1          5          10          15

Tyr Asp Tyr Met Glu Gly Gly Asp Ile Arg Val Arg Arg Leu Phe Cys
20        25        30

Arg Thr Gln Trp Tyr Leu Arg Ile Asp Lys Arg Gly Lys Val Lys Gly
35        40        45

Thr Gln Glu Met Lys Asn Asn Tyr Asn Ile Met Glu Ile Arg Thr Val
50        55        60

Ala Val Gly Ile Val Ala Ile Lys Gly Val Glu Ser Glu Phe Tyr Leu
65        70        75        80

Ala Met Asn Lys Glu Gly Lys Leu Tyr Ala Lys Lys Glu Cys Asn Glu
85        90        95

Asp Cys Asn Phe Lys Glu Leu Ile Leu Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr
100       105       110

Ala Ser Ala Lys Trp Thr His Asn Gly Gly Glu Met Phe Val Ala Leu
115       120       125

Asn Gln Lys Gly Ile Pro Val Arg Gly Lys Lys Thr Lys Lys Glu Gln
130       135       140

Lys Thr Ala His Phe Leu Pro Met Ala Ile Thr
145       150       155

```

10 (2) Informace o SEQ ID NO:39:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 465 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

15

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

20 (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:39:

```

ATGGCTACTA ATGTTAACTC TTCTCCTGAA CGTCATACGC GTTCCTACGA CTACATGGAA      60
GGTGGTGACA TCCGCGTACG TCGTCTGTTT TGCCGTACCC AGTGGTACCT GCGTATCGAC      120
AAACGCGGCA AAGTCAAGGG CACCCAAGAG ATGAAAAACA ACTACAATAT TATGGAAATC      180
CGTACTGTTG CTGTTGGTAT CGTTGCAATC AAAGGTGTTG AATCTGAATT CTACCTGGCA      240
ATGAACAAAG AAGGTAAACT GTACGCAAAA AAAGAATGCA ACGAAGACTG CAACTTCAAA      300
GAACTGATCC TGGAAAACCA CTACAACACC TACGCATCTG CTAAATGGAC CCACAACGGT      360
GGTGAAATGT TCGTTGCTCT GAACCAGAAA GGTATCCCGG TTCGTGGTAA AAAAACCAAA      420
AAAGAACAGA AAACCGCTCA CTTCTGCGG ATGGCAATCA CTTAA                          465

```

(2) Informace o SEQ ID NO:40:

- 5 (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 154 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

10

- (ii) Typ molekuly: protein

- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:40:

```

Met Ala Thr Asn Val Asn Ser Ser Pro Glu Arg His Thr Arg Ser Tyr
1          5          10          15

Asp Tyr Met Glu Gly Gly Asp Ile Arg Val Arg Arg Leu Phe Cys Arg
          20          25          30

Thr Gln Trp Tyr Leu Arg Ile Asp Lys Arg Gly Lys Val Lys Gly Thr
          35          40          45

Gln Glu Met Lys Asn Asn Tyr Asn Ile Met Glu Ile Arg Thr Val Ala
          50          55          60

Val Gly Ile Val Ala Ile Lys Gly Val Glu Ser Glu Phe Tyr Leu Ala
65          70          75          80

Met Asn Lys Glu Gly Lys Leu Tyr Ala Lys Lys Glu Cys Asn Glu Asp
          85          90          95

Cys Asn Phe Lys Glu Leu Ile Leu Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr Ala
          100          105          110

Ser Ala Lys Trp Thr His Asn Gly Gly Glu Met Phe Val Ala Leu Asn
          115          120          125

Gln Lys Gly Ile Pro Val Arg Gly Lys Lys Thr Lys Lys Glu Gln Lys
          130          135          140

Thr Ala His Phe Leu Pro Met Ala Ile Thr
145          150

```

15

(2) Informace o SEQ ID NO:41:

- 5 (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 450 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

10 (ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:41:

```

ATGTCTTCTC CTGAACGTCA TACGCGTTCC TACGACTACA TGGAAGGTGG TGACATCCGC      60
GTACGTCGTC TGTTCTGCCG TACCCAGTGG TACCTGCGTA TCGACAAACG CGGCAAAGTC      120
AAGGGCACCC AAGAGATGAA AAACAAC TAC AATATTATGG AAATCCGTAC TGTTGCTGTT      180
GGTATCGTTG CAATCAAAGG TGTTGAATCT GAATTCTACC TGGCAATGAA CAAAGAAGGT      240
AAACTGTACG CAAAAAAGA ATGCAACGAA GACTGCAACT TCAAAGAACT GATCCTGGAA      300
AACCACTACA ACACCTACGC ATCTGCTAAA TGGACCCACA ACGGTGGTGA AATGTTGTT      360
GCTCTGAACC AGAAAGGTAT CCCGGTTCGT GGTAAAAAAA CAAAAAAGA ACAGAAAACC      420
GCTCACTTCC TGCCGATGGC AATCACTTAA      450

```

15 (2) Informace o SEQ ID NO:42:

- (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 149 aminokyselin
 20 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

25 (ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:42:

Met Ser Ser Pro Glu Arg His Thr Arg Ser Tyr Asp Tyr Met Glu Gly
 1 5 10 15

Gly Asp Ile Arg Val Arg Arg Leu Phe Cys Arg Thr Gln Trp Tyr Leu
 20 25 30

Arg Ile Asp Lys Arg Gly Lys Val Lys Gly Thr Gln Glu Met Lys Asn
 35 40 45

Asn Tyr Asn Ile Met Glu Ile Arg Thr Val Ala Val Gly Ile Val Ala
 50 55 60

Ile Lys Gly Val Glu Ser Glu Phe Tyr Leu Ala Met Asn Lys Glu Gly
 65 70 75 80

Lys Leu Tyr Ala Lys Lys Glu Cys Asn Glu Asp Cys Asn Phe Lys Glu
 85 90 95

Leu Ile Leu Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr Ala Ser Ala Lys Trp Thr
 100 105 110

His Asn Gly Gly Glu Met Phe Val Ala Leu Asn Gln Lys Gly Ile Pro
 115 120 125

Val Arg Gly Lys Lys Thr Lys Lys Glu Gln Lys Thr Ala His Phe Leu
 130 135 140

Pro Met Ala Ile Thr
 145

(2) Informace o SEQ ID NO:43:

- 5 (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 447 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

10

- (ii) Typ molekuly: cDNA

- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:43:

ATGTCTCCTG AACGTCATAC GCGTTCCTAC GACTACATGG AAGGTGGTGA CATCCGCGTA 60

CGTCGTCTGT TCTGCCGTAC CCAGTGGTAC CTGCGTATCG ACAAACGCGG CAAAGTCAAG 120

GGCACCCAAG AGATGAAAAA CAACTACAAT ATTATGGAAA TCCGTACTGT TGCTGTTGGT 180

ATCGTTGCAA TCAAAGGTGT TGAATCTGAA TTCTACCTGG CAATGAACAA AGAAGGTAAA 240

CTGTACGCAA AAAAAGAATG CAACGAAGAC TGCAACTTCA AAGAACTGAT CCTGGAAAAC 300

CACTACAACA CCTACGCATC TGCTAAATGG ACCCACAACG GTGGTGAAAT GTTCGTTGCT 360

CTGAACCAGA AAGGTATCCC GGTTTCGTGGT AAAAAACCA AAAAAGAACA GAAAACCGCT 420

CACTTCCTGC CGATGGCAAT CACTTAA 447

(2) Informace o SEQ ID NO:44:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 148 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:44:

```

Met Ser Pro Glu Arg His Thr Arg Ser Tyr Asp Tyr Met Glu Gly Gly
1           5           10           15

Asp Ile Arg Val Arg Arg Leu Phe Cys Arg Thr Gln Trp Tyr Leu Arg
          20           25           30

Ile Asp Lys Arg Gly Lys Val Lys Gly Thr Gln Glu Met Lys Asn Asn
          35           40           45

Tyr Asn Ile Met Glu Ile Arg Thr Val Ala Val Gly Ile Val Ala Ile
          50           55           60

Lys Gly Val Glu Ser Glu Phe Tyr Leu Ala Met Asn Lys Glu Gly Lys
65           70           75           80

Leu Tyr Ala Lys Lys Glu Cys Asn Glu Asp Cys Asn Phe Lys Glu Leu
          85           90           95

Ile Leu Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr Ala Ser Ala Lys Trp Thr His
          100          105          110

Asn Gly Gly Glu Met Phe Val Ala Leu Asn Gln Lys Gly Ile Pro Val
          115          120          125

Arg Gly Lys Lys Thr Lys Lys Glu Gln Lys Thr Ala His Phe Leu Pro
          130          135          140

Met Ala Ile Thr
145

```

(2) Informace o SEQ ID NO:45:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 444 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:45:

```

ATGCCTGAAC GTCATACGCG TTCCTACGAC TACATGGAAG GTGGTGACAT CCGCGTACGT      60
CGTCTGTTCT GCCGTACCCA GTGGTACCTG CGTATCGACA AACGCGGCAA AGTCAAGGGC      120
ACCCAAGAGA TGAAAAACAA CTACAATATT ATGGAAATCC GTACTGTTGC TGTGTTGTTATC      180
GTTGCAATCA AAGGTGTTGA ATCTGAATTC TACCTGGCAA TGAACAAAGA AGGTAAACTG      240
TACGCAAAAA AAGAATGCAA CGAAGACTGC AACTTCAAAG AACTGATCCT GGAAAACCAC      300
TACAACACCT ACGCATCTGC TAAATGGACC CACAACGGTG GTGAAATGTT CGTTGCTCTG      360
AACCAGAAAG GTATCCCGGT TCGTGGTAAA AAAACCAAAA AAGAACAGAA AACCGCTCAC      420
TTCCTGCCGA TGGCAATCAC TTAA                                           444

```

(2) Informace o SEQ ID NO:46:

- 5 (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 147 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

- 10 (ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:46:

```

Met Pro Glu Arg His Thr Arg Ser Tyr Asp Tyr Met Glu Gly Gly Asp
1           5           10           15

Ile Arg Val Arg Arg Leu Phe Cys Arg Thr Gln Trp Tyr Leu Arg Ile
          20           25           30

Asp Lys Arg Gly Lys Val Lys Gly Thr Gln Glu Met Lys Asn Asn Tyr
          35           40           45

Asn Ile Met Glu Ile Arg Thr Val Ala Val Gly Ile Val Ala Ile Lys
          50           55           60

Gly Val Glu Ser Glu Phe Tyr Leu Ala Met Asn Lys Glu Gly Lys Leu
          65           70           75           80

Tyr Ala Lys Lys Glu Cys Asn Glu Asp Cys Asn Phe Lys Glu Leu Ile
          85           90           95

Leu Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr Ala Ser Ala Lys Trp Thr His Asn
          100          105          110

Gly Gly Glu Met Phe Val Ala Leu Asn Gln Lys Gly Ile Pro Val Arg
          115          120          125

Gly Lys Lys Thr Lys Lys Glu Gln Lys Thr Ala His Phe Leu Pro Met
          130          135          140

Ala Ile Thr
          145

```

Met Glu Arg His Thr Arg Ser Tyr Asp Tyr Met Glu Gly Gly Asp Ile
 1 5 10 15

Arg Val Arg Arg Leu Phe Cys Arg Thr Gln Trp Tyr Leu Arg Ile Asp
 20 25 30

Lys Arg Gly Lys Val Lys Gly Thr Gln Glu Met Lys Asn Asn Tyr Asn
 35 40 45

Ile Met Glu Ile Arg Thr Val Ala Val Gly Ile Val Ala Ile Lys Gly
 50 55 60

Val Glu Ser Glu Phe Tyr Leu Ala Met Asn Lys Glu Gly Lys Leu Tyr
 65 70 75 80

Ala Lys Lys Glu Cys Asn Glu Asp Cys Asn Phe Lys Glu Leu Ile Leu
 85 90 95

Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr Ala Ser Ala Lys Trp Thr His Asn Gly
 100 105 110

Gly Glu Met Phe Val Ala Leu Asn Gln Lys Gly Ile Pro Val Arg Gly
 115 120 125

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

Ile Thr
 145

(2) Informace o SEQ ID NO:49:

- 5 (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 438 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

10

- (ii) Typ molekuly: cDNA

- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:49:

ATGCGTCATA CGCGTTCCTA CGACTACATG GAAGGTGGTG ACATCCGCGT ACGTCGTCTG 60

TTCTGCCGTA CCCAGTGGTA CCTGCGTATC GACAAACGCG GCAAAGTCAA GGGCACCCAA 120

GAGATGAAAA ACAACTACAA TATTATGGAA ATCCGTACTG TTGCTGTTGG TATCGTTGCA 180

ATCAAAGGTG TTGAATCTGA ATTCTACCTG GCAATGAACA AAGAAGGTAA ACTGTACGCA 240

AAAAAAGAAT GCAACGAAGA CTGCAACTTC AAAGAAGTGA TCCTGGAAAA CCACTACAAC 300

ACCTACGCAT CTGCTAAATG GACCCACAAC GGTGGTGAAA TGTTGTTTGC TCTGAACCAG 360

AAAGGTATCC CGGTTCTGTG TAAAAAACC AAAAAAGAAC AGAAAACCGC TCACTTCCTG 420

CCGATGGCAA TCACTTAA 438

(2) Informace o SEQ ID NO:50:

- (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 145 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:50:

```

Met Arg His Thr Arg Ser Tyr Asp Tyr Met Glu Gly Gly Asp Ile Arg
1           5           10           15

Val Arg Arg Leu Phe Cys Arg Thr Gln Trp Tyr Leu Arg Ile Asp Lys
          20           25           30

Arg Gly Lys Val Lys Gly Thr Gln Glu Met Lys Asn Asn Tyr Asn Ile
          35           40           45

Met Glu Ile Arg Thr Val Ala Val Gly Ile Val Ala Ile Lys Gly Val
          50           55           60

Glu Ser Glu Phe Tyr Leu Ala Met Asn Lys Glu Gly Lys Leu Tyr Ala
          65           70           75           80

Lys Lys Glu Cys Asn Glu Asp Cys Asn Phe Lys Glu Leu Ile Leu Glu
          85           90           95

Asn His Tyr Asn Thr Tyr Ala Ser Ala Lys Trp Thr His Asn Gly Gly
          100          105          110

Glu Met Phe Val Ala Leu Asn Gln Lys Gly Ile Pro Val Arg Gly Lys
          115          120          125

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

Thr
145

```

(2) Informace o SEQ ID NO:51:

- (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 435 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:51:

```

ATGCATACTC GTTCCTACGA CTACATGGAA GGTGGTGACA TCCGCGTACG TCGTCTGTTC      60
TGCCGTACCC AGTGGTACCT GCGTATCGAC AAACGCGGCA AAGTCAAGGG CACCCAAGAG      120
ATGAAAAACA ACTACAATAT TATGGAAATC CGTACTGTGTG CTGTTGGTAT CGTTGCAATC      180
AAAGGTGTTG AATCTGAATT CTACCTGGCA ATGAACAAAG AAGGTAAACT GTACGCAAAA      240
AAAGAATGCA ACGAAGACTG CAACTTCAAA GAACTGATCC TGGAAAACCA CTACAACACC      300
TACGCATCTG CTAAATGGAC CCACAACGGT GGTGAAATGT TCGTTGCTCT GAACCAGAAA      360
GGTATCCCGG TTCGTGGTAA AAAAACCAAA AAAGAACAGA AAACCGCTCA CTTCTGCCG      420
ATGGCAATCA CTTAA                                          435

```

(2) Informace o SEQ ID NO:52:

5 (i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 144 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

10 (D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:52:

```

Met His Thr Arg Ser Tyr Asp Tyr Met Glu Gly Gly Asp Ile Arg Val
1           5           10           15
Arg Arg Leu Phe Cys Arg Thr Gln Trp Tyr Leu Arg Ile Asp Lys Arg
20           25           30
Gly Lys Val Lys Gly Thr Gln Glu Met Lys Asn Asn Tyr Asn Ile Met
35           40           45
Glu Ile Arg Thr Val Ala Val Gly Ile Val Ala Ile Lys Gly Val Glu
50           55           60
Ser Glu Phe Tyr Leu Ala Met Asn Lys Glu Gly Lys Leu Tyr Ala Lys
65           70           75           80
Lys Glu Cys Asn Glu Asp Cys Asn Phe Lys Glu Leu Ile Leu Glu Asn
85           90           95
His Tyr Asn Thr Tyr Ala Ser Ala Lys Trp Thr His Asn Gly Gly Glu
100          105          110
Met Phe Val Ala Leu Asn Gln Lys Gly Ile Pro Val Arg Gly Lys Lys
115          120          125
Thr Lys Lys Glu Gln Lys Thr Ala His Phe Leu Pro Met Ala Ile Thr
130          135          140

```

15

(2) Informace o SEQ ID NO:53:

- (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 432 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:53:

```

ATGACTCGTT CCTACGACTA CATGGAAGGT GGTGACATCC GCGTACGTCG TCTGTTCTGC      60
CGTACCCAGT GGTACCTGCG TATCGACAAA CGCGGCAAAG TCAAGGGCAC CCAAGAGATG      120
AAAAACAAC TACAATATTAT GGAAATCCGT ACTGTTGCTG TTGGTATCGT TGCAATCAAAA      180
GGTGTGTAAT CTGAATTCTA CCTGGCAATG AACAAAGAAG GTAAACTGTA CGCAAAAAAAAA      240
GAATGCAACG AAGACTGCAA CTTCAAAGAA CTGATCCTGG AAAACCACTA CAACACCTAC      300
GCATCTGCTA AATGGACCCA CAACGGTGGT GAAATGTTTC TTGCTCTGAA CCAGAAAGGT      360
ATCCCGGTTT GTGGTAAAAA AACCAAAAAA GAACAGAAAA CCGCTCACTT CCTGCCGATG      420
GCAATCACTT AA                                     432

```

(2) Informace o SEQ ID NO:54:

- (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 143 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:54:

```

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

```


Lys Val Lys Gly Thr Gln Glu Met Lys Asn Asn Tyr Asn Ile Met Glu
 35 40 45
 Ile Arg Thr Val Ala Val Gly Ile Val Ala Ile Lys Gly Val Glu Ser
 50 55 60
 Glu Phe Tyr Leu Ala Met Asn Lys Glu Gly Lys Leu Tyr Ala Lys Lys
 65 70 75 80
 Glu Cys Asn Glu Asp Cys Asn Phe Lys Glu Leu Ile Leu Glu Asn His
 85 90 95
 Tyr Asn Thr Tyr Ala Ser Ala Lys Trp Thr His Asn Gly Gly Glu Met
 100 105 110
 Phe Val Ala Leu Asn Gln Lys Gly Ile Pro Val Arg Gly Lys Lys Thr
 115 120 125
 Lys Lys Glu Gln Lys Thr Ala His Phe Leu Pro Met Ala Ile Thr
 130 135 140

(2) Informace o SEQ ID NO:55:

- 5 (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 429 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

10

- (ii) Typ molekuly: cDNA

- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:55:

ATGCGTTCCT ACGACTACAT GGAAGGTGGT GACATCCGCG TACGTGCTCT GTTCTGCCGT 60
 ACCCAGTGGT ACCTGCGTAT CGACAAACGC GGCAAAGTCA AGGGCACCCA AGAGATGAAA 120
 AACAACTACA ATATTATGGA AATCCGTA CT GTTGCTGTTG GTATCGTTGC AATCAAAGGT 180
 GTTGAATCTG AATTCTACCT GGCAATGAAC AAAGAAGGTA AACTGTACGC AAAAAAAGAA 240
 TGCAACGAAG ACTGCAACTT CAAAGAACTG ATCCTGGAAA ACCACTACAA CACCTACGCA 300
 TCTGCTAAAT GGACCCACAA CGGTGGTGAA ATGTTCTGTTG CTCTGAACCA GAAAGGTATC 360
 CCGGTTCGTG GTAAAAAAC CAAAAAAGAA CAGAAAACCG CTCACCTTCCT GCCGATGGCA 420
 ATCACTTAA 429

15 (2) Informace o SEQ ID NO:56:

- 20 (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 142 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:56:

```

Met Arg Ser Tyr Asp Tyr Met Glu Gly Gly Asp Ile Arg Val Arg Arg
1           5           10           15

Leu Phe Cys Arg Thr Gln Trp Tyr Leu Arg Ile Asp Lys Arg Gly Lys
20           25           30

Val Lys Gly Thr Gln Glu Met Lys Asn Asn Tyr Asn Ile Met Glu Ile
35           40           45

Arg Thr Val Ala Val Gly Ile Val Ala Ile Lys Gly Val Glu Ser Glu
50           55           60

Phe Tyr Leu Ala Met Asn Lys Glu Gly Lys Leu Tyr Ala Lys Lys Glu
65           70           75           80

Cys Asn Glu Asp Cys Asn Phe Lys Glu Leu Ile Leu Glu Asn His Tyr
85           90           95

Asn Thr Tyr Ala Ser Ala Lys Trp Thr His Asn Gly Gly Glu Met Phe
100          105          110

Val Ala Leu Asn Gln Lys Gly Ile Pro Val Arg Gly Lys Lys Thr Lys
115          120          125

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

```

5

(2) Informace o SEQ ID NO:57:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 426 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:57:

15

```

ATGTCCTACG ACTACATGGA AGGTGGTGAC ATCCGCGTAC GTCGTCTGTT CTGCCGTACC      60
CAGTGGTACC TCGTATCGA CAAACGCGGC AAAGTCAAGG GCACCCAAGA GATGAAAAAC      120
AACTACAATA TTATGGAAAT CCGTACTGTT GCTGTTGGTA TCGTTGCAAT CAAAGGTGTT      180
GAATCTGAAT TCTACCTGGC AATGAACAAA GAAGGTAAAC TGTACGCAAA AAAAGAATGC      240
AACGAAGACT GCAACTTCAA AGAACTGATC CTGGAAAACC ACTACAACAC CTACGCATCT      300
GCTAAATGGA CCCACAACGG TGGTGAAATG TTCGTTGCTC TGAACCAGAA AGGTATCCCG      360
GTTCTGGTA AAAAAACCAA AAAAGAACAG AAAACCGCTC ACTTCCTGCC GATGGCAATC      420
ACTTAA                                          426

```

(2) Informace o SEQ ID NO:58:

- 5 (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 141 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

10

- (ii) Typ molekuly: protein

- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:58:

```

Met Ser Tyr Asp Tyr Met Glu Gly Gly Asp Ile Arg Val Arg Arg Leu
1           5           10           15

```

```

Phe Cys Arg Thr Gln Trp Tyr Leu Arg Ile Asp Lys Arg Gly Lys Val
          20           25           30

```

```

Lys Gly Thr Gln Glu Met Lys Asn Asn Tyr Asn Ile Met Glu Ile Arg
          35           40           45

```

```

Thr Val Ala Val Gly Ile Val Ala Ile Lys Gly Val Glu Ser Glu Phe
          50           55           60

```

```

Tyr Leu Ala Met Asn Lys Glu Gly Lys Leu Tyr Ala Lys Lys Glu Cys
65           70           75           80

```

```

Asn Glu Asp Cys Asn Phe Lys Glu Leu Ile Leu Glu Asn His Tyr Asn
          85           90           95

```

```

Thr Tyr Ala Ser Ala Lys Trp Thr His Asn Gly Gly Glu Met Phe Val
          100          105          110

```

```

Ala Leu Asn Gln Lys Gly Ile Pro Val Arg Gly Lys Lys Thr Lys Lys
          115          120          125

```

```

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

```

15

(2) Informace o SEQ ID NO:59:

- (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 423 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:59:

```

ATGTACGACT ACATGGAAGG TGGTGACATC CGCGTACGTC GTCTGTTCTG CCGTACCCAG      60
TGGTACCTGC GTATCGACAA ACGCGGCAAA GTCAAGGGCA CCCAAGAGAT GAAAAACAAC      120
TACAATATTA TGGAAATCCG TACTGTTGCT GTTGGTATCG TTGCAATCAA AGGTGTTGAA      180
TCTGAATTCT ACCTGGCAAT GAACAAAGAA GGTAAGTGT ACGCAAAAAA AGAATGCAAC      240
GAAGACTGCA ACTTCAAAGA ACTGATCCTG GAAAACCACT ACAACACCTA CGCATCTGCT      300
AAATGGACCC ACAACGGTGG TGAAATGTTT GTTGCTCTGA ACCAGAAAGG TATCCCGGTT      360
CGTGGTAAAA AAACCAAAAA AGAACAGAAA ACCGCTCACT TCCTGCCGAT GGCAATCACT      420
TAA                                          423

```

(2) Informace o SEQ ID NO:60:

- (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 140 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:60:

Met Tyr Asp Tyr Met Glu Gly Gly Asp Ile Arg Val Arg Arg Leu Phe
 1 5 10 15
 Cys Arg Thr Gln Trp Tyr Leu Arg Ile Asp Lys Arg Gly Lys Val Lys
 20 25 30
 Gly Thr Gln Glu Met Lys Asn Asn Tyr Asn Ile Met Glu Ile Arg Thr
 35 40 45
 Val Ala Val Gly Ile Val Ala Ile Lys Gly Val Glu Ser Glu Phe Tyr
 50 55 60
 Leu Ala Met Asn Lys Glu Gly Lys Leu Tyr Ala Lys Lys Glu Cys Asn
 65 70 75 80
 Glu Asp Cys Asn Phe Lys Glu Leu Ile Leu Glu Asn His Tyr Asn Thr
 85 90 95
 Tyr Ala Ser Ala Lys Trp Thr His Asn Gly Gly Glu Met Phe Val Ala
 100 105 110
 Leu Asn Gln Lys Gly Ile Pro Val Arg Gly Lys Lys Thr Lys Lys Glu
 115 120 125
 Gln Lys Thr Ala His Phe Leu Pro Met Ala Ile Thr
 130 135 140

(2) Informace o SEQ ID NO:61:

5 (i) Charakteristika sekvence

- (A) Délka: 495 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

10

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:61:

ATGTCTAATG ATATGACTCC GGAACAGATG GCTACCAACG TTAACCTCCTC CTCCCCGGAA 60
 CGTCACACGC GTTCCTACGA CTACATGGAA GGTGGTGACA TCCGCGTACG TCGTCTGTTC 120
 TGCCGTACCC AGTGGTACCT GCGTATCGAC AAACGCGGCA AASTCAAGGG CACCCAAGAG 180
 ATGAAAAACA ACTACAATAT TATGGAAATC CGTACTGTTG CTGTTGGTAT CGTTGCAATC 240

15

```

AAAGGTGTTG AATCTGAATT CTATCTTGCA ATGAACAAGG AAGGAAAACCT CTATGCAAAG      300
AAAGAATGCA ATGAAGATTG TAACTTCAAA GAACTAATTC TGGAAAACCA TTACAACACA      360
TATGCATCTG CTAAATGGAC CCACAACGGT GGTGAAATGT TCGTTGCTCT GAACCAGAAA      420
GGTATCCCTG TTGAAGGTAA GAAAACCAAG AAAGAACAGA AAACCGCTCA CTCCTGCCG      480
ATGGCAATCA CTTAA                                                              495

```

(2) Informace o SEQ ID NO:62:

- 5 (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 164 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

10

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:62:

```

Met Ser Asn Asp Met Thr Pro Glu Gln Met Ala Thr Asn Val Asn Ser
1           5           10           15

Ser Ser Pro Glu Arg His Thr Arg Ser Tyr Asp Tyr Met Glu Gly Gly
          20           25           30

Asp Ile Arg Val Arg Arg Leu Phe Cys Arg Thr Gln Trp Tyr Leu Arg
          35           40           45

Ile Asp Lys Arg Gly Lys Val Lys Gly Thr Gln Glu Met Lys Asn Asn
          50           55           60

Tyr Asn Ile Met Glu Ile Arg Thr Val Ala Val Gly Ile Val Ala Ile
65           70           75           80

Lys Gly Val Glu Ser Glu Phe Tyr Leu Ala Met Asn Lys Glu Gly Lys
          85           90           95

Leu Tyr Ala Lys Lys Glu Cys Asn Glu Asp Cys Asn Phe Lys Glu Leu
          100          105          110

Ile Leu Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr Ala Ser Ala Lys Trp Thr His
          115          120          125

Asn Gly Gly Glu Met Phe Val Ala Leu Asn Gln Lys Gly Ile Pro Val
          130          135          140

Glu Gly Lys Lys Thr Lys Lys Glu Gln Lys Thr Ala His Phe Leu Pro
145          150          155          160

Met Ala Ile Thr

```

15

(2) Informace o SEQ ID NO:63:

- (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 495 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:63:

```

ATGTCTAATG ATATGACTCC GGAACAGATG GCTACCAACG TTAACCTCTC CTCCCCGGAA      60
CGTCACACGC GTTCCTACGA CTACATGGAA GGTGGTGACA TCCGCGTACG TCGTCTGTTC      120
TGCCGTACCC AGTGGTACCT GCGTATCGAC AAACGCGGCA AAGTCAAGGG CACCCAAGAG      180
ATGAAAAACA ACTACAATAT TATGGAAATC CGTACTGTTG CTGTTGGTAT CGTTGCAATC      240
AAAGGTGTTG AATCTGAATT CTATCTTGCA ATGAACAAGG AAGGAAAACCT CTATGCAAAG      300
AAAGAATGCA ATGAAGATTG TAACTTCAA GAACTAATTC TGGAAAACCA TTACAACACA      360
TATGCATCTG CTAATGGAC CCACAACGGT GGTGAAATGT TCGTTGCTCT GAACCAGAAA      420
GGTATCCCTG TTCAAGGTAA GAAAACCAAG AAAGAACAGA AAACCGCTCA CTCCTGCCG      480
ATGGCAATCA CTTAA                                     495
  
```

(2) Informace o SEQ ID NO:64:

- (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 164 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:64:

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

(2) Informace o SEQ ID NO:65:

- 5 (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 426 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

10 (ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:65:

ATGTCCTACG ACTACATGGA AGGTGGTGAC ATCCGCGTAC GTCGTCTGTT CTGCCGTACC 60
 CAGTGGTACC TGGGTATCGA CAAACGCGGC AAAGTCAAGG GCACCCAAGA GATGAAAAAC 120


```

AACTACAATA TTATGGAAAT CCGTACTGTT GCTGTTGGTA TCGTTGCAAT CAAAGGTGTT      180
GAATCTGAAT TCTATCTTGC AATGAACAAG GAAGGAAAAC TCTATGCAAA GAAAGAATGC      240
AATGAAGATT GTAACITCAA AGAACTAATT CTGGAAAACC ATTACAACAC ATATGCATCT      300
GCTAAATGGA CCCACAACGG TGGTGAAATG TTCGTTGCTC TGAACCAGAA AGGTATCCCT      360
GTTCAAGGTA AGAAAACCAA GAAAGAACAG AAAACCGCTC ACTTCCTGCC GATGGCAATC      420
ACTTAA                                         426

```

(2) Informace o SEQ ID NO:66:

- 5 (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 141 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

10

- (ii) Typ molekuly: protein

- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:66:

```

Met Ser Tyr Asp Tyr Met Glu Gly Gly Asp Ile Arg Val Arg Arg Leu
1           5           10           15
Phe Cys Arg Thr Gln Trp Tyr Leu Arg Ile Asp Lys Arg Gly Lys Val
          20           25           30
Lys Gly Thr Gln Glu Met Lys Asn Asn Tyr Asn Ile Met Glu Ile Arg
          35           40           45
Thr Val Ala Val Gly Ile Val Ala Ile Lys Gly Val Glu Ser Glu Phe
          50           55           60
Tyr Leu Ala Met Asn Lys Glu Gly Lys Leu Tyr Ala Lys Lys Glu Cys
65           70           75           80
Asn Glu Asp Cys Asn Phe Lys Glu Leu Ile Leu Glu Asn His Tyr Asn
          85           90           95
Thr Tyr Ala Ser Ala Lys Trp Thr His Asn Gly Gly Glu Met Phe Val
          100          105          110
Ala Leu Asn Gln Lys Gly Ile Pro Val Gln Gly Lys Lys Thr Lys Lys
          115          120          125
Glu Gln Lys Thr Ala His Phe Leu Pro Met Ala Ile Thr
          130          135          140

```

15

(2) Informace o SEQ ID NO:67:

- 20 (i) Charakteristika sekvence

- (A) Délka: 24 párů bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Počet řetězců: neznámý
- (D) Topologie: neznámá

5

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:67:

GAGCTCACTA GTGTCGACCT GCAG

24

10

(2) Informace o SEQ ID NO:68:

(i) Charakteristika sekvence

- (A) Délka: 24 párů bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Počet řetězců: neznámý
- (D) Topologie: neznámá

15

(ii) Typ molekuly: cDNA

20

(ix) Vlastnosti:

- (A) Jméno/klíč: misc_feature (různé vlastnosti)
- (B) Umístění: doplňková (1..24)

25

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:68:

CTGCAGGTCG ACACTAGTGA GCTC

24

(2) Informace o SEQ ID NO:69:

30

(i) Charakteristika sekvence

- (A) Délka: 18 párů bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Počet řetězců: neznámý
- (D) Topologie: neznámá

35

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:69:

CAATCTACAA TTCACAGA

40

19

(2) Informace o SEQ ID NO:70:

(i) Charakteristika sekvence

- (A) Délka: 18 párů bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Počet řetězců: neznámý
- (D) Topologie: neznámá

45

(ii) Typ molekuly: cDNA

50

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:70:

TTAAGTTATT GCCATAGG

18

5 (2) Informace o SEQ ID NO:71:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 29 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

10 (C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

15 (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:71:

AACAAAGCTT CTACAATTCA CAGATAGGA

29

(2) Informace o SEQ ID NO:72:

20 (i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 27 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

25 (D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:72:

AACAAGATCT TAAGTTATTG CCATAGG

27

30

(2) Informace o SEQ ID NO:73:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 38 párů bází

35 (B) Typ: nukleová kyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

40

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:73:

CGGTCTAGAC CACCATGCAC AAATGGATAC TGACATGG

38

45 (2) Informace o SEQ ID NO:74:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 33 párů bází

- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Počet řetězců: neznámý
- (D) Topologie: neznámá

5 (ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:74:

GCCGTCGACC TATTAAGTTA TTGCCATAGG AAG

33

10 (2) Informace o SEQ ID NO:75:

- (i) Charakteristika sekvence
 - (A) Délka: 16 aminokyselin
 - (B) Typ: aminokyselina
 - (C) Počet řetězců: neznámý
 - (D) Topologie: neznámá

15

(ii) Typ molekuly: protein

20 (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:75:

Xaa Asn Asp Met Thr Pro Glu Gln Met Ala Thr Asn Val Xaa Xaa Ser
1 5 10 15

(2) Informace o SEQ ID NO:76:

- 25 (i) Charakteristika sekvence
 - (A) Délka: 12 aminokyselin
 - (B) Typ: aminokyselina
 - (C) Počet řetězců: neznámý
 - (D) Topologie: neznámá

30

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:76:

Ser Tyr Asp Tyr Met Glu Gly Gly Asp Ile Arg Val
1 5 10

35 (2) Informace o SEQ ID NO:77:

- (i) Charakteristika sekvence
 - (A) Délka: 517 párů bází
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Počet řetězců: neznámý
 - (D) Topologie: neznámá

40

(ii) Typ molekuly: cDNA

45 (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:77:

CTAGAAGGAG GAATAACATA TGTCTAATGA TATGACTCCG GAACAGATGG CTACCAACGT	60
TAACTCCTCC TCCCCGGAAC GTCACACGCG TTCCTACGAC TACATGGAAG GTGGTGACAT	120
CCGCGTACGC CGTTTGTCT CTCTACCCA GTGGTACCTG CGTATCGACA AACGCGGCAA	180
AGTCAAGGGC ACCCAAGAGA TGAAAAACAA CTACAATATT ATGGAAATCC GTACTGTTGC	240
TGTTGGTATC GTTGCAATCA AAGGTGTTGA ATCTGAATTC TATCTTGCAA TGAACAAGGA	300
AGGAAAACCTC TATGCAAAGA AAGAATGCAA TGAAGATTGT AACTTCAAAG AACTAATTCT	360
GGAAAACCAT TACAACACAT ATGCATCAGC TAAATGGACA CACAACGGAG GGGAAATGTT	420
TGTTGCCTTA AATCAAAGG GGATTCCTGT AAGAGGAAA AAAACGAAGA AAGAACAAA	480
AACAGCCCAC TTTCTTCCTA TGGCAATAAC TTAATAG	517

(2) Informace o SEQ ID NO:78:

- 5 (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 164 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyseliny
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá
- 10 (ii) Typ molekuly: protein
- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:78:

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

(2) Informace o SEQ ID NO:79:

- 5 (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 517 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá
- 10 (ii) Typ molekuly: cDNA
- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:79:

```

CTAGAAGGAG GAATAACATA TGTCTAATGA TATGACTCCG GAACAGATGG CTACCAACGT      60
TAACTCCTCC TCCCCGGAAC GTCACACGCG TTCCTACGAC TACATGGAAG GTGGTGACAT      120
CCGCGTACGT CGTCTGTTCT GCCGTACCCA GTGGTACCTG CGTATCGACA AACGCGGCAA      180
AGTCAAGGGC ACCCAAGAGA TGAAAAACAA CTACAATATT ATGGAAATCC GTACTGTTGC      240
TGTTGGTATC GTTGCAATCA AAGGTGTTGA ATCTGAATTC TACCTGGCTA TGAACAAAGA      300
AGGTAAACTG TACGCTAAAA AAGAATCCAA TGAAGATTGT AACTTCAAAG AACTAATTCT      360
GGAAAACCAT TACAACACAT ATGCATCAGC TAAATGGACA CACAACGGAG GGGAAATGTT      420
TGTTGCCTTA AATCAAAAGG GGATTCTGT AAGAGGAAAA AAAACGAAGA AAGAACAAAA      480
AACAGCCCAC TTTCTTCCTA TGGCAATAAC TTAATAG                                517

```

(2) Informace o SEQ ID NO:80:

- 5 (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 164 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

10

- (ii) Typ molekuly: protein

- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:80:

```

Met Ser Asn Asp Met Thr Pro Glu Gln Met Ala Thr Asn Val Asn Ser
1           5           10           15

Ser Ser Pro Glu Arg His Thr Arg Ser Tyr Asp Tyr Met Glu Gly Gly
          20           25           30

```

Asp Ile Arg Val Arg Arg Leu Phe Cys Arg Thr Gln Trp Tyr Leu Arg
 35 40 45
 Ile Asp Lys Arg Gly Lys Val Lys Gly Thr Gln Glu Met Lys Asn Asn
 50 55 60
 Tyr Asn Ile Met Glu Ile Arg Thr Val Ala Val Gly Ile Val Ala Ile
 65 70 75 80
 Lys Gly Val Glu Ser Glu Phe Tyr Leu Ala Met Asn Lys Glu Gly Lys
 85 90 95
 Leu Tyr Ala Lys Lys Glu Ser Asn Glu Asp Cys Asn Phe Lys Glu Leu
 100 105 110
 Ile Leu Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr Ala Ser Ala Lys Trp Thr His
 115 120 125
 Asn Gly Gly Glu Met Phe Val Ala Leu Asn Gln Lys Gly Ile Pro Val
 130 135 140
 Arg Gly Lys Lys Thr Lys Lys Glu Gln Lys Thr Ala His Phe Leu Pro
 145 150 155 160
 Met Ala Ile Thr

(2) Informace o SEQ ID NO:81:

- 5 (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 517 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

10

- (ii) Typ molekuly: cDNA

- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:81:

CTAGAAGGAG GAATAACATA TGTCTAATGA TATGACTCCG GAACAGATGG CTACCAACGT 60
 TAACTCCTCC TCCCCGGAAC GTCACACGCG TTCCTACGAC TACATGGAAG GTGGTGACAT 120
 CCGCGTACGT CGTCTGTTCT GCCGTACCCA GTGGTACCTG CGTATCGACA AACGCGGCAA 180
 AGTCAAGGGC ACCCAAGAGA TGA AAAACAA CTACAATATT ATGGAAATCC GTACTGTTGC 240
 TGTTGGTATC GTTGCAATCA AAGGTGTTGA ATCTGAATTC TACCTGGCTA TGAACAAAGA 300
 AGGTAAACTG TACGCTAAAA AAGAATCCAA TGAAGATTCT AACTTCAAAG AACTAATTCT 360
 GGAAACCAT TACAACACAT ATGCATCAGC TAAATGGACA CACAACGGAG GGGAAATGTT 420
 TGTTGCCTTA AATCAAAAAGG GGATTCTGT AAGAGGAAAA AAAACGAAGA AAGAACAAAA 480
 AACAGCCCAC TTTCTTCCTA TGGCAATAAC TTAATAG 517

15

(2) Informace o SEQ ID NO:82:

- (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 164 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:82:

```

Met Ser Asn Asp Met Thr Pro Glu Gln Met Ala Thr Asn Val Asn Ser
1           5           10           15

Ser Ser Pro Glu Arg His Thr Arg Ser Tyr Asp Tyr Met Glu Gly Gly
          20           25           30

Asp Ile Arg Val Arg Arg Leu Phe Cys Arg Thr Gln Trp Tyr Leu Arg
          35           40           45

Ile Asp Lys Arg Gly Lys Val Lys Gly Thr Gln Glu Met Lys Asn Asn
          50           55           60

Tyr Asn Ile Met Glu Ile Arg Thr Val Ala Val Gly Ile Val Ala Ile
65           70           75           80

Lys Gly Val Glu Ser Glu Phe Tyr Leu Ala Met Asn Lys Glu Gly Lys
          85           90           95

Leu Tyr Ala Lys Lys Glu Ser Asn Glu Asp Ser Asn Phe Lys Glu Leu
          100          105          110

Ile Leu Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr Ala Ser Ala Lys Trp Thr His
          115          120          125

Asn Gly Gly Glu Met Phe Val Ala Leu Asn Gln Lys Gly Ile Pro Val
          130          135          140

Arg Gly Lys Lys Thr Lys Lys Glu Gln Lys Thr Ala His Phe Leu Pro
145          150          155          160

Met Ala Ile Thr

```

(2) Informace o SEQ ID NO:83:

- (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 426 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:83:

```

ATGTCCTACG ACTACATGGA AGGTGGTGAC ATCCGCGTAC GTCGTCTGTT CTGCCGTACC      60
CAGTGGTACC TGCATATCGA CAAACGCGGC AAAGTCAAGG GCACCCAAGA GATGAAAAAC      120
AACTACAATA TTATGGAAAT CCGTACTGTT GCTGTTGGTA TCGTTGCAAT CAAAGGTGTT      180
GAATCTGAAT TCTACCTGGC AATGAACAAA GAAGGTAAAC TGTACGCAAA AAAAGAATGC      240
AACGAAGACT GCAACTTCAA AGAACTGATC CTGGAAAACC ACTACAACAC CTACGCATCT      300
GCTAAATGGA CCCACAACGG TGGTGAAATG TTCGTTGCTC TGGAACAGAA AGGTATCCCT      360
GTTCGTGGTA AGAAAACCAA GAAAGAACAG AAAACCGCTC ACTTCCTGCC GATGGCAATC      420
ACTTAA                                         426

```

(2) Informace o SEQ ID NO:84:

5

- (i) Charakteristika sekvence
 - (A) Délka: 141 aminokyselin
 - (B) Typ: aminokyselina
 - (C) Počet řetězců: neznámý
 - (D) Topologie: neznámá

10

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:84:

```

Met Ser Tyr Asp Tyr Met Glu Gly Gly Asp Ile Arg Val Arg Arg Leu
1           5           10           15
Phe Cys Arg Thr Gln Trp Tyr Leu Arg Ile Asp Lys Arg Gly Lys Val
                20                25                30
Lys Gly Thr Gln Glu Met Lys Asn Asn Tyr Asn Ile Met Glu Ile Arg
                35                40                45
Thr Val Ala Val Gly Ile Val Ala Ile Lys Gly Val Glu Ser Glu Phe
                50                55                60
Tyr Leu Ala Met Asn Lys Glu Gly Lys Leu Tyr Ala Lys Lys Glu Cys
65                70                75                80
Asn Glu Asp Cys Asn Phe Lys Glu Leu Ile Leu Glu Asn His Tyr Asn
                85                90                95
Thr Tyr Ala Ser Ala Lys Trp Thr His Asn Gly Gly Glu Met Phe Val
                100               105               110
Ala Leu Glu Gln Lys Gly Ile Pro Val Arg Gly Lys Lys Thr Lys Lys
                115               120               125
Glu Gln Lys Thr Ala His Phe Leu Pro Met Ala Ile Thr
130               135               140

```

(2) Informace o SEQ ID NO:85:

- 5 (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 426 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

- 10 (ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:85:

```

ATGTCCTACG ACTACATGGA AGGTGGTGAC ATCCGCGTAC GTCGTCTGTT CTGCCGTACC      60
CAGTGGTACC TCGTATCGA CAAACGCGGC AAAGTCAAGG GCACCCAAGA GATGAAAAAC      120
AACTACAATA TTATGAAAT CCGTACTGTT GCTGTTGGTA TCGTTGCAAT CAAAGGTGTT      180
GAATCTGAAT TCTACCTGGC AATGAACAAA GAAGGTAAAC TGTACGCAAA AAAAGAATGC      240
AACGAAGACT GCAACTTCAA AGAAGTATC CTGGAAAACC ACTACAACAC CTACGCATCT      300
GCTAAATGGA CCCACAACGG TGGTGAAATG TTCGTTGCTC TGAACCAGGA AGGTATCCCT      360
GTTGCTGGTA AGAAAACCAA GAAAGAACAG AAAACCGCTC ACTTCCTGCC GATGGCAATC      420
ACTTAA                                         426

```

(2) Informace o SEQ ID NO:86:

- 15 (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 141 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 20 (D) Topologie: neznámá

- (ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:86:

Met Ser Tyr Asp Tyr Met Glu Gly Gly Asp Ile Arg Val Arg Arg Leu
 1 5 10 15

Phe Cys Arg Thr Gln Trp Tyr Leu Arg Ile Asp Lys Arg Gly Lys Val
 20 25 30

Lys Gly Thr Gln Glu Met Lys Asn Asn Tyr Asn Ile Met Glu Ile Arg
 35 40 45

Thr Val Ala Val Gly Ile Val Ala Ile Lys Gly Val Glu Ser Glu Phe
 50 55 60

Tyr Leu Ala Met Asn Lys Glu Gly Lys Leu Tyr Ala Lys Lys Glu Cys
 65 70 75 80

Asn Glu Asp Cys Asn Phe Lys Glu Leu Ile Leu Glu Asn His Tyr Asn
 85 90 95

Thr Tyr Ala Ser Ala Lys Trp Thr His Asn Gly Gly Glu Met Phe Val
 100 105 110

Ala Leu Asn Gln Glu Gly Ile Pro Val Arg Gly Lys Lys Thr Lys Lys
 115 120 125

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

(2) Informace o SEQ ID NO:87:

(i) Charakteristika sekvence

- (A) Délka: 426 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:87:

ATGTCCTACG ACTACATGGA AGGTGGTGAC ATCCGCGTAC GTCGTCTGTT CTGCCGTACC 60

CAGTGGTACC TGCATATCGA CAAACGCGGC AAAGTCAAGG GCACCCAAGA GATGAAAAAC 120

AACTACAATA TTATGGAAAT CCGTACTGTT GCTGTTGGTA TCGTTGCAAT CAAAGGTGTT 180

GAATCTGAAT TCTACCTGGC AATGAACAAA GAAGGTAAAC TGTACGCAAA AAAAGAATGC 240

AACGAAGACT GCAACTTCAA AGAAGTATC CTGGAACACC ACTACAACAC CTACGCATCT 300

GCTAAATGGA CCCACAACGG TGGTGAAATG TTCGTTGCTC TGAACCAGCA AGGTATCCCT 360

GTTTCGTGGTA AGAAAACCAA GAAAGAACAG AAAACCGCTC ACTTCCTGCC GATGGCAATC 420

ACTTAA 426

(2) Informace o SEQ ID NO:88:

- (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 141 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

- (ii) Typ molekuly: protein

- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:88:

```

Met Ser Tyr Asp Tyr Met Glu Gly Gly Asp Ile Arg Val Arg Arg Leu
1          5          10          15
Phe Cys Arg Thr Gln Trp Tyr Leu Arg Ile Asp Lys Arg Gly Lys Val
20          25          30
Lys Gly Thr Gln Glu Met Lys Asn Asn Tyr Asn Ile Met Glu Ile Arg
35          40          45
Thr Val Ala Val Gly Ile Val Ala Ile Lys Gly Val Glu Ser Glu Phe
50          55          60
Tyr Leu Ala Met Asn Lys Glu Gly Lys Leu Tyr Ala Lys Lys Glu Cys
65          70          75          80
Asn Glu Asp Cys Asn Phe Lys Glu Leu Ile Leu Glu Asn His Tyr Asn
85          90          95
Thr Tyr Ala Ser Ala Lys Trp Thr His Asn Gly Gly Glu Met Phe Val
100         105         110
Ala Leu Asn Gln Gln Gly Ile Pro Val Arg Gly Lys Lys Thr Lys Lys
115         120         125
Glu Gln Lys Thr Ala His Phe Leu Pro Met Ala Ile Thr
130         135         140

```

(2) Informace o SEQ ID NO:89:

- (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 426 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

- (ii) Typ molekuly: cDNA

- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:89:

```

ATGTCCTACG ACTACATGGA AGGTGGTGAC ATCCGCGTAC GTCGTCTGTT CTGCCGTACC      60
CAGTGGTACC TCGGTATCGA CAAACGCGGC AAAGTCAAGG GCACCCAAGA GATGAAAAAC      120
AACTACAATA TTATGGAAAT CCGTACTGTT GCTGTTGGTA TCGTTGCAAT CAAAGGTGTT      180
GAATCTGAAT TCTACCTGGC AATGAACAAA GAAGGTAAAC TGTACGCAA AAAAGAATGC      240
AACGAAGACT GCAACTTCAA AGAACTGATC CTGGAAAACC ACTACAACAC CTACGCATCT      300
GCTAAATGGA CCCACAACGG TGGTGAAATG TTCGTTGCTC TGAACCAGAA AGGTATCCCT      360
GTTGCTGGTA AGAAAACCAA GAAAGAACAG AAAACCGCTC ACTTCCTGCC GATGGCAATC      420
ACTTAA                                          426

```

(2) Informace o SEQ ID NO:90:

- 5 (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 141 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

10

- (ii) Typ molekuly: protein

- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:90:

```

Met Ser Tyr Asp Tyr Met Glu Gly Gly Asp Ile Arg Val Arg Arg Leu
1              5              10              15
Phe Cys Arg Thr Gln Trp Tyr Leu Arg Ile Asp Lys Arg Gly Lys Val
                20              25              30
Lys Gly Thr Gln Glu Met Lys Asn Asn Tyr Asn Ile Met Glu Ile Arg
                35              40              45
Thr Val Ala Val Gly Ile Val Ala Ile Lys Gly Val Glu Ser Glu Phe
                50              55              60
Tyr Leu Ala Met Asn Lys Glu Gly Lys Leu Tyr Ala Lys Lys Glu Cys
65              70              75              80
Asn Glu Asp Cys Asn Phe Lys Glu Leu Ile Leu Glu Asn His Tyr Asn
                85              90              95
Thr Tyr Ala Ser Ala Lys Trp Thr His Asn Gly Gly Glu Met Phe Val
                100             105             110
Ala Leu Asn Gln Lys Gly Ile Pro Val Ala Gly Lys Lys Thr Lys Lys
                115             120             125
Glu Gln Lys Thr Ala His Phe Leu Pro Met Ala Ile Thr
                130             135             140

```

(2) Informace o SEQ ID NO:91:

- 5 (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 426 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

- 10 (ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:91:

```

ATGTCCTACG ACTACATGGA AGGTGGTGAC ATCCGCGTAC GTCGTCTGTT CTGCCGTACC      60
CAGTGGTACC TGCSTATCGA CAAACGCGGC AAAGTCAAGG GCACCCAAGA GATGAAAAAC      120
AACTACAATA TTATGGAAAT CCGTACTGTT GCTGTTGGTA TCGTTGCAAT CAAAGGTGTT      180
GAATCTGAAT TCTATCTTGC AATGAACAAG GAAGGAAAAC TCTATGCAAA GAAAGAATGC      240
AATGAAGATT GTAAC TTCAA AGAACTAATT CTGGAAAACC ATTACAACAC ATATGCATCT      300
GCTAAATGGA CCCACAACGG TGGTGAAATG TTCGTTGCTC TGAACCAGAA AGGTATCCCT      360
GTTGAAGGTA AGAAAACCAA GAAAGAACAG AAAACCGCTC ACTTCCTGCC GATGGCAATC      420
ACTTAA                                         426

```

15 (2) Informace o SEQ ID NO:92:

- (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 141 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 20 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

- (ii) Typ molekuly: protein

25 (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:92:

Met Ser Tyr Asp Tyr Met Glu Gly Gly Asp Ile Arg Val Arg Arg Leu
 1 5 10 15

Phe Cys Arg Thr Gln Trp Tyr Leu Arg Ile Asp Lys Arg Gly Lys Val
 20 25 30

Lys Gly Thr Gln Glu Met Lys Asn Asn Tyr Asn Ile Met Glu Ile Arg
 35 40 45

Thr Val Ala Val Gly Ile Val Ala Ile Lys Gly Val Glu Ser Glu Phe
 50 55 60

Tyr Leu Ala Met Asn Lys Glu Gly Lys Leu Tyr Ala Lys Lys Glu Cys
 65 70 75 80

Asn Glu Asp Cys Asn Phe Lys Glu Leu Ile Leu Glu Asn His Tyr Asn
 85 90 95

Thr Tyr Ala Ser Ala Lys Trp Thr His Asn Gly Gly Glu Met Phe Val
 100 105 110

Ala Leu Asn Gln Lys Gly Ile Pro Val Glu Gly Lys Lys Thr Lys Lys
 115 120 125

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

(2) Informace o SEQ ID NO:93:

- 5 (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 426 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

- 10 (ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:93:

ATGTCCTACG ACTACATGGA AGGTTGGTGAC ATCCGCGTAC GTCGTCTGTT CTGCCGTACC 60

CAGTGGTACC TGCATATCGA CAAACGCGGC AAAGTCAAGG GCACCCAAGA GATGAAAAAC 120

AACATAATA TTATGGAAAT CCGTACTGTT GCTGTTGGTA TCGTTGCAAT CAAAGGTGTT 180

GAATCTGAAT TCTACCTGGC AATGAACAAA GAAGGTAAAC TGTACGCAAA AAAAGAATGC 240

AACGAAGACT GCAACTTCAA AGAAGTATC CTGGAAAACC ACTACAACAC CTACGCATCT 300

GCTAAATGGA CCCACAACGG TGGTGAAATG TTCGTTGCTC TGAACCAGAA AGGTATCCCT 360

GTTCTGGGTA AGAAAACCAA GAAAGAACAG AAAACCGCTC ACTTCCTGCC GATGGCAATC 420

ACTTAA 426

(2) Informace o SEQ ID NO:94:

- (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 141 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:94:

```

Met Ser Tyr Asp Tyr Met Glu Gly Gly Asp Ile Arg Val Arg Arg Leu
1      5      10      15
Phe Cys Arg Thr Gln Trp Tyr Leu Arg Ile Asp Lys Arg Gly Lys Val
20      25      30
Lys Gly Thr Gln Glu Met Lys Asn Asn Tyr Asn Ile Met Glu Ile Arg
35      40      45
Thr Val Ala Val Gly Ile Val Ala Ile Lys Gly Val Glu Ser Glu Phe
50      55      60
Tyr Leu Ala Met Asn Lys Glu Gly Lys Leu Tyr Ala Lys Lys Glu Cys
65      70      75      80
Asn Glu Asp Cys Asn Phe Lys Glu Leu Ile Leu Glu Asn His Tyr Asn
85      90      95
Thr Tyr Ala Ser Ala Lys Trp Thr His Asn Gly Gly Glu Met Phe Val
100     105     110
Ala Leu Asn Gln Lys Gly Ile Pro Val Leu Gly Lys Lys Thr Lys Lys
115     120     125
Glu Gln Lys Thr Ala His Phe Leu Pro Met Ala Ile Thr
130     135     140

```

(2) Informace o SEQ ID NO:95:

- (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 426 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:95:

```

ATGTCCTACG ACTACATGGA AGGTGGTGAC ATCCGCGTAC GTCGTCTGTT CTGCCGTACC      60
CAGTGGTACC TCGTATCGA CAAACGCGGC AAAGTCAAGG GCACCCAAGA GATGAAAAAC      120
AACTACAATA TTATGAAAT CCGTACTGTT GCTGTTGGTA TCGTTGCAAT CAAAGGTGTT      180
GAATCTGAAT TCTACCTGGC AATGAACAAA GAAGGTAAAC TGTACGCAA AAAAGAATGC      240
AACGAAGACT GCAACTTCAA AGAACTGATC CTGGAAAACC ACTACAACAC CTACGCATCT      300
GCTAAATGGA CCCACAACGG TGGTGAAATG TTCGTTGCTC TGAACCAGAA AGGTATTCTT      360
GTTCTGTGTA AGGAAACCAA GAAAGAACAG AAAACCGCTC ACTTCCTGCC GATGGCAATC      420
ACTTAA                                         426

```

(2) Informace o SEQ ID NO:96:

- 5 (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 141 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

10 (ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:96:

```

Met Ser Tyr Asp Tyr Met Glu Gly Gly Asp Ile Arg Val Arg Arg Leu
1           5           10           15
Phe Cys Arg Thr Gln Trp Tyr Leu Arg Ile Asp Lys Arg Gly Lys Val
          20           25           30
Lys Gly Thr Gln Glu Met Lys Asn Asn Tyr Asn Ile Met Glu Ile Arg
          35           40           45
Thr Val Ala Val Gly Ile Val Ala Ile Lys Gly Val Glu Ser Glu Phe
          50           55           60
Tyr Leu Ala Met Asn Lys Glu Gly Lys Leu Tyr Ala Lys Lys Glu Cys
65           70           75           80
Asn Glu Asp Cys Asn Phe Lys Glu Leu Ile Leu Glu Asn His Tyr Asn
          85           90           95
Thr Tyr Ala Ser Ala Lys Trp Thr His Asn Gly Gly Glu Met Phe Val
          100          105          110
Ala Leu Asn Gln Lys Gly Ile Pro Val Arg Gly Lys Glu Thr Lys Lys
          115          120          125
Glu Gln Lys Thr Ala His Phe Leu Pro Met Ala Ile Thr
          130          135          140

```

(2) Informace o SEQ ID NO:97:

- (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 426 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:97:

```

ATGTCCTACG ACTACATGGA AGGTGGTGAC ATCCGCGTAC GTCGTCTGTT CTGCCGTACC      60
CAGTGGTACC TCGGTATCGA CAAACGCGGC AAAGTCAAGG GCACCCAAGA GATGAAAAAC      120
AACTACAATA TTATGGAAAT CCGTACTGTT GCTGTTGGTA TCGTTGCAAT CAAAGGTGTT      180
GAATCTGAAT TCTACCTGGC AATGAACAAA GAAGGTAAAC TGTACGCAA AAAAGAATGC      240
AACGAAGACT GCAACTTCAA AGAACTGATC CTGGAAAACC ACTACAACAC CTACGCATCT      300
GCTAAATGGA CCCACAACGG TGGTGAAATG TTCGTTGCTC TGAACCAGAA AGGTATCCCT      360
GTTCTGTGTA AGCAAACCAA GAAAGAACAG AAAACCGCTC ACTTCCTGCC GATGGCAATC      420
ACTTAA                                         426

```

(2) Informace o SEQ ID NO:98:

- (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 141 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:98:

```

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

```

```

Asn Glu Asp Cys Asn Phe Lys Glu Leu Ile Leu Glu Asn His Tyr Asn
      85                      90                      95

Thr Tyr Ala Ser Ala Lys Trp Thr His Asn Gly Gly Glu Met Phe Val
      100                    105                    110

Ala Leu Asn Gln Lys Gly Ile Pro Val Arg Gly Lys Gln Thr Lys Lys
      115                    120                    125

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

```

(2) Informace o SEQ ID NO:99:

- 5 (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 426 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

10

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:99:

```

ATGTCCTACG ACTACATGGA AGGTGGTGAC ATCCGCGTAC GTCGTCTGTT CTGCCGTACC      60
CAGTGGTACC TGC GTATCGA CAAACGCGGC AAAGTCAAGG GCACCCAAGA GATGAAAAAC      120
AACTACAATA TTATGGAAAT CCGTACTGTT GCTGTTGGTA TCGTTGCAAT CAAAGGTGTT      180
GAATCTGAAT TCTACCTGGC AATGAACAAA GAAGGTAAAC TGTACGCAA AAAAGAATGC      240
AACGAAGACT GCAACTTCAA AGAACTGATC CTGGAAAACC ACTACAACAC CTACGCATCT      300
GCTAAATGGA CCCACAACGG TGGTGAAATG TTCGTTGCTC TGAACCAGAA AGGTATCCCT      360
GTTTCGTGGTA AGAAAACCAA GAAAGAACAG GAAACCGCTC ACTTCCTGCC GATGGCAATC      420
ACTTAA                                           426

```

15 (2) Informace o SEQ ID NO:100:

- (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 141 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

20

(ii) Typ molekuly: protein

25 (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:100:

Met Ser Tyr Asp Tyr Met Glu Gly Gly Asp Ile Arg Val Arg Arg Leu
 1 5 10 15

Phe Cys Arg Thr Gln Trp Tyr Leu Arg Ile Asp Lys Arg Gly Lys Val
 20 25 30

Lys Gly Thr Gln Glu Met Lys Asn Asn Tyr Asn Ile Met Glu Ile Arg
 35 40 45

Thr Val Ala Val Gly Ile Val Ala Ile Lys Gly Val Glu Ser Glu Phe
 50 55 60

Tyr Leu Ala Met Asn Lys Glu Gly Lys Leu Tyr Ala Lys Lys Glu Cys
 65 70 75 80

Asn Glu Asp Cys Asn Phe Lys Glu Leu Ile Leu Glu Asn His Tyr Asn
 85 90 95

Thr Tyr Ala Ser Ala Lys Trp Thr His Asn Gly Gly Glu Met Phe Val
 100 105 110

Ala Leu Asn Gln Lys Gly Ile Pro Val Arg Gly Lys Lys Thr Lys Lys
 115 120 125

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

(2) Informace o SEQ ID NO:101:

- (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 426 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

- (ii) Typ molekuly: cDNA

- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:101:

ATGTCCTACG ACTACATGGA AGGTGGTGAC ATCCGCGTAC GTCGTCTGTT CTGCCGTACC 60

CAGTGGTACC TGC GTATCGA CAAACGCGGC AAAGTCAAGG GCACCCAAGA GATGAAAAAC 120

AACTACAATA TTATGGAAAT CCGTACTGTT GCTGTTGGTA TCGTTGCAAT CAAAGGTGTT 180

GAATCTGAAT TCTACCTGGC AATGAACAAA GAAGGTAAAC TGTACGCAAA AAAAGAATGC 240

AACGAAGACT GCAACTTCAA AGAACTGATC CTGGAAAACC ACTACAACAC CTACGCATCT 300

GCTAAATGGA CCCACAACGG TGGTGAAATG TTCGTTGCTC TGAACCAGAA AGGTATCCCT 360

GTTCTGGTA AGAAAACCAA GAAAGAACAG CAAACCGCTC ACTTCCTGCC GATGGCAATC 420

ACTTAA 426

(2) Informace o SEQ ID NO:102:

- (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 141 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

- (ii) Typ molekuly: protein

- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:102:

```

Met Ser Tyr Asp Tyr Met Glu Gly Gly Asp Ile Arg Val Arg Arg Leu
1           5           10           15
Phe Cys Arg Thr Gln Trp Tyr Leu Arg Ile Asp Lys Arg Gly Lys Val
20           25           30
Lys Gly Thr Gln Glu Met Lys Asn Asn Tyr Asn Ile Met Glu Ile Arg
35           40           45
Thr Val Ala Val Gly Ile Val Ala Ile Lys Gly Val Glu Ser Glu Phe
50           55           60
Tyr Leu Ala Met Asn Lys Glu Gly Lys Leu Tyr Ala Lys Lys Glu Cys
65           70           75           80
Asn Glu Asp Cys Asn Phe Lys Glu Leu Ile Leu Glu Asn His Tyr Asn
85           90           95
Thr Tyr Ala Ser Ala Lys Trp Thr His Asn Gly Gly Glu Met Phe Val
100          105          110
Ala Leu Asn Gln Lys Gly Ile Pro Val Arg Gly Lys Lys Thr Lys Lys
115          120          125
Glu Gln Gln Thr Ala His Phe Leu Pro Met Ala Ile Thr
130          135          140

```

(2) Informace o SEQ ID NO:103:

- (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 426 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

- (ii) Typ molekuly: cDNA

- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:103:

```

ATGTCCTACG ACTACATGGA AGGTGGTGAC ATCCGCGTAC GTCGTCTGTT CTGCCGTACC      60
CAGTGGTACC TCGGTATCGA CAAACGCGGC AAAGTCAAGG GCACCCAAGA GATGAAAAAC      120
AACTACAATA TTATGGAAAT CCGTACTGTT GCTGTTGGTA TCGTTGCAAT CAAAGGTGTT      180
GAATCTGAAT TCTACCTGGC AATGAACAAA GAAGGTAAAC TGTACGCAAA AAAAGAATGC      240
AACGAAGACT GCAACTTCAA AGAAGTATC CTGGAAAACC ACTACAACAC CTACGCATCT      300
GCTAAATGGA CCCACAACGG TGGTGAAATG TTCGTTGCTC TGAACCAGAA AGGTATCCCT      360
GTTCTGTGGTA AGAAAACCAA GAAAGAAGAG GAAACCGCTC ACTTCCTGCC GATGGCAATC      420
ACTTAA                                         426

```

(2) Informace o SEQ ID NO:104:

- 5 (i) Charakteristika sekvence
 (A) Délka: 141 aminokyselina
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Počet řetězců: neznámý
 (D) Topologie: neznámá

10 (ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:104:

```

Met Ser Tyr Asp Tyr Met Glu Gly Gly Asp Ile Arg Val Arg Arg Leu
1           5           10           15
Phe Cys Arg Thr Gln Trp Tyr Leu Arg Ile Asp Lys Arg Gly Lys Val
          20          25          30
Lys Gly Thr Gln Glu Met Lys Asn Asn Tyr Asn Ile Met Glu Ile Arg
          35          40          45
Thr Val Ala Val Gly Ile Val Ala Ile Lys Gly Val Glu Ser Glu Phe
          50          55          60
Tyr Leu Ala Met Asn Lys Glu Gly Lys Leu Tyr Ala Lys Lys Glu Cys
65          70          75          80
Asn Glu Asp Cys Asn Phe Lys Glu Leu Ile Leu Glu Asn His Tyr Asn
          85          90          95
Thr Tyr Ala Ser Ala Lys Trp Thr His Asn Gly Gly Glu Met Phe Val
          100         105         110
Ala Leu Asn Gln Lys Gly Ile Pro Val Arg Gly Lys Lys Thr Lys Lys
          115         120         125
Glu Glu Glu Thr Ala His Phe Leu Pro Met Ala Ile Thr
          130         135         140

```

PATENTOVÉ NÁROKY

5

1. Analog nativního keratinocytového růstového faktoru KGF, odpovídající aminokyselinám 32 až 194 SEQ ID NO:2, popřípadě spolu se signální sekvencí, kterým je deltaN23, odpovídající SEQ ID NO:58, v kteréžto sekvenci je počáteční methioninový zbytek považován za zbytek
10 v poloze 0 a jedná se o zbytek fakultativní, přičemž tento analog je kovalentně připojen k polyethylenglykolu nebo příbuznému vodorozpustnému organickému polymeru.

2. Použití analogu kovalentně připojeného k polyethylenglykolu nebo příbuznému vodorozpustnému organickému polymeru, podle nároku 1 pro výrobu léčiva pro stimulaci produkce
15 nefibroblastových epithelových buněk u pacienta, který to potřebuje, přičemž nefibroblastové buňky epithelu jsou zvoleny z adnexálních struktur, jaterních buněk, mukosálního epithelu respiračního traktu nebo tympanových epithelových buněk.

3. In vitro způsob stimulace produkce nefibroblastových epithelových buněk, **v y z n a -**
20 **č u j í c í s e t í m**, že zahrnuje podání účinného množství analogu kovalentně připojeného k polyethylenglykolu nebo příbuznému vodorozpustnému organickému polymeru, podle nároku 1, nebo farmaceutického prostředku na jeho bázi, přičemž nefibroblastové buňky epithelu jsou zvoleny z adnexálních struktur, jaterních buněk, mukosálního epithelu respiračního traktu nebo tympanových epithelových buněk.

4. Použití analogu kovalentně připojeného k polyethylenglykolu nebo příbuznému vodorozpustnému organickému polymeru, podle nároku 1 pro výrobu léčiva pro stimulaci produkce
25 nefibroblastových epithelových buněk u pacienta za účelem prevence nebo léčení stavu zvoleného ze souboru sestávajícího z popálenin a jiných poranění v části nebo celé tloušťce tkáně, epidermolysis bullosa, alopecie indukované chemoterapií, plešatosti mužského typu, progresivní ztráty vlasů u mužů a žen, žaludečních a dvanáctníkových vředů, zánětlivých chorob střev, jako je Crohnova choroba a vředová kolitida, toxicity spojené s radiačním a chemoterapeutickým ošetřením, choroby hyalinní membrány, akutního a chronického poškození plic, cirrhosy jater; prudkého selhání jater, akutní virové hepatitidy, toxických napadení jater, abraze rohovky,
35 progresivní choroby dásní a poškození ušního bubínku.

54 výkresů

40

Obr.1

lidský KGF (+ signální sekvence)

```

|---OLIGO#25-----|           |-----OLIGO#1-----|
5'CAATCTACAATTCACAGA 3'       5'CAATGACCTAGGAGTAACAATCAAC 3'
5'CAATCTACAATTCACAGATAGGAAGAGGTCAATGACCTAGGAGTAACAATCAACTCAAGA-
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60

-TTCATTTTCATTATGTTATTCATGAACACCCGGAGCACTACACTATAATGCACAAATGGA-
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
                                     M H K W I

-TACTGACATGGATCCTGCCAACTTTGCTCTACAGATCATGCTTTCACATTATCTGTCTAG-
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
      L T W I L P T L L Y R S C F H I I C L V

-TGGGTACTATATCTTTAGCTTGCAATGACATGACTCCAGAGCAAATGGCTACAAATGTGA-
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
      G T I S L A C N D M T P E Q M A T N V N

-ACTGTTCCAGCCCTGAGCGACACACAAGAAGTTATGATTACATGGAAGGAGGGGATATAA-
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
      C S S P E R H T R S Y D Y M E G G D I R

-GAGTGAGAAGACTCTTCTGTGCAACACAGTGGTACCTGAGGATCGATAAAAGAGGCAAAG-
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
      V R R L F C R T Q W Y L R I D K R G K V

-TAAAAGGGACCCAAGAGATGAAGAATAATTACAATATCATGGAATCAGGACAGTGGCAG-
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
      K G T Q E M K N N Y N I M E I R T V A V

-TTGAATTGTGGCAATCAAAGGGGTGGAAGTGAATTCTATCTTGCAATGAACAAGGAAG-
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
      G I V A I K G V E S E F Y L A M N K E G

-GAAACTCTATGCAAAGAAAGAATGCAATGAAGATTGTAACCTCAAAGAACTAATTCTGG-
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
      K L Y A K K E C N E D C N F K E L I L E

-AAAACCATTACAACACATATGCATCAGCTAAATGGACACACAACGGAGGGGAAATGTTTG-
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
      N H Y N T Y A S A K W T H N G G E M F V

-TTGCCTTAAATCAAAGGGGATTCTGTAAGAGGAAAAAAACGAAGAAAGAACAAAAAA-
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
      A L N Q K G I P V R G K K T K K E Q K T

-CAGCCCACTTTCTTCCTATGGCAATAACTTAATTGCATATGGTATATAAAGAACCAGTT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
      A H F L P M A I T *
      3'GGATACCGTTATTGAATT 5'
      |---OLIGO#26-----|

```

Obr.1
(pokračování)

```

-CCAGCAGGGAGATTTCTTTAAGTGGACTGTTTTCTTCTCTCAAATTTTCTTTCCTT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780

-TATTTTTTTAGTAATCAAGAAAGGCTGGAAAACTACTGAAAACTGATCAAGCTGGACTT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
                                     3'ACCTGAA-
                                     |-----

-GTGCATTTATGTTTGTTTTAAG 3'
-----+-----+----- 862
-CACGTAAATACAAACAAAA 5'
---OLIGO#2-----|

```

FIG. 2A

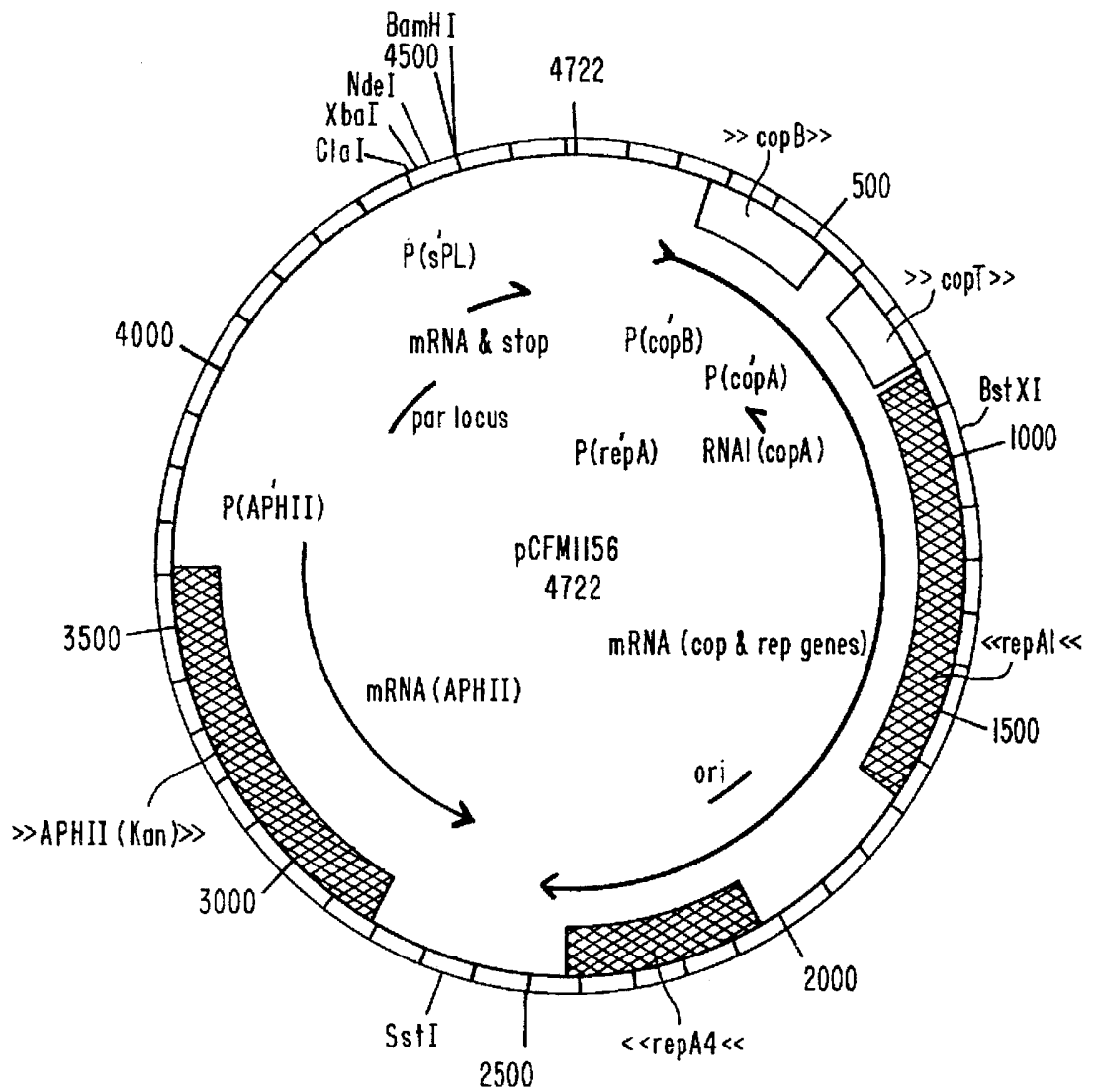


FIG.2B

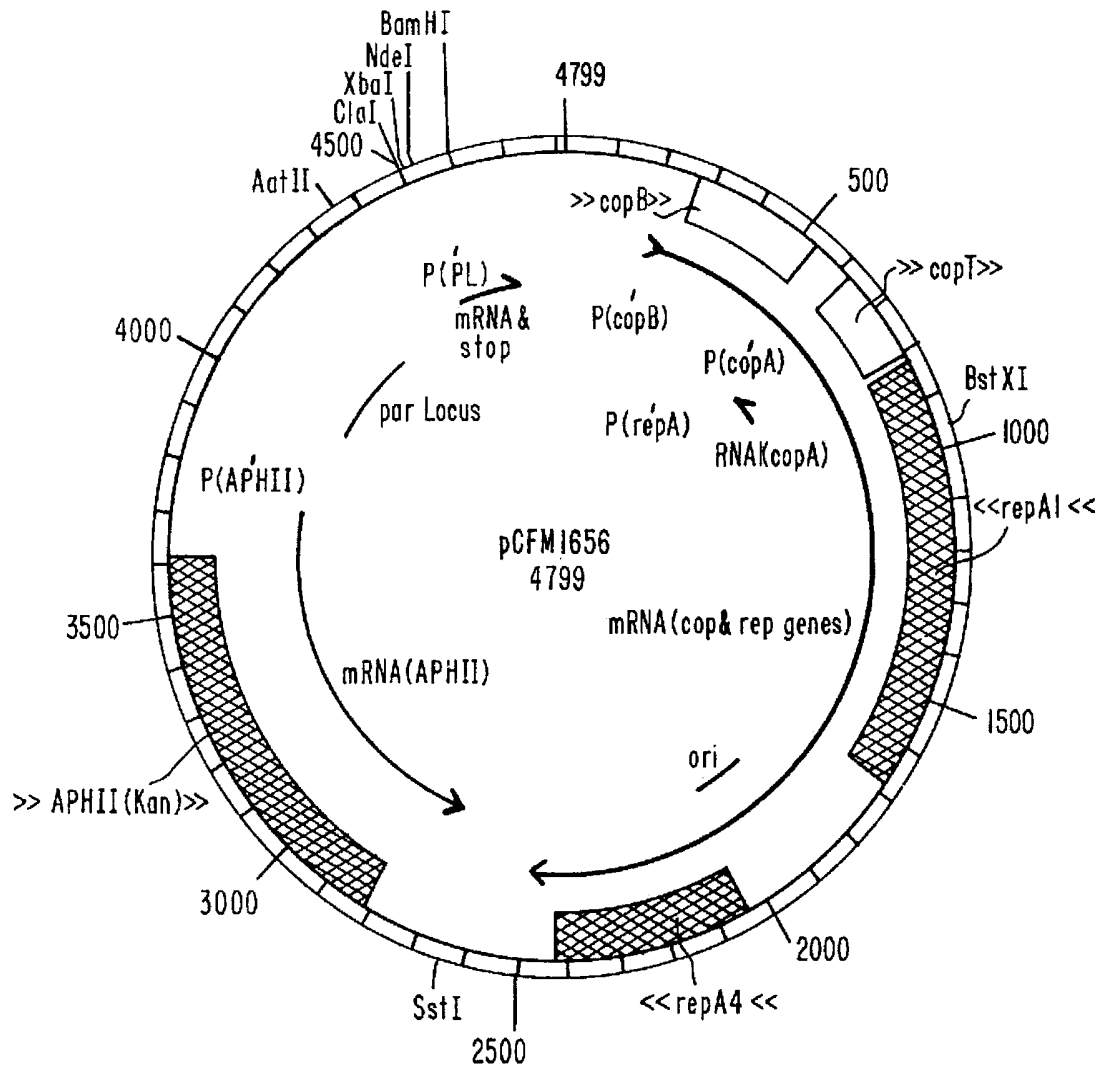
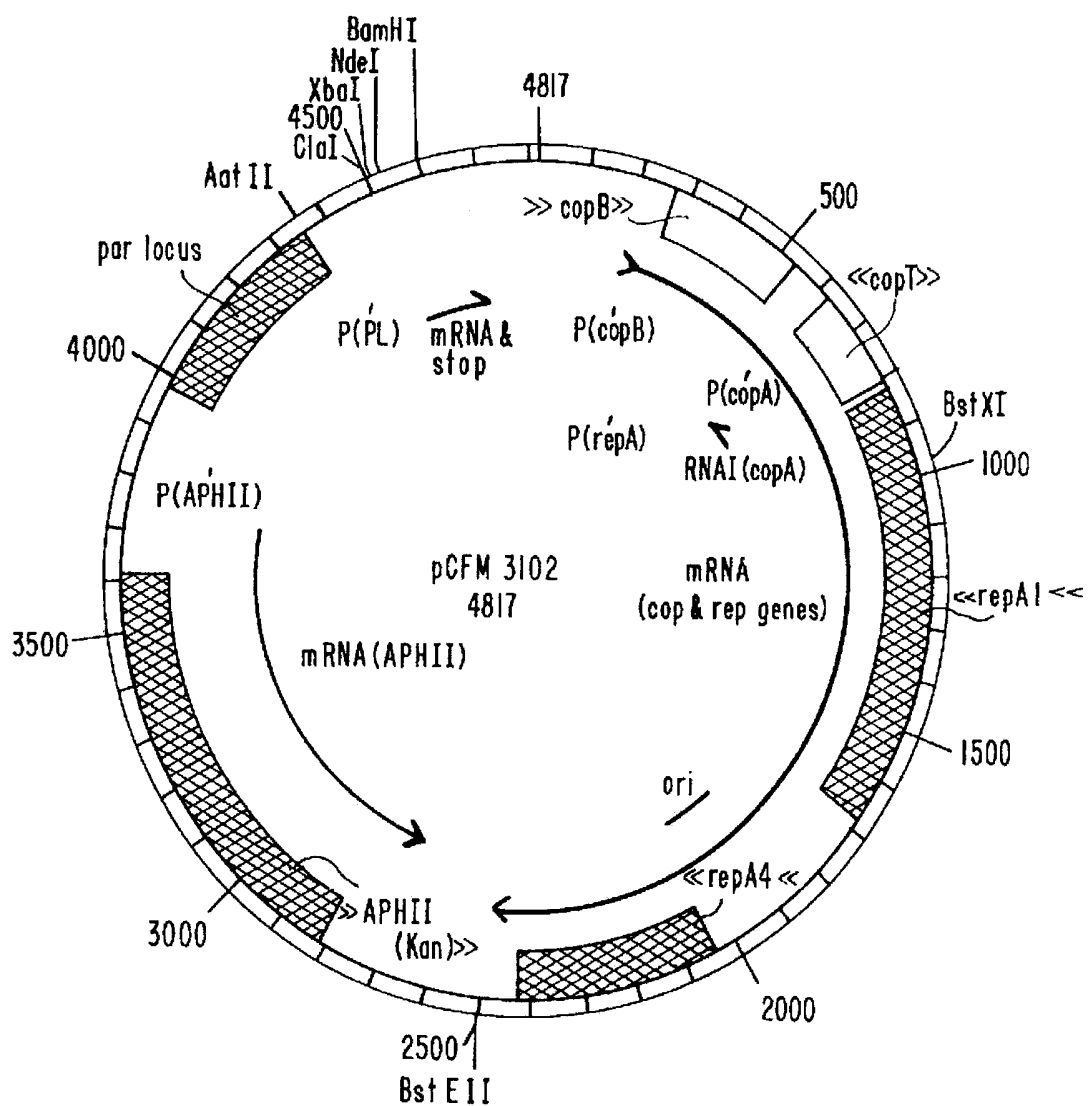


FIG.2C



plasmidová DNA
sekvence

*Cla*I
*Xba*I
*Nde*I
 5'-ATCGATTTGATTCTAGAAGGAGGAATAACATATGAAAAG-
M K K

RSH signal sequence MluI
 -CGCGCACGTGCTATCGCCATTGCTGTGGCTCTGGCAGTTTCGCAACTAGTGCACA-3'
 R A R A I A I A V A L A G F A T S A H A -

MluI
 5' CGCGTGCAATGACATGACTCCAGAGCAAATGGCTACAAATGTGAACTGTTCCAGCCCTGA-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 - C N D M T P E Q M A T N V N C S S P E 60

[illegible]

KpnI ClaI

-CTGTCGAACACAGTGGTACTCGAGGATCGATAAAAGAGGCCAAAGTAAAAGGGACCCAAGA-

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----> 180

C R T Q W Y L R I D K R G K V K G T Q E

[illegible][illegible][illegible][illegible]

-GGGGATTCTGTAAGAGGAAAAAAACGAAGAAGAACAAAAACAGCCCACTTTCTTCC-
+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
 G I P V R G K K T K K E Q K T A H F L P

^{BamHI}
 -TATGGCAATAACTTAATAG 3'
 -----+-----+----- 503
 M A I T * *

- plasmidová DNA
- sekvence

Obr. 4

KGF

NdeI
 5' TATGTGCAATGACATGACTCCAGAGCAAATGGCTACAAATGTGAACTGTTCCAGCCCTGA-
 -----+-----+-----+-----+-----+ 60
 M C N D M T P E Q M A T N V N C S S P E

-GCGACACACAAGAAGTTATGATTACATGGAAGGAGGGGATATAAGAGTGAGAAGACTCTT-
 -----+-----+-----+-----+-----+ 120
 R H T R S Y D Y M E G G D I R V R R L F

KpnI *ClaI*
 -CTGTCGAACACAGTGGTACCTGAGGATCGATAAAAGAGGCAAAGTAAAAGGGACCCAAGA-
 -----+-----+-----+-----+-----+ 180
 C R T Q W Y L R I D K R G K V K G T Q E

-GATGAAGAATAATTACAATATCATGGAAATCAGGACAGTGGCAGTTGGAATTGTGGCAAT-
 -----+-----+-----+-----+-----+ 240
 M K N N Y N I M E I R T V A V G I V A I

EcoRI
 -CAAAGGGGTGGAAAGTGAATTCTATCTTGCAATGAACAAGGAAGGAAACTCTATGCAA-
 -----+-----+-----+-----+-----+ 300
 K G V E S E F Y L A M N K E G K L Y A K

BsmI
 -GAAAGAATGCAATGAAGATTGTAACCTCAAAGAACTAATTCTGGAAAACCATTACAACAC-
 -----+-----+-----+-----+-----+ 360
 K E C N E D C N F K E L I L E N H Y N T

NdeI
 -ATATGCATCAGCTAAATGGACACACAACGGAGGGGAAATGTTTGTTCCTTAAATCAAAA-
 -----+-----+-----+-----+-----+ 420
 Y A S A K W T H N G G E M F V A L N Q K

-GGGGATTCTGTAAAGAGGAAAAAAACGAAGAAAGAACAAAAACAGCCCACTTTCTTCC-
 -----+-----+-----+-----+-----+ 480
 G I P V R G K K T K K E Q K T A H F L P

BamHI
 -TATGGCAATAACTTAATAG 3'
 -----+-----+----- 503
 M A I T *

Obr. 5

substituce KpnI až EcoRI sekvence pro vytvoření KGF (dsd)

```

KpnI
|-----OLIGO#6-----||-----OLIGO#7-----
5' CTGCGTATCGACAAACGCGGCAAAGTCAAGGGCACCCTAAGAGATGAAAAACAACACTACAAT-
3' CATGGACGCATAGCTGTTTGCGCCGTTTCAGTTCCTGGGTTCTCTACTTTTTGTTGATGTTA-
|-----OLIGO#9-----||-----OLIGO#10-----
- L R I D K R G K V K G T Q E M K N N Y N -

EcoRI
|-----OLIGO#8-----||-----
5' -ATTATGGAAATCCGTACTGTTGCTGTTGGTATCGTTGCAATCAAAGGTGTTGAATCTG 3'
3' -TAATACCTTTAGGCATGACAACGACAACCATAGCAACGTTAGTTTCCACAACCTTAGACTTAA 5'
|-----OLIGO#11-----||-----
I M E I R T V A V G I V A I K G V E S E -

```


Obr.6

KGF (optimalizovaný kodon)

```

XbaI
|-----OLIGO#12-----|
5' AGTTTTGATCTAGAAGGAGG 3'
|-----OLIGO#14-----|
5' AGTTTTGATCTAGAAGGAGGAATAACATATGTGCAACGACATGACTCCGGAACAGATGGCT-
-----|-----OLIGO#15-----|
-ACCAACGTTAACTGCTCCAGCCCCGGAACGTACACCCGTAGCTACGACTACATGGAAGGTG-
3' GGGCCTTGCAGTGTGGGCAT 5'
|-----OLIGO#20-----|
-----OLIGO#15-----|
-GTGACATCCGTGTTTCGTCTGTTCTGCCGTACCCAGTGGTACCTGCGTATCGACAAACG-
3' ATAGCTGTTTGC-
|-----OLIGO#21-----|
-----OLIGO#16-----|
-TGGTAAAGTTAAAGGTACCCAGGAAATGAAAACAACTACAACATCATGGAATCCGTACT-
-ACCATTC 5'
-----|
-----|-----OLIGO#17-----|
-GTTGCTGTTGGTATCGTTGCAATCAAAGGTGTTGAATCTGAATTCTACCTGGCAATGAACA-
3' ACGTTAGTTTCCACAACCTTA 5'
|-----OLIGO#22-----|
-----OLIGO#17-----|
-AAGAAGGTAACTGTACGCCAAAAAAGAATGCAACGAAGACTGCAACTTCAAAGAACTGAT-
3' GAAGTTTCTTGACTA-
|-----OLIGO#23-----|
-----OLIGO#18-----|
-CCTGGAAAACCACTACAACACCTACGCATCTGCTAAATGGACCCACAACGGTGGTGAAATG-
-GGACC 5'
-----|
-----|-----OLIGO#19-----|
-TTCGTTGCTCTGAACCAGAAAGGTATCCCGGTTCTGTGGTAAAAAACCAGAAAGAACAGA-
3' GGTCTTTCCATAGGGCCAAG 5'
|-----OLIGO#24-----|
-----OLIGO#19-----|
-AAACCGCTCACTTCCTGCCGATGGCAATCACTTAATAGGATCCAGTTTTGA 3'
3' AATTATCCTAGGTCAAAACT 5'
|-----OLIGO#13-----|
BamHI

```

Obr.7

KGF C(1,15)S

5' ATGTCTAATGATATGACTCCGGAACAGATGGCTACCAACGTTAACTCCTCCTCCCGGAA-
 -----+-----+-----+-----+-----+ 60
 M S N D M T P E Q M A T N V N S S S P E
 -CGTCACACGCGTTCTTACGACTACATGGAAGGTGGTGACATCCGCGTACGTCGTCTGTTC-
 -----+-----+-----+-----+-----+ 120
 R H T R S Y D Y M E G G D I R V R R L F
 -TGCCGTACCCAGTGGTACCTGCGTATCGACAAACGCGGCAAAGTCAAGGGCACCCAAGAG-
 -----+-----+-----+-----+-----+ 180
 C R T Q W Y L R I D K R G K V K G T Q E
 -ATGAAAAACAACACTACAATATTATGGAAATCCGTACTGTTGCTGTTGGTATCGTTGCAATC-
 -----+-----+-----+-----+-----+ 240
 M K N N Y N I M E I R T V A V G I V A I
 -AAAGGTGTTGAATCTGAATTCTACCTGGCAATGAACAAAGAAGGTAAACTGTACGCAAAA-
 -----+-----+-----+-----+-----+ 300
 K G V E S E F Y L A M N K E G K L Y A K
 -AAAGAATGCAACGAAGACTGCAACTTCAAAGAACTGATCCTGGAAAACCACTACAACACC-
 -----+-----+-----+-----+-----+ 360
 K E C N E D C N F K E L I L E N H Y N T
 -TACGCATCTGCTAAATGGACCCACAACGGTGGTGAAATGTTTCGTTGCTCTGAACCAGAAA-
 -----+-----+-----+-----+-----+ 420
 Y A S A K W T H N G G E M F V A L N Q K
 -GGTATCCCGGTTTCGTGGTAAAAAAACCAAAAAGAACAGAAAACCGCTCACTTCCTGCCG-
 -----+-----+-----+-----+-----+ 480
 G I P V R G K K T K K E Q K T A H F L P
 -ATGGCAATCACTTAA 3'
 -----+----- 495
 M A I T *

Obr. 8

KGF ΔN3/C(15)S

5' ATGACTCCGGAACAGATGGCTACCAACGTAACTCCTCCTCCCCGGAACGTCACACGCGT-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
 M T P E Q M A T N V N S S S P E R H T R
 -TCCTACGACTACATGGAAGGTGGTGACATCCGCGTACGTCGTCTGTTCTGCCGTACCCAG-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
 S Y D Y M E G G D I R V R R L F C R T Q
 -TGGTACCTGCGTATCGACAAACGCGGCAAAGTCAAGGGCAGGAGATGAAAAACAAC-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
 W Y L R I D K R G K V K G T Q E M K N N
 -TACAATATTATGGAATCCGTACTGTTGCTGTTGGTATCGTTGCAATCAAAGGTGTTGAA-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
 Y N I M E I R T V A V G I V A I K G V E
 -TCTGAATTCTACCTGGCAATGAACAAAGAAGGTAAACTGTACGCAAAAAAGAATGCAAC-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
 S E F Y L A M N K E G K L Y A K K E C N
 -GAAGACTGCAACTTCAAAGAACTGATCCTGGAAAACCACTACAACACCTACGCATCTGCT-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
 E D C N F K E L I L E N H Y N T Y A S A
 -AAATGGACCCACAACGGTGGTGAATGTTGCTTCTGAACCAGAAAGGTATCCCGGTT-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
 K W T H N G G E M F V A L N Q K G I P V
 -CGTGGTAAAAAAACCAAAAAGAACAGAAAACCGCTCACTTCCTGCCGATGGCAATCACT-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
 R G K K T K K E Q K T A H F L P M A I T
 -TAA 3'
 --- 483
 *

Obr. 9

KGF ΔN3/C(15)-

```

5' ATGACTCCGGAACAGATGGCTACCAACGTTAACTCTTCTCCTGAACGTCATACGCGTTCC-
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
  M T P E Q M A T N V N S S P E R H T R S

-TACGACTACATGGAAGGTGGTGACATCCGCGTACGTCGTCTGTTCTGCCGTACCCAGTGG-
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
  Y D Y M E G G D I R V R R L F C R T Q W

-TACCTGCGTATCGACAAACGCGGCAAAGTCAAGGGCACCCCAAGAGATGAAAAACAACCTAC-
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
  Y L R I D K R G K V K G T Q E M K N N Y

-AATATTATGGAAATCCGTACTGTTGCTGTTGGTATCGTTGCAATCAAAGGTGTTGAATCT-
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
  N I M E I R T V A V G I V A I K G V E S

-GAATTCTACCTGGCAATGAACAAAGAAGGTAAACTGTACGCAAAAAAGAATGCAACGAA-
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
  E F Y L A M N K E G K L Y A K K E C N E

-GACTGCAACTTCAAAGAACTGATCCTGGAAAACCACTACAACACCTACGCATCTGCTAAA-
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
  D C N F K E L I L E N H Y N T Y A S A K

-TGGACCCACAACGGTGGTGAAATGTTTCGTTGCTCTGAACCAGAAAGGTATCCCGGTTTCGT-
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
  W T H N G G E M F V A L N Q K G I P V R

-GGTAAAAAACCACAAAAAGAACAGAAAACCGCTCACTTCCTGCCGATGGCAATCACTTAA 3'
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
  G K K T K K E Q K - T A H F L P M A I T *

```

Obr.10

KGF ΔN8/C(15)S

5' ATGGCTACTAATGTAACTCCTCTTCTCCTGAACGTCATACGCGTTCCTACGACTACATG-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
 M A T N V N S S S P E R H T R S Y D Y M
 -GAAGGTGGTGACATCCGCGTACGTCGTCTGTTCTGCCGTACCCAGTGGTACCTGCGTATC-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
 E G G D I R V R R L F C R T Q W Y L R I
 -GACAAACGCGGCAAAGTCAAGGGCACCCAAGAGATGAAAAACAAC TACAATATTATGGAA-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
 D K R G K V K G T Q E M K N N Y N I M E
 -ATCCGTACTGTTGCTGTTGGTATCGTTGCAATCAAAGGTGTTGAATCTGAATTCTACCTG-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
 I R T V A V G I V A I K G V E S E F Y L
 -GCAATGAACAAAGAAGGTAAACTGTACGCAAAAAAGAATGCAACGAAGACTGCAACTTC-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
 A M N K E G K L Y A K K E C N E D C N F
 -AAAGAACTGATCCTGGAAAACCACTACAACACCTACGCATCTGCTAAATGGACCCACAAC-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
 K E L I L E N H Y N T Y A S A K W T H N
 -GGTGGTGAAATGTTGCTGCTCTGAACCAGAAAGGTATCCCGGTTGCTGGTAAAAAAACC-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
 G G E M F V A L N Q K G I P V R G K K T
 -AAAAAAGAACAGAAAACCGCTCACTTCCTGCCGATGGCAATCACTTAA 3'
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 468
 K K E Q K T A H F L P M A I T *

Obr.11

KGF ΔN8/C15-

5' ATGGCTACTAATGTAACTCTTCTCCTGAACGTCATACGCGTTCCTACGACTACATGGAA-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
 M A T N V N S S P E R H T R S Y D Y M E
 -GGTGGTGACATCCGCGTACGTCGTCTGTTCTGCCGTACCCAGTGGTACCTGCGTATCGAC-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
 G G D I R V R R L F C R T Q W Y L R I D
 -AAACGCGGCAAAGTCAAGGGCACCCAAGAGATGAAAAACAAC TACAATATTATGGAAATC-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
 K R G K V K G T Q E M K N N Y N I M E I
 -CGTACTGTTGCTGTTGGTATCGTTGCAATCAAAGGTGTTGAATCTGAATTCTACCTGGCA-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
 R T V A V G I V A I K G V E S E F Y L A
 -ATGAACAAAGAAGGTAAACTGTACGCAAAAAAAGAATGCAACGAAGACTGCAACTTCAAA-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
 M N K E G K L Y A K K E C N E D C N F K
 -GAACTGATCCTGGAAAACCACTACAACACCTACGCATCTGCTAAATGGACCCACAACGGT-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
 E L I L E N H Y N T Y A S A K W T H N G
 -GGTGAAATGTTGCTCTGAACCAGAAAGGTATCCCGGTTGCTGGTAAAAAAACCAAA-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
 G E M F V A L N Q K G I P V R G K K T K
 -AAAGAACAGAAAACCGCTCACTTCCTGCCGATGGCAATCACTTAA 3'
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 465
 K E Q K T A H F L P M A I T *

Obr.12

KGF ΔN15

5' ATGTCTTCTCCTGAACGTCATACGCGTTCCCTACGACTACATGGAAGGTGGTGACATCCGC-
 -----+-----+-----+-----+-----+ 60
 M S S P E R H T R S Y D Y M E G G D I R

 -GTACGTCGTCTGTTCTGCCGTACCCAGTGGTACCTGCGTATCGACAAACGCGGCAAAGTC-
 -----+-----+-----+-----+-----+ 120
 V R R L F C R T Q W Y L R I D K R G K V

 -AAGGGCACCCCAAGAGATGAAAAACAAC TACAATATTATGGAAATCCGTACTGTTGCTGTT-
 -----+-----+-----+-----+-----+ 180
 K G T Q E M K N N Y N I M E I R T V A V

 -GGTATCGTTGCAATCAAAGGTGTTGAATCTGAATTCTACCTGGCAATGAACAAAGAAGGT-
 -----+-----+-----+-----+-----+ 240
 G I V A I K G V E S E F Y L A M N K E G

 -AAACTGTACGCAAAAAAGAATGCAACGAAGACTGCAACTTCAAAGAACTGATCCTGGAA-
 -----+-----+-----+-----+-----+ 300
 K L Y A K K E C N E D C N F K E L I L E

 -AACCACTACAACACCTACGCATCTGCTAAATGGACCCACAACGGTGGTGAAATGTTTCGTT-
 -----+-----+-----+-----+-----+ 360
 N H Y N T Y A S A K W T H N G G E M F V

 -GCTCTGAACCAGAAAGGTATCCCGGTTTCGTGGTAAAAAAACCAAAAAGAACAGAAAACC-
 -----+-----+-----+-----+-----+ 420
 A L N Q K G I P V R G K K T K K E Q K T

 -GCTCACTTCCTGCCGATGGCAATCACTTAA 3'
 -----+-----+-----+ 450
 A H F L P M A I T *

Obr.13

KGF ΔN16

5' ATGTCTCCTGAACGTCATACGCGTTCCTACGACTACATGGAAGGTGGTGACATCCGCGTA-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
 M S P E R H T R S Y D Y M E G G D I R V
 -CGTCGTCTGTTCTGCCGTACCCAGTGGTACCTGCGTATCGACAAACGCGGCAAAGTCAAG-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
 R R L F C R T Q W Y L R I D K R G K V K
 -GGCACCCAAGAGATGAAAACAACTACAATATTATGGAAATCCGTACTGTTGCTGTTGGT-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
 G T Q E M K N N Y N I M E I R T V A V G
 -ATCGTTGCAATCAAAGGTGTTGAATCTGAATTCTACCTGGCAATGAACAAAGAAGGTAAA-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
 I V A I K G V E S E F Y L A M N K E G K
 -CTGTACGCAAAAAAAGAATGCAACGAAGACTGCAACTTCAAAGAACTGATCCTGGAAAAC-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
 L Y A K K E C N E D C N F K E L I L E N
 -CACTACAACACCTACGCATCTGCTAAATGGACCCACAACGGTGGTGAAATGTTGTTGCT-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
 H Y N T Y A S A K W T H N G G E M F V A
 -CTGAACCAGAAAGGTATCCCGGTTTCGTGGTAAAAAACCAGAAACAGAAAACCGCT-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
 L N Q K G I P V R G K K T K K E Q K T A
 -CACTTCCTGCCGATGGCAATCACTTAA 3'
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 447
 H F L P M A I T *

Obr.14

KGF ΔN17

```

5' ATGCCTGAACGTCATACGCGTTCTACGACTACATGGAAGGTGGTGACATCCGCGTACGT-
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
M P E R H T R S Y D Y M E G G D I R V R 60
-CGTCTGTTCTGCCGTACCCAGTGGTACCTGCGTATCGACAAACGCGGCAAAGTCAAGGGC-
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
R L F C R T Q W Y L R I D K R G K V K G 120
-ACCCAAGAGATGAAAAACAACACTACAATATTATGAAATCCGTACTGTTGCTGTTGGTATC-
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
T Q E M K N N Y N I M E I R T V A V G I 180
-GTTGCAATCAAAGGTGTTGAATCTGAATTCTACCTGGCAATGAACAAAGAAGGTAAACTG-
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
V A I K G V E S E F Y L A M N K E G K L 240
-TACGCAAAAAAAGAATGCAACGAAGACTGCAACTTCAAAGAACTGATCCTGGAAAACCAC-
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Y A K K E C N E D C N F K E L I L E N H 300
-TACAACACCTACGCATCTGCTAAATGGACCCACAACGGTGGTGAATGTTTCGTTGCTCTG-
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Y N T Y A S A K W T H N G G E M F V A L 360
-AACCAGAAAGGTATCCCGGTTTCGTGGTAAAAAAACCAAAAAAGAACAGAAAACCGCTCAC-
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
N Q K G I P V R G K K T K K E Q K T A H 420
-TTCCTGCCGATGGCAATCACTTAA 3'
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
F L P M A I T * 444

```

Obr.15

KGF ΔN18

5' ATGGAACGTCATACGCGTTCCTACGACTACATGGAAGGTGGTGACATCCGCGTACGTCGT-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
 M E R H T R S Y D Y M E G G D I R V R R
 -CTGTTCTGCCGTACCCAGTGGTACCTGCGTATCGACAAACGCGGCAAAGTCAAGGGCACC-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
 L F C R T Q W Y L R I D K R G K V K G T
 -CAAGAGATGAAAAACAACTACAATATTATGGAAATCCGTACTGTTGCTGTTGGTATCGTT-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
 Q E M K N N Y N I M E I R T V A V G I V
 -GCAATCAAAGGTGTTGAATCTGAATTCCTACCTGGCAATGAACAAAGAAGGTAAACTGTAC-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
 A I K G V E S E F Y L A M N K E G K L Y
 -GCAAAAAAAGAATGCAACGAAGACTGCAACTTCAAAGAACTGATCCTGGAAAACCACTAC-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
 A K K E C N E D C N F K E L I L E N H Y
 -AACACCTACGCATCTGCTAAATGGACCCACAACGGTGGTGAAATGTTGCTGCTCTGAAC-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
 N T Y A S A K W T H N G G E M F V A L N
 -CAGAAAGGTATCCCGGTTTCGTGGTAAAAAACCAGAAAAGAACAGAAAACCGCTCACTTC-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
 Q K G I P V R G K K T K K E Q K T A H F
 -CTGCCGATGGCAATCACTTAA 3'
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 441
 L P M A I T *

Obr. 16

KGF ΔN19

5' ATGCGTCATACGCGTTCCTACGACTACATGGAAGGTGGTGACATCCGCGTACGTCGTCTG-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
 M R H T R S Y D Y M E G G D I R V R R L
 -TTCTGCCGTACCCAGTGGTACCTGCGTATCGACAAACGCGGCAAAGTCAAGGGCACCCAA-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
 F C R T Q W Y L R I D K R G K V K G T Q
 -GAGATGAAAAACAAC TACAATATTATGGAATCCGTACTGTTGCTGTTGGTATCGTTGCA-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
 E M K N N Y N I M E I R T V A V G I V A
 -ATCAAAGGTGTTGAATCTGAATTCTACCTGGCAATGAACAAAGAAGGTAAACTGTACGCA-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
 I K G V E S E F Y L A M N K E G K L Y A
 -AAAAAAGAATGCAACGAAGACTGCAACTTCAAAGAACTGATCCTGGAAAACCACTACAAC-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
 K K E C N E D C N F K E L I L E N H Y N
 -ACCTACGCATCTGCTAAATGGACCCACAACGGTGGTGAAATGTTGCTTCTGAACCAG-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
 T Y A S A K W T H N G G E M F V A L N Q
 -AAAGGTATCCCGGTTTCGTGGTAAAAAAACCAAAAAAGAACAGAAAACCGCTCACTTCCTG-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
 K G I P V R G K K T K K E Q K T A H F L
 -CCGATGGCAATCACTTAA 3'
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 438
 P M A I T *

Obr. 17

KGF ΔN20

5' ATGCATACTCGTTCCTACGACTACATGGAAGGTGGTGACATCCGCGTACGTCTGTTC-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
 M H T R S Y D Y M E G G D I R V R R L F
 -TGCCGTACCCAGTGGTACCTGCGTATCGACAAACGCGGCAAAGTCAAGGGCACCCAAGAG-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
 C R T Q W Y L R I D K R G K V K G T Q E
 -ATGAAAAACAACTACAATATTATGGAAATCCGTACTGTTGCTGTTGGTATCGTTGCAATC-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
 M K N N Y N I M E I R T V A V G I V A I
 -AAAGGTGTTGAATCTGAATTCTACCTGGCAATGAACAAAGAAGGTAACTGTACGCAAAA-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
 K G V E S E F Y L A M N K E G K L Y A K
 -AAAGAATGCAACGAAGACTGCAACTTCAAAGAAGTATCCTGGAAAACCACTACAACACC-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
 K E C N E D C N F K E L I L E N H Y N T
 -TACGCATCTGCTAAATGGACCCACAACGGTGGTGAAATGTTGCTTGCTCTGAACCAGAAA-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
 Y A S A K W T H N G G E M F V A L N Q K
 -GGTATCCCGGTTTCGTGGTAAAAAAACCAAAAAGAACAGAAAACCGCTCACTTCCTGCCG-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
 G I P V R G K K T K K E Q K T A H F L P
 -ATGGCAATCACTTAA 3'
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 435
 M A I T *

Obr.18

KGF ΔN21

5'ATGACTCGTTTCCTACGACTACATGGAAGGTGGTGACATCCGCGTACGTCTGTTCTGC-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
 M T R S Y D Y M E G G D I R V R R L F C
 -CGTACCCAGTGGTACCTGCGTATCGACAAACGCGGCAAAGTCAAGGGCACCCAAGAGATG-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
 R T Q W Y L R I D K R G K V K G T Q E M
 -AAAAACAAC TACAATATTATGGAATCCGTACTGTTGCTGTTGGTATCGTTGCAATCAAA-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
 K N N Y N I M E I R T V A V G I V A I K
 -GGTGTGGAATCTGAATTCTACCTGGCAATGAACAAAGAAGGTAAACTGTACGCAAAAAAA-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
 G V E S E F Y L A M N K E G K L Y A K K
 -GAATGCAACGAAGACTGCAACTTCAAAGAAGTATCCTGGAAAACCACTACAACACCTAC-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
 E C N E D C N F K E L I L E N H Y N T Y
 -GCATCTGCTAAATGGACCCACAACGGTGGTGAAATGTTGCTTGCTCTGAACCAGAAAGGT-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
 A S A K W T H N G G E M F V A L N Q K G
 -ATCCCGGTTTCGTGGTAAAAAAACCAAAAAAGAACAGAAAACCGCTCACTTCCTGCCGATG-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
 I P V R G K K T K K E Q K T A H F L P M
 -GCAATCACTTAA 3'
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 432
 A I T *

Obr.19

KGF ΔN22

5'ATGCGTTCCTACGACTACATGGAAGGTGGTGACATCCGCGTACGTCGTCGTGTTCTGCCGT-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
 M R S Y D Y M E G G D I R V R R L F C R
 -ACCCAGTGGTACCTGCGTATCGACAAACGCGGCAAAGTCAAGGGCACCCAAGAGATGAAA-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
 T Q W Y L R I D K R G K V K G T Q E M K
 -AACAACTACAATATTATGGAAATCCGTACTGTTGCTGTTGGTATCGTTGCAATCAAAGGT-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
 N N Y N I M E I R T V A V G I V A I K G
 -GTTGAATCTGAATTCTACCTGGCAATGAACAAAGAAGGTAAACTGTACGCAAAAAAAGAA-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
 V E S E F Y L A M N K E G K L Y A K K E
 -TGCAACGAAGACTGCAACTTCAAAGAACTGATCCTGGAAAACCACTACAACACCTACGCA-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
 C N E D C N F K E L I L E N H Y N T Y A
 -TCTGCTAAATGGACCCACAACGGTGGTGAAATGTTGCTGCTCTGAACCAGAAAGGTATC-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
 S A K W T H N G G E M F V A L N Q K G I
 -CCGGTTCGTGGTAAAAAAACCAAAAAAGAACAGAAAACCGCTCACTTCCTGCCGATGGCA-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
 P V R G K K T K K E Q K T A H F L P M A
 -ATCACTTAA 3'
 ----- 429
 I T *

Obr. 20

KGF ΔN23

5' ATGTCCTACGACTACATGGAAGGTGGTGACATCCGCGTACGTCGTCTGTTCTGCCGTACC-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
 M S Y D Y M E G G D I R V R R L F C R T
 -CAGTGGTACCTGCGTATCGACAAACGCGGCAAAGTCAAGGGCACCCAAGAGATGAAAAAC-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
 Q W Y L R I D K R G K V K G T Q E M K N
 -AACTACAATATTATGGAAATCCGTACTGTTGCTGTTGGTATCGTTGCAATCAAAGGTGTT-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
 N Y N I M E I R T V A V G I V A I K G V
 -GAATCTGAATTCTACCTGGCAATGAACAAAGAAGGTAAACTGTACGCAAAAAAGAATGC-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
 E S E F Y L A M N K E G K L Y A K K E C
 -AACGAAGACTGCAACTTCAAAGAACTGATCCTGGAAAACCACTACAACACCTACGCATCT-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
 N E D C N F K E L I L E N H Y N T Y A S
 -GCTAAATGGACCCACAACGGTGGTGAATGTTGCTGCTCTGAACCAGAAAGGTATCCCG -
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
 A K W T H N G G E M F V A L N Q K G I P
 -GTTGCTGGTAAAAAAACCAAAAAGAACAGAAAACCGCTCACTTCCTGCCGATGGCAATC-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
 V R G K K T K K E Q K T A H F L P M A I
 -ACTTAA 3'
 ----- 426
 T *

Obr. 21

KGF ΔN24

5' ATGTACGACTACATGGAAGGTGGTGACATCCGCGTACGTCGTCTGTTCTGCCGTACCCAG-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
 M Y D Y M E G G D I R V R R L F C R T Q
 -TGGTACCTGCGTATCGACAAACGCGGCAAAGTCAAGGGCACCCAAGAGATGAAAAACAAC-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
 W Y L R I D K R G K V K G T Q E M K N N
 -TACAATATTATGGAAATCCGTACTGTTGCTGTTGGTATCGTTGCAATCAAAGGTGTTGAA-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
 Y N I M E I R T V A V G I V A I K G V E
 -TCTGAATTCTACCTGGCAATGAACAAAGAAGGTAAACTGTACGCAAAAAAAGAATGCAAC-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
 S E F Y L A M N K E G K L Y A K K E C N
 -GAAGACTGCAACTTCAAAGAACTGATCCTGGAAAACCACTACAACACCTACGCATCTGCT-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
 E D C N F K E L I L E N H Y N T Y A S A
 -AAATGGACCCACAACGGTGGTGAAATGTTGCTCTGAACCAGAAAGGTATCCCGGTT-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
 K W T H N G G E M F V A L N Q K G I P V
 -CGTGGTAAAAAAACCAAAAAAGAACAGAAAACCGCTCACTTCCTGCCGATGGCAATCACT-
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
 R G K K T K K E Q K T A H F L P M A I T
 -TAA 3'
 --- 423
 *

Obr.22

C(1,15)S/R(144)E

5' ATGTCTAATGATATGACTCCGGAACAGATGGCTACCAACGTTAACTCCTCCTCCCCGGAA-
-----+-----+-----+-----+-----+ 60
M S N D M T P E Q M A T N V N S S S P E
-CGTCACACGCGTTCTTACGACTACATGGAAGGTGGTGACATCCGCGTACGTCGTCTGTTC-
-----+-----+-----+-----+-----+ 120
R H T R S Y D Y M E G G D I R V R R L F
-TGCCGTACCCAGTGGTACCTGCGTATCGACAAACGCGGCAAAGTCAAGGGCACCCAAGAG-
-----+-----+-----+-----+-----+ 180
C R T Q W Y L R I D K R G K V K G T Q E
-ATGAAAAACAACACTACAATATTATGGAAATCCGTACTGTTGCTGTTGGTATCGTTGCAATC-
-----+-----+-----+-----+-----+ 240
M K N N Y N I M E I R T V A V G I V A I
-AAAGGTGTTGAATCTGAATTCTATCTTGCAATGAACAAGGAAGGAAAACCTCTATGCAAAG-
-----+-----+-----+-----+-----+ 300
K G V E S E F Y L A M N K E G K L Y A K
-AAAGAATGCAATGAAGATTGTAACCTTCAAAGAATAATTCTGGAAAACCATTAACAACA-
-----+-----+-----+-----+-----+ 360
K E C N E D C N F K E L I L E N H Y N T
-TATGCATCTGCTAAATGGACCCACAACGGTGGTGAAATGTTTCGTTGCTCTGAACCAGAAA-
-----+-----+-----+-----+-----+ 420
Y A S A K W T H N G G E M F V A L N Q K
-GGTATCCCTGTTGAAGGTAAGAAAACCAAGAAAGAACAGAAAACCGCTCACTTCCTGCCG-
-----+-----+-----+-----+-----+ 480
G I P V E G K K T K K E Q K T A H F L P
-ATGGCAATCACTTAA 3'
-----+----- 495
M A I T *

Obr. 23

KGF C(1,15)S/R(144)Q

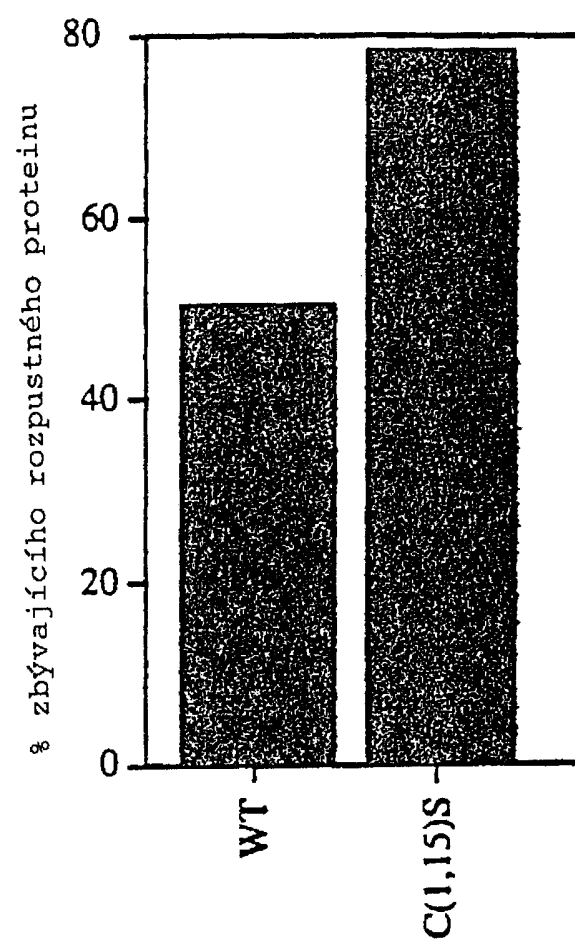
5' ATGTCTAATGATATGACTCCGGAACAGATGGCTACCAACGTTAACTCCTCCTCCCCGGAA-
 -----+-----+ 60
 M S N D M T P E Q M A T N V N S S S P E
 -CGTCACACGCGTTTCCTACGACTACATGGAAGGTGGTGACATCCGCGTACGTCGTCTGTTC-
 -----+-----+ 120
 R H T R S Y D Y M E G G D I R V R R L F
 -TGCCGTACCCAGTGGTACCTGCGTATCGACAAACGCGGCAAAGTCAAGGGCACCCAAGAG-
 -----+-----+ 180
 C R T Q W Y L R I D K R G K V K G T Q E
 -ATGAAAAACAACACTACAATATTATGGAAATCCGTACTGTTGCTGTTGGTATCGTTGCAATC-
 -----+-----+ 240
 M K N N Y N I M E I R T V A V G I V A I
 -AAAGGTGTTGAATCTGAATTCTATCTTGCAATGAACAAGGAAGGAAAACCTCTATGCAAAG-
 -----+-----+ 300
 K G V E S E F Y L A M N K E G K L Y A K
 -AAAGAATGCAATGAAGATTGTAACCTTCAAAGAACTAATTCTGGAAAACCATTACAACACA-
 -----+-----+ 360
 K E C N E D C N F K E L I L E N H Y N T
 -TATGCATCTGCTAAATGGACCCACAACGGTGGTGAATGTTGCTTGTCTGAACCAGAAA-
 -----+-----+ 420
 Y A S A K W T H N G G E M F V A L N Q K
 -GGTATCCCTGTTCAAGGTAAGAAAACCAAGAAAGAACAGAAAACCGCTCACTTCCTGCCG-
 -----+-----+ 480
 G I P V Q G K K T K K E Q K T A H F L P
 -ATGGCAATCACTTAA 3'
 -----+----- 495
 M A I T *

Obr. 24

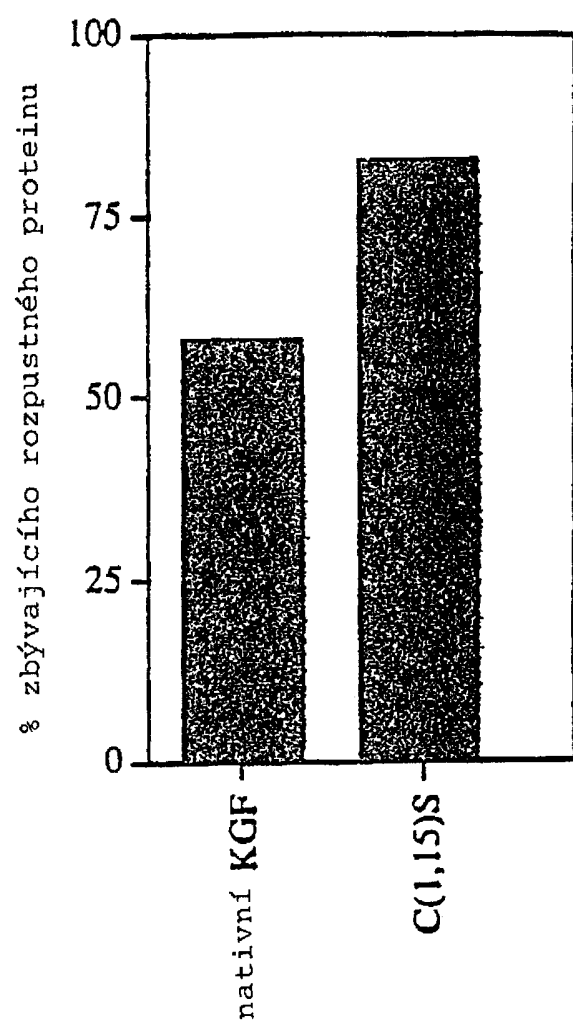
KGF ΔN23/R(144)Q

5' ATGTCCTACGACTACATGGAAGGTGGTGACATCCGCGTACGTCTGTTCTGCCGTACC-
 -----+-----+-----+-----+-----+ 60
 M S Y D Y M E G G D I R V R R L F C R T
 -CAGTGGTACCTGCGTATCGACAAACGCGGCAAAGTCAAGGGCACCCAAGAGATGAAAAAC-
 -----+-----+-----+-----+-----+ 120
 Q W Y L R I D K R G K V K G T Q E M K N
 -AACTACAATATTATGGAAATCCGTACTGTTGCTGTTGGTATCGTTGCAATCAAAGGTGTT-
 -----+-----+-----+-----+-----+ 180
 N Y N I M E I R T V A V G I V A I K G V
 -GAATCTGAATTCTATCTTGCAATGAACAAGGAAGGAAACTCTATGCAAAGAAAGAATGC-
 -----+-----+-----+-----+-----+ 240
 E S E F Y L A M N K E G K L Y A K K E C-
 -AATGAAGATTGTAACCTCAAAGAATAATTCTGGAAAACCATTAACACATATGCATCT-
 -----+-----+-----+-----+-----+ 300
 N E D C N F K E L I L E N H Y N T Y A S
 -GCTAAATGGACCCACAACGGTGGTGAAATGTTGCTGCTCTGAACCAGAAAGGTATCCCT-
 -----+-----+-----+-----+-----+ 360
 A K W T H N G G E M F V A L N Q K G I P
 -GTTCAAGGTAAGAAAACCAAGAAAGAACAGAAAACCGCTCACTTCCTGCCGATGGCAATC-
 -----+-----+-----+-----+-----+ 420
 V Q G K K T K K E Q K T A H F L P M A I
 -ACTTAA 3'
 ----- 426
 T *

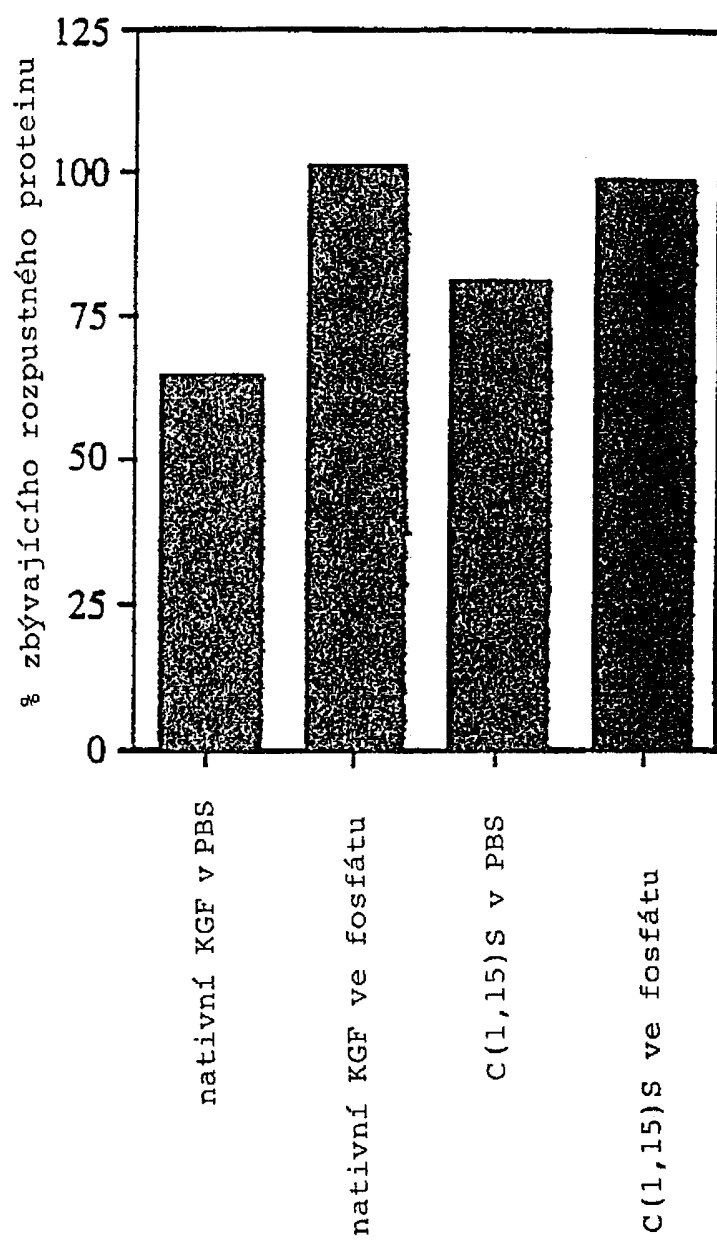
Obr.25



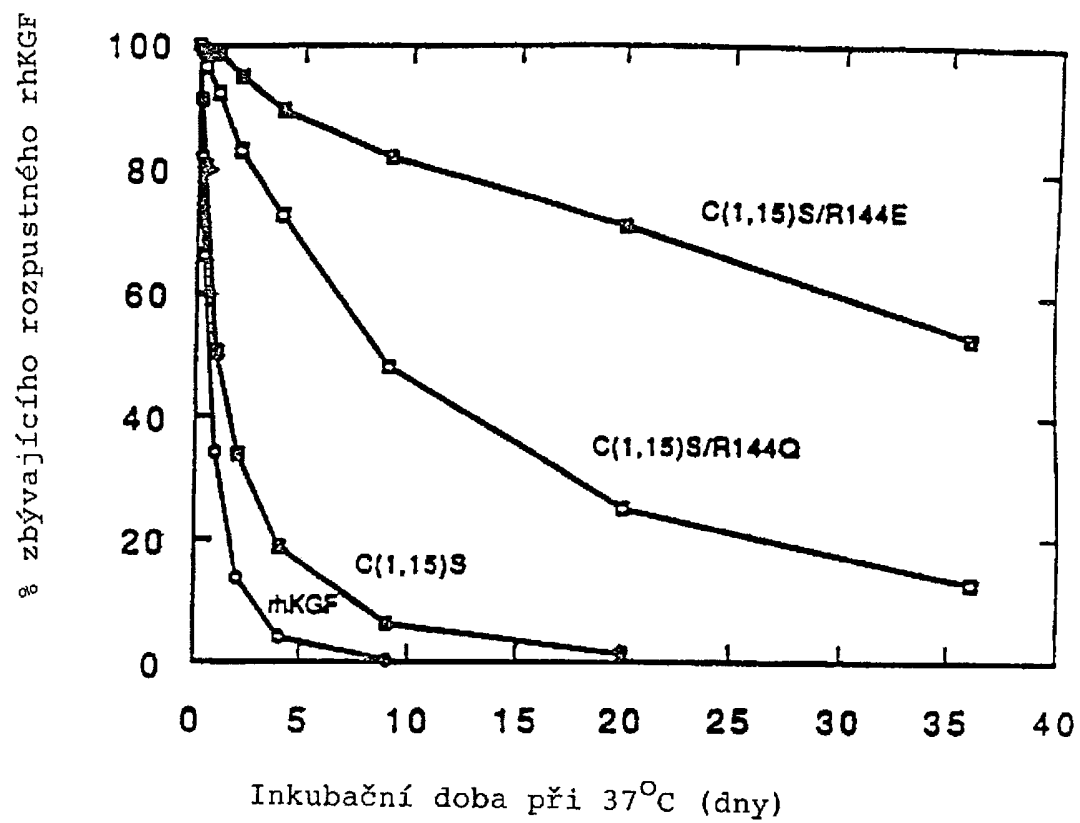
Obr. 26



Obr. 27

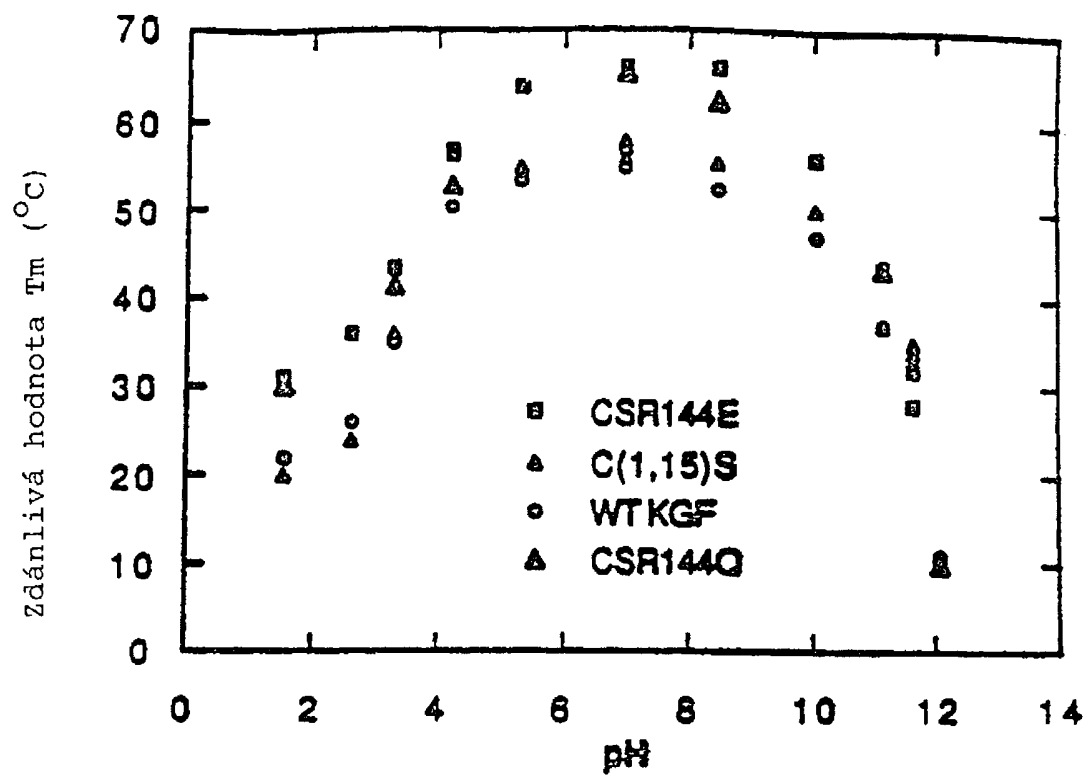


Obr. 28

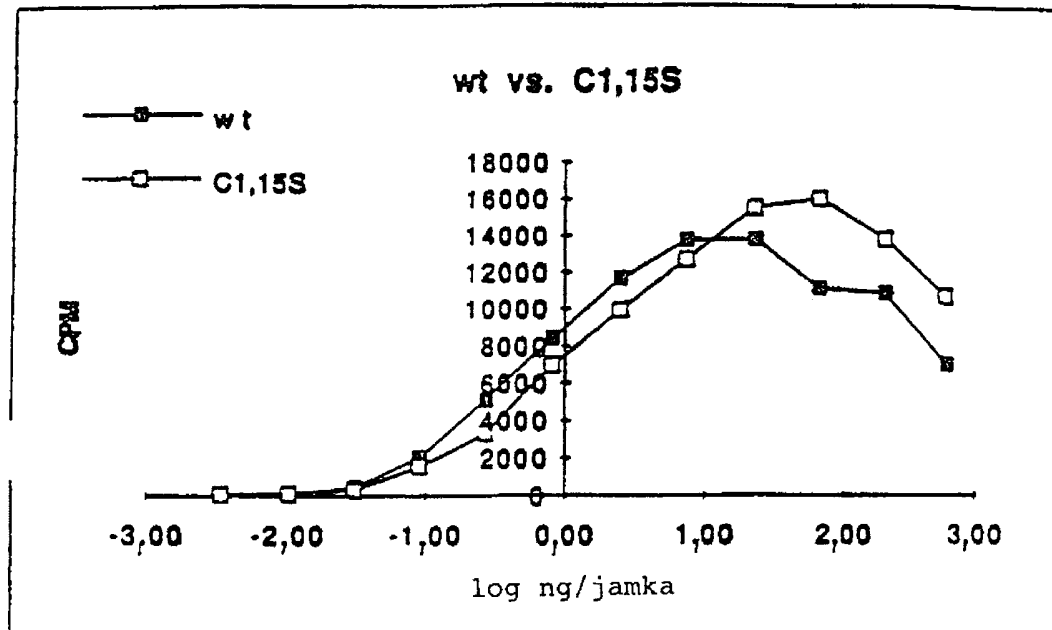


Obr.29

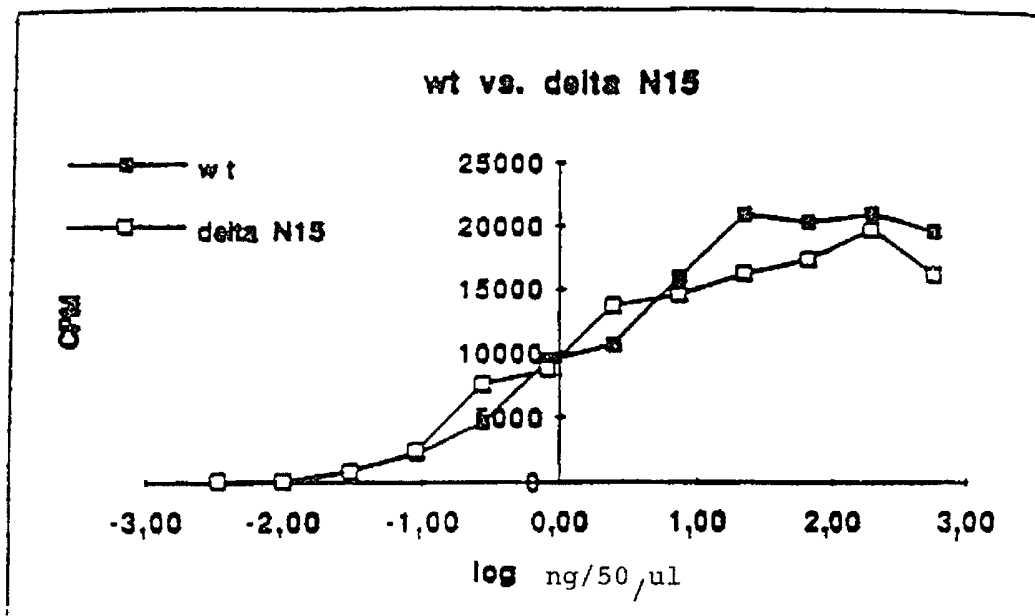
Tepelné rozvinutí KGF analogů



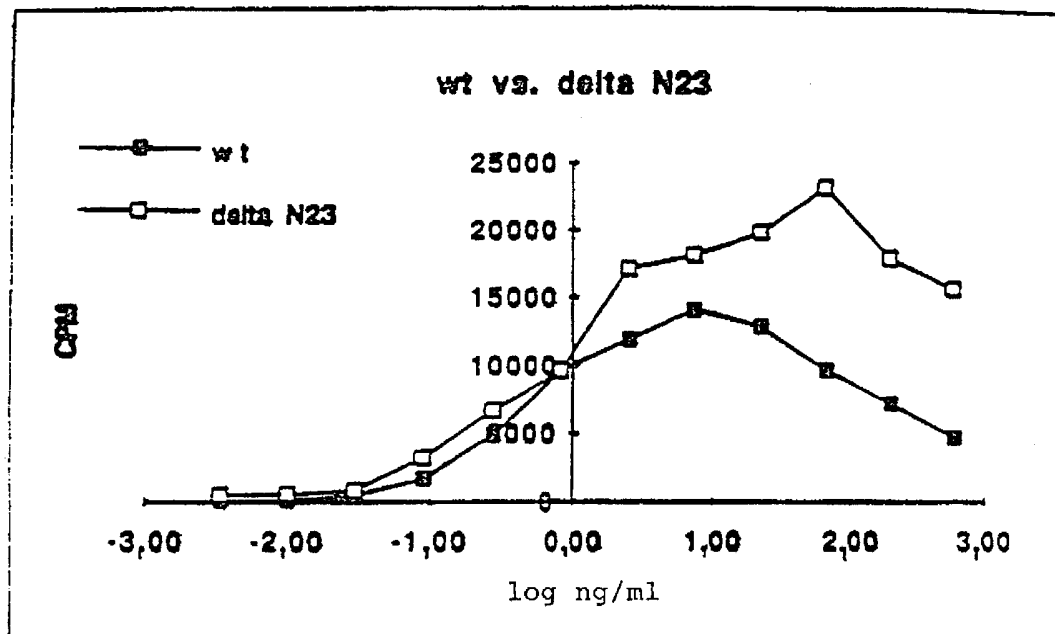
Obr. 30



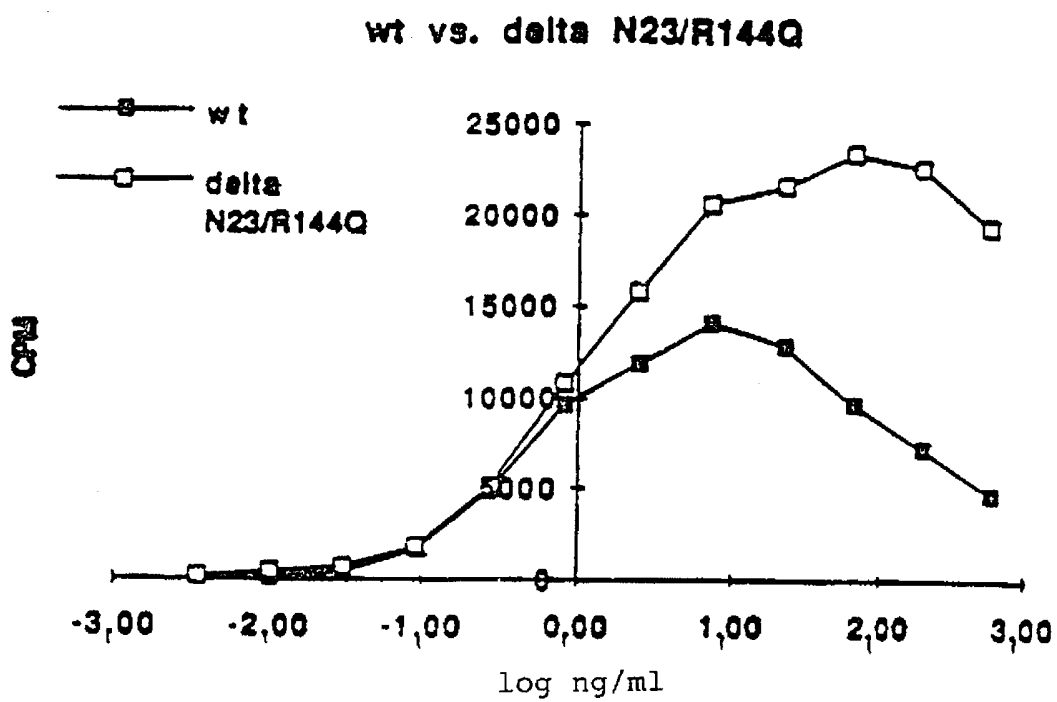
Obr. 31



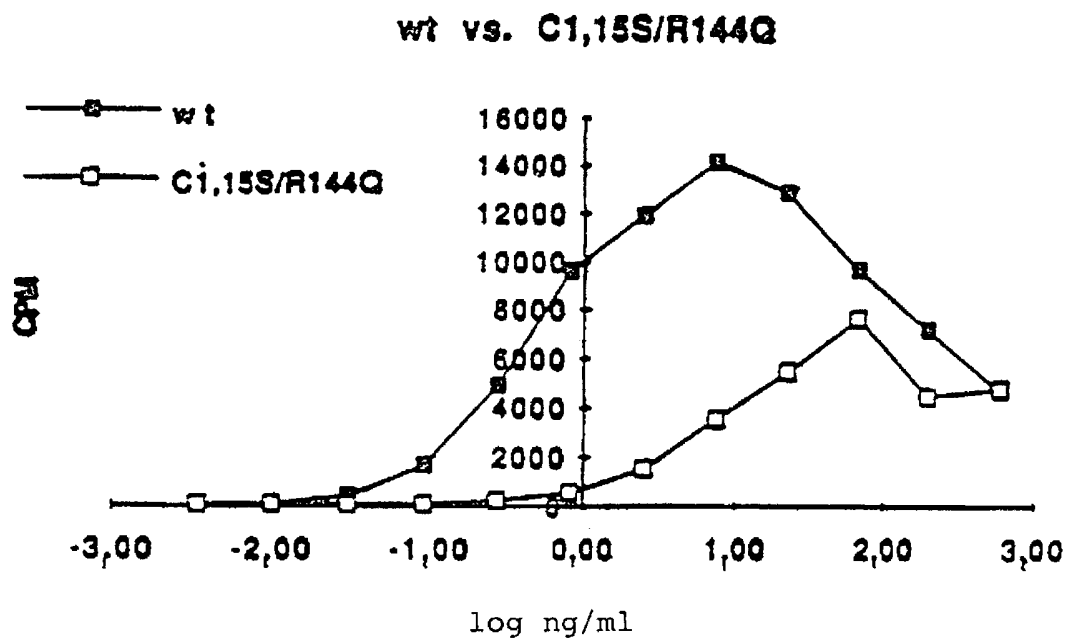
Obr. 32



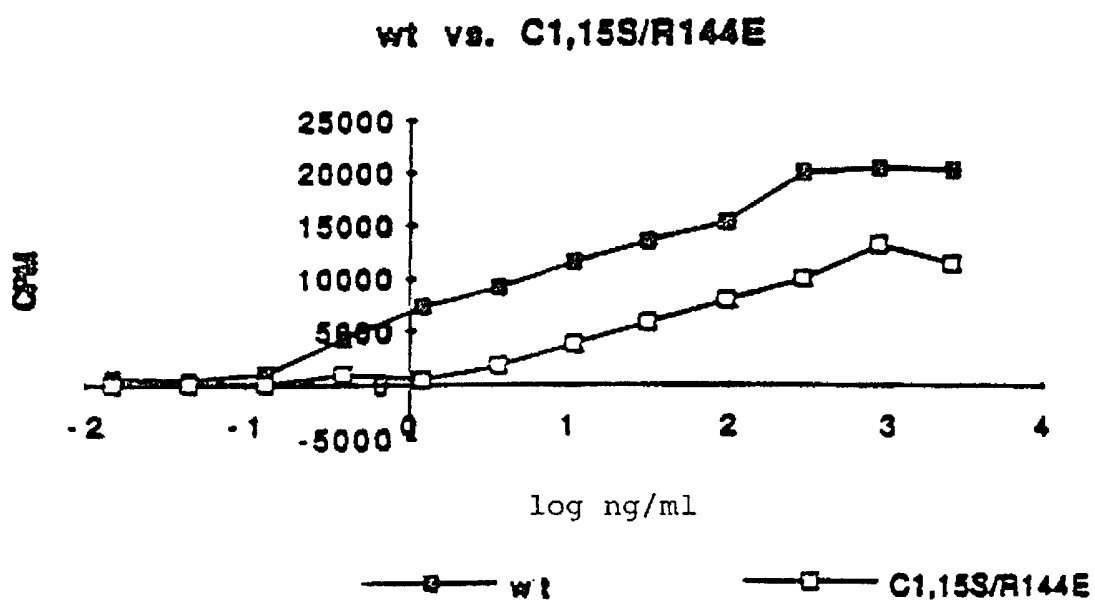
Obr. 33



Obr. 34

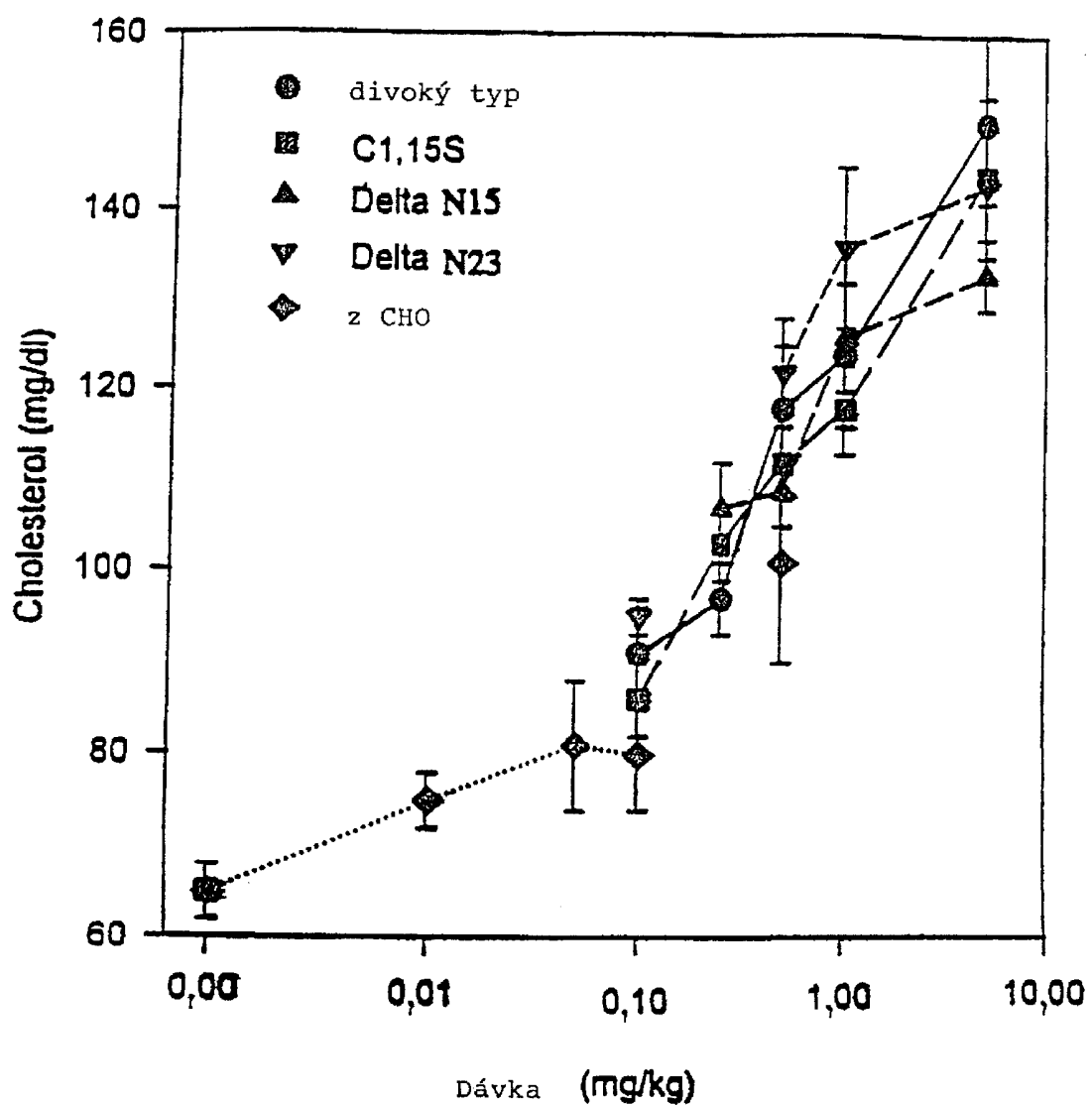


Obr. 35



Obr.36

Účinek KGF na sérový cholesterol



Obr. 37

KGF C1,15,40S

```

1  CTAGAAGGAGGAATAACATATGTCTAATGATATGACTCCGGAACAGATGGCTACCAACGT 60
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   TTCCTCCTTATTGTATACAGATTACTATACTGAGGCCTTGTCTACCGATGGTTGCA
       M S N D M T P E Q M A T N V

61  TAACTCCTCCTCCCCGGAACGTCACACGCGTTCCTACGACTACATGGAAGGTGGTGACAT 120
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   ATTGAGGAGGAGGGGCCTTGCAGTGTGCGCAAGGATGCTGATGTACCTTCCACCACTGTA
       N S S S P E R H T R S Y D Y M E G G D I

121  CCGCGTACGCCGTTTGTCTCTCGTACCCAGTGGTACCTGCGTATCGACAAACGCGGCAA 180
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   GGCGCATGCGGCAACAAGAGAGCATGGGTCAACCATGGACGCATAGCTGTTTGCGCCGTT
       R V R R L F S R T Q W Y L R I D K R G K

181  AGTCAAGGGCACCCCAAGAGATGAAAAACAAC TACAATATTATGGAAATCCGTACTGTTGC 240
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   TCAGTTCCCGTGGGTTCTCTACTTTTTGTTGATGTTATAATACCTTTAGGCATGACAACG
       V K G T Q E M K N N Y N I M E I R T V A

241  TGTGTTGATCGTTGCAATCAAAGGTGTTGAATCTGAATCTATCTTGCAATGAACAAGGA 300
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   ACAACCATAGCAACGTTAGTTTCCACAACCTTAGACTTAAGATAGAACGTTACTTGTTCCT
       V G I V A I K G V E S E F Y L A M N K E

301  AGGAAAACCTCTATGCAAAAGAAAGAATGCAATGAAGATTGTAACCTCAAAGAACTAATTCT 360
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   TCCTTTTGAGATACGTTTCTTTCTTACGTTACTTCTAACATTGAAGTTTCTTGATTAAGA
       G K L Y A K K E C N E D C N F K E L I L

361  GGAAAACCATTAACAACATATGCATCAGCTAAATGGACACACAACGGAGGGGAAATGTT 420
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   CCTTTTGGTAATGTTGTGTATACGTAGTCGATTTACCTGTGTGTTGCCTCCCCCTTTACAA
       E N H Y N T Y A S A K W T H N G G E M F

421  TGTGTCCTTAAATCAAAAGGGGATTCTGTAAAGAGGAAAAAAACGAAGAAAGAACAAAA 480
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   ACAACGGAATTTAGTTTTCCCTAAGGACATTCTCCTTTTTTTTGCTTCTTTCTTGTGTTT
       V A L N Q K G I P V R G K K T K K E Q K

481  AACAGCCCCTTTCTTCCTATGGCAATAACTTAATAG 521
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   TTGTCGGGTGAAAGAAGGATACCGTTATTGAATTATCCTAG
       T A H F L P M A I T * *

```


Obr.38

KGF C1,15,102S

```

1  CTAGAAGGAGGAATAACATATGTCTAATGATATGACTCCGGAACAGATGGCTACCAACGT 60
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      TTCCTCCTTATTGTATACAGATTACTATACTGAGGCCTTGTCTACCGATGGTTGCA
      M S N D M T P E Q M A T N V

61  TAACTCCTCCTCCCCGGAACGTCACACGCGTTTCCTACGACTACATGGAAGGTGGTGACAT 120
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      ATTGAGGAGGAGGGGCCCTTGCAGTGTGCGCAAGGATGCTGATGTACCTTCCACCACTGTA
      N S S S P E R H T R S Y D Y M E G G D I

121  CCGCGTACGTCTGTCTGTTCTGCCGTACCCAGTGGTACCTGCGTATCGACAAACGGCGCAA 180
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      GGCGCATGCAGCAGACAAGACGGCATGGGTACCATGGACGCATAGCTGTTTGGCGCGTT
      R V R R L F C R T Q W Y L R I D K R G K

181  AGTCAAGGGCACCACAGAGATGAAAAACAACCTACAATATTATGGAATCCGTACTGTTGC 240
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      TCAGTTCCCGTGGGTTCTCTACTTTTTGTTGATGTTATAATACCTTTAGGCATGACAACG
      V K G T Q E M K N N Y N I M E I R T V A

241  TGTGTTGATCGTTGCAATCAAAGGTGTTGAATCTGAATTCTACCTGGCTATGAACAAAGA 300
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      ACAACCATAGCAACGTTAGTTTCCACAACCTTAGACTTAAGATGGACCGATACTTGTCTCT
      V G I V A I K G V E S E F Y L A M N K E

301  AGGTAAACTGTACGCTAAAAAAGAATCCAATGAAGATTGTAACCTCAAAGAACTAATTCT 360
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      TCCATTGACATGCGATTTTTTCTTAGGTTACTTCTAACATTGAAGTTTCTTGATTAAGA
      G K L Y A K K E S N E D C N F K E L I L

361  GGAAACCATTACAACACATATGCATCAGCTAAATGGACACACAACGGAGGGGAAATGTT 420
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      CCTTTTGGTAATGTTGTGTATACGTAGTCGATTACCTGTGTGTTGCCTCCCTTTACAA
      E N H Y N T Y A S A K W T H N G G E M F

421  TGTTCCTTAAATCAAAGGGGATTCTGTAAAGAGGAAAAAAACGAAGAAGAACAAAA 480
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      ACAACGGAATTTAGTTTCCCTAAGGACATTCTCCTTTTTTTTGCTTCTTCTTGTGTTT
      V A L N Q K G I P V R G K K T K K E Q K

481  AACAGCCCACCTTCTTCCTATGGCAATAACTTAATAG 521
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      TTGTCGGGTGAAAGAAGGATACCGTTATTGAATTATCCTAG
      T A H F L P M A I T * *

```

Obr. 39

KGF C1,15,102,106S

```

1  CTAGAAGGAGGAATAACATATGTCTAATGATATGACTCCGGAACAGATGGCTACCAACGT 60
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   TTCCTCCTTATTGTATACAGATTACTATACTGAGGCCTTGTCTACCGATGGTTGCA
       M S N D M T P E Q M A T N V

61  TAACTCCTCCTCCCCGGAACGTCACACGCGTTCCTACGACTACATGGAAGGTGGTGACAT 120
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   ATTGAGGAGGAGGGGCCTTGCACTGTGCGCAAGGATGCTGATGTACCTTCCACCACTGTA
       N S S S P E R H T R S Y D Y M E G G D I

121  CCGCGTACGTCGTCTGTTCTGCCGTACCCAGTGGTACCTGCGTATCGACAAACGCGGCAA 180
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   GCGCATGCAGCAGACAAGACGGCATGGGTCCACCATGGACGCATAGCTGTTTGGCCGTT
       R V R R L F C R T Q W Y L R I D K R G K

181  AGTCAAGGGCACCCAAGAGATGAAAAACAACACTACAATATTATGGAAATCCGTACTGTTGC 240
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   TCAGTTCCCGTGGGTTCTCTACTTTTTGTTGATGTTATAATACCTTTAGGCATGACAACG
       V K G T Q E M K N N Y N I M E I R T V A

241  TGTGTTGATCGTTGCAATCAAAGGTGTTGAATCTGAATTCTACCTGGCTATGAACAAAGA 300
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   ACAACCATAGCAACGTTAGTTTCCACAACCTTAGACTTAAGATGGACCGATACTTGTTCCT
       V G I V A I K G V E S E F Y L A M N K E

301  AGGTAAACTGTACGCTAAAAAAGAATCCAATGAAGATTCTAACTTCAAAGAACTAATTCT 360
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   TCCATTTGACATGCGATTTTTTCTTAGGTTACTTCTAAGATTGAAGTTTCTTGATTAAGA
       G K L Y A K K E S N E D S N F K E L I L

361  GGAAAACCATTAACACATATGCATCAGCTAAATGGACACACACACGAGGGGAAATGTT 420
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   CCTTTTGGTAATGTTGTGTATACGTAGTCGATTTACCTGTGTGTTGCCTCCCTTTACAA
       E N H Y N T Y A S A K W T H N G G E M F

421  TGTGTCCTTAAATCAAAGGGGATTCTGTAAGAGGAAAAAAAACGAAGAAAGAACAAAA 480
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   ACAACGGAATTTAGTTTTCCCTAAGGACATTCTCCTTTTTTTTGCTTCTTTCTGTTTT
       V A L N Q K G I P V R G K K T K K E Q K

481  AACAGCCCACTTTCTTCCTATGGCAATAACTTAATAG 521
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   TTGTCGGGTGAAGAAGGATACCGTTATTGAATTATCCTAG
       T A H F L P M A I T * *

```

Obr. 40

ΔN23/N(137)E

5' -ATGTCCTACGACTACATGGAAGGTGGTGACATCCGCGTACGTCGTCTGTTCTGCCGTACC-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 M S Y D Y M E G G D I R V R R L F C R T -
 -CAGTGGTACCTGCGTATCGACAAACGCGGCAAAGTCAAGGGCACCCAAGAGATGAAAAAC-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 Q W Y L R I D K R G K V K G T Q E M K N -
 -AACTACAATATTATGGAAATCCGTACTGTTGCTGTTGGTATCGTTGCAATCAAAGGTGTT-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 N Y N I M E I R T V A V G I V A I K G V -
 -GAATCTGAATTCTACCTGGCAATGAACAAAGAAGGTAAACTGTACGCAAAAAAAGAATGC-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 E S E F Y L A M N K E G K L Y A K K E C -
 -AACGAAGACTGCAACTTCAAAGAACTGATCCTGGAAAACCACTACAACACCTACGCATCT-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 N E D C N F K E L I L E N H Y N T Y A S -
 -GCTAAATGGACCCACAACGGTGGTGAAATGTTGCTGCTCTGGAACAGAAAGGTATCCCT-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 A K W T H N G G E M F V A L E Q K G I P -
 -GTTGCTGGTAAGAAAACCAAGAAAGAACAGAAAACCGCTCACTTCCTGCCGATGGCAATC-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 V R G K K T K K E Q K T A H F L P M A I -
 -ACTTAA-3'
 +-----
 T *

Obr. 41

ΔN23/K(139)E

```

5' -ATGTCCTACGACTACATGGAAGGTGGTGACATCCGCGTACGTCTGTTCTGCCGTACC-
+-----+-----+-----+-----+-----+
M S Y D Y M E G G D I R V R R L F C R T -
-CAGTGGTACCTGCGTATCGACAAACGCGGCAAAGTCAAGGGCACCCAAGAGATGAAAAAC
+-----+-----+-----+-----+-----+
Q W Y L R I D K R G K V K G T Q E M K N -
-AACTACAATATTATGGAAATCCGTACTGTTGCTGTTGGTATCGTTGCAATCAAAGGTGTT-
+-----+-----+-----+-----+-----+
N Y N I M E I R T V A V G I V A I K G V -
-GAATCTGAATTCTACCTGGCAATGAACAAAGAAGGTAAACTGTACGCAAAAAAAGAATGC-
+-----+-----+-----+-----+-----+
E S E F Y L A M N K E G K L Y A K K E C -
-AACGAAGACTGCAACTTCAAAGAAGTATCCTGGAAAACCACTACAACACCTACGCATCT
+-----+-----+-----+-----+-----+
N E D C N F K E L I L E N H Y N T Y A S -
-GCTAAATGGACCCACAACGGTGGTGAATGTTGCTGCTCTGAACCAGGAAGGTATCCCT-
+-----+-----+-----+-----+-----+
A K W T H N G G E M F V A L N Q E G I P -
-GTTCGTGGTAAGAAAACCAAGAAAGAACAGAAAACCGCTCACTTCCTGCCGATGGCAATC-
+-----+-----+-----+-----+-----+
V R G K K T K K E Q K T A H F L P M A I -
-ACTTAA-3'
+-----
T *
```

Obr. 42

 Δ N23/K(139)Q

5' -ATGTCCTACGACTACATGGAAGGTGGTGACATCCGCGTACGTCGTCTGTTCTGCCGTACC-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 M S Y D Y M E G G D I R V R R L F C R T -
 -CAGTGGTACCTGCGTATCGACAAACGCGGCAAAGTCAAGGGCACCCAAGAGATGAAAAAC-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 Q W Y L R I D K R G K V K G T Q E M K N -
 -AACTACAATATTATGGAAATCCGTACTGTTGCTGTTGGTATCGTTGCAATCAAAGGTGTT-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 N Y N I M E I R T V A V G I V A I K G V -
 -GAATCTGAATTCTACCTGGCAATGAACAAAGAAGGTAAACTGTACGCAAAAAAAGAATGC-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 E S E F Y L A M N K E G K L Y A K K E C -
 -AACGAAGACTGCAACTTCAAAGAAGTATCCTGGAAAACCACTACAACACCTACGCATCT-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 N E D C N F K E L I L E N H Y N T Y A S -
 -GCTAAATGGACCCACAACGGTGGTGAAATGTTGCTGCTCTGAACCAGCAAGGTATCCCT-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 A K W T H N G G E M F V A L N Q Q G I P -
 -GTTTCGTGGTAAGAAAACCAAGAAAGAACAGAAAACCGCTCACTTCCTGCCGATGGCAATC-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 V R G K K T K K E Q K T A H F L P M A I -
 -ACTTAA-3'
 +-----+
 T *

Obr. 43

 Δ N23/R(144)A

5' -ATGTCCTACGACTACATGGAAGGTGGTGACATCCGCGTACGTCTGTTCTGCCGTACC-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 M S Y D Y M E G G D I R V R R L F C R T -
 -CAGTGGTACCTGCGTATCGACAAACGCGGCAAAGTCAAGGGCACCCAAGAGATGAAAAAC-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 Q W Y L R I D K R G K V K G T Q E M K N -
 -AACTACAATATTATGGAAATCCGTA CTGTTGCTGTTGGTATCGTTGCAATCAAAGGTGTT-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 N Y N I M E I R T V A V G I V A I K G V -
 -GAATCTGAATTCTACCTGGCAATGAACAAAGAAGGTAAACTGTACGCAAAAAAAGAATGC-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 E S E F Y L A M N K E G K L Y A K K E C -
 -AACGAAGACTGCAACTTCAAAGAACTGATCCTGGAAAACCACTACAACACCTACGCATCT-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 N E D C N F K E L I L E N H Y N T Y A S -
 -GCTAAATGGACCCACAACGGTGGTGAAATGTTTCGTTGCTCTGAACCAGAAAGGTATCCCT-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 A K W T H N G G E M F V A L N Q K G I P -
 -GTTGCTGGTAAGAAAACCAAGAAAGAACAGAAAACCGCTCACTTCCTGCCGATGGCAATC-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 V A G K K T K K E Q K T A H F L P M A I -
 -ACTTAA-3'
 +-----+
 T *

Obr. 44

 $\Delta N23/R(144)E$

5' -ATGTCCTACGACTACATGGAAGGTGGTGACATCCGCGTACGTCGTCTGTTCTGCCGTACC-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 M S Y D Y M E G G D I R V R R L F C R T -
 -CAGTGGTACCTGCGTATCGACAAACGCGGCAAAGTCAAGGGCACCCAAGAGATGAAAAAC-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 Q W Y L R I D K R G K V K G T Q E M K N -
 -AACTACAATATTATGGAAATCCGTACTGTTGCTGTTGGTATCGTTGCAATCAAAGGTGTT-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 N Y N I M E I R T V A V G I V A I K G V -
 -GAATCTGAATTCTATCTTGCAATGAACAAGGAAGGAAAACCTCTATGCAAAGAAAGAATGC-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 E S E F Y L A M N K E G K L Y A K K E C -
 -AATGAAGATTGTAACCTCAAAGAAGTAATTCTGGAAAACCATACACACATATGCATCT-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 N E D C N F K E L I L E N H Y N T Y A S -
 -GCTAAATGGACCCACAACGGTGGTGAAATGTTGCTCTGAACCAGAAAGGTATCCCT-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 A K W T H N G G E M F V A L N Q K G I P -
 -GTTGAAGGTAAGAAAACCAAGAAAGAACAGAAAACCGCTCACTTCCTGCCGATGGCAATC-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 V E G K K T K K E Q K T A H F L P M A I -
 -ACTTAA-3'
 +-----
 T *

Obr. 45

 Δ N23/R(144)L

5' -ATGTCCTACGACTACATGGAAGGTGGTGACATCCGCGTACGTCGTCTGTTCTGCCGTACC-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 M S Y D Y M E G G D I R V R R L F C R T -
 -CAGTGGTACCTGCGTATCGACAAACGCGGCAAAGTCAAGGGCACCCAAGAGATGAAAAAC-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 Q W Y L R I D K R G K V K G T Q E M K N -
 -AACTACAATATTATGGAAATCCGTACTGTTGCTGTTGGTATCGTTGCAATCAAAGGTGTT-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 N Y N I M E I R T V A V G I V A I K G V -
 -GAATCTGAATTCTACCTGGCAATGAACAAAGAAGGTAAACTGTACGCAAAAAAAGAATGC-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 E S E F Y L A M N K E G K L Y A K K E C -
 -AACGAAGACTGCAACTTCAAAGAACTGATCCTGGAAAACCACTACAACACCTACGCATCT-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 N E D C N F K E L I L E N H Y N T Y A S -
 -GCTAAATGGACCCACAACGGTGGTGAAATGTTGCTGCTCTGAACCAGAAAGGTATCCCT-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 A K W T H N G G E M F V A L N Q K G I P -
 -GTTCTGGGTAAGAAAACCAAGAAAGAACAGAAAACCGCTCACTTCCTGCCGATGGCAATC-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 V L G K K T K K E Q K T A H F L P M A I -
 -ACTTAA-3'
 +-----+
 T *

Obr. 46

ΔN23/K(147)E

```

5' -ATGTCCTACGACTACATGGAAGGTGGTGACATCCGCGTACGTCGTCTGTTCTGCCGTACC-
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
M S Y D Y M E G G D I R V R R L F C R T -
-CAGTGGTACCTGCGTATCGACAAACGCGGCAAAGTCAAGGGCACCCAAGAGATGAAAAAC-
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Q W Y L R I D K R G K V K G T Q E M K N -
-AACTACAATATTATGGAAATCCGTACTGTTGCTGTTGGTATCGTTGCAATCAAAGGTGTT-
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
N Y N I M E I R T V A V G I V A I K G V -
-GAATCTGAATTCTACCTGGCAATGAACAAAGAAGGTAAACTGTACGCAAAAAAAGAATGC-
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
E S E F Y L A M N K E G K L Y A K K E C -
-AACGAAGACTGCAACTTCAAAGAACTGATCCTGGAAAACCACTACAACACCTACGCATCT-
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
N E D C N F K E L I L E N H Y N T Y A S -
-GCTAAATGGACCCACAACGGTGGTGAAATGTTGCTGCTGAACCAGAAAGGTATTCCT-
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
A K W T H N G G E M F V A L N Q K G I P -
-GTTCGTGGTAAGGAAACCAAGAAAGAACAGAAAACCGCTCAC'ITCCTGCCGATGGCAATC-
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
V R G K E T K K E Q K T A H F L P M A I -
-ACTTAA-3'
+-----+
T *
```

Obr. 47

ΔN23/K(147)Q

```

5' -ATGTCCTACGACTACATGGAAGGTGGTGACATCCGCGTACGTCGTCTGTTCTGCCGTACC-
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
M S Y D Y M E G G D I R V R R L F C R T -
-CAGTGGTACCTGCGTATCGACAAACGCGGCAAAGTCAAGGGCACCCAAGAGATGAAAAAC-
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Q W Y L R I D K R G K V K G T Q E M K N -
-AACTACAATATTATGGAAATCCGTACTGTTGCTGTTGGTATCGTTGCAATCAAAGGTGTT-
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
N Y N I M E I R T V A V G I V A I K G V -
-GAATCTGAATTCTACCTGGCAATGAACAAAGAAGGTAAACTGTACGCAAAAAAAGAATGC-
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
E S E F Y L A M N K E G K L Y A K K E C -
-AACGAAGACTGCAACTTCAAAGAACTGATCCTGGAAAACCACTACAACACCTACGCATCT-
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
N E D C N F K E L I L E N H Y N T Y A S -
-GCTAAATGGACCCACAACGGTGGTGAATGTTCGTTGCTCTGAACCAGAAAGGTATCCCT-
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
A K W T H N G G E M F V A L N Q K G I P -
-GTTCGTGGTAAGCAAACCAAGAAAGAACAGAAAACCGCTCACTTCCTGCCGATGGCAATC-
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
V R G K Q T K K E Q K T A H F L P M A I -
-ACTTAA-3'
+-----+
T *
```

Obr. 48

 Δ N23/K(153)E

5'-ATGTCCTACGACTACATGGAAGGTGGTGACATCCGCGTACGTCGTCTGTTCTGCCGTACC-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 M S Y D Y M E G G D I R V R R L F C R T -
 -CAGTGGTACCTGCGTATCGACAAACGCGGCAAAGTCAAGGGCACCCAAGAGATGAAAAAC-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 Q W Y L R I D K R G K V K G T Q E M K N -
 -AACTACAATATTATGGAAATCCGTACTGTTGCTGTTGGTATCGTTGCAATCAAAGGTGTT-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 N Y N I M E I R T V A V G I V A I K G V -
 -GAATCTGAATTCTACCTGGCAATGAACAAAGAAGGTAAACTGTACGCAAAAAAAGAATGC-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 E S E F Y L A M N K E G K L Y A K K E C -
 -AACGAAGACTGCAACTTCAAAGAACTGATCCTGGAAAACCACTACAACACCTACGCATCT-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 N E D C N F K E L I L E N H Y N T Y A S -
 -GCTAAATGGACCCACAACGGTGGTGAATGTTGCTTGCTCTGAACCAGAAAGGTATCCCT-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 A K W T H N G G E M F V A L N Q K G I P -
 -GTTTCGTGGTAAGAAAACCAAGAAAGAACAGGAAACCGCTCACTTCCTGCCGATGGCAATC-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 V R G K K T K K E Q E T A H F L P M A I -
 -ACTTAA-3'
 +-----+
 T *

Obr. 49

 Δ N23/K(153)Q

```

5' -ATGTCCTACGACTACATGGAAGGTGGTGACATCCGCGTACGTCGTCTGTTCTGCCGTACC-
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
M S Y D Y M E G G D I R V R R L F C R T -
- CAGTGGTACCTGCGTATCGACAAACGCGGCAAAGTCAAGGGCACCCAAGAGATGAAAAAC-
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Q W Y L R I D K R G K V K G T Q E M K N -
- AACTACAATATTATGGAAATCCGTACTGTTGCTGTTGGTATCGTTGCAATCAAAGGTGTT-
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
N Y N I M E I R T V A V G I V A I K G V -
- GAATCTGAATTCTACCTGGCAATGAACAAAGAAGGTAAACTGTACGCAAAAAAGAATGC-
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
E S E F Y L A M N K E G K L Y A K K E C -
- AACGAAGACTGCAACTTCAAAGAACTGATCCTGGAAAACCACTACAACACCTACGCATCT-
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
N E D C N F K E L I L E N H Y N T Y A S -
- GCTAAATGGACCCACAACGGTGGTGAAATGTTGCTGCTCTGAACCAGAAAGGTATCCCT-
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
A K W T H N G G E M F V A L N Q K G I P -
- GTTCGTGGTAAGAAAACCAAGAAAGAACAGCAAACCGCTCACTTCCTGCCGATGGCAATC-
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
V R G K K T K K E Q Q T A H F L P M A I -
- ACTTAA-3'
+-----+
T * -

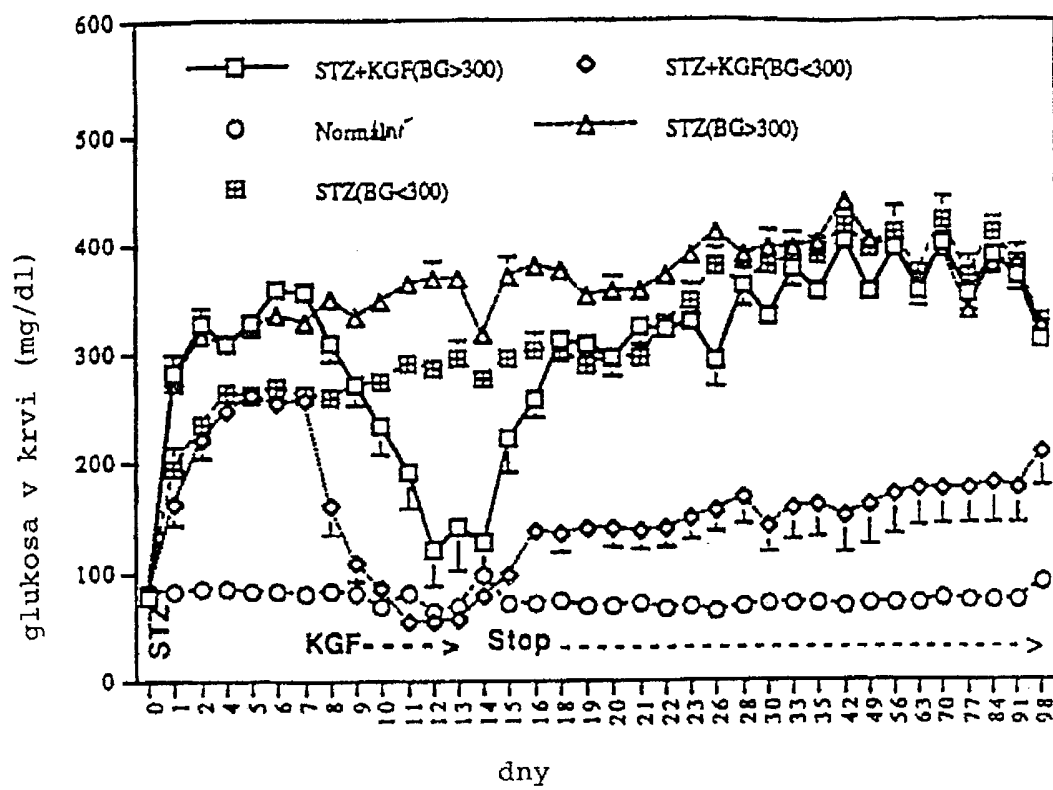
```

Obr. 50

 $\Delta N23/Q(152)E/K(153)E$

5' -ATGTCCTACGACTACATGGAAGGTGGTGACATCCGCGTACGTCGTCTGTTCTGCCGTACC-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 M S Y D Y M E G G D I R V R R L F C R T -
 -CAGTGGTACCTGCGTATCGACAAACGCGGCAAAGTCAAGGGCACCCAAGAGATGAAAAAC-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 Q W Y L R I D K R G K V K G T Q E M K N -
 -AACTACAATATTATGGAAATCCGTACTGTTGCTGTTGGTATCGTTGCAATCAAAGGTGTT-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 N Y N I M E I R T V A V G I V A I K G V -
 -GAATCTGAATTCTACCTGGCAATGAACAAAGAAGGTAAACTGTACGCAAAAAAAGAATGC-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 E S E F Y L A M N K E G K L Y A K K E C -
 -AACGAAGACTGCAACTTCAAAGAACTGATCCTGGAAAACCACTACAACACCTACGCATCT-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 N E D C N F K E L I L E N H Y N T Y A S -
 -GCTAAATGGACCCACAACGGTGGTGAAATGTTTCGTTGCTCTGAACCAGAAAGGTATCCCT-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 A K W T H N G G E M F V A L N Q K G I P -
 -GTTTCGTGGTAAGAAAACCAAGAAAGAAGAGGAAACCGCTCACTTCCTGCCGATGGCAATC-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 V R G K K T K K E E E T A H F L P M A I -
 -ACTTAA-3'
 +-----+
 T *

Obr. 51



Konec dokumentu