

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-523795

(P2008-523795A)

(43) 公表日 平成20年7月10日(2008.7.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 2 4
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08 Z N A	4 B 0 6 4
C O 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46	4 C O 8 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 Y	4 H O 4 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 75 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2007-546119 (P2007-546119)	(71) 出願人	505045610
(86) (22) 出願日	平成17年12月15日 (2005.12.15)		サントル ナショナル ドゥ ラ ルシェ
(85) 翻訳文提出日	平成19年7月20日 (2007.7.20)		ルシュ スィヤンティフィック (セーエヌ
(86) 国際出願番号	PCT/FR2005/003151		エルエス)
(87) 国際公開番号	W02006/064136		CENTRE NATIONAL DE
(87) 国際公開日	平成18年6月22日 (2006.6.22)		LA RECHERCHE SCIENT
(31) 優先権主張番号	0413433		IFIQUE (CNRS)
(32) 優先日	平成16年12月16日 (2004.12.16)		フランス国 F-75794 パリ セデ
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		ックス 16 リュ ミッシュル-アンジ
			ユ 3

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗体フォーマットの生産および前記抗体フォーマットの免疫学的用途

(57) 【要約】

本発明は抗体フォーマットに関し、該抗体フォーマットは、V H Hまたはヒト化V H HまたはヒトV Hドメインの全体または一部がヒト抗体の定常領域に融合されていることを特徴とする。本発明はさらに、前記抗体フォーマットの免疫診断および免疫治療における用途に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

V H H またはヒト化 V H H またはヒト V H ドメインの全体または一部がヒト抗体の定常領域に融合されていることを特徴とする抗体フォーマット。

【請求項 2】

前記抗体フォーマットは F a b タイプであり、2つの同一もしくは異なる V H H ドメインまたは2つのヒト V H ドメイン、あるいは V H H の C D R が移植された2つのヒト V H ドメインが結合したものであり、該ドメインのうち的一方がヒト免疫グロブリンの定常領域 C または C に融合し、他方がヒト免疫グロブリンの定常領域 C H 1 に融合していることを特徴とする、請求項 1 に記載の抗体フォーマット。

10

【請求項 3】

前記抗体フォーマットは F a b ' タイプであり、2つの同一もしくは異なる V H H ドメインまたは2つのヒト V H ドメイン、あるいは V H H の C D R が移植された2つのヒト V H ドメインが結合したものであり、該ドメインのうち的一方がヒト免疫グロブリンの定常領域 C または C に融合し、他方がヒト免疫グロブリンの定常領域 C H 1 および後続するヒンジ領域 H に融合していることを特徴とする、請求項 1 に記載の抗体フォーマット。

【請求項 4】

前記抗体フォーマットは F (a b ')₂ タイプであり、請求項 3 に記載の F a b ' タイプの2つの抗体フォーマットが結合したものである、請求項 1 に記載の抗体フォーマット。

20

【請求項 5】

前記抗体フォーマットは F (a b ')₂ タイプであり、前記 F (a b ')₂ タイプのフォーマットを還元して得られた2つの同一もしくは異なる F a b ' が結合したものである、請求項 4 に記載の抗体フォーマット。

【請求項 6】

前記抗体フォーマットは (H C H 2 C H 3)₂ タイプであり、H はヒト免疫グロブリンのヒンジ領域を表し、C H 2 および C H 3 はヒト I g の二番目および三番目のドメインを表し、前記抗体フォーマットは、2つの同一の V H H またはヒト V H、あるいは V H H の超可変領域が移植された2つのヒト V H が結合したものであって、各々がヒトの I g G または他の任意の I g の H - C H 2 - C H 3 領域に融合されていることを特徴とする、請求項 1 に記載の抗体フォーマット。

30

【請求項 7】

前記抗体フォーマットは m A b * タイプであり、2つの同一もしくは異なる V H H または2つのヒト V H、あるいは V H H の超可変領域が移植された2つのヒト V H が結合したものであって、一方がヒトの C または C 領域に融合し、他方がヒト I g の C H 1 - H - C H 2 - C H 3 領域に融合していることを特徴とする、請求項 1 に記載の抗体フォーマット。

【請求項 8】

免疫グロブリンは、ヒトのアイソフォーム I g G 1、I g G 2、I g G 3 または I g G 4 に相当する I g G、あるいはアイソフォーム I g A 1、I g A 2 に相当するヒトの I g A である、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体フォーマット。

40

【請求項 9】

V H H は、ヒト V H、または V H H からヒト V H 上への C D R の移植によるヒト化 V H H で置き換えられている、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の抗体フォーマット。

【請求項 10】

前記抗体フォーマットは抗 C D 1 6 または抗 C E A 抗体フラグメントを含んでなり、前記フラグメントはそれぞれ、S E Q I D N o . 7 3、S E Q I D N o . 7 4、S E Q I D N o . 7 5、S E Q I D N o . 7 6、S E Q I D N o . 1 0 3 および S E Q I D N o . 1 0 4 の配列または S E Q I D N o . 7 7、S E Q I D

50

No. 78、SEQ ID No. 79、SEQ ID No. 80およびSEQ ID No. 105の配列からなる群から選択されたアミノ酸配列に従うことを特徴とする、請求項1～9のいずれか1項に記載の抗体フォーマット。

【請求項11】

ラクダ科、特にラマ由来のVHH抗体のフラグメントであって、前記フラグメントは抗CD16または抗CEA抗体フラグメントで構成されており、前記フラグメントはそれぞれ、SEQ ID No. 73、SEQ ID No. 74、SEQ ID No. 75、SEQ ID No. 76、SEQ ID No. 103およびSEQ ID No. 104の配列またはSEQ ID No. 77、SEQ ID No. 78、SEQ ID No. 79、SEQ ID No. 80およびSEQ ID No. 105の配列からなる群から選択されたアミノ酸配列に従うか、あるいは、SEQ ID No. 81、SEQ ID No. 82、SEQ ID No. 83、SEQ ID No. 84、SEQ ID No. 106およびSEQ ID No. 107の配列またはSEQ ID No. 85、SEQ ID No. 86、SEQ ID No. 87、SEQ ID No. 88およびSEQ ID No. 108の配列からなる群から選択されたヌクレオチド配列に従うことを特徴とする抗体フラグメント。

10

【請求項12】

VHHのCDRで構成されることを特徴とする、請求項11に記載の抗体フラグメント。

【請求項13】

キメラ化またはヒト化された、多重特異性または多価のうち少なくともいずれか一方である抗体を生産する方法であって、請求項1～10のいずれか1項に記載の抗体フォーマットを使用することを含む、方法。

20

【請求項14】

前記抗体フォーマットは、ラクダ科、特にラマ由来の抗CEAおよび抗CD16 VHHを含んでなる、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

前記抗CEAおよび抗CD16 VHHの可変ドメインが、

- ラクダ科動物、特にラマを、免疫原としてCEAまたはCD16を用いて免疫することと、
- 血液から得られたBリンパ球を精製することと、
- VHHバンクを構築することと、
- 該バンクからVHHを単離することと

を含むプロトコールによって有利に生産されることを特徴とする、請求項14に記載の方法。

30

【請求項16】

前記バンクの構築は、

- Bリンパ球からの全RNAの抽出と、
- 対応するcDNAを得るためのRNAの逆転写と、
- 一本鎖重鎖の抗CD16および抗CEA抗体の可変領域をコードする遺伝子のPCRによる増幅と、
- フェージミドで増幅させたDNAの酵素切断によって得られたVHH DNAフラグメントのライゲーションと

を含む、請求項15に記載の方法。

40

【請求項17】

VHHはフェージディスプレイ技術によってバンクから単離され、精製される、請求項15または16に記載の方法。

【請求項18】

選択されたVHHの遺伝子を、発現ベクター、特にプラスミドに導入し、請求項1～10のいずれか1項に記載の抗体フォーマットを生産する、請求項15～17のいずれか1

50

項に記載の方法。

【請求項 19】

請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の抗体フォーマットの発現ベクター、特にプラスミドであって、2 つのユニークな制限酵素切断部位の間に、プロモータと、シグナル配列と、前記抗体フォーマットをコードしうるヌクレオチド配列とを含んでなることを特徴とする発現ベクター。

【請求項 20】

SEQ ID No. 98 および SEQ ID No. 112 の配列のプラスミド pC CH1 1 - TAG ならびに SEQ ID No. 100 および SEQ ID No. 114 の配列のプラスミド pC CH1 1 であって、請求項 2 に記載の Fab タイプの抗体の生産を可能にするプラスミド。

10

【請求項 21】

SEQ ID No. 99 および SEQ ID No. 113 の配列のプラスミド pC CH1H 1 - TAG ならびに SEQ ID No. 101 および SEQ ID No. 115 の配列のプラスミド pC CH1H 1 であって、請求項 3 および 4 に記載の Fab' または F(ab')₂ タイプの抗体の生産を可能にするプラスミド。

【請求項 22】

SEQ ID No. 95 の配列のプラスミド pHCH2CH3 1 - TAG ならびに SEQ ID No. 96 の配列のプラスミド pHCH2CH3 1 であって、請求項 6 に記載の (HCH2CH3)₂ タイプの抗体の生産を可能にするプラスミド。

20

【請求項 23】

SEQ ID No. 102 および SEQ ID No. 116 の配列のプラスミド pMab 1* であって、請求項 7 に記載の mAb* タイプの抗体の生産を可能にするプラスミド。

【請求項 24】

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の抗体フォーマットのうち少なくとも 1 つを含んでなる医薬組成物。

【請求項 25】

インビトロの免疫診断法であって、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の抗体フォーマットを使用することを含む方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗体フォーマットの生産およびそれらの免疫学的用途、より具体的には免疫療法および免疫診断における用途に関する。

【背景技術】

【0002】

本発明者らは、抗体分子は 5 つのクラス、すなわち：IgM、IgG、IgD、IgE および IgA に属する免疫グロブリン (Ig) であると認識している。一般に、これらの分子は重鎖 (H) と、鎖 () または鎖 () のいずれかである軽鎖 (L) とを含んでなる。

40

【0003】

各クラスの免疫グロブリンは特定のタイプの重鎖、すなわち IgM は μ 鎖、IgG は鎖、IgD は鎖、IgE は鎖、および IgA は鎖を含む。

各鎖は、それぞれ内部にジスルフィド結合を備えたドメインより形成される。軽鎖は 2 つのドメインを有し、重鎖は 4 つのドメインを有する。各鎖のアミノ末端を含むドメインの配列は可变的であり (VH および VL 領域)、他のドメインの配列は一定である (重鎖の CH1、CH2、および CH3、ならびに軽鎖の CL)。

【0004】

可変領域 V は、ともに相補性を決定する CDR と呼ばれる超可変配列の領域を含む。

50

重鎖では、最初の2つのドメイン(VH-CH1)に続いてヒンジ領域がある。免疫グロブリンでは、軽鎖はジスルフィド結合によって重鎖に接続されてヘテロダイマーを形成する。このヘテロダイマーがヒンジ領域でいくつかのジスルフィド結合によって同じヘテロダイマーに接続され、免疫グロブリンを形成する。ヒンジ領域のレベルでプロテアーゼにより分割すると、2つのフラグメント、すなわち：Fabフラグメント(VL-CLおよびVH-CH1ドメインを含む、抗原を結合するドメイン)およびFcフラグメント(CH2-CH3)₂ドメインを含むエフェクタ・ドメイン)が得られる。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明の目的は、抗体フォーマットの生産およびそれらの免疫学的用途、より具体的には免疫療法および免疫診断における用途を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、より具体的には、抗体フラグメントおよびこれらのフラグメントから創出された種々の抗体フォーマット、特にキメラ化またはヒト化された、多重特異性または多価のうち少なくともいずれか一方である抗体について述べる。

【0007】

本発明において「抗体フォーマット」とは、上述のタイプのドメインおよび領域の種々の組合せに相当する。

本発明者らは、用語「キメラ化抗体」により、動物起原のVHドメインがヒト免疫グロブリンの定常領域へ融合されたものを意味する。

【0008】

本発明者らは、用語「ヒト化抗体」により、動物起原のVHから超可変領域(CDR)が移植されたヒトのVHドメインが、ヒトIgの定常領域へ融合されたものを意味する。

これらの抗体は、所与の分子に対応する標的のエピトープを認識する。これらのエピトープは様々であり、異なる標的に属していても同じ標的に属していてもよい。よって用語「二重特異性抗体」とは、2つの異なる標的を結合する2つの異なるVHを備えたフォーマットを意味し、「二重エピトープ抗体」とは、同じ標的上の2つの異なるエピトープに結合する2つの異なるVHを備えたフォーマットを意味する。

【0009】

「価数」は、同じVHがそのフラグメント上で見つかる回数に相当する。

所定の標的に到達する抗体の認識特異性は、様々な疾病、特に腫瘍学上の診断および治療に使用されており、腫瘍学では、標的は腫瘍関連抗原でも、成長因子レセプターでも、がん遺伝子もしくは変異した「腫瘍抑制」遺伝子の産物でも、あるいは血管形成に関連した分子または非腫瘍細胞上で発現するが前駆細胞には存在しない(CD20の場合のような)分子であってもよい。

【0010】

20年間以上の実験研究の後、モノクローナル抗体による腫瘍の免疫ターゲティングは現在では相当に発展している。

その結果として、種々の臨床研究の結果から、最近ではある種の抗体の治療上の可能性が実証されており、また該抗体がFDAの承認を受け、また欧州でのAMMを受けている。

【0011】

こうした進展は、主にいわゆる「第二世代」の組換え抗体、すなわち：

- ヒト化抗体、例えば、ある種の乳癌の化学療法に使用される抗HER2/Neu抗体であるハーセプチン(Herceptin)、
 - キメラ抗体、例えば、濾胞B細胞リンパ腫の治療に使用される抗CD20抗体であるリツキシマブ(Rituximab)
- の使用によるものである。

10

20

30

40

50

【0012】

遺伝子工学によって、マウス抗体の可変領域または超可変領域をヒトのIg分子上に「移植する」ことが可能である。

現在、新しい技術を用いて、ファージ上で発現させた（いわゆる「ファージディスプレイ」技術）ヒト可変ドメインの選択によって、あるいはヒト抗体を産生するトランスジェニックマウスの使用によって、完全なヒト抗体を得ることが可能である。

【0013】

さらに、二重特異性抗体の概念は、免疫系を刺激することにより標的の腫瘍細胞とエフェクタ細胞との間の接触を容易にするために使用されてきた。この概念は、二重の特異性を賦与された抗体の構築にある。この抗体は、腫瘍細胞の表面で生産された分子（CEA、HER2/Neu、GD₂など）と、免疫のエフェクタ細胞であるナチュラルキラー細胞、キラーT細胞もしくはCTL、多核性好中球、単球およびマクロファージの表面で発現された分子（Fc受容体など）を結合させることができなければならない。この戦略の変形は、腫瘍細胞の表面で生産された分子と、直接的または間接的な細胞毒性（放射性元素、毒素、プロドラッグ）を示す分子とを連結させる抗体の構築である。

10

【0014】

今まで、ほとんどの二重特異性抗体は抗体の2つのフラグメントを生化学的にカップリングすることにより開発されたものである。しかしながら、この技術は、工業規模ではほとんど展開されていない。いくつかの二重特異性抗体、例えばscFvタイプの二重特異性抗体（「ダイアボディ（diabody）」）は、遺伝学的に開発されている。不運にも、該抗体は大腸菌で可溶性の形態で生産するのが依然難しく、またADCCの点においてもあまり有効ではない。

20

【0015】

免疫療法のための抗体フォーマットを生成し、特に多重特異性抗体を得るための候補抗体の探索において、本発明者らは、ラクダ科（ラクダ、ヒトコブラクダ、ラマ）に確認された軽鎖を有しない特異抗体（ハマス キースターマン（Hammers-Casterman）ら、1993年）に着目した。

【0016】

一種類の抗原を特異的に認識するラクダ科由来の一本鎖重鎖抗体の可変ドメイン（VHH）を、免疫した動物から選択し、プラスミド構築物から生産可能なキメラ化抗体あるいはヒト化抗体の様々なフォーマットを開発するために使用した。任意の他のVHHまたはヒト化VHH、あるいはヒトVHの生産を可能にするために、様々なフォーマットが適合することが判明した。

30

【0017】

本発明は、探索の対象となる標的およびエピトープを認識する特性を備えた、VHHまたはヒト化VHHあるいはヒトVHドメインの全体のうち一部を含む抗体フォーマットを提供することを目的とする。

【0018】

さらに本発明は、これらの様々な構築物の生産のための方法を提供することを目的とする。

40

別の態様によれば、本発明は、作製した利用可能な種々のフォーマットの免疫治療および免疫診断における適用を目的とする。

【0019】

本発明はまた、ラクダ科、特にラマのVHHおよび/またはヒトVHのドメインの一部または全体を、ヒト化抗体の定常領域に融合された状態で含む抗体フォーマットに関する。

【0020】

本発明を達成する第1の手段によれば、抗体フォーマットはFabタイプであり、2つの同一もしくは異なるVHHドメインまたは2つのヒトVHドメイン、あるいはVHHのCDRが移植された2つのヒトVHドメインが結合し、該ドメインのうち的一方がヒト免

50

疫グロブリンの定常領域C またはC に融合し、他方がヒト免疫グロブリンの定常領域CH1に融合していることを特徴とする。

【0021】

本発明を達成する第2の手段によれば、抗体フォーマットはFab'タイプであり、2つの同一もしくは異なるVHHドメインまたは2つのヒトVHドメイン、あるいはVHHのCDRが移植された2つのヒトVHドメインが結合し、該ドメインのうち的一方がヒト免疫グロブリンの定常領域C またはC に融合し、他方がヒト免疫グロブリンの定常領域CH1および後続するヒンジ領域Hに融合していることを特徴とする。

【0022】

これらのキメラ化またはヒト化抗体フォーマットは、単一特異性/二価、二重特異性/一価、および二重エピトープ性/一価のタイプである。

本発明を達成する第3の手段によれば、抗体フォーマットはF(ab')₂タイプであり、上に定義されるようなFab'タイプが2つ結合したものと特徴づけられる。

【0023】

これらのキメラ化またはヒト化抗体フォーマットは、ヒト免疫グロブリン由来のヒンジ領域Hを有するため、単一特異性/四価、二重特異性/二価、および二重エピトープ性/二価の組合せが可能である。

【0024】

本発明を達成する第4の手段によれば、抗体フォーマットはF(ab')₂タイプであり、上記のF(ab')₂タイプのフォーマットの還元によって得られた2つのFab'が結合したものと特徴づけられる。

【0025】

これらのキメラ化またはヒト化抗体フォーマットは、ヒト免疫グロブリン由来のヒンジ領域Hを有するため、単一特異性/四価から四重特異性/一価または四重エピトープ性/一価まで、その中間の可能な組合せを全て含んだ組合せが可能である。

【0026】

本発明を達成する第5の手段によれば、抗体フォーマットは(HCH₂CH₃)₂タイプ(Hはヒト免疫グロブリンのヒンジ領域を表し、CH₂およびCH₃はヒトIg重鎖の二番目および三番目の定常領域を表す)であり、2つの同一のVHHまたはヒトVH、あるいはVHHの超可変領域が移植された2つのヒトVHが結合したものであって、各々がヒトIgのH-CH₂-CH₃領域で融合されていることを特徴とする。

【0027】

これらのキメラ化またはヒト化抗体フォーマットにより、単一特異性/二価の組合せが可能である。

本発明を達成する第6の手段によれば、抗体フォーマットは、mAb*タイプ(このタイプは、元の可変ドメインがVHHもしくはヒト化VHH、またはヒトVHドメインの全体または一部で置き換えられて、ヒト抗体の定常領域と融合されているものを指す)であり、2つの同一もしくは異なるVHHまたは2つのヒトVH、あるいはVHHの超可変領域が移植された2つのヒトVHが結合したものであって、一方がヒトのC またはC 領域に融合し、他方がヒトIgのCH₁-H-CH₂-CH₃領域に融合していることを特徴とする。

【0028】

これらのキメラ化またはヒト化抗体フォーマットにより、単一特異性/四価および二重特異性/二価および二重エピトープ性/二価の組合せが可能である。

これらの種々のフォーマットでは、免疫グロブリンは、ヒトのアイソフォームIgG₁、IgG₂、IgG₃またはIgG₄に相当するIgG、あるいはアイソフォームIgA₁、IgA₂に相当するIgA、あるいはその他のヒトIgである。

【0029】

VHHは、ヒトVHで置き換えられてもよいし、またはVHHからヒトVH上へのCDRの移植によるヒト化VHHで置き換えられてもよい。

10

20

30

40

50

本発明を達成する上記手段の例では、V H Hは、ラクダ科、特にラマ由来のV H H抗体のフラグメントに相当するかまたは該フラグメントを含む。特に該V H Hは、抗癌胎児性抗原（略して抗C E A）抗体フラグメントまたは抗F c R I I Iレセプター（略して抗C D 1 6）抗体フラグメントの一部または全体で構成されるという点で特徴的なフラグメントを含む。

【0030】

抗C E A抗体フラグメントは、より具体的には、S E Q I D N o .（配列番号）77、S E Q I D N o . 78、S E Q I D N o . 79、S E Q I D N o . 80およびS E Q I D N o . 105の配列からなる群から選択されたアミノ酸配列に従うものである。

10

【0031】

好ましい形態における抗C D 1 6抗体フラグメントは、S E Q I D N o . 73、S E Q I D N o . 74、S E Q I D N o . 75、S E Q I D N o . 76、S E Q I D N o . 103およびS E Q I D N o . 104の配列からなる群から選択されたアミノ酸配列に相当する。

【0032】

これらのフラグメントは新たな産物を形成し、このように本発明の範囲内にある。

本発明は、これらのV H HフラグメントのC D Rも含む。

本発明は、免疫療法または免疫診断のための、キメラ化またはヒト化された多重特異性および/または多価抗体を生産する方法も含み、該方法は上記に定義された抗体フォーマットの使用を含むことを特徴とする。

20

【0033】

本発明は具体的には、抗C E Aおよび抗C D 1 6ラクダ科V H H、特にラマV H Hを含む上記フォーマットの方法を目指す。

より具体的には、本発明は、抗C E Aおよび抗C D 1 6V H Hの可変ドメインであって、

- ラクダ科動物、特にラマを、免疫原としてC E AまたはC D 1 6を用いて免疫することと、

- 血液から得られたBリンパ球を精製することと、

- V H Hバンクを構築することと、

- 該バンクからV H Hを単離することと

30

を含むプロトコールによって有利に生産されたものを指す。前記バンクの構築は：

- Bリンパ球からの全R N Aの抽出と、

- 対応するc D N Aを得るためのR N Aの逆転写と、

- 一本鎖重鎖の抗C D 1 6および抗C E A抗体の可変領域をコードする遺伝子のP C Rによる増幅と、

- フェージミドで増幅させたD N Aの酵素切断によって得られたV H H D N Aフラグメントのライゲーションと

を含む。

【0034】

V H Hはフェージディスプレイ技術によってバンクから単離され、精製される。

抗C E Aおよび抗C D 1 6 V H Hの前記可変ドメインは、

- ラクダ科動物、特にラマを、免疫原としてC E AまたはC D 1 6を用いて免疫することと、

- 血液から回収されたBリンパ球を精製することと、

- V H Hバンクを構築することと、

- 該バンクからV H Hを単離することと

を含むプロトコールによって有利に生産される。

40

【0035】

有利な方法において、前記バンクの構築は：

50

- Bリンパ球からの全RNAの抽出と、
 - 対応するcDNAを得るためのRNAの逆転写と、
 - 一本鎖重鎖の抗CD16および抗CEA抗体の可変領域をコードする遺伝子のPCRによる増幅と、
 - フェージミドで増幅させたDNAの酵素切断によって得られたVHH DNAフラグメントのライゲーションと
- を含む。

【0036】

VHHはフェージディスプレイ技術によってバンクから単離され、精製される。

種々のVHHについて、実施例に例証するようにして特異性および親和性について検証した。

10

【0037】

本発明によれば、次いで、選択されたVHHの遺伝子を発現ベクター、特にプラスミドに導入し、種々の多重特異性および/または多価(抗CEA/抗CD16)キメラ化抗体であって、表面にCEAを発現している腫瘍細胞に結合し、かつCD16を発現する免疫系由来のエフェクタ細胞(単球、マクロファージ、NK、多核性好中球など)を動員することのできる抗体を生産する。

【0038】

本発明はまた、上記に定義された抗体フォーマットの発現ベクターにも言及する。

より具体的には本発明は、発現ベクター、特にプラスミドに言及し、該発現ベクターは2つのユニークな制限酵素切断部位の間に、プロモータと、シグナル配列と、上記に定義されたVHHドメイン、ヒトIgの定常領域をコードしうる、またはヒトVHドメイン、VHHのCDR領域、ヒトIgの定常領域をコードしうるヌクレオチド配列とを含んでいる。

20

【0039】

本発明によるプラスミドは、上記に定義された抗体フォーマットを細菌において可溶性の形態で大量に発現することが可能であり、抗体ドメインをコードする領域は、原核生物または真核生物の他の発現システムにも容易に移入可能である。

【0040】

したがって、本発明は、上記に定義された抗体フォーマットを達成するための第1の手段によるFabタイプの抗体の生産を可能にするプラスミドpC CH1 1-TAG (SEQ ID No. 98およびSEQ ID No. 112)およびpC CH1 1 (SEQ ID No. 100およびSEQ ID No. 114)に言及する。

30

【0041】

これらのプラスミドは、より具体的には、プラスミドp55Flag/RBS/35cmyc6HisGS (SEQ ID No. 94およびSEQ ID No. 110)の中に、Igの軽鎖Cおよび重鎖定常領域CH1をコードするヌクレオチド配列が挿入されたものとして特徴づけられる。

【0042】

本発明はまた、上記に定義された抗体フォーマットを達成するための第2、第3および第4の手段によるFab'およびF(ab')₂タイプの抗体の生産を可能にするプラスミドpC CH1H1-TAG (SEQ ID No. 99およびSEQ ID No. 113)およびpC CH1H1 (SEQ ID No. 101およびSEQ ID No. 115)にも関する。

40

【0043】

これらのプラスミドは、より具体的には、p55CFlag/RBS/35cmyc6HisGS (SEQ ID No. 97およびSEQ ID No. 111)の中に、Igの重鎖CH1およびヒンジ領域(H)をコードするヌクレオチド配列が挿入されたものとして特徴づけられる。

【0044】

50

本発明はさらに、上記に定義された抗体フォーマットを達成するための第5の手段による(HCH₂CH₃)₂タイプの抗体の生産を可能にするプラスミドpHCH₂CH₃1-TAG(SEQ ID No. 95)およびpHCH₂CH₃1(SEQ ID No. 96)にも言及する。

【0045】

これらのプラスミドは、より具体的には、p55Flag/RBS/35cmyc6HisGSの中に、Igのヒンジ領域(H)ならびに定常領域CH₂およびCH₃をコードするヌクレオチド配列が挿入されたものとして特徴づけられる。

【0046】

本発明はまた、本発明を達成するための第6の手段によるmAb*タイプの抗体の生産を可能にするプラスミドpMab1*(SEQ ID No. 102およびSEQ ID No. 116)にも言及する。

【0047】

このプラスミドは、より具体的には、pCCH₁1-TAGの中に、Igの重鎖定常領域CH₁、ヒンジ領域および定常領域CH₂およびCH₃をコードするヌクレオチド配列が挿入されたものとして特徴づけられる。

【0048】

これらのプラスミドの略図を図10Bに、そのヌクレオチド配列を図11に示す。上記プラスミドの構築に使用された中間体プラスミドも本発明の範囲内にある。より具体的には、上記に定義されたプラスミドを開発するために構築された、プラスミドp55PhoA6HisGS/N⁻(SEQ ID No. 89)、p55PhoA6HisGS/NAB⁻(SEQ ID No. 90)、p55/MCS1(SEQ ID No. 92)、p55Flag/RBS/35(SEQ ID No. 93およびSEQ ID No. 109)、p55Flag/RBS/35cmyc6HisGS(SEQ ID No. 94およびSEQ ID No. 110)およびp55CFlag/RES/35cmyc6HisGS(SEQ ID No. 97およびSEQ ID No. 111)が含まれる。

【0049】

これらのプラスミド中のIgのドメインCH₁、CH₂、CH₃、Hは、IgG₁、IgG₂、IgG₃もしくはIgG₄、またはIgA、またはその他のIgに属する。

VHHまたはヒトVHをコードする遺伝子を、種々のプラスミドのユニークな部位の間に導入する。これらの遺伝子を、VHHのCDRをヒトVH上に移植することによりヒト化VHHをコードする遺伝子に置き換えてもよい。

【0050】

より一般的には、本発明によって使用されるプラスミドは、抗CEAまたは抗CD16VHH以外のVHH、他のヒトVH、あるいは他のヒト化VHHであって任意の分子上に結合しうるものをコードするヌクレオチド配列を含むように設計可能である。

【0051】

本発明はさらに、プラスミドp55PhoA6HisGS⁻/NAB⁻(SEQ ID No. 91)に関し、該プラスミドは、図10Aおよび11の略図に従ってアルカリホスファターゼに融合したヒトVHドメインを生産するためのヌクレオチド配列を含むことを特徴とする。

【0052】

免疫グロブリン重鎖の可変領域ヒトフラグメント(VH)を選択し、かつ該フラグメントが最も良好に生産され最も良く分泌されるクローンを分離するための方法が開発されている。

【0053】

有利には、これらのヒトVHを、可変領域をヒト化するために、予め選択されたVHHからCDRを移植するための母体として使用する。

上記に定義された抗体フォーマットは、免疫療法および免疫診断において非常に興味深

10

20

30

40

50

いものである。該抗体フォーマットは、異なる分子を認識し、または同じ分子上の2つの異なるエピトープに結合することが可能であり、さらに、従来の抗体によって認識されない新しいエピトープにアクセスすることも可能である。該抗体フォーマットはヒト化することも可能であり、ヒト化することにより、ヒトに注射された後の免疫原性が低い抗体を得るという有利な見通しが得られることになる。該抗体フォーマットが可溶形態で得られるという事実は、これらの抗体のさらなる興味深い特性である。免疫診断および免疫療法における該抗体フォーマットの適用も本発明の一部である。

【0054】

本発明のその他の特性および利点は以下の実施例において提示される。該実施例では図1～13が参照される。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0055】

実施例1

ラマの免疫化、血清の抗体価測定およびBリンパ球の精製

ヒト組換えレセプターFc RIIIB (CD16B) の細胞外領域で雌のラマを免疫化した(タイロードシー(Teillaud C)ら、1993を参照)。

【0056】

ヒト組換え癌胎児性抗原(CEA)の細胞外領域で雄のラマを免疫化した(タースキク(Terskikh)らの文献(1993)およびタースキク(Terskikh)らの特許文献(1993)を参照)。

20

【0057】

各500 μ gの免疫原で動物を毎月免疫化した。100mlの血液を各免疫化の15日後に採取した。得られた各サンプルについて、血清および精製抗体(IgG1、2および3)の抗体価測定を実施し、種々の免疫原に対する抗体の存在を検出した。その後、Bリンパ球をFicol1(R)の勾配(histopaque(R)-1077、シグマ・アルドリッチ(Sigma-Aldrich))で精製し、次いでPBSで2回洗浄した。

【0058】

VHHバンクの構築：全RNAの精製、逆転写、PCR1、PCR2およびファージミドpHen1へのクローニング

30

VHHバンクの構築：

全RNAの精製：

Bリンパ球の全RNAは、グアニジンイソチオシアナートを使用する方法によって抽出する(チョムツィンスキー(Chomczynski)およびサッキ(Sacchi)、1987年参照)。酸性媒体中でフェノール/クロロホルム抽出した後、全RNAをエタノールで沈殿させる。RNAの品質および定量は1%アガロースゲル上で評価する。その後、逆転写によってcDNAに変換する。

【0059】

逆転写およびPCR：

使用したSEQ ID No. 1～9の配列のオリゴヌクレオチドは以下のとおりである。

40

【0060】

【化 1】

3' CH2FORTA4

SEQ ID N°1 : CGCCATCAAGGTACCAGTTGA

3'CH2-2

SEQ ID N°2 : GGTACGTGCTGTTGAACTGTTCC

3' RC-IgG2

SEQ ID N°3 : GGAGCTGGGGTCTTCGCTGTGGTGCG

10

3' RC-IgG3

SEQ ID N°4 : TGGTTGTGGTTTTGGTGTCTTGGGTT

5'VH1-Sfi

SEQ ID N°5 :

CATGCCATGACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTGCAGCTGGTGCAGT

CTGG

5'VH2-Sfi

20

SEQ ID N°6:

CATGCCATGACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTCACCTTGAAGGAGT

CTGG

5'VH3-Sfi

SEQ ID N°7 :

CATGCCATGACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGT

CTGG

5'VH4-Sfi

30

SEQ ID N°8 :

CATGCCATGACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTGCAGCTGCAGGAGT

CGGG

3'VHII-Not

SEQ ID N°9 : CACGATTCTGCGGCCGCTGAGGAGAC(AG)GTGACCTGGGTCC

【 0 0 6 1 】

5 μ g の全 RNA を、1 pmole (ピコモル) のオリゴヌクレオチド 3' CH2F O R T A 4 (アルバビ ガーロウディ (Arbabi Ghahroudi) ら、1997 年) またはラマ Ig G の一本鎖重鎖の CH2 ドメインに特異的な CH2 - 2 とハイブリダ イズさせ、150 U の superscript (R) II (BRL) を用いて 50 で 3 0 分間逆転写する。Ig G 2 および 3 のヒンジ領域の特異的オリゴヌクレオチドである 3 ' R C - I g G 2 および 3 ' R C - I g G 3 も使用可能である。一本鎖 cDNA をビーズ (BioMag (R) カルボキシルターミネータ、ポリサイエンス・インコーポレイテッ ド (Polyscience Inc)) で精製し、17 μ l の 10 mM トリス・アセタート pH 7.8 で溶出させる。

40

【 0 0 6 2 】

P C R 1 の条件 :

50

4 μ l の cDNA を、0.5 U の Dynazyme (TM) Extend DNA ポリメラーゼ (フィンザイム (Finnzymes))、10 pmole の同じプライマー 3' CH2FOR TA 4 または CH2 - 2、および 10 pmole の、ヒト IgG の VH ドメインに特異的な 4 種のプライマー 5' VH1 - 4 Sfi を用いて、容量 50 μ l 中で PCR によって増幅させる (94、3 分間; 94、1 分間; 60、1 分間; 72、1 分間; を 37 サイクル、その後、72、10 分間)。

【0063】

3 つの DNA フラグメントが増幅され、1 つは IgG 1 の VH - CH1 - CH2 ドメインをコードする約 900 bp のフラグメント; 2 つは IgG 2 および 3 の VHH - CH2 ドメインをコードする約 600 bp のフラグメントである。

10

【0064】

PCR 2 の条件:

前記 600 bp のフラグメントを 1% アガロースゲルで精製し (「Qiaquick (R) ゲル抽出」キット、キアゲン (Qiagen))、次いで 1 U の Deep Vent (R) (バイオラボ (Biolabs))、ならびにヒト IgG の VH ドメインに特異的な 4 つのプライマー 5' VH1 - 4 Sfi 10 pmole および 3' VHH - Not I プライマー 10 pmole を用いて PCR によって増幅させる (94、3 分間; 94、45 秒; 65、45 秒; 72、45 秒; を 15 サイクル、次いで、94、45 秒; 60、45 秒; 72、45 秒; をさらに 15 サイクル、その後 72、10 分間)。

20

【0065】

VHH をコードする約 400 bp のフラグメントを、1% アガロースゲルで精製し (「Qiaquick ゲル抽出」キット、キアゲン)、回収し、エタノールで沈殿させる。次いで該フラグメントを、制限酵素 Nco I および Not I、あるいは Bgl I および Not I (バイオラボ) で切断して、ファージミド pHen1 (フーゲンブーム (Hoogenboom) ら、1991 参照) の Nco I および Not I 部位、あるいは Sfi I および Not I 部位にクローニングする。

【0066】

ベクターの準備:

20 μ g のファージミド pHen1 を、容量 300 μ l 中で、50 U の Sfi I を用いて BSA 存在下にて 50 で 16 時間; あるいは 50 U の Nco I を用いて BSA 存在下にて 37 で 16 時間消化する。直線状となったファージミドを 0.7% アガロースゲルで精製する (「Qiaquick ゲル抽出」キット、キアゲン)。溶出させた DNA を、次に、容量 200 μ l 中で 50 U の Not I を用いて 37 で 16 時間切断する。酵素を 65 で 15 分間加熱して失活させ、DNA をフェノール/クロロホルムで抽出してエタノールで沈殿させる。切断した pHen1 を 0.7% アガロースゲルで確認し、定量し、200 ng / μ l に調節する。

30

【0067】

VHH DNA フラグメントの準備:

5 μ g の VHH フラグメントを、容量 300 μ l 中で、50 U の Bgl I および Not I を用いて BSA 存在下にて 37 で 16 時間; あるいは 50 U の Nco I および Not I を用いて BSA 存在下にて 37 で 16 時間切断する。酵素を 65 で 15 分間変性させ; その後、DNA をフェノール/クロロホルムで抽出し、10 μ g のグリコーゲン (ロッシュ (Roche)) 存在下にてエタノールで沈殿させる。Nco I および Not I によって切断した VHH フラグメントを 1% アガロースゲルで精製し、次に 2% アガロースゲルで確認し、定量し、100 ng / μ l に調節する。

40

【0068】

ライゲーション:

Sfi I および Not I によって消化した 150 ng の pHen1 を、Bgl I および Not I によって消化した 60 ng の VHH フラグメントと、容量 20 μ l 中で、200

50

0 UのT4 DNAリガーゼ（バイオラボ）を用いて16 で17時間ライゲーションする。

【0069】

リガーゼを65 で15分間不活性化し、ライゲーション産物を20UのXhoI（バイオラボ）で37 にて4時間切断し、連結されずに残ったベクターを除去する。こうして6種のライゲーションを実施する。その後、ライゲーション産物を2本のチューブに回収し、フェノール/クロロホルムで抽出し、10 μ gのグリコーゲンの存在下で沈殿させ、2 \times 18 μ lの超高純度H₂Oに溶解させる。2 μ lをエレクトロポレーションに使用する。

【0070】

雄のラマ由来のVHHバンク（参照番号：080101）は5.4 10⁶クローンに相当し、雌のラマ由来のVHHバンク（参照番号：010301）は10⁶クローンに相当する。

【0071】

ファージディスプレイ技術によるバンクからのVHHの単離

抗CEAおよび抗CD16 VHHの選択：

種々のVHHをファージディスプレイ技術によって単離する。

【0072】

ファージバンクの作製：

バンク080101または010301（ファージミドで形質転換したTG1細胞）からのストック10 μ lを、50mlの（2TY、100 μ g/mlアンピシリン、2%グルコース）に接種し、OD₆₀₀が0.5になるまで37 でインキュベートする。その後、5mlの培養物を、5mlのM13KO7（10¹³ pfu/ml）を用いて37 で30分間、撪拌せずに感染させる。遠心分離の後、ファージ堆積物を25mlの（2TY、100 μ g/mlアンピシリン、25 μ g/mlカナマイシン）に入れる。この培養物を撪拌しながら30 で16時間インキュベートする。その後、1/5容の2.5M NaCl/20%PEG6000でファージを沈殿させ、PBS中で25倍に濃縮する。

【0073】

VHHの選択：

ストレプトアビジンでコーティングされたビーズ（Dynabeads（R）M-280、ダイナル（Dyna1））200 μ lを、1mlの2%ミルク/PBSを用いて周囲温度で45分間、回転式振とう器で撪拌しながら平衡化する。上記生成物からの10¹²個のファージについても、2%ミルク/PBSを用いて最終容量500 μ l中で、周囲温度で60分間、回転式振とう器で撪拌しながら平衡化する。

【0074】

ビーズを磁石で圧縮し、250 μ lの2%ミルク/PBSに再懸濁させ、200 μ lのピオチン化抗原とともに周囲温度で30分間、回転式振とう器でインキュベートする。それぞれ終濃度150、75および25nMのピオチン化抗原を、第1、第2および第3回目に使用する。

【0075】

ビーズ/ピオチン化抗原450 μ lをとり、ファージ500 μ lを加えて周囲温度で3時間、回転式振とう器で撪拌しながら処理する。このビーズ/ピオチン化抗原/ファージ混合物を、800 μ lの4%ミルク-PBSで5回洗浄し、次いで新しいエッペンドルフ（Eppendorf）チューブに移す。800 μ lのPBS-0.1%トゥイーンでさらに5回の洗浄を行い、次いで混合物を別のエッペンドルフチューブに移す。最後に、800 μ lのPBSで5回洗浄する。

【0076】

ビーズ/ピオチン化抗原上に結合した抗体ファージを200 μ lのPBSで再懸濁させ、線毛にファージが結合するようにコンピテント状態にした1mlのTG1（コンピテントセル：2YTで一晩培養したTG1培養物から1/100希釈物を作製し、50mlの

10

20

30

40

50

2 Y T に植菌して O D₆₀₀ が 0.5 付近になるまで 37 で 攪拌する) と共に、攪拌せずに 37 で 30 分間 インキュベートする。各選択作業において、ファージを計数し、さらなる選択のために増幅させる。

【0077】

選択物の計数：

ファージ(上記参照)でトランスフェクトされた T G 1 細胞 1 μ l の 10⁻² ~ 10⁻⁵ 希釈物を、2 Y T で作製する。各希釈物の 1、10 および 100 μ l を、ペトリ皿(2 Y T / 100 μ g / m l アンピシリン / 2 % グルコース)に広げる。該ペトリ皿を 30 で 16 時間 インキュベートする。

【0078】

コロニー単離のための選択物の播種：

5 m l のトランスフェクトされた T G 1 を 3000 g で 10 分間遠心分離して細胞を集め、沈殿物を 1 m l の 2 Y T に懸濁させる。1 枚のペトリ皿(12 c m × 12 c m)(2 T Y / 100 μ g / m l アンピシリン / 2 % グルコース)当たり 250 μ l を使用し、30 で 16 時間 インキュベートする。

【0079】

この方法を使用して、次の V H H が単離された。すなわち：4 つの抗 C E A V H H (クローン：3、17、25、43) および 4 つの抗 C D 16 V H H (クローン：c 13、c 21、c 28、c 72) が得られた。これらのアミノ酸およびヌクレオチド配列を図 1 および 2 に示す。

【0080】

V H H および二重特異性抗体の再クローニング、生産および精製

V H H のクローニング：

V H H を、プラスミド p 55 P h o A 6 H i s G S / N A B⁺ (構造は第 1.3.6 項に記載、図 10 A および 11 を参照) の制限酵素 S f i I および H i n d I I I の切断部位の間にクローニングした。

【0081】

P C R 条件：

50 n g の V H H を、1 U の D e e p V e n t (バイオラボ)、10 p m o l e のプライマー 5' p J F - V H 3 - S f i および 3' c m y c - 6 H i s / H i n d I I I を用いて、50 μ l の最終容量で P C R にて増幅した(94、3 分間；94、45 秒；52、45 秒；72、45 秒；で 30 サイクル、その後、72、5 分間)。

【0082】

次の S E Q I D N o . 10 および S E Q I D N o . 11 の配列のオリゴヌクレオチドを使用する：

【0083】

【化 2】

5' pJF-VH3-Sfi

SEQ ID N°10: CTTTACTATTCTCACGGCCATGGCGGCCGAGGTGCAGCTGGTGG

3'cmyc-6His/HindIII

SEQ ID N°11:

CCGCGCGCGCCAAGACCCAAGCTTGGGCTA(GA)TG(GA)TG(GA)TG(GA)TG(GA)

TG(GA)TGTGCGGCCCCATTCAGATC

【0084】

P C R 産物を 1 % アガロースゲルで精製し(「Q i a q u i c k ゲル抽出」キット、キ

10

20

30

40

50

アゲン)、20 UのBgl Iおよび20 UのHind I I I (バイオラボ)を用いて37
で16時間切断処理する。10 μgのp55 Pho A / N A B⁻を、最初に50 UのS
fi Iで50⁻にて16時間、次いで20 UのHind I I Iで37⁻にて12時間切断
処理する。切断産物(ベクターおよびPCRフラグメント)をエタノール中で沈殿させる
。このDNAを20 μlのH₂Oに再懸濁し、0.7%アガロースゲルで定量する。

【0085】

ライゲーションは、200 UのT4 DNAリガーゼ、Sfi IおよびHind I I Iで
切断した50 ngのp55 Pho A / N A B⁻、ならびにBgl IおよびHind I I I
で切断した10 ngのPCRフラグメントを用いて、容量20 μlとして16⁻で16時
間実施する。T4 DNAリガーゼを65⁻で15分間不活性化させた後、10 UのXho
Iを用いた37⁻で2時間の酵素消化によって非組換えベクターを除去する。

10

【0086】

ライゲーション反応物による形質転換およびいくつかの組換えコロニーの分析の後、目
的のVHHを大腸菌中で生産させる。

VHHの生産:

単離されたコロニーを、3 mlの2YT / 100 μg / mlアンピシリン / 2%グルコ
ース中に接種し、攪拌しながら37⁻でインキュベートする。次いで50 mlの2YT /
100 μg / mlアンピシリン / 2%グルコースに上記培養物の希釈物を植え、攪拌しな
がら30⁻で16時間インキュベートする。400 mlの2YT / 100 μg / mlアン
ピシリンにOD₆₀₀として0.1ユニット相当物を植え、OD₆₀₀が0.5~0.7
になるまで攪拌しながら30⁻でインキュベートする。その後、該培養物を、400 μl
のIPTG (イソプロピル - D - チオガラクトピラノシド)で終濃度0.1 mMとし
て誘導し、30⁻で16時間培養する。

20

【0087】

二重特異性抗体の生産:

大腸菌株DH5⁻をプラスミドで形質転換して得られた単離コロニーを、3 mlの2Y
T / 100 μg / mlアンピシリン / 2%グルコースに接種し、攪拌しながら30⁻でイ
ンキュベートする。その後、50 mlのLB / 100 μg / mlアンピシリン / 2%グル
コースに先述の培養物の希釈物を植え、攪拌しながら30⁻で16時間インキュベートす
る。400 mlのLB / 100 μg / mlアンピシリンにOD₆₀₀として0.1ユニッ
ト相当物を接種し、攪拌しながら30⁻で2.5時間インキュベートし、次にOD₆₀₀
が0.5~0.7になるまで攪拌しながら20⁻でインキュベートする。その後、該培養
物を、400 μlのIPTG (イソプロピル - D - チオガラクトピラノシド)で終濃
度0.1 mMとして誘導し、20⁻で72時間培養する。

30

【0088】

ペリプラズムの可溶性画分の抽出:

VHHまたは二重特異性抗体を生産するために用いた培養物を、4200 g、4⁻で4
0分間遠心分離する。沈殿物を、4 mlの氷結TES (0.2 Mトリス - HCl pH 8
.0; 0.5 mM EDTA; 0.5 Mスクロース)中に入る。その後、リゾチーム (T
ES中に10 mg / ml、新たに調製したもの) 160 μlを加え、次いでH₂O中1/
2に希釈した24 mlの冷TESを加える。該混合物を氷中で30分間インキュベートす
る。

40

【0089】

4200 g、4⁻で40分間の遠心分離の後に、上清を回収し(ペリプラズム画分に相
当)、150 μlのDNase (10 mg / ml)および終濃度5 mMのMgCl₂を添
加し、周囲温度で30分間処理する。該溶液を、平衡化バッファー (50 mM酢酸ナトリ
ウムおよび0.1 M NaCl pH 7.0)に対して16時間透析する。

【0090】

VHHの精製:

カラム (BD TALON (TM) 金属親和性カラム (BD バイオサイエンシズクロン

50

テック (BD Biosciences Clontech) を平衡化バッファー (50 mM 酢酸ナトリウムおよび 0.1 M NaCl pH 7.0) で平衡化する。ペリプラズム画分をカラムに載せる。5 倍容量の平衡化バッファーでカラムを洗浄した後に、VHH を pH 勾配またはイミダゾール (平衡化バッファー pH 7.0 と 50 mM 酢酸ナトリウム溶液 pH 5.0 との間の勾配あるいは 200 mM イミダゾール溶液) によって溶出させる。各フラクションをクマシーブルーで染色してから SDS/PAGE ゲル (15% アクリルアミド) で確認する。目的のフラクションを合わせて PBS に対して透析する。VHH をメンブレン (アミコンウルトラ (Amicon Ultra) 5000 MWCO、ミリポア (Millipore)) で濃縮し、パイオラッド (Biorad) のタンパク質アッセイキットを使用してローリー (Lowry) の熱量測定法で分析する。

10

【0091】

二重特異性抗体の精製：

二重特異性抗体は、ペリプラズム画分 (「ペリプラズムの可溶性画分の抽出」を参照されたい) から 2 ステップで精製する。最初に BD TALON カラム (「VHH の精製」を参照)、その後 プロテイン G (HiTrap (TM) プロテイン G 5 ml、アマシャム・バイオサイエンス (Amersham biosciences)) である。

【0092】

「HiTrap プロテイン G」カラムを PBS (NaCl 137 mM、KCl 2.67 mM、Na₂HPO₄ 1.2 mM、KH₂PO₄ 1.76 mM pH 7.4) で平衡化する。BD TALON カラム上で溶出させ、PBS に対して透析したタンパク質をプロテイン G に載せる。5 倍容の PBS でカラムを洗浄した後で、二重特異性抗体を 0.1 M グリシン pH 2.7 で溶出させてから 1 M の hepes pH 8 で緩衝化する。SDS/PAGE ゲル (10% アクリルアミド) で確認した後、二重特異性抗体を 0.1 × PBS 中で透析し、-80 で凍結させ、凍結乾燥して 10 倍に濃縮する。最後に、PBS で平衡化した Tricorn (TM) Superdex (TM) 200 10/300 GL カラム (アマシャム・バイオサイエンス) で F(ab')₂ を Fab' から分離する。

20

【0093】

ELISA、Biacore (R)、免疫蛍光法 (フローサイトメトリー、FACS) および CD16 の活性化試験による VHH および二重特異性抗体の機能的な特性解析

30

ELISA による抗 CEA および抗 CD16 抗体の特性解析：

ファージ-VHH の ELISA：

5 μg/ml のビオチン化抗原 (CEA または CD16) を、予め 2% ミルク-PBS で飽和させたストレプトアビジンプレート (BioBind (TM) Assembly、ストレプトアビジンコーティング型、サーモラボシステム (Thermo Labsystems)) に結合させる。5 × 10¹⁰ ファージ抗体を抗原に接触させる。抗原/抗体結合を、ファージのタンパク質 P8 に対するモノクローナル抗体 (HRP/抗 M13 モノクローナル抗体コンジュゲート、ファルマシア (Pharmacia)) を含む ELISA によって検出する。20 ml の検出バッファー (18 ml の PBS、1 ml の 1 M クエン酸、1 ml の 1 M クエン酸ナトリウム、10 ml の 30% H₂O₂) に、基質として 10 mg の ABTS (2,2'-アジノビス (3-エチルベンゾ-チアゾリン-6-スルホン酸、ジアンモニウム塩) を添加して、405 nm (テカン (Tecan)) で反応を読みとる。

40

【0094】

VHH の ELISA：

5 μg/ml ビオチン化抗体を、予め 2% ミルク-PBS で飽和させたストレプトアビジンプレート (BioBind Assembly、ストレプトアビジンコーティング型、サーモラボシステム) に結合させる。各 VHH (0.001 μg/ml ~ 1 μg/ml) をマイクロウェル中に吸着させた抗原に結合させる。この結合を、1/1000 に希釈した c-myc ラベルに対するモノクローナル抗体 (サンタクルーズ・バイオテクノロジー

50

ー・インコーポレイテッド (Santa Cruz Biotechnology, Inc)) と、1/5000 に希釈した抗マウス IgG ヤギポリクローナル抗体ペルオキシダーゼ連結物 (参照番号 55556、ICN) とを用いて、ABTS (2, 2'-アジノジ- (3-エチルベンズチアゾリンスルホン酸) ジアンモニウム塩)、ロッシュ) の存在下で検出する。

【0095】

二重特異性抗体の ELISA :

10 µg/ml の抗原 (rhCD16 または rhCEA) を用いて、MaxiSorp (TM) プレート (ヌンク (Nunc)) を受動的にコーティングする。PBS/4% ミルク中でプレートを飽和させた後、該マイクロウェル中に吸着した抗原に、二重特異性抗体 (F(ab')₂、Fab'、Fab) (800 ~ 0.4 nM) を結合させる。結合を以下のいずれかの条件で検出する :

- 1/5000 に希釈した Flag タグに対するモノクローナル抗体 (抗 Flag M2 mAb、シグマ) と、1/5000 に希釈した抗マウス IgG ヤギポリクローナル抗体アルカリホスファターゼ連結物 (参照番号 115-055-003 (ジャクソン・イムノリサーチ (Jackson ImmunoResearch))) とを用いて、DNPP (4-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム六水和物) の存在下。

【0096】

- 1/5000 に希釈した c-myc タグに対するモノクローナル抗体 (サンタクルーズ・バイオテクノロジー) と、1/5000 に希釈した抗マウス IgG ヤギポリクローナル抗体アルカリホスファターゼ連結物 (参照番号 115-055-003 (ジャクソン・イムノリサーチ)) とを用いて、DNPP の存在下。

【0097】

- 1/5000 に希釈した抗ヒト軽鎖 () ヤギポリクローナル抗体アルカリホスファターゼ連結物 (参照番号 2060-04、サザンバイオテック (Southern Biotech)) を用いて、DNPP の存在下。

【0098】

VHH CD16 c21 がマイクロウェル中に吸着した rhCD16 に結合したときの、VHH CEA17 の接近可能性を、ビオチン化 rhCEA および 1/5000 希釈されたストレプトアビジン・アルカリホスファターゼ連結物 (DAKO (カタログ番号 D0396)) を用いて実証する。

【0099】

Biacore (R) による抗 CEA および抗 CD16 抗体の結合定数 :

BIACORE は、表面プラズモン共鳴 (SPR) の原理を用いて、分子を標識することなく分子間の相互作用をリアルタイムでモニターする。相互作用のパートナーのうちの一方は共有結合によりバイオセンサ上に固定化され、他方は連続的な流れの中に注入される。SPR による検出の原理は、分子複合体の形成および解離によるバイオセンサ表面での分子量の変化をモニターすることを可能にする。レスポンスは共鳴ユニット (RU) として定量され、屈折率の変化の測定により分析物の結合速度を直接的に示すものである。記録されたシグナル (センサーグラム) は数学的に処理され、結合速度定数 k_a 、解離速度定数 k_d 、結合定数 K_A ($K_A = k_a / k_d$) および平衡時の解離定数 K_D ($K_D = k_d / k_a$) が得られる。

【0100】

CEA または CD16 と VHH (モノクローナル抗体 9E10 (サンタクルーズ・バイオテクノロジー・インコーポレイテッド) によって認識される c-myc タグを有する) との間の相互作用について、モノクローナル抗体 9E10 が BIACORE 提案のアミンによる標準的カップリング手法 (NHS/EDC による活性化) に従って共有結合で固定化された CM5 バイオセンサを装備した BIACORE 3000 で調べた。その後、VHH (バッファー: 10 mM HEPES; 150 mM NaCl; 3 mM EDTA; 0.005% 界面活性剤 P20; に溶解したもの) を注入し、次に、一連の CEA または

10

20

30

40

50

CD16を、9E10上に固定化されたVHH上に注入する。並行して、タンパク質は注入せずに同じカップリング手法に供した対照チャンネルについても同様に注入を実施する。VHHの親和性を以下の表1に示す。二重特異性抗体の種々のフォーマットから同等の親和性が得られる。

【0101】

【表1】

表1

VHH	$k_a \times 10^5$ (1/Ms)	$k_d \times 10^{-3}$ (1/s)	$K_A \times 10^7$ (1/M)	$K_D \times 10^{-9}$ (M)
抗-CEA 3	1,24±0,014	1,68±0,002	7,38	13,6
抗-CEA 17	1,56±0,014	1,3±0,002	12	8,3
抗-CEA 25	1,13±0,014	3,6±0,004	3,15	31,7
抗-CEA 43	1,78±0,019	1,83±0,002	9,72	10,3
抗-CD16 c13	0,53±0,07	5,67±0,02	0,94	100,6
抗-CD16 c21	2,86±0,02	2,79±0,006	10,3	9,7
抗-CD16 c28	0,42±0,03	3,45±0,006	1,22	81,9
抗-CD16 c72	0,39±0,02	3,7±0,006	1,06	94,6

10

20

【0102】

抗CEAおよび抗CD16 VHHならびに対応する二重特異性抗体の特異性のFACSによる分析：

CEAに対する特異性：

(有効な免疫ターゲティングのためには、抗CEA抗体がNCA(顆粒球の表面で発現される、CEAに非常に相同性の高い分子)を認識しないことが極めて重要である。)

抗原抗体結合の検出は、トランスフェクションしていないMC38株(ネズミ結腸がんの細胞株)、同細胞株をCEAでトランスフェクションしたもの(MC38/CEA⁺)またはNCAでトランスフェクションしたもの(MC38/NCA⁺)、ヒト腫瘍細胞株LS174T(表面にCEAを発現するヒト結腸腺癌の細胞株)、および表面にNCAを発現する顆粒球について実施する。

30

【0103】

顆粒球は、2種類の密度のFicoll 1勾配(histopaque(R)1119および1077)でヘパリン存在下の新鮮血から抽出する。顆粒球は、2つのhistopaqueの境界面に見いだされる。

【0104】

細胞への結合に使用された抗体は：

40

- 35A7、抗CEAモノクローナル抗体(CEAに特異的)；
- 192、抗CEAモノクローナル抗体(NCAと交差反応する)；
- 7.5.4および3G8抗CD16モノクローナル抗体；
- 抗CD16 VHH(c13、c21、c28、c72)；
- 抗CEA VHH(3、17、25、43)；
- 抗CEA/抗CD16二重特異性抗体であって、8つの単離VHHから構築したものの；である。

【0105】

検出に使用された抗体は：

50

- 9E10、マウス抗cmvモノクローナル抗体(200μg/ml、1/10希釈

して使用)であって、精製VHHのc-myc標識に結合；
 - AP326F、ヒツジの抗マウスIgGポリクローナル抗体のFITC連結物(シーレーノス(Silenus)、1/100希釈して使用)；
 である。

【0106】

1回のテスト当たり細胞 0.5×10^6 個を使用する。VHHおよびモノクローナル抗体は100 μ lのPBS-1%BSA中で希釈する。

細胞 0.5×10^6 個(細胞の自己蛍光測定)。

【0107】

細胞 0.5×10^6 個+抗マウスIgG-FITC 20 μ g/ml。

細胞 0.5×10^6 個+抗9E10 20 μ g/ml、その後、抗マウスIgG-FITC 20 μ g/ml。

【0108】

細胞 0.5×10^6 個+抗CEAまたは抗CD16 VHH 1~5 μ g/ml、次に9E10 20 μ g/ml、次に抗マウスIgG-FITC 20 μ g/ml。

細胞 0.5×10^6 個+モノクローナル抗体(35A7、192、7.5.4)20 μ g/ml、その後、抗マウスIgG-FITC 20 μ g/ml。

【0109】

各ステップにおいて、サンプルを暗所にて4で45分間インキュベートする。

各反応の間では、2mlのPBS/1%BSAで洗浄を実施する。最後のステップでは、細胞を0.5mlのPBS中に入れる。

【0110】

FACSによる結果は、分析した4種の抗CEA VHHならびにFab、Fab'およびF(ab')₂の形態の抗CEA/抗CD16二重特異性抗体の特異性を実証している。これらはCEA特異的であり、NCAとは交差反応しない。1例を図3に示す。この例において、対照のモノクローナル抗体であるmAb 35A7および192は、CEAを発現しないMC38細胞には結合せず、表面上にCEAを発現するMC38 CEA⁺およびLS174T CEA⁺細胞には結合する。mAb 192はさらに、表面上にNCAを発現するMC38 NCA⁺細胞および顆粒球にも結合する。CEA17 VHHは、表面にCEAを発現する細胞にのみ結合する。その他の抗CEA VHH抗体(クローン3、25および43)でも同等の結果が得られる。CEA17 VHH/CD16 c21 VHH二重特異性抗体は、Fab'およびF(ab')₂いずれの形態でも腫瘍細胞に特異的である。

Fab、Fab'およびF(ab')₂の形態のその他の抗CEA/抗CD16二重特異性抗体(8種の抗CEAおよび抗CD16 VHH由来)でも同等の結果が得られる。

【0111】

CD16に対する特異性：

免疫系がエフェクタ細胞を有効に認識するためには、CD16Bから選ばれた抗CD16抗体がさらにCD16Aをも認識しなければならない。さらに、該抗体はCD32(RFc IIAおよびRfc IIB)とは交差反応してはならない。

【0112】

実験は、Jurkat細胞(ヒトT細胞リンパ腫細胞株由来の細胞株；ATCC TIB-152)、該細胞をCD16Aをコードする遺伝子でトランスフェクションした株(表面にCD16Aを発現する安定な細胞株；ビビエ(Vivier)ら、1992年)、CD16Bを発現する顆粒球、CD32Aのみを発現するK562細胞、およびCD32Bのみを発現するIIA 6huIIB1細胞を用いて実施する。

【0113】

細胞への結合に使用された抗体は：

- 3G8、抗CD16(ヒトRfc IIA/IIB)モノクローナル抗体であって、エピトープのコンホメーションを認識し、CD16AおよびCD16BへのIgGの

10

20

30

40

50

結合をブロックする部位認識抗体；

- 7.5.4、抗CD16 (ヒトRFc IIA/IIIB)モノクローナル抗体であって、CD16のIgG結合部位の外側に局在する線形のエピトープを認識し、かつ競合テスト(ヴェリイ(Veily)ら、1997年)において高濃度でも前記IgG結合への影響がごくわずかである抗体；
- AT10、抗CD32 (ヒトRFc IIA/IIIB)モノクローナル抗体；
- IV.3、抗CD32 (ヒトRFc IIA)モノクローナル抗体；
- 抗CD16 VHH(c13、c21、c28、c72)；
- 抗CEA VHH(3、17、25、43)；
- 35A7、抗CEAモノクローナル抗体；
- 192、抗NCAモノクローナル抗体(CEAと交差反応する)；
- 抗CEA/抗CD16二重特異性抗体、8つの単離VHHから構築されたものである。

10

【0114】

検出に使用された抗体は：

- 9E10、マウス抗cmycモノクローナル抗体(200 μ g/ml、1/10希釈して使用)であって、精製VHHのc-myc標識に結合；
- ヤギの抗マウスIgG抗体のFab'2であって、FITCとの連結物(F(ab')₂/FITC)、20 μ g/mlで使用(ジャクソン・イムノリサーチ・ラボ社(Jackson ImmunoResearch Lab. Inc.)、115-096-003)。

20

【0115】

1回のテスト当たり細胞0.5 \times 10⁶個を使用する。VHHおよびモノクローナル抗体は100 μ lのPBS-1%BSA中で希釈する。

細胞0.5 \times 10⁶個(細胞の自己蛍光測定)

細胞0.5 \times 10⁶個+(F(ab')₂/FITC)20 μ g/ml

細胞0.5 \times 10⁶個+抗9E10 20 μ g/ml、その後(F(ab')₂/FITC)20 μ g/ml

細胞0.5 \times 10⁶個+VHH 1~5 μ g、次に9E10 20 μ g/ml、次に(F(ab')₂/FITC)20 μ g/ml

30

細胞0.5 \times 10⁶個+モノクローナル抗体(35A7、192、3G8、7.5.4、AT10、IV.3)20 μ g/ml、その後(F(ab')₂/FITC)20 μ g/ml。

【0116】

各ステップにおいて、サンプルを暗所にて4で45分間インキュベートする。

各反応の間では、2mlのPBS/1%BSAで洗浄を実施する。最後のステップでは、細胞を0.5mlのPBS中に入れる。

【0117】

FACSによる結果は、分析した4種の抗CD16 VHHならびにFab、Fab'および(Fab')₂の形態の抗CEA/抗CD16二重特異性抗体の特異性を実証するものである。これらの抗体はCD16特異的であり、CD32とは交差反応しない。1例を図4に示す。この例において、対照のモノクローナル抗体であるmAb 3G8は、CD16を発現しないJurkat細胞、K562 CD32A⁺およびIIA.1.6huIIIB1 CD32B⁺には結合せず、表面にCD16を発現するJurkat CD16A⁺細胞および顆粒球には結合する。CD16 c21 VHHは、表面にCD16を発現する細胞に結合しない。その他の抗CD16 VHH抗体(クローンc13、c28およびc72)でも同等の結果が得られる。二重特異性抗体であるVHH CEA17/VHH CD16 c21は、Fabおよび(Fab')₂のいずれの形態でもJurkat CD16A⁺およびNKL細胞に特異的である。Fab、Fab'および(Fab')₂の形態のその他の抗CEA/抗CD16二重特異性抗体(8つの抗CEAおよび

40

50

抗CD16 VHH由来)でも同等の結果が得られる。

【0118】

二重特異性抗体の細胞上への接近可能性に関するFACS分析：

抗CD16 VHHドメインの接近可能性：

5 × 10⁵個のLS174T細胞を、Fab、Fab'またはF(ab')₂の存在下(10 μg/ml ~ 0.1 μg/mlの範囲)で、氷中のPBS - 1%BSAの中で30分間インキュベートする。細胞をPBS - BSA 1%で洗浄する。その後、種々の抗体フラグメントの抗CD16 VHHドメイン上へのrhCD16(10 μg/ml)の結合を2ステップで検出する。該検出は、モノクローナル抗体7.5.4あるいは3G8(3 μg/ml)を細胞と共に氷中で30分間インキュベートし、次いで細胞をFITC標識された抗マウスIgG(H+L)ヤギF(ab')₂(ジャクソン・イムノリサーチ・ラボラトリー(Jackson ImmunoResearch Laboratory)、カタログ番号：115-096-003)と共に、氷中で30分間インキュベートすることにより行われる。数回の洗浄の後、Cell Quest Pro(TM)プログラムを使用して、FACS caliber(TM)4C4(ベクトン・ディキンソン(Becton Dickinson))を用いたフローサイトメトリー法によって免疫蛍光(immunofluorescence)を分析する。

10

【0119】

抗CEA VHHドメインの接近可能性：

5 × 10⁵個のJurkat CD16A⁺細胞を、Fab、Fab'またはF(ab')₂の存在下(10 μg/ml ~ 0.1 μg/mlの範囲)で、氷中のPBS BSA 1%中で30分間インキュベートする。細胞をPBS - BSA 1%で洗浄する。その後、Fab、Fab'またはF(ab')₂の抗CEA VHHドメイン上へのrhCEA(10 μg/ml)の結合を2ステップで検出する。該検出は、モノクローナル抗体192(3 μg/ml)を細胞と共に氷中で30分間インキュベートし、次いで細胞をFITC標識された抗マウスIgG(H+L)ヤギF(ab')₂(ジャクソン・イムノリサーチ・ラボラトリー、カタログ番号：115-096-003)と共に、氷中で30分間インキュベートすることにより行われる。数回の洗浄の後、Cell Quest Pro(TM)プログラムを使用して、FACS caliber(TM)4C4(ベクトン・ディキンソン)を用いたフローサイトメトリー法によって免疫蛍光を分析する。

20

30

【0120】

1例を図5に示す。二重特異性抗体であるVHH CEA17/VHH CD16 c21は、LS174TおよびJurkat CD16A⁺細胞のいずれにも結合する。Fab、Fab'およびF(ab')₂の形態のその他の抗CEA/抗CD16二重特異性抗体(8つの抗CEAおよび抗CD16 VHH由来)でも同等の結果が得られる。

【0121】

抗CD16 VHHとモノクローナル抗体3G8および7.5.4との間の競合テスト：

ELISA：

5 μg/mlのビオチン化VHH(c21、c28)を、予め2%ミルク - PBSで飽和させたストレプトアビジン吸着プレート(BioBind(TM)Assembly、ストレプトアビジンコーティング型、サーモラボシステム)のウェルに結合させる。その後、0.07 ~ 20 μg/mlの濃度範囲のCD16Bを添加する。第2に、5 μg/mlの一定濃度のモノクローナル抗体(3G8または7.5.4)を添加する。CD16Bとモノクローナル抗体との結合を、抗マウスIgGヤギF(ab')₂のアルカリホスファターゼ連結物(サザン・パイオテクノロジ、1030-04)を用いて、p-ニトロフェニルホスファターゼ(シグマ、N9389)の存在下で検出する。

40

【0122】

ELISAにおける競合曲線を図6に示す。CD16 c21 VHHは、モノクローナル抗体7.5.4によってシフトする。CD16 c28 VHHは、モノクローナル

50

抗体 3 G 8 によってシフトする。

【 0 1 2 3 】

間接免疫蛍光法 (F R C S)

5 × 1 0 ⁵ 個の Jurkat - CD 1 6 A 細胞を、CD 1 6 c 2 1 または c 2 8 VHH (1 ~ 1 0 0 μ g / m l) の存在下、氷中の P B S - 5 % B S A の中で 3 0 分間インキュベートする。その後、細胞を、0 . 1 μ g / m l の 3 G 8 または 1 μ g / m l の 7 . 5 . 4 と共に同じ条件で 3 0 分間インキュベートし、次いで P B S - 5 % B S A 中で洗浄する。その後、3 G 8 または 7 . 5 . 4 の結合を検出する。該検出は、細胞を、FITC 標識された抗マウス Ig G (H + L) ヤギ抗体 F (a b ') ₂ (ジャクソン・イムノリサーチ・ラボラトリーズ社 (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc .) 米国ペンシルバニア州ウエストグローブ所在、カタログ番号 : 1 1 5 - 0 9 6 - 0 0 3) とともに氷中で 3 0 分間インキュベートすることにより行われる。数回の洗浄の後、Cell Quest Pro (T M) プログラムを使用して、F A C S c a l i b u r (T M) 4 C 4 (ベクトン・ディキンソン、米国カリフォルニア州マウンテンビュー所在) を用いたフローサイトメトリー法によって免疫蛍光を分析する。

10

【 0 1 2 4 】

細胞上での競合プロファイルを図 7 に示す。CD 1 6 c 2 1 VHH はモノクローナル抗体 7 . 5 . 4 によってシフトする。CD 1 6 c 2 8 VHH はモノクローナル抗体 3 G 8 によってシフトする。高用量の CD 1 6 c 2 8 VHH もモノクローナル抗体 7 . 5 . 4 によってシフトする。

20

【 0 1 2 5 】

抗 CD 1 6 VHH および二重特異性抗体による Jurkat CD 1 6 ⁺ 細胞の活性化 :

この実験は、CD 1 6 A をコードする遺伝子でトランスフェクションされた Jurkat 細胞 (A T C C T I B - 1 5 2) を用いて実施する。該細胞は、1 0 % の F C S 、 1 0 0 U / m l のペニシリン、1 0 0 μ g / m l のストレプトマイシン、2 m M の L - グルタミン、0 . 5 m g / m l の G 4 1 8 を添加した R P M I 1 6 4 0 で培養する。

【 0 1 2 6 】

その後、5 × 1 0 ⁵ 個の細胞をマイクロプレートウェル中 (1 0 % の F C S 、 1 % の P S 、 0 . 5 m g / m l の G 4 1 8 を含有する 2 5 0 μ l の R P M I) で 1 8 時間培養する。

30

【 0 1 2 7 】

その後、1 0 n g / m l のフォルボールミリスチンアセテート (P M A) (それ自体では I L 2 の産生および分泌を誘導しないが I L 2 産生の「第 2 のシグナル」として必要な濃度) を添加し、続いて 0 . 0 1 ~ 0 . 1 μ g / m l のビオチン化 VHH および 1 0 μ g / m l のストレプトアビジン (VHH の架橋を可能にする) または非ビオチン化二重特異性抗体を添加する。

【 0 1 2 8 】

細胞上清中に産生されたヒト I L 2 を、R & D キット (D u o s e t (R) ヒト I L 2 ; 参照番号 : D Y 2 0 2) の抗体およびストレプトアビジンのアルカリホスファターゼ連結物 (D A K O 、 D 0 3 9 6) を使用して、p - ニトロフェニルホスファート (シグマ、カタログ番号 1 0 4 - 4 0 5) の存在下で E L I S A によって測定する。

40

【 0 1 2 9 】

CD 1 6 A の活性化 (インターロイキン 2 の産生および分泌) の結果を図 8 に示す。2 種の抗 CD 1 6 c 2 1 および c 2 8 VHH は、Jurkat CD 1 6 A ⁺ 細胞の I L 2 産生を活性化する。c 2 1 によって誘導されたのと同様の I L 2 の産生および分泌を誘導するためには、c 2 8 ではより多くの量が必要である。F (a b ') ₂ の形態の抗 C E A 1 7 / 抗 CD 1 6 c 2 1 二重特異性抗体は、ストレプトアビジンによる架橋がなくても、Jurkat 細胞がその表面で CD 1 6 A を発現する場合は I L 2 の産生を活性化

50

する。その他の抗CD16 VHHおよび抗CEA/抗CD16二重特異性抗体からも同等の結果が得られる。

【0130】

二重特異性抗体存在下におけるNK細胞による腫瘍細胞の溶解：

ナチュラルキラー細胞の細胞毒性テストについては、顆粒性大リンパ球を伴う白血病から得られた細胞株としてNK細胞（ロバートソンら、1996（12））を使用する。該細胞の機能的特性はNKに類似しており、またCD16の発現についてはフローサイトメトリー法によって最初に確認した。使用した標的細胞は、ヒトの白血病から得られたまさにNK感受性のHeLa細胞、ネズミ結腸C15.4.3 AP由来のNK感受性細胞（MC38）、ならびにヒトCEAでトランスフェクションされた、本来NK耐性であるMC38細胞である。

10

【0131】

培養物中の標的細胞を懸濁させ（HeLa細胞についてはトリプシン反応により、MC38細胞とNK細胞については機械的に懸濁）、トリパンブルーを使用してMalassayセル中で計数する。1ウェル当たり2000個の細胞を、 3.7×10^6 Bqの ^{51}Cr および種々の抗体フォーマット（200、100または $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）を含んだ $100 \mu\text{l}$ 中で37℃にて1時間インキュベートする。その後、細胞を数回洗浄して、培地に残っている ^{51}Cr ならびに非結合の抗体を除去する。懸濁させたNK細胞を計数し、エフェクタ/標的比を60:1~0.2:1として標的細胞に添加する。37℃で4時間インキュベーションした後、培地中に放出されたCrの放射活性を、カウンターを使用して測定する。Fab'およびF(ab')₂の形態の抗CEA17/抗CD16c21および抗CEA17/抗CD16c28二重特異性抗体を用いて得られた細胞溶解を示す例を図9に示す。

20

【0132】

種々のプラスミドの構築（図10A、10B、11、12Aおよび12Bを参照）

- プロトコルの概要はすべて、サムブルック（Sambrook）、フリッチェ（Fritsch）およびマニアティス（Maniatis）の「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」第2版、コールドスプリングハーバー・ラボラトリーズ・プレス、1989年に記述されている。

【0133】

- 制限酵素による消化は供給業者の推奨に従って実施する。

挿入したヒト起源の遺伝子：領域C、CH1、H、CH2およびCH3をコードする遺伝子はそれぞれ、ヒト免疫グロブリンの軽鎖（鎖）の定常領域、ヒト免疫グロブリンIgG1の重鎖の第1の定常領域、ヒンジ領域、第2の定常領域、および第3の定常領域をコードする遺伝子のドメインに相当する。これらの遺伝子は、RT-PCRによってLFB（フランス分画生物工学研究所）のポケット試料（poché）から得た。この材料は法的な認可を受けており、記載された実験に使用可能である。

30

【0134】

- 各プラスミドの配列決定は、ABI310型シーケンサを用いて、以下のオリゴヌクレオチド：

40

EcoRI-90、SEQ ID No. 12: GCGCCGACATCATTAACGGTTCTGGC

HindIII+88、SEQ ID No. 13: CGCTACTGCCGCCAGGC

を使用して実施する。

【0135】

- すべてのベクターは、2つのユニークな制限酵素切断部位の間に：種々のプロモータ、PelB型（またはその他の）種々のシグナル配列、種々のRBS配列、任意のVHHまたはヒト化VHHドメイン、任意のCドメイン、あるいは任意のタイプの免疫グロブリンのCH1、H、CH2およびCH3ドメイン、を導入可能なように設計される。

50

【0136】

pMCSPhoA' (図10A)

このプラスミドの構築については、ル・カルベス (Le Calvez) ら (1995) の参考文献に記述されている。

【0137】

このプラスミドは、6番目の残基 (プロリン) から始まる成熟型アルカリホスファターゼ (PhoA) をコードする。

p35PhoA' (図10A)

このプラスミドの構築についてはル・カルベス (Le Calvez) (1996) に記述されている。

10

【0138】

遺伝子断片 (PelBのシグナル配列をコードする2~14コドンの3番目の塩基を縮重させたオリゴヌクレオチドによって形成) を、プラスミドpMCSPhoA'のNdeI部位とEagI部位との間に挿入する。その後、最も高いアルカリホスファターゼ活性を示すクローン (1~60) を選択した。

【0139】

p35PhoA' / NcoI (図10Aおよび11)

phoA遺伝子中のNcoI部位の抑制。

オリゴヌクレオチド: 上流 - RsrII、NcoI-sup、NcoI-infおよび下流 - EcoNIを用いてpMCSPhoA'からオーバーラップPCRを実施する。

20

【0140】

使用したオリゴヌクレオチドの配列、SEQ ID No. 14~17は以下のとおりである。

【0141】

【化3】

上流-RsrII

SEQ ID No 14: GGCACATGTGACCTCGCGC

NcoI-sup

SEQ ID No 15: GCAACGTACCACGGCAATATCG

NcoI-inf

SEQ ID No 16: CGATATTGCCGTGGTACGTTGC

下流-EcoNI

SEQ ID No 17: GCCATCTTTGGTATTTAGCGCC

30

【0142】

PCR1およびPCR2の条件:

1 μlのプラスミド (5 ng)、10 pmoleの各オリゴヌクレオチド (PCR1については上流-RsrIIおよびNcoI-inf、PCR2についてはNcoI-supおよび下流-EcoNI)、0.5 UのDynazyme (TM)、最終容量50 μl (94 °C、3分間; 94 °C、45秒間; 60 °C、45秒間; 72 °C、45秒間; を25サイクル、次いで72 °C、10分間)。PCR産物を2%アガロースゲルで精製する (キアゲンのゲル抽出キット、最終容量50 μl)。

40

【0143】

オーバーラップPCR3の条件:

PCR1および2をそれぞれ1 μl、ならびに0.5 UのDeep Vent、最終容量50 μl。5サイクル (94 °C、3分間; 94 °C、1分間; 60 °C、1分間; 72 °C、

50

1.5分間)の反応の後、10 pmoleの各オリゴヌクレオチド(上流-RsrIIおよび下流-EcoNI)を添加し、PCRを35サイクル続けた後、72、10分間。PCRの産物を、2%アガロースゲルで精製する(キアゲンのゲル抽出キット、最終容量50 μl)。

【0144】

PCRフラグメントの配列決定は、オリゴヌクレオチド5' EcoRI-90を使用して、ABI310型シーケンサで実施する。

プラスミドp35PhoA'中へのPCR3フラグメントのクローニング:

35 μlのPCR3フラグメントおよび5 μl(2.5 μg)のp35PhoA'を、10UのRsrIIおよびEcoNIで消化する。16時間インキュベーションした後、酵素を65で10分間処理して失活させる。その後、各DNAを沈殿させて20 μlのH₂Oに再懸濁させる。

10

【0145】

ライゲーションは、PCRフラグメント5 μl、ベクター0.5 μlおよび3 Weiss UのT4DNAリガーゼ(バイオラボ(Biolabs))を用いて、最終容量10 μl中で、16で16時間実施する。細菌TG1コンピテントセル(CaCl₂法)をライゲーション反応物5 μlで形質転換する。

【0146】

p55PhoA6HisGS/N⁻ (図10Aおよび11)

6ヒスチジン-グリシン-セリンモチーフの挿入

20

オリゴヌクレオチドXhoI-SacIおよび6HisGS/HindIIIを使用してp35PhoA'/N⁻からPCRを実施する。

【0147】

SEQ ID No. 18および19の配列のオリゴヌクレオチドを使用:

【0148】

【化4】

XhoI-SacI

SEQ ID No 18: CCATGGCGGCCGATCCTCGAGAG

30

6HisGS/HindIII

SEQ ID No 19:

CATGCAGTCCCAAGCTTATTAGCTCCCGTGATGGTGATGATGATGTTTCAGCCC

CAGAGCGGCTTTC

【0149】

PCRの条件:

PCRは、最終容量50 μl中に、5 ngのp35PhoA'/N⁻ベクター、10 pmoleの各オリゴヌクレオチドおよび0.5 UのDynaZymeを用いて実施する(94、3分間; 94、1分間; 70、1分間; 72、1分間を35サイクル、その後、72、10分間)。PCR産物を1%アガロースゲルで精製する(キアゲンのゲル抽出キット、最終容量50 μl)。

40

【0150】

XhoI-HindIIIフラグメントのクローニング

20 μlのPCRフラグメントおよび5 μl(2.5 μg)のp55PhoA'ベクター(ル・カルベス(Lecalvez)ら、Gene(1996)、第170巻、p. 51-55)を、BSA存在下で10UのXhoIおよびHindIIIで消化する。16時間インキュベーションした後、酵素を65で10分間処理して失活させる。その後、各DNAを沈殿させて20 μlのH₂Oに再懸濁させる。ライゲーションは、最終容量

50

10 μ l 中に PCR フラグメント 5 μ l、ベクター 0.5 μ l および 3 Weiss U の T4 DNA リガーゼ (パイオラボ) として 16 で 16 時間実施する。TG1 コンピテントセル (CaCl₂ 法) をライゲーション反応物 5 μ l で形質転換する。

【0151】

p55 PhoA6 HisGS / NAB⁻ (図 10A および 11)

p55 PhoA6 HisGS / N⁻ の ApaI 部位および BstEII 部位の抑制

1 回のオーバーラップ PCR を、オリゴヌクレオチド：上流 - EcoRV、ApaI - BstEII - sup、BstEII - ApaI - inf および下流 - MluI を用いて、p55 PhoA6 HisGS / N⁻ から実施する。SEQ ID No. 20 ~ 23 の配列のオリゴヌクレオチドを使用：

10

【0152】

【化5】

上流-EcoRV

SEQ ID No 20 : CATGAGCTGTCTTCGGTATC

ApaI-BstEII-sup

SEQ ID No 21 : TAATGGTCCCGCTAACAGCGCGATTTGCTGATGACCCA

BstEII-ApaI-inf

SEQ ID No 22 : TGGGTCAATCAGCAAATCGCGCTGTTAGCGGGACCATTA

20

下流-MluI

SEQ ID No 23 : GAACGAAGCGGCGTCGAAG

【0153】

PCR 1 および PCR 2 の条件：

1 μ l (5 ng) のプラスミド p55 PhoA6 HisGS / N⁻、10 pmole の各オリゴヌクレオチド (PCR 1 については上流 - EcoRV および BstEII - ApaI - inf、PCR 2 については ApaI - BstEII - sup および下流 - MluI)、0.5 U の Dynazyme (94、3 分間；94、45 秒間；60、45 秒間；72、45 秒間；を 25 サイクル、その後 72、10 分間)。PCR 産物を 2% アガロースゲルで精製する (キアゲンのゲル抽出キット、最終容量 50 μ l)。

30

【0154】

オーバーラップ PCR 3 の条件：

PCR 1 および 2 をそれぞれ 1 μ l、ならびに 0.5 U の Deep Vent、最終容量 50 μ l。5 サイクル (94、3 分間；94、1 分間；60、1 分間；72、1.5 分間) の後、10 pmole の各オリゴヌクレオチド (上流 - EcoRV および下流 - MluI) を添加し、PCR を 35 サイクル 続けてから、72、10 分間。PCR 3 の産物を 2% アガロースゲルで精製する (キアゲンのゲル抽出キット、最終容量 50 μ l)。

40

【0155】

PCR フラグメントの配列決定は、オリゴヌクレオチド 5' EcoRI - 90 を使用して、ABI 310 型シーケンサで実施する。

p55 PhoA6 HisGS / N⁻ プラスミド中への PCR 3 フラグメントのクローニング：

35 μ l の PCR 3 フラグメント および 5 μ l (2.5 μ g) の p55 PhoA6 HisGS / N⁻ を、10 U の EcoRV および MluI で消化する。16 時間インキュベーションした後、酵素を 65 で 10 分間処理して失活させる。その後、各 DNA を沈殿させ、20 μ l の H₂O に再懸濁させる。

50

【0156】

ライゲーションは、最終容量10 μ l中に、PCRフラグメント5 μ l、ベクター0.5 μ lおよび3 Weiss UのT4 DNAリガーゼ(バイオラボ)として16 $^{\circ}$ Cで16時間実施する。TG1コンピテントセル(CaCl₂法)をライゲーション反応物5 μ lで形質転換する。

【0157】

p55 PhoA 6 His GS⁻/NAB⁻ (図10Aおよび11)

PhoA遺伝子のEagI部位における位相シフト

この位相シフトにより単一のFseI部位を作出する。

【0158】

5 μ l(2.5 μ g)のp55 PhoA 6 His GS/NAB⁻を10UのEagIで消化する。16時間インキュベーションした後、酵素を65 $^{\circ}$ Cで10分間処理して失活させる。その後、反応混合物を沈殿処理し、20 μ lのH₂Oに再懸濁させる。dGTPおよびdCTPの等モル濃度混合物(終濃度33 μ M)および2.5Uのクレノウ(Klenow)exoフラグメント(バイオラボ)を添加して最終容量50 μ lとし、25 $^{\circ}$ Cで15分間処理する。500mMのEDTAを2 μ l加え、75 $^{\circ}$ Cで20分間処理して反応を停止させる。反応混合物をエタノール沈殿し、5 μ lのH₂O中に入れ、最終容量10 μ lとして3 Weiss UのT4 DNAリガーゼ(バイオラボ)を用いてライゲーションする。細菌TG1コンピテントセル(CaCl₂法)をライゲーション反応物5 μ lで形質転換する。

【0159】

このプラスミドにより、ヒト抗体VHのフラグメントをクローニングして最も良く分泌されるものを選択することが可能となる。

p55/MCS1 (図10Aおよび11)

1対のオリゴヌクレオチド5' MCS1および3' MCS1を使用した、p55 PhoA 6 His GS/NAB⁻のNcoI部位およびHindIII部位の間へのMCS1の挿入。

【0160】

SEQ ID No. 24および25の配列のオリゴヌクレオチドを使用:

【0161】

【化6】

5' MCS1

SEQ ID No. 24:

CATGGCCCAGGTCACCGTCTCCTCAAACCGCGGACTCGAGGGCGGCCAGCCGG
CCATGGCCGCTAGCGCGGCCGCTCTAGATTA

3' MCS1

SEQ ID No. 25:

AGCTTAATCTAGAGCGGCCGCGCTAGCGGCCATGGCCGGCTGGGCGCCTCGA
GTCCGCGGTTTGAGGAGACGGTGACCTGGGC

【0162】

5 μ l(2.5 μ g)のp55 PhoA 6 His GS/NAB⁻ベクターを、各10UのNcoIおよびHindIII酵素によって16時間消化する。各10 μ molのオリゴヌクレオチド5' MCS1および3' MCS1を80 $^{\circ}$ Cで5分間インキュベーションし、その後、該溶液を周囲温度までゆっくり冷却する。

【0163】

10

20

30

40

50

5 μ l のベクターと 1.2 μ l のハイブリッドカセット (5' MCS I + 3' MCS I) とを、3 Weiss U の T4 DNA リガーゼ (バイオラボ) の存在下で周囲温度にて 1 時間ライゲーションする。リガーゼを 65 で 10 分間インキュベーションして失活させる。10 U の E a g I を含有する 90 μ l の反応混合物を加え (2 h)、元のベクターを破壊する。この混合物をエタノール沈殿処理し、10 μ l の H₂O 中に入れる。細菌 T G 1 コンピテントセル (C a C l₂ 法) を該混合物 5 μ l で形質転換する。

【0164】

p 5 5 F l a g / R B S / 3 5 (図 1 0 A および 1 1)

1 対のオリゴヌクレオチド 5' F l a g / R B S / 3 5 s u p および 3' F l a g / R B S / 3 5 i n f を使用した、p 5 5 / M C S 1 の S f i I 部位および S a c 2 部位の間への F l a g / R B S / P e l B 3 5 モチーフの挿入。

10

【0165】

S E Q I D N o . 2 6 および 2 7 の配列のオリゴヌクレオチドを使用 :

【0166】

【化7】

5' Flag/RBS/35-sup

SEQ ID N°26 :

GGAGAGTGTGCAGGTGATTACAAAGACGATGACGATAAGTAATAAACAGGAA
ACAGAAGTCCATATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTA
CTCGCGGCCAGC

20

SEQ ID N°117 :

GGAGAGTGTGCAGGTGATTACAAAGACGATGACGATAAGTAATAAACAGGAA
ACAGAAGTCCATATGAAATATCTTTTACCTACGGCAGCCGCAGGTTTGTGTTA
CTCGCGGCCAGC

3' Flag/RBS/35-inf

SEQ ID N° 27 :

GGGCCGCGAGTAATAACAATCCAGCGGCTGCCGTAGGCAATAGGTATTTTCATA
TGGACTTCTGTTTCCTGTTTATTACTTATCGTCATCGTCTTTGTAATCACCTGCA
CACTCTCCGC

30

SEQ ID N° 118

GGGCCGCGAGTAACAACAACCTGCGGCTGCCGTAGGTAAGATATTTTCATA
TGGACTTCTGTTTCCTGTTTATTACTTATCGTCATCGTCTTTGTAATCACCTGCA
CACTCTCCGC

40

【0167】

クローニングは、M C S I の挿入について先述した条件のとおり実施する。ライゲーションの後、反応混合物を 10 U の X h o I 酵素で消化する。

p 5 5 F l a g / R B S / 3 5 c m y c 6 H i s G S (図 1 0 B および 1 1)

1 対のオリゴヌクレオチド 5' c - m y c - 6 H i s G S および 3' c - m y c - 6 H i s G S を使用した、p 5 5 F l a g / R B S / 3 5 の N o t I 部位および H i n d I I 部位の間への c - m y c - 6 H i s G S モチーフの挿入。S E Q I D N o . 2 8 および 2 9 の配列のオリゴヌクレオチドを使用 :

【0168】

50

【化8】

5' c-myc-6HisGS

SEQ ID N° 28:

GGCCGCAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATGGGGCCGTACATC
ACCACCATCACCATGGGAGCTA

SEQ ID N° 29:

3' c-myc-6HisGS

AGCTTAGCTCCCATGGTGATGGTGGTGATGTACGGCCCCATTCAGATCCTCTTC
TGAGATGAGTTTTTGTCTGC

10

【0169】

クローニングは、MCS Iの挿入について先述した条件のとおり実施する。ライゲーション混合物を10UのXbaI酵素で消化する。

P55C Flag/RBS/35cmyc6HisGS (図10Bおよび11)

p55Flag/RBS/35cmyc6HisGSへの免疫グロブリン軽鎖C 定常領域の挿入。

20

【0170】

SEQ ID No. 30および31の配列のオリゴヌクレオチドを使用：

【0171】

【化9】

5' Cκ

SEQ ID N° 30:

GGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGGTACCGTGGCTGCACCATCT
GTCTTC

30

SEQ ID N° 119:

GGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCACGTACGGTGGCTGCACCATCT
GTCTTC

3' Cκ

SEQ ID N°31:

CGTCATCGTCTTTGTAATCACCTGCACACTCTCCGCGGTTGAAGCTCTTTGTCA
CCG

40

【0172】

C ドメインの増幅：

LF B提供のポケット試料からFicol1勾配によってヒトBリンパ球を精製する。その後、全RNAを第1.3.2項に記載のプロトコールに従って調製する。

【0173】

ハイブリダイゼーション：

全DNA 1 μlを、1 pmoleのオリゴヌクレオチド3' C とともに最終容量 8 μlとして70 °Cで10分間プレインキュベーションする。温度を徐々に(45分間)37 °Cまで低下させる。

50

【0174】

逆転写：

8 μ l をとり、0.5 μ l の RNAsine (20 U)、3 μ l の 5 \times バッファー (SuperScript (TM) II、インビトロゲン (Invitrogen))、1 μ l の DTT (100 mM)、2 μ l の dNTP (10 mM) を加え、50 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベーションする。その後、0.75 μ l の SuperScript (150 U) を加え、インキュベーションを 50 $^{\circ}$ C で 30 分間継続し、70 $^{\circ}$ C で 15 分間処理する。

【0175】

得られた cDNA は、ビーズ (BioMag (R) カルボキシル基結合型、ポリサイエンシズ (Polysciences)) を用いて供給業者の推奨に従って精製する。最終的な溶離は、15 μ l の 10 mM トリス・アセタート pH 7.8 で実施する。

10

【0176】

PCR1 および 2 の条件：

PCR1 は、1 μ l の cDNA、各 10 pmole のオリゴヌクレオチド 5' C および 3' C、0.5 U の Dynazyme を用いて、最終容量 50 μ l として実施する (94 $^{\circ}$ C、3 分間；94 $^{\circ}$ C、1 分間；60 $^{\circ}$ C、1 分間；72 $^{\circ}$ C、1.5 分間；を 30 サイクル、その後、72 $^{\circ}$ C、10 分間)。

【0177】

PCR2 は、1 μ l の PCR1 から、0.5 U の Deep Vent を用いて最終容量 50 μ l として実施する (94 $^{\circ}$ C、3 分間；94 $^{\circ}$ C、45 秒間；60 $^{\circ}$ C、45 秒間；72 $^{\circ}$ C、45 秒間；を 25 サイクル、その後 72 $^{\circ}$ C、5 分間)。PCR 産物を 2% アガロースゲルで精製する (キアゲンのゲル抽出キット、最終容量 50 μ l)。

20

【0178】

PCR フラグメントは、クローニングの前にオリゴヌクレオチド 5' C および 3' C を用いて ABI 310 型シーケンサで配列決定する。

C ドメインのクローニングは、p55 Flag/RBS/35 cmyc 6 His GS の BstEII 部位および SacI 部位の間で行う：

20 μ l の PCR2 フラグメントおよび 5 μ l (2.5 μ g) の p55 Flag/RBS/35 cmyc 6 His GS を、10 U の BstEII および SacI で消化する。16 時間のインキュベーションの後、酵素を 65 $^{\circ}$ C で 10 分間処理して失活させる。その後、各 DNA を沈殿処理し、20 μ l の H₂O に再懸濁させる。

30

【0179】

ライゲーションは、最終容量 10 μ l 中で、5 μ l の PCR2 フラグメント、0.5 μ l のベクターおよび 3 Weiss U の T4 DNA リガーゼ (バイオラボ) を用いて 16 $^{\circ}$ C で 16 時間実施する。TG1 コンピテントセル (CaCl₂ 法) を 5 μ l のライゲーション反応物で形質転換する。

【0180】

p55 C Flag/RBS/35 CH1 1 cmyc 6 His GS (pC CH1 1-TAG)

p55 C Flag/RBS/35 cmyc 6 His GS への、IgG1 タイプ免疫グロブリンの重鎖定常領域 CH1 の挿入。

40

【0181】

SEQ ID No. 32 ~ 35 の配列のオリゴヌクレオチドを使用：

【0182】

【化10】

5' CH1 γ 1

SEQ ID N°32:

CTCGAGGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGCTAGCACCAAGGGCCCATCGG

3' CH1 γ 1

SEQ ID N°33:

AAGCTTAATCTAGAGCGGCCGCACAAGATTTGGGCTCAACTTTC

BstEII-sup

SEQ ID N°34:

CCCTCAGCAGCGTAGTGACCGTGCCCTCC

BstEII-inf

SEQ ID N°35:

GGAGGGCACGGTCACTACGCTGCTGAGGG

10

【0183】

20

CH1 γ 1ドメインの増幅は、BstEII部位を消失させるオーバーラップPCRにより実施される。

逆転写は、C β について上述した通りに、ただしオリゴヌクレオチド3' CH1 γ 1を使用して実施する。

【0184】

RTの後のPCR1は、1 μ lのcDNA、各10pmoleのオリゴヌクレオチド5' CH1 γ 1および3' CH1 γ 1、0.5UのDynaZymeを用いて、最終容量を50 μ lとして実施する(94 $^{\circ}$ C、3分間; 94 $^{\circ}$ C、1分間; 60 $^{\circ}$ C、1分間; 72 $^{\circ}$ C、1.5分間; を30サイクル、その後、72 $^{\circ}$ C、10分間)。

【0185】

30

PCR2aは、1 μ lのPCR1と、オリゴヌクレオチド5' CH1 γ 1およびBstEII-infとから、0.5UのDynaZymeを用いて最終容量を50 μ lとして実施する(94 $^{\circ}$ C、3分間; 94 $^{\circ}$ C、45秒間; 60 $^{\circ}$ C、45秒間; 72 $^{\circ}$ C、45秒間; を25サイクル、その後、72 $^{\circ}$ C、5分間)。

【0186】

PCR2bは、1 μ lのPCR1と、オリゴヌクレオチドBstEII-supおよび3' CH1 γ 1とから、0.5UのDynaZymeを用いて最終容量を50 μ lとして実施する(94 $^{\circ}$ C、3分間; 94 $^{\circ}$ C、45秒間; 60 $^{\circ}$ C、45秒間; 72 $^{\circ}$ C、45秒間; を25サイクル、その後、72 $^{\circ}$ C、5分間)。

【0187】

40

PCR3は、各1 μ lのPCR2aおよびPCR2bと、オリゴヌクレオチド5' CH1 γ 1および3' CH1 γ 1とから、0.5UのDeep Ventを用いて最終容量を50 μ lとして実施する(94 $^{\circ}$ C、3分間; 94 $^{\circ}$ C、45秒間; 60 $^{\circ}$ C、45秒間; 72 $^{\circ}$ C、45秒間; を25サイクル、その後、72 $^{\circ}$ C、5分間)。

【0188】

PCR3の産物を2%アガロースゲルで精製する(キアゲンのゲル抽出キット、最終容量50 μ l)。PCR3フラグメントの配列決定はオリゴヌクレオチド5' CH1 γ 1および3' CH1 γ 1を使用して、ABI310型シーケンサで実施する。

【0189】

クローニングは、C β ドメインについて記載したように実施するが、p55C-Fla

50

g / R B S / 3 5 c m y c 6 H i s G S の S f i I 部 位 と N o t I 部 位 の 間 と す る 。

得られたプラスミドを通称 p C C H 1 1 - T A G と し、該 プラスミド により、各鎖に標識を有する F a b タイプの抗体フラグメント (図 1 2 A) の生産が可能となる。

【 0 1 9 0 】

p 5 5 C F l a g / R B S / 3 5 C H 1 H 1 c m y c 6 H i s G S (p C 5 C H 1 H 1 - T A G) (図 1 0 B お よ び 1 1)

I g G 1 タイプ免疫グロブリンの重鎖定常領域 C H 1 およびヒンジ領域 (H) の、 p 5 5 C F l a g / R B S / 3 5 c m y c 6 H i s G S へ の 挿 入

P C R 1、2 a、2 b および 3 は、C H 1 ドメインの増幅について上述したとおりに実施するが、オリゴヌクレオチド 3 ' C 1 をオリゴヌクレオチド 3 ' C H 1 H 1 に置き換えて行う。3 ' C H 1 H 1 の配列 S E Q I D N o . 3 6 は以下のとおりである：

【 0 1 9 1 】

【 化 1 1 】

3' CH1H₁

SEQ ID N° 36 :

AAGCTTAATCTAGAGCGGCCGCTGGGCACGGTGGGCATGTGTGAGTTTTGTCA
CAAGATTTGGGCTCAACTTTC

10

20

【 0 1 9 2 】

クローニングは、C H 1 1 ドメインについて記述したように、p 5 5 C F l a g / R B S / 3 5 c m y c 6 H i s G S の S f i I 部 位 と N o t I 部 位 の 間 で 行 う 。

得られたプラスミドを通称 p C C H 1 H 1 - T A G と し、該 プラスミド により、各鎖に標識を有する F (a b ') ₂ タイプの抗体フラグメント (図 1 2 A) の生産が可能となる。

【 0 1 9 3 】

p 5 5 C / R B S / 3 5 C H 1 1 (p C C H 1 1) (図 1 0 B お よ び 1 1)

S a c I I および S f i I の間に含まれる DNA フラグメントを、1対のオリゴヌクレオチド 5 ' R B S / 3 5 s u p および 3 ' R B S / 3 5 i n f を使用して新たなカセットに置き換えることによる、プラスミド p 5 5 C F l a g / R B S / 3 5 C H 1 1 c m y c 6 H i s G S からの F l a g 標識および c - m y c - 6 h i s G S 標識の除去。

【 0 1 9 4 】

S E Q I D N o . 3 7 および 3 8 の配列のオリゴヌクレオチドを使用：

【 0 1 9 5 】

30

【化 1 2】

5' RBS/35-sup

SEQ ID N°37 :

GGAGAGTGTTAATAAACAGGAAACAGAAGTCCATATGAAATACCTATTGCCIA
CGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCAGC

SEQ ID N°120 :

GGAGAGTGTTAATAAACAGGAAACAGAAGTCCATATGAAATATCTTTTACCTACGGCA
GCCGCAGGTTTGTGTTACTCGCGGCCAGC

10

3' RBS/35-inf

SEQ ID N°38 :

GGCCCGCAGTAATAACAATCCAGCGGCTGCCGTAGGCAATAGGTATTTTCATA
TGGACTTCTGTTTCCTGTTTATTAACACTCTCCGC

SEQ ID N°121 :

GGCCCGCAGTAACAACAACCTGCGGCTGCCGTAGGTAAGATATTTTCATA
TGGACTTCTGTTTCCTGTTTATTAACACTCTCCGC

20

【0196】

クローニングは、MCSIの挿入について記述した条件に従って正確に実施する。得られた中間体プラスミドを p55C / RBS / 35CH1 1cmyc6HisGS と称する。

【0197】

c-myc-6HisGSモチーフは、CH1 1ドメインを p55C / RBS / 35CH1 1cmyc6HisGS に再クローニングすることにより除去される。

1回のPCRにより、5ngのプラスミド p55C Flag / RBS / 35CH1 1cmyc6HisGS から、オリゴヌクレオチド 5' CH1 1および 3' CH1 1-STOP を用いて CH1 1ドメインを増幅する。

30

【0198】

SEQ ID No. 39の配列のオリゴヌクレオチドを使用：

【0199】

【化 1 3】

3' CH1 γ 1-STOP

SEQ ID N°39 :

CATGCAGTCCCAAGCTTAACAAGATTTGGGCTCAACTTTC

40

【0200】

PCRフラグメントのクローニングは、C ドメインについて記載したようにして実施するが、プラスミド p55C / RBS / 35CH1 1cmyc6HisGS の Sfi I 部位と HindIII 部位との間で行う。

【0201】

得られたプラスミドを通称 pC CH1 1とし、該プラスミドにより、Fabタイプの抗体フラグメント(図12A)の生産が可能となる。

p55C / RBS / 35CH1H 1 (pC CH1H 1) (図10Bおよび

50

11)

SacIおよびSfiIの間に含まれるDNAフラグメントを、1対のオリゴヌクレオチド5' RBS / 35 supおよび3' RBS / 35 infを使用して新たなカセットに置き換えることによる、プラスミドp55C Flag / RBS / 35 CH1H1cmyc6HisGSからのFlag標識およびc-myc-6hisGS標識の除去クローニングは、MCSIの挿入について記述された条件に従って正確に実施する。得られた中間体プラスミドをp55C / RBS / 35 CH1H1cmyc6HisGSと称する。

【0202】

c-myc-6HisGSモチーフは、CH1H1ドメインをp55C / RBS / 35 CH1H1cmyc6HisGSに再クローニングすることにより除去される。

10

1回のPCRにより、5ngのプラスミドp55C Flag / RBS / 35 CH1H1cmyc6HisGSから、オリゴヌクレオチド5' CH11および3' CH1H1-STOPを用いてCH1H1ドメインを増幅する。

【0203】

SEQ ID No. 40の配列のオリゴヌクレオチドを使用：

【0204】

【化14】

3' CH1H1-STOP

20

SEQ ID N°40 :

CATGCAGTCCCAAGCTTATGGGCACGGTGGGCATGTGTG

【0205】

PCRフラグメントのクローニングは、上述のようにSfiI部位とHindIII部位の間で、ただしプラスミドp55C / RBS / 35 CH1H1cmyc6HisGSから実施する。

【0206】

得られたプラスミドを通称pC CH1H1とし、該プラスミドは、F(ab')₂タイプの抗体フラグメント(図12A)の生産を可能にする。

30

p55C / RBS / 35 CH1HCH2CH31(pMab1*) (図10Bおよび11)

IgG1タイプ免疫グロブリンの重鎖定常領域CH1、ヒンジ領域(H)および定常領域CH2およびCH3の、p55C Flag / RBS / 35 CH11cmyc6HisGSへの挿入

PCR1、2a、2bおよび3は、上述のCH1ドメインの増幅と同じように、ただしオリゴヌクレオチド3' CH11をオリゴヌクレオチド3' HindIII / H-CH2-CH3に置き換えて実施する。オリゴヌクレオチド3' HindIII / H-CH2-CH3の配列SEQ ID No. 41を以下に示す：

40

【0207】

【化15】

3' HindIII/H-CH2-CH3

SEQ ID N°41 :

CCGCCAAAACAGCCAAGCTTATTTACCCGGAGACAGGGAG

【0208】

クローニングは、CH1ドメインについて記述したように、p55C Flag / R

50

B S / 3 5 C H 1 1 c m y c 6 H i s G S の S f i I 部位と H i n d I I I 部位の間で行う。

【0209】

得られたプラスミドを通称 p M A b 1 * とし、該プラスミドは、m A b * タイプの抗体フラグメント(図12B)の生産を可能にする。

p 5 5 H C H 2 C H 3 1 c m y c 6 H i s G S (p H C H 2 C H 3 1 - T A G)
(図10Bおよび11)

I g G 1 タイプ免疫グロブリンのヒンジ領域(H)ならびに定常領域C H 2 およびC H 3 の、p 5 5 F l a g / R B S / 3 5 c m y c 6 H i s G S の B s t E I I 部位と N o t I 部位の間への挿入

逆転写はC について記載したとおりに、ただしオリゴヌクレオチド3' N o t I / H - C H 2 - C H 3 を用いて行う。

【0210】

S E Q I D N o . 4 2 および43の配列のオリゴヌクレオチドを使用:

【0211】

【化16】

5' BstE2/H-CH2-CH3

SEQ ID N°42:

CCGGCCATGGCCCAGGTCACCGTCTCCTCAGACAAAACCTCACACATGCC

3' NotI/H-CH2-CH3

SEQ ID N°43:

AAGCTTAATCTAGAGCGGCCGCTTTACCCGGAGACAGGGAG

【0212】

R T 後の P C R は、1 μ l の c D N A 、各 1 0 p m o l e のオリゴヌクレオチド5' B s t E 2 / H - C H 2 - C H 3 および3' N o t I / H - C H 2 - C H 3 、0 . 5 U の D y n a z y m e を用いて最終容量50 μ l として実施する(94、3分間; 94、1分間; 60、1分間; 72、1.5分間; を30サイクル、その後、72、10分間)。

【0213】

得られたプラスミドを通称 p H C H 2 C H 3 1 - T A G とし、該プラスミドは、C H 3 の末端に標識を備えた(H C H 2 C H 3)₂ タイプの抗体フラグメント(図12B)の生産を可能にする。

【0214】

p 5 5 H C H 2 C H 3 1 (p H C H 2 C H 3 1) (図10Bおよび11)

I g G 1 タイプ免疫グロブリンのヒンジ領域(H)ならびに定常領域C H 2 およびC H 3 の、p 5 5 F l a g / R B S / 3 5 c m y c 6 H i s G S の B s t E I I 部位と H i n d I I I 部位の間への挿入

逆転写はC について記載したとおりに、ただしオリゴヌクレオチド3' H i n d I I I / H - C H 2 - C H 3 を使用して行う。

【0215】

S E Q I D N o . 4 4 および45の配列のオリゴヌクレオチドを使用:

【0216】

10

20

30

40

【化 17】

5' BstE2/H-CH2-CH3

SEQ ID N°44 :

CCGGCCATGGCCCAGGTCACCGTCTCCTCAGACAAAACCTCACACATGCC

3' HindIII/H-CH2-CH3

SEQ ID N°45 : CCGCCAAAACAGCCAAGCTTATTTACCCGGAGACAGGGAG

10

【0217】

RT後のPCRは、1 μ lのcDNA、各10pmoleのオリゴヌクレオチド5' BstE2/H-CH2-CH3および3' HindIII/H-CH2-CH3、0.5UのDynaZymeを用いて最終容量50 μ lとして実施する(94 $^{\circ}$ C、3分間; 94 $^{\circ}$ C、1分間; 60 $^{\circ}$ C、1分間; 72 $^{\circ}$ C、1.5分間; を30サイクル、その後、72 $^{\circ}$ C、10分間)。

【0218】

得られたプラスミドを通称pHCH2CH3 1とし、該プラスミドは、(HCH2CH3)₂タイプの抗体フラグメント(図12B)の生産を可能にする。

20

VHHのクローニング

種々のフォーマットにおいて、任意のVHHをユニークな部位の間に導入可能である。

【0219】

Cの上流: EcoRIとBstEII(またはKpnI)の間、

CH1の上流: SfiIとNheIの間、

Hの上流: EcoRIとBstEII。

【0220】

このようにして、本発明者らは以下の5'および3'オリゴヌクレオチドの対を用いたPCRによって種々のVHHを増幅する。

SEQ ID No. 46~52の配列のオリゴヌクレオチドを使用:

30

【0221】

【化 1 8】

5' EcoR1-PelB55-PelBPHen

SEQ ID N°46:

CGACACCGGAATTCCATATGAAATACCTATTACCAACAGCAGCAGCTGGGTTA
TTAATTGCTCGCTGCGCAGCCGGCCATGGCCGAGGTGCAGCTG

5'VH1-Sfi

SEQ ID N°47:

CATGCCATGACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTGCAGCTGGTGCAGT
CTGG

5'VH2-Sfi

SEQ ID N°48:

CATGCCATGACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTTCACCTTGAAGGAGT
CTGG

5'VH3-Sfi

SEQ ID N°49:

CATGCCATGACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGT
CTGG

5'VH4-Sfi

SEQ ID N°50:

CATGCCATGACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTGCAGCTGCAGGAGT
CGGG

3' BstEII/KpnI

SEQ ID N°51:

GGTGCAGCCACGGTACCTGAGGAGACGGTGACCTG

3' BstE2/NheI

SEQ ID N°52:

GGGCCCTTGGTGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCTG

【 0 2 2 2】

生体特異抗体を生産、精製および特性解析

6HisGS標識を備えた種々の抗体フラグメントを、上述のように生産および精製する。標識のない抗体フラグメントの精製については、塩基に基づいたクロマトグラフィー工程を、抗体フラグメントの特性に応じた特性（陰イオンまたは陽イオン）のイオン交換カラムに置き換える。

【 0 2 2 3】

電気泳動ゲルを図13に示す。Fab'およびF(ab')₂は、コバルトカラムとその後のプロテインGカラムで精製する。その後、種々の抗体フラグメントをsuperdex(R)200（またはsuperdex75でもよい）で分離する。

【 0 2 2 4】

ヒトVHの単離方法およびベクターの構築

10

20

30

40

50

方法の原理は、ヒトVHドメイン（LFBポケット試料からRT-PCRによって単離されたもの）を、プラスミドp55PhoA6HisGS⁻/NAB⁻中にクローニングすることから成る（図10Aおよび11）。このプラスミドには、アルカリホスファターゼをコードする遺伝子が、発現不可能な読み枠として含まれている。VHをクローニングすることによりアルカリホスファターゼの読み枠が回復し、アルカリホスファターゼの上流にVHが融合したものを生産することが可能となる（細菌TG1株にクローニングされたVH-PhoAバンク）。その後、種々のクローンを96ウェルマイクロプレート中で作製し、該クローンの増殖速度を30分ごとにマイクロプレートから直接測定する（OD_{620nm}）。このようにして、増殖がVHの存在によって変化しないクローンを選択する。マイクロプレートから得たクローンを複製し、-80℃に保存する。37℃で2時間の誘導、または30℃、24℃もしくは18℃などでの16時間の誘導の後、増殖を停止させ、培地の上澄みから直接ホスファターゼ活性を測定する。ホスファターゼ活性は、各マイクロプレートのウェルに見出だされる細菌数と比例する。

【0225】

アルカリホスファターゼは、細菌ペリプラズム中に分泌される場合、ジスルフィド架橋が正確に形成された二量体の形態においてのみ活性を有する。この手法は、大部分の融合タンパク質VH-PhoAを細菌培地中に分泌させて生産するクローンの選択を可能にする。このようにして、正確に複製され、かつジスルフィド架橋が正確に形成され、したがって可溶性のVHを選択することが可能である。選択されたVHは、ヒトVHのCDRを前述のラマVHH由来のCDRに交換するための母体として使用される。VHは、そのCDR接合部のアミノ酸がVHHのアミノ酸と同等のVHを選択することにより選ばれる。

【0226】

RT-PCRおよびPCRの条件

ハイブリダイゼーション：

1μlの全RNA（第1.3.2項に記載の精製）を、1pmoleのオリゴヌクレオチド（3' JH1-4-5；3' JH2；3' JH3および3' JH6の混合物）とともに最終容量8μlとして70℃で10分間プレインキュベーションする。温度を徐々に（45分間）37℃まで低下させる。

【0227】

逆転写：

8μlをとり、0.5μlのRNAsine（20U）、3μlの5×バッファー（SuperScriptII、インビトロゲン）、1μlのDTT（100mM）、2μlのdNTP（10mM）を加え、50℃で10分間インキュベーションする。次に、0.75μlのSuperScript（150U）を加え、インキュベーションを50℃で30分間続け、さらに70℃で15分間行う。

【0228】

得られたcDNAを、ビーズ（BioMag、カルボキシル結合型、ポリサイエンズ（Polysciences））を用いて供給業者の推奨に従って精製する。最終的な溶解は15μlの10mMトリス・アセタートpH7.8で実施する。

【0229】

PCR1は、1μlのcDNA（RT-PCRによって得られたもの）、10pmoleの5'オリゴヌクレオチド（以下に配列を示す5'オリゴヌクレオチド各0.625pmole）および3'オリゴヌクレオチド（以下に配列を示す3'オリゴヌクレオチド各2.5pmole）、0.5UのDynaZymeを用いて実施する（95℃、3分間；次いで95℃、1分間；58℃、1分間；72℃、1分間；を35サイクル、次いで72℃、10分間）。PCR産物を2%アガロースゲルに供し、VHに相当するバンドを精製する（キアゲンのゲル抽出キット）。

【0230】

PCR2は、1/1000に希釈したPCR1を1μl、上記の同量のオリゴヌクレオチド、0.5UのDeep Ventを用いて、最終容量50μlとして実施する（94

10

20

30

40

50

、3分間；次いで94、1分間；70、1分間；72、1.5分間；を40サイクル、次いで72、10分間)。フラグメントを上述のように2%アガロースゲルから精製する。

【0231】

SEQ ID No. 53 ~ 72の配列のオリゴヌクレオチドを使用：

【0232】

【化19】

5' VH1a

SEQ ID N°53 :

CG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GG

10

5' VH1b

SEQ ID N°54 :

CG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GT(CT) CAG CT(GT) GTG CAG TCT GG

5' VH1c

SEQ ID N°55 :

CG GCC CAG CCG GCC ATG GCC (CG)AG GTC CAG CTG GTA CAG TCT GG

20

5' VH1d

SEQ ID N°56 :

CG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CA(GA) ATG CAG CTG GTG CAG TCT GG

5' VH2a

SEQ ID N°57 :

CG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTC ACC TTG AAG GAG TCT GG

5' VH2b

SEQ ID N°58 :

CG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG ATC ACC TTG AAG GAG TCT GG

30

5' VH3a

SEQ ID N°59 :

CG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GG

5' VH3b

SEQ ID N°60 :

CG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAA GTG CAG CTG GTG GAG TCT GG

40

5' VH3c

SEQ ID N°61 :

CG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GG

5' VH3d

SEQ ID N°62:

CG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG GTG CAG CTG GTG GAG (AT)C(TC)
(GC)G

5' VH4a

SEQ ID N°63:

CG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GG

10

5' VH4b

SEQ ID N°64:

CG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG CTG CAG CTG CAG GAG TC(GC) GG

5' VH4c

SEQ ID N°65:

CG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTG CAG CTA CAG CAG TGG GG

5' VH5a

SEQ ID N°66:

CG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GA(GA) GTG CAG CTG GTG CAG TCT GG

20

5' VH6a

SEQ ID N°67:

CG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG) GTA CAG CTG CAG CAG TCA GG

5' VH7a

SEQ ID N°68:

CG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTG CAG CTG GTG CAA TCT GG

30

3' JH1-4-5

SEQ ID N°69:

GTC TAG ACG TCC CCC CGG GGA GGA GAC GGT GAC CAG GG

3' JH2

SEQ ID N°70:

GTC TAG ACG TCC CCC CGG GGA GGA GAC AGT GAC CAG GG

3' JH3

SEQ ID N°71:

GTC TAG ACG TCC CCC CGG GGA AGA GAC GGT GAC CAT TG

40

3' JH6

SEQ ID N°72:

GTC TAG ACG TCC CCC CGG GGA GGA GAC GGT GAC CGT GG

【 0 2 3 3 】

種々の精製PCRフラグメントを、10UのNcoIおよびXmaIによって消化し、

50

ライゲーションによってクローニングベクター p55 / PhoA6HisGS⁻ / NAB⁻ に挿入する。ライゲーション混合物を FseI で消化してから細菌を形質転換する。形質転換は、エレクトロコンピテントな細菌 TG1 を用いてエレクトロポレーションによって実施する。VHドメインが挿入されたクローンではホスファターゼ活性が回復する（青色コロニー）。

【0234】

96 または 384 ウェルのマイクロプレートにおける生産：

対照：陰性対照の培地（2YT / 100 μg / ml アンピシリン）、陰性対照のベクター p55 / PhoA6HisGS⁻ / NAB⁻、陽性対照のベクター p55 PhoA6HisGS / NAB⁻。

10

【0235】

1 ウェル（Nunc lon (TM) surface、ヌンク（Nunc））あたり 150 または 40 μl の培地（2YT / 100 μg / ml アンピシリン）を分配する。各ウェルに、小楊枝または細胞用ピック（Qpix）を用いて単離された青色コロニーを接種し、次いでプレートを無菌接着シートで密閉する。900 rpm で稼動する IEMS (R) Thermoプレート・インキュベータ中に、37 °C または 30 °C で 16 時間置き、次に、96 または 384 ウェルのレプリケータを用いて、150 または 40 μl の 2YT / 100 μg / ml アンピシリンが入ったマイクロプレートに前記「母親」マイクロプレートのレプリカを作製する。次いで、無菌接着シートで密閉する。（レプリカ作製後、「母親」マイクロプレートには 1 ウェルあたり 37.5 または 10 μl の 80% のグリセロールを加え、-80 °C に保存する）。3 時間の培養（OD_{620nm} でおよそ 0.5）の後に、終濃度 100 μM の IPTG を用いて 16 時間誘導する。620 nm における OD を誘導の終了時に測定する。

20

【0236】

アルカリホスファターゼ活性の分析：

培養物全体（細胞 + 培地）を 10 μl、培養上清（これについては 910 g で 3 分間遠心分離する）を 10 μl とする。各サンプルに、65 μl の 10 mM トリス HCl pH 8.0 を加え、また 25 μl の PNPP（p-ニトロフェニルリン酸、（ジエタノールアミン pH 9.8（HCl）； MgCl₂ 0.5 mM）中に 1 mg / ml）を加える。攪拌しながら 30 分間反応させた後、405 nm で OD を測定する。

30

【0237】

405 nm で測定されたアルカリホスファターゼ活性を、誘導の終了時に各ウェルに含まれていた細胞数（620 nm での OD 測定値）で補正する。アルカリホスファターゼに融合した VH を発現するクローンのホスファターゼ活性をそれぞれ、陽性対照（p55 PhoA6HisGS / NAB⁻ によって生産された非融合型のアルカリホスファターゼ）の活性と比較する。対照と同等またはより高い活性を有するクローンだけを考慮し、オリゴヌクレオチド 5' EcoRI - 90 および 3' inf - PstI + 71（3' inf - PstI + 71 オリゴヌクレオチドの配列は GTTAAACGGCGAGCACCG）を用いて配列決定する。

【0238】

40

【表 2】

参照文献

- 1- Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 1993; 363 : 446-448. 10
- 2- Teillaud C, Galon J, Zilber MT, Mazieres N, Spagnoli R, Kurrle R, Fridman WH, Sautes C. Soluble CD16 binds peripheral blood mononuclear cells and inhibits pokeweed-mitogen-induced responses. *Blood*, 1993, 82 : 3081-3090).
- 3- Terskikh, A, Mach, JP, and Pèlegriin A. Marked increase in the secretion of a fully antigenic recombinant CEA obtained by deletion of its hydrophobic tail. *Mol Immunol*, 1993, 30:921-927.
- 4- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, 162 : 156-159. 20
- 5- Arbabi Ghahroudi M, Desmyter A, Wyns L, Hamers R, Muyldermans S. Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Lett*, 1997, 414 : 521-526.
- 6- Vivier E, Rochet N, Ackerly M, Petrini J, Levine H, Daley J, Anderson P. Signaling function of reconstituted CD16: zeta: gamma receptor complex isoforms. *Int Immunol*, 1992, 4 : 1313-1323.
- 7- Vély F, Gruel N, Moncuit J, Cochet O, Rouard H, Daré S, Galon J, Sautès C, Fridman WH, Teillaud J-L. A new set of monoclonal antibodies against human Fcγ₃RII (CD32) and Fcγ₃RIII (CD16): characterization and use in various assays. *Hybridoma*, 1997, 16 : 519-528. 30
- 8- Le Calvez H, Fieschi J, Green JM, Marchesi N, Chauveau J, Baty D. Paratope characterisation by structural modelling of two anti-cortisol single-chain variable fragments produced in *E. coli*. *Mol. Immunol*, 1995, 32 : 185-198.
- 9- Le Calvez H, Green JM, Baty D. Increased efficiency of alkaline phosphatase production levels in *Escherichia coli* using a degenerate PelB signal sequence. *Gene*, 1996, 170 : 51-55. 40

【図面の簡単な説明】

【 0 2 3 9 】

【図 1】本発明によって単離された 4 つの抗 CD 16 V H H (VHH ANTI-CD16) クローンのアミノ酸配列 (S E Q I D N o . 7 3 ~ 7 6、1 0 3 および 1 0 4) ならびに 4 つの抗 C E A V H H (VHH ANTI-CEA) クローンのアミノ酸配列 (S E Q I D N o . 7 7 ~ 8 0 および 1 0 5) を示す図。

【図 2】本発明によって単離された 4 つの抗 CD 16 V H H (VHH anti-CD16) クローンのヌクレオチド配列 (S E Q I D N o . 8 1 ~ 8 4、1 0 6 および 1 0 7) ならび 50

に4つの抗CEA VHH (VHH anti-CEA) クローンのヌクレオチド配列 (SEQ ID No. 85 ~ 88 および 108) を示す図。

【図3】分析した8種のVHHおよび対応する二重特異性抗体の特異性を実証するFACSの結果を示す図。縦軸：細胞数、横軸：FL-1蛍光強度。(Granulocytes：顆粒球)

【図4】分析した8種のVHHおよび対応する二重特異性抗体の特異性を実証するFACSの結果を示す図。縦軸：細胞数、横軸：FL-1蛍光強度。(Granulocytes：顆粒球)

【図5】二重特異性抗体の細胞上への接近可能性を実証するFACSの結果を示す図。縦軸：細胞数、横軸：FL-1蛍光強度。

【図6】2種の抗CD16 VHHと抗CD16モノクローナル抗体との間のELISAによる競合テストの結果を示す図。

【図7】2種の抗CD16 VHHと抗CD16モノクローナル抗体との間のFACSによる細胞上での競合プロファイルを示す図。縦軸：細胞数、横軸：FL-1蛍光強度。

【図8】2種の抗CD16 VHH、およびタイプF(ab')₂の抗CEA17/抗CD16 c21二重特異性抗体による、CD16Aの活性化の結果を示す図。

【図9】二重特異性抗体によって活性化されたナチュラルキラー細胞による細胞溶解の結果を示す図。

【図10A】本発明によるプラスミドの構築を示す図。

【図10B】本発明によるプラスミドの構築を示す図。

【図11】本発明のプラスミドの配列を示す図。

【図12A】Fab、Fab'、F(ab')₂、(HCH₂CH₃)₂ およびmAb*タイプの抗体フォーマットを示す図。

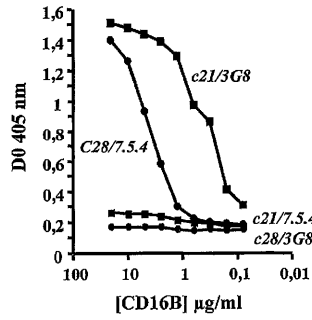
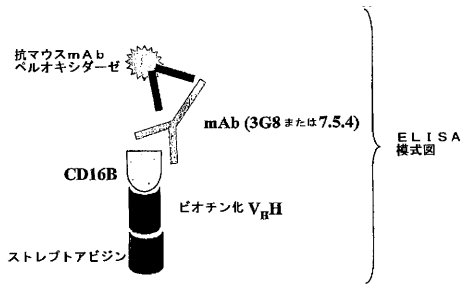
【図12B】Fab、Fab'、F(ab')₂、(HCH₂CH₃)₂ およびmAb*タイプの抗体フォーマットを示す図。

【図13】Fab、Fab'、F(ab')₂タイプの抗体フラグメントを精製する種々の工程における該フラグメントの電気泳動ゲルを示す図。

10

20

【 図 6 】



【 図 7 】

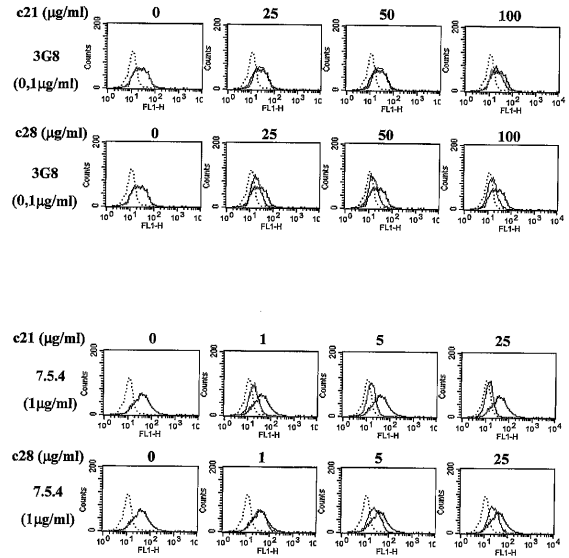


Figure 7

【 図 8 】

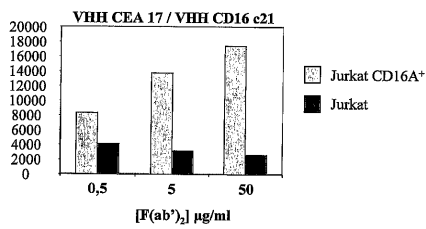
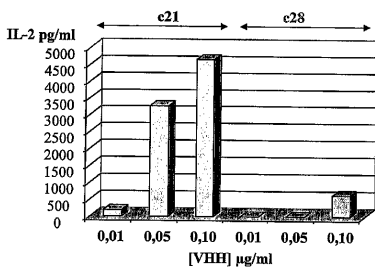
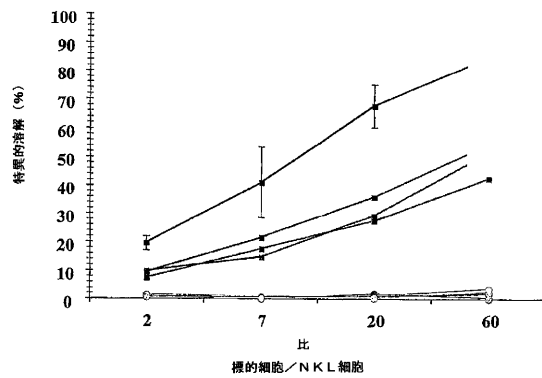
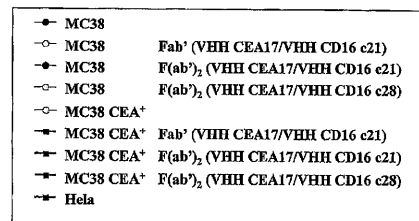


Figure 8

【 図 9 】



ggagcttatcgactgcaocgggcaacactctctccggctcaggcagccatoggaagctgggtatggctgtgca
 ggtcg
 taaatcaactgataaattctgctcctcgaagcgcaactccogctctggataatgttttttggccgacatacaac
 ggttc
 tggcaaatatctgaaatgagcgtgtgcaaatcaatcaactcggctcgtatacaatgctggaaatgtgagcggataca
 aattc
 caacaggaacaacGAATTCCATATGAATACCTATTACCAACAGCAGCAGCTGGGTTATTATTGCTCCCTGCCA
 GCCCG
 CCATGGCGccggcgcaactctcggcgctccggcgtCTGCGGCCctgtctctggaaacccggcgtctcaggcgtat
 attac
 tgcacccggcggctcgcgcgctttaaocgggtatcagaatgcgcgtctcgggtgatctctcttagogataaacctgc
 aaaaa
 atatttttctgctgattggcgtatggatgggggactcggaaatctacgcgcgcgttaattatgcgaaggtcggg
 cggcg
 ttttttaaggtatagatgcttaccggtacccggcaatacaactcactatgctgctgaaataaaaaacccggcaaa
 ccgga
 ctacgtcaocgactcggctcactcagcaacccgctcgtcaacccgcttcaaaaactataacccggcctcggcgt
 cgaata
 tcccgaaaaagatcaacccagctctctggaatgcaaaagccggcgtctggcgaacccggttaactcaccg
 cagag
 ttgcagagtgccaccccgctcgcgctggcaactgtgacctcggcgaactcactacggtccgagccgcaactg
 gaaaa
 atgtccgggttaacgctctggaaaaggcggaaaggatcgaatcaccagacgctctaaocgctcggcgcagct
 taacc
 ttggcggcggcgaacaaactctgctgaaacggcaacccgctggaatggcagggaaaaacgctcgtgcaacagg
 caacg
 ggcgctgggtatcagttggctgagcgtcctcactcaatctcggtaacgggaagcgaatcaacgaaacccctg
 ctgg
 cctgttctgctcggcgaactcgcagctcggctgctgagcgaacgaacgtaCCACGGcaatcgtataagcc
 cgcag
 tcaactgtacccaaactccgcaactaagcagcttaacacccctggcgcagatgaccgcaaaacccatgaaat
 tgttg
 agtataaattgaaaggcttttctcgaagtgaaggctcgaatcgaataaacaggatcatgctcgaatacct
 tgttg
 gcaaatggcggaaggctcgtatcgaatgaacccgcaacccgctggaatcgtataaaaaggaggttaaac
 gctgg
 tcaactcaccgctgataccgcaacccgcaacccgcaactgctggcggcgaatcaccagaaacccctg
 cgtca
 aatcaaaaagatggcggatgaggtgagtgagttcagggaactccgaagagatcaaaagaaataccggcagt
 cagtt
 gogtatggcggcgaatggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
 gaaag
 ccgctctggggctgaaacCATCATCATCACCTACCGGcaactAACTTggctgtttggcggatgagagaag
 attt
 cagcctgatacagatataacagaaacccgcaacccgctctgataaaacagaaatggcctggcggcagtagccggt
 ggtcc
 caactgaccccaactcgcgaactcagagtgaaacccgctgagcggcggatggtagtgggtctcccactcggagag
 taggg
 aactcgcaggcgtcaataaaaacgaaaggctcagtgaaagactggcctctcgtttatctgtgtttgtcggg
 gaaag
 cctcctcggatgaggaacaaactccgcaacccgcaacccgcaacccgcaacccgcaacccgcaacccgcaaccc
 cagg
 ccgcccgaataaactccagcgaactcaaatgacgaagacccctcctgacggatggccttttggctttctcaaa
 actct
 t

p55/M61

gggcttatcgactgcaocgggcaacactctctccggctcaggcagccatoggaagctgggtatggctgtgca
 ggtcg
 taaatcaactgataaattctgctcctcgaagcgcaactccogctctggataatgttttttggccgacatacaac
 ggttc
 tggcaaatatctgaaatgagcgtgtgcaaatcaatcaactcggctcgtatacaatgctggaaatgtgagcggataca
 aattc
 caacaggaacaacGAATTCCATATGAATACCTATTACCAACAGCAGCAGCTGGGTTATTATTGCTCCCTGCCA
 GCCCG
 CCATGGCGccggcgcaactctcggcgctccggcgtCTGCGGCCctgtctctggaaacccggcgtctcaggcgtat
 attac
 tgcacccggcggctcgcgcgctttaaocgggtatcagaatgcgcgtctcgggtgatctctcttagogataaacctgc
 aaaaa
 atatttttctgctgattggcgtatggatgggggactcggaaatctacgcgcgcgttaattatgcgaaggtcggg
 cggcg
 ttttttaaggtatagatgcttaccggtacccggcaatacaactcactatgctgctgaaataaaaaacccggcaaa
 ccgga
 ctacgtcaocgactcggctcactcagcaacccgctcgtcaacccgcttcaaaaactataacccggcctcggcgt
 cgaata
 tcccgaaaaagatcaacccagctctctggaatgcaaaagccggcgtctggcgaacccggttaactcaccg
 cagag
 ttgcagagtgccaccccgctcgcgctggcaactgtgacctcggcgaactcactacggtccgagccgcaactg
 gaaaa
 atgtccgggttaacgctctggaaaaggcggaaaggatcgaatcaccagacgctctaaocgctcggcgcagct
 taacc
 ttggcggcggcgaacaaactctgctgaaacggcaacccgctggaatggcagggaaaaacgctcgtgcaacagg
 caacg
 ggcgctgggtatcagttggctgagcgtcctcactcaatctcggtaacgggaagcgaatcaacgaaacccctg
 ctgg
 cctgttctgctcggcgaactcgcagctcggctgctgagcgaacgaacgtaCCACGGcaatcgtataagcc
 cgcag
 tcaactgtacccaaactccgcaactaagcagcttaacacccctggcgcagatgaccgcaaaacccatgaaat
 tgttg
 agtataaattgaaaggcttttctcgaagtgaaggctcgaatcgaataaacaggatcatgctcgaatacct
 tgttg
 gcaaatggcggaaggctcgtatcgaatgaacccgcaacccgctggaatcgtataaaaaggaggttaaac
 gctgg
 tcaactcaccgctgataccgcaacccgcaacccgcaactgctggcggcgaatcaccagaaacccctg
 cgtca
 aatcaaaaagatggcggatgaggtgagtgagttcagggaactccgaagagatcaaaagaaataccggcagt
 cagtt
 gogtatggcggcgaatggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
 gaaag
 ccgctctggggctgaaacCATCATCATCACCTACCGGcaactAACTTggctgtttggcggatgagagaag
 attt
 cagcctgatacagatataacagaaacccgcaacccgctctgataaaacagaaatggcctggcggcagtagccggt
 ggtcc
 caactgaccccaactcgcgaactcagagtgaaacccgctgagcggcggatggtagtgggtctcccactcggagag
 taggg
 aactcgcaggcgtcaataaaaacgaaaggctcagtgaaagactggcctctcgtttatctgtgtttgtcggg
 gaaag
 cctcctcggatgaggaacaaactccgcaacccgcaacccgcaacccgcaacccgcaacccgcaacccgcaaccc
 cagg
 ccgcccgaataaactccagcgaactcaaatgacgaagacccctcctgacggatggccttttggctttctcaaa
 actct
 t

ttgtttatcttctaaatcaactcaaatatgatacgcctcagcgaataaaccctgataaactcctcaataata
 ttgaa
 aaaggaagagatgagatcaactctcogctcgccttctccctttttggcgaatttgcctcctcgttt
 ttgct
 caccocgaacgctgggaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcaocgaggtttacatcgaactggat
 ctcaa
 cagcggtaagactcctgagcgttttcccccgaagaaagctttcccaatgatgagcactttaaagctctgctatg
 tggcg
 cgttatctccgcttgtagcggcggcgaagcctctcggcgcgcatacactattcagaatgacttgggt
 agtac
 tccaccgtcaacgaagaacatctcaggatgcaatgacagtaagagatctgcaagctgctgcaataacccatgag
 gataa
 caactcggcccaactcactctgacaacgactcggaggcaacgaggaactaacocgtttttgcaacaaactgggga
 caatg
 taaocgctctgactgctgggaacggcgtgaaatgaaocccaaacgcaagcgtgcaacacagatgctg
 tagca
 atggcaaacacgcttgcaaacacttaactggcgaactcactcactcagctcccccgaacaaataatgactgctg
 atgga
 gggggaataaagtggcgaacccactctcgcctcggccctcogctcggctggtttatgctgataaactcggagc
 cgttg
 agcgtgggtctcgggtaacttgcagcactggggcagatggttaagcctccgtatcgtatctcaacga
 cgggg
 agccaggcaactatggatgaacgaatagacagatcgtcagatagggtcctcactgatlaagcattggttaactg
 tccga
 ccaagttactcactatactttatgattttaaactcatttttaattaaaggatctaggtgaagatcct
 ttttg
 ataatctcagcaacaaactccctaaagctgattttcgttccactcagcctcagcccccagaaagatcaaaag
 gatct
 tcttgagatcctttttctcggcgttaactcgtctgtctgcaaacaaaaaacccocgctaccagcgggttgt
 ttgoc
 ggatcaagagatacactccttttccgaagtaactggctcagcagagcgcagatacccaactcgtcctct
 agtgt
 agcgtagttaggcccaactcaagaactctgtagcaacccctcaactcagcagcgcagatacccaactcgtcctct
 tggct
 gctcagctggcgaataagctcgtcttaccggctggactcaagcagatgctaccggaataaggcagcagcgtg
 ggetg
 aaocgggggtctgtgcaacacccagcactggaggaacgctcaacacgcaactcagatcactcaagcgtgagca
 ttgag
 aaagcggcagcctcccgaggggagaagcggcagagatccggtaagcggaggtcggaaacaggaagcgcga
 ccggg
 ggcgtccagggggaaacccctggtatctttagctcgtcgggttccgcaactcagatcagcagcagcagcagc
 ttgtg
 atgctcagggggggcggcagcctatgaaacacccagcaacccgcttccgcaactcagatcagcagcagcagc
 ggcct
 ttgctcaatgctctctcctcgtctcctcctgcttctggatgcaacccatcagcctttgagtagctgata
 ccgct
 ccgcccagcgaacacccagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 ctctac
 gcaactcgtggggttttcaacacgcatatagtgcaactcagtaacactcgtcgtcagcagcagcagcagcagc
 cagta
 tcaactcagctatcgtcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 ccggc
 ttgctcgtccggcactcgttcaacagcaactgtagcagcctccggagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 gctat
 caacgaacccggcagc
 catcc

p55/M61

ggagcttatcgactgcaocgggcaacactctctccggctcaggcagccatoggaagctgggtatggctgtgca
 ggtcg
 taaatcaactgataaattctgctcctcgaagcgcaactccogctctggataatgttttttggccgacatacaac
 ggttc
 tggcaaatatctgaaatgagcgtgtgcaaatcaatcaactcggctcgtatacaatgctggaaatgtgagcggataca
 aattc
 caacaggaacaacGAATTCCATATGAATACCTATTACCAACAGCAGCAGCTGGGTTATTATTGCTCCCTGCCA
 GCCCG
 CCATGGCGccggcgcaactctcggcgctccggcgtCTGCGGCCctgtctctggaaacccggcgtctcaggcgtat
 attac
 tgcacccggcggctcgcgcgctttaaocgggtatcagaatgcgcgtctcgggtgatctctcttagogataaacctgc
 aaaaa
 atatttttctgctgattggcgtatggatgggggactcggaaatctacgcgcgcgttaattatgcgaaggtcggg
 cggcg
 ttttttaaggtatagatgcttaccggtacccggcaatacaactcactatgctgctgaaataaaaaacccggcaaa
 ccgga
 ctacgtcaocgactcggctcactcagcaacccgctcgtcaacccgcttcaaaaactataacccggcctcggcgt
 cgaata
 tcccgaaaaagatcaacccagctctctggaatgcaaaagccggcgtctggcgaacccggttaactcaccg
 cagag
 ttgcagagtgccaccccgctcgcgctggcaactgtgacctcggcgaactcactacggtccgagccgcaactg
 gaaaa
 atgtccgggttaacgctctggaaaaggcggaaaggatcgaatcaccagacgctctaaocgctcggcgcagct
 taacc
 ttggcggcggcgaacaaactctgctgaaacggcaacccgctggaatggcagggaaaaacgctcgtgcaacagg
 caacg
 ggcgctgggtatcagttggctgagcgtcctcactcaatctcggtaacgggaagcgaatcaacgaaacccctg
 ctgg
 cctgttctgctcggcgaactcgcagctcggctgctgagcgaacgaacgtaCCACGGcaatcgtataagcc
 cgcag
 tcaactgtacccaaactccgcaactaagcagcttaacacccctggcgcagatgaccgcaaaacccatgaaat
 tgttg
 agtataaattgaaaggcttttctcgaagtgaaggctcgaatcgaataaacaggatcatgctcgaatacct
 tgttg
 gcaaatggcggaaggctcgtatcgaatgaacccgcaacccgctggaatcgtataaaaaggaggttaaac
 gctgg
 tcaactcaccgctgataccgcaacccgcaacccgcaactgctggcggcgaatcaccagaaacccctg
 cgtca
 aatcaaaaagatggcggatgaggtgagtgagttcagggaactccgaagagatcaaaagaaataccggcagt
 cagtt
 gogtatggcggcgaatggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
 gaaag
 ccgctctggggctgaaacCATCATCATCACCTACCGGcaactAACTTggctgtttggcggatgagagaag
 attt
 cagcctgatacagatataacagaaacccgcaacccgctctgataaaacagaaatggcctggcggcagtagccggt
 ggtcc
 caactgaccccaactcgcgaactcagagtgaaacccgctgagcggcggatggtagtgggtctcccactcggagag
 taggg
 aactcgcaggcgtcaataaaaacgaaaggctcagtgaaagactggcctctcgtttatctgtgtttgtcggg
 gaaag
 cctcctcggatgaggaacaaactccgcaacccgcaacccgcaacccgcaacccgcaacccgcaacccgcaaccc
 cagg
 ccgcccgaataaactccagcgaactcaaatgacgaagacccctcctgacggatggccttttggctttctcaaa
 actct
 t

p55/Flag/RBS/35

ttgtttatcttctaaatcaactcaaatatgatacgcctcagcgaataaaccctgataaactcctcaataata
 ttgaa
 aaaggaagagatgagatcaactctcogctcgccttctccctttttggcgaatttgcctcctcgttt
 ttgct
 caoccoaagaacgctgggaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcaocgaggtttacatcgaactggat
 ctcaa
 cagcggtaagatccttgagatgtttcccccgaagaaagctttcccaatgatgagcactttaaagctctcgtatg
 tggcg
 cgttatctccgcttgtagcggcggcgaagaaactcggctcgcgcatacactattcagaatgacttgggt
 agtac
 tcaocgctcacaagaagacatctcggatggcagcagtaagagatgctcogctgctgccaatacactagatg
 gataa
 caactcggcccaactcactctgcaacagatcggagagcgaagagotaaocgcttttttgcacaactggggga
 caatg
 taaactcgtctgactgctgggaacccgagctgaatgaaocccaaacgcaagcgtgcaacacagatgctg
 tagca
 atggcaacagcttgcccaacttaactggcgaactcactcactcagctcagctcccccgaacaaataatgactg
 atgga
 ggggataaagtggcaacccactctcgcctcggccctcogctcggctggtttatgctgataaactcggagc
 cgttg
 agcgtgggtctcgggtatcactcagcagcctggggcagatggttaagcctcctcgtatcgtatctcaacga
 cgggg
 agtcagggcaactatgatacaaaatagacagatcgtcagataggtgctcactgatlaagatggttaactg
 tccga
 ccaagtttaactatatacttttagatgattttaaactcatttttaattaaaggatctaggtgagatcct
 ttttg
 ataatctcagcaacaaactccctaaocgtgagtttctgctccactgagcgtcagcccccagcagcagcagcagc
 gatct
 ccttgagatcctttttctcggcgttaactcgtcgtctgcaacaaaaaacccocgctaccagcagcgggttgt
 ttgoc
 ggaacagagctcaacactctttccgaagtaactggctcagcagagcgcagatacaaaactcgtcctctc
 agtgt

agccgtagttaggccaccactcaagaactctgtagcaccgctacacactcgtctgttaactcgttaccg
 tggc
 gctccgtagtggcgaatagctgtctaccgggttgactcaagcagatagtagccggaataggcgcggtg
 gctg
 aacgggggtctgtgcaacagccagctggcgaacgactacacggaactgagatacctcagcgtgagca
 ttgag
 aaagccacgcttccgaagggaagaaggcaggtaccggttaagcggagggtaggaacaggaagcga
 cggg
 gagcttccgggggaacgctgtatctttagctctgtcgggtttcggcaactgactttagctgagctg
 ttggt
 atgctcgtcagggggcggagcctatggaanaacccagcaacggcgtctttacgggtcctggtcttctg
 gctt
 tigtacacagctcttctcgttctccctgctctgtgtagtaaacgctatccgctttagttagctgata
 cggc
 cggccagcgcgaacagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 ctacc
 gbatctgtgggtatccacacgcataatggtgactctcagtaacatctgctctgatgcccagctatg
 taagc
 cagta
 tacactccgctatcgtcagctgactgggtcagctgcccagcaccgcaacacccgcaacccgctgac
 cggc
 ttgctgctccggcactccgctacagcaagcgtgacgctctccgggactgctgctgagaggtttccac
 gctac
 caccgaacccggcagcgtcggtaagcctcactcagcgtctgtagagcgttccagagatccagcgt
 ctacc
 cgtccagcctcgtttagtcttccagaaagcgttaagctggctctgataaagcggcctgtaagggcgt
 ttttc
 ctgtttggtcactgactcctcgttaggggaaattctgttccatggggtaagtagacagatgaacagag
 agat
 gctcaagatccgggttactgatgataacatgcccggcttactgacagctgtgagggtaaacactg
 gctgtag
 gggggaccagagaaaaactcactcaggtcaatggcagcgtcttcttaacagatgtaggtttccacag
 ggtg
 gcaagcagctcctgagatcagcaataatggtagggcgtgactcggcgtttccagactttacga
 aacga
 cggaa
 accgaagccactctgctgtgctcagctcagcagcgtttgtagcagcagcgtcgttccagctctg
 cgtg
 atcactctgtaacagcaaacccgcaacgctgacggtcctcaacgacaggaacagcagcagcagc
 cggc
 gggcaggaaccaacgctgcccagagatgcccggctgcccggctggagatggcagcagcagcagc
 caag
 gtgtgtttgagcattccagcttccgcaagatgtagttgctccactctggaggtggaactcagc
 agcag
 gtgcccctccactcagctcaggtggcggcgtccatcaccgacgacgacgagcagcagcagcagc
 agat
 gggg
 cggctcaaatccatgcccacccgctccatgctgctcggcagcggcgaataacatcagcagcagc
 agc
 gtagc
 gaagttagctgtagaagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 atggc
 ctgcaacggcggcactccgagcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
 gaac
 ccagcaagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 ccgc
 ttccagctgggaaacccctgctccagcctgacttaagatggcgaacccgcaacccgggagagc
 ggttctgctat
 tggg
 gcccgggtgggttttcttctccagctgagcagcggcaacagcagctgctccctcaccgctg
 ggcgagcgt
 tgcag
 caagcggctccagcctgggttcccccagcagcggaaactcctgtttagctgggtgagcggcgg
 gataacatg
 cgtgt

ctcggtagttaggccaccactcaagaactctgtagcaccgctacacactcgtctgttaactcgttaccg
 tggc
 gctccgtagtggcgaatagctgtctaccgggttgactcaagcagatagtagccggaataggcgcggtg
 gctg
 aacgggggtctgtgcaacagccagctggcgaacgactacacggaactgagatacctcagcgtgagca
 ttgag
 aaagccacgcttccgaagggaagaaggcaggtaccggttaagcggagggtaggaacaggaagcga
 cggg
 gagcttccgggggaacgctgtatctttagctctgtcgggtttcggcaactgactttagctgagctg
 ttggt
 atgctcgtcagggggcggagcctatggaanaacccagcaacggcgtctttacgggtcctggtcttctg
 gctt
 tigtacacagctcttctcgttctccctgctctgtgtagtaaacgctatccgctttagttagctgata
 cggc
 cggccagcgcgaacagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 ctacc
 gbatctgtgggtatccacacgcataatggtgactctcagtaacatctgctctgatgcccagctatg
 taagc
 cagta
 tacactccgctatcgtcagctgactgggtcagctgcccagcaccgcaacacccgcaacccgctgac
 cggc
 ttgctgctccggcactccgctacagcaagcgtgacgctctccgggactgctgctgagaggtttccac
 gctac
 caccgaacccggcagcgtcggtaagcctcactcagcgtctgtagagcgttccagagatccagcgt
 ctacc
 cgtccagcctcgtttagtcttccagaaagcgttaagctggctctgataaagcggcctgtaagggcgt
 ttttc
 ctgtttggtcactgactcctcgttaggggaaattctgttccatggggtaagtagacagatgaacagag
 agat
 gctcaagatccgggttactgatgataacatgcccggcttactgacagctgtgagggtaaacactg
 gctgtag
 gggggaccagagaaaaactcactcaggtcaatggcagcgtcttcttaacagatgtaggtttccacag
 ggtg
 gcaagcagctcctgagatcagcaataatggtagggcgtgactcggcgtttccagactttacga
 aacga
 cggaa
 accgaagccactctgctgtgctcagctcagcagcgtttgtagcagcagcgtcgttccagctctg
 cgtg
 atcactctgtaacagcaaacccgcaacgctgacggtcctcaacgacaggaacagcagcagcagc
 cggc
 gggcaggaaccaacgctgcccagagatgcccggctgcccggctggagatggcagcagcagcagc
 caag
 gtgtgtttgagcattccagcttccgcaagatgtagttgctccactctggaggtggaactcagc
 agcag
 gtgcccctccactcagctcaggtggcggcgtccatcaccgacgacgacgagcagcagcagcagc
 agat
 gggg
 cggctcaaatccatgcccacccgctccatgctgctcggcagcggcgaataacatcagcagcagc
 agc
 gtagc
 gaagttagctgtagaagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 atggc
 ctgcaacggcggcactccgagcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
 gaac
 ccagcaagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 ccgc
 ttccagctgggaaacccctgctccagcctgacttaagatggcgaacccgcaacccgggagagc
 ggttctgctat
 tggg
 gcccgggtgggttttcttctccagctgagcagcggcaacagcagctgctccctcaccgctg
 ggcgagcgt
 tgcag
 caagcggctccagcctgggttcccccagcagcggaaactcctgtttagctgggtgagcggcgg
 gataacatg
 cgtgt

F59Plag/RBS/35cmcy6E1E6S

ttggttatttttataacacattcaaatatgtagctcagcagcaataaccctgataaatgctcaataa
 ttgaa
 aaaggaaagatgagatgtaacacattccgctgctcccttattcccttttggcgtatttgctcctg
 ttgct
 caccgcaaacgctggtgaaagtaaaagctgtagagatcagttgggtgcaagcagctggatccact
 gtaac
 ctcaa

cagcgttagatccttgagagtttccgcccgaagaagcgtttccaatgatgagcactttaaagttctgctatg
 tggcg
 cggtaattaccgctgtgagcgggcaagagcaactcggctcggcagcactcaactctccagaaatgactgggtg
 agtao
 tccagcgtcacaagaagaactcctaccagctggcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 gataa
 cactggggcaacttactctgcaacagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 tcaatg
 taactcggctgactcgttgggaacccgagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 tagca
 atggcaaacagcttggcgaacattaaactggcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 atgga
 gggcagtaaaagctgcaagcaactcctcggcctcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
 cgggt
 agcgtgggtctcggcgtatcctgcaacagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 cggg
 agtcaggcaactatgagtagaagaaatagacagatcgtgagataggtgctcactgataagcattggttaactg
 tcaag
 ccaagtttactcaatatactttagatgatttaaaactcatttttaattaaaggatctaggtgaagatcct
 ttttg
 ataactcagcagcaaacctccttaagctgagtttctgctcactgagcgtcagaacccctgagaagaatcaaa
 gatct
 tctlgagactcctttttctcggcgttaactcgtctgcttgcaaacaaaaaaaccacagcagcagcagcagc
 tggc
 ggtcaagagctcaaacctcctttccgaaggttaactggctcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 agtgt
 agcgtgtagttagcagcacttcaagactctgtagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 tggct
 gctccagctggcgaactcgtgcttaccgggttggactcaagcagatagttaccggataagggcagcagcagc
 gggc
 aacgggggttctgcaacagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 ttgag
 aaagcggcagcgttccgaagggaagggcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 cggg
 gggctccaggggaaacgctggtatctttagctcgtcgtgggtttccgcaactcctgactgagcgtcagatt
 ttggt
 atgctcgtcagggggcggagcctatggaanaacccgcaacggcgtctttacggctctcctggcctttgctg
 gctt
 ttgctcaactgcttctcctgcttaccctgctctgctgggataacagcttaccgctttgagtagctgata
 cggc
 cggccagcgcgaacagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 ctacc
 gcatctgtgggtatccacacgcataatggtgactctcagtaacatctgctctgtagcggcagtagtaagc
 cagta
 tacactccgctatcgtcagctgactgggtcaggtgctggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
 cggc
 ttgctgctcggcactccgctacagcaagcgtgtagcgtctccgggactgactgctcagaggtttccac
 gctac
 cccgcaaacggcggcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 cggc
 gggcagc
 ctacc
 ctgtttggtcaactgactcggcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 agat
 gctcagc
 gtagc
 gggggaccagagaaaaactcactcaggtcaatggcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 ccag

cagcgttagatccttgagagtttccgcccgaagaagcgtttccaatgatgagcactttaaagttctgctatg
 tggcg
 cggtaattaccgctgtgagcgggcaagagcaactcggctcggcagcactcaactctccagaaatgactgggtg
 agtao
 tccagcgtcacaagaagaactcctaccagctggcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 gataa
 cactggggcaacttactctgcaacagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 tcaatg
 taactcggctgactcgttgggaacccgagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 tagca
 atggcaaacagcttggcgaacattaaactggcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 atgga
 gggcagtaaaagctgcaagcaactcctcggcctcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
 cgggt
 agcgtgggtctcggcgtatcctgcaacagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 cggg
 agtcaggcaactatgagtagaagaaatagacagatcgtgagataggtgctcactgataagcattggttaactg
 tcaag
 ccaagtttactcaatatactttagatgatttaaaactcatttttaattaaaggatctaggtgaagatcct
 ttttg
 ataactcagcagcaaacctccttaagctgagtttctgctcactgagcgtcagaacccctgagaagaatcaaa
 gatct
 tctlgagactcctttttctcggcgttaactcgtctgcttgcaaacaaaaaaaccacagcagcagcagcagc
 tggc
 ggtcaagagctcaaacctcctttccgaaggttaactggctcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 agtgt
 agcgtgtagttagcagcacttcaagactctgtagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 tggct
 gctccagctggcgaactcgtgcttaccgggttggactcaagcagatagttaccggataagggcagcagcagc
 gggc
 aacgggggttctgcaacagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 ttgag
 aaagcggcagcgttccgaagggaagggcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 cggg
 gggctccaggggaaacgctggtatctttagctcgtcgtgggtttccgcaactcctgactgagcgtcagatt
 ttggt
 atgctcgtcagggggcggagcctatggaanaacccgcaacggcgtctttacggctctcctggcctttgctg
 gctt
 ttgctcaactgcttctcctgcttaccctgctctgctgggataacagcttaccgctttgagtagctgata
 cggc
 cggccagcgcgaacagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 ctacc
 gcatctgtgggtatccacacgcataatggtgactctcagtaacatctgctctgtagcggcagtagtaagc
 cagta
 tacactccgctatcgtcagctgactgggtcaggtgctggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
 cggc
 ttgctgctcggcactccgctacagcaagcgtgtagcgtctccgggactgactgctcagaggtttccac
 gctac
 cccgcaaacggcggcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 cggc
 gggcagc
 ctacc
 ctgtttggtcaactgactcggcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 agat
 gctcagc
 gtagc
 gggggaccagagaaaaactcactcaggtcaatggcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 ccag

ttgctgctccggcactccgcttcacagaacagctgtgacgctctccggagctgcatgtgtcagaggttttccac
 gcoat
 cccgaaacccgagcagctgctgtaagctcctacagcgtgctgtaagagcttccacagatgtcgcctgtt
 catcc
 gctccagcctgctgagcttccacagaacgcttctgctctctgtaaaagcggccatgttaagggcgctt
 ttttc
 ctgttggctcaactgagctcctgtaaggggaaatctctgctcctggtgggttaagatccagatgaacagag
 aggat
 gctcagctacgggttactgtagtaaacctgcccgttctcggaaactgtgagggtaaaacacccggcgatg
 tagtc
 ggccggaccagagaaatacactcagggctcaatgcccagcctctgcttaatacagatgtaggtgttccacaggyta
 gccag
 cagcctcctcggatgagatccagcaataatggtcagggcgctgactccgcttccagacttccgaaaca
 cggaa
 acgaaagacattcatgttctgctcaggtgtagcagcttctgacagcagctcctcagcttccgctcctgct
 cggctg
 atctcatctgtaaaccaaggaaccccgccagcctgacgggtctcctcaacagcagagcagatcatcgcca
 cccgt
 ggccaggaacaaagctgcccagagctgcccggctgctgctgctgagagatggccagcagatgtagatgttctg
 caagg
 gtgggtttgcaatccagcttcccgcaagaatgtagtctcctcaatctctggaggtgtagatccgttagcag
 gtagc
 gtcggcttccatccagctgaggtggccggctcctgacccogcgaacccggggagagcagcaagtagatag
 cggcg
 cgcctcaaatccatgcaaacctgctcctgctgcccggcgagcaataatcgcctgtagcagatcagcggctcag
 tgate
 gaagttagcctggttaagagcggcagcctcctggaactgcccctgagctcctcctgctcctgctgagcagc
 atgpc
 ctgcaacggcggtcccgatgcccgggaagcagcaagaatacctaaatgggaaagccatccagctcggctcgc
 gaag
 ccagcaagcagtagccagcggctcggcagctgcaatctcggctcaactcaatgagctgctcctcctgctcct
 cccgc
 tttccagctcgggaaacctgctgctcagctgctcaatgaaatcgcccaacccggggagagcgggttgcgctat
 tggcg
 gccaggggtgggttttcttccagctgagcagggcgaacagctgagctcctcagcggctcggctcggagagat
 tgcag
 caagcggctccagctggtttgcccagcagcggaaatctcctgctgagctggttgcagcggcagataaactga
 gctgt
 ctctggatctgctgctcctcctcagagatctccgcaacacccggcagcggctcctcctcctgctgctgctg
 cggcc
 agcgcctctgctgctgctgcaacccggctcagctggggaacagctcctcctcctcctcctcctcctcctcct
 aaacc
 ggaacggcct
 agcca
 gacgcagcagcggcggcgaacaaactaaggtcccgctcaacagcggctgtagctgtagcctcctcctcctcct
 gctcc
 accgagctcct
 aacgc
 cggaaactagtcagcagcctccacagcaatgtagctgtagctgtagctgtagctgtagctgtagctgtagctg
 gacgc
 gttgcggcagagatgtagcagcagcctcagcctggcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 tggca
 cccagctgtagcggcagatgtagcagcagcctcagcctggcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 agcgc
 aatcagc
 tccca
 cttttcccgcttctccgcaaacctgctgctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcct
 cctac

tctgcaactcgtataacgttaactggtttccattccaccctgaatgactctctccggcgctcctcctgca
 atacc
 ggaaaggttttgcgcaatcagatggttcaagctaaatgctcagcctgctcctcctcctcctcctcctcctcct
 gatcc
 ggagcttatcagcctcagcctgcaacactgctctggcctcagggcagcctcggaaagctggttagctgtgca
 agctg
 taaatcactgcaataactgctcagcctcagcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcct
 gttcc
 tggcaaatctcgaatgagctgtgcaatctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcct
 aattt
 caacagaaacaGAATTCCatATGAAATACCTATTACAAACAGCAGCAGCTGGGTATTATTCTCCCTCCGCA
 CCGGG
 CCATGGcccaAGTCCCTctcctcaGACAAATTCACACATGCCACCGTCCCAAGcaactcctcctggggg
 gacgc
 tccgtctcct
 tggga
 cctgagccagaaacccctggagctcaagtcaactgtagctgtagcctgtagcctgtagcctgtagcctgtagcct
 cggcg
 ggaggagcagctacaacagcagctcgggtggctcagcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcct
 agag
 tcaactgcaaggtctcccaacaaacccctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcct
 CCAAA
 ACCCAAGTGTATACCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCT
 AGGCT
 TCTATCCAGCCGACATCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCT
 TCTCT
 GACTCCGACCGCTCCT
 TCTCT
 CTCCCTGATGATGAGCT
 gctgt
 tttggcagtagagagagatctcagcctgtagcagatgaaatcagaaagcagcagcctgtagcctgtagcctgtag
 tggc
 tggcggcagtagcagcctgtagcctgtagcctgtagcctgtagcctgtagcctgtagcctgtagcctgtagcctgtag
 tggc
 ggtctcct
 cgttt
 taactgtgtttgctgtagcagcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcct
 acgca
 cggggagcct
 atgcc
 ctbtgtgcttctcct

F55CKFlag/RBS/35cmv6E1aGS

tgtttatttttcaatacattcaaatgtagtccgctcagcagcaaacctgataaactgttcaataata
 ttaga
 aaaggaagatgtagatctcaactctcctgctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcct
 ttgct
 caccagaaacgctggtgaaatgaaagctgtagcagtagtgggtgtagcagtagggttagcagtagggttagcagtagg
 ctcaa
 cagcgttaagatcctgtagagtttgcggcgaagcagcttcccaatgtagcagtagggttagcagtagggttagcagtagg
 ttgag
 cgttatctcctggttagcagcggcgaagcaactcctgctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcct
 agtac
 tccagctcagcaaaagcattctcagcagtagcagtagcagtaggtaggtaggtaggtaggtaggtaggtaggtaggtagg
 gataa

cactcgggccaacttactctgacaacagatcgggagccgagagagatcaacgctttttgcaacaactggggga
 tcaatg
 taaactcctgctgtagtgggaaacggagctgaaatgagccataccaacagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 taaca
 atggcaacaactgtagcaacatctaaactggcaactcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcct
 atgga
 ggccgataaagttgcaagcaactcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcct
 cggctg
 agcgtgggtctcggctcct
 cgggg
 agtcaggcaactatggatgaaagcaatgagcaactcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcct
 tcaaga
 ccaagtttaactcct
 ttttg
 ataatctcct
 gatct
 tctgagatccttttctcct
 ttgccc
 ggtcagagctaccaactcttctcagaggaactcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcct
 agtgt
 agcgttagttagcaccactcctcagaaactcctgtagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 tggct
 gctcagctggcgaatagctgtcttaccgggtggaactcaagcagatgtagcagcaatgtagcagcaatgtagcagcaat
 ggctg
 aaaggggggttctgcaacagc
 ttaga
 aaagc
 cagag
 gtagctcagggggaaacgctggtatcttctatgctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcct
 ttgtg
 atgctcctcagggggcagc
 gcttt
 ttgctcaatgcttctcct
 cctgct
 cgcgcagc
 ctbac
 gcatctgctgctatctcagc
 cagta
 tacaactcct
 cgggc
 ttgctgctcct
 gctac
 caccgaaacgagc
 catcc
 gctccagcctgctgagtttctcagcaagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 ttttc
 ctgtttgctcactgtagcctcctgtagaagggaaatctctgctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcct
 aggat
 gctcagc
 tagtc
 ggccggaccagagaaatacactcagggctcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 gccag
 cagcactcct
 cggaa
 accgaaagcactcctgcttctcct
 cgggt
 attcaatctcct

ggccaggaacccaacgctcggcagatgcccggctgctgagatggggcagcagtagatgtctcgc
 caagg
 gctggcttgcgcaatcagcttccgcaagaatgtagtggctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcct
 gtagc
 gccgcttccatcagctcagctggccggctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcct
 ggagg
 cgcctcaactcagc
 tgate
 gaagttagctgtagaagc
 atgcc
 ctgcaacggcagc
 gaaag
 ccagcaagc
 cggcg
 ttccagctcgggaaacctgctgctcagctgcaatgaaatggcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 ttgggc
 gccaggggtgggttttctcctcagc
 tggag
 caagcgttccagc
 gctgt
 ctggttagctgctgctcct
 cggcc
 agcgcactgtagcttggcaacagc
 aaacc
 ggcaactggcaactcagctcct
 agcca
 gacagc
 gctcc
 accgcaagc
 aagcc
 cggcaacttagtgcagc
 gaggc
 gttgcggagagatgtagc
 tggca
 cccagctgtagcggcagc
 agccc
 aatcagcaacagc
 ctcca
 cttttcccgcttctcagcaaacctgctgctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcct
 ctbac
 tctgcaactcgtataaactgtagcttctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcct
 atacc
 ggaaaggttttgcgcaatcagatggttcaagctaaatgcaatgctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcct
 gatcc
 ggagcttatcagc
 ggtcg
 taatcactgcaataactcctgctcctcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 taac
 tggcaaatatctgaaatgagctgtagcaataatcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcct
 aactt
 caacaggaacagc
 GCCGG
 CCATGGcccaAGTCCCTCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCT
 AGTGG
 AAATCTGAACTCCCT
 GATAA
 CCCTCCCAATCCGGTAACTCCCAAGAGAGGTCTCAAGAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC
 CACCC


```

AAAGGCGACGCTCCCGAAGGGAAGGCGGACAGGTAACCGGTAAGCGGCGAGGTCGGAAACAGGAGCGCA
CGAGG
GAGCTCCAGGGGAAACCGCTGGTACTCTTATAGCTCGTGGGTTGCGCACTCTGACTTGGCGCTGATTT
TTGTG
ATGCTCGTCAAGGGGCGGAGCTATGAAAGCGGACGCGGCTTTTACGGTTCCTGGCTTTGCTG
TTGTGCACTGTTCTTCCGCTGATCCCGTATCTGTGTAACCGTATACCGCTTTGAGTGGCTGATA
CGCGT
CGCGGACGCGAAGCGGACGCGGAGCGTCACTGAGCGGAGGCGGAGCGGCTGATGGTATTTTCTC
CTAC
GCACTGTGCGTATTTCAACCGCTATAATGGTCACTCTGAGTAACTCTGTCTGATGCGCATAGTTAAG
CACTA
TACACTCGCTATCGTCACTGAGTGGTCACTGAGTGGTCACTGAGTGGTCACTGAGTGGTCACTGAG
CGGCT
TTGTCTGCTCCGGGATCGCTTACAGCAAGCTGTGACCGTCTCGGGAGCTGATGCTGAGAGTTCACCG
GTACT
CACCGAAAGCGGCGGAGCTGGTAAAGCTCACTGAGTGGTCTGAGAGCTTACAGTGTCTGCTGCTT
CATCC
CGCTCCAGCTCGTGGTCTTCCAGAGCGTAACTGTCTGCTGATGAGGCTGATGAGTAAAGCGGCTT
TTTCT
CTGTTGGTCACTGATGCTCGTAAAGGGGAACTTCTGCTGATGAGGCTGATGAGTAAAGCGGCTT
AGGCT
GCTCACTGAGTGGTCACTGATGATGAGTCACTGAGTGGTCACTGAGTGGTCACTGAGTGGTCACTG
GAGT
GGCGGACGAGAAATCACTCGGCTCACTGAGTGGTCACTGAGTGGTCACTGAGTGGTCACTGAGTGG
TCAAG
GCACTCGTGGTCACTGAGTGGTCACTGAGTGGTCACTGAGTGGTCACTGAGTGGTCACTGAGTGG
CGAA
ACCAGAGCACTGATGTTGCTGAGTGGTCACTGAGTGGTCACTGAGTGGTCACTGAGTGGTCACTG
AGT
ATTCTCTGCTCACTGAGTGGTCACTGAGTGGTCACTGAGTGGTCACTGAGTGGTCACTGAGTGG
CGCA
CCCGT
GGCGGACCGCAAGCTGGCGGAGTGGCGGCTGGCGGCTGGCGGCTGGCGGCTGGCGGCTGGCGGCTGG
CAAG
GTGGTTGCGCTCACTGAGTGGTCACTGAGTGGTCACTGAGTGGTCACTGAGTGGTCACTGAGTGG
TGCC
GGCGGCTCCACTGAGTGGTGGCGGCTGGCGGCTGGCGGCTGGCGGCTGGCGGCTGGCGGCTGGCGG
ATAG
GGCGGCTCCACTGAGTGGTGGCGGCTGGCGGCTGGCGGCTGGCGGCTGGCGGCTGGCGGCTGGCGG
TGATC
GAGTGGTGGTGGTAAAGAGCGGAGCGTCTGAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG
ATGG
CTGCAAGCGGCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG
GAGC
CCAGCAAGCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG
CCCG
TTCCAGTGGGAAACCTGCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG
TGGG
GGCGGCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG
TGAG
CAAGCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG
GCTGT
CTGCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG
CGCC
AGCGCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG
AAAC
GGCACTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG
AGCA

```

```

GAGCGAGCGCGGAGCAGAACTAATGGTCCCGTAAACAGCGGATTTGCTGATGACCAATGCGACAGAT
GCTCC
ACGCCAGTCCGCTACCGTCTTCTGGGAGAAATAACTGTTGTTGGTGTGCTGGTCAAGACATCAAGAAAT
AACCG
CGGAACTAGTGGAGGAGCTTCCAGCAATGGTATCCGCTGATCCAGCGGATGATGATGATGAGCCACT
GAGCG
GTTGGCGGAGAGATGTTGCAACCGGCTTACAGCTTCCAGCGGCTGCTTCCAGCGGACCGCAAGCG
TGGA
CCAGTGTGATCGGCGGAGATTTAATCGCGGCAATTTGCGAGCGGCTGCTTCCAGCGGACCGCAAGCG
AGCC
AATCAAGCAAGCTGTTGCGCGCACTGTTGCGCGCAATTTGCGAGCGGCTGCTTCCAGCGGACCGCA
TCCCA
CTTTTCCCGCTTTTCCAGCAAGCTGGTGGCTGGTCCAGCGGAGAAAGCTGATGATGAGCAAGCGG
ATAC
CTGAGACATGATAGCTTACTGTTTCCAGTCCAGCGGCTGATGCTTCTTCCCGGCTGATCATGCTCC
ALACC
GGGAAAGTTTGGCGCACTGATGTTGCAAGTAAATGATGCGCTGCTGCTGCGCGGAAATGAGCAAGCT
GATCC
GGAGCTATCGACTGCAAGTCCAGCAATGTTGCGGCTGAGCGCACTGGAAAGCTGGTATGCTGTGCA
GGTCT
TAAATCACTGATAATGCTGCTGCTGCAAGTAAATGATGCGCTGCTGCTGCGCGGAAATGAGCAAGCT
GGTTC
TGGCAATATCTGAAATGAGCTGTGCAATTAATCACTGCTGATGATGTTGGAATGATGAGCGGATAAC
AATTT
CACACAGGAAACGAAATCCATATGAAATACCTATTACCAACAGCGGCTGGTATTTATGCTCCGCTCCGA
GCCAG
CCATGGCCAGGTTCCAGCTCTCTCAAGTACCGTGGCTGACCACTGCTGCTTCTTCCCGCTGATGAGC
AGTTT
AAATCTGGAACTGCTCTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
GATTA
CGCCCTCCAACTCGGTAACCTCCAGAGAGTGTCAAGAGCAGGACAGCAGGACAGCAGCAGCAGCAGC
CACTT
TGACCTCGAGCAAGAGCACTACAGAGAAACAGAGCTCAAGCTCGAGAGTCAAGCTTCCAGCGGCTG
CGCTG
ACAAAGGCTTCAAGCGGAGGATGTTAATAAAGAGAAACAGAGTCCATATGAAATACCTATTGCTCCG
AGCCG
CTGATGTTGTTACTCGCGGCTGCGCGGCTGCGCGGCTGAGCAAGGCGGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
CTCC
TCCAGAGCACTGTTGGGCGACAGCGGCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG
TCTGT
GAGTCAAGCGGCTGAGCGAGCGGCTGAGCGGCTGAGCGGCTGAGCGGCTGAGCGGCTGAGCGGCTGAG
CAGC
TGGTGGCGGCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG
AGTGT
GGCAAGAGTGGAGCCAAATCTTGTGACAAATCTCAACATGCCCGCTGCCCGCAAGCAAGCTGGTGG
GGACC
GTGATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
GGTGG
AGCTGGAGCAAGAGCGCTGAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG
AGCG
CGGAGGAGGAGTCAAGCAAGCTGAGCGGCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG
AAGGA
GTACAGTGGAGGCTGCAAGAGCGCTGAGCGGCTGAGCGGCTGAGCGGCTGAGCGGCTGAGCGGCTG
CCAG
AACCAGGCTGATACCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
AAGCC
TCTATCCAGCAAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
GTGCT

```

```

GQACTCCGACCGCTCCTCTCTCTCTCAACAGCTCACCGTGGACAGAGCGAGTGGCAGCGGAAACGCTT
CTCAT
GCTCCCGTATCATGAGGCTCTCCACACCACTACCGGAGAGAGCTCCTCTCTCTCCGCTAAATAAGCTT
GGTGT
TTTTGGGGATGAGGAGATTTCCAGCTGATACAGATTAATCAGAAAGCGAGAGGCTGATGATGAGGAG
TTTGC
CTGGCGGAGTGGCGGCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG
GTGTG
GGTTCCTCCAGTGGAGTGGGAACTGGAGGCTCAATAAAGCAAGGCTGATGAGGAGCTGGGCTT
TGGT
TTATCTGTTGTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
AACGG
CCGGAGGAGCGCTGGCGGAGAGCGGCTCAAACTGGAGGCTCAAACTGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
GATGG
CTTTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG

```

【 図 10 A 】

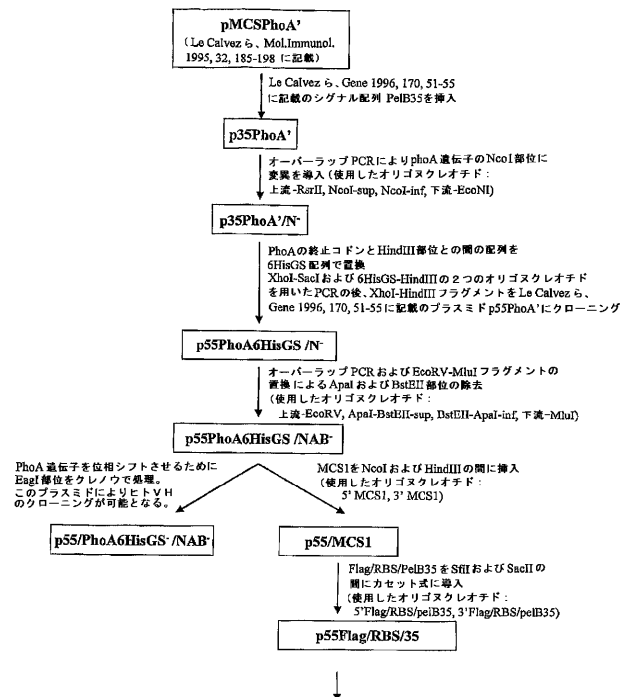
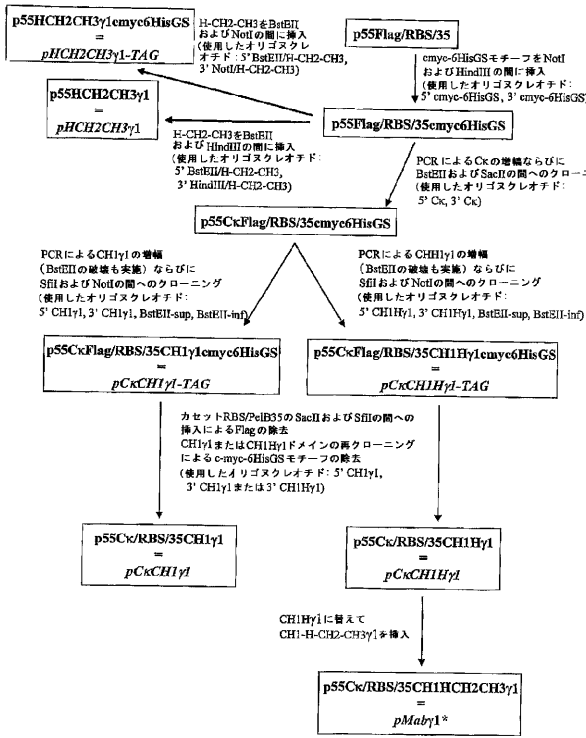


図 10 B のプラスミド構築に続く

【 図 10 B 】



【 図 11 】

FIGURE 11

p55PhoAHisGS/N^{*}

SEQ ID NO 89

```

1 1tggtttatt ttctaatac attcaaatat gtatccgctc atgagcaaat aacctgata
61 aatgtctcaa taatattgaa aaagaagaag tatgatgatc caactttcc gtgtgocct
121 aatctccctt ttgggggaa ttgtccctcc tggttttgt caccagaaa cgtgtgtcaa
181 agttaaagat gtttggggc agtbtgggic acagttggc taactcgaa tgacttcaa
241 ccggttaag atctctgaga gttttccgc ccagaacgt ttccaaga tgaactctt
301 taagttctg ctatgtggc cgttatatac cgtgttgac gccgggaaa gcaactctg
361 ttgcgcata caatttctc agaatgact cgtgttgat taaccgta cagaagaac
421 tcttcagat ggcataaac taagaagat cgtgttgat gccataaca tgagtata
481 caatgggccc aacttaact tgaacaagat cgtgttgat gccataaca tgagtata
541 gcaacaact ggggatcag taactctgc tgaactctg cgtgttgat gccataaca
601 cacaacaa gtagagctg acaacaagat cgtgttgat atgcaaca atgcaaca
661 actataact ggcgaactc taactctgc ttcccggca caattaag atgtgatga
721 ggcgataaa gtgcaggac caactctgc ctggccctt ccgctggt gtttttgt
781 tgataaatc ggcggctgt agctgggtc cgtgttgat agtcaagca ctatgatga
841 tggtaagcc tccgtatgc tagttatca caagcggg agtcaagca ctatgatga
901 agcaataga cagatctgt agatagatc ctactctgt agtcaagca ctatgatga
961 caagttac tcatatac tttagatga tttaaaact cattttaa taaaggat
1021 ctagtgaag atctttctg ataactat gaccaaac cttaacgt agttttgt
1081 caactgagc tcaaacccc tagaaagat caaaggct ttctgagat ctttttct
1141 ggcgttaac tgcgtctgc aacaaaaa accacgcta ccagcggc ttgagatg
1201 ggatacag ctacaactc ttttccgaa gtaactagg ttgagatg ttgtttgc
1261 aaactctc tcttagtg agcctagt agcccacc tcaagaag ctgtgacc
1321 gctcaaac ctgcctgc taactctgt accgtgct gtcgcaag gctagaatc
1381 gctgttacc ggttggct caagcagat gttacggat aagcggcc gctggctgt
1441 aacggggtc tctgtacc agccactg gtagagag actcaagca ctatgatga
1501 ctacagct ggcattag aaagccac cgttccgaa cgtcaagc gctagaatc
1561 tccgtaag ccagcggct gaacagga gtcgagag gactctag gggaaagc
1621 ctgtatct tatagtct cgtgttcc ccactctg ctgagctc gattttgt
1681 atgctgct aagcggct agtcaagat gttcaagg cgtttctc ttgttacc
1741 ctgctctc tctgtacc agtcaagat gttcaagg cgtttctc ttgttacc
1801 gataaacct attacgct tgcgtgac tgcactct ccagctcc ctgactct
1861 ggcagcag tcaatgag agagcggc agagcggc atgctgtg ttctctac
1921 gactctgc gttattcac accgatata tggtaact tcaatcac ctgctgat
1981 gctcagat caagcagta taactctc tatctcag tgaatgct agtctgtc
2041 ccgcaacc gctgagcc gctgagcc cctgagcc gctgagcc gctgagcc
2101 ctacagca agctgagc cctgagcc gctgagcc gctgagcc gctgagcc
2161 caccgaac ccgagcag cctgagcc gctgagcc gctgagcc gctgagcc
2221 agctctgc ctgtctcc gctcagct cgtgttcc cccagacc gttatgct
2281 gctcagat aagcggct agtcaagat gttcaagg cgtttctc ttgttacc
2341 tctgtacc agtcaagat gttcaagg cgtttctc ttgttacc
2401 gctcagat agctgagc atgcaagc gttcaagg cgtttctc ttgttacc
2461 caactgag gtagagc ggcgagca ggaataac actcaagc atgcaagc
2521 ctctgtaa actgagag gttctaac ggttagcc cagatctg ctgagctc
2581 agcaacata atgtagag gctgactc cctgagcc gctgagcc gctgagcc
2641 ccgcaacc gctgagcc gctgagcc gctgagcc gctgagcc gctgagcc
2701 gctgagcc gctgagcc gctgagcc gctgagcc gctgagcc gctgagcc
2761 ccgctctc aagcagca gctcagct gctcagct gctcagct gctcagct
2821 agagctgc cgtgtgag tctcagca gactgagc gctcagct gctcagct
2881 gctgagcc gctgagcc gctgagcc gctgagcc gctgagcc gctgagcc
2941 gactgagc gctgagcc gctgagcc gctgagcc gctgagcc gctgagcc
3001 ccgcaacc cctgagcc gctgagcc gctgagcc gctgagcc gctgagcc
  
```

```

3061 cgttccatg tgcctgcca ggcgcata atccctgca cgtatccgc tcaagtatc
3121 gaagttagc tggtaagac ccagcagat ccttgaagc gctccctgat gctgctct
3181 actgctctg acagctgac ctgacagcc ggcctccga tccgcgca agcagaaga
3241 atctaatgg ggaagcact ccgctctac taactaac cgttgtgt cactgccc
3301 gctgtgcca gcttgaact ccgctctac taactaac cgttgtgt cactgccc
3361 ttccactgc ggaactcgt cgtgagct gattatga atcgcgca cgtgaggg
3421 agcggcttg cgtattgac gcaagctgt tttttctt caccagtg accgcaaga
3481 gctgagct cttcaacc tgcctcag agagtctag caagcgtcc acgtggtt
3541 gcccagcc gcaaaaac tttttctg tttttctg tttttctg tttttctg
3601 ctctgctac gctgctcc actacaga tatccgca atccgca accgctgc
3661 taatggcgc actgagcc agcctcct gatctgtgc aacagcag cgtgaggg
3721 agtgcctcc attcagct tgcagctt gttgaaac ggcactgca ctccactgc
3781 ctccctgct cgtatgag tgaattgat tgcagctag atattatg accagcca
3841 gctgagcc cctgagca gacttact ggcctcct caagcagct tgcgtgat
3901 caatggct cagctgct acccgctc gctgagcc tctcaggg aaataaac
3961 tggtagtgg tgtgtgta gactcaat gaatagag cgaactta gtcggagag
4021 ctccagacc aatgctcc tgcctcct ggcagatg atgtatgac ctactgagc
4081 gtcgagag aagattgac acccgctc taccgctc gacgagct gcttacc
4141 tccagacc cactgctc cactgctg cctgagca ttaactgc gcaacttt
4201 gctgagcc gtcgagcc agctgagc gctgagcc tctcaggg aaataaac
4261 ccagcattg tgcgagcc cgttggga tgaattag ctccgctc gctgagcc
4321 ctctctcc cgttctga gaaactgc gctgagct caaccgct gaaactgct
4381 gataagac accgctac tctgagat cgtatact gaaactgc gaaactgct
4441 cctgagct actctctc ggcgctac atgactca cgcgaact tgcgagct
4501 gctgagct actgagct cctgagct cctgagct cctgagct cctgagct
4561 ggccttgc gactgagc tgcagctc ctctgctc cagcagca tgcgagct
4621 tggtagtgg gtcgagct taactcct cataactg gctgagct ggcagctc
4681 gctgagct atgttttg cgcagctc ataacgct tggcaaat tgcgagct
4741 gctgagct ataatcct gctgagct atgtgagc tgcgagct ataatcct
4801 caacagca gcaactcct atgaaata ctactaca accagcag cctgagct
4861 atgtctgc ggcgagcc cctgagct atgtgagc tgcgagct atgtctgc
4921 tctctgca acccggct cctgagct tactatga gctgagcc gctgagcc
4981 accgctgc cagactgc cctgagct tctctgca gataactc caaaactc
5041 tcttctgc atgtgagc ggcgagcc cctgagct actgagca gtaactgct
5101 ggcgagcc ggcgctct atgaaact agtgcctc cctgagcc gcaactc
5161 tctctgca atgaaata aaacgca agctctc cctgagct cctgagct
5221 agcaaccg tgcgagcc gctgagcc ataacgca gctgagcc cctgagct
5281 agcaaacg caccagca tctgagc gcaaacg cctgagcc gctgagct
5341 cgttctac cagactgc agactgca cctgagcc cctgagcc atgtgagct
5401 ggcgagcc tccgctca ggcgagcc gcaaacg cctgagcc cctgagcc
5461 agcgggaa gactgata ccagagca agctctc cctgagcc gctgagcc
5521 ccgagcga aaactctg cctgagcc gctgagcc gctgagcc gctgagcc
5581 gctgagcc gcaagcgc cctgagct atgtgagc gctgagcc cactgagct
5641 gctgagcc gcaactgc aaacactc gctgagct tctgagc gcaactgc
5701 agtgcgct atgagcga aagcagca cccgctac atgataag ccagctgc
5761 ctgagcga aaccagca gaaactgc agctctc cctgagcc gctgagcc
5821 agctgagc tctgagca atgagcga tgcgagca cctgagcc gcaactgc
5881 aatgataa cagactgc cctgagct tctgagca atgagcga atgagcga
5941 gctgagcc gcaactgc cctgagct gctgagcc gctgagcc gctgagcc
6001 agtgcgct gatacgc aagcagca gctgagcc cctgagcc gctgagcc
6061 ctccagcc gctgagca atgagcga agctctc cctgagcc gctgagcc
6121 ccagagct cctgagca atgagcga cctgagct atgagcga atgagcga
6181 tgcgagcc atgagcga tgcgagca gactctc tctcagca tgaagcgc
6241 tctgagcc aaactcct ataacgca cctgagct taagctct tctgagcc
6301 gcaactgc ataacgca ataacgca ataacgca gcaagcgc atgagcga
6361 agactctc cctgagcc tgcgagcc gctgagcc ataacgca gcaactgc
6421 gcaactgc tgcgagcc tgcgagcc gctgagcc ataacgca gcaactgc
6481 ccgctcct ataacgca agctctc gcaagcgc gcttctg tctgagcc
  
```

```

6541 tttgtggt aacgctctc tgcgagca aaatccgcc ggcgagct tgaactgct
6601 gaacagca ccgagcag cctgagcc agagcgc ctaatact cactgagca
6661 aatgaacg aagcctcct tgcgagct atctttgt ttttccaa ctctt

p55PhoAHisGS/NAB*
SEQ ID NO 90
1 1tggtttatt ttctaatac attcaaatat gtatccgctc atgagcaaat aacctgata
61 aatgtctcaa taatattgaa aaagaagaag tatgatgatc caactttcc gtgtgocct
121 aatctccctt ttgggggaa ttgtccctcc tggttttgt caccagaaa cgtgtgtcaa
181 agttaaagat gtttggggc agtbtgggic acagttggc taactcgaa tgacttcaa
241 ccggttaag atctctgaga gttttccgc ccagaacgt ttccaaga tgaactctt
301 taagttctg ctatgtggc cgttatatac cgtgttgac gccgggaaa gcaactctg
361 ttgcgcata caatttctc agaatgact cgtgttgat taaccgta cagaagaac
421 tcttcagat ggcataaac taagaagat cgtgttgat gccataaca tgagtata
481 caatgggccc aacttaact tgaacaagat cgtgttgat gccataaca tgagtata
541 gcaacaact ggggatcag taactctgc tgaactctg cgtgttgat gccataaca
601 cacaacaa gtagagctg acaacaagat cgtgttgat atgcaaca atgcaaca
661 actataact ggcgaactc taactctgc ttcccggca caattaag atgtgatga
721 ggcgataaa gtgcaggac caactctgc ctggccctt ccgctggt gtttttgt
781 tgataaatc ggcggctgt agctgggtc cgtgttgat agtcaagca ctatgatga
841 tggtaagcc tccgtatgc tagttatca caagcggg agtcaagca ctatgatga
901 agcaataga cagatctgt agatagatc ctactctgt agtcaagca ctatgatga
961 caagttac tcatatac tttagatga tttaaaact cattttaa taaaggat
1021 ctagtgaag atctttctg ataactat gaccaaac cttaacgt agttttgt
1081 caactgagc tcaaacccc tagaaagat caaaggct ttctgagat ctftttct
1141 ggcgttaac tgcgtctgc aacaaaaa accacgcta ccagcggc ttgagatg
1201 ggatacag ctacaactc ttttccgaa gtaactagg ttgagatg ttgtttgc
1261 aaactctc tcttagtg agcctagt agcccacc tcaagaag ctgtgacc
1321 gctcaaac ctgcctgc taactctgt accgtgct gtcgcaag gctagaatc
1381 gctgttacc ggttggct caagcagat gttacggat aagcggcc gctggctgt
1441 aacggggtc tctgtacc agccactg gtagagag actcaagca ctatgatga
1501 ctacagct ggcattag aaagccac cgttccgaa cgtcaagc gctagaatc
1561 tccgtaag ccagcggct gaacagga gtcgagag gactctag gggaaagc
1621 ctgtatct tatagtct cgtgttcc ccactctg ctgagctc gattttgt
1681 atgctgct aagcggct agtcaagat gttcaagg cgtttctc ttgttacc
1741 ctgctctc tctgtacc agtcaagat gttcaagg cgtttctc ttgttacc
1801 gataaacct attacgct tgcgtgac tgcactct ccagctcc ctgactct
1861 ggcagcag tcaatgag agagcggc agagcggc atgctgtg ttctctac
1921 gactctgc gttattcac accgatata tggtaact tcaatcac ctgctgat
1981 gctcagat caagcagta taactctc tatctcag tgaatgct agtctgtc
2041 ccgcaacc gctgagcc gctgagcc cctgagcc gctgagcc gctgagcc
2101 ctacagca agctgagc cctgagcc gctgagcc gctgagcc gctgagcc
2161 caccgaac ccgagcag cctgagcc gctgagcc gctgagcc gctgagcc
2221 agctctgc ctgtctcc gctcagct cgtgttcc cccagacc gttatgct
2281 gctcagat aagcggct agtcaagat gttcaagg cgtttctc ttgttacc
2341 tctgtacc agtcaagat gttcaagg cgtttctc ttgttacc
2401 gctcagat agctgagc atgcaagc gttcaagg cgtttctc ttgttacc
2461 caactgag gtagagc ggcgagca ggaataac actcaagc atgcaagc
2521 ctctgtaa actgagag gttctaac ggttagcc cagatctg ctgagctc
2581 agcaacata atgtagag gctgactc cctgagcc gctgagcc gctgagcc
2641 ccgcaacc gctgagcc gctgagcc gctgagcc gctgagcc gctgagcc
2701 gctgagcc gctgagcc gctgagcc gctgagcc gctgagcc gctgagcc
2761 ccgctctc aagcagca gctcagct gctcagct gctcagct gctcagct
2821 agagctgc cgtgtgag tctcagca gactgagc gctcagct gctcagct
2881 gctgagcc gctgagcc gctgagcc gctgagcc gctgagcc gctgagcc
2941 gactgagc gctgagcc gctgagcc gctgagcc gctgagcc gctgagcc
3001 ccgcaacc cctgagcc gctgagcc gctgagcc gctgagcc gctgagcc
  
```

3061 cegttccatg tgcctccga gggcgataa atgcgcgta cgtatcaggc tccatgatc
 3121 gaagttagc tggtaagag ccgagagcat cctgaagcat gtcctgatg tgcctcatc
 3181 acctgctcgc acagccgca cggcaagcgg ggcctccgca tgcgcgcga agcgagaa
 3241 atcatatgg ggaagccat ccagctccgc gtcgcgcga ggcagcga agcgagaa
 3301 gctgcgcga cgttgcaat ccgctgaat taactaat gctgtgctc cactccgca
 3361 ttccatgct ggaacccgt cgtccagct gcattatga atcggcaac atcggcgagg
 3421 agggcgttg cgtattggc gcaagagtg tttttcttt caccatgag acggcaaca
 3481 gctgctcgc cgtccgca tggcctcga agcttgcag caagcgctc acgtgcttt
 3541 gcccagcag ccgaattcc ttgtgatg tggagtgag ccgagataa catgagctg
 3601 ctctggctc gctgatccc ataccaga taccgcgc ccgagataa catgagctg
 3661 taatggcgc cactgccc agcccatc gactgtgg aaccagcgc cagctggga
 3721 cgtccgctc atccagcat tgcattggt gttgaaacc ggaatcgca ctccagctc
 3781 ctccctgca cgtccgca tggattgct tggagtgag atattatgc cagccgcca
 3841 gcccagcag ccgagcga ccaatcgc cgtccagct agggcgat tgcctgatc
 3901 ccaatgca cagatgctc agccagctc gctccagct tccctgctc caataaac
 3961 tggatgagc tggctgca gagaatca gaataacc cggaaatca atcggcgagg
 4021 ctcccaagc atgagctc tggcctcga cggagatt atgatcag ccaatgca
 4081 gttggcga agcttgctc acggctctc taagctctc gacggctct cttctacca
 4141 tgcagccac cagctgca ccaatcgc cgtccgca atcgcgc ggcagcaatt
 4201 gcaagcgc gtcgagcc agcctggc tggcagcgc aatcgcgc gactgtgct
 4261 ccgctgctc tggcagcc cgttggaa tgaattcgc ctccgcctc cagccgctc
 4321 ctcttccgc cgtttgca gaaagcgc tggcctgct caccagcgc gaaagcctc
 4381 gataagagc accgctacc cgtccgctc atgcatac cggaaatg agctgtcct
 4441 cctgaattg actctctcc gggctcct atgcatac cggaaatg agctgtcct
 4501 agatgctc acgtaaat cctccgctc cgtctgctc cggaaatg agctgtcct
 4561 ggaacttc gactcagc tgcagcgc cttgctgct cgcagcgc tgcagcgc
 4621 tggatgct gtcagctg taactcgc catactgt gctgctcag ggcgctcct
 4681 gctctgata atgttttg cgcgcatc ataacgctc tggcaaat tctgaaatg
 4741 gctgtgaca attaactc gctctgata atgttttg tggagcgc agctgtcct
 4801 caacagca acagatcc ataatgata cttactaca cagcagcgc cgtgtgctc
 4861 atgctgct ggcagcgc cactgggc cgtctgctc gactcagc cgtgtgctc
 4921 tggctgga aaccgctc ctaaggcga tttactgca cccgctgct cctccgctc
 4981 aacggctg cagctgctc ctaaggcga tttactgca cccgctgct cctccgctc
 5041 cgaagctg ggcgctc ttaagctg agctgctc cgcgctc gaaatgctc
 5101 gataagagc accgctacc cgtccgctc atgcatac cggaaatg agctgtcct
 5161 tcaatgct gctgataa aaccgctc agccagcgc ggcgctc gctgtcctc
 5221 agcaagcgc tggtaagc gctgataa ctaaacgc ggcgctc gctgtcctc
 5281 gctttacc ggcgctc agatgca ggcagcgc agggctc ggcgctc
 5341 ggcgctc tgcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc
 5401 ggcgctc tgcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc
 5461 ggcgctc tgcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc
 5521 ggcgctc tgcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc
 5581 ggcgctc tgcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc
 5641 ggcgctc tgcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc
 5701 ggcgctc tgcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc
 5761 ggcgctc tgcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc
 5821 ggcgctc tgcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc
 5881 ggcgctc tgcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc
 5941 ggcgctc tgcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc
 6001 ggcgctc tgcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc
 6061 ggcgctc tgcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc
 6121 ggcgctc tgcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc
 6181 ggcgctc tgcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc
 6241 ggcgctc tgcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc
 6301 ggcgctc tgcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc
 6361 ggcgctc tgcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc
 6421 ggcgctc tgcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc
 6481 ggcgctc tgcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc

6541 ttgtctgctc aaagctctc tgcagcgc aatccgcgc ggcagcgc tgcagcgc
 6601 ggcagcgc aaagctctc tgcagcgc aatccgcgc ggcagcgc tgcagcgc
 6661 aatccgcgc aaagctctc tgcagcgc aatccgcgc ggcagcgc tgcagcgc

P55/PhoA6/kiags'/NAB'

SEQ ID No 91

1 ttgttttttt ttctaataa attcaaat gttccgctc atgagcaat aaccctgata
 61 atgtgttca taattatga aaagaaagc tatgattat caacttct gttgctcct
 121 tttctcttt ttgtggatc ttgtctctc ttgtttgtc caccgcaaa cgtgctgta
 181 agtaaaagc gctgaagtc agttggctg acagctggc taactcaga ttgctctaa
 241 cagctgtag atccttgcg gttctccgc cgaagaagt ttccaaga ttgcaacttt
 301 taagctgtc ctatctgct agatgact cgtgttgc cgcggcaag agcaactgc
 361 tgcgcgata caatctctc agatgact ttccgca caactcaga gattcttgc
 421 tctcagat ggcattgag taagaaat atgagctgt cctcaacca ttgattgta
 481 cactggcgc aacttactc tgaacaact cgcagcgc agagcaaca cgtttttt
 541 gcaacaactc ggggatctc taactcctc gactgctg gaccagca gtaatgca
 601 caccacaac ggcagcgc acaccagc cctcagca atgccaaca cgtgtgca
 661 actataact ggcagcgc acaccagc cctcagca atgccaaca cgtgtgca
 721 ggcgataa gttgcagc caactctgc ctccgctc cgtctgctc atgcaaga cgtgta
 781 tgaataatc ggcagcgc agctggctc cctcagca atgccaaca cgtgtgca
 841 tggtaagcc tccatctgc tagttatca cgcagcgc agtccagca ctatgta
 901 agaaatga cagatcctc agatagctc ctaactct agcatctt caacttct
 961 ccaatttat taataaac tttagctc tttaaacct caatttct taaaagct
 1021 ctatgtag atctctttc taactctc gcaaaaac ctaatacgt agtttctc
 1081 cactgagc tgcagcgc tagaaagc taagaagt tcttgatc cttttctc
 1141 ggcgtaac tgcgtctc aaacaaaa accacgca cagcggctc ttgtttgc
 1201 ggtcaagc ctaccaactc ttcttcga ggtcaacc tcaagaact cgtgtgca
 1261 aatctctc ctctctgc agcagctc ggcagcgc cctcaaac cgtgtgca
 1321 gctctatc ctctctgc taactctc caagaactc agcagcgc agcagcgc
 1381 gttctaac ggttgact caagaactc gttccagc agcagcgc agcagcgc
 1441 aacggctc tgcgcaac agcagcgc ggcagcgc actcaaac cactgata
 1501 cctcagctc gactgtag aaagcgcgc gctccgca ggcagcgc agcagcgc
 1561 cccgtaagc ggcagcgc ggcagcgc ggcagcgc ggcagcgc agcagcgc
 1621 ctgtatctc taatactc tgcgctc ggcagcgc ggcagcgc agcagcgc
 1681 atgctgca ggcgctc ggcagcgc ggcagcgc ggcagcgc agcagcgc
 1741 cctgctctc tgcgctc ttgtctc gttctctc gcttctc cgtatctc
 1801 ggtcaactc ataccgctc ttgagtag gtaaccgc cgcagcgc gcaagcgc
 1861 ggcagcgc ggcagcgc ggcagcgc ggcagcgc ggcagcgc agcagcgc
 1921 gctctgca ggcagcgc ggcagcgc ggcagcgc ggcagcgc agcagcgc
 1981 ggcagcgc taagaactc taactcgc tgcagcgc agcagcgc agcagcgc
 2041 cccgcaacc gcaacacc gtcagcgc ctcagcgc ttgtctc cgcagcgc
 2101 ctcaagca agctgtag gttccgca gctcagc ggcagcgc agcagcgc
 2161 cccgcaacc gcaacacc gtcagcgc ctcagcgc ttgtctc cgcagcgc
 2221 gctctgca ggcagcgc ggcagcgc ggcagcgc ggcagcgc agcagcgc
 2281 gctctgca ggcagcgc ggcagcgc ggcagcgc ggcagcgc agcagcgc
 2341 cctgtaagc ggcagcgc ttgtctc gttctctc gcttctc cgtatctc
 2401 gtcagcgc agctgtag agtagcgc ggcagcgc ggcagcgc agcagcgc
 2461 caactctc gctgtagc ggcagcgc ggcagcgc ggcagcgc agcagcgc
 2521 ctctctc caactctc ggcagcgc ggcagcgc ggcagcgc agcagcgc
 2581 cgcagcgc atgctgtag ggcagcgc ggcagcgc ggcagcgc agcagcgc
 2641 cgcagcgc atctgtag ttgtctc ggcagcgc ggcagcgc agcagcgc
 2701 cgtctgctc gctatctc atctctc ggcagcgc ggcagcgc agcagcgc
 2761 cgtctctc caacagc ggcagcgc ggcagcgc ggcagcgc agcagcgc
 2821 gctgtctc ggcagcgc ggcagcgc ggcagcgc ggcagcgc agcagcgc
 2881 gctgtctc ggcagcgc ggcagcgc ggcagcgc ggcagcgc agcagcgc
 2941 gactctc ggcagcgc ggcagcgc ggcagcgc ggcagcgc agcagcgc
 3001 cgcagcgc agcagcgc ggcagcgc ggcagcgc ggcagcgc agcagcgc

3061 cegttccatg tgcctccga gggcgataa atgcgcgta cgtatcaggc tccatgatc
 3121 gaagttagc tggtaagag ccgagagcat cctgaagcat gtcctgatg tgcctcatc
 3181 acctgctcgc acagccgca cggcaagcgg ggcctccgca tgcgcgcga agcgagaa
 3241 atcatatgg ggaagccat ccagctccgc gtcgcgcga ggcagcga agcgagaa
 3301 gctgcgcga cgttgcaat ccgctgaat taactaat gctgtgctc cactccgca
 3361 ttccatgct ggaacccgt cgtccagct gcattatga atcggcaac atcggcgagg
 3421 agggcgttg cgtattggc gcaagagtg tttttcttt caccatgag acggcaaca
 3481 gctgctcgc cgtccgca tggcctcga agcttgcag caagcgctc acgtgcttt
 3541 gcccagcag ccgaattcc ttgtgatg tggagtgag ccgagataa catgagctg
 3601 ctctggctc gctgatccc ataccaga taccgcgc ccgagataa catgagctg
 3661 taatggcgc cactgccc agcccatc gactgtgg aaccagcgc cagctggga
 3721 cgtccgctc atccagcat tgcattggt gttgaaacc ggaatcgca ctccagctc
 3781 ctccctgca cgtccgca tggattgct tggagtgag atattatgc cagccgcca
 3841 gcccagcag ccgagcga ccaatcgc cgtccagct agggcgat tgcctgatc
 3901 ccaatgca cagatgctc agccagctc gctccagct tccctgctc caataaac
 3961 tggatgagc tggctgca gagaatca gaataacc cggaaatca atcggcgagg
 4021 ctcccaagc atgagctc tggcctcga cggagatt atgatcag ccaatgca
 4081 gttggcga agcttgctc acggctctc taagctctc gacggctct cttctacca
 4141 tgcagccac cagctgca ccaatcgc cgtccgca atcgcgc ggcagcaatt
 4201 gcaagcgc gtcgagcc agcctggc tggcagcgc aatcgcgc gactgtgct
 4261 ccgctgctc tggcagcc cgttggaa tgaattcgc ctccgcctc cagccgctc
 4321 ctcttccgc cgtttgca gaaagcgc tggcctgct caccagcgc gaaagcctc
 4381 gataagagc accgctacc cgtccgctc atgcatac cggaaatg agctgtcct
 4441 cctgaattg actctctcc gggctcct atgcatac cggaaatg agctgtcct
 4501 agatgctc acgtaaat cctccgctc cgtctgctc cggaaatg agctgtcct
 4561 ggaacttc gactcagc tgcagcgc cttgctgct cgcagcgc tgcagcgc
 4621 tggatgct gtcagctg taactcgc catactgt gctgctcag ggcgctcct
 4681 gctctgata atgttttg cgcgcatc ataacgctc tggcaaat tctgaaatg
 4741 gctgtgaca attaactc gctctgata atgttttg tggagcgc agctgtcct
 4801 caacagca acagatcc ataatgata cttactaca cagcagcgc cgtgtgctc
 4861 atgctgct ggcagcgc cactgggc cgtctgctc gactcagc cgtgtgctc
 4921 tggctgga aaccgctc ctaaggcga tttactgca cccgctgct cctccgctc
 4981 aacggctg cagctgctc ctaaggcga tttactgca cccgctgct cctccgctc
 5041 cgaagctg ggcgctc ttaagctg agctgctc cgcgctc gaaatgctc
 5101 gataagagc accgctacc cgtccgctc atgcatac cggaaatg agctgtcct
 5161 tcaatgct gctgataa aaccgctc agccagcgc ggcgctc gctgtcctc
 5221 agcaagcgc tggtaagc gctgataa ctaaacgc ggcgctc gctgtcctc
 5281 gctttacc ggcgctc agatgca ggcagcgc agggctc ggcgctc
 5341 ggcgctc tgcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc
 5401 ggcgctc tgcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc
 5461 ggcgctc tgcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc
 5521 ggcgctc tgcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc
 5581 ggcgctc tgcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc
 5641 ggcgctc tgcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc
 5701 ggcgctc tgcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc
 5761 ggcgctc tgcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc
 5821 ggcgctc tgcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc
 5881 ggcgctc tgcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc
 5941 ggcgctc tgcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc
 6001 ggcgctc tgcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc
 6061 ggcgctc tgcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc
 6121 ggcgctc tgcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc
 6181 ggcgctc tgcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc
 6241 ggcgctc tgcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc
 6301 ggcgctc tgcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc
 6361 ggcgctc tgcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc
 6421 ggcgctc tgcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc
 6481 ggcgctc tgcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc ggcgctc

6541 ctgtgtttg tggtagaac ctctctgag taagcaaac cgcgcgagg aggtatgaa
 6601 cgttgcaag caagcgcgc gaggacctc ggcgcaaga cgcgcgcc aactcgca
 6661 gctcaaatc aaagcaagc ccaatctgc ggtggctc ttgtgctc taactcact
 6721 t

P55/MS1

SEQ ID No 92

1 ttgttttttt ttctaataa attcaaat gttccgctc atgagcaat aaccctgata
 61 atgtgttca taattatga aaagaaagc tatgattat caacttct gttgctcct
 121 tttctcttt ttgtggatc ttgtctctc ttgtttgtc caccgcaaa cgtgctgta
 181 agtaaaagc gctgaagtc agttggctg acagctggc taactcaga ttgctctaa
 241 cagctgtag atccttgcg gtttctcgc cgaagaagt ttccaaga ttgcaacttt
 301 taagctgtc ctatctgct agatgact cgtgttgc cgcggcaag agcaactgc
 361 tgcgcgata caatctctc agatgact ttccgca caactcaga gattcttgc
 421 tctcagat ggcattgag taagaaat atgagctgt cctcaacca ttgattgta
 481 cactggcgc aacttactc tgaacaact cgcagcgc agagcaaca cgtttttt
 541 gcaacaactc ggggatctc taactcctc gactgctg gaccagca gtaatgca
 601 caccacaac ggcagcgc acaccagc cctcagca atgccaaca cgtgtgca
 661 actataact ggcagcgc acaccagc cctcagca atgccaaca cgtgtgca
 721 ggcgataa gttgcagc caactctgc ctccgctc cgtctgctc atgcaaga cgtgta
 781 tgaataatc ggcagcgc agctggctc cctcagca atgccaaca cgtgtgca
 841 tggtaagcc tccatctgc tagttatca cgcagcgc agtccagca ctatgta
 901 agaaatga cagatcctc agatagctc ctaactct agcatctt caacttct
 961 ccaatttat taataaac tttagctc tttaaacct caatttct taaaagct
 1021 ctatgtag atctctttc taactctc gcaaaaac ctaatacgt agtttctc
 1081 cactgagc tgcagcgc tagaaagc taagaagt tcttgatc cttttctc
 1141 ggcgtaac tgcgtctc aaacaaaa accacgca cagcggctc ttgtttgc
 1201 ggtcaagc ctaccaactc ttcttcga ggtcaacc tcaagaact cgtgtgca
 1261 aatctctc ctctctgc agcagctc ggcagcgc cctcaaac cgtgtgca
 1321 gctctatc ctctctgc taactctc caagaactc agcagcgc agcagcgc
 1381 gttctaac ggttgact caagaactc gttccagc agcagcgc agcagcgc
 1441 aacggctc tgcgcaac agcagcgc ggcagcgc actcaaac cactgata
 1501 cctcagctc gactgtag aaagcgcgc gctccgca ggcagcgc agcagcgc
 1561 cccgtaagc ggcagcgc ggcagcgc ggcagcgc ggcagcgc agcagcgc
 1621 ctgtatctc taatactc tgcgctc ggcagcgc ggcagcgc agcagcgc
 1681 atgctgca ggcgctc ggcagcgc ggcagcgc ggcagcgc agcagcgc
 1741 cctgctctc tgcgctc ttgtctc gttctctc gcttctc cgtatctc
 1801 ggtcaactc ataccgctc ttgagtag gtaaccgc cgcagcgc gcaagcgc
 1861 ggcagcgc ggcagcgc ggcagcgc ggcagcgc ggcagcgc agcagcgc
 1921 gctctgca ggcagcgc ggcagcgc ggcagcgc ggcagcgc agcagcgc
 1981 ggcagcgc taagaactc taactcgc tgcagcgc agcagcgc agcagcgc
 2041 cccgcaacc gcaacacc gtcagcgc ctcagcgc ttgtctc cgcagcgc
 2101 ctcaagca agctgtag gttccgca gctcagc ggcagcgc agcagcgc
 2161 cccgcaacc gcaacacc gtcagcgc ctcagcgc ttgtctc cgcagcgc
 2221 gctctgca ggcagcgc ggcagcgc ggcagcgc ggcagcgc agcagcgc
 2281 gctctgca ggcagcgc ggcagcgc ggcagcgc ggcagcgc agcagcgc
 2341 cctgtaagc ggcagcgc ttgtctc gttctctc gcttctc cgtatctc
 2401 gtcagcgc agctgtag agtagcgc ggcagcgc ggcagcgc agcagcgc
 2461 caactctc gctgtagc ggcagcgc ggcagcgc ggcagcgc agcagcgc
 2521 ctctctc caactctc ggcagcgc ggcagcgc ggcagcgc agcagcgc
 2581 cgcagcgc atgctgtag ggcagcgc ggcagcgc ggcagcgc agcagcgc
 2641 cgcagcgc atctgtag ttgtctc ggcagcgc ggcagcgc agcagcgc
 2701 cgtctgctc gctatctc atctctc ggcagcgc ggcagcgc agcagcgc
 2761 cgtctctc caacagc ggcagcgc ggcagcgc ggcagcgc agcagcgc
 2821 gctgtctc ggcagcgc ggcagcgc ggcagcgc ggcagcgc agcagcgc
 2881 gctgtctc ggcagcgc ggcagcgc ggcagcgc ggcagcgc agcagcgc
 2941 gactctc ggcagcgc ggcagcgc ggcagcgc ggcagcgc agcagcgc
 3001 cgcagcgc agcagcgc ggcagcgc ggcagcgc ggcagcgc agcagcgc

3001 cccgacgca acggcgggag ccgcaagaat tataggggcg cgcctacaat ccagcccaac
3062 cggctccatg cccgacgca ggggcaat acggcggtga cgtatcgagg ccagctgatc
3121 gaagttaggc tggtaagagc cggagcagat ccttgagatg gtcctcagtg gtagctatc
3181 acctgctgg acagcagtcg ctcacacagc ggcataccga tgcgcggcga agcgagaaga
3241 acctaatgg ggaagccat ccagctcgcg gtcgcgaagc ccagcaagac gtagcccccg
3301 gctgcgcga gctggaact cgcgctaacg tcaataaatt gctgtgcgt ccagcccccg
3361 gctgcgcga ggaactgat cggcgccgct gcaataatga atggcccaac ccgccccggg
3421 agggcgttg cttatctgg ccccgccggt tttctctt caagacagc acggggaaca
3481 gctgtgctg cttcacccgc gcccctggcg agatgtggag caagcggctc agctggctt
3541 ccccgacagc ggcgaatacc tggttgtagg tggttgacgg ggggataata cagtagctgt
3601 etteggatg cgcgtatccc actacacaga taaccgccc aacggcgaag ccgagctcgt
3661 taatggcgcc agctcgcgcc agcccaactc gatcgtggc aaccagctc gcaatgggaa
3721 cgttgccctc atttcagctg tgcagcagc ggcgagatc aggcattgca ctcagctgca
3781 ettcocctg cgtatcggc tgaatttatg tgcagctgag atattatgc cagcagaaca
3841 gacgcagcag ccgcagaca gaactaatg gtcgcctaca cagcgcgat tgcgtatgc
3901 ccaatgcgac cagatgctcc agcccactc gctcaacgct tcaatggag aaaaataac
3961 cgttgctggc tgtctgctca gagaactaca gaataaacg ccgaacata gtcgaggaag
4021 cttctccgc agagcagcc tggctaccc gggatagct agctgatct cactcagcga
4081 gttgcgagc agactatgc acccgcttcc tcaaggcttc gacpcgctc cgtctacca
4141 tgcacaccac cagctcgcg cccagctgat cggcgcgga ttaactcgc ggcacaatt
4201 ggcagcggcg gtcgagggcg agctggagc tggcaacgc aatcaacaa ccagctttgc
4261 cccgagctg tttgtccacg cggttggga tgaataacg cctccgcatc gcccgttcca
4321 cttttccgc cgtttccga gaaacgtgg tggctggct caccagcgg gaaacgctct
4381 gataagcag ccgcagatc acccgcttcc tcaaggcttc gacpcgctc cgtctacca
4441 cctgaattg actctctcc gggcagctc actgcaacc ccggaaggtt tggcgccatt
4501 cgtatggctc aagtaaatg actcagcct cgcctcctg cgcagatgc aagctatgc
4561 gtagcttcc gactcagc tgcacaaatg cttctggct cagcagcca tggagatgt
4621 tggatggct gtagcctg taactcagc cabaatcgt gtcgctaac ggcagatccc
4681 gttctggata atgttttg cgcgaccc ataacgctc tggcaaatc tctgaatga
4741 gctgtgaca ataatcct gctgctata actatgcca tggtagcgg ataacattt
4801 caccagggaa acagaaatc atagcaact cgcctcctg cgcagatgc aagctatgc
4861 atgtctgcg cgcagcgg ccagtgcca ggcacgctc gataaactt ggcgttttg
4921 ggcgccccg ccggcattc agctgatac agtaataac agccgcagc agcagctct
4981 gggagaga gaagatttc agctgatac agtaataac agccgcagc agcagctct
5041 taacacagaa tttgcctgc ggaactgag cggctggccc actgcccc atgcagact
5101 cagaagtga acccgctag cgcattgga gctggggct tcccactgc agatagga
5161 actgcagcc atcaataaa agcaagctc cagcagcaa actcggctt tggttttg
5221 tttgttgtg cgtgtagcc tctcctagc agcaacaa cgcggcggag gatttgaac
5281 gttgtaaac agctgtagc tctcctagc atgcagcag cgcgcagata aactgcagc
5341 catcaatta agcagaagg cactcagag gatggctt tggctttt acaactctt

F55P1ag/aaB/35

89Q ID N° 93

1 tggttattt tttaaatc atfoaaat gtaectgc atagacaat aacctgata
61 aatgctcaa taatatgaa aaaggaagc tatgatatt caactttcc gttgcctcc
121 tttcccttt ttggcgact ttgtctccc tggttttt caccagaaa cgtgtgtgaa
181 agtaaaagc gctgaagtc agtggctgc taactgggt taactgac tatgcttca
241 cagcgttag atctctgga gttttccgc ccgagcagc tttccaaga tgaacattt
301 taagtttcc atctctgca tttccctgct cccagctggc agcagcagc agcagctgg
361 tgcgcgata caactatcc agactgact gttgtagct taactgata cagaanaagc
421 tcttcagat ggcatacag taagaaatg atgcagctt cctcaacca tgaatgata
481 caactggcc caactatcc tgaacaagc agggagcag aagagctaa cgccttttt
541 gaaacaaag gggagctag taactcagc tgcctgctg gaaacagagc tgaatgaga
601 catcaaaac agcgcgagc atctcagc tttccggca ctcgcagcag cgttgcgaa
661 actattacc ggcactatc ttaactagc tttccggca ctaataac actgtagga
721 ggcgataaa gttcagagc caactcagc cctggcctct cgcctgctt gttttatgc
781 tgaataact ggcagcgtg agctggctc tgcgctatc attgacac tggggccaga

89Q ID N° 109

1 tggttattt tttaaatc atfoaaat gtaectgc atagacaat aacctgata
61 aatgctcaa taatatgaa aaaggaagc tatgatatt caactttcc gttgcctcc
121 tttcccttt ttggcgact ttgtctccc tggttttt caccagaaa cgtgtgtgaa
181 agtaaaagc gctgaagtc agtggctgc taactgggt taactgac tatgcttca
241 cagcgttag atctctgga gttttccgc ccgagcagc tttccaaga tgaacattt
301 taagtttcc atctctgca tttccctgct cccagctggc agcagcagc agcagctgg
361 tgcgcgata caactatcc agactgact gttgtagct taactgata cagaanaagc
421 tcttcagat ggcatacag taagaaatg atgcagctt cctcaacca tgaatgata
481 caactggcc caactatcc tgaacaagc agggagcag aagagctaa cgccttttt
541 gaaacaaag gggagctag taactcagc tgcctgctg gaaacagagc tgaatgaga
601 catcaaaac agcgcgagc atctcagc tttccggca ctaataac actgtagga
661 actattacc ggcactatc ttaactagc tttccggca ctaataac actgtagga
721 tgaataact ggcagcgtg agctggctc tgcgctatc attgacac tggggccaga
781 tgaataact ggcagcgtg agctggctc tgcgctatc attgacac tggggccaga
841 tggtaagcc tccgctatg tagttatca cccgagcggc agtcaagca ctatgtaga
901 agcaatga cagatcgtg agatagtc ctcactgctt agcattgct aactgca
961 caactgtac caabatac tttagatga tttaaaact cabbttatc taaaagat
1021 ctaggtagc atctcttg atattatc gaaacaaat ccttaagctt atttttgt
1081 ccaatgagc tcaagccc tgaanaagc aaagatctc tctgtagat cttttttt
1141 ggcgtaac tgcctcgc aaacaaaaa accacagca ccagcgttg ttttttgc
1201 ggaacaag ctaacaact ttttttgc agccagcc ctaagaaat ctgtagccc
1261 aaactatc cttctagct agcagatgt aggcacac tcaagaact ctgtagccc
1321 gtcacatac cttcctgc taactatg atcagctt agggcctt cctcagctt
1381 gttctaac gtttggct caagcagta atccagat aagcgagc gttcggctg
1441 aacgggggtc tctgcaac agccagctt ggcagcagc actcaaac aactgaga
1501 ctaacagct gacatgag aagcgccc cctcagca ggcagaaag ccgaaagga
1561 tccgtagc gggggctg gaaacagga ggcagcagc gactcagc gtttggag
1621 cttgtagc gggggctg gaaacagga ggcagcagc gactcagc gtttggag
1681 atgctgca gggggctg gaaacagga ggcagcagc gactcagc gtttggag
1741 cctggctt tggctgct tttctatc gttttctt cgttatccc ctgatttct
1801 ggaacagc ataccgct tgcagcagc gatacctc cccgagcc gaaacagga
1861 ggcagcagc tgcagcagc gaaacagga ggcagcagc gactcagc gtttggag
1921 gctcgtgc gtaatacc accagataa tggctcact caagcagc gactcagc
1981 ggcagcagc tgcagcagc taactcagc tctcagcag tgcagcagc gactcagc
2041 cccagccc gcaacccc gtcagcagc ctcagcagc tgcagcagc gactcagc
2101 ctacagaca agctgtacc ctctcagc gttcagctg tcaagctt tccagctt

841 tggtaagcc tccgctatg tagttatca cccgagcggc agtcaagca ctatgtaga
901 agcaatga cagatcgtg agatagtc ctaactgct aagactgct aactcagca
961 ccaactgt caabatac tttagatga tttaaaact cabbttatc taaaagat
1021 ctaggtagc atctcttg atattatc gaaacaaat ccttaagctt atttttgt
1081 ccaatgagc tcaagccc tgaanaagc aaagatct cctgtagat cttttttt
1141 ggcgtaac tgcctcgc aaacaaaaa accacagca ccagcgttg ttttttgc
1201 ggaacagc ctaacaact ttttttgc agccagcc ctaagaaat ctgtagccc
1261 aaactatc cttctagct agcagatgt aggcacac tcaagaact ctgtagccc
1321 gctcaaac cttcctgc taactatg atcagctt agggcctt cctcagctt
1381 gttctaac gtttggct caagcagca gtaaccagc aagcgagcc gttcggctg
1441 aacgggggtc tctgcaac agccagctt ggcagcagc actcaaac aactgaga
1501 ctaacagc gacatgag aagcgccc cctcagca ggcagaaag ccgaaagga
1561 tccgtagc gggggctg gaaacagga ggcagcagc gactcagc gtttggag
1621 ctggtagc gggggctg gaaacagga ggcagcagc gactcagc gtttggag
1681 atgctgca gggggctg gaaacagga ggcagcagc gactcagc gtttggag
1741 cctggctt tggctgct tttctatc gttttctt cgttatccc ctgatttct
1801 ggaacagc ataccgct tgcagcagc tgaactcct cccgagcc gaaacagga
1861 ggcagcagc tgcagcagc taactcagc tctcagcag tgcagcagc gactcagc
1921 gactcagc gtaatacc accagataa tggctcact caagcagc gactcagc
1981 ggcagcagc taagcagca taactcagc tctcagcag tgcagcagc gactcagc
2041 cccagccc gcaacccc gtcagcagc ctcagcagc gtaactcct gcttatccc
2101 ctacagaca agctgtacc cctcagcag cctcagcag ctaactcct tcaactcct
2161 caacagca cccgagcag cccgagcag gtaactcag gtaactcct tcaactcct
2221 agatagc ctgtcacg gctcagct cgttgctt cttccagc gtaactcct
2281 ggtctgat aagcggcc agttaaagg cgtttttt cgttttgc actgagct
2341 tccgttag ggggaatt tttctagg gtaataag cgtatgaa actgagct
2401 gctcagca cgggtatg atgataca tcccgctt cgttaagc gtaactcct
2461 caactgag gtaactgag gggggcag gaaacaaac ctaactcct actcagc
2521 ettgtagc actgtagc gtttcaac gtttcaac gtttcaac ctaactcct
2581 cccagcagc atgttagc gctgact cccgcttc agacttacc aaaaagca
2641 cccagcagc atgttagc tgcagctt cgcagcag ctaactcct gctatccc
2701 cctgctgc cgtatagc atcaactc ctaactcct agcaactc gcaactcct
2761 cccagcagc cccgagcag ggcagcag gtaactcct gtaactcct gcaactcct
2821 gttgttgc gactcagc tctcagca gaatttag gctcactt tggctgtg
2881 gaaactc ggcagctgc cccgcttc ataccagc agttagc agttagc
2941 gaaactc ggcagctgc cccgcttc ataccagc agttagc agttagc
3001 cccagcagc agcgggag gcaacaaag tataggcgc cgtcaact ccaactcct
3061 cctcagca cccgagcag ggcagcag gtaactcct gtaactcct gcaactcct
3121 gaagttagc tggtagagc gggggcag atccagcag cctgtagc gtaactcct
3181 actgctgc agcagcag ctaactcct gtaactcct gtaactcct gtaactcct
3241 acctaatg ggaagccat ccagctcgc gtcgagcag cccagcagc gtaactcct
3301 gctcagca gtttagct cgcctcact caactaat gctgtgct ccaactcct
3361 cctcagca gaaactgct ggcagcag gtaactcct gtaactcct gcaactcct
3421 agctgttcc atactgag cccagcag cctgtagc gtaactcct gcaactcct
3481 cctgtagc ctaactcct ggcagcag agcttagc ccaactcct agctgttcc
3541 cccagcag ggaanaatc tttttagc tttttagc gtaactcct gcaactcct
3601 cttcagca tgcataccc actcagcag taactcct aacggcag cgcagctgc
3661 taatggcag cactcagc gatcagct gatcagct gatcagct gatcagct
3721 cctcagca atactgag ggcagcag cctgtagc gtaactcct gcaactcct
3781 ettcocctc cgtatcgc tgaatttat tgcagctg atattatg cagcagca
3841 gacgcagc cgcagaca gaactaat gctcagc ctaactcct tgcagcag
3901 ccaatgca cagatgctc agcccact gctcagc tcaactcct aaaaataac
3961 tttgttggc tgtctgca gagaactaca gaataaac ggcagcagc gtagcagc
4021 cttctccgc agagcagc tggctaccc gggatagct agctgatc cactcagc
4081 gttgcgagc agactatgc acccgctt ccaactcct cagcagct cgtctaca
4141 tgcacacc cagctgca cccagctt cgcgagca ttaactcct ggcagca
4201 ggcagcagc gtcagcagc agctggagc tggcaacg aatcaaac gactgttcc
4261 cccagcagc tttgcagc cggttggga tgaatacc cctcagcag ccaactcct

F55P1ag/RB/35cmv614s

SEQ ID N° 94

1 tggtttttt ttctaaatc attcaaatg gttccgctc atgacaacat aaccctgata
 61 aatgcttca taatattga aaagagagc tatgattat caacatctc gttgcctgca
 121 tatctcttt ttggcgcat ttgctctcc tggtttctg caacgaata tggatctca
 181 agtaaaagt gctgagatc agttggctg acagtgaggt tacatcgac ccgtctgga
 241 cagcgttaag atctctgga gttttgccc cgaagaagc ttctcaatg tgaacttca
 301 taaggtctg ctatggggc cggattatc ccgtgtgac gcggggcaag agcaactcgg
 361 tccgcgatc tggccttgc agaaagctc gttgagatc tcaccctga cagaagaagc
 421 tctcaagctt ggcatacag taagaaattc atgctcaatc gctcaaacat tggatgaa
 481 cactgcccgc aacttactc tgcacaagt tggctggcc agaggatua cccgtcttt
 541 gcaacaatg gggatgctc taactcgtc tggctggcc gaacggagc tgaatgaagc
 601 catacaaac gcagcggctc acaacagct cctctgaga atggaacaa cgttgccaa
 661 actataact ggcagctgc taactcagc tcccccga caataaatg actggatgca
 721 ggcgataaa gttgcagac cactctcgc tcccccga caataaatg actggatgca
 781 tgaataact ggcagctgc acgtctgctc tcccccga caataaatg actggatgca
 841 tggtaagcc tccctgctg taactctca ccaactgagc agtcaagaa tggatgca
 901 agcaaatga cagatctgc agatagctc ctaactgctc agcaatgctc actgctgca
 961 ccaagttac taatataac tttgattga tttaaacat cacttttaac ttaaaagat
 1021 ctaggtgaag atctcttgg atactctac gcaacaact ccttaacgctc agttctgct
 1081 ccaactgagc tcaagccgc tagaanaat caaagatctc tcttgagcc attttttct
 1141 ggcgctaatc tgcgtctgc taacaaaaa aacacgcta ccaagctgctc tttgttctc
 1201 ggaacaagc ctacaactc tttttccga agtcaactgc tcaagcagc cgaataacc
 1261 aaactctgc cttcctgctc agctgagc ggtcaacac gaactctgc tttgttctc
 1321 gctacatac ctgctctgc taactctgc ccaactgagc agtcaagaa tggatgca
 1381 gttgttacc ggttggatc caagcagc gttaccgac taagcagc actgagata
 1441 aacggggggt tctgcaacc agcccactc ggaagcaag actcaacac actgagata
 1501 ctaacagctc gacatgagc aaagccacc gttcccgaa gggagaagc cgaagata
 1561 tccgtaagc gtcagctgc gacagcaga ggcagcagc gaactctgc tttgttctc
 1621 tctgattctc taagctctg tgggttctg caactctgc ccaactgagc agtcaagaa
 1681 atgctctca gggggcgca gctatgca aaagccacc ccaagctgctc tttgttctc
 1741 cttgctctc tctgctctc tctgctctc gttctctc gcttctc ctgattctc
 1801 ggaatacgtc attacgctc tttgctgagc gttaccgctc ccccgagcc gaagcaga
 1861 ggcagcagc tcaagctgc aggaagcaga agcagcagc agtctctgc tttgttctc
 1921 gctctctgc ggtatttcc accgataca tttgctctc agtcaagaa tggatgca
 1981 ggcagctgctc taagcagca taactctgc tctgctgag tctgctgctc tttgttctc
 2041 cccgaaccc gcaacaacc gttgagcgc cctgagcgc tttgtctgc cccgactgc
 2101 ctaacagca agctgagcc gttcccgca gctcagctc tcaagctctc tccctctc
 2161 ccaagcaagc cccagctgc gtcagcaga gctcctgag agtctctgc agatctca
 2221 agctctctc gctgctgctc agctgagctc ccaactgagc tttgttctc
 2281 gctctctgc aaagccgc atgtaagc cgttttctc cttgttctc
 2341 tctgctgagc ggggaattc tttgctgagc gttatgca ccaagcaagc gggagat
 2401 gctacagca cgggtactc atgagca gttcccgca ctgcaactc gttgctgca
 2461 acaactgagc gttgctgagc ggggcaaga ggaacaactc actgagctc
 2521 cttgctctc taagctctg tgggttctg caactctgc agtcaagaa tggatgca
 2581 ccaagcaactc atggtgagc gctgctctc ccaactgagc agtcaagaa tggatgca
 2641 agcaagac atctctgctc tttgctgagc ccaagctc tttgctgctc
 2701 cttgctgctc cgtatctgc atcaactc ccaagcaagc agtcaagaa tggatgca
 2761 ccaagctgctc taagcagca gcaactgagc ccaagctc agtcaagaa tggatgca
 2821 gctgctgctc taagcagca gcaactgagc ccaagctc agtcaagaa tggatgca
 2881 gttgctgctc taagcagca gcaactgagc ccaagctc agtcaagaa tggatgca
 2941 gttgctgctc taagcagca gcaactgagc ccaagctc agtcaagaa tggatgca
 3001 ccaagctgctc taagcagca gcaactgagc ccaagctc agtcaagaa tggatgca
 3061 ccaagctgctc taagcagca gcaactgagc ccaagctc agtcaagaa tggatgca
 3121 gttgctgctc taagcagca gcaactgagc ccaagctc agtcaagaa tggatgca
 3181 ccaagctgctc taagcagca gcaactgagc ccaagctc agtcaagaa tggatgca
 3241 atcaatg ggaagcactc ccaagctgctc gttcagcagc ccaagcaagc gttgctgctc
 3301 gctgctgctc gttcagcagc ccaagctgctc gttcagcagc ccaagcaagc gttgctgctc

3361 tttccagctc gaaacctgt cgtgcaact gcaataatg atcggccaac ggcggggag
 3421 aggggttgc cgtatgggc gcaagctgtc tttttttt caccagctg acgggcaaa
 3481 gctgctgctc cttcaaccg tggcctgag aggtctgag caagctgtc acgtggttt
 3541 gcccagcag gcaaaatcc tttgttggc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 3601 cttgctgctc gctgctacc atcaaccga taccgcaac accgctgca cccgctgctc
 3661 taatggcgc cttgctgctc aggcctgctc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 3721 cttgctgctc cttgctgctc gcaatgctc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 3781 cttgctgctc cttgctgctc gcaatgctc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 3841 gctgctgctc cttgctgctc gcaatgctc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 3901 ccaactgagc cgtgctgctc agcctgctc gctgctgctc tttgttggc tttgttggc
 3961 tttgttggc tttgttggc gcaatgctc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 4021 cttgctgctc atgctgctc tttgttggc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 4081 cttgctgctc atgctgctc tttgttggc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 4141 tttgctgctc atgctgctc tttgttggc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 4201 gctgctgctc gctgctgctc agctgctgctc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 4261 cctgctgctc tttgttggc tttgttggc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 4321 cttgctgctc cttgctgctc tttgttggc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 4381 gcaaaagc atgctgctc tttgttggc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 4441 cttgctgctc atgctgctc tttgttggc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 4501 cgtgctgctc atgctgctc tttgttggc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 4561 ggaactgctc gctgctgctc tttgttggc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 4621 tttgttggc gctgctgctc tttgttggc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 4681 gcaaaagc atgctgctc tttgttggc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 4741 cttgctgctc atgctgctc tttgttggc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 4801 ccaagcaagc atgctgctc tttgttggc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 4861 atgctgctc gctgctgctc ccaagcaagc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 4921 gttgctgctc tcaaaagc atgctgctc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 4981 acaactgctc ccaagcaagc ccaagcaagc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 5041 cctgctgctc atgctgctc tttgttggc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 5101 atcaaccg ccaagcaagc atgctgctc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 5161 agctgctc agtataactc agcaagcaagc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 5221 ggaactgctc cctgctgctc ccaagcaagc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 5281 gcaaaagc atgctgctc tttgttggc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 5341 ccaagcaagc atgctgctc tttgttggc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 5401 cttgctgctc agcaagcaagc ccaagcaagc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 5461 agcaagcaagc ccaagcaagc ccaagcaagc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 5521 cctgctgctc gctgctgctc tttgttggc tttgttggc tttgttggc tttgttggc

SEQ ID N° 110

1 tggtttttt ttctaaatc attcaaatg gttccgctc atgacaacat aaccctgata
 61 aatgcttca taatattga aaagagagc tatgattat caacatctc gttgcctgca
 121 tatctcttt ttggcgcat ttgctctcc tggtttctg caacgaata tggatctca
 181 agtaaaagt gctgagatc agttggctg acagtgaggt tacatcgac ccgtctgga
 241 cagcgttaag atctctgga gttttgccc cgaagaagc ttctcaatg tgaacttca
 301 taaggtctg ctatggggc cggattatc ccgtgtgac gcggggcaag agcaactcgg
 361 tccgcgatc tggccttgc agaaagctc gttgagatc tcaccctga cagaagaagc
 421 tctcaagctt ggcatacag taagaaattc atgctcaatc gctcaaacat tggatgaa
 481 cactgcccgc aacttactc tgcacaagt tggctggcc agaggatua cccgtcttt
 541 gcaacaatg gggatgctc taactcgtc tggctggcc gaacggagc tgaatgaagc
 601 catacaaac gcagcggctc acaacagct cctctgaga atggaacaa cgttgccaa
 661 actataact ggcagctgc taactcagc tcccccga caataaatg actggatgca
 721 ggcgataaa gttgcagac cactctcgc tcccccga caataaatg actggatgca
 781 tgaataact ggcagctgc acgtctgctc tcccccga caataaatg actggatgca
 841 tggtaagcc tccctgctg taactctca ccaactgagc agtcaagaa tggatgca
 901 agcaaatga cagatctgc agatagctc ctaactgctc agcaatgctc actgctgca
 961 ccaagttac taatataac tttgattga tttaaacat cacttttaac ttaaaagat
 1021 ctaggtgaag atctcttgg atactctac gcaacaact ccttaacgctc agttctgct
 1081 ccaactgagc tcaagccgc tagaanaat caaagatctc tcttgagcc attttttct

4621 tttgttggc gctgctgctc taactctgc ccaagcaagc tttgttggc tttgttggc
 4681 gctgctgctc atgctgctc tttgttggc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 4741 cttgctgctc atgctgctc tttgttggc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 4801 ccaagcaagc atgctgctc tttgttggc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 4861 atgctgctc gctgctgctc ccaagcaagc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 4921 tttgttggc tttgttggc tttgttggc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 4981 aatctctt ccaagcaagc gctgctgctc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 5041 cctgctgctc atgctgctc tttgttggc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 5101 atcaaccg ccaagcaagc atgctgctc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 5161 agctgctc agtataactc agcaagcaagc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 5221 ggaactgctc cctgctgctc ccaagcaagc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 5281 gcaaaagc atgctgctc tttgttggc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 5341 ccaagcaagc atgctgctc tttgttggc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 5401 cttgctgctc agcaagcaagc ccaagcaagc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 5461 agcaagcaagc ccaagcaagc ccaagcaagc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 5521 cctgctgctc gctgctgctc tttgttggc tttgttggc tttgttggc tttgttggc

PHC2H3Y1-7A0

SEQ ID N° 95

1 tggtttttt ttctaaatc attcaaatg gttccgctc atgacaacat aaccctgata
 61 aatgcttca taatattga aaagagagc tatgattat caacatctc gttgcctgca
 121 tatctcttt ttggcgcat ttgctctcc tggtttctg caacgaata tggatctca
 181 agtaaaagt gctgagatc agttggctg acagtgaggt tacatcgac ccgtctgga
 241 cagcgttaag atctctgga gttttgccc cgaagaagc ttctcaatg tgaacttca
 301 taaggtctg ctatggggc cggattatc ccgtgtgac gcggggcaag agcaactcgg
 361 tccgcgatc tggccttgc agaaagctc gttgagatc tcaccctga cagaagaagc
 421 tctcaagctt ggcatacag taagaaattc atgctcaatc gctcaaacat tggatgaa
 481 cactgcccgc aacttactc tgcacaagt tggctggcc agaggatua cccgtcttt
 541 gcaacaatg gggatgctc taactcgtc tggctggcc gaacggagc tgaatgaagc
 601 catacaaac gcagcggctc acaacagct cctctgaga atggaacaa cgttgccaa
 661 actataact ggcagctgc taactcagc tcccccga caataaatg actggatgca
 721 ggcgataaa gttgcagac cactctcgc tcccccga caataaatg actggatgca
 781 tgaataact ggcagctgc acgtctgctc tcccccga caataaatg actggatgca
 841 tggtaagcc tccctgctg taactctca ccaactgagc agtcaagaa tggatgca
 901 agcaaatga cagatctgc agatagctc ctaactgctc agcaatgctc actgctgca
 961 ccaagttac taatataac tttgattga tttaaacat cacttttaac ttaaaagat
 1021 ctaggtgaag atctcttgg atactctac gcaacaact ccttaacgctc agttctgct
 1081 ccaactgagc tcaagccgc tagaanaat caaagatctc tcttgagcc attttttct
 4621 tttgttggc gctgctgctc taactctgc ccaagcaagc tttgttggc tttgttggc
 4681 gctgctgctc atgctgctc tttgttggc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 4741 cttgctgctc atgctgctc tttgttggc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 4801 ccaagcaagc atgctgctc tttgttggc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 4861 atgctgctc gctgctgctc ccaagcaagc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 4921 tttgttggc tttgttggc tttgttggc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 4981 aatctctt ccaagcaagc gctgctgctc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 5041 cctgctgctc atgctgctc tttgttggc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 5101 atcaaccg ccaagcaagc atgctgctc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 5161 agctgctc agtataactc agcaagcaagc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 5221 ggaactgctc cctgctgctc ccaagcaagc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 5281 gcaaaagc atgctgctc tttgttggc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 5341 ccaagcaagc atgctgctc tttgttggc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 5401 cttgctgctc agcaagcaagc ccaagcaagc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 5461 agcaagcaagc ccaagcaagc ccaagcaagc tttgttggc tttgttggc tttgttggc
 5521 cctgctgctc gctgctgctc tttgttggc tttgttggc tttgttggc tttgttggc

1141 ggcgctaatc tgcgtctgc taacaaaaa aacacgcta ccaagctgctc tttgttctc
 1201 ggaacaagc ctacaactc tttttccga gttcaactgc tcaagcagc cgaataacc
 1261 aaactctgc cttcctgctc agctgagc ggtcaacac gaactctgc tttgttctc
 1321 gctacatac ctgctctgc taactctgc ccaactgagc agtcaagaa tggatgca
 1381 gttgttacc ggttggatc caagcagc gttaccgac taagcagc actgagata
 1441 aacggggggt tctgcaacc agcccactc ggaagcaag actcaacac actgagata
 1501 ctaacagctc gacatgagc aaagccacc gttcccgaa gggagaagc cgaagata
 1561 tccgtaagc gtcagctgc gacagcaga ggcagcagc gaactctgc tttgttctc
 1621 tctgattctc taagctctg tgggttctg caactctgc ccaactgagc agtcaagaa
 1681 atgctctca gggggcgca gctatgca aaagccacc ccaagctgctc tttgttctc
 1741 cttgctctc tctgctctc tctgctctc gttctctc gcttctc ctgattctc
 1801 ggaatacgtc attacgctc tttgctgagc gttaccgctc ccccgagcc gaagcaga
 1861 ggcagcagc tcaagctgc aggaagcaga agcagcagc agtctctgc tttgttctc
 1921 gctctctgc ggtatttcc accgataca tttgctctc agtcaagaa tggatgca
 1981 ggcagctgctc taagcagca taactctgc tctgctgag tctgctgctc tttgttctc
 2041 cccgaaccc gcaacaacc gttgagcgc cctgagcgc tttgtctgc cccgactgc
 2101 ctaacagca agctgagcc gttcccgca gctcagctc tcaagctctc tccctctc
 2161 ccaagcaagc cccagctgc gtcagcaga gctcctgag agtctctgc agatctca
 2221 agctctctc gctgctgctc agctgagctc ccaactgagc tttgttctc
 2281 gctctctgc aaagccgc atgtaagc cgttttctc cttgttctc
 2341 tctgctgagc ggggaattc tttgctgagc gttatgca ccaagcaagc gggagat
 2401 gctacagca cgggtactc atgagca gttcccgca ctgcaactc gttgctgca
 2461 acaactgagc gttgctgagc ggggcaaga ggaacaactc actgagctc
 2521 cttgctctc taagctctg tgggttctg caactctgc agtcaagaa tggatgca
 2581 ccaagcaactc atggtgagc gctgctctc ccaactgagc agtcaagaa tggatgca
 2641 agcaagac atctctgctc tttgctgagc ccaagctc tttgctgctc
 2701 cttgctgctc cgtatctgc atcaactc ccaagcaagc agtcaagaa tggatgca
 2761 ccaagctgctc taagcagca gcaactgagc ccaagctc agtcaagaa tggatgca
 2821 gctgctgctc taagcagca gcaactgagc ccaagctc agtcaagaa tggatgca
 2881 gttgctgctc taagcagca gcaactgagc ccaagctc agtcaagaa tggatgca
 2941 gttgctgctc taagcagca gcaactgagc ccaagctc agtcaagaa tggatgca
 3001 ccaagctgctc taagcagca gcaactgagc ccaagctc agtcaagaa tggatgca
 3061 ccaagctgctc taagcagca gcaactgagc ccaagctc agtcaagaa tggatgca
 3121 gttgctgctc taagcagca gcaactgagc ccaagctc agtcaagaa tggatgca
 3181 ccaagctgctc taagcagca gcaactgagc ccaagctc agtcaagaa tggatgca
 3241 atcaatg ggaagcactc ccaagctgctc gttcagcagc ccaagcaagc gttgctgctc
 3301 gctgctgctc gttcagcagc ccaagctgctc gttcagcagc ccaagcaagc gttgctgctc

2221 agatgtctg ctgttcaatc gctgcagct cgtttagttt ctccaaga gtttaagtct
 2222 gcttctga aagcgggct abttaaagg cgtttttt ctgtttgtc aatgtagct
 2341 tccgtttaa ggaatttct tgttaaatg ggttaatac ccgaatgaac agtagagat
 2401 gctcaagata ccggttaact atgtagaac tgcocggta ctgaaactgt gtagcaat
 2461 acaactggc gttatggac ggggagaca gggaaaaat actcaggctc atgcocgat
 2521 ctctgtaac acagabtag gtttcaaca gggtaacag cagactctg ccagtcagat
 2581 ccgaaacta atggttcaag gctgcactt ccggtttcc agacttaac aaacacggaa
 2641 acagagaa atgttttct ttcctttct cgtcagcgt ttgcagcag actgottca
 2701 cgttcctgc cgtatcctg attcattctg ctacaactg agcaaaccc ggcagctag
 2761 ccggtcttc acagacaga gcaagctat ggcacccgt ggcagacc ccagctgtc
 2821 ccagatgct ccgttgctg tctgagat ggcgacccg atgatatgt tctgcaag
 2881 gttggttgc gaattcaag tctccgcaa gaattgatg gctcaactc ttgagttgt
 2941 gaactgttc ccagctgct ccagctgct attcaggctg agtggccgc gctccatga
 3001 ccgcagcga acggggggg ggcagacag tataggggc cgtccaaac ccagtcocac
 3061 ccgttcatg tctctcaga ggggagata atcccgctga cgtcagcgt tccagtcat
 3121 gaagttagc tggtaagac ccgagagat ccttgaact gctcctgat gctcctat
 3181 acctgcctg acagctggt cgcacaagc ggcactccga tgcgcggga agcagaaga
 3241 atcataagc ggaagcctc ccagctcgc gtcgcagac ccagcaagc gtagccaga
 3301 gctgcagca gtttgaact ccggttaact tacatlaat gctgtctgt ccctggccc
 3361 tttcagctg ggaactcgt cgtcagcgt gacttaaga atggccaa ccgctgggg
 3421 aggggtttg cgtattggc ccagctggt tttctttt caccagtag acggcaaca
 3481 gctgattgc cttaaccgc tgcctcagc agattggag caagcgtcc acgtggtt
 3541 gcccagcgc gccaactcc tggtttagg ttggttcag cgggataa catgagctg
 3601 tttggtatc gttgtatcc actaacgga tctcctcag aaacgcagc ccgactctg
 3661 taatggcgc cactgccc agcactct gctcctgtc atgcagcgc ccgactctg
 3721 cgtactctc attcagctt tgcattggt gatgaaac ggcactgca ctccagtc
 3781 ctccctctc cgtatctgc tgaattgat tgcagtagg atattatgc cagccaga
 3841 ggcagcagc ccgcagaca gaaactaat gctccctaa cagccagat tctgtatg
 3901 ccaatgctc cagtgctcc acgcagctc gctacactc tctacagcc aaataaat
 3961 tctgtatgc tctgtctca gacactaca gaaataacc cggaaacta gtagcag
 4021 ctccacagc aatgctcc tgtatcca cggtagtt atgataag ccactgagc
 4081 gttgcgagc aagattgct acocgcct tactagctc gacccctc cgttcaaca
 4141 tgcacacc cactgtgca ccagttgat ccggcaga ttaatagcc ggcacatt
 4201 ggcagcgc gtagcagcc agactggag tggcaacc atccagcag actgcttgc
 4261 ccagctgtg ttgtgcag ccgttgaac tgaattagc ctccagctc gctctcca
 4321 ctittctcc cgttttcca gaaactgag tggctggtt caccagcgc gaacgctc
 4381 gataagagc accgctacc tctgcactc tactagctc gacccctc cgttcaaca
 4441 cctgattg actctctcc gggcgtatc atgcactc ggcagaatt tgcocatt
 4501 cgttggctc aagcaaatg cactgcact cgcctctgc cgcagttgc aagctgct
 4561 ggaacttca gactcagc cactgcact cgcctctgc cgcagttgc aagctgct
 4621 tggattgct gtagcagct taaactctg atactctg gctcctatg gctcctat
 4681 gttctgata atgtttttg ccgacatc ataaactct tggcaaatc tctgaatga
 4741 gctgtgaca ataatcatc gctcgtata atgttggaa ttgtgagc ataaactc
 4801 caacagaga acaacttcc atatgaaata ctatataca acagcagc ctggttatt
 4861 atgtctgca atgttgcga ggtccgca tctcagaca aactcagc
 4921 atgcccgc tgcocgca ctgaactgt gggggacc tgaattctc tttctccccc
 4981 aaacccagc gacacctca tctctccc gaccctgag gtcacatgc tgggttga
 5041 cgtgagcag gaagacctg agtcaactt caactgac gtagcagc tggatgca
 5101 taatgcccg acaagccgc ggggagaga gtaacaagc actgacccg tggctcaat
 5161 cctacagc ctagccagc actgctgaa tggcaagag taactgta agtctcctc
 5221 caaacctcc ccagcccca tctgmaaac ctctcaaa gcaaaagc agccagaa
 5281 accagctgc taacccctc cccatccc ggaatgctg accaagaac agtccgct
 5341 gactcctg gtaaacctc tctatccc gactcagc gtagctg gtagcaatg
 5401 gacgcccag acaactaca agacaagc tccctgctg gctcagcag cctctctt
 5461 cctacagc ctagccagc actgctgaa tggcaagag taactgta agtctcctc
 5521 ctccgtgct cactgctcc tggcaagc ctctcaaa agactctc cctctcct
 5581 ggttaataa gcttgcctg tttgcagat gagaagag gcttgaat ggcctaca
 5641 tcaaacct cactgagc gataactg cctgtttg cgttgagc aagatttca

5701 gctgataca gatlaaatac gaacgagaa cggctctgtg aaaacagat tctcctggc
 5761 ggcagtagc ggtgtccca cctgcacca tgcgaactc agaatgaaa ccgcagtag
 5821 ccagtagtc tggggggct ccactgca ggcagtagc cctgcagca tcaataaaa
 5881 cgaagctc actgaaaga atgggctc cgttttct cgttttgc gggagact
 5941 ctctgagta ggaacatc ccgcggagc gattgaaq tttcaagaa ccgcgcgga
 6001 ggaactcgg ggcagagag ccocgata atccagcag atcaaatga gtagtagc
 6061 atctgagc atgcccctt tggttteta caactctt

DHC62CH3YL
 SEQ ID NO 96
 1 tttttttt ttotaatat attaaatc gttccgctc atgagcaat aacctgata
 61 atgcttcaa taatattgaa aaagaaagc tatgattc caactttcc cgttgcctc
 121 tttctctc ttggcgat ttgccttc ttttttgc caccagaaa ccgctgtga
 181 agtaaaagc gctgagatc agttgggct agagaggtt taactgaa tggatcaca
 241 cagcgttag atcttgaga gttttccc gagaagatc tttccaga tgcacttt
 301 taagtctg ctatgtgc cgttattc cgtgttagc gcccagca agcaactg
 361 tgcgcata caacttctc agaatgatt agttgagc tccacgca cagaaga
 421 tctatgag gcaatctc tgaacatc atgagagct gcatcaaca tgaatgaa
 481 cactgccc aacttctc tgaacatc atgagagct gcatcaaca tgaatgaa
 541 gcaaacat ggggtagc taactgct tctgttgc gaccgagc tgaatgaa
 601 cacaacaac ggcagcgt acacaagc gctgtgca atgcaaca cgttgcgca
 661 actataact ggcgaactc ttaactat cactgtgc ttcgcgca caattatg
 721 ggcgataaa gttgagac cactgtgc cccgcctc cccgctgt gttttatg
 781 tgaataat ggcgagcgt agctggctc tgcggttc attgagca tgggagca
 841 tggtagcc tccctgat tagtata cagcagcgt gaccgagc atgagtag
 901 agcaatga cagctgct agatggtc ctactgct agaatgct aactgagc
 961 ccaattac taatatac tttagatg ttaaaact ctttttat taaaaagat
 1021 ctagggag actcttctg atactctc gacaaact ccttaactc agtttctg
 1081 ccaactgct tgcagcgt tagaagaat caaagctc gttcttcc ttttttgc
 1141 ggcgtaac tctgtctc aaacaaaa acccaactc gttcttcc ttttttgc
 1201 gataagag ctacaact tttccgaa gtaactgc tgcagagc ccagatca
 1261 aaactatc cttctgct agcctgct agcccaac ttcagact ctttttat
 1321 gactatac ctctgctc taactgct accagctc gctcagct gctgagct
 1381 gtttttcc gttttagc caagaata gtaactg accagctc gctcagct
 1441 accggtgt tctgtcag acccaact ggcagcgt acccaact caactgata
 1501 cctacagc gactgagc aaagcacc cctccgaa ggggagag ccgacatg
 1561 tccgttag ggcaggtc gaacagaga ggcagcagc gacttccg ggggagca
 1621 ctgattct ttagcagc tccgtgtc caactctc atgagctc ctttttat
 1681 aaactgta gttttagc gactgagc gactgagc gactgagc gactgagc
 1741 cctggtct ttttttgc ttttttgc ttttttgc ttttttgc ttttttgc
 1801 gataactc atactgct ttagtagc gactgagc gactgagc gactgagc
 1861 ggcagcagc taatgagc agtagagc agtagagc agtagagc agtagagc
 1921 gactgagc gactgagc taactgct accagctc gctcagct gctcagct
 1981 gactgagc gactgagc taactgct accagctc gctcagct gctcagct
 2041 cccagcacc gcaacacc gctgagc gctgagc gctgagc gctgagc
 2101 cctacagca agctgagc cctccgca gctgagc gctgagc gctgagc
 2161 cccagcagc cgcagcagc cgcgtaaa gctcagc gctgagc gctgagc
 2221 gataactc gcttctcc gctcagct cgttctgc atgagctc gcttctcc
 2281 taactgag aggtattc ttttttgc ttttttgc ttttttgc ttttttgc
 2341 cctgtagc gactgagc gactgagc gactgagc gactgagc gactgagc
 2401 gctcagta cgttctag atgtagca tgcocgta ctgaactg gtaggtaa
 2461 caactgct gtagtagc ggcgagca gagaacaa atcagactc aatgagc
 2521 ctctgact cactgagc gtttcaaa ggtagcag accactgct cactgagc
 2581 ccgaaact cactgagc gtttcaaa ggtagcag accactgct cactgagc
 2641 accagcag cactgagc gtttcaaa ggtagcag accactgct cactgagc
 2701 cgttctgc cgtatgct atactctg ctacaactc agcaactc gctcagct
 2761 cctgctcc acagcaga gcaactat gcaactc gcaactc gcaactc

2821 ccagatgct ccgttgctg tctgagat ggcgagcgt atgatatgt tctgcaag
 2881 gttggttgc gaattcaag tctccgcaa gaattgatg gctcaactc ttgagttgt
 2941 gaactgctc gtaggtagc ccgctgtc ccgctgtc agtggccgc cgtctcaga
 3001 ccgcttcatg tttctcaga ggggagata atcccgctga cgtcagcgt tccagtcat
 3121 gaagttagc tggtaagac ccgagcagt ccttgaact gctcctgat gctcctat
 3181 acctgcctg acagctggt cgcacaagc ggcactccga tgcgcggga agcagaaga
 3241 atcataagc ggaagcctc ccagctcgc gtcgcagac ccagcaagc gtagccaga
 3301 gctgcagca gtttgaact ccggttaact tacatlaat gctgtctgt ccctggccc
 3361 tttcagctg ggaactcgt cgtcagcgt gacttaaga atggccaa ccgctgggg
 3421 aggggtttg cgtattggc ccagctggt tttctttt caccagtag acggcaaca
 3481 gctgattgc cttaaccgc tgcctcagc agattggag caagcgtcc acgtggtt
 3541 gcccagcgc gccaactcc tggtttagg ttggttcag cgggataa catgagctg
 3601 taatggcgc cactgccc agcactct gctcctgtc atgcagcgc ccgactctg
 3661 cgtactctc attcagctt tgcattggt gatgaaac ggcactgca ctccagtc
 3781 ctccctctc cgtatctgc tgaattgat tgcagtagg atattatgc cagccaga
 3841 ggcagcagc ccgcagaca gaaactaat gctccctaa cagccagat tctgtatg
 3901 ccaatgctc cagtgctcc acgcagctc gctacactc tctacagcc aaataaat
 3961 tctgtatgc tctgtctca gacactaca gaaataacc cggaaacta gtagcag
 4021 ctccacagc aatgctcc tgtatcca cggtagtt atgataag ccactgagc
 4081 gttgcgagc aagattgct acocgcct tactagctc gacccctc cgttcaaca
 4141 tgcacacc cactgtgca ccagttgat ccggcaga ttaatagcc ggcacatt
 4201 ggcagcgc gtagcagcc agactggag tggcaacc atccagcag actgcttgc
 4261 ccagctgtg ttgtgcag ccgttgaac tgaattagc ctccagctc gctctcca
 4381 gataagagc accgctacc tctgcactc tactagctc gacccctc cgttcaaca
 4441 cctgattg actctctcc gggcgtatc atgcactc ggcagaatt tgcocatt
 4501 cgttggctc aagcaaatg cactgcact cgcctctgc cgcagttgc aagctgct
 4561 ggaacttca gactcagc cactgcact cgcctctgc cgcagttgc aagctgct
 4621 tggattgct gtagcagct taaactctg atactctg gctcctatg gctcctat
 4681 gttctgata atgtttttg ccgacatc ataaactct tggcaaatc tctgaatga
 4741 gctgtgaca ataatcatc gctcgtata atgttggaa ttgtgagc ataaactc
 4801 caacagaga acaacttcc atatgaaata ctatataca acagcagc ctggttatt
 4861 atgtctgca atgttgcga ggtccgca tctcagaca aactcagc
 4921 atgcccgc tgcocgca ctgaactgt gggggacc tgaattctc tttctccccc
 4981 aaacccagc gacacctca tctctccc gaccctgag gtcacatgc tgggttga
 5041 cgtgagcag gaagacctg agtcaactt caactgac gtagcagc tggatgca
 5101 taatgcccg acaagccgc ggggagaga gtaacaagc actgacccg tggctcaat
 5161 cctacagc ctagccagc actgctgaa tggcaagag taactgta agtctcctc
 5221 caaacctcc ccagcccca tctgmaaac ctctcaaa gcaaaagc agccagaa
 5281 accagctgc taacccctc cccatccc ggaatgctg accaagaac agtccgct
 5341 gactcctg gtaaacctc tctatccc gactcagc gtagctg gtagcaatg
 5401 gacgcccag acaactaca agacaagc tccctgctg gctcagcag cctctctt
 5461 cctacagc ctagccagc actgctgaa tggcaagag taactgta agtctcctc
 5521 ctccgtgct cactgctcc tggcaagc ctctcaaa agactctc cctctcct
 5581 ggttaataa gcttgcctg tttgcagat gagaagag gcttgaat ggcctaca
 5641 tcaaacct cactgagc gataactg cctgtttg cgttgagc aagatttca

1 tttttttt ttotaatat attaaatc gttccgctc atgagcaat aacctgata
 61 atgcttcaa taatattgaa aaagaaagc tatgattc caactttcc cgttgcctc
 121 tttctctc ttggcgat ttgccttc ttttttgc caccagaaa ccgctgtga
 181 agtaaaagc gctgagatc agttgggct agagaggtt taactgaa tggatcaca
 241 cagcgttag atcttgaga gttttccc gagaagatc tttccaga tgcacttt
 301 taagtctg ctatgtgc cgttattc cgtgttagc gcccagca agcaactg
 361 tgcgcata caacttctc agaatgatt agttgagc tccacgca cagaaga
 421 tctatgag gcaatctc tgaacatc atgagagct gcatcaaca tgaatgaa
 481 cactgccc aacttctc tgaacatc atgagagct gcatcaaca tgaatgaa
 541 gcaaacat ggggtagc taactgct tctgttgc gaccgagc tgaatgaa
 601 cacaacaac ggcagcgt acacaagc gctgtgca atgcaaca cgttgcgca
 661 actataact ggcgaactc ttaactat cactgtgc ttcgcgca caattatg
 721 ggcgataaa gttgagac cactgtgc cccgcctc cccgctgt gttttatg
 781 tgaataat ggcgagcgt agctggctc tgcggttc attgagca tgggagca
 841 tggtagcc tccctgat tagtata cagcagcgt gaccgagc atgagtag
 901 agcaatga cagctgct agatggtc ctactgct agaatgct aactgagc
 961 ccaattac taatatac tttagatg ttaaaact ctttttat taaaaagat
 1021 ctagggag actcttctg atactctc gacaaact ccttaactc agtttctg
 1081 ccaactgct tgcagcgt tagaagaat caaagctc gttcttcc ttttttgc
 1141 ggcgtaac tctgtctc aaacaaaa acccaactc gttcttcc ttttttgc
 1201 gataagag ctacaact tttccgaa gtaactgc tgcagagc ccagatca
 1261 aaactatc cttctgct agcctgct accagctc gctcagct gctgagct
 1321 gactatac ctctgctc taactgct accagctc gctcagct gctgagct
 1381 gtttttcc gttttagc caagaata gtaactg accagctc gctcagct
 1441 accggtgt tctgtcag acccaact ggcagcgt acccaact caactgata
 1501 cctacagc gactgagc aaagcacc cctccgaa ggggagag ccgacatg
 1561 tccgttag ggcaggtc gaacagaga ggcagcagc gacttccg ggggagca
 1621 ctgattct ttagcagc tccgtgtc caactctc atgagctc ctttttat
 1681 aaactgta gttttagc gactgagc gactgagc gactgagc gactgagc
 1741 cctggtct ttttttgc ttttttgc ttttttgc ttttttgc ttttttgc
 1801 gataactc atactgct ttagtagc gactgagc gactgagc gactgagc
 1861 ggcagcagc taatgagc agtagagc agtagagc agtagagc agtagagc
 1921 gactgagc gactgagc ttaactct accagctc gctcagct gctcagct
 1981 gactgagc gactgagc ttaactct accagctc gctcagct gctcagct
 2041 cccagcacc gcaacacc gctgagc gctgagc gctgagc gctgagc
 2101 cctacagca agctgagc cctccgca gctgagc gctgagc gctgagc
 2161 cccagcagc cgcagcagc cgcgtaaa gctcagc gctgagc gctgagc
 2221 agatgctg cgttctcc gctcagct cgtttagc atgagctc gcttctcc
 2281 gacttctg aaagcggc agttaaagc cgttttgc gttttagc atgagctc
 2341 tctgtagc gactgagc gactgagc gactgagc gactgagc gactgagc
 2401 gctcagta cgttctag atgtagca tgcocgta ctgaactg gtaggtaa
 2461 caactgct gtagtagc ggcgagca gagaacaa atcagactc aatgagc
 2521 ctctgact cactgagc gtttcaaa ggtagcag accactgct cactgagc
 2581 ccgaaact cactgagc gtttcaaa ggtagcag accactgct cactgagc
 2641 accagcag cactgagc gtttcaaa ggtagcag accactgct cactgagc
 2701 cgttctgc cgtatgct atactctg ctacaactc agcaactc gctcagct
 2761 cctgctcc acagcaga gcaactat gcaactc gcaactc gcaactc

P53K1ag/RS/35mpy6Hise2

5281 atabgnaata cctattgect agogaaogcc ctggattgtt attactogcc gcccaagccg
 5341 caatggccgc tagcaacgc gpgcaatcgg tottccctcc ggaaccctcc tccaaagaca
 5401 cctctggggg caacggccgc ctggccgc tgcacaaga ctactctccc gaacggcgga
 5461 cggctctcgc gaactcagcc gcccctgaca gccggctgca caacttccgc gctgcctcac
 5521 agtccctcgg actctactcc ctcaagccgc tagtcaagc cccctccagc agtctgggca
 5581 cccagacctc cactctcaac ctgaaatcca agccagccca caaacagtg gacaagaag
 5641 ttgagccaa atctggccg gcccgaagca aaaaactct ctcaagagc gatctgaatg
 5701 ggccctgaca tcccacgca gctgagccgc gtaaaagttg gctgtctggc ggaagagag
 5761 agattttca gctctgatac gattaataca gaacgaagc cngctctgat aaaaacaaat
 5821 ttgctggccg cagtagcgcc ggttggtcca cccagaccca tgcagaaact agaatgaaa
 5881 cccctagcgc ccagtagtgc ttggtgtctt occatgaca gagttaggaa ctccagccga
 5941 tcaataaaaa cyaagagctc agtcaaaaga ctggcccttt cgttttatct gttgtttgtc
 6001 ggtgaagctc ctctctggca gyaacaaatc gccggcgagc gatttgaag ttgcaagaa
 6061 acygcocgga ggaactccgc gggcagagcc ccgcocataa actgcagccg atcaaatba
 6121 gcaagaagcc atctcgagc agtgcctttt tggctttata caaactott

SEQ ID № 112

1 tggttattt tttaaatat attcaaatat gtatccctcc atgagacaat aacocctgata
 61 aatgcttcaa taatatgaa aaagaagagc tatgagattt caacatttcc gttgtccctt
 121 tattcccttt ttggcgcat ttgctctccc tgtttttggc caaccagaaa cgtctgggaa
 181 agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc acagatggct taactcgaac tggatctcaa
 241 acaggttaag actcttgaga gtttttgcgc ccgaagaagc ttctcaatga tgaagcacttt
 301 taagttctgc ctatgtggcg ccgtatlatc ccgtgtgac gccggcgagc agcaactcgg
 361 tgcgcgata caetatttcc agaatgact ttctgagact tcccaagca cagaanaaaa
 421 tcttcagcat ggcataagc taagaagat atgcagctgc gccataccca tggatgata
 481 cactgcggcc aacttactt tgaacaagc agtgaagcc gcaagagata cgcctttttt
 541 gcaacaatg ggggacatg taactcgcct tgcctgtcgg gaaccgagc tgaatgaagc
 601 ctacaacaa gccggctgac caacaacat gctctgaga atgcaacaa cgttcggaaa
 661 actataact ggcgaactac ttaactcgc ttcccgaaa caattaagc actgagtagc
 721 ggcgataaa gttgcagcc caactctgcc ctggccctcc ccgctggctt gttttatg
 781 tgaataact ggaecoggt agcgtggctc tccgctatc attcagcaac tggggccgga
 841 tggtaagcc tccgctatgc tagttactca caagcaggg agtcagaaa ctatgata
 901 ccgaatgaa cagatctgct agatagtcg ctactgatt agcatggct aactgtgaa
 961 coagtttgc actcttttgc atactctat gcccaaaatc ccttaacgtg agttttcgtt
 1021 coactgagc tcaagccgc tagaanaag caaagatctc ttctgagtc cttttttt
 1141 ggcgttaac tgcgtcttgc aaaaacaaa accaccgcta cccagcgttg ttgttttgc
 1201 ggaacaaa gcaactctgc ttctccgaa gtaactcgc tccagagagc cgttcgaaa
 1261 aaactcgtc ctctctgctc agcctgactt aggcacaaac caattaagc actgagtagc
 1321 gctacatac ctgcctcgc taactcgtt accagctgc gctgcagctc gctgaagtc
 1381 gttcttacc gggttgact caagacata gtaacogct aagcgcagc gctgggtgct
 1441 aacgggggtc tctgcaaac agcccgctt ggaagcaac acccaaaccc aactgagata
 1501 ctacacagc gcaactcgc aaagccccc gctcccgaa ggaagaaagc gggcagagta
 1561 tccgtaagc gccaggtgag gaacagaga ggcagagcc gactctccg gggaaagcgc
 1621 ctggttactc tatgctctc tccgcttgc caactcga cctgagctc gatttttgg
 1681 atgctctca gggggcgga gactatgaa aaaccgaca acgcggcctc tttaagctt
 1741 cctggccttc tggctcctc ttgctcaat gttctttctc gctatctcc ctagctctg
 1801 gataacagc agctgtgac ttgctcagc tgaactcgc ccgcagccc gtagagctaa
 1861 ggcagcagc tcaatgagc agtgaagca tggtaacgc agtgcagc ctagagctaa
 1921 gcaactgagc gttattctc accgatata tggctcagc tcaatcaat ctgctctg
 1981 gcaactagc taacagcta taactcgc ctactcagc tctgctgct atgctctg
 2041 cccagaccc gccaaacccc gctgagcgc cctgagcgc ttgtctgct ccgctcagc
 2101 ctacagca agctgtgac gctcccgga gctccagc tcaaggttt taactcagc
 2161 caacgaagc cctggtagc ctggcaaaa gctctcagc atggagctc gctggcagc
 2221 agtctctgc ctgtctccg gctgcagcc cgttgattt cccagagcc gtaaatgct
 2281 ggtctctg atcaagccgc atgttaagc agtggttttc ctgtttgctc actgtatgc
 2341 tccgttga agggatttct tgttcaagc gtaacgta ccagtaaac gtagaggt
 2401 gctacagta cctgctact gtagtaaaa tggcggta ctggaaactc gtagaggtaa

5941 tcaataaaaa cyaagagctc agtcaaaaga ctggcccttt cgttttatct gttgtttgtc
 6001 ggtgaagctc ctctctggca gyaacaaatc gccggcgagc gatttgaag ttgcaagaa
 6061 acygcocgga ggaactccgc gggcagagcc ccgcocataa actgcagccg atcaaatba
 6121 gcaagaagcc atctcgagc agtgcctttt tggctttata caaactott

PCCKHNYI-740

SEQ ID № 99

1 tggttattt tttaaatat attcaaatat gtatccctcc atgagacaat aacocctgata
 61 aatgcttcaa taatatgaa aaagaagagc tatgagattt caacatttcc gttgtccctt
 121 tattcccttt ttggcgcat ttgctctccc tgtttttggc caaccagaaa cgtctgggaa
 181 agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc acagatggct taactcgaac tggatctcaa
 241 acaggttaag actcttgaga gtttttgcgc ccgaagaagc ttctcaatga tgaagcacttt
 301 taagttctgc ctatgtggcg ccgtatlatc ccgtgtgac gccggcgagc agcaactcgg
 361 tgcgcgata caetatttcc agaatgact ttctgagact tcccaagca cagaanaaaa
 421 tcttcagcat ggcataagc taagaagat atgcagctgc gccataccca tggatgata
 481 cactgcggcc aacttactt tgaacaagc agtgaagcc gcaagagata cgcctttttt
 541 gcaacaatg ggggacatg taactcgcct tgcctgtcgg gaaccgagc tgaatgaagc
 601 ctacaacaa gccggctgac caacaacat gctctgaga atgcaacaa cgttcggaaa
 661 actataact ggcgaactac ttaactcgc ttcccgaaa caattaagc actgagtagc
 721 ggcgataaa gttgcagcc caactctgcc ctggccctcc ccgctggctt gttttatg
 781 tgaataact ggaecoggt agcgtggctc tccgctatc attcagcaac tggggccgga
 841 tggtaagcc tccgctatgc tagttactca caagcaggg agtcagaaa ctatgata
 901 ccgaatgaa cagatctgct agatagtcg ctactgatt agcatggct aactgtgaa
 961 coagtttgc actcttttgc atactctat gcccaaaatc ccttaacgtg agttttcgtt
 1021 coactgagc tcaagccgc tagaanaag caaagatctc ttctgagtc cttttttt
 1141 ggcgttaac tgcgtcttgc aaaaacaaa accaccgcta cccagcgttg ttgttttgc
 1201 ggaacaaa gcaactctgc ttctccgaa gtaactcgc tccagagagc cgttcgaaa
 1261 aaactcgtc ctctctgctc agcctgactt aggcacaaac caattaagc actgagtagc
 1321 gctacatac ctgcctcgc taactcgtt accagctgc gctgcagctc gctgaagtc
 1381 gttcttacc gggttgact caagacata gtaacogct aagcgcagc gctgggtgct
 1441 aacgggggtc tctgcaaac agcccgctt ggaagcaac acccaaaccc aactgagata
 1501 ctacacagc gcaactcgc aaagccccc gctcccgaa ggaagaaagc gggcagagta
 1561 tccgtaagc gccaggtgag gaacagaga ggcagagcc gactctccg gggaaagcgc
 1621 ctggttactc tatgctctc tccgcttgc caactcga cctgagctc gatttttgg
 1681 atgctctca gggggcgga gactatgaa aaaccgaca acgcggcctc tttaagctt
 1741 cctggccttc tggctcctc ttgctcaat gttctttctc gctatctcc ctagctctg
 1801 gataacagc agctgtgac ttgctcagc tgaactcgc ccgcagccc gtagagctaa
 1861 ggcagcagc tcaatgagc agtgaagca tggtaacgc agtgcagc ctagagctaa
 1921 gcaactgagc gttattctc accgatata tggctcagc tcaatcaat ctgctctg
 1981 gcaactagc taacagcta taactcgc ctactcagc tctgctgct atgctctg
 2041 cccagaccc gccaaacccc gctgagcgc cctgagcgc ttgtctgct ccgctcagc
 2101 ctacagca agctgtgac gctcccgga gctccagc tcaaggttt taactcagc
 2161 caacgaagc cctggtagc ctggcaaaa gctctcagc atggagctc gctggcagc
 2221 agtctctgc ctgtctccg gctgcagcc cgttgattt cccagagcc gtaaatgct
 2281 ggtctctg atcaagccgc atgttaagc agtggttttc ctgtttgctc actgtatgc
 2341 tccgttga agggatttct tgttcaagc gtaacgta ccagtaaac gtagaggt
 2401 gctacagta cctgctact gtagtaaaa tggcggta ctggaaactc gtagaggtaa

2461 acaactggcg gtaggtatg gggcgcaaa gagaanaatc actcaggttc aatcccagc
 2521 ctctgttact acagcttag gttctcaaa ggttagcag cagctctcgc gtagcagat
 2581 ccgcacata atggcgagc gggcgcaaa gttctgactt cggcttccgc agactcttag acaacagaa
 2641 accgaagac atctattg ttgctaggtt cggcaaggtt ctgcaagc agctctca
 2701 cgtctctgc cgtatctg attcattgt ctaaacata aggaaccctc gccactgac
 2761 cgggttcc ccaagcaga gcaatcat ggcacaact gcaacagc agctctgac
 2821 cagagcgc cggctgccc tctctgagc gggcgcaagc atgattatg tctccagac
 2881 gttctgagc gcaacagc ctcccgaaa gaatctgct gctccactt ttggatggct
 2941 gaactcgtta cggagctg gccgcttcc atccagctg agggcgcc gctccctga
 3001 ccgcagcaga accggyggag gcaacaaagc tataggcgcc cgcctacat caatgcaaa
 3061 ccgttccag ttctcgcga gggcgcaaa atcccgctg cagtctagc tccatgctc
 3121 gaagttagc tggtaagcc ccgcagcctc ccttgaagct gctccctgct gctctcatc
 3181 gttctgagc aagagagcc ctgcaacgc ggaactccga tgcgcgcga agcgagaa
 3241 atcaatagc ggaagccat ccagctctgc gttccgagc caacagcagc gtagccagc
 3301 gctcgcca cgttgaact cgcctaac taactaat cgttggct cactgcgc
 3361 ttccagtc ggaacactg cgtccagct gaattaaga atggccac gccggggag
 3421 agggcgttg cgtattggc gcaagcttg ttctttttt caacagtag accgcaaca
 3481 gctgagct cttccgc tggccttgc aggttgcag caagcgtcc accgtgttt
 3541 gcccaagc gcaaaaatc ttgttttg ttgctagc agagataa catgactgt
 3601 ctctgtatc gctgatcc actaacgaa taccagca tccagccgc cggactgag
 3661 taatggcg cactgccc agcccatc gatctgag caaccagc gccagtgaa
 3721 cagctcctc atcaactc tgcattgtt gttgaaac ggaactgga cctcagtc
 3781 ctccctgc cgtatcggc tgaattgt tggagtagc atattatgc cagcagca
 3841 gacgcagc cgcagcga gaaactatg gcccctga cagcagca tgcctagtc
 3901 caactgca cagctctcc agccagctc gctcaact gctcagc gcaactgga
 3961 ttgtgagc ttctgctca gagaacaa gaataaag ccgaacta gctcagc
 4021 ctccacagc aatggctcc tggctcca cggatgct aatgtagc cactcagc
 4081 gttcgagc aagatgct acccgctt taagcttc cggcgagc ttaatagc gcaaaatt
 4141 tgaacccc cagctgga ccaagtagc agctgagc agcagcagc agcagcagc
 4201 gcaagcgc gtagagcc agactgagc ggttggaa tgaattag cctccagc
 4261 ccgcaagc ttgtgccc cgttggaa tgaattag cctccagc gcccttca
 4321 ctttttcc cgttttgc gaaagcgc tggcctgt caaccggc caaccgtt
 4381 gataagac accgctacc cctgagctc cgtataag taactgctc caactcaaa
 4441 ccaagtag actctctcc gggccttc atgcaaac ggaaggtt ttgctcct
 4501 cagctgctc actgaagc agctgagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc
 4561 ggaactac gactcagc tgcacagc cctctgctc cagcagca tggagctg
 4621 ttgtatgt gtagctgc taactcagc cataactg gctcctag cgcactgc
 4681 gttctgata atgtttttt cgcgcagc ataaagctc tggcaaatc tctgaaatc
 4741 gctgtgca ataacatc ggtctgata atgttggaa ttgtagagc atacaatt
 4801 caacagaa acgaactcc agcagctg cctctgagc caacagc gtagcagc
 4861 atgtctgt ggcagcgc caatggcca gttccagc tcccaagc cgtctgctc
 4921 acactctc ttaactcc cgcactga tgaagctg aaatggaa cctctctg
 4981 ttgtgctc ctgaatac tctatccc agagccaa gtaactgga agtgataa
 5041 ctacagc tggtaact cccagagc tgcacagc gacagcaga aggaagca
 5101 ctacagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc
 5161 cgtctgga gtaacact agggctag cctcagctc caacagca tggagctg
 5221 aggtgaga gttgatac aagaagca cgaataagc taacagca acagactc
 5281 atagaaata cctattctc agcagcgc cagttctgt gtaactgc gccagcgc
 5341 cactgagc tagcaaac ggcctagc tctccctc ggaactcc tcaagagca
 5401 cctgtggc agcagcgc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc
 5461 cgtgtgtg gaactcagc gctcagca gggcgagc caactctc cactgcgc
 5521 agctctag actactcc ctagagc tagtagctc gctcagc gtagcagc
 5581 ccagcacta cactgcaac gtaacaca agcccaaa ccaagagc gcaagaaag
 5641 ttgagccaa atcttggc gcgcagca aaaaactat ctagagagc gatctgag
 5701 aaaaactat ctagagagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc
 5761 gtaactgt gctgtttg cgtatgagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc
 5821 gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc
 5881 cgcagcag cagctgagc ttgggggt cccactgga gtagtagc actgagca

SEQ ID № 113

1 tggttattt tttaaatat attcaaatat gtatccctcc atgagacaat aacocctgata
 61 aatgcttcaa taatatgaa aaagaagagc tatgagattt caacatttcc gttgtccctt

121 tttcccttt ttggggatc ttgctcttc tttttttg caccogaaa cgtgtgtgaa
 122 agtaaaaga gtaagagatc agtgggtgc acagggggg tcaatgaaac tggatctcaa
 241 cagcggtaag atctctgga gttttcttc tttttttg tttttttg tttttttg
 301 taagctctg atctctgga gttttcttc tttttttg tttttttg tttttttg
 361 tctggcaga cactattctc agaatgact gtttgatgc tcaacagta cagaagaaga
 421 tctggcaga gaaatgacg taagaagt atagctgtc gocaataca tggatgataa
 481 cactggcag aacttacttc tgaacaactc aggaagcagc aaggagctaa cctgtttttg
 541 gaaacaactg tttttcttc tttttttg tttttttg tttttttg tttttttg
 601 caatacaac ggcagcgtc agcaacactc gctgtgaga atgtcaaca cgtttgtgaa
 661 actataact ggcagcgtc tttttcttc tttttttg cacttaaac caattaaag actgtgata
 721 gggagataa gttgagacg cactcttgc tttttcttc cctgtgtct gttttttg
 781 tttttttg ggcagcgtc agtgggtgc tttttcttc atttgagca tggggccaga
 841 tttttttg tttttcttc tttttttg tttttttg tttttttg tttttttg
 901 agcaataga cagatcgtc agataggtc ctaactgact cctgtgtct gttttttg
 961 caagtttac tcaatatac tttttcttc tttttttg tttttttg tttttttg
 1021 ctaggtaga atctttttg ataatcttc gaccaaac cottaacgtc agttttctg
 1081 cctgtgtc tttttcttc tttttttg tttttttg tttttttg tttttttg
 1141 gctgtgact agcttttc aaacaaaaa accacagccta cagcgggtg tttttttg
 1201 gttacagag ctaccaactc tttttcttc tttttttg tttttttg tttttttg
 1261 aaatactgc cttaactgtc agcgtgact aggcacacac ttaacagac ctgtgaaac
 1321 gctcaatac ctgctctgc taactctgt accagtgct gctgcaagc gctgaaact
 1381 gctgtctac ggggtgact caagacata gttacagatc aaggcagc gttgctgtc
 1441 aacgggggt tctgtcaac agccagctc gctgcaagc acctaacagc aactgata
 1501 cctacagctc gacatctgc aaagcagc gcttccgca gggcaagc cggacagta
 1561 tctgtgact ggcagcgtc gacagcaga gctgcaagc gactctca gggcaagc
 1621 ctgttatct tatagctgc tctgtctgc cactctctc ctgagctc gattttgtc
 1681 atctgtc ggggggaga gctatgaa aaacagcctc aagcggctc tttttcttc
 1741 cctgtctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 1801 gttacagctc ataacgtc tttgtctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 1861 gctgctgc tctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc
 1921 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 1981 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 2041 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 2101 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 2161 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 2221 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 2281 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 2341 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 2401 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 2461 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 2521 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 2581 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 2641 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 2701 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 2761 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 2821 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 2881 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 2941 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 3001 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 3061 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 3121 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 3181 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 3241 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 3301 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 3361 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 3421 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 3481 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 3541 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc

3601 ctctggatc tttgtctc actcaaga tctctgacc aagcggcagc cggactcgg
 3661 taaggggag cactgtctc agccagctc agccagctc gttggagca gttggagca
 3721 ctctggatc tttgtctc actcaaga tctctgacc aagcggcagc cggactcgg
 3781 ctctggatc tttgtctc actcaaga tctctgacc aagcggcagc cggactcgg
 3841 gacgcagag cgcagcaga gaaatgac gttcgcata cagcagctc tttgtctc
 3901 caactgtgac cagatctgc agccagctc agccagctc gttggagca gttggagca
 3961 tttgtctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 4021 ctctggatc tttgtctc actcaaga tctctgacc aagcggcagc cggactcgg
 4081 tttgtctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 4141 tttgtctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 4201 ggcagcgtc gttgagacg agctgtgag tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 4261 ctctggatc tttgtctc actcaaga tctctgacc aagcggcagc cggactcgg
 4321 ctctggatc tttgtctc actcaaga tctctgacc aagcggcagc cggactcgg
 4381 gataagac cgcagcaga tttgtctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 4441 cctgtgtc actctctc gggcagctc atgcaactc gccaagctc gttgtctc
 4501 gctgtctc agtaaatc cctgtgtc cctgtgtc cctgtgtc cctgtgtc
 4561 gctgtctc gctgtctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 4621 tttgtctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 4681 tttgtctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 4741 gctgtctc ataatc gctgtctc atgtgtc atgtgtc atgtgtc
 4801 caacagaa acagatctc atagaata cctattaca cgcagcagc aagctgtc
 4861 atgtctc gctgtctc cctgtgtc gttcagc gttcagc gttcagc
 4921 cctgtctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 4981 tttgtctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 5041 gctgtctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 5101 cctgtctc agcagcagc tttgtctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 5161 gctgtctc gttcagc gttcagc gttcagc gttcagc gttcagc
 5221 agctgtc gctgtctc gctgtctc gctgtctc gctgtctc gctgtctc
 5281 atagaata tttgtctc cgcagcagc cctgtgtc tttgtctc tttgtctc
 5341 cctgtctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 5401 cctgtctc cgcagcagc tttgtctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 5461 gctgtctc gttcagc gttcagc gttcagc gttcagc gttcagc
 5521 gctgtctc gttcagc gttcagc gttcagc gttcagc gttcagc
 5581 cctgtctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 5641 tttgtctc atgtgtc aaactca cctgtctc cctgtctc gcaagaagc
 5701 aaactca cctgtctc atagaata gctgtctc gctgtctc gctgtctc
 5761 gctgtctc gttcagc gttcagc gttcagc gttcagc gttcagc
 5821 cctgtctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 5881 cctgtctc gttcagc gttcagc gttcagc gttcagc gttcagc
 5941 cctgtctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 6001 gctgtctc gttcagc gttcagc gttcagc gttcagc gttcagc
 6061 gctgtctc gttcagc gttcagc gttcagc gttcagc gttcagc
 6121 gctgtctc gttcagc gttcagc gttcagc gttcagc gttcagc
 6181 tttgtctc aaactca cctgtctc atagaata gctgtctc gctgtctc

pcKchrl1

SEQ ID N° 100

1 tttttttt tttttttt atcaaatc gttctctc atgacaaat aacctgata
 61 atgtctca taatgaa aaagaagc tatgtatt caactctc gttgtctc
 121 tttttttt tttttttt tttttttt tttttttt tttttttt tttttttt
 181 agtaaaag gtaagagc gttgtctc agtgggtg taatgaaac tggatctcaa
 241 cagcggta atctctga gttttctc tttttttg tttttttg tttttttg
 301 taagctctg atctctgga gttttctc tttttttg tttttttg tttttttg
 361 tctggcaga cactattctc agaatgact gtttgatgc tcaacagta cagaagaaga
 421 tctggcaga gaaatgacg taagaagt atagctgtc gocaataca tggatgataa
 481 cactggcag aacttacttc tgaacaactc aggaagcagc aaggagctaa cctgtttttg
 541 gaaacaactg tttttcttc tttttttg tttttttg tttttttg tttttttg
 601 caatacaac ggcagcgtc agcaacactc gctgtgaga atgtcaaca cgtttgtgaa
 661 actataact ggcagcgtc tttttcttc tttttttg cacttaaac caattaaag actgtgata
 721 gggagataa gttgagacg cactcttgc tttttcttc cctgtgtct gttttttg
 781 tttttttg ggcagcgtc agtgggtgc tttttcttc atttgagca tggggccaga
 841 tttttttg tttttcttc tttttttg tttttttg tttttttg tttttttg
 901 agcaataga cagatcgtc agataggtc ctaactgact cctgtgtct gttttttg
 961 caagtttac tcaatatac tttttcttc tttttttg tttttttg tttttttg
 1021 ctaggtaga atctttttg ataatcttc gaccaaac cottaacgtc agttttctg
 1081 cctgtgtc tttttcttc tttttttg tttttttg tttttttg tttttttg
 1141 gctgtgact agcttttc aaacaaaaa accacagccta cagcgggtg tttttttg
 1201 gttacagag ctaccaactc tttttcttc tttttttg tttttttg tttttttg
 1261 aaatactgc cttaactgtc agcgtgact aggcacacac ttaacagac ctgtgaaac
 1321 gctcaatac ctgctctgc taactctgt accagtgct gctgcaagc gctgaaact
 1381 gctgtctac ggggtgact caagacata gttacagatc aaggcagc gttgctgtc
 1441 aacgggggt tctgtcaac agccagctc gctgcaagc acctaacagc aactgata
 1501 cctacagctc gacatctgc aaagcagc gcttccgca gggcaagc cggacagta
 1561 tctgtgact ggcagcgtc gacagcaga gctgcaagc gactctca gggcaagc
 1621 ctgttatct tatagctgc tctgtctgc cactctctc ctgagctc gattttgtc
 1681 atctgtc ggggggaga gctatgaa aaacagcctc aagcggctc tttttcttc
 1741 cctgtctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 1801 gttacagctc ataacgtc tttgtctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 1861 gctgctgc tctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc
 1921 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 1981 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 2041 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 2101 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 2161 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 2221 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 2281 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 2341 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 2401 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 2461 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 2521 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 2581 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 2641 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 2701 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 2761 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 2821 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 2881 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 2941 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 3001 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 3061 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 3121 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 3181 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 3241 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 3301 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 3361 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 3421 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 3481 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc
 3541 gctgtctc gttatgac agtggctc tttgtctc tttgtctc tttgtctc

SEQ ID N° 114

1 tttttttt tttttttt atcaaatc gttctctc atgacaaat aacctgata
 61 atgtctca taatgaa aaagaagc tatgtatt caactctc gttgtctc
 121 tttttttt tttttttt tttttttt tttttttt tttttttt tttttttt
 181 agtaaaag gtaagagc gttgtctc agtgggtg taatgaaac tggatctcaa
 241 cagcggta atctctga gttttctc tttttttg tttttttg tttttttg
 301 taagctctg atctctgga gttttctc tttttttg tttttttg tttttttg
 361 tctggcaga cactattctc agaatgact gtttgatgc tcaacagta cagaagaaga
 421 tctggcaga gaaatgacg taagaagt atagctgtc gocaataca tggatgataa
 481 cactggcag aacttacttc tgaacaactc aggaagcagc aaggagctaa cctgtttttg
 541 gaaacaactg tttttcttc tttttttg tttttttg tttttttg tttttttg
 601 caatacaac ggcagcgtc agcaacactc gctgtgaga atgtcaaca cgtttgtgaa
 661 actataact ggcagcgtc tttttcttc tttttttg cacttaaac caattaaag actgtgata
 721 gggagataa gttgagacg cactcttgc tttttcttc cctgtgtct gttttttg
 781 tttttttg ggcagcgtc agtgggtgc tttttcttc atttgagca tggggccaga
 841 tttttttg tttttcttc tttttttg tttttttg tttttttg tttttttg
 901 agcaataga cagatcgtc agataggtc ctaactgact cctgtgtct gttttttg
 961 caagtttac tcaatatac tttttcttc tttttttg tttttttg tttttttg
 1021 ctaggtaga atctttttg ataatcttc gaccaaac cottaacgtc agttttctg
 1081 cctgtgtc tttttcttc tttttttg tttttttg tttttttg tttttttg
 1141 gctgtgact agcttttc aaacaaaaa accacagccta cagcgggtg tttttttg
 1201 gttacagag ctaccaactc tttttcttc tttttttg tttttttg tttttttg

1361 aaatactctg cttctagctg agcctagctt agccaccacc ttcaagaact ctgtagacc
 1321 gcaatacacc aggtctgctc taactccgctt accagctgct agccagcagtg gcaataagct
 1381 gttgttaccg ccgtctgctc taactccgctt accagctgct agccagcagtg gcaataagct
 1441 aacgggggct tctgtcaaac gctccagact gggcgcaact agccagcagtg gcaataagct
 1501 ctcaacagctt gacattgctg aaagcgccac gctcccgaaa gggagaagag ccgacagctg
 1561 tccggttaag cggcagcttg aaacagcaga gctcccgaaa gggagaagag ccgacagctg
 1621 ctgtatctct tatgtctctg tccggtcttg ccaactctga ctgacagctc gatttttctg
 1681 atgtctctct taagctgctg gctccagcga aaagcgccac agccagcagtg tttacagctg
 1741 ctgctgctta tctgtccctt tctgtccctt gttcttctct gctctatctc ctatctatgt
 1801 ggtacaacct attaccogct tctgtgagtg tgataccctg ccgacagcag gcaacagcga
 1861 ggcagcagtg taagttagtg aggaagcaga agcgcgcctg agcgcgcctt tttctcttcc
 1921 gactctgctg gttattctcc accagcagata tggtagcctc taagtaaac ctgtctctat
 1981 gctgctagtg taagcagctg taactctctc gctccagcag taactctctc taactctctc
 2041 cccagcagcc gcaaacaccg gctgacgctg cctgacggcg tigtctgctc ccgacatctg
 2101 cttaacagca agctgtgacc gctcccgaaa gctgctatgt taagagcttt tctccctatg
 2161 caacgaaagc cggcagcagc ctgctgtaaa gctccagcag gctgtctgta agcattctcc
 2221 agatctctg ctgtctctcc gctccagcag ctgtgagctt ctccagagca gttatctctg
 2281 gttctctgta aaagcgccac atgtctagtg aggtttcttc ctgtttcttc actgtgagcc
 2341 tccgtgtaag ggggaatttc tttctctctg gtttaagca ccgagtaaac gagagagat
 2401 gctcaagata cgggttactg atgtagca gcccctgta cctggaactt gtagaggtta
 2461 acaactgctg gtagtgatgc ggcgagcaga gagaanaat actcagcttc aatccagcag
 2521 ctctgtctat acagatgtag gttctccaca gggtagcag cagcatctct gtagcagat
 2581 ccgacacata atgtctcaag gctccagctt ccgctgttcc agactttacc aaacagcaga
 2641 accagagacc attatctgtg tttctctctg ccgagccttg tgcagcagc agtgcctcca
 2701 cgttctctct cgtatctctg attactctg ctaccagta agcaaacacc ccgacatctg
 2761 ccggtctctc aaacagcaga gcaagctat ccgacccctg ggcagcagcc caacgtctgc
 2821 ccgagctctc ccgctctctg tctgtgagat gggcagcagc atgtatgtt tctgccaag
 2881 gttgtgtctg gactctcaag tctctccaga gaattgatg gctcccaatc ttgagtgctg
 2941 gactccttta gggagtgctc gctctctctc taattgatg agtctgctct gctcccaatc
 3001 ccgagcagca accgctggag gcaagcaga tatagggctg cgtcccaatc ccgagcagc
 3061 ccgttctctg tctgtctgca gggcgata actcgcctga cgtatcagtg tccagtgatc
 3121 gaagttagtg tggtaagcag ccgagcagct ccttgaactg gctccctgag tctgtctctc
 3181 acctgctctg acagctctg ctgcaagcag ggcctccaga tgcgcgca gcaagcaga
 3241 atcataatg ggaagcact ccagctctc gctccagcag ccagcaagc gtagccagc
 3301 gctgctgca gcttcaat ccgctcact taacttaat gctgtctctc ccgagcagc
 3361 tttccagctg ggaacactgt cgtccagctt gacttaatga atgcgcaac ccgctggagc
 3421 agcgtctctg cgtatctctg cccagcagct tttctctctc caacagtagc accgcaagc
 3481 gctgagctct cttcaacagc tggcctctg agatgtctg caagctctc acgtgcttt
 3541 cccagcagcc gctgcaatcc ctcaacagct tttctctctc caacagtagc accgcaagc
 3601 ctctgtctat gctgtatctc ctcaacagct tttctctctc caacagtagc accgcaagc
 3661 taatgctctc cactgctctc agcctcact gatctgtg accagcagc cctgtgtgga
 3721 cgtatctctc attaccact tctatctctg gttgaaacc ggaactgca ctccagctg
 3781 ctctctctct cttcaacagc tggcctctg agatgtctg caagctctc acgtgcttt
 3841 gcaagcagcc cagatctctc gaacttaag tctccagcag cagcagctt tctgtgagc
 3901 ccaatgctct cagatctctc gaacttaag tctccagcag cagcagctt tctgtgagc
 3961 tctgtgagc tctgtgagc gagaactca gaatacagc ccgcaacata gtagcagc
 4021 ctccacagc aatgctctc tttctctctc tttctctctc caacagtagc accgcaagc
 4081 gtagcagc aatgctctc tttctctctc tttctctctc caacagtagc accgcaagc
 4141 tctcaacagc cctgctctc ccagctctg cctgctctc caacagtagc accgcaagc
 4201 gcaagcagc gtagcagc ccagctctg cctgctctc caacagtagc accgcaagc
 4261 ccgagctctc tttctctctc tttctctctc tttctctctc caacagtagc accgcaagc
 4321 ctctctctc cttctctctc gaaactgct cttctctctc caacagtagc accgcaagc
 4381 gataagcagc accgctctc tctgctctc cgtataact gtagctgtt caactctc
 4441 cctgctctc accgctctc gggctctc atgcctctc ccgcaagct tctgctctc
 4501 gtagctctc accgctctc gggctctc atgcctctc ccgcaagct tctgctctc
 4561 cctgctctc accgctctc gggctctc atgcctctc ccgcaagct tctgctctc
 4621 tctgctctc gtagcagc tcaactctc caactctc gtagctgtt caactctc
 4681 gttctgata atgtttctg ccgacactc ataactctg tggcaaat tctgaaatg

4741 gctgtgca attaactct ggtctgata atgtgtgaa ttgtagagtg ataacattt
 4801 ctcaacagca agcaactct atagtaaca cttatctca cttctctc cttctctc
 4861 attctctg ggcagcagc cctgctctc atagtaaca cttatctca cttctctc
 4921 accactct tctatctct cctctctg cctctctg atagtaaca cttatctca
 4981 tctgtctg ctgataact tctatctca agcagcaaa gtagcagta agtggata
 5041 cctctctca tgggttaact cccagagagc tgcacagag ccagcagca agcagcagc
 5101 ctcaacagca agcaactct atagtaaca cttatctca cttctctc cttctctc
 5161 cctctctg gcaacactc gtagcagc atagtaaca cttatctca cttctctc
 5221 aggtgtta taaaagcaga accagagag atagtaaca ttttctctc cttctctc
 5281 caggtttct tttctctc cccagcagc cctgctctc atagtaaca cttatctca
 5341 tctctctc gcaactct ccaacagca cctctctg cctctctc cctctctc
 5401 tctctctc atctctct gtagcagc atagtaaca cttatctca cttctctc
 5461 cctctctg caactctc gtagcagc atagtaaca cttatctca cttctctc
 5521 tctgctct gctctctc aggtgtgca cccagcagc cctctctc cctctctc
 5581 agcagcaga ccaacagtg gacaagag tgcagcaga cttctctc cttctctc
 5641 tttgctct gagaagat tttctctc atagtaaca cttatctca cttctctc
 5701 ctgataaac agaatctct gtagcagc atagtaaca cttatctca cttctctc
 5761 aactagcag taaaagcag ttagcagc atagtaaca cttatctca cttctctc
 5821 ggaactct agcaacaa taaaagcag ttagcagc atagtaaca cttatctca
 5881 tctctctg tctctctc agctctct gtagcagc atagtaaca cttatctca
 5941 gcaactct agcaacag cctgagcag cctgagcag cctgagcag ctaactct
 6001 cagctctc ataaagcaga agcctctc gtagcagc cttctctc tctcaaac
 6061 tctt

pCKm111

SRQ ID No 101

1 tttttttt ttttaaat attaaatat gtagcctc atgagcaat accctgata
 61 aatgctcaa taattatgaa aaagaaagc tatgagat caactctc gttgctct
 121 tttctctt tttgctct tttgctct tttgctct tttgctct caccagaa cgtgtgaa
 181 agtaaaagc gctgaagat agtggctg agcagctg tacatgaa cgtatctc
 241 agcagctg atctctgta gtttctct cctgagct tttctctc agcagctg
 301 taagttct ctatgctg cgttatct cctgagct tttctctc agcagctg
 361 tctgctca cactatct agatgctt gttgctct cctgagct gtagcagc
 421 tttctctg gctatgaa taagaaat agtctctc gcaataaca cgtgtgaa
 481 cactgctc aactatct tgaacagc cctgagcagc aagagctaa cgtttctt
 541 gcaacagc ggggctct taactctg tctctctg gtagcagc atagcagc
 601 ctacacaa gtagcagc tttctctc tttctctc gtagcagc atagcagc
 661 actataat gtagcagc tttctctc tttctctc gtagcagc atagcagc
 721 gtagcagc gtagcagc cactctct cctgagct cctgagct cctgagct
 781 gtagcagc gtagcagc agcagctg cctgagct cctgagct cctgagct
 841 tttctctc tttctctc tttctctc tttctctc tttctctc tttctctc
 901 gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc
 961 cactctct tttctctc tttctctc tttctctc tttctctc tttctctc
 1021 aactctct atctctct atactctc gcaacaa cctctctc cctctctc
 1081 cactctct tttctctc tttctctc tttctctc tttctctc tttctctc
 1141 gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc
 1201 gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc
 1261 aactctct cctctctc agcagctg gtagcagc gtagcagc gtagcagc
 1321 gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc
 1381 gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc
 1441 gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc
 1501 gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc
 1561 cctgagct gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc
 1621 cctgagct gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc
 1681 gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc
 1741 cctgagct gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc

SRQ ID No 115

1 tttttttt ttttaaat attaaatat gtagcctc atgagcaat accctgata
 61 aatgctcaa taattatgaa aaagaaagc tatgagat caactctc gttgctct
 121 tttctctt tttgctct tttgctct tttgctct tttgctct caccagaa cgtgtgaa
 181 agtaaaagc gctgaagat agtggctg agcagctg tacatgaa cgtatctc
 241 agcagctg atctctgta gtttctct cctgagct tttctctc agcagctg
 301 taagttct ctatgctg cgttatct cctgagct tttctctc agcagctg
 361 tctgctca cactatct agatgctt gttgctct cctgagct gtagcagc
 421 tttctctg gctatgaa taagaaat agtctctc gcaataaca tggatgaa
 481 cactgctc aactatct tgaacagc cctgagcagc aagagctaa cgtttctt
 541 gcaacagc ggggctct taactctg tctctctg gtagcagc atagcagc
 601 ctacacaa gtagcagc tttctctc tttctctc gtagcagc atagcagc
 661 actataat gtagcagc tttctctc tttctctc gtagcagc atagcagc
 721 gtagcagc gtagcagc cactctct cctgagct cctgagct cctgagct
 781 gtagcagc gtagcagc agcagctg cctgagct cctgagct cctgagct
 841 tttctctc tttctctc tttctctc tttctctc tttctctc tttctctc
 901 gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc
 961 cactctct tttctctc tttctctc tttctctc tttctctc tttctctc
 1021 aactctct atctctct atactctc gcaacaa cctctctc cctctctc
 1081 cactctct tttctctc tttctctc tttctctc tttctctc tttctctc
 1141 gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc
 1201 gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc
 1261 aactctct cctctctc agcagctg gtagcagc gtagcagc gtagcagc
 1321 gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc
 1381 gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc
 1441 gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc
 1501 gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc
 1561 cctgagct gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc
 1621 cctgagct gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc
 1681 gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc
 1741 cctgagct gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc

1801 ggtacaacct attaccogct tctgtgagtg tgataccctg ccgacagcag gcaacagcga
 1861 ggcagcagtg taagttagtg aggaagcaga agcgcgcctg agtggatatt tttctcttcc
 1921 gactctgctg gttattctcc accagcagata tggtagcctc taagtaaac ctgtctctat
 1981 gctgctagtg taagcagctg taactctctc gctccagcag taactctctc taactctctc
 2041 cccagcagcc gcaaacaccg gctgacgctg cctgacggcg tigtctgctc ccgacatctg
 2101 cttaacagca agctgtgacc gctcccgaaa gctgctatgt taagagcttt tctccctatg
 2161 caacgaaagc cggcagcagc ctgctgtaaa gctccagcag gctgtctgta agcattctcc
 2221 agatctctg ctgtctctcc gctccagcag ctgtgagctt ctccagagca gttatctctg
 2281 gttctctgta aaagcgccac atgtctagtg aggtttcttc ctgtttcttc actgtgagcc
 2341 tccgtgtaag ggggaatttc tttctctctg gtttaagca ccgagtaaac gagagagat
 2401 gctcaagata cgggttactg atgtagca gcccctgta cctggaactt gtagaggtta
 2461 acaactgctg gtagtgatgc ggcgagcaga gagaanaat actcagcttc aatccagcag
 2521 ctctgtctat acagatgtag gttctccaca gggtagcag cagcatctct gtagcagat
 2581 ccgacacata atgtctcaag gctccagctt ccgctgttcc agactttacc aaacagcaga
 2641 accagagacc attatctgtg tttctctctg ccgagccttg tgcagcagc agtgcctcca
 2701 cgttctctct cgtatctctg attactctg ctaccagta agcaaacacc ccgacatctg
 2761 ccggtctctc aaacagcaga gcaagctat ccgacccctg ggcagcagcc caacgtctgc
 2821 ccgagctctc ccgctctctg tctgtgagat gggcagcagc atgtatgtt tctgccaag
 2881 gttgtgtctg gactctcaag tctctccaga gaattgatg gctcccaatc ttgagtgctg
 2941 gactccttta gggagtgctc gctctctctc taattgatg agtctgctct gctcccaatc
 3001 ccgagcagca accgctggag gcaagcaga tatagggctg cgtcccaatc ccgagcagc
 3061 ccgttctctg tctgtctgca gggcgata actcgcctga cgtatcagtg tccagtgatc
 3121 gaagttagtg tggtaagcag ccgagcagct ccttgaactg gctccctgag tctgtctctc
 3181 acctgctctg acagctctg ctgcaagcag ggcctccaga tgcgcgca gcaagcaga
 3241 atcataatg ggaagcact ccagctctc gctccagcag ccagcaagc gtagccagc
 3301 gctgctgca gcttcaat ccgctcact taacttaat gctgtctctc ccgagcagc
 3361 tttccagctg ggaacactgt cgtccagctt gacttaatga atgcgcaac ccgctggagc
 3421 agcgtctctg cgtatctctg cccagcagct tttctctctc caacagtagc accgcaagc
 3481 gctgagctct cttcaacagc tggcctctg agatgtctg caagctctc acgtgcttt
 3541 cccagcagcc gctgcaatcc ctcaacagct tttctctctc caacagtagc accgcaagc
 3601 ctctgtctat gctgtatctc ctcaacagct tttctctctc caacagtagc accgcaagc
 3661 taatgctctc cactgctctc agcctcact gatctgtg accagcagc cctgtgtgga
 3721 cgtatctctc attaccact tctatctctg gttgaaacc ggaactgca ctccagctg
 3781 ctctctctc tttcaacagc tggcctctg agatgtctg caagctctc acgtgcttt
 3841 gcaagcagcc cagatctctc gaacttaag tctccagcag cagcagctt tctgtgagc
 3901 ccaatgctct cagatctctc gaacttaag tctccagcag cagcagctt tctgtgagc
 3961 tctgtgagc tctgtgagc gagaactca gaatacagc ccgcaacata gtagcagc
 4021 ctccacagc aatgctctc tttctctctc tttctctctc caacagtagc accgcaagc
 4081 gtagcagc aatgctctc tttctctctc tttctctctc caacagtagc accgcaagc
 4141 tctcaacagc cctgctctc ccagctctg cctgctctc caacagtagc accgcaagc
 4201 gcaagcagc gtagcagc ccagctctg cctgctctc caacagtagc accgcaagc
 4261 ccgagctctc tttctctctc tttctctctc tttctctctc caacagtagc accgcaagc
 4321 ctctctctc cttctctctc gaaactgct cttctctctc caacagtagc accgcaagc
 4381 gataagcagc accgctctc tctgctctc cgtataact gtagctgtt caactctc
 4441 cctgctctc accgctctc gggctctc atgcctctc ccgcaagct tctgctctc
 4501 gtagctctc accgctctc gggctctc atgcctctc ccgcaagct tctgctctc
 4561 cctgctctc accgctctc gggctctc atgcctctc ccgcaagct tctgctctc
 4621 tctgctctc gtagcagc tcaactctc caactctc gtagctgtt caactctc
 4681 gttctgata atgtttctg ccgacactc ataactctg tggcaaat tctgaaatg

2521 cttogtbaat acagatgtag gtttccaca gggtagoag cagcatctcg cgtatgcaat
 2522 ccagaaacaa atgggtgagc ggcgtgact ccggttctcc agcatttaag aaacacggna
 2523 accagagacc atactatgca ttgtccaggt cgtgaagct ttacagag agtgccttca
 2701 cgtctgctcg cytatcgctg atcaattctg cttaaccagta aggoaaagcc agtgccttca
 2721 ccggttccctc aacgacagga gcaactgat ggcacocgt ggcacagacc caagctgtcc
 2822 ccagatggcg tggtaagagc tgcgtgagat ggcgagcccg atggatagt ttgcaaaagg
 2823 gtttggttgc gaattccagc ttctccgaaa gaattggttg gttccaaact ttggagttgt
 2941 gaattccgta gggagctg ccagctctcc atctggctcc aggtgagcc gttccaaagc
 3001 ccgcaagca accggggtag cgcagaagc tatagggcg ccgttcaact caatgcgca
 3021 ccgttccatg tctgcgcgca gggcgataa atccgcttgc cgtacagcgg tccagtatc
 3121 gaagttagc tggtaagagc ggcagagct ccttgaagct ctccctgatg ttgctcactc
 3122 accgttcgtg acagatgagc cttcaagcgg ggcattccca tgcgcgcgca agcgaaga
 3241 atactaatgg ggaagcact ccagctctcc cttgcaagc ccaagagac gtagccagcc
 3301 ggcgtgcgca gcttcaact ccgctcaact tacaataact ccgtttgctg cactgcccgc
 3321 ttccagctg ggaacactg cgtgcagct gcaataatga atcggccaac ggcgggggag
 3421 agggcgttgg cgtatggcg gcaagggggg tttttctttt caccagctag agcggcaaca
 3481 gctgatgccc cttccacccc tggccctgag agagtctgag caagcgttcc acgctgtggt
 3541 gcccagagc gcaaaatcc ttgtttgag ttgttgcag ccgagatca caatgagctg gttccaaagc
 3601 cttogtctat cgtctatccc actacagcga tctccagccc aacggagagc cgtgctcgg
 3621 taatggcgcc cactgcccgc aggcactct gatctgctg aaccagctac cagttgggaa
 3721 cgtatgccc attcagcct ttgatggct ttgaaaacg ggaactggca ctccagctgc
 3781 cttccgcttc cgtatcggc tgaattgat tggagctgag atattatgag cagcagcga
 3841 gacgagagc cgcagagca gaacttaag ttccctgaaa caagcgctac ttgctgagca
 3901 ccaatgagcc cagatgctcc agcccactg cgtctacgct tccattggag aaaaataacc
 3961 ttgtgatgg ttctcgttca gagaactaca gaataaacg ccggaactta gtcagcagc
 4021 cttccacagc aatggctacc ttgtatccca tccagctgat aatgtaoag ccaatgcagc
 4081 gttgagagc aagattgtgc accgcctctc taccagctg cagcgcctct cgttctacca
 4141 tgcacacac cagctgtgca ccaagttgat atgcctaac ggaagagtg ttgcccactc
 4201 ggcagccgc gtagccgccc agatggggag ttgcaaacgc aatcagcaac gactcctg
 4261 ccgcaagtg ttgtcccagc cgtttgggaa tgaattatgc ctcagcactc cgccttcca
 4321 ctttttccc cgttttccga gaaactggc tgcctcgttt caccagccgg gaaacgctc
 4381 gataagagc accgctaac tctgcaact cgtataactg taactgttcc acattacca
 4441 ccttgattg actctcttcc ggcctgactc atgcctaac ggaagagtt ttgcccactc
 4501 cgtatgctc aactaactg actccttacc atgcctaac ggaagagtt ttgcccactc
 4561 gtagcttgc aactaactg actccttacc atgcctaac ggaagagtt ttgcccactc
 4621 ttgtatgct gtagcagctg taataactg ctaattctg ttgctcaag gctcagctcc
 4681 gttctgata atgtttttg cgcagcactc ataacgcttc ttgcaaatc ttgaaatga
 4741 gctgtgaca ataaactc gttctgata atgtttgaaa ttgtgagcg ataacactg
 4801 caacagagca acagattcc atatgaaa ctatttccca ttgtgagcg ataacactg
 4861 atgtctctg ggcagcggc ccagtgccca gttccagctc tccctcaact cgttggctg
 4921 accatctgc ttcacttccc cgcactatga ttgagactgt aatctggaa cgtcctctg
 4981 ttgtgctgc cgtataact tctatccag agggcaaaa ttgagccca atcttggac aaaaactca
 5041 cgtccctcc ttggaaact cccagagag ttgcaagag cagagcaga agacagca
 5101 ctaacgctc agagccccc agatggggag ttgcaaacg taagcaaac aaaaactca
 5161 cgtctgaaa gttccactc aggcctctg cttccgctg acaagagct tcaacgctg
 5221 agattgtaa taacagaaa caagaagct atataaata cctatgctc agccgcccg
 5281 cgttatgct atactcgg ccccagccc cactgcccgc tagcaaaa gcccactc
 5341 cttccctcc gttccactc tccagagca cctctggggg caagcggcc cttggctgc
 5401 ttgtccagca cactctcc gaaagcggc agctctgag gaactcagc gactgctg
 5461 gggcgtgca cactctccc gctctcacc actctcacc cactctcacc ctagcagcc
 5521 ttgtgactg cactctccc agttgggca cccagacta cactctcacc gtagatca
 5581 agcccaaaa caccagagc gacaagaa ttgagccca atcttggac aaaaactca
 5641 cgtccctcc ttgcaagca cctgaactc cctcagccc gtagcttctc tctctccc
 5701 caaacccca gaaagccct aggtcaact tcaactgta ttgcaagc gtagcttctc
 5761 aactgcaaaa gaaagccct aggtcaact tcaactgta ttgcaagc gtagcttctc
 5821 taatgcaaaa gaaagccct aggtcaact tcaactgta ttgcaagc gtagcttctc
 5881 tctcactg cttccagcag gactgctg atggcaaaa gtaaacagc aaggtotca
 5941 caaacccca gaaagccct aggtcaact tcaactgta ttgcaagc gtagcttctc
 6001 caaacccca gaaagccct aggtcaact tcaactgta ttgcaagc gtagcttctc
 6061 gtagcact gttcaaaa ctaactgta ttgcaagc gtagcttctc
 6121 gtagcact gttcaaaa ctaactgta ttgcaagc gtagcttctc
 6181 tctctcag aactcagc gttgcaaaa gtagcttctc gtagcttctc
 6241 gtagcact gttcaaaa ctaactgta ttgcaagc gtagcttctc
 6301 cgttcaaaa gtagcttctc gtagcttctc gtagcttctc gtagcttctc
 6361 aactcagc gtagcttctc gtagcttctc gtagcttctc gtagcttctc
 6421 gtagcact gttcaaaa ctaactgta ttgcaagc gtagcttctc
 6481 gtagcact gttcaaaa ctaactgta ttgcaagc gtagcttctc

6001 ctagcagca ggcagccgc ctaactgag cagcagcaaa ataaagcaga aggcactcc
 6061 gacagagag ctttttctg tctcaaaa tctt

YMapy1*

500 ID No 102
 1 ttgtttatt ttctaatac atcaaatat gtagccttc atgagcaat aacctgata
 61 aatgcttca taatattga aaagagag tatgatatt caacttccc gtagccttc
 121 ttttccctt ttgggggat ttgctctcc ttgttttgc caccagaaa cgtgtgtaa
 181 agtaaaagt gctgaagta agttgggtgc acagctggg taactgaaa tggatcaaa
 241 ccggtgtag atctctgga gttttccgc cgaagaact ttccaatga tgaagattt
 301 taactgtg ctatgtggc ggtattatc atctctgag cctgtttgca cagaagaaga
 361 tgcgcgata caactctc ttactgact ttgctgtac cctgacctc cagaaagca
 421 ttttccgat ggaatgagc taagaact atgactgt gcaatacca gtaggata
 481 cactgctgc caactctc tgaacaact gtaggagc aggaagctc cgcctttt
 541 gcaacaact gggagctg taactcct ttagctgt gaaagcagc tgaagtagc
 601 caacacagc ggcagcctg caacagct gctctgaga atgcaaaa cgttgcgaa
 661 actataact ggtgctat taactgact ttgctgtac caatataag actgagcga
 721 ggggataa gttgagagc caactctgc ctagcctc cctgacctc cgtgtgta
 781 tgaataact gtagcagc agctgtgtg ctagcctc atgagcagc tggcgccga
 841 ttgtaagccc tccgtatg tagttatca ctagcagc agtagcagc ctatgtagc
 901 acgaataga cagctgctg agtaggagc atgactgag ctagcagc tgaagtagc
 961 caagttac taatatac tttagatga ttbaaact caattttaa taaagagat
 1021 ctatgtagc atctcttgc atactatc gaccttacc cttbaactg agttttagc
 1081 caactgagc tagaccctc taagaagat caaagatc atgagcagc cttttttt
 1141 ggcgttaac ttgctgtgc aaacaaaa accaccga ctagcagc ttgtttgc
 1201 ggtcaagag ctcaaacctc tttttccga gttgagctc ttagcagc ttagcagc
 1261 aactactgc ctctctgt agctgtgtg accagctg ctagcagc ttagcagc
 1321 gctcaatc ctgctgtgc taactctg accagctg ctagcagc ttagcagc
 1381 ttgtttacc ggttggat caagcagta ttgctgtg atgagcagc ttagcagc
 1441 aacgggggtg ttgctgtgc agccagctc gtagcagc agtagcagc ttagcagc
 1501 ctagcagc gactgtag aaagcagc gttccgga gtagcagc ttagcagc
 1561 tccgttagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc ttagcagc
 1621 ctgtatct ttatgctg tgggttgc ctagcagc gtagcagc ttagcagc
 1681 atgctgtc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc ttagcagc
 1741 cctgctct ttgctgtg gtagcagc gtagcagc gtagcagc ttagcagc
 1801 gtagcagc ataacctc ttgctgtg gtagcagc gtagcagc ttagcagc
 1861 gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc ttagcagc
 1921 gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc ttagcagc
 1981 gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc ttagcagc
 2041 ctagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc ttagcagc
 2101 ctagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc ttagcagc
 2161 ctagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc ttagcagc
 2221 gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc ttagcagc
 2281 gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc ttagcagc
 2341 ctagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc ttagcagc
 2401 gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc ttagcagc
 2461 caactgagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc ttagcagc
 2521 ctagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc ttagcagc
 2581 gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc ttagcagc
 2641 caactgagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc ttagcagc
 2701 ctagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc ttagcagc
 2761 ctagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc ttagcagc
 2821 gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc ttagcagc
 2881 gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc ttagcagc
 2941 gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc ttagcagc
 3001 ctagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc ttagcagc

3061 cgttccatg tctgcgcgca gggcgataa atcgcctgca cgtacagcgg tccagtatc
 3121 gaagttagc tggtaagagc ggcagagct ccttgaagct ctccctgatg ttgctcactc
 3181 accgttcgtg acagatgagc ggttcagcga gttccaaact ttggagttgt
 3241 atactaatgg ggaagcact ccagctctcc cttgcaagc ccaagagac gtagccagcc
 3301 ggcgtgcgca gcttcaact ccgctcaact tacaataact ccgtttgctg cactgcccgc
 3361 ttccagctg ggaacactg cgtgcagct gcaataatga atcggccaac ggcgggggag
 3421 agggcgttgg cgtatggcg gcaagggggg tttttctttt caccagctag agcggcaaca
 3481 gctgatgccc cttccacccc tggccctgag agagtctgag caagcgttcc acgctgtggt
 3541 gcccagagc gcaaaatcc ttgtttgag ttgttgcag ccgagatca caatgagctg gttccaaagc
 3601 cttogtctat cgtctatccc actacagcga tctccagccc aacggagagc cgtgctcgg
 3621 taatggcgcc cactgcccgc aggcactct gatctgctg aaccagctac cagttgggaa
 3721 cgtatgccc attcagcct ttgatggct ttgaaaacg ggaactggca ctccagctgc
 3781 cttccgcttc cgtatcggc tgaattgat tggagctgag atattatgag cagcagcga
 3841 gacgagagc cgcagagca gaacttaag ttccctgaaa caagcgctac ttgctgagca
 3901 ccaatgagcc cagatgctcc agcccactg cgtctacgct tccattggag aaaaataacc
 3961 ttgtgatgg ttctcgttca gagaactaca gaataaacg ccggaactta gtcagcagc
 4021 cttccacagc aatggctacc ttgtatccca tccagctgat aatgtaoag ccaatgcagc
 4081 gttgagagc aagattgtgc accgcctctc taccagctg cagcgcctct cgttctacca
 4141 tgcacacac cagctgtgca ccaagttgat atgcctaac ggaagagtg ttgcccactc
 4201 ggcagccgc gtagccgccc agatggggag ttgcaaacgc aatcagcaac gactcctg
 4261 ccgcaagtg ttgtcccagc cgtttgggaa tgaattatgc ctcagcactc cgccttcca
 4321 ctttttccc cgttttccga gaaactggc tgcctcgttt caccagccgg gaaacgctc
 4381 gataagagc accgctaac tctgcaact cgtataactg taactgttcc acattacca
 4441 ccttgattg actctcttcc ggcctgactc atgcctaac ggaagagtt ttgcccactc
 4501 cgtatgctc aactaactg actccttacc atgcctaac ggaagagtt ttgcccactc
 4561 gtagcttgc aactaactg actccttacc atgcctaac ggaagagtt ttgcccactc
 4621 ttgtatgct gtagcagctg taataactg ctaattctg ttgctcaag gctcagctcc
 4681 gttctgata atgtttttg cgcagcactc ataacgcttc ttgcaaatc ttgaaatga
 4741 gctgtgaca ataaactc gttctgata atgtttgaaa ttgtgagcg ataacactg
 4801 caacagagca acagattcc atatgaaa ctatttccca ttgtgagcg ataacactg
 4861 atgtctctg ggcagcggc ccagtgccca gttccagctc tccctcaact cgttggctg
 4921 accatctgc ttcacttccc cgcactatga ttgagactgt aatctggaa cgtcctctg
 4981 ttgtgctgc cgtataact tctatccag agggcaaaa ttgagccca atcttggac aaaaactca
 5041 cgtccctcc ttggaaact cccagagag ttgcaagag cagagcaga agacagca
 5101 ctaacgctc agagccccc agatggggag ttgcaaacg taagcaaac aaaaactca
 5161 cgtctgaaa gttccactc aggcctctg cttccgctg acaagagct tcaacgctg
 5221 agattgtaa taacagaaa caagaagct atataaata cctatgctc agccgcccg
 5281 cgttatgct atactcgg ccccagccc cactgcccgc tagcaaaa gcccactc
 5341 cttccctcc gttccactc tccagagca cctctggggg caagcggcc cttggctgc
 5401 ttgtccagca cactctcc gaaagcggc agctctgag gaactcagc gactgctg
 5461 gggcgtgca cactctccc gctctcacc actctcacc cactctcacc ctagcagcc
 5521 ttgtgactg cactctccc agttgggca cccagacta cactctcacc gtagatca
 5581 agcccaaaa caccagagc gacaagaa ttgagccca atcttggac aaaaactca
 5641 cgtccctcc ttgcaagca cctgaactc cctcagccc gtagcttctc tctctccc
 5701 caaacccca gaaagccct aggtcaact tcaactgta ttgcaagc gtagcttctc
 5761 aactgcaaaa gaaagccct aggtcaact tcaactgta ttgcaagc gtagcttctc
 5821 taatgcaaaa gaaagccct aggtcaact tcaactgta ttgcaagc gtagcttctc
 5881 tctcactg cttccagcag gactgctg atggcaaaa gtaaacagc aaggtotca
 5941 caaacccca gaaagccct aggtcaact tcaactgta ttgcaagc gtagcttctc
 6001 caaacccca gaaagccct aggtcaact tcaactgta ttgcaagc gtagcttctc
 6061 gtagcact gttcaaaa ctaactgta ttgcaagc gtagcttctc
 6121 gtagcact gttcaaaa ctaactgta ttgcaagc gtagcttctc
 6181 tctctcag aactcagc gttgcaaaa gtagcttctc gtagcttctc
 6241 gtagcact gttcaaaa ctaactgta ttgcaagc gtagcttctc
 6301 cgttcaaaa gtagcttctc gtagcttctc gtagcttctc gtagcttctc
 6361 aactcagc gtagcttctc gtagcttctc gtagcttctc gtagcttctc
 6421 gtagcact gttcaaaa ctaactgta ttgcaagc gtagcttctc
 6481 gtagcact gttcaaaa ctaactgta ttgcaagc gtagcttctc

6541 gaaagactg gctttctgt ttatctgtg tttctcgtg aactgtccc gtagtagagc
 6601 aactcggcc gtagcagc taactgagc taactgagc taactgagc taactgagc
 6661 agagccccc ccaataactg agagcagc taactgagc taactgagc taactgagc
 6721 ctttttctg ttttcaaaa ctttt

500 ID No 116

1 ttgtttatt ttctaatac atcaaatat gtagccttc atgagcaat aacctgata
 61 aatgcttca taatattga aaagagag tatgatatt caacttccc gtagccttc
 121 ttttccctt ttgggggat ttgctctcc ttgttttgc caccagaaa cgtgtgtaa
 181 agtaaaagt gctgaagta agttgggtgc acagctggg taactgaaa tggatcaaa
 241 ccggtgtag atctctgga gttttccgc cgaagaact ttccaatga tgaagattt
 301 taactgtg ctatgtggc ggtattatc atctctgag cctgtttgca cagaagaaga
 361 tgcgcgata caactctc ttactgact ttgctgtac cctgacctc cagaaagca
 421 ttttccgat ggaatgagc taagaact atgactgt gcaatacca gtaggata
 481 cactgctgc caactctc tgaacaact gtaggagc aggaagctc cgcctttt
 541 gcaacaact gggagctg taactcct ttagctgt gaaagcagc tgaagtagc
 601 caacacagc ggcagcctg caacagct gctctgaga atgcaaaa cgttgcgaa
 661 actataact ggtgctat taactgact ttgctgtac caatataag actgagcga
 721 ggggataa gttgagagc caactctgc ctagcctc cctgacctc cgtgtgta
 781 tgaataact gtagcagc agctgtgtg ctagcctc atgagcagc tggcgccga
 841 ttgtaagccc tccgtatg tagttatca ctagcagc agtagcagc ctatgtagc
 901 acgaataga cagctgctg agtaggagc atgactgag ctagcagc tgaagtagc
 961 caagttac taatatac tttagatga ttbaaact caattttaa taaagagat
 1021 ctatgtagc atctcttgc atactatc gaccttacc cttbaactg agttttagc
 1141 ggcgttaac ttgctgtgc aaacaaaa accaccga ctagcagc ttgtttgc
 1201 ggtcaagag ctcaaacctc tttttccga gttgagctc ttagcagc ttagcagc
 1261 aactactgc ctctctgt agctgtgtg accagctg ctagcagc ttagcagc
 1321 gctcaatc ctgctgtgc taactctg accagctg ctagcagc ttagcagc
 1441 aacgggggtg ttgctgtgc agccagctc gtagcagc agtagcagc ttagcagc
 1501 ctagcagc gactgtag aaagcagc gttccgga gtagcagc ttagcagc
 1561 tccgttagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc ttagcagc
 1621 ctgtatct ttatgctg tgggttgc ctagcagc gtagcagc ttagcagc
 1681 atgctgtc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc ttagcagc
 1741 cctgctct ttgctgtg gtagcagc gtagcagc gtagcagc ttagcagc
 1801 gtagcagc ataacctc ttgctgtg gtagcagc gtagcagc ttagcagc
 1861 gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc ttagcagc
 1921 gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc ttagcagc
 1981 gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc ttagcagc
 2041 ctagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc ttagcagc
 2101 ctagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc ttagcagc
 2161 caactgagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc ttagcagc
 2221 agctgtctg ctagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc ttagcagc
 2281 gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc ttagcagc
 2341 ctagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc ttagcagc
 2401 gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc ttagcagc
 2461 caactgagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc ttagcagc
 2521 ctagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc ttagcagc
 2581 gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc ttagcagc
 2641 caactgagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc ttagcagc
 2701 ctagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc ttagcagc
 2761 ctagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc ttagcagc
 2821 gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc ttagcagc
 2881 gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc ttagcagc
 2941 gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc ttagcagc
 3001 ctagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc gtagcagc ttagcagc

```

3121 gaagttagc tggtaagac cgcgagcat ccttgaagc gtcctgatg gtcgcatct
3181 acctgctcgg acagcgtlgg ctcgaacgg ggaatccca tgcgcgcga agcagaaga
3241 atcaataagp ggaagggcat ccagctccg gtcggaagp ccagcaagac gtgacccaag
3301 gctgaggcca gcttgcgat ccgctaac taaatfaat cggtlggcct caagcccg
3361 ttccagctcg gaaacccgt cgtgccact gcaataatg atcgcgcaac gcgcggggag
3421 aggcgggttg cgtattggc gccagggtag tttttcttt caccagtag acggcaaca
3481 gctggttgc cttcaccgg tggccctag agatctgag caagcgctc acgtggttt
3541 gccccggag ggaataacc tgttctgctg tggctggcg cgggatata catgagctgt
3601 ctccgttatc gtcgtatcc actaacaga tctccgccc aagcgagag ccgagatgg
3661 taatggcgc cactggccc agggccatc gatcgttgc aaccagatc cgaagtggaa
3721 cagtgccctc attccgact tgaatggtt gtagaaaac ggaatggca ctcocagtcg
3781 ctcccgctc cgtatcggc tgaattgat gtcggatgag atatttatg cagcagcca
3841 gagcagac cgcgagaca gaactaatg gtcocgtaa cagcgctat tgcgtgatg
3901 ccaatgcgc cagatgctc agcccaatg ggttaacgc ttaclggag aaatataac
3961 tgttgatgg tctctgtca gacatcaa gaataaac cggaaacta gtcgagcag
4021 ctccacagc aatgcatcc tggtaacca gggtagatt aatgatcgc ccaatgagc
4081 gttgcggag aagattgtg accgcgctt lacagcttc gaagcgcct cgttataca
4141 tgcacccc cagctggca cccagttgt cggcgaga ttaaatgoc gcgacaatt
4201 ggcagcggc gtcgagggc agcctggag tgcgagc aaccagcac gactgttgc
4261 ccgcagttg tttgtccc cgttgggaa tgaatagc ctccgccc cgcgctcca
4321 cttttccc cgttttcca gaaagtg tggcgtggt caccagcgg gaaacgtgt
4381 gataagac accgcaac tctggcaat cgtatacgt tactggttc acattcaaca
4441 cctggaatg actctctcc gggcgctac atgcatacc gogaagttc tbgocatt
4501 agctgctg acgtaatg catgocgt cgcctctgg cgcgaatgc aagatgatc
4561 ggcattatc gactcaagc tgcacaatg cttctgctc cagcagcca tggagagtg
4621 tggatggct gtcgagtcg taatcactc cataactgt gtcgctcaag ggcactcuc
4681 gttctgata atgtttttg cgcgcaatc ataacgttc tggcaatat tctgaatga
4741 gctgtgaca atlaacatc gctcgtata atgtggaa tbtgagcgg ataacattt
4801 caacaggaa acagatcc atgtgaata ctattacca acagcagag ctgggttatt
4861 atgtctcgt ggcagcggc ccatgcca cgtcctgca aactctgaa ctgctctgt
4921 accatctgc tctacttcc cgcactcca tgcagatgt aactctgaa ctgctctgt
4981 tbtgtcctc ctgaatact tctatccag agagccaaa gtacatgga agtgataa
5041 cgcctccca tgggtaat cccagagag tctaacagc cagcagaca agcagcagc
5101 ctacagctc agcagcac tgcgctgag caagcagac tacgaaaac acaagtcta
5161 cgcctggaa gtaaccatc agcagctg agctcggc cagcagcca tggagagtg
5221 agagtgtta taacaggaa acagagctc atgaataa tttttact tttttact
5281 caggttctt gtaactcgc gccacggc ccatggcgc tagcacaag gccccatgg
5341 tctctccctc ggaacctcc tcaaaagca cctctgggg cagcggccc ctggctgcc
5401 tggcaagga ctactctcc gaaacggta cgtgtctg gaactcagg gccctgaca
5461 ggcgctgaa caactctcc gctctctca agtctcgg actctactc ctccagcgc
5521 tggtagcgt gccctccag agcttggca cccagccta catctcaac gtagatcca
5581 agccagaaa caccaggtg gaaagaa tgcagccaa atctgtgc aaaaotcca
5641 catgcccacc gtcgcaaga cctgaactc tgggggacc ctaactctc ctcttccc
5701 caaaacaaa ggaacacctc atgatctcc ggaacctga gtbcaatg gttgggtgg
5761 actgagcga cgaagacctc ggtcactg tcaactgaa cgtggagcg gtagagttg
5821 ataatgcaa gacaagccc cggcgagc agtacaacg caactcagc gtagagttg
5881 tctcactgt cctgcaacc atcgagtaa atgcagaa acccaaggg cagcccgag
5941 acaagcctc cccagcccc atcgagaaa caatccca acccaaggg cagcccgag
6001 acaagcctc gtaaccctc cccatctcc gggatgact gaccaaac cagctcagc
6061 tgaactgct gtaaccctc gtaaccctc gtaaccctc gtaaccctc gtaaccctc
6121 ggcagcggc gaaacactc aagaccacc ctctcctgt gtaaccctc gtaaccctc
6181 tctctacag caactcacc gtagcaaga gcaagttgc gaaagggac gtaaccctc
6241 gctcgtgt gcaagctc ctgcaaac actacaaga gaagagctc tctctctc
6301 cgggtaata agcttggct ttttgcgga tgaagaaga ttttgcact gatcagatt
6361 aatcagac gaaagggc tctataaaa cgaatttc ctggcggag tgaagttgt
6421 gttccactc acccaagc gaactcaga gtaaccctc gtagcggag tgaagttgt
6481 ggtctccc atcgagct agggactc cagctcaa atanaaga agctcactc
6541 gaaagctg cctctctgt ttatctgt ttttgcgtg aactctcc tgaatgaa

```

```

6501 aaatccggc ggaagcgtt tgaactgc gaagcaagc ccggagagc cctggcggc
6561 aggcagccc ccaataatc ccagatcca aataagagc aagccatcc tgaagatgg
6721 ctttttggc ttttcaaaa cttct

```

【 図 1 2 A 】

Fab タイプ:
VHH1-CL/VHH2-CH1γ1
(プラスミド pCκCH1γ1-TAGまたは pCκCH1γ1へのVHHのクローニング)

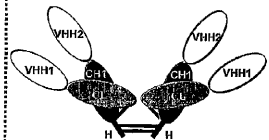


組合せ:

VHH1	A	A
VHH2	A	B

フォーマット:
AA = 単一特異性、二価
AB = 二重特異性または二価エピトープ性、一価

F(ab')₂ タイプ:
VHH1-CL/VHH2-CH1Hγ1
(プラスミド pCκCH1Hγ1-TAGまたは pCκCH1Hγ1へのVHHのクローニング)



組合せ:

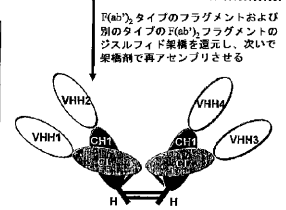
VHH1	Ax2	Ax2
VHH2	Ax2	Bx2

フォーマット:
A4 = 単一特異性、四価
A2B2 = 二重特異性または二価エピトープ性、二価

組合せ:

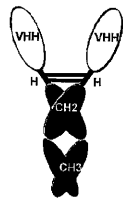
VHH1	A	A	A	A	A	A	A	B	A
VHH2	A	B	A	A	A	B	A	B	B
VHH3	A	A	B	A	B	A	C	A	C
VHH4	A	B	B	A	C	C	A	C	D

フォーマット: 単一特異性で四価(AAAA)から四重特異性または四価エピトープ性で一価(ABCD)までの可能な全てのフォーマット (上記の命名法および定義を参照のこと)



【 図 1 2 B 】

(HCH2CH3)₂ タイプ:
VHH-HCH2CH3
(プラスミド pHCH2CH3γ1-TAGまたは pHCH2CH3γ1へのVHHのクローニング)

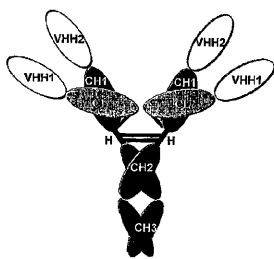


組合せ:

VHH	A	A
-----	---	---

フォーマット:
A2 = 単一特異性、二価

mAb*タイプ:
VHH1-CL/VHH2-CH1HCH2CH3γ1
(プラスミド pCκCH1HCH2CH3γ1へのVHHのクローニング)

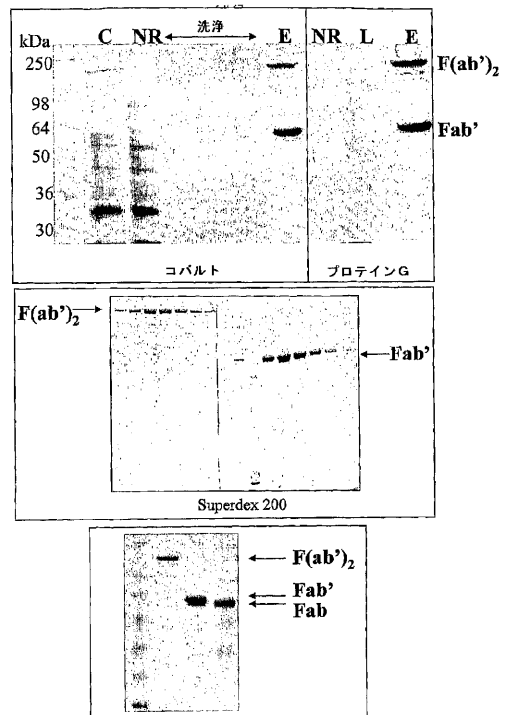


組合せ:

VHH1	Ax2	Ax2
VHH2	Ax2	Bx2

フォーマット:
A4 = 単一特異性、四価
A2B2 = 二重特異性または二価エピトープ性、二価

【 図 1 3 】



【配列表】

2008523795000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成18年5月22日(2006.5.22)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

V H Hまたはヒト化V H HまたはヒトV Hドメインの全体または一部がヒト抗体の定常領域に直接融合されていることを特徴とする抗体フォーマット。

【請求項2】

前記抗体フォーマットはF a bタイプであり、2つの同一もしくは異なるV H Hドメインまたは2つのヒトV Hドメイン、あるいはV H HのC D Rが移植された2つのヒトV Hドメインが結合したものであり、該ドメインのうち一方がヒト免疫グロブリンの定常領域C またはC に融合し、他方がヒト免疫グロブリンの定常領域C H 1に融合していることを特徴とする、請求項1に記載の抗体フォーマット。

【請求項3】

前記抗体フォーマットはF a b'タイプであり、2つの同一もしくは異なるV H Hドメインまたは2つのヒトV Hドメイン、あるいはV H HのC D Rが移植された2つのヒトV Hドメインが結合したものであり、該ドメインのうち一方がヒト免疫グロブリンの定常領域C またはC に融合し、他方がヒト免疫グロブリンの定常領域C H 1および後続するヒンジ領域Hに融合していることを特徴とする、請求項1に記載の抗体フォーマット。

【請求項4】

前記抗体フォーマットはF (a b')₂タイプであり、請求項3に記載のF a b'タイプの2つの抗体フォーマットが結合したものである、請求項1に記載の抗体フォーマット。

【請求項5】

前記抗体フォーマットはF (a b')₂タイプであり、前記F (a b')₂タイプのフォーマットを還元して得られた2つの同一もしくは異なるF a b'が結合したものである、請求項4に記載の抗体フォーマット。

【請求項6】

前記抗体フォーマットは(H C H 2 C H 3)₂タイプであり、Hはヒト免疫グロブリンのヒンジ領域を表し、C H 2およびC H 3はヒトI gの二番目および三番目のドメインを表し、前記抗体フォーマットは、2つの同一のV H HまたはヒトV H、あるいはV H Hの超可変領域が移植された2つのヒトV Hが結合したものであって、各々がヒトのI g Gまたは他の任意のI gのH - C H 2 - C H 3領域に融合されていることを特徴とする、請求項1に記載の抗体フォーマット。

【請求項7】

前記抗体フォーマットはm A bタイプであり、2つの同一もしくは異なるV H Hまたは2つのヒトV H、あるいはV H Hの超可変領域が移植された2つのヒトV Hが結合したものであって、一方がヒトのC またはC 領域に融合し、他方がヒトI gのC H 1 - H - C H 2 - C H 3領域に融合していることを特徴とする、請求項1に記載の抗体フォーマット。

【請求項8】

免疫グロブリンは、ヒトのアイソフォームI g G 1、I g G 2、I g G 3またはI g G 4に相当するI g G、あるいはアイソフォームI g A 1、I g A 2に相当するヒトのI g

Aである、請求項1～7のいずれか1項に記載の抗体フォーマット。

【請求項9】

VHHは、ヒトVH、またはVHHからヒトVH上へのCDRの移植によるヒト化VHHで置き換えられている、請求項1～8のいずれか1項に記載の抗体フォーマット。

【請求項10】

前記抗体フォーマットは抗CD16または抗CEA抗体フラグメントを含んでなり、前記フラグメントはそれぞれ、SEQ ID No. 73、SEQ ID No. 74、SEQ ID No. 75、SEQ ID No. 76、SEQ ID No. 103およびSEQ ID No. 104の配列またはSEQ ID No. 77、SEQ ID No. 78、SEQ ID No. 79、SEQ ID No. 80およびSEQ ID No. 105の配列からなる群から選択されたアミノ酸配列に従うことを特徴とする、請求項1～9のいずれか1項に記載の抗体フォーマット。

【請求項11】

ラクダ科、特にラマ由来のVHH抗体のフラグメントであって、前記フラグメントは抗CD16または抗CEA抗体フラグメントで構成されており、前記フラグメントはそれぞれ、SEQ ID No. 73、SEQ ID No. 74、SEQ ID No. 75、SEQ ID No. 76、SEQ ID No. 103およびSEQ ID No. 104の配列またはSEQ ID No. 77、SEQ ID No. 78、SEQ ID No. 79、SEQ ID No. 80およびSEQ ID No. 105の配列からなる群から選択されたアミノ酸配列に従うか、あるいは、SEQ ID No. 81、SEQ ID No. 82、SEQ ID No. 83、SEQ ID No. 84、SEQ ID No. 106およびSEQ ID No. 107の配列またはSEQ ID No. 85、SEQ ID No. 86、SEQ ID No. 87、SEQ ID No. 88およびSEQ ID No. 108の配列からなる群から選択されたヌクレオチド配列に従うことを特徴とする抗体フラグメント。

【請求項12】

VHHのCDRで構成されることを特徴とする、請求項11に記載の抗体フラグメント。

【請求項13】

キメラ化またはヒト化された、多重特異性または多価のうち少なくともいずれか一方である抗体を生産する方法であって、請求項1～10のいずれか1項に記載の抗体フォーマットまたは請求項11もしくは12に記載のフラグメントのドメインを使用することを含む、方法。

【請求項14】

前記抗体フォーマットは、ラクダ科、特にラマ由来の抗CEAおよび抗CD16 VHHを含んでなる、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

前記抗CEAおよび抗CD16 VHHの可変ドメインが、

- ラクダ科動物、特にラマを、免疫原としてCEAまたはCD16を用いて免疫することと、
- 血液から得られたBリンパ球を精製することと、
- VHHバンクを構築することと、
- 該バンクからVHHを単離することと

を含むプロトコールによって有利に生産されることを特徴とする、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

前記バンクの構築は、

- Bリンパ球からの全RNAの抽出と、
- 対応するcDNAを得るためのRNAの逆転写と、
- 一本鎖重鎖の抗CD16および抗CEA抗体の可変領域をコードする遺伝子のPCR

による増幅と、

- フェージミドで増幅させたDNAの酵素切断によって得られたVHH DNAフラグメントのライゲーションとを含む、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

VHHはフェージディスプレイ技術によってバンクから単離され、精製される、請求項15または16に記載の方法。

【請求項18】

選択されたVHHの遺伝子を、発現ベクター、特にプラスミドに導入し、請求項1～10のいずれか1項に記載の抗体フォーマットを生産する、請求項15～17のいずれか1項に記載の方法。

【請求項19】

請求項1～10のいずれか1項に記載の抗体フォーマットの発現ベクター、特にプラスミドであって、2つのユニークな制限酵素切断部位の間に、プロモータと、シグナル配列と、前記抗体フォーマットをコードするヌクレオチド配列とを含んでなることを特徴とする発現ベクター。

【請求項20】

SEQ ID No. 98およびSEQ ID No. 112の配列のプラスミドpCCH1 1-TAGならびにSEQ ID No. 100およびSEQ ID No. 114の配列のプラスミドpCCH1 1であって、請求項2に記載のFabタイプの抗体の生産を可能にするプラスミド。

【請求項21】

SEQ ID No. 99およびSEQ ID No. 113の配列のプラスミドpCCH1H 1-TAGならびにSEQ ID No. 101およびSEQ ID No. 115の配列のプラスミドpCCH1H 1であって、請求項3および4に記載のFab'またはF(ab')₂タイプの抗体の生産を可能にするプラスミド。

【請求項22】

SEQ ID No. 95の配列のプラスミドpHCH2CH3 1-TAGならびにSEQ ID No. 96の配列のプラスミドpHCH2CH3 1であって、請求項6に記載の(HCH2CH3)₂タイプの抗体の生産を可能にするプラスミド。

【請求項23】

SEQ ID No. 102およびSEQ ID No. 116の配列のプラスミドpMab 1*であって、請求項7に記載のmAb*タイプの抗体の生産を可能にするプラスミド。

【請求項24】

請求項1～9のいずれか1項に記載の抗体フォーマットのうち少なくとも1つを含んでなる医薬組成物。

【請求項25】

インビトロの免疫診断法であって、請求項1～9のいずれか1項に記載の抗体フォーマットを使用することを含む方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2005/003151

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/00 C07K16/28 C07K16/30		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, PAJ, WPI Data, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2002/155604 A1 (LEDBETTER JEFFREY A ET AL) 24 October 2002 (2002-10-24)	1
Y	paragraph [0071]; claims 29,35,39	2-24
Y	MÜLLER KM ER AL: "The first constant domain (CH1 and C1) of an antibody used as heterodimerization domain for bispecific miniantibodies". FEBS LETTER, vol. 422, 1998, pages 259-264, XP002343701 Introduction part.figure 1A	2-24
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 March 2006	Date of mailing of the international search report 22/03/2006	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Vadot, P	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/FR2005/003151

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2002155604 A1	24-10-2002	US 2004253250 A1	16-12-2004

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR2005/003151

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C07K16/00 C07K16/28 C07K16/30		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C07K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, PAJ, WPI Data, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 2002/155604 A1 (LEDBETTER JEFFREY A ET AL) 24 octobre 2002 (2002-10-24)	1
Y	alinéa [0071]; revendications 29,35,39	2-24
Y	MÜLLER KM ER AL: "The first constant domain (CH1 and C1) of an antibody used as heterodimerization domain for bispecific miniantibodies" FEBS LETTER, vol. 422, 1998, pages 259-264, XP002343701 Introduction part.figure 1A	2-24
<input type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités:		
A document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
10 mars 2006		22/03/2006
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Vadot, P

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°
PCT/FR2005/003151

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 2002155604 A1	24-10-2002	US 2004253250 A1	16-12-2004

フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)
A 6 1 P 37/00 (2006.01) A 6 1 P 37/00
G 0 1 N 33/531 (2006.01) G 0 1 N 33/531 A

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(71) 出願人 591060614
 アンスチチュ ナショナル ド ラ サント エ ド ラ ルシエルシュ メディカル (アンセルム)
 フランス国 7 5 6 5 4 パリ セデックス 1 3 リュ ドゥ トルビアック 1 0 1

(74) 代理人 100068755
 弁理士 恩田 博宣

(74) 代理人 100105957
 弁理士 恩田 誠

(72) 発明者 バティ、ダニエル
 フランス国 F - 1 3 0 0 9 マルセイユ リュ アントワーズ フォルテユネ マリオン 4 1

(72) 発明者 ベアール、ジスレーヌ
 フランス国 F - 1 3 0 1 5 マルセイユ ブールバール ロンバール 3 1

(72) 発明者 シャルティエ、マルティヌ
 フランス国 F - 1 3 0 1 1 マルセイユ アブニュ ドゥ ラ グロニヤルド 3 5 0 ドメーヌ サン ジャン バティモン デー 1

(72) 発明者 ペルグラン、アンドレ
 フランス国 F - 3 4 0 7 0 モンペリエ サン クレマン スクワール ミュリロ 1 0 レジダンス フォンテーヌ

(72) 発明者 テイロー、ジャン - リュック
 フランス国 F - 7 5 0 0 4 パリ リュ デ ザルシーブ 4 1

(72) 発明者 テュロン、イザベル
 フランス国 F - 3 4 9 8 0 サン ジェリー デュ フェスク リュ デ ゾリピエ 2 7 2

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA53 CA04 CA07 DA02 DA05 DA11 EA02 EA04
 FA02 GA01 GA11 HA01 HA11
 4B064 AG27 CA19 CC24 DA01 DA13
 4C085 AA13 AA34 BB01 BB33 BB34 BB35 BB36 BB37 CC04 DD62
 EE01
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 DA76 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	产生抗体形式和所述抗体形式的免疫应用		
公开(公告)号	JP2008523795A	公开(公告)日	2008-07-10
申请号	JP2007546119	申请日	2005-12-15
[标]申请(专利权)人(译)	法国国家科学研究中心 安钢居全国多拉城主Edora Rusheru格哈德医疗安瑟伦		
申请(专利权)人(译)	中心法国国家扫描速率洋科技 (说NTT LSI) Ansutchichu国家德拉桑特等德拉RECHERCHE医疗 (安瑟伦)		
[标]发明人	バティダニエル ベアールジスレーヌ シャルティエマルティーヌ ペルグランアンドレ テイロージャンリュック テュロンイザベル		
发明人	バティ、ダニエル ベアール、ジスレーヌ シャルティエ、マルティーヌ ペルグラン、アンドレ テイロー、ジャン-リュック テュロン、イザベル		
IPC分类号	C12N15/09 C12P21/08 C07K16/46 A61K39/395 A61P35/00 A61P37/00 G01N33/531		
FI分类号	C12N15/00.A C12P21/08.ZNA C07K16/46 A61K39/395.Y A61P35/00 A61P37/00 G01N33/531.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA11 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4C085/AA13 4C085/AA34 4C085/BB01 4C085/BB33 4C085/BB34 4C085/BB35 4C085/BB36 4C085/BB37 4C085/CC04 4C085/DD62 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	昂达诚		
优先权	2004013433 2004-12-16 FR		
其他公开文献	JP5026279B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及用于将靶向基因组修饰引入卵母细胞或卵中的体外方法和用于在宿主细胞的基因组中进行随机插入的方法。

VHH	$ka \times 10^3$ (1/Ms)	$kd \times 10^3$ (1/s)	$KA \times 10^7$ (1/M)	$KD \times 10^{10}$ (M)
抗-CBA 3	1,24±0,014	1,68±0,002	7,38	13,6
抗-CBA 17	1,56±0,014	1,3±0,002	12	8,3
抗-CBA 25	1,13±0,014	3,6±0,004	3,15	31,7
抗-CBA 43	1,78±0,019	1,83±0,002	9,72	10,3
抗-CD16 c13	0,53±0,07	5,67±0,02	0,94	100,6
抗-CD16 c21	2,86±0,02	2,79±0,006	10,3	9,7
抗-CD16 c28	0,42±0,03	3,45±0,006	1,22	81,9
抗-CD16 c72	0,39±0,02	3,7±0,006	1,06	94,6