



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 120**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

C40B 40/08 (2006.01)

C40B 50/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06842807 .7**

96 Fecha de presentación : **27.12.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1966375**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.09.2008**

54

Título: **Vector para la selección eficaz y/o maduración de un anticuerpo y usos del mismo.**

30

Prioridad: **27.12.2005 EP 05028501**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.06.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.06.2011

73

Titular/es:
Sigma-Tau Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.A.
Viale Shakespeare 47
00144 Roma, IT
TECNOGEN S.p.A.

72

Inventor/es: **Minenkova, Olga y**
Pavoni, Emiliano

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 362 120 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Vector para selección y/o maduración eficiente de un anticuerpo y sus usos

La presente invención se refiere a un procedimiento de mejora de la capacidad de selección del anticuerpo en biblioteca de despliegue de fago, en el que dicha mejora se obtiene a través de la reducción de los niveles de expresión de los anticuerpos producidos en dicha biblioteca.

Campo de la invención

La tecnología de ADN recombinante proporciona una alternativa económica y útil para la producción de anticuerpos monoclonales. El despliegue de anticuerpos recombinantes en la cápside del bacteriófago, conocido como despliegue en fago, no solo permite la generación de una biblioteca de anticuerpos humanos para la selección de ligadores específicos, que proporciona anticuerpos útiles para la terapia que no induce una respuesta inmune perjudicial en los pacientes, sino que también facilita la maduración de afinidad de los anticuerpos a través de la construcción de una biblioteca de anticuerpos mutantes, que proporciona clones con mayor afinidad.

La posibilidad de hallar ligadores de alta afinidad en una biblioteca de anticuerpos recombinantes caracteriza su calidad, que depende de varios factores como tamaño, diversidad y fuente de los genes de inmunoglobulina de la biblioteca.

Se sabe que varios tejidos linfoides de donantes inmunizados o no inmunizados, tales como linfocitos de sangre periférica, bazo y médula ósea e incluso tejido de ganglios linfáticos metastático o drenado de individuos afectados por tumores pueden actuar como fuente del repertorio de anticuerpos específicos.

Si bien las bibliotecas de anticuerpos sin tratamiento son más diversas y llevan al aislamiento de especificidades de anticuerpo amplias, es razonable sugerir que la construcción de una biblioteca de anticuerpos recombinantes a partir del repertorio de Ig de un paciente afectado por una enfermedad específica puede proporcionar fragmentos de anticuerpos de mayor afinidad contra antígenos particulares.

Varios estudios publicados describen la construcción de bibliotecas de anticuerpos recombinantes provenientes de ganglios linfáticos asociados con tumor (Clin. Exp. Immunol. 1997 109(1):166-74; Int. J. Mol. Med. 2004 14(4):729-35; World J. Gastroenterol. 2004 10 (18):2619-23). Estos estudios se basan en la idea general de que el tejido del ganglio linfático de los pacientes con cáncer está infiltrado con células B activadas, que pueden servir como fuente de anticuerpos específicos de tumor.

Es relativamente difícil obtener ganglios linfáticos metastáticos o drenados de los pacientes con cáncer de mama como material quirúrgico fresco. De acuerdo con la práctica médica reciente el cirujano extirpa solo un ganglio linfático centinela o un pequeño agrupamiento de ganglios (ganglio centinela y los más próximos a este), de este modo se realiza una cirugía menos invasiva y se reducen los efectos secundarios, en vez de extirpar docenas de ganglios linfáticos de acuerdo con la técnica quirúrgica previa. Después de la disección del ganglio linfático centinela, prácticamente se estudia el ganglio entero para determinar la presencia de micrometástasis o células cancerosas únicas. En consecuencia, en la cirugía de cáncer de mama el ganglio metastático está prácticamente no disponible como material quirúrgico descartado.

La evidencia de que los anticuerpos derivados de linfocitos B infiltrantes del tumor (TIL-B) también pueden reconocer células tumorales se obtuvo por la producción de hibridomas humanos, obtenidos de TIL, capaces de secretar anticuerpos específicos de tumor (Lancet. 1982 1(8262):11-4; Br. J. Cancer, 1983 47(1): 135-45); por la expansión de las células B de TIL de las biopsias de tumor humano (Cancer Immunol. Immunother. 1994 38(4):225-32); por la expansión de las células B de TIL derivado de melanoma y posterior clonación del anticuerpo scFv de un clon de células B único con reactividad específica para melanoma (Cancer Res. 1995 55:3584-91); y por trasplante subcutáneo de tejido de cáncer pulmonar humano en ratones inmunodeficientes productores de anticuerpos humanos derivados de TIL-B, que reconocieron dos proteínas específicas de tumor (Cancer Invest. 2000;18(6):530-6; Cancer Res. 2002 62(6):1751-6), de este modo se sugiere una función específica de TIL-B en el tumor.

Recientemente, el carcinoma cervical y un tipo raro de cáncer de mama, clasificado como carcinoma medular (MCB) han demostrado que se caracterizan por infiltrados linfoplasmácitos que se correlacionan con mejor pronóstico y supervivencia del paciente. Estas enfermedades se investigaron para entender la naturaleza de los linfocitos B infiltrados en tumores (TIL-B) por el uso también de procedimientos de despliegue en fago. El estudio de la estructura molecular de las regiones variables del anticuerpo proporcionó evidencia de las respuestas inmuno humorales dirigidas por antígeno en los carcinomas de mama medulares, así como en los tumores cervicales. La predominancia oligoclonal hallada en los genes del anticuerpo derivado de los TIL indicó la posible selección clonal de las moléculas de Ig contra neoantígenos específicos sobreexpresados o expresados específicamente, en tejido tumoral (Cancer Immunol. Immunother. 2001 50(10): 523-32; Cancer Res. 2001 61(21):7889-99; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2001 98(22):12659-64; J. Immunol. 2002 169 (5):2701-11).

A pesar de las muy importantes indicaciones mencionadas anteriormente de que el tejido tumoral está infiltrado con células B activadas, que pueden servir como fuente de anticuerpos específicos de tumor, varios grupos de

investigación, en los experimentos de inmunopurificación realizados con bibliotecas de despliegue en fago derivadas de TIL contra antígenos tumorales conocidos purificados, o células tumorales vivas o secciones de tejido congelado, no pudieron seleccionar ni un anticuerpo específico que discrimine entre células tumorales y normales ni uno reactivo con antígenos tumorales de la superficie celular (Cancer Res. 2001 61(21):7889-99; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2001 98(22):12659-64; Int. J. Cancer 2001 93:832-40). Solo más tarde, dos grupos diferentes pudieron identificar anticuerpos específicos que reconocen células tumorales de esta clase de bibliotecas de despliegue en fago (J. Immunol. 2002 169:1829-36; J Immunol. 2005 175(4):2278-85).

Un abordaje alternativo, basado en una biblioteca derivada de tumor con expresión en fago y protocolos de detección en placa directa, que evitan las limitaciones del sistema de despliegue en fago, permitieron a Wu y colegas (Cancer Immunol Immunother. 2002 51 (2): 79-90) aislar múltiples anticuerpos que se unen específicamente a células tumorales cultivadas. Este estudio indica que las dificultades observadas en la selección de anticuerpos anti-tumor de las bibliotecas de despliegue en fago derivadas de TIL provienen de la imperfección de los vectores de despliegue conocidos en la técnica. Sin embargo, la detección directa tampoco es un procedimiento excelente para la selección de anticuerpos recombinantes de una biblioteca grande. En efecto es un procedimiento laborioso que demanda gran cantidad de tiempo y medios, en comparación con la tecnología de despliegue en fago. Barbas et al. (Phage Display: a laboratory manual, ISSN:0-87969-546-3, (2001) páginas I-XVI, 1,1) describen vectores para despliegue en fago (pComb3H y pComb3X) en los que los fragmentos scFv se unen al extremo C de 180 aminoácidos de la proteína de cubierta gpIII (aa230-460) del fago filamentoso. También se describen fagémidos que comprenden promotores de eficiencia baja o reprimibles (plac) en el vector de fagémido y los procedimientos para usar dichos vectores en la selección y maduración del scFv. La solicitud de patente Europea EP 1 452 599 describe vectores para despliegue en fago, fagémidos y bibliotecas de despliegue en fago que despliegan varios péptidos epitópicos o dominios proteicos con potencial para unirse a un material blanco de interés. El documento WO 92/01047 describe un procedimiento de producir un miembro multimérico de un par de unión específica (sbp), que comprende expresar en un organismo huésped recombinante una primera cadena polipeptídica del miembro sbp o una población genéticamente diversa de este tipo de miembro sbp fusionado a un componente de un paquete de despliegue genético replicable secretado (rgdp) que de este modo despliega el polipéptido en la superficie del paquete y que expresa en un organismo huésped recombinante una segunda cadena polipeptídica del multímero y que causa o permite que las cadenas polipeptídicas se unan entre sí para formar el multímero como parte de la rgdp, al menos una de las cadenas polipeptídicas que se expresa en el ácido nucleico es capaz de empaquetarse por medio del uso del componente a través del cual el material genético de cada rgdp codifica una cadena polipeptídica. También describe vectores de fagémido en la que las secuencias de nucleótidos del scFv se fusionan a la proteína de cubierta de gpIII de un fago filamentoso y la preparación de dicho scFv. El documento WO 93/11236 describe un procedimiento para proporcionar una biblioteca de paquetes de despliegue genético replicable (rgdps), cada una que exhibe en su superficie, el miembro del par de unión específica (sbp), y cada una que contiene ácido nucleico con una secuencia derivada de la especie mamífera, que codifica la cadena polipeptídica que es componente del miembro sbp desplegado en la superficie; y (b) selección por unión con el autoantígeno (Ag), uno o más miembros sbp con especificidad para el auto-antígeno.

El solicitante realizó un análisis de las bibliotecas de despliegue en fago de anticuerpos recombinantes derivadas de TIL-B por la utilización de un nuevo vector de fagémido pKM19 y demostró la eficiente selección de anticuerpos específicos de tumor contra los antígenos tumorales deseables así como contra las células de carcinoma de mama vivas.

Compendio de la invención

Los autores han hallado que es posible mejorar la eficiencia de la selección y/o maduración de los anticuerpos recombinantes de la biblioteca por el uso del sistema de despliegue en fago, tras las modificaciones de los vectores de la técnica previa. Los vectores de la técnica previa son, es decir, vectores de fagémidos como en "Antibody Engineering - A practical approach (McCafferty, J. Hoogenboom, H. & Chiswell D., eds), pp,325, Oxford University Press, 1996)".

En consecuencia es un objeto de la presente invención un vector adecuado para la eficiente selección y/o maduración de un anticuerpo recombinante perteneciente al grupo de: ScFv, fragmentos activos de Ab, secuencias humanizadas de Ab, dicho vector se caracteriza porque i) contiene al menos un elemento capaz de reducir el nivel de expresión del anticuerpo recombinante perteneciente al grupo de: a) un codón de detención suprimido dentro del péptido líder o la secuencia codificadora del anticuerpo; b) un promotor de eficiencia baja que dirige la transcripción de dicha secuencia codificadora del anticuerpo; y ii) tiene una eficacia mejorada del despliegue de dicho anticuerpo recombinante por medio de: a) fusionar la secuencia codificadora del anticuerpo recombinante con una secuencia codificadora para la parte carboxi-terminal de la proteína pIII; y b) usar como péptido líder del anticuerpo recombinante el péptido líder de la fosfatasa alcalina de *E. coli*, y c) eliminar cualquier codón ámbar entre la secuencia codificadora del anticuerpo recombinante y la secuencia codificadora de pIII, en la que el nivel de expresión del anticuerpo recombinante se puede reducir con un inhibidor del promotor que dirige la transcripción de dicha secuencia codificadora del anticuerpo.

El vector de la invención puede ser un plásmido, un fagémido, un fago o cualquier otro vector conocido por los expertos en la técnica.

Barbas et al. (Phage Display: a laboratory manual, ISSN: 0-87969-546-3, (2001) páginas I-XVI, 1,1) describen vectores para despliegue en fago (pComb3H y pComb3X) en los que los fragmentos scFv se unen al extremo C-terminal de 180 aminoácidos de la proteína de cubierta gpIII (aa230-460) del fago filamentoso. También describen fagémidos que comprenden promotores de eficiencia baja o reprimibles (plac) en el vector de fagémido y procedimientos para usar dichos vectores en la selección y maduración del scFv.

La Solicitud de la patente europea EP 1 452 599 describe vectores para despliegue en fago, fagémidos y bibliotecas de despliegue en fago que despliega varios péptidos epitópicos o dominios de proteína con potencial para unirse a un material blanco de interés.

El documento WO 92/01047 describe un procedimiento de producir un miembro multimérico de un par de unión específica (sbp), que comprende expresar en un organismo huésped recombinante una primera cadena polipeptídica del miembro sbp o una población genéticamente diversa de este tipo de miembro sbp fusionado a un componente de un paquete de despliegue genético replicable secretado (rgdp) que de este modo despliega el polipéptido en la superficie del paquete y que expresa en un organismo huésped recombinante una segunda cadena polipeptídica del multímero y que causa o permite que las cadenas polipeptídicas se unan entre sí para formar el multímero como parte de la rgdp, al menos una de las cadenas polipeptídicas que se expresa en el ácido nucleico es capaz de empaquetarse por medio del uso del componente a través del cual el material genético de cada rgdp codifica una cadena polipeptídica. También describe vectores de fagémido en los que las secuencias de nucleótidos del scFv se fusionan a la proteína de cubierta de gpIII de un fago filamentoso y la preparación de dicho scFv. El documento WO 93/11236 describe un procedimiento para proporcionar una biblioteca de paquetes de despliegue genético replicable (rgdps), cada una que exhibe en su superficie, el miembro del par de unión específica (sbp), y cada una que contiene ácido nucleico con una secuencia derivada de la especie mamífera, que codifica la cadena polipeptídica que es componente del miembro sbp desplegado en la superficie; y (b) selección por unión con el autoantígeno (Ag), uno o más miembros sbp con especificidad para el auto-antígeno

En consecuencia es un objeto de la presente invención un vector adecuado para la eficiente selección y/o maduración de un anticuerpo recombinante perteneciente al grupo de: ScFv, fragmentos activos de Ab, secuencias humanizadas de Ab, dicho vector caracterizado por que

i) contiene al menos un elemento capaz de reducir el nivel de expresión del anticuerpo recombinante perteneciente al grupo de: a) un codón de detención suprimido dentro del péptido líder o la secuencia codificadora del anticuerpo; b) un promotor de eficiencia baja que dirige la transcripción de dicha secuencia codificadora del anticuerpo; y

ii) tiene una eficiencia mejorada de despliegue en dicho anticuerpo recombinante por medio de: a) fusión de la secuencia codificadora del anticuerpo recombinante a una secuencia codificadora para la parte carboxi-terminal de la proteína pIII; y b) usar como péptido líder del anticuerpo recombinante el péptido líder de la fosfatasa alcalina de *E. coli*, y c) eliminar cualquier codón ámbar entre la secuencia codificadora del anticuerpo recombinante y la secuencia codificadora de pIII,

en la que el nivel de expresión del anticuerpo recombinante se puede reducir con un inhibidor del promotor que dirige la transcripción de dicha secuencia codificadora del anticuerpo.

Los promotores de eficiencia baja son conocidos en la técnica y se ejemplifican en Biochem J. 1970 117: 741-746). Los inhibidores adecuados para los promotores son conocidos en la técnica y se ejemplifican en J. Bacteriol. 1979,138(1):40-7.

Un objeto adicional de la presente invención es un vector de fagémido que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1.

Este vector, llamado pKM19, se diseña para el despliegue de anticuerpos recombinantes en formato de cadena única sobre la superficie de un fago filamentoso.

Un objeto adicional de la invención es una biblioteca de anticuerpo de despliegue en fago obtenida por la clonación del ADNc en el vector de la invención. Preferiblemente la biblioteca se obtiene por la clonación en el vector de la invención del ADNc de las células productoras de anticuerpo, más preferiblemente linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) o linfocitos de sangre periférica (PBL). En un aspecto preferido, tales células productoras de anticuerpo se aíslan de un sujeto afectado por tumor, preferiblemente de un sujeto afectado de cáncer de mama. Alternativamente la biblioteca consiste en una biblioteca de anticuerpos sintética o semisintética, también mutada para la maduración de afinidad de los anticuerpos.

Otro objeto de la presente invención es una célula huésped transformada con el vector de la invención. Un objeto adicional de la presente invención es un procedimiento para mejorar la selección y/o maduración de un anticuerpo recombinante que comprende la etapa de clonación y expresión del ADNc, o secuencias de anticuerpo sintéticas o semisintéticas, incluso mutadas para maduración de afinidad de los anticuerpos en el vector que se describió anteriormente.

La invención se describirá a continuación por medio de ejemplos no limitantes con referencia a las siguientes figuras:

Descripción detallada de los dibujos

Figura 1. Se describen esquemáticamente los elementos esenciales del plásmido pKM16 plásmido útiles para la producción de anticuerpos solubles en formato scFv y los elementos esenciales de los plásmidos pKM17, pKM18 y pKM19 útiles para la producción de anticuerpos desplegados en el fago. Estos plásmidos dirigen la expresión del anticuerpo bajo el control del promotor pLac. Los sitios de clonación únicos NcoI y NotI permiten la inserción de un gen del anticuerpo para expresar los anticuerpos de cadena simple con un péptido líder de la enzima periplásmica bacteriana, fosfatasa alcalina (líder PhoA). El plásmido pKM17 codifica la proteína pIII entera (406 aa) y los plásmidos pKM18 y pKM19 codifican la parte carboxi-terminal de pIII (197 aa). El plásmido pKM19 contiene el codón ámbar en el líder PhoA.

Figura 2. Se describe la estructura detallada del vector pKM19 de fagémido. La modificación específica realizada se informa en la figura y se describe en el texto.

Figura 3. Producción de scFv soluble por el uso del plásmido pKM16 plásmido. Tres clones independientes obtenidos por la clonación del gen del antígeno anti-carcino-embrionario (CEA) scFv en pKM16 se analizaron para determinar producción de scFv soluble (líneas del gel 1-3). Las fracciones de la proteína periplásmica se purificaron de las bacterias por el procedimiento de congelamiento y descongelamiento. Se incluye el marcador de tamaño de proteína. Se desarrolló la membrana de transferencia Western con un anticuerpo secundario conjugado con AP anti-FLAG. Las bandas correspondientes a los anticuerpos scFv solubles (peso molecular esperado 26 kDa) migran entre las bandas de 24,5 y 35,9 kDa.

Figura 4. Eficiencia de despliegue de los plásmidos pKM17, pKM18 y pKM19 en comparación con un sistema de fagémido clásico. Los anticuerpos scFv anti-CEA desplegados por tres plásmidos diferentes, se ensayaron por ELISA contra la proteína de CEA y se compararon con el fago MA39 (anti-CEA/pDN322). El fago auxiliar, M13K07, que no despliega fragmentos del anticuerpo, se incluyó como control negativo. Los datos registrados son los valores promedio de los ensayos realizados por duplicado. La concentración de fago más alta, marcada con asterisco, corresponde a 10^{10} TU para todos los fagos y 3×10^{10} TU, para anti-CEA/pKM17. El ELISA se realizó por medio del anti-M13 (panel A), o alternativamente, el anticuerpo secundario anti-FLAG (panel B).

Figura 5. Filtración de muestras de fago. Aproximadamente 2×10^{11} TU/pocillo de cada preparación o la correspondiente cantidad de muestras de filtrado se analizaron en ELISA y se desarrollaron con anti-M13 (panel A) o anticuerpos secundarios anti-FLAG (panel B). Los datos registrados son los valores promedio de ensayos realizados por duplicado. Los datos muestran la reactividad de los filtrados contra CEA como porcentaje de la reactividad original de muestras no filtradas (100%).

Figura 6. Competición con scFv de anti-CEA soluble. Los sobrenadantes recién preparados de los fagos MA39 (10 μ L) y anti-CEA/pKM19 (5 μ L) en competición con varias cantidades del anticuerpo anti-CEA soluble purificado. Los datos se expresan como porcentaje de reactividad de los sobrenadantes sin competidores. El scFv anti-SP2 soluble irrelevante se usó como control negativo.

Figura 7. Competición con filtrados de sobrenadante del fago. Los sobrenadantes recién preparados de los fagos de MA39 (10 μ L) y anti-15 CEA/pKM19 (5 μ L) compitieron con 10 μ L o 50 μ L de filtrados de los mismos sobrenadantes del fago. Los datos se expresan como porcentaje de la reactividad de los sobrenadantes sin competidores.

Figura 8. Transferencia Western de los fagos recombinantes purificados con PEG. Los extractos de proteína de aproximadamente 5×10^9 PFU de los fagos MA39, anti-CEA/pKM18 y anti-CEA/pKM19, y 1×10^9 PFU de anti-CEA/pKM17 se fraccionaron por SDS-PAGE y se transfirieron en una membrana de nitrocelulosa. Las tiras de membrana se desarrollaron con un anticuerpo conjugado con AP anti-FLAG. El marcador de tamaño de la proteína se incluye (última tira). Las proteínas scFv-pIII (66,1 kDa) y scFv- Δ pIII (45,2 kDa) migran como bandas de peso molecular superiores a causa de un residuo anómalo de la proteína pIII descrita antes (Goldsmith y Konigsberg, 1977).

Figura 9. Selección contra la proteína SP2-GST. Se muestra la reactividad de las mezclas de fago derivados de la primera y segunda rondas de inmunopurificación de la biblioteca de scFvEC23. GST (glutación S-transferasa), leche y estreptavidina, presentes en el sistema de selección, se incluyen como controles negativos. Los datos registrados son los valores promedio de los ensayos realizados por duplicado. La entrada de fagos se normalizó. Aproximadamente 3×10^9 TU por pocillo individual de cada preparación se analizaron en ELISA.

Figura 10. Selección por afinidad del gen de anti-CEA maduro de una biblioteca de maduración. En este ensayo, las reacciones inmunológicas positivas se desarrollaron con un anticuerpo secundario conjugado con AP anti-FLAG, a fin de moderar las señales positivas y hacer visible el aumento de reactividad durante el procedimiento de selección. El fago auxiliar, M13K07, que no despliega fragmentos del anticuerpo, se incluyó como control negativo. Se muestra la reactividad del anticuerpo anti-CEA original en pKM19 (anti-CEA/pKM19), biblioteca de maduración (Lib.), mezclas de fagos después de la primera y segunda ronda de selección (I ronda, II ronda) y clones únicos (cl,1, cl,2) de la mezcla de fagos después de la segunda ronda de selección por afinidad, analizada en proteína de CEA y GST

irrelevante. Los datos informados son los valores promedio de los ensayos realizados por duplicado. La entrada de fago se normalizó. Aproximadamente 3×10^{10} TU por pocillo individual de cada preparación se analizaron en ELISA.

5 **Figura 11.** Reactividad por ELISA de scFv maduros solubles. Se ensayaron varias cantidades de anticuerpos solubles en placas recubiertas con CEA. Se desarrollaron los scFv unidos por medio de un anticuerpo secundario anti-FLAG. Los datos informados son los valores promedio de los ensayos realizados por duplicado. El anticuerpo anti-SP2 irrelevante y el anticuerpo anti-CEA E8 maduro, obtenidos previamente (Pavoni et al., 2006), se incluyeron como controles.

10 **Figura 12.** Especificidad de clones maduros. Aproximadamente 250 ng por pocillo de anticuerpos originales y maduros en forma soluble se ensayaron con CEA y varias proteínas irrelevantes. El anticuerpo anti-SP2 irrelevante se incluyó como control negativo. Los datos informados son los valores promedio de los ensayos realizados por duplicado.

15 **Figura 13.** Análisis V(D)J de los genes del anticuerpo derivado de TIL. A. ADNc de SMART derivado de 10 muestras tumorales diferentes (pacientes B84, B85, B87, B89, B90, B91, B92, B93, B95, B96), de mamas normales, testículos normales y linfocitos de cuatro donantes sanos (L1, L2, L3, L4), se usaron como molde para la amplificación de las regiones del anticuerpo V(D)J. Las muestras de ADNc se normalizaron por amplificación del gen constitutivo de β -actina. Los fragmentos de V(D)J se amplificaron bien de todos los moldes con exclusión del ADNc de los testículos normales. B. Los mismos productos de PCR se fraccionaron por PAGE lo que da una resolución alta para bandas de ADN.

20 **Figura 14.** Distribuciones de subclase de anticuerpo. Las muestras de ADNc de mama normal y B84 ADNc amplificadas por PCR, que no muestran bandas oligoclonales en la prueba V(D)J, tienen prevalencia de las bandas de IgA en comparación con IgG1 y IgG2 (panel izquierdo), mientras que las tres muestras, que muestran bandas oligoclonales fuertes en la prueba previa (B91, B92 y B93), tienen prevalencia de bandas IgG1 o IgG2 en comparación con IgA (panel derecho).

25 **Figura 15.** Secuencias de aminoácidos de regiones variables de 30 clones aleatorios obtenidos por la clonación de los genes del anticuerpo de cadena γ y derivados del ADNc de B92 y B93. La secuencia de péptidos se informa en código de letra única. Los aminoácidos idénticos en clones similares se representan con un guión.

30 **Figura 16.** Selección en las proteínas ED-B, MUC1 y CEA. Se analizó la reactividad de las mezclas de fagos derivadas de la segunda y tercera rondas de inmunopurificación en comparación con la biblioteca original. GST se incluye como un control negativo. Se usó un control negativo adicional, la proteína D que posee cola de 6His como una proteína blanco usada en la selección en caso de la inmunopurificación de ED-B. Los datos informados son los valores promedio de los ensayos realizados por duplicado. La biblioteca ScFvEC23 deriva de PBL. MixTIL es una mezcla de 4 bibliotecas derivadas de TIL (ScFvB87, ScFvB95, ScFvB96 y ScFvmix) como se indica en la tabla 1.

35 **Figura 17.** Reactividad por ELISA de anticuerpos de scFv desplegados sobre clones de fago único. Se analizó la reactividad de los clones de fago único seleccionados contra ED-B (clones EDE1, EDE3, EDE5, EDB5, tabla 5), MUC1 (clones ME 1, ME2, MB5, tabla 5) y CEA (clones CB3, CB37, CB40, CB41, CB53, CB60, tabla 5) después de la tercera ronda de selección por medio de las proteínas respectivas. Los datos informados son los valores promedio de los ensayos realizados por duplicado. Varia proteínas irrelevantes y un anticuerpo de fago irrelevante anti-SP2 se incluyen como controles negativos.

40 **Figura 18.** Se analizó la reactividad por inmunopurificación basada en células contra células de carcinoma de mama fijo (MCF7) y fibroblasto humano (HFF) de las mezclas de fagos derivadas de la cuarta y quinta rondas de inmunopurificación en comparación con la biblioteca original. Los datos informados son los valores promedio de los ensayos realizados por triplicado. Las bibliotecas scFvB96 y mixLIB se definen la Tabla 2.

45 **Figura 19.** Reactividad celular por ELISA contra las células fijas de los clones de fago único. Los datos informados son los valores promedio de los ensayos realizados por triplicado. Célula en desarrollo con anticuerpo anti-SP2 irrelevante se incluye como control negativo. MCF7 y MDA-MB-468: células de carcinoma de mama fijo; HFF: fibroblasto humano y MCF10-2A: células epiteliales de mama humanas.

50 **Figura 20.** Origen de anticuerpos scFv de anti-MCF7. Un μ l de cada biblioteca de fago de scFv se amplificó por PCR por medio de los cebadores de oligonucleótidos específicos para los genes de anticuerpo analizados. Se usó el fago purificado por PEG correspondiente como control positivo (*línea última*). También se analizó el gen del anticuerpo anti-SP2 irrelevante de origen conocido, seleccionado antes de la biblioteca de scFvEC23; derivado de PBL. Se seleccionaron el anticuerpo anti-MUC1 MB5 y el anticuerpo anti-CEA CB37 de la mezcla de la biblioteca derivada de TIL. Los anticuerpos de la mezcla 11, mezcla 12, mezcla 17 y mezcla 39 se seleccionaron de la mezcla de anticuerpos de la biblioteca derivados de TIL y derivados de PBL se definen en la Tabla 5.

55 **Figura 21.** Tinción de fluorescencia de carcinoma MCF7 de mama no permeabilizado y células fijas de epitelio de mama normal MCF10-2A por anticuerpos scFv desplegados en fago (mezcla 17 (A), mezcla 7 (B)).

Figura 22. A. Tinción de fluorescencia de células de carcinoma de mama MCF7, antígeno tumoral MUC1 que

expresa SkBr3 y células de epitelio de mama normal MCF10-2A por medio de anticuerpo scFv anti-MUC1 MB5 desplegado en fago; B. Tinción de células de adenocarcinoma colorrectal LoVo que expresan CEA por anticuerpo scFv anti-CEA CB37 desplegado en fago. Se incluye la tinción de las células MCF10-2A control negativo. Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

5 **EJEMPLO 1: Construcción de nuevo vector pKM19 de fagémido para el despliegue de los anticuerpos de cadena simple sobre el fago filamentoso.**

Introducción

Este trabajo describe la construcción de un nuevo vector de fagémido pKM19 para el despliegue de los anticuerpos de cadena simple sobre el fago filamentoso. Este vector se caracteriza por varias diferencias comparadas con los sistemas canónicos.

a) Codón ámbar

Los fagémidos clásicos contienen un codón ámbar entre los genes de scFv y gpIII, de este modo dirigen la producción de scFv libres y anticuerpos de fusión scFv-pIII en bacterias supresoras, tales como TG1, o DH5 α F', o XL1-Blue, generalmente usadas para la amplificación del fago. Estas cepas bacterianas, que portan la mutación supE, son supresoras de inserción de glutamina con eficiencia de supresión dependiente del codón siguiente al TAG (J. Mol. Biol. 1983 164(1):59-71; Mol. Gen. Genet. 1987 207(2-3):517-518). En tal sistema, los anticuerpos scFv solubles libres producidos se secretan en el periplasma y posteriormente filtran del periplasma en el medio. En el protocolo de purificación de fago estándar por PEG/NaCl, los anticuerpos scFv libres se coprecipitan con partículas de fago. Como resultado, la concentración de los anticuerpos libres en la suspensión del fago puede ser cinco a diez veces mayor que la concentración de las proteínas fusionadas scFv-pIII ensambladas en la partícula del fago. En una selección posterior, los anticuerpos libres abundantes compiten con los anticuerpos desplegados en fago para la unión del blanco. Esto interfiere la eficiencia de inmunopurificación y retrasa el procedimiento de selección, especialmente:

- 25 i) cuando la concentración de antígeno está limitada (por ejemplo, bioinmunopurificación en células vivas, células ex-vivo),
- ii) en rondas de inmunopurificación posterior, donde la concentración de fago específico es relativamente alta, o
- iii) en bibliotecas de maduración, que contienen muchos anticuerpos relativos con la misma especificidad.

En consecuencia se necesitan fagémidos clásicos para una mejor selección y/o maduración de anticuerpos.

30 Tal como se espera a partir de los datos de la bibliografía, la presencia de un codón ámbar ubicado en una secuencia que codifica un péptido líder de fosfatasa alcalina en pKM19, produce un nivel de expresión relativamente bajo de anticuerpos recombinantes en la bacteria supresora de ámbar que alberga este plásmido.

Se demostró (Gene 1999 228: 23-31) que la inhibición del promotor lac solo por represión catabólica con glucosa no es suficiente para equilibrar las tasas de crecimiento de diferentes clones con o sin codones de detención. La expresión de scFv menor obtenida mediante el pKM19, reduce la toxicidad de los anticuerpos recombinantes para el huésped bacteriano y no tiene influencia en la eficacia del despliegue.

Por medio del pKM 19 los autores demostraron:

- 40 (i) que el nivel presente de la expresión del anticuerpo es suficiente para producir anticuerpos del fago altamente reactivos, lo que da una señal similar en la prueba ELISA en comparación con el fago pKM18 sin codón ámbar;
- (ii) que los anticuerpos específicos se pueden aislar fácilmente de una biblioteca scFv construida de los linfocitos de sangre periférica de un paciente con anticuerpos contra una proteína blanco después de solo dos rondas de selección;
- 45 (iii) que la maduración del anticuerpo anti-CEA produce el aislamiento de mejores clones de scFv sin codones de detención en comparación con la maduración realizada por el uso del vector canónico (BMC Cancer 2006 6:41).

b) Proteína del gen III

El vector pKM19 permite la clonación de los fragmentos scFv como fusión amino terminal de la proteína del gen III suprimida.

50 Los vectores de despliegue de fago comúnmente usados para scFv producen la incorporación en las partículas del fago del pIII entero fusionado al fragmento del anticuerpo (en Antibody Engineering - A practical approach:

McCafferty, J. Hoogenboom, H. & Chiswell D., eds, pp.325, Oxford University Press, 1996), mientras que en el caso de plásmido pComb3 utilizado para el despliegue de Fab (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991 88(18):7978-7982), el fragmento del anticuerpo se fusiona con la mitad del carboxi terminal de la pIII. La infectividad de tales fagos recombinantes se obtiene durante su propagación, ya que la superinfección con un fago auxiliar proporciona la proteína del gen III nativa.

De acuerdo con los datos presentes, la fusión del anticuerpo de cadena simple a la parte C-terminal de pIII mejora la producción del fago y la eficiencia del despliegue de un anticuerpo en comparación con la fusión de la proteína pIII wt. Estos datos están de acuerdo con los datos previos de Kretzschmar (Gene 1995 155(1):61-65). La mejora de la eficiencia del despliegue en combinación con la eliminación de los anticuerpos scFv libres de la mezcla de incubación facilita la selección por afinidad y produce un enriquecimiento más rápido de las mezclas de fagos para los clones específicos. Esto también puede contribuir a la reducción de los codones de detención en clones seleccionados ya que se necesita una cantidad menor de rondas de inmunopurificación/amplificación para completar la selección. Los clones defectuosos de crecimiento rápido tienen menos oportunidad de ser aislados.

c) Péptido líder PhoA

En bacterias que albergan el vector pKM19, después de la síntesis de la proteína recombinante, el péptido líder PhoA se escinde con líder peptidasa después de la translocación de membrana, y scFv-pIII se ensambla en la partícula del fago. De esta manera, el sitio de escisión entero de la fosfatasa alcalina, una proteína periplásmica genuina de *E. coli*, se conserva para garantizar el procesamiento eficiente y correcto y el ensamblaje del anticuerpo. Como resultado, la proteína madura contiene dos aminoácidos adicionales en el extremo N-terminal del scFv. En el sistema descrito, es necesario volver a clonar el gen del anticuerpo en el plásmido apropiado para la producción posterior de los anticuerpos solubles. En esta etapa, los aminoácidos adicionales se pueden conservar o eliminar de acuerdo con requerimientos específicos.

En conclusión, la combinación de expresión relativamente baja de los anticuerpos desplegados por la introducción del codón ámbar antes del gen del anticuerpo con mejor eficiencia de despliegue hace útil al nuevo fagémido pKM19 para la selección de los anticuerpos scFv recombinantes contra los blancos deseados de una biblioteca grande, así como para su maduración de afinidad. El plásmido garantiza el despliegue eficiente y permite la reducción del sesgo biológico contra anticuerpos "difíciles" en la delicada etapa de selección inicial. Más aún, este vector es particularmente útil para la maduración de afinidad de los anticuerpos, ya que altos niveles de expresión pueden aumentar la avidéz de las partículas del fago que despliegan Ab, que llevan a la selección de anticuerpos con solo afinidad modesta.

Procedimientos

Cepas bacterianas y fagos

Se usó la cepa bacteriana DH5 α F' (*supE44* Δ *lacU169* (Φ 80 *lacZ* Δ M15) *hsdR17* *recA1* *endA**lgyrA96* *thi-1* *relA1* F' [*traD36* *proAB+* *lacI* Δ *lacZ* Δ M15]) para la producción de anticuerpos soluble y de fago. El fago auxiliar M13 KO7 (Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989) se usó para la preparación del fago.

El anticuerpo del fago anti-CEA, MA39 (BMC Cancer 2006 6: 41), en el plásmido pDN322 (J. Biol. Chem. 1998 273 (34): 21769-21776) se usó como fuente del gen del anticuerpo anti-CEA.

Construcción de plásmidos

El plásmido pC89 (J. Mol. Biol. 1991 222(2): 301-310) se amplificó por PCR inversa con los oligonucleótidos KM161, KM162, que contienen los sitios HindIII y NotI (subrayados) (KM161 5'- GAGGAAGCTTCCATTAAACGGG-TAAAATAC-3' (SEQ ID 78); KM162 5'- TGCAATGGCGGCCGCTAATATTGTTCTGGATATTACCAGC-3' (SEQ ID 79)). En la PCR inversa se usó una mezcla de Taq polimerasa con ADN polimerasa Pfu para aumentar la fidelidad de la síntesis de ADN. Se realizaron veinticinco ciclos de amplificación (95°C-30seg, 55°C-30seg, 72°C-20min). El producto de PCR se digirió con las Endonucleasas HindIII y NotI y se ligó con un dúplex del oligonucleótido KM163-KM164 que codifica el péptido FLAG y cola His (KM163 5'- AGCTTCCTC ATG TAG GCG GCC GCA GGA GAC TAC AAA GAC GAC GAC GAC AAA CAC CAC CAT CAC CAC CAT TAA-3' (SEQ ID,80); KM164 5'- GGCC TTA ATG GTG GTG ATG GTG GTG TTT GTC GTC GTC GTC TTT GTA GTC TCC TGC GGC CGC CTA CAT GAGGA-3' (SEQ ID 81)). El dúplex de ADN clonado contenía un sitio NotI interno, corriente arriba de la secuencia que codifica el péptido FLAG, mientras que el sitio NotI, usado para la clonación del dúplex, no fue restaurado. El plásmido pKM15 resultante se digirió nuevamente con las endonucleasas HindIII, NotI y se ligó con el dúplex de KM175-KM176 que codifica la secuencia líder y los primeros dos aminoácidos de la proteína bacteriana PhoA, que contiene el sitio de clonación de NcoI (KM175 5'-AGC TTA TAA AGG AGG AAA TCC TCA TGA AAC AGA GCA CCA TCG CAC TGG CAC TGT TAC CGT TAC TGT TCA CCC CGG TTA CCA AAG CAC GTA CCA TGG TTT CCC TTGC-3' (SEQ ID 82); KM176 5'-GGC CGC AAG GGA AAC CAT GGT ACG TGC TTT GGT AAC CGG GGT GAA CAG TAA CGG TAA CAG TGC CAG TGC GAT GGT GCT CTG TTT CAT GAG GAT TTC CTC CTT TATA-3' (SEQ ID 83)). Este nuevo plásmido pKM16 se destinó para la producción de anticuerpo de cadena simple soluble (Figura 1).

5 El plásmido pKM16 se amplificó por PCR inversa con los oligonucleótidos KM181, KM182, que presentan los sitios de restricción EcoRI y BamHI, respectivamente (KM181 5'-GTG GTG ATG GAA TTC TTT GTC GTC GTC GTC TTT GTA GTC-3'[SEQ ID 84]; KM182 5'- CAC CAT TAA GGA TCC TAA TAT TGT TCT GGA TAT TAC CAG C-3' [SEQ ID 85]). El gen III de longitud completa (Número de acceso V00604) y la parte 3' del gen que codifica los últimos 197 aa del pIII se amplificaron por medio de los oligonucleótidos KM183-KM185 o KM184-KM185 que contienen los sitios BamHI y NcoI (subrayados) y se ligó en pKM16 digerido, que da los nuevos plásmidos pKM17 y pKM18, respectivamente (KM183 5'- TC TAT TCT GAA TTC GCT GAA ACT GTT GAA AGT TGT TTA GC-3' [SEQ ID 86]; KM184 5'- GC CAA TCG GAA TTC CTG CCT CAA CCT CCT GTG AAT GCT-3' [SEQ ID 87]; KM185 5'- GAA CTG GGA TCC TTA AGA CTC CTT ATT ACG CAG TAT G-3'[SEQ ID 88]).

10 Un fragmento corto del plásmido pKM18 que codifica la secuencia líder se amplificó por PCR con los cebadores KM186-KM180, que introducen una mutación ámbar en el gen PhoA del péptido líder (KM186 5'- ACC CGT AAG CTT ATA AAG GAG GAA ATC CTC ATG AAA TAG AGC ACC ATC GC-3'[SEQ ID 89]; KM180 5'- TAG CCC CCT TAT TAG CGT TTG-3' [SEQ ID 90]). El producto de PCR resultante se digirió con HindIII y NotI y se clonó en pKM18, se digirió con Hindi y NotI y se purificó en agarosa, para construir el plásmido pKM19.

15 Producción de anticuerpo soluble

Una colonia individual se inoculó en 50 ml de LB que contiene 100 µg/ml de Ap y 2% de glucosa. El cultivo se desarrolló a 37°C durante 2-3 h hasta una D.O.=0,8. Las células recuperadas por centrifugación se resuspendieron en 50 ml de LB con Ap y 1 mM de IPTG y se incubaron toda la noche a 30-32°C. El pellet celular se resuspendió en 500 µl de PBS. Después de tres ciclos de congelamiento y descongelamiento, los desechos celulares se sedimentaron por centrifugación. El sobrenadante resultante se usó para ELISA o para transferencia Western.

20 Purificación de linfocitos de sangre periférica y síntesis de ADNc

Los linfocitos se aislaron de 10 ml de sangre periférica fresca del paciente EC23 (con estadio avanzado de cáncer de mama) con un anticoagulante por medio de Ficoll-Paque Plus (Amersham Pharmacia Biotech, Suecia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se aisló ARNm de los linfocitos por medio del uso del kit Dynabeads ARNm DIRECT (DynaL, Noruega). El ARNm se aisló de linfocitos por medio del uso del kit Dynabeads ARNm DIRECT (DynaL, Oslo; Noruega). Se usó un µg del poli(A)+ ARN de los linfocitos para sintetizar el ADNc de longitud completa por medio del kit de construcción de biblioteca de ADN SMART (Clontech, Palo Alto, CA).

25 Construcción de biblioteca de scFv

El repertorio del gen del anticuerpo se amplificó por medio de un conjunto de cebadores diseñado para la amplificación de los dominios VH y VL del anticuerpo, mientras que los fragmentos scFv enteros se ensamblaron in vitro como se describió en [Pope, A.R., Embleton, M.J. & Mernaugh R. (1996) Construction and use of antibody gene repertoires. En: Antibody Engineering - A practical approach (McCafferty, J., Hoogenboom, H. & Chiswell D., eds), pp,325, Oxford University Press]. Estos últimos posteriormente se amplificaron por PCR con cebadores de extensión apropiados, que incorporan los sitios de restricción NcoI, NotI, y permiten la clonación de los genes de scFv en un vector pKM19. Los productos de PCR resultantes se purificaron en 1% de gel de agarosa de punto de fusión bajo (NuSieve 3:1 agarosa, Rockland, ME), se cortaron con NcoI/NotI y se insertaron en el plásmido digerido. La biblioteca scFvEC23 transformada contenía $1,77 \times 10^7$ clones independientes con el inserto de scFv de longitud completa. La biblioteca de scFvEC23 deriva de los PBL obtenidos de un solo paciente EC23 con estadio avanzado de cáncer de mama.

40 Construcción de biblioteca de scFv de anti-CEA mutado

La biblioteca de maduración para el scFv de anti-CEA se construyó como se describió previamente (BMC Cancer 2006 6:41). En breves palabras, se generaron los fragmentos del gen de scFv mutado por la amplificación por PCR con los cebadores: KM144-KM143 (KM143, 5'-GTCATCGTCGGAATCGTCATCTGC-3' [SEQ ID 91]; KM144, 5'-TGTGCGAAAAGTAATGAGTTTCTTTTGGACTACTGGGGC-3' [SEQ ID 92]) y KM148-KM145 (KM148, 5'-CTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGA-3' [SEQ ID 93]; KM145, 5'-TCCGCCGAATACCACATAGGGCAACCACGGATAAGAGGAGTTACAGTAATAGTCAGCC-3' [SEQ ID 94]) que introducen mutaciones aleatorias en las regiones CDR3 de las cadenas pesada o liviana con frecuencia baja. Cada base subrayada de los oligonucleótidos KM144 y KM145 se reemplazó con la mezcla de G/A/T/C con una frecuencia de 10%. Las partes del gen del anticuerpo de scFv faltantes se amplificaron con cebadores KM148-KM157 y KM158-KM143 para HC y LC, respectivamente (KM157 5'-TTT CGC ACA GTA ATA TAC GG-3' [SEQ ID 95]; KM158 5'-TAT GTG GTA TTC GGC GGA-3' [SEQ ID 96]). A fin de reconstruir el gen entero, los fragmentos correspondientes se combinaron y amplificaron en un procedimiento similar a PCR sin cebadores de oligonucleótido. El producto de PCR resultante se utilizó para amplificar el gen entero con cebadores externos KM148, KM143. El fragmento de ADN final se purificó en agarosa, digirió con enzimas de restricción NcoI y NotI, y se ligó con el plásmido pKM19 digerido. La biblioteca resultante contenía $2,2 \times 10^6$ clones de anticuerpo mutados.

55 Competición con scFv soluble

Las placas de ELISA se recubrieron, bloquearon y lavaron como antes. Varias cantidades de anticuerpo anti-CEA

soluble MA39 (BMC Cancer 2006 6: 41) en 100 μ L de buffer de bloqueo se añadieron a los pocillos y se incubaron durante 30 min a 37°C. Posteriormente, se añadieron 10 μ L ($4,5 \times 10^9$ TU) del sobrenadante del fago MA39 o 5 μ L (3×10^8 TU) del sobrenadante anti-CEA/pKM19 a los pocillos y se incubaron durante otra 1 h a 37°C. Las placas se lavaron y el fago unido detectado por un anticuerpo anti-M13 conjugado por HRP. Un scFv anti-SP2 soluble irrelevante (Tabla 5), se usó a una concentración alta (400 ng/pocillo) como control negativo. Una cantidad menor del fago anti-CEA/pKM19, en comparación con MA39, se usó para la reactividad moderada por ELISA de este fago.

En el caso de competición con filtrados de los sobrenadantes del fago, se usaron 10 μ L o 50 μ L de los filtrados MA39 o pKM19/anti-CEA en 100 μ L del buffer de bloqueo como competidores. Los filtrados del fago se obtuvieron de sobrenadante del fago recién preparados por el uso de una columna de filtración Microcon 100.

10 Transferencia Western de fagos purificados con PEG

El fago se purificó de acuerdo con precipitación de PEG/NaCl estándar (Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989). Los extractos proteicos de las muestras de fago se fraccionaron por SDS-PAGE y transfirieron en una membrana de nitrocelulosa. Las tiras de membrana se desarrollaron con un anticuerpo conjugado con AP anti-FLAG.

15 ELISA del fago

Las placas multipocillo (Immunoplate Maxisorb, Nunc, Roskilde, Dinamarca) se revistieron ON a 4°C con una solución de proteína a una concentración de 10 mg/ml en 50 mM de NaHCO₃, pH 9,6. Después de descartar la solución de revestimiento, las placas se bloquearon durante 1 h a 37 °C con buffer de bloqueo de ELISA (5% de leche deshidratada no grasa, 0,05% de Tween-20 en PBS). Las placas se lavaron varias veces con buffer de lavado (0,05% de Tween-20 en PBS). El fago purificado en PEG en buffer de bloqueo (1:1) se añadió a cada pocillo y se incubó durante 1 h a 37°C. Las placas se lavaron y el fago unido se detectó con un anticuerpo secundario anti-M13 conjugado con HRP (27-9421-01, Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia), o anti-FLAG conjugado con HRP (A9044, Sigma, St. Louis, MO), o anti-FLAG conjugado con AP (A9469, Sigma). En el caso de los conjugados con HRP, la inmunoreacción se desarrolló por la incubación con sustrato líquido TMB (Sigma) durante 15 min y se detuvo por la adición de 25 μ L de H₂SO₄ 2 M. Los resultados se expresaron como la diferencia entre las absorbancias a 450 y 620 nm, que se determina con un lector de ELISA automatizado. El anticuerpo conjugado a AP se detectó por incubación con 1 mg/ml de solución de fosfato de p-nitrofenilo en buffer sustrato (10% de buffer de dietanolamina, 0,5 mM de MgCl₂, pH 9,8) durante 60 min. Los resultados se expresaron como la diferencia entre las absorbancias 405 y 620 nm.

30 Los anticuerpos se definen en la tabla 5.

Resultados

El plásmido pKM16 (Figura 1) usado para la producción de anticuerpos solubles en configuración scFv se construye como se describió anteriormente. Este plásmido dirige la expresión de proteína bajo el control del promotor lacP. Los sitios de clonación únicos NcoI y NotI permiten la inserción de un gen del anticuerpo capaz de expresar los anticuerpos de cadena simple con un péptido líder de la enzima periplásmica bacteriana, fosfatasa alcalina (AP), y con los dos primeros aminoácidos de la proteína AP madura, en el extremo terminal amino del anticuerpo; y FLAG/cola His en el extremo terminal carboxi del anticuerpo. A fin de confirmar las calidades prácticas del plásmido, un gen de un anticuerpo de cadena simple de especificidad conocida, el anti-CEA MA39, se amplificó por PCR y se clonó en el vector pKM16. Los autores posteriormente analizaron las proteínas periplásmicas purificadas por congelamiento-descongelamiento en la transferencia Western desarrollada con un anticuerpo secundario anti-FLAG (Figura 3). Las bandas del anticuerpo de cadena simple migraron como proteínas con el peso molecular esperado. La secuenciación de la proteína N-terminal por la degradación de Edman confirma el procesamiento correcto del péptido líder.

Fagémidos para el despliegue del anticuerpo scFv

45 Un fagémido clásico (pDN322) que despliega el anticuerpo de cadena simple anti-CEA, MA39, se comparó con los vectores pKM17, pKM18 y pKM19 que despliegan el mismo anticuerpo, para la producción y eficiencia del despliegue de la partícula el fago. Los plásmidos pKM17 y pKM18 (Figura 1) permiten desplegar los fragmentos del anticuerpo sobre una partícula de fago por fusión a, respectivamente, la pIII entera (1-406 aa) o el dominio carboxi terminal solo (210-406 aa) de la proteína. El plásmido pKM19, derivado de pKM18, alberga un codón ámbar en la secuencia líder, de este modo lleva a una menor producción de las proteínas de fusión de scFv-pIII en comparación con pKM18. Este es un experimento con datos que muestra en la bacteria *supE*, la eficiencia de supresión de este codón TAG, que depende del contexto del nucleótido, es aproximadamente 10-15% (J. Mol. Biol. 1983 164(1): 59-71; Mol. Gen. Genet. 1987 207(2-3): 517-518).

55 Los autores realizaron pruebas funcionales por la clonación del gen del anticuerpo de cadena simple anti-CEA en tres nuevos plásmidos y se los confrontó con el clon original MA39 (anti-CEA en pDN322).

Se incubaron tres colonias individuales por cada clon en 10 ml de medio y se amplificó el fago como se describe en

el Ejemplo 2. Después del rescate del fagémido se titularon los sobrenadantes. Los autores obtuvieron un intervalo entre 5 a 1×10^{11} TU/ml para MA39, pKM18 y pKM19, que despliegan el anticuerpo anti-CEA, mientras que anti-CEA/pKM17 generó títulos cinco a diez veces menores (Tabla 1).

Tabla 1. Producción de fago por diferentes vectores de fagémido que codifican el mismo gen de anti-CEA.

Fago	Clon	Título	Fago	Clon	Título
MA39	1	$1,5 \times 10^{11}$	anti-CEA/pKM18	1	$2,52 \times 10^{11}$
	2	$2,55 \times 10^{11}$		2	$2,5 \times 10^{11}$
	3	$5,1 \times 10^{11}$		3	$1,75 \times 10^{11}$
anti-CEA/pKM17	1	6×10^{10}	anti-CEA/pKM19	1	3×10^{11}
	2	$4,1 \times 10^{10}$		2	$1,8 \times 10^{11}$
	3	$1,95 \times 10^{10}$		3	$2,8 \times 10^{11}$

5

Las preparaciones de fago se analizaron en ELISA, donde el desarrollo se realizó por el uso de anti-M13, o alternativamente, el anticuerpo secundario anti-FLAG. Se aplicaron diferentes cantidades de fago por pocillo de ELISA, los autores demostraron mayor eficiencia del despliegue para los fagos pKM18 y pKM19 en comparación con pKM17 y mucho mayor en comparación con MA39 (Figura 4). Es interesante que el clon de MA39, que produce un nivel de anticuerpos mayor que anti-CEA/pKM17, como se muestra por el desarrollo con anticuerpo anti-FLAG, (Figura 4B), tiene una señal más débil cuando el ELISA se desarrolla con el anticuerpo secundario anti-M13 (Figura 4A).

10

Esto indica que los scFv libres, producidos por el sistema de fagémido clásico, filtran en el medio y coprecipitan con las partículas del fago, en consecuencia compiten con los anticuerpos desplegados en fago por la unión al blanco. Este fenómeno se debe a la presencia de un codón ámbar entre los genes de scFv y pIII.

15

A fin de verificar esta hipótesis, los autores filtraron preparaciones frescas del fago MA39 y anti-CEA/pKM19 por medio de Microcon 100 Centrifugal Filter Devices (Millipore Corporation, Bedford, MA), capaces de retener partículas grandes del fago y pasar a través de scFv solubles. La prueba ELISA de las preparaciones de fago, antes y después de la filtración, desarrolladas con anticuerpos anti-M13 o anti-FLAG, muestra que:

20

(i) los filtrados de MA39 y pKM19 prácticamente pierden los anticuerpos desplegados en las partículas del fago, como se espera;

(ii) los anticuerpos libres están presentes en ambas preparaciones (Figura 5).

Sin embargo, el nivel de anticuerpos libres en la muestra de anti-CEA/pKM19 es marcadamente menor. Los anticuerpos libres en esta muestra son el resultado de la eliminación de anticuerpos, inevitable durante la preparación del fago y que pueden aumentar como resultado del contacto con los componentes del sistema de filtración; mientras que los anticuerpos libres en las muestras MA39 son el resultado de la expresión libre del anticuerpo y la filtración en el medio junto con la eliminación.

25

Para analizar la capacidad competitiva de los anticuerpos libres en los sobrenadantes del fago, nosotros debemos hacer competir los sobrenadantes del fago de los fagos MA39 y anti-CEA/pKM19 con el anticuerpo soluble anti-CEA de concentración conocida (Figura 6) o con cantidades diferentes de filtrados de sobrenadantes de ambos fagos (Figura 7). Estos dos experimentos muestran que los scFv libres compiten eficientemente con los anticuerpos del fago. Diez μ l del filtrado de MA39 ya compiten con 10 μ l de su propio sobrenadante del fago y 5 μ l del sobrenadante anti-CEA/pKM19, mientras que la misma cantidad del filtrado de anti-CEA/pKM19 no tiene efecto. Se observa competición marcada solo en un exceso de diez veces de filtrado de anti-CEA/pKM19 con el mismo sobrenadante del fago (50 μ l del filtrado a 5 μ l de sobrenadante). El análisis de transferencia Western (Figura 8) de varios fagos purificados por PEG desarrollados con un anticuerpo anti-FLAG detecta: (i) la banda superior de cada muestra que corresponde a la fusión scFv-pIII en caso de los fagos MA39 y anti-CEA/pKM17 y scFv-%pIII en caso de anti-CEA/pKM18 o anti-CEA/pKM19; (ii) una presencia notable de anticuerpos libres en la muestra MA39; (iii) presencia de productos de degradación en las muestras de fago como se describió previamente (Gene 1995 155(1):61-65).

35

Generación de biblioteca desplegada en anticuerpo scFv y aislamiento de las especificidades de unión por medio del nuevo plásmido pKM19

40

El plásmido pKM19, un derivado de pKM18, que alberga el codón ámbar en la secuencia líder se usó para la generación de la biblioteca scFv para estudiar si una baja producción de anticuerpos fusionados permite la selección eficiente de un anticuerpo específico contra una molécula blanco.

Una biblioteca de anticuerpo scFv se construyó a partir de linfocitos humanos de sangre periférica como se describió en Materiales y Procedimientos. La biblioteca se seleccionó contra la fusión de GST de un polipéptido de 168 aa de largo SP2 de *Streptococcus pneumoniae* (FEMS Microbiol. Lett. 2006 262(1):14-21), que fue reactivo con la muestra de sangre utilizada para la construcción de la biblioteca scFv.

5 Se diseñó un procedimiento de selección para crear una alta concentración de la proteína blanco en volumen de incubación pequeño, por el uso de proteína biotilada para la inmunopurificación y Dynabeads revestidas con estreptavidina para el aislamiento del fago unido, como se describió en el Ejemplo 2. Después de completar dos rondas de inmunopurificación, nosotros ensayamos la reactividad de las mezclas de fagos en ELISA (Figura 9). La mezcla de fagos, después de la segunda ronda de selección por afinidad, fue altamente reactiva con la proteína de fusión y negativa con las proteínas irrelevantes, tales como GST, leche y estreptavidina, que se presentaron como portador de proteína o componentes del sistema de selección y todas se usaron como controles negativos en ELISA, de este modo se indica la sucesiva selección de anticuerpo específicos.

10 Finalmente, los autores aislaron y secuenciaron un número de clones positivos para confirmar la secuencia correcta de scFv. Uno de los genes identificados de scFv se clonó en pKM16 para la producción de anticuerpo anti-SP2 soluble (Tabla 5), que se usó como un anticuerpo control irrelevante en los experimentos descritos en las Figuras 6, 11 y 12.

Maduración del anticuerpo scFv de anti-CEA por medio del uso del vector pKM19

15 La selección por afinidad de una biblioteca de maduración se llevó a cabo como se describió en BMC Cancer 2006 6:41. La Figura 10 muestra que la reactividad del fago contra la proteína de CEA crece en cada ronda de selección sucesiva. Se aislaron los clones de fago único con mejor reactividad (Figura 10). Los autores secuenciaron 19 clones aleatorios de la mezcla de fagos después de la segunda ronda de selección. Ninguno los clones secuenciados de la mezcla de fagos que tiene aumento de afinidad (0 de 19) presentó codones de detención en su secuencia, mientras que 70% (9 de 13) de los clones del sistema de fagémido clásico contenían tales mutaciones ($P=0,00002$, calculadas de acuerdo con la prueba de chi cuadrado). En consecuencia, el uso del vector de pKM19 para la maduración de un anticuerpo anti-CEA aumenta significativamente los resultados de la selección.

20 Dos genes del anticuerpo aislados de la biblioteca de maduración (clones 1 y 2), se clonaron en pKM16, y se produjeron los anticuerpos solubles y se compararon con el anti-CEA MA39 soluble original y el anticuerpo E8 maduro con el fagémido canónico (Pavoni et al., 2006). La Figura 11 confirma la mayor afinidad de los anticuerpos maduros.

25 La prueba de especificidad sobre los scFv recién seleccionados muestra su baja reactividad umbral con proteínas irrelevantes, comparable con la del anticuerpo original (Figura 12).

EJEMPLO 2: Construcción de la biblioteca derivada de TIL y selección del anticuerpo

Introducción

30 La identificación de los anticuerpos recombinantes específicos del tumor de la biblioteca de despliegue derivados de los ganglios linfáticos de pacientes con cáncer se describió en [Clin. Exp. Immunol. 1997 109(1):166-74; Int. J. Mol. Med. 2004 14(4):729-35; World J. Gastroenterol. 2004 10(18):2619-23].

35 Se sabe que aproximadamente 7% de las secuencias de anticuerpo de cadena pesada derivadas de ganglio linfático y entre 18-68% derivadas de TIL pertenecen a los grupos clonales (Cancer Immunol. Immunother. 2003 52(12):715-738). Esto indica que tanto los ganglios linfáticos drenantes del tumor como los linfocitos infiltrantes del tumor son fuentes promisorias de anticuerpos específicos de tumor. Los autores mostraron por amplificación por PCR de las regiones del gen del anticuerpo específicas de diez de tumores de mama primarios (ninguno es del tipo histológico raro MBC) de pacientes entre 49-79 años, que 7 de 10 de estas muestras (70%), tenían una prominencia de la expresión del anticuerpo IgG, en comparación con la subclase IgA, que se correlaciona con la oligoclonalidad de la región hipervariable de los anticuerpos de cadena pesada, lo que sugiere una respuesta inmune específica a los antígenos expresados en el tumor. La clonalidad de los anticuerpos derivados del tumor se confirmó por análisis de secuenciación.

40 Los autores identificaron un panel de anticuerpos específicos del tumor a partir de las bibliotecas descritas que fueron reactivos con el dominio de ED-B, de las células de carcinoma de mama MUC1, CEA y MCF7 usadas en las selecciones respectivas. Es interesante que en la realización de la selección basada en células sin etapa de inmunopurificación sustractiva en el epitelio de mama normal, en contraste con numerosos protocolos de selección descritos previamente [Int J Mol Med. 2004 14(4):729-35; World J Gastroenterol. 2004 10(18):2619-23; Int J Oncol. 2000 16(1):187-95; Cancer Res. 1999 59(11):2718-23; Biochem Biophys Res Commun. 2001 280(2):548-52], los autores aislaron solo un scFv de 10 que no era específico del tumor y también reconocieron epitelio de mama normal. Esto probablemente indica que nuestra biblioteca de tamaño modesto contiene un muy restringido repertorio de anticuerpos naturales provisto por TIL-B, más que un vasto repertorio de anticuerpos creado por la transposición de cadena del anticuerpo. Más aún, la selección de anticuerpos de una mezcla bibliotecas derivadas de PBL y TIL muestra claramente que la última biblioteca es más eficiente en una inmunopurificación basada en células. En

efecto, todos los anticuerpos de cadena simple anti-MCF7 aislados parecieron derivar de los linfocitos infiltrantes del tumor. En síntesis, la biblioteca derivada de TIL proporcionó buenos resultados en todas las selecciones realizadas, que proporcionan un panel de anticuerpos humanos específicos de tumor, que reconocen antígenos de la superficie celular del tumor útiles para la terapia y diagnóstico del cáncer.

- 5 En este estudio nosotros demostramos que la aplicación del nuevo vector de despliegue en fagos mejorado pKM19 llevó al aislamiento de un panel grande de anticuerpos derivados de trozos de tejido tumoral extirpado en la cirugía del tumor, contra antígenos tumorales conocidos y células tumorales enteras, y que son potencialmente útiles en la terapia del cáncer. Estos resultados son similares a los resultados obtenidos por la detección directa de la biblioteca de expresión del anticuerpo derivado de TIL soluble (Cancer Immunol. Immunother. 2002 51(2):79-90). La detección
10 directa es un abordaje de detección sin sesgo que no depende de las etapas de amplificación del fago y resulta más eficiente en comparación con la selección por afinidad realizada con los vectores de despliegue canónicos, que no pudieron seleccionar anticuerpos específicos de tumor en trabajos análogos (Cancer Res. 2001 61(21):7889-99; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2001 98(22):12659-64; Int. J. Cancer 2001 93:832-40). Nuestros resultados indican que el vector pKM19 mejora los resultados de la selección en comparación con los vectores de despliegue clásicos y al
15 mismo tiempo, proporciona la posibilidad de aplicar metodologías de selección por afinidad, que facilitan la manipulación con bibliotecas grandes.

En conclusión, nuestros resultados indican que las respuestas inmunes naturales a los antígenos relacionados con el tumor existen en la mayoría de los pacientes con cáncer de mama, no solo en los histológicamente definidos como MCB. Se obtuvieron muestras tumorales tan pequeñas como 0,2 g como material quirúrgico y se pueden
20 aprovechar como una fuente apropiada para la generación de bibliotecas de despliegue en fago recombinante enriquecidas para los anticuerpos específicos de tumor: el aislamiento de un panel de scFv antitumorales a través de la selección contra blancos de proteína deseables, así como contra células de carcinoma de mama vivas, muestra que este abordaje es muy promisorio para el desarrollo de anticuerpos terapéuticos humanos. Más aún, la investigación de los blancos de proteína que induce la producción de anticuerpos específicos de las células
25 tumorales en un microambiente del tumor puede (i) proporcionar detalles importantes acerca de la inmunorreactividad individual de un paciente dado, lo que proporciona un valor pronóstico; (ii) abrir una gran perspectiva para el descubrimiento de nuevos antígenos específicos del tumor.

Procedimientos

Muestras de tejido y sangre

- 30 Los especímenes de carcinoma de mama y la sangre periférica fresca de pacientes con cáncer de mama (B81-B96, EC23) se obtuvieron de M. G. Vannini Hospital, Roma. Todas las muestras biológicas se obtuvieron mediante consentimiento informado.

Líneas celulares

- 35 La líneas celulares de carcinoma de mama MCF-7 (Número ATTC: HTB-22), MDA-MB-468 (Número ATTC: HTB-132) y SkBr3 (Número ATTC: HTB-30), y línea celular de adenocarcinoma de colon LoVo (Número ATTC: CCL-229) se mantuvieron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los fibroblastos de prepucio humano (HFF) se cultivaron en DMEM suplementado con 10% de FBS y 1% de L-glutamina. Las células epiteliales de mama inmortales MCF10-2A (Número ATTC CRL-10781) [Cancer Res. 1990 50(18):6075-86] se propagaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y usaron como controles negativos en las pruebas ELISA.

Proteínas de antígeno tumoral purificado

La proteína de CEA humana, purificada del carcinoma de colon y metástasis hepática, se adquirió en USBiological (#C1300-16, United States Biological, Swampscott, MA).

El dominio ED-B recombinante biotinilado de la fibronectina se obtuvo de Sigma-Tau S.p.A. (Pomezia, Roma).

- 45 La proteína MUC1 recombinante se obtuvo en varias etapas. Dos oligonucleótidos superpuestos KM358 5'-ACT TCA GCT CCG GAC ACC CGT CCG GCT CCG GGT TCC ACC GCT CCG CCG GCT CAC GGT GTC-3' [SEQ ID 97] y KM359 5'-CGG AGC CGG ACG GGT GTC CGG AGC TGA AGT GAC ACC GTG AGC CGG CGG AGC GGT GGA ACC-3' [SEQ ID 98] codificados por la repetición de 20-aa MUC1, se ensamblaron en un proceso tipo PCR, en el que se realizaron 25 ciclos de amplificación por PCR con 0,2 pM/μl de KM358 y KM359. Posteriormente se cortó la banda de ADN de peso alto del gel de agarosa y se ligó con un adaptador corto, obtenido por el apareamiento de un
50 oligonucleótido KM328 5'-CT AGT TCG TCG GGT TCG TCG GGA-3' [SEQ ID 99] y uno fosforilado: KM329 5'-TCC CGA CGA ACC CGA CGA A-3' [SEQ ID 100]. El fragmento de ADN resultante se purificó del exceso de adaptador, se fosforiló y clonó en pGEX-SN digerido y defosforilado [Int J Cancer. 2003 106(4):534-44], derivado del plásmido pGEX-3X [Gene 1988 67:31-40]. La proteína recombinante MUC1 fusionada a GST, que contiene una secuencia de MUC1 de 107-aa, que contiene 5,3 repeticiones, se purificó de acuerdo con procedimientos estándares [Gene 1988
55 67:31-40].

Purificación de linfocitos de sangre periférica

Los linfocitos se aislaron de 10 ml de sangre periférica fresca mezclada con anticoagulante por el uso de Ficoll-Paque Plus (Amersham Pharmacia Biotech, Suecia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. ARNm se aisló de los linfocitos por medio del uso del kit de ARNm directo Dynabeads (Dyna, Noruega).

5 Extracción de ARN y síntesis de ADNc

Se obtuvieron especímenes de tumor de aproximadamente 200 mg de pacientes con carcinoma de mama como muestras de descarte quirúrgico e inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido. El ARN total se preparó con el sistema de aislamiento de ARN total (Promega, Madison, WI) y se purificó a poli A+ ARN por medio del uso de los sistemas de aislamiento de ARNm PolyATract (Promega). Se usaron quinientos ng de poli(A)+ ARN de carcinomas de mama o 1 µg del poli(A)+ ARN de los linfocitos para sintetizar el ADNc de longitud completa por medio del kit de construcción de biblioteca de ADNc SMART (Clontech, Palo Alto, CA).

Análisis de la expresión del gen del anticuerpo por PCR

La región hipervariable del anticuerpo V(D)J se amplificó por PCR a partir de los moldes de ADNc por medio de cebadores específicos de sitio 5'-GGACACGGCT(G/C)TGTACTG-3'[SEQ ID 101] y 5'-GCTGAGGAGACGGTGACC-3'[SEQ ID 102] diseñados en un estudio por Hansen y colegas [Proc Natl Acad Sci USA 2001 98(22):12659-64]. La determinación de la subclase IgG1, IgG2 y IgA se realizó como se describió en [J Immunol. 2002 169(5):2701-11] por la combinación en forma individual de los cebadores específicos de la región constante para los genes de IgG1, IgG2 y IgA (CG1d, CG2a y CA1, respectivamente) con un conjunto de cebadores de la cadena pesada variable: VH135, VH3a, VH3f, VH4, VH4b. Estos cebadores se diseñaron para la construcción de la biblioteca de Fab humana [Barbas CF III, Burton DR (1994) Monoclonal antibodies from combinatorial library. Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual].

Construcción de la biblioteca de scFv

El repertorio de genes del anticuerpo se amplificó por medio del conjunto de cebadores diseñados para la amplificación de los dominios del anticuerpo VH y VL [Pope, A.R., Embleton, M.J. & Mernaugh R. (1996) Construction and use of antibody gene repertoires. En: Antibody Engineering - A practical approach (McCafferty, J., Hoogenboom, H. & Chiswell D., eds), pp.325, Oxford University Press] y los fragmentos scFv se ensamblaron *in vitro* como se describió antes [Pope AR et al., 1996]. Los fragmentos scFv posteriormente se amplificaron por PCR con cebadores de extensión apropiados, que incorporan los sitios de restricción NcoI, NotI, lo que permite la clonación de los genes scFv en el vector pKM19. Los productos de PCR resultantes se purificaron en un gel de agarosa de fusión baja 1% (NuSieve 3:1 agarosa, Rockland, ME). Los fragmentos de ADN se digirieron con NcoI/NotI y se insertaron en el vector pKM19. El Adn ligado se usó para transformar las células bacterianas competentes DH5αF' (*supE44ΔlacU169(Φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1gyrA96 thi-1 relA1 F' [traD36 proAB⁺ lac^flacZΔM15]*) por electroporación.

Las células transformadas se sembraron en 20 placas de agar (Ø 15 cm), que contienen agar LB, 100 µg/ml de ampicilina y 1% de glucosa. Después de la incubación toda la noche a 37°C, las colonias bacterianas se desprendieron de las placas y resuspendieron en LB, que contiene 10% de glicerol. Las alícuotas de esta suspensión celular se conservaron a -80°C y se usaron para la amplificación del fago.

Amplificación del fago

Se incubaron cuarenta µl de células bacterianas desprendidas en 40 ml de LB que contiene ampicilina y 1% de glucosa hasta D.O=0.2. Las bacterias se recolectaron por centrifugación y resuspensión en 40 ml de LB con ampicilina sin glucosa. Aproximadamente 6x10⁹ pfu de M13K07 auxiliar se añadieron a cada ml de suspensión celular, se incubaron durante 15 min a 37°C sin agitación y otras 2 h en un agitador. Se añadió kanamicina a la concentración final de 20 µg/ml y las células se incubaron ON a 32°C. El fago se purificó de acuerdo con la precipitación de PEG/NaCl estándar [Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989].

Selección basada en células de anticuerpos de biblioteca desplegada en fago

Las células semiconfluentes MCF-7 (aproximadamente 2x10⁷) se enjuagaron 3 veces con buffer PBS y se incubaron con 2 ml de 2 mM de EDTA en PBS durante 15 min a 37°C. Diez ml de PBS que contiene 10 mM de MgCl₂ se añadieron a las células, estas se extrajeron con precisión por pipeteo. Las células se recolectaron por centrifugación, se lavaron una vez con 10 ml de PBS/MgCl₂ y finalmente se resuspendieron en 1 ml de buffer de bloqueo recién preparado: 4% de leche en polvo no grasa, 0,05% de Tween 20, 5x10¹¹ pfu de fago destruido por UV f1. Las células se bloquearon durante 30 min a RT sobre rueda giratoria, posteriormente se recolectaron e incubaron durante 1 h a 37°C sobre la rueda con aproximadamente 5x10¹¹ TU de biblioteca de anticuerpo scFv recién amplificada en 1 ml de buffer de bloqueo. Las células se lavaron 5 veces con PBS/Tween. El fago unido se eluyó por el añadido de 400 µL de HCl 0,1 M, pH 2,2 (ajustado por glicina). La suspensión celular se incubó con solución de elución durante 10 min a RT, se neutralizó con 40 µL de Tris-HCl 2 M, pH 9,6 y se usó para la infección de las células bacterianas. Las

bacterias se sembraron en dos placas de agar LB (o 15 cm), que contiene 100 µg/ml de ampicilina y 1% de glucosa. Las bacterias desprendidas se usaron para la amplificación del fago.

Selección por afinidad sobre blancos de proteína purificada

5 CEA y MUC1 se biotinilaron como se describió en [Harlow E. & Lane D. Antibody: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1988]. Aproximadamente 5×10^{11} TU de biblioteca de anticuerpo scFv recién amplificada se preincubaron con 50 µL de extracto bacteriano AD202 en buffer de bloqueo durante 30 min a 37 °C. Veinte y de una proteína biotinilada se añadieron a la mezcla de reacción y se incubaron durante otra h a 37°C a agitación suave. El fago unido se capturó por medio de Dynabeads M-280 revestidas con estreptavidina (112,05, Dynal, Oslo, Noruega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, se lavaron 5-10 veces con PBS/Tween, posteriormente, se eluyeron y amplificaron como antes.

Experimentos de ELISA

15 Las células se cultivaron en una placa de 96 pocillos hasta casi confluyente. Después de descartar el medio de crecimiento, 100 µL de 4% de paraformaldehído recién preparado (#15710, Electron Microscopy Science, Hatfield, PA) en PBS se añadieron rápidamente durante 10 min. La solución de fijación se extrajo por pipeteo y las células se incubaron con buffer de bloqueo (5% de leche, 0,05% de Tween 20 en PBS) durante 30 min a RT. El fago purificado por PEG en buffer de bloqueo (1:1) se añadió a las células y se incubó durante 1 hora a 37°C bajo agitación suave. Las células se lavaron 3 veces y un anticuerpo anti-M13 conjugado con HRP (Pharmacia) se usó para desarrollar la reacción. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Tinción de inmunofluorescencia

20 Las células se cultivaron en una placa de 24 pocillos para el cultivo celular (Nunc, Roskilde, Dinamarca), se fijó como antes y se bloqueó con 3% de BSA en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. El fago purificado con PEG en 1% de BSA/PBS se añadió a las células y se incubó durante 1 h bajo agitación suave a 37°C. Las células se lavaron tres veces con 1% de BSA/PBS y se incubaron con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-M13 (27-9420-01, Amersham Biosciences) durante 30 min a 37°C. Las células se lavaron como antes y posteriormente se incubaron con un anticuerpo policlonal de cabra anti-ratón conjugado con FITC (554001, BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA) a una concentración de 5 µg/ml durante 30 µmin a 37°C bajo agitación suave. Después de la última incubación, las células se lavaron cinco veces, se secaron en la oscuridad, se montaron en medio Vectashield (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA) y cubreobjetos, y se analizaron por medio de microscopía de fluorescencia invertida.

Todos los anticuerpos se definen en la tabla 5.

30 **Resultados**

Caracterización del infiltrado celular linfoplasmático en muestras de tumor de mama

Diez especímenes de tumor de pacientes con cáncer de mama (47-79 años) se examinaron para determinar la presencia y naturaleza de TIL-B por amplificación por PCR de segmentos de anticuerpo V(D)J (CDR3) y por comparación de la representación de las clases de anticuerpo IgG y IgA.

35 Los patrones de expresión de los genes del fragmento de anticuerpo se analizaron por PCR semicuantitativa a partir del molde de ADNc de SMART. El panel de ADNc de los diez carcinomas de mama, de las muestras de mama normal, testículos normales y linfocitos de sangre periférica de los donantes sanos se normalizaron por la amplificación por PCR de un gen constitutivo, β-actina y se muestran en la Figura 13A.

40 Las regiones de cadena pesada hipervariable del anticuerpo V(D)J se amplificaron como se describió en Materiales y Procedimientos. Después del análisis por electroforesis en gel de agarosa, los mismos productos de PCR se fraccionaron por 10% de PAGE de alta resolución (Figura 13B). En la aplicación de esta técnica, los autores observan que 7 de 10 muestras derivadas de tumor contienen varios números de bandas diferenciadas, que caracterizan la oligoclonalidad de la respuesta inmune en estos patrones, mientras que los fragmentos de ADN de mama normal y linfocitos periféricos bien amplificados no contienen bandas intensivas y forman una mancha, que consiste en las bandas de diferente longitud. La oligoclonalidad observada de las inmunoglobulinas no se correlaciona con la edad de los pacientes.

50 A fin de analizar las distribuciones de subclase del anticuerpo, nosotros amplificamos los genes de Ig del ADNc del carcinoma de mamas y mamas normales, por medio de cebadores específicos de subclase. De acuerdo con el ensayo previo, las 3 muestras de ADNc de tumor, que no contienen bandas oligoclonales en las regiones V(D)J amplificadas por PCR, tienen una prevalencia de la banda de IgA en comparación con las bandas de IgG1 e IgG2, exactamente como en una muestra de mama normal donde IgA generalmente representa la principal clase de Ig (Br. Med. J. 1976 2(6034):503-506). Por otra parte, las muestras que muestran oligoclonalidad en el primer ensayo contienen IgG1, o IgG1 e IgG2 como bandas de anticuerpo dominantes, en contraste con la mama normal. La Figura 14 muestra cuatro ejemplos más característicos junto con la muestra de mama normal.

La oligoclonalidad de los anticuerpos derivados de TIL-B en pacientes con cáncer de mama se confirmó por secuenciación

Los autores seleccionaron dos muestras de ADNc (B92, B93) que proporcionan las bandas únicas más fuertes en la prueba V(D)J, para el análisis de secuenciación. Se determinaron las secuencias de nucleótidos de 17 y 13 clones elegidos aleatoriamente que contienen genes del anticuerpo y que derivan de ADNc de B92 y B93, respectivamente, y se dedujeron sus secuencias de aminoácidos. Los 30 clones codificaron en marco cadenas pesadas organizadas correctas. Los anticuerpos aislados más frecuentemente (B92-A y B93-A1) contenían regiones V(D)J de la longitud exacta correspondiente a las bandas fuertes que se observaron primero en la Figura 13B (líneas con las muestras B92 y B93) (Figura 15), en consecuencia se indica que tanto la amplificación por PCR con cebadores de cadena pesada variable como la etapa de clonación no introducen ningún sesgo particular que interfiere en las frecuencias de cadena pesada de la biblioteca construida.

Como se indica en la figura 15, se identificaron seis mutaciones somáticas en los fragmentos del anticuerpo. Estas mutaciones se localizan en las CDR variables de la cadena y de la misma especificidad, mientras que solo halló una mutación fuera de las regiones variables (P=0,0002). Por ende, la oligoclonalidad del repertorio de anticuerpos derivado de un tejido tumoral es una respuesta inmune natural que ocurre dentro del tejido tumoral dirigido por antígenos tumorales y no un artefacto introducido por la amplificación por PCR.

Construcción de bibliotecas

Se construyeron cuatro bibliotecas de anticuerpo scFv por medio del uso de siete ADNc como molde, caracterizados por la oligoclonalidad de la respuesta inmune (ver lista de bibliotecas en la Tabla 2). Solo la biblioteca scFvEC23 (descrita en el Ejemplo 1) se construyó a partir de linfocitos de sangre periférica, obtenidos de un paciente solo con estadio avanzado de cáncer de mama.

Tabla 2. Lista de biblioteca de anticuerpos ScFv

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

Selección de anticuerpos anti-tumorales específicos de la biblioteca de despliegue en fagos generada a partir de TIL-B y PBL

Los autores examinaron directamente la posibilidad de seleccionar fragmentos de anticuerpo específicos de la biblioteca de fagos contra antígenos de cáncer comunes que incluyen el dominio ED-B de fibronectina [EMBO J. 1987 6(8):2337-42], MUC1 [Cancer Res. 1992 52(22):6365-70; Hum Pathol. 1995 26(4):432-9], y CEA [J. Clin. Lab. Anal. 5: 344-366; Semin Cancer Biol. 1999 9:67-81; Cancer Res. 2002 62:5049-5057]. En las condiciones descritas en Materiales y Procedimientos una mezcla de cuatro bibliotecas desplegada en anticuerpo scFv derivada de TIL (scFvB87, scFvB95, scFvB96 y scFvmix) denominada biblioteca mixTIL (Tabla 2) y la biblioteca de scFvEC23 se inmunopurificaron por separado contra tres blancos de proteína en varias rondas. En cada caso nosotros observamos que las mezclas de fago fueron ya positivas contra el antígeno seleccionado después de la segunda y tercera rondas de inmunopurificación (Figura 16). Los clones elegidos aleatoriamente se analizaron para determinar la reactividad de unión contra los antígenos. Los resultados de la prueba de los clones del fago aleatorio de las mezclas de fagos de la tercera ronda se sintetizan en la Tabla 3. Los clones positivos se analizaron por búsqueda de huella genética por medio del uso de digestión doble con HaeIII y AluI y se secuenciaron los clones de anticuerpo únicos. La Figura 17 represente el ELISA de scFv-fagos únicos seleccionados sobre antígenos purificados. Los

clones únicos analizados se unen fuertemente con los antígenos respectivos y no reaccionan con proteínas irrelevantes. Este resultado indica que el vector pKM19 es una herramienta adecuada para la selección de anticuerpos anti-tumorales de la biblioteca derivada de TIL y PBL.

Tabla 3. Resultado de las selecciones a través del uso de tres antígenos tumorales purificados.

Antígeno blanco	Biblioteca	Clones positivos/ clones analizados	Genes de anticuerpo aislados
ED-B	mixTIL	10/10	1
	scFvEC23	10/10	3
MUC1	mixTIL	2/16	1
	scFvEC23	6/8	2
CEA	mixTIL	17/20	4
	scFvEC23	15/20	3

5

Selección basada en células de los anticuerpos específicos de tumor.

Los autores analizaron la funcionalidad de una biblioteca derivada de TIL única (scFvB96) por la selección de anticuerpos específicos de cáncer de mama a través de la inmunopurificación basada en células de la línea celular de carcinoma de mama MCF-7. Cuatro bibliotecas, que incluyen scFvB87, scFvB95, scFvmix y scFvEC23, se combinaron entre sí (biblioteca denominada mixLIB, tabla 2) y se inmunopurificaron en el mismo tipo de células. Cuatro o cinco rondas de selección rondas en las células MCF-7 fueron necesarias para la biblioteca mixLIB o scFvB96, respectivamente, a fin de enriquecer las mezclas de fagos para los ligadores de células específicas (Figura 18). Posteriormente, los clones elegidos aleatoriamente se analizaron para determinar la presencia de anticuerpo ScFv entero. Los clones de scFv-fago de longitud completa se analizaron por ELISA basado en células, y se analizaron por búsqueda de huella genética, y se secuenciaron varios clones positivos. Las secuencias de aminoácidos se dedujeron de las secuencias de ADN, lo que confirma las estructuras del anticuerpo en marco correctas. Los datos del análisis del clon se sintetizan en la Tabla 4.

10

15

Tabla 4 Resultado de la selección en células de carcinoma de mama humano MCF7 intactas/vivas.

Biblioteca	Selección de MCF-7	
	scFvB96	mixLIB
Ronda de selección	5	4
scFv de longitud completa/ clones analizados	12/40	30/40
Clones positivos/ clones analizados de longitud completa	5/12	22/30
Genes del anticuerpo aislados	2	8

La reactividad y especificidad de los anticuerpos seleccionados en las células se verificaron por ELISA en líneas celulares de carcinoma de mama: MCF-7, MDA-MB-468, y células normales, como controles negativos: MCF10-2A (epitelio de mama humano), HFF (fibroblastos humanos) (Figura 19). Entre 10 anticuerpos scFv seleccionados diferentes scFv pertenecientes a 7 grupos de especificidad (los anticuerpos (mix7, mix12, mix25 tienen la misma secuencia de cadena pesada y diferentes cadenas livianas; los anticuerpos mix8 y mix39 tienen secuencias similares con diferencias menores), 9 son específicas para las células de carcinoma de mama, mientras que solo el anticuerpo scFv B96/4F se une también a las células epiteliales normales.

20

Anticuerpos seleccionados en células derivados de TIL

Los anticuerpos scFv Mix11, mix12, mix17, mix23 y mix39 (Tabla 4) se seleccionaron de una mezcla de bibliotecas derivadas de PBL y TIL. Los autores investigaron el origen de estos anticuerpos a fin de observar cuál tipo de biblioteca actúa mejor en condiciones de selección iguales. Un μ l de cada biblioteca amplificada se usó como molde para la amplificación por PCR con el par de cebadores de oligonucleótido específicos para cada anticuerpo (Figura 20). Este análisis muestra que los 5 anticuerpos scFv analizados, se aislaron de una mezcla de bibliotecas, pertenecientes a los anticuerpos derivados de TIL. Los genes del anticuerpo de mix7 y mix25 (que tienen la misma

30

cadena pesada que mix12, tabla 5), y mix8 (similar a la mix39, tabla 5) se considera que tienen un origen similar. Para el anticuerpo anti-SP2 irrelevante, que se seleccionó de la biblioteca de scFvEC23, se confirmó su origen de la biblioteca derivada de PBL. Los anticuerpos anti-MUC1 MB5 y anti-CEA CB37, que se seleccionaron de la mezcla de cuatro bibliotecas derivadas de TIL (mixTIL) se mostraron que derivan de la biblioteca scFvmix y scFvB96, respectivamente.

5

Tinción de fluorescencia de las células tumorales

Se ensayaron las especificidades de unión de varios clones, que incluyen mix17, mix7 (Figura 21), anticuerpo anti-Muc1 MB5 y anti-CEA CB37 (Figura 22) por la tinción de inmunofluorescencia de las células tumorales directamente con los anticuerpos scFv desplegados en el fago. El scFv de Mix17 reconoce la mayor parte de las células de células de carcinoma de mama MCF7 no permeabilizadas en este experimento (Figura 21A), mientras que mix7 tiñe un bajo porcentaje de células, probablemente células y apoptóticas.

10

El anticuerpo MB5 tiñe intensivamente las células MCF7, conocidas por alta expresión de MUC1, y también reacciona bien con otra línea celular de carcinoma de mama, SkBr3 (Figura 22). El anticuerpo CB37 tiñe las células LoVo. No se observó tinción umbral en el epitelio de mama normal para ambos anticuerpos MB5 y CB37.

15

EJEMPLO 3: Maduración de anticuerpos scFV de anti-MUC1 y anti-CEA

Para aumentar la afinidad de los anticuerpo específicos de tumor CB37 y MB5, nosotros realizamos la maduración de afinidad del anticuerpos in vitro. La nueva biblioteca de maduración se creó por la combinación de genes de cadenas VH simples derivadas de CB37 y MB5, respectivamente, con varios genes de las cadenas VL derivados de TIL y PBL de los pacientes con tumor. Las bibliotecas se construyeron como se describe en los Ejemplos 1 y 2.

20

Procedimientos

Selección por afinidad

La selección por afinidad se realizó por medio de las proteínas biotiniladas como se describe en el Ejemplo 2, con la diferencia de que para la primera ronda de selección por afinidad, nosotros usamos 10 μ g de la proteína y para la segunda solo 50 ng. Los clones hallados positivos en el ELISA se analizaron por PCR y huella genética con las enzimas de restricción AluI y HaeIII para identificar clones diferentes. Se determinó la secuencia de ADN de los clones. Los genes del anticuerpo de los clones que tienen reactividad contra proteínas blanco mayor que los anticuerpos originales se clonaron en pKM16 para producir los scFv en forma soluble como se describe en el Ejemplo 1.

25

Caracterización de anticuerpos maduros

30

Los fragmentos del anticuerpo maduro se caracterizaron por la unión al antígeno.

Los nuevos anticuerpos anti-MUC1 MB5/C'1 y MB5/C'3 y los anticuerpos anti-CEA maduros CB37/3B y CB37/9C (Tabla 5) en forma soluble se caracterizaron por resonancia del plasmón superficial (Biacore) como se describe en BMC Cancer 2006 6:41. Los resultados se muestran en la tabla 6.

Tabla 5. Anticuerpos seleccionados. MixTIL y MixLIB son mezclas de las bibliotecas definidas en la tabla 2

Anticuerpo	Antígeno	Biblioteca usada para selección	Secuencia de nucleótidos/aminoácidos
EDE1	ED-B	scFVEC23	<p>CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAG CCTGGGCCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGA TACACCTTCAACCGCTACTATATGCACTGGGTGGACAG GCCCTGGACAAGGGTTGAGTGGATGGATGGATCAAC CCTAACAGTGGTGGCACAACATAATGCACAGAAGTTTCAG GGCAGGTTCAACATGACACAGGACACGTCCTCATCAGCACA GCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACG GCCGTGTATTTACTGTGCGAGAGATTCCGCCACAAAATTGT ACTAATGGTGTATGCCACCGGGGGAGTCAATGTCCACTAC TACGGTATGGACGCTCTGGGGCCAAAGGCAACCCTGGTCACC GTCTCTTTCAGTGGGGCGGTTCAAGCGGAGGTGGCTCT GCGGTGGCGGATCGCAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCC TCCGCGCCGGTCTCCTGGACAGTCAGTCACCATCTCC TGCACTGGAACCAGCAGTGTGTTGGTGGTTATAACTAT GTCTCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAAGCCCCAAA CTCATGATTTATGACGTCAATAAGCGGCCCTCAGGGGTC CCTGATCGCTTCTCTGCCCTCAAAGTCTGGCAACACGGCC TCCCTGACCGTCTCTGGGCTCCAGGCTGACGATGAGGCT GATTACTACTGCGCTTCATATGCAGGCACCTACAGTTAT GTCTTCGGAACCTGGGACCCAGCTCACCGTTTTAGGTGCG GCCGCAGGAGA [Seq ID 22]</p> <p>QVQLQESGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTGYMHWRQ APGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFGQGRVTMTRDTSIST AYMELSRRLRSDDTAVYYCARDSPQNCINGVCHRSSHVHY YGMDVWGQGLVTVSSGGGGGGGGGGSSALTPA SAAGSPGQSVTISCTGTSSDVGGINYVSWYQQHPGKAPK LMIYDVKRPSGVDFRFSASKSNTASLTVSGLQADDEA DYYCASYAGTYSYVFGTGTQLTVLGAHA [Seq ID 23]</p>

(continuación)

Anticuerpo	Antígeno	Biblioteca usada para selección	Secuencia de nucleótidos/aminoácidos
EDE3	ED-B	scFvEC23	<p>GAGGTGCAGCTGTTGCAGTCTGGGGCCGAGGTGAAGAAG CCTGGGCCCTCAGTGAAGGTCCTCGAAGGCTTCTTGGA TACACCTTCAACCGGCTACTATATGCACTGGGTGGACAG GCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAAC CCTAACAGTGGTGGCACAACATA TGCA CAGAAGTTTCAG GGCAGGTCACCATGACCCAGGGACACGTCCTCATCAGCACA GCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACG GCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATTCGCCACAAAAATTGT ACTAATGGTGTATGCCACCGGGGAGTCATGTCCACTAC TACGGTATGGACGTC TGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACC GTCTCTCAGTGGGGGGGTT CAGGGGAGGTGGCTCT GCGGTGGGGGATCGCAGTCTGCCCTGACTCAGCCCTGCC TCCGGGCCGGGTCTTGGACAGTCACTACCATCTCC TGCACTGGAAACCAGCAGTGTGGTGGTTATAAATAT GTCTCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAGCCCCCAA CTCA TGATTTATGACGTCAATAAGCGGCCCTCAGGGGTC CCTGATCGCTTCTTTGCCCTCAAAGTCTGGCAACACGGCC TCCC TGACCGTCTCTGGGCTCCAGGCTGACGATGAGGCT GATTACTACTGCGCTTCATATGCAGGCACCTACAGTTAT GTCTTCGGAACTGGGACCCAGCTCACCGTTTTAGGTGCG GCCGCA [seq ID. 24]</p> <p>EVQLLQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTGYMHWRQ APQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFGQGRVTMTRDTSIST AYMELSRLRSDDTAVYICARDSPQNCINGVCHRGSVHY YGMDVWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGSSQSALTPA SAAGCLGQSVTISCTGTSSDVGGYKYSWYQQHPGKAPK LMIYDVNKRPSGVPDRFFASKSGNTASLTVSGLQADDEA DYYCASAYAGTYSYVFGTGTQLTLVLGAAA [seq ID 25]</p>

(continuación)

Anticuerpo	Antígeno	Biblioteca usada para selección	Secuencia de nucleótidos/aminoácidos
EDE5	ED-B	scFvEC23	<p>GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAG CCTGGGCCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTTGGGA TACACCTTACCCGGCTACTATATGCACTGGGTGCGACAG GCCCCTGGACAAGGGCTTGAAGTGGATGGGATGGATCAAC CCTAACAGTGGTGGCACAACCTATGCACAGAAATTTTCCAG GGCAGGGTCAACATGACCCAGGGACACGTCCATCAGCACAA GCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGCACACAG GCCGTGATTAATGCTGTGAGAGGTTCCGCCACAAAATTGT ACTAATGGTGTATGCCACCGGGGGAGTCACTGTCCTACTAC TACGGTATGGACGTCTGGGGCCCAAGGACCAACGGTCAACC GTCTCCTCAGGTGGGGCGGTTTCCAGGGGAGGTGGCTCT GGCGTGGCGGATCGCAGTCTGCCCTGACTCAGCCTTGCC TCCGTGCTGGGTCTCCTGGACAGTCCGATCACCATCTCC TGCACTGGAACCAAGCAGTGTGTTGGAGTTATAACCTTT GTCCTCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAGCCCCCAA CTCATGATTTATGAGGTCAAGTAACTGGCCCTCAGGGGTT TGTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCC TCCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCT GATTATTAICTGCAGCTCATATACAAGCAGCAGCACCTCTC GAGGTGTTCCGGCGGAGGACCCAGCTCACCCGTTTTAGGT GCGGCCGCA [seq ID 26]</p> <p>EVQLVESGAEVKKPGASVKVSKKASGYFTGYMHWRQ APGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFGQGRVTMTRDTSIST AYMELSRLLRSDDTAVYYCVRGSPQNCNGVCHRGSVHVHY YGMVDVWGQTTVTVSSGGGGSGGGSGGGSSQSSALTPA SVSGSPGQSIITISCTGTSSDVGSYNIIVSWYQQHPGKAPK LMIYEVSNRPSGVCNRFSGSKSGNTASLTIISGLQAEDEA DYICSSYTSSTLEVFVGGTQLTVLGAAG [seq ID 27]</p>

(continuación)

Anticuerpo	Antígeno	Biblioteca usada para selección	Secuencia de nucleótidos/aminoácidos
EDB5	ED-B	mixTIL	<p>CAGGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGTGGCTTGGTC CAGCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGAGCCTCT GGATTCAACCCTCAGTAGCTATGCTATGCACTGGGTCCGC CAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGTCTCAACTATT AGTGGTGGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGGTG AAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAAATCCAAGAAC ACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGCTGAGAGCCGAGGAC ACGGCCGTATATTACTGTGCGAGACGGGGCGGGCTTTT GATATCTGGGCCAAAGGACCAAGTCAACCGTCTCCCTTA GGTGAGGCGGTTCAGGGCGGAGGTGGTCTGCGGGTGGC GGATCGCAGTCTGTGTGACCGCAGCCGCCCTCAGTGTCT GGGGCCCCAGGGCAGAGGTCAACATCTCCTGCACTGGG AGCAGTCCAAACATCGGGCGGGGTATGATGTACACTGG TACCAGAGCTTCCAGGAACAGCCCCCAAATCCTCATT TATGGTAAACAGCAATCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGA TTCTCTGGCTCCAAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCC ATCACTGGCTCCAGGCTGAGGATGAGGCTGATTATTAT TGCTCCAGTCCATGATCAGCAGCCTGAGTGGTCAATGTG GTATTCGGCGGAGGACCAAGGTGACCGTCTAGGTGGC GCCGCA [seq ID 28] QEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSSYAMHWVR QAPKGLEWVSTISGGGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLR AEDTAVYYCARRGRAFDIWGQGT VVTVSL GGGGSGGGSGGGGQS VLTQPPSVSGAPGQRVTISCTG SSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSPGVPDR FSGSKGTSASLAITGLQAEDEADYICSSPMISL SGHV VFGGGTKVTVLGAAA [seq ID 29]</p>

(continuación)

Anticuerpo	Antígeno	Biblioteca usada para selección	Secuencia de nucleótidos/aminoácidos
ME1	MUC1	scFVEC23	<p>CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGGGGTGAGGTGAAGAAG CCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCTGCAAGGCTTCTTGGGA TACACCTTCAACCGCTACTATATGCACTGGGTGGACAG GCCCCGGAAGAAGGCTTGGTGGATGGGATGGATCAAC CCTAACAGTGGTGGCAAAACTATGCACAGAAAGTTCAG GGCAGGTCACCATGACCAGGGACACGTCATTTGGCACA GCTACATGGAGTTGAGCAGCCTGACATCTGACGACACG GCCATGTATTATTGTGGGAGAAACAAATGTTGCTATGGGT TATACTATGGACGCTGGGGCCAAAGGACAAATGGTCACC GTCTCTCAGTGGAGCGGTTACAGGGGAGGTGGCTCT GGCGGTGGCGGATCGCAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCC TCCCGTCCGGGTCTCCTGGACAGTCAGTCACCATCTCC TGCACTGGAAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTAT GTCTCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAAACCCCAAA CTCTTGATTTATGAGGTGAGTGTAGTCGGCCCTCAGGGGTT TCTAAATCGCTTCTTGGCTCCAGCCTGGCAACACGGCC TCCCTGACCATCTTGGTCTCCAGGCTGAGGACGAGGCT GATTATTACTGCATCTCATATACAAGCAGCAACTTGG GTGTTCCGGGGAGGACCCAGCTCACCGTTTATAGGTGCG GCCGCA [Seq ID 30]</p> <p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKASGYTFYGMHWVRQ APGQGLEWMGWINPNSSGTNYAQKFGQGRVITMTRDTSIGT VYMESSLTSDDTAMYICARNNVAMGYTMDVWQGTMVT VSSGGGSGGGGSGGSSQSAALTPASASGSPGQSVTIS CTGTSDDVGGYNYVSWYQQHPGKTPKLLIYEVSSRPSGV SNRFGSKPGNTASLTIISGLQAEDEADYICISYTSNTW VFGGTQLITVLGAAA [Seq ID 31]</p>

(continuación)

Anticuerpo	Antígeno	Biblioteca usada para selección	Secuencia de nucleótidos/aminoácidos
ME2	MUC1	scFvEC23	<p>GAGGTGCAGCIGTIGCAGTCTGGGGGGGAGGTGAAGAAG CCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGA TACACCTTCAACCGGCTACTATATGCACTGGGTGCGACAG GCCCCTGGAACAAGGCTTGAGTGGATGGATGGATCAAC CCTAACAGTGGTGGCAAAACTATGCACAGAAGTTTCAG GGCAGAGTCAACCATGACCAAGGAACCTCCATAAGCACAA GCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACG GCCGTGATTTACTGTGCGGGTCAGGAGGCACATGGGGAC GGTATGGACGTCTGGGGCCAAAGGACCAACGGTCAACCGTC TCCTCGGTGGAGCGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCG CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCCTCCGGTCCGGGTCT CCTGGACAGTCGATCACCATCTCCTGCACTGGAACCCAGC GGTGACGTTGGTGGTTATAACTATGTCTCCTGGTACCAA CAGCACCCAGGCAAGCCCAAACTCATGATTTATGAA GTCAGTAATCGGCCCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCT GGTCCAAAGTCTGGCAGCACGGCCCTCCCTGACCATCTCT GGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTTACTACTGCGTC TCATATACAAGCAGAAACACTTATGTCTTTCGGATCCGGG ACCCAGCTCACCGTTTTTAGGTGCGGGCCCGGA [Seq ID 32]</p> <p>EVQLLQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTGYMHWRQ APGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFGGRVTMTRNTSIST AYMELSSLRSEDTAVYYCAGQEAHGDGMDVWGQGTIVTV SSVERGGSGGGSQSALTOPASASGSPQSITISCTGTS GDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIEVSNRPSGVSNRFS GSKSGSTASLTISGLQAEDEADYYCVSYTSRNTYVFGSG TQLTVLGAAA [Seq ID 33]</p>

Anticuerpo	Antígeno	Biblioteca usada para selección	Secuencia de nucleótidos/aminoácidos
MB5	MUC1	mixTIL	<p>GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAG CCGGGCCCTCAGTGAAGGTTCTCTGCAAGGTTCTGGA TACACTTCAACCGCTCCTATAATGCACCTGGGTGCGACAG GCCCTGGACAAGGCTTGAGTGGATGGGATGGTTCAAC CCTAATAGTGGTGGCACAAAATAATGCACAGAAAGTTTCAG GGCAGGTCACCATGACCCGGGACACGTTCCACCAGCACAC GGCTATATGGAGCTGAGCAGGCTGACATCTGACGACGCG NCCGTGTAATTTGTGGAGAGATCGGGCTCTGCTATG GCGTCTGGGCCAAAGCACCCCTGGTCAACCGTCTCCTCA GGTGGAGCGGTTCAAGGGGAGGTGGCTCTGGCGGNGGC GGATCGCAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGCGTCC GGGTCTCCTGGACAGTCACTCACCATCTCCTGCACCTGA ACCAGAGTACGTTGGTGGTTAATACTATGTCTCCTGG TACCAACAGCACCCAGGCAAGCCCAAACTCATGATT TATGACGTCAATAAGCGGCCCTCAGGGTCCCCTGATCGC TTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACC GTCTCTGGCTCCAGGCTGAGGATGAGGCTGATTATTAC TGCAGTCAATATGCAGGTAGTAACTTTCTCTATTCGGC GGAGGACCCAGCTCACCGTTTATTAGGTGGCGCCGCA [Seq ID 2]</p> <p>EVQLVESGAEVKPKGASVKVSKASGYFTTASYMHWVRQ APGQGLEWMGFNPNSSGGTNYAQKFGQGRVTMTGDTSTST GYMELSRLLTSDDATVYICARDRASAMGVWQGLLVTVSS GGGSGGGSGGGGQSALTPASASGSPGQSVTISCTG TSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIDVVKRPSGVPDR FSGSKSGNTASLTVSGLQAEDEADYYCSSYAGSNTFLFG GGTQLTIVLGAAA [Seq ID 3]</p>

(continuación)

Anticuerpo	Antígeno	Biblioteca usada para selección	Secuencia de nucleótidos/aminoácidos
MB 5 C'1	MUC1	biblioteca de maduración basada en don MB5, según se describe en el Ejemplo 3	<p> A TGGAGGAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGAGCTGAGGTG AAGAAGCCCGGGCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCT TCTGGATACACCTTCACCGCTCCTATATATGCACCTGGGTG CGACAGGCCCTGGACAAGGCTTGAAGTGGATGGATGG TTCAACCTAA TAGTGGTGGCA CAAACTATGCA CAGAAG TTTCAGGGCAGGTCACCA TGACCGGGGACACGTC CACC AGCACAGGCTATATGGAGCTGAGCAGGCTGACATCTGAC GACGGGCGGTGTTATTTGTGGAGAGATCGGGCCCTCT GCTATGGGCGTCTGGGCCAAGGAACCTGGTCAACGTC TCCTCAGGTGGAGGGGTT CAGGGGAGGTGGCTCTGGC GGTGGGGATCCCAGTCTGCCCTGACTCAGCCCTGCCCTCC GTGTCTGGTCTCCTGGACAGTCGATCACCATCTCCTGC ACTGGAAC CAGCAGTGA CGTTGGTGGTTATAACTATGTC TCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAGCCCCCAAACCTC ATGATTTATGATGTGAGTCA TCGGCCCTCAGGGATTTCT AATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACCGCCCTCC CTGACCATCTCTAGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGAT TATTACTGCAGCTCATA TACAAGCAGTAACACTTTTCATC TTCGGAACTGGGACCCAGCTCACCGTTTTTAGGTGGGGCC GC [Seq ID 4] </p> <p> MEEVQLQESGAEVKKPGASVKVCKASGYTFRTASYMHWV RQAPGGGLEWNGWFNPNSGGNTYAQKFGQGRVTMTGDTST STGYMELSRLLTSDDAVYYCARDRASAMGVWGQGLVTV SSGGGGGGGGGGGSSALTPASVSGSPGQSITISC TGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMICYDVSHPSPGIS NRFSGSKSGNTASLTISRLLQAEDEADYYCSSLTSSNTFI FGTGTQLTLVLGAA [Seq ID 5] </p>

(continuación)

Anticuerpo	Antígeno	Biblioteca usada para selección	Secuencia de nucleótidos/aminoácidos
MB5/ C'3	MUC1	biblioteca de maduración basada en clon MB5, según se descrito en el Ejemplo 3	<p>ATGGAGCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTG AAGAAGCCCGGGCCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCC TCTGGATAACACTTCACCGCCCTCCTATATGCACTGGGTG CGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGTGATGGATGGATGG TTCAAACCCTAAATAGTGGTGGCACMAACTATGCACAGAAG TTTCAGGGCAGGGTACCAATGACCCGGGACACGGTCCACC AGCACAGGCTAATAGGAGCTGAGCAGGCTGACATCTGAC GACGGCCCGTGTATTAATGTGCGAGAGATCGGGCCCTCT GCTATGGGGCTCTGGGGCCAAGGCACCCTGGTCAACCGTC TCCTCAGGTGGAGGGGGTTCAGGGGGAGGGGCTCTGGC GGTGGGGATCGCAGTCTGCCCTGACTCAGCCCTGCCCTCC GTGCTGGGTCTCCTGGACAGTCCGATCACCAATCTCCTGC ACTGGAACCAAGCAGTGAAGTGGTGGTTATAACTAATGTC TCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAAAGCCCCCAAACTC ATGATTTATGATGTCACTAATCGGCCCTTCAGGGGTTTCT AGTCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACAACGGCCCTCC CTGACCATCTCTGGACTCCAGACTGAGGACGAGGCTGAT TATTACTGCAACTCATTTACAAGCAGCAACACTTATGTC TTCGGAACCTGGGACCCAGCTCACCCGTTTTAGGTGCGGCC GC [Seq ID 6]</p> <p>MEQVLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFPTASYMHWV RQAPGGGLEMMGFNPNSSGGTNYAQKFKQGRVTMTGDTST STGYMELSRLLTSDDAAYVYCARDRA SAMGWGGTLLVTV SSGGGSGGGGSGGGSSQSALTPFASVSGSPGQSITISC TGTSSDVGGINVYSWYQQHPGKAPKLMYDVTNRRPSGVS SRFSGSKSGNTASLTI SGLQTEDEADYCNSTSSNTYV FGTGTQLTVLGAA [Seq ID 7]</p>

(continuación)

Anticuerpo	Antígeno	Biblioteca usada para selección	Secuencia de nucleótidos/aminoácidos
CB3	CEA	mixTIL	<p>GAGGTGCAGCTGTTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAG CCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCCTCTGCAAGGCTTCTTGA TACACCTTCAACCGGCTCCTATATTCACTGGGTGCCACAG GCCCTGGACAAAGGCTTGGATGGATGGGACGGATGAAC CCTAACAGTGGTGACACAAACTATGCACAGAAGTTTCAG GGCCGGGTCAACCATGACCAGGGACACGTCCTCATCAGCACA GCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACCG GCCGTGTACTACTGTGCGACGGAGGGAGTGGCTTTACGT CCCGGTGCCTTTTGATTTCTGGGGCCAAGGGACCCAGCTC ACCGTTTTAGGTGCGGCCGCA [seq ID 34]</p> <p>EVQLLQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTGSIYIHWRQ APGQGLEWMGRMNPNSGDTNYAQKFKQGRVTMTRDTSIST AYMELSRRLRSDDDTAVYYCATEGVALRPGAFDFWGQGTQL TVLGAAA [Seq ID 35]</p>

(continuación)

Anticuerpo	Antígeno	Biblioteca usada para selección	Secuencia de nucleótidos/aminoácidos
CB37	CEA	mixTIL	<p>GAGGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTG3AGGAGGCTTGATC CAGCCGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTTGTGTAGCCTCT GAGTTCAACGTCAGAAGCAACTACATGAGCTGGGTCCGC CAGGCTCCAGGAAGGGCTGGAGTGGTCTCAGTTATG TATGACGGGGTAGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAG GGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACTTAAGAACACG GTGTATCTTCAAAATGAACAGCTGAGAGCCGAGGACACG GCCGTCTATTACTGTGCGAGAGCGGATTTGGGTTGCCT ACAATCGCGTCTTGGGAGATCTGGGCCAAGGGACAATG GTCACCGTCTTTCAGGTGGAGCGGTTCTGGCGGAGGT GGCCTGGCGGTGGCGGATCGTCTTATGTGCTGACTCAG CCACCTCGGTGTGAGTGGCCCCAGGAAAGACGGCCACG ATTACCTGTGCGGAAACAAATAGGAAAGTAAACAGTGTA TACTGGTACCAGCAGAAACAGGCCCTGGCCCTGTACTG GTCGTCTATGATGATAGAGACCGGCCCTCAGGGATCCCT GAGCGATTCTTGCTCCAAATCCGGGAACACGGCCACC CTGACCATCAGCAGGTCGAGGCCGGGATGAGGCCGAC TATTCTTGTGAGGTGGGATCCTAGTAGTATCACCTC TATGTCTTCCGAACTGGGACCCAGCTCACCGTTTAGGT GCGGCCGCA [seq ID 8]</p> <p>EEVQLVQSGGGLIQPGLSLRLSCVASEFNVRSNYMSWVR QAPGKLEWVSVMYDGGSTYYADSVKGRFTISRDNISKNT VYLQMNSLRRAEDTAVYFCARGGLGLPTIASWEIWGQGT VTVSSGGGGGGGGSSSYVLTQPPSVSVAPGKTAT ITCAGNNIGSNVYVYQKPLAPLVVYDDDRDRPSPGIP ERFSGSKSGNTATLTISRVEAGDEADYSCQVNDPSSDHL YVFGTGTQLTLVLGAAA [seq ID 9]</p>
CB40	CEA	mixTIL	=CB37

(continuación)

Anticuerpo	Antígeno	Biblioteca usada para selección	Secuencia de nucleótidos/aminoácidos
CB41	CEA	mixTIL	<p>GAGGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTC CAGCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCCCTGTGCAGCCTCT GGATTCACCGTCAGTAGCAACTACATGAGCTGGGTCCGC CAGGCTCCAGGAAAGGGCTGGAGTGGTCTCAGTTGTT TATAGCGGTGGTAGCATACTACGCAGACTCCGTGAAG GGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAAATCCAAGAACACG CTGTATCTTCAAA TGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACG GCTGTGTA TTA CTGTGCGAGAGACCTAGGGGGACTACA GTTTGGCGCTACTACGGTATGGACGTTCTGGGCCAAAGG ACCACGGTCAACCGTCTCCTCAGGTGGAGGCGGTTCAAGC GGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGTCCCTATGTGCTG ACTCAGCCACCTCGGTGTCAAGTGGCCCCAGGAAAGACG GCCACGATTA CCTGTGCGGGAACAATA TAGGAAGTAA AGTGATACTGGTACCAGCAGAAACCAGGCTGGCCCCCT GTACTGGTCTGTATGATGATAGAGACCGGCCCTCAGGG ATCCCTGGGCGATTCTCTGGCTCCAAATCCGGGAACACG GCCACCTGACCATCAGCAGGTCGAGGCCCGGGGATGAG GCCGACTATTCTTGTTCAGGTGTGGGATCCTAGTAGTGAT CACCTCTATGTCTTCGGAAC TGGGACCCAGCTCACCGTT TTAGGTGGGCCCGCA [Seq ID 36]</p> <p>EEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVR QAPKGLWEVSVVYSGGTYADSVKGRFTISRDN SKNT LYLQMNSLR AEDTAVYCARDLGGTTVWRYGMDVWGQG TITVTVSSGGGGGGGGSSYVLTQPPSVSVAPGKT ATITCAGNNIGSNSVYWYQKPG LAPVLVYVYD DRRPSG IPGRFSGSKSGNTA LTI SRVEAGDEADYSCQVWD PPSD HLYVFGTGTQLTVLGAAA [Seq ID 37]</p>

(continuación)

Anticuerpo	Antígeno	Biblioteca usada para selección	Secuencia de nucleótidos/aminoácidos
CB53	CEA	mixTIL	<p>GAGGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGACTTGTATC CAGCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT GGGTTTACCGTCCGTAGCAACTACATGAGCTGGGTCCGC CAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAATGGGTCTCAGTTATT TATAGCGGTGGTAGTACATACTACGCAGACTCCCGTGAAG GGCCGATTCAACCTCCAGAGACAATCCAAGAACACCG CTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACG GCCGTGTTACTGTGTGAGAGATAGGGGTGATGCTTTT GATACTGGGCCAAGGACAATGGTCAACCGTCTTTCA GGTGAGGCGTTCCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCCGGTGGC GGATCGTCTATGCGTGAICTAGCCACCCCTCGGTGTCA GTGGCCCCAGGAAGACGGCCACGATTACCTGTGCCGGA AACAAATATAGGAAGTAAACAGTGTATACTGGTACCAGCAG AAACCAGGCTGGCCCTGTACTGGTCTGTATGATGAT</p>
CB60	CEA	mixTIL	<p>AGCGACCGGCCCTCAGGGATGTCIGAGCGATTCTCTGGC TCCAAATCCGGGAACACGGCCACCCCTGACCATCAGCAGG GTCAGGCCCGGGGATGAGGCCGACTATCTTGTCCAGGTG TGGATCCTAGTAGTAGTATCACCCTCTATGTCTTCGGAAT GGGACCCAGCTCACCGTTTTAGGTGCGGCCGCA [Seq ID 38]</p> <p>EEVQLVESGGDLIQPGGSLRLSCAASGFTVGSNYMSWVR QAPGKGLEWVSVIYSGGSTYYADSVKGRFTISRDNISKNT LYLQMNSLRRAEDTAVYICVDRDRGDAFDIWGQGTMTVSS GGVPGGGGGGGSSYALTPPPSVSVAPGKTAITCAG NNIGNSVYVYQQKPKGLAPVLVYDDSDRPSGMSERFSG SKSGNTATLTI SRVEAGDEADYSCQVWDPPSSDHLVYVFGT GTQLTLVLGAAA [Seq ID 39]</p> <p>=CB41</p>

(continuación)

Anticuerpo	Antígeno	Biblioteca usada para selección	Secuencia de nucleótidos/aminoácidos
CB37/ 3B	CEA	Biblioteca de maduración basada en el clon CB37, descrito en el ejemplo 3.	<p>ATGAGAGGTCAGCTGGTGACAGTCTGGAGGAGGCTTG ATCAGCCGGGGGTCCTGAGACTCTCTTGTGTAGCC TCTGAGTTCAACGTCAGAAGCAACTACATGAGCTGGGTC CGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGGTTTCAGTT ATGATGACGGCGGTAGTACATACTACGCAGACTCCGTG AAGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATCTAAGAAC ACGGTGTATCTTCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC ACGGCCGTCATTA TACTGTGCGAGAGCGGATGGGGTTG CCTACAATCGGCCCTTGGGAGATCTGGGGCCAAGGGACA ATGGTCAACCGTCTCTTCAAGGTGGAGCGGTTTCAGGCGGA GGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGTCCFATGTGTGACT CAGCCACCCCTCGGTGTCA GTGGCCCCAGGAAAGACGGCC ACGATTACCTGTGCGGAAACAATATAGGAAGTAA CAGT GTATACTGGTACCACA AAAACCAAGCCCTGGCCCCCTGTA CTGGTCGTCTATGATGATAGAGACCGGCCCTCAGGGATC CATGAGCGATTCTCTGGCTCCAAAATCCGGGAACACGGCC ACCCTGACCATCAGCAGGGTCGAGGCCGGGGATGAGGCC GACTATTCTTGTTCAGGTGTTGGATCCTAGTAGTATCAC CTCTATGTCTTCGGAAC TGGGACCCAGCTCACCGTTTTTA GGTGGCGCCGC [Seq ID 10]</p> <p>MEEVQLVQSGGGLI QPGLSLRLSCLVSEFNVRSNYMSWV RQAPGKGLEWVSVMYDGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKN TVYLMNLSLRAEDTAVYFCARGGLGLPTIAPWEI WGGGT MVTVSSGGGGSGGGSSYVLTQPPSVSVAPGKTA TITCAGNNIGNSVYWYQKPLAPVLVYD DRRDRPSGI HERFSGSKSGNTATLTI SRVEAGDEADYSCQVWDPSSDH LYVFGTGTQLTVLGAA [Seq ID 11]</p>

(continuación)

Anticuerpo	Antígeno	Biblioteca usada para selección	Secuencia de nucleótidos/aminoácidos
CB37/9C	CEA	Biblioteca de maduración basada en el clon CB37, descrito en el ejemplo 3.	<p>ATGAGGAGGTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGGAGGC'TTG ATCCAGCCGGGGGTCCTGAGACTCTCTTGTGTAGCC TCTGAGTTCAACGTCAAGCAACTACATGAGCTGGGTC CGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGGTTCTCAGTT ATGTATGACGGCGGTAGTACATACTACGCAGACTCCGTTG AAGGGCCGATTACCCATCTCCAGAGACAATTTAAGAAC ACGGTGTATCTTCAAA TGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC</p> <p>ACGGCCGTCTATTACTGTGCGAGAGCGGATTTGGGGTTG CCTACAAATCGCGTCTTGGGAGATCTGGGGCCCAAGGGACA ATGGTCAACCGTCTCTTCAAGTGGAGCGGTTTCAGGCGGA GGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGTCTATGTGTGACT CAGCCACCCTCGGTGTAGTGGCCCCAGGAAAGACGGCC ACGATTACCTGTGGGAAACAATATAGGAAAGTAAACAGT GTATACTGGTACCAGCAAGAAACAGGCTGGCCCTGTGA CTGGTCGTCTATGATGATAGAGACCGGCCCTCAGGGCTC CCCGGCGATTCTCTGGCTCCAATCCGGGAACACGGCC ACCCTGACCATCAGCAGGGTCGAGGCCGGGGATGAGGCC .GACTATTCTTGTTCAGGTGTGGGATCCTAGTAGTATCAC CTCTATGTCTTCGGAACTGGGACCCAGCTCACCCGTTTA GGTGGCGCCG [seq ID 12]</p> <p>MEEVQLVQSGGGLIQPGSLRLSCVASEFNRSNYSWV RQAPGKLEWVSVMYDGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKN TVYLMNSLRAEDTAVYYCARGGLGLPTIASWEIWGQGT MVTVSSGGGGGGGGSSSYVLTQPPSVSVAPGKTA TITCAGNNIGSNVYVYQKPLAPLVVYDDDRDRPSGL PGRFSGSKGNTATLTISRVEAGDEADYSQVWDPSSDH LYVFGTGTQLTVLGAA [seq ID 13]</p>

(continuación)

Anticuerpo	Antígeno	Biblioteca usada para selección	Secuencia de nucleótidos/aminoácidos
anti-SP2	SP2	scFV _{EC23}	<p>ATGGAGGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGCCTTG GTACAGCCTGGGGGTCCCTGAGAAATCTCTTGTGTAGGC TCTGGATTCACTTCCGACAGCATGACATGAGCTGGGTC CGCCAGGCTCCTGGGAAGGGCTGGAGTGGGTCCGAACT ATAAGTGAAGTGTGATAACACATTTTACGCAGACTCC GTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATCCCAAG AACACGGCTGTATCTGCAGATGAACACCCCTGAAAAGCCGAC GACACGGCCGTAATTTACTGTGCGAAGAAAATATATAGAA CCAAGTGTACTCCCGATTTGACTACTGGGGCCAGAGAAACC CTGGTCAACCGTCTCCTCAGGTGGAGCGGGTTCAGGGCGGA GGTGGCTCTGGCGGTGGGGATCCGGATGTTGTGATGACT CAGTCTCCACCTCTCTGTCCGTACCCCTGGACAGCCG GCCTCCATCTCTGCAAGTCTAGTCAGAGCCTCCTGTCAT AGTGATGGAAAGACCTATTTGTATTTGGTACCTGCAGAAG CCAGGCCAGTCTCCACAGCTCTGATCTATGAAGTTTCC AACCGGTTCTCTGGAGTGCCAGATAGGTTCAAGTGGCAGC GGTCAAGGACAGATTTCAACACTGAAAATCAGCCCGGTG GAGCTGAGGATGTTGGGTTTATTA CTGCATGCAAAAGT ATACAGCTCCCGATCACCTTCGGCCAAGGACACGACTG GAGATTAAACGTGCGGCCGC [Seq ID 40]</p> <p>MEEVQLVESGGALVQPGGSLRISCVGSGFTFRQHDMSWV RQAPGKGLEWVATISGSADNTFYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNITLKADDTAVYCAKKEYIEPGATRFDYWGQRT LVTVSSGGGGGGGGGGSDVVMVMTQSPPLSLSVTPGPQ ASISCKSSQSLLLHSDGKTYLYWYLQKPGQSPQLLIYEVS NRFSGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQS IQLPITFGQGRLEIKRAA [Seq ID 41]</p> <p>GAGCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCGGAGGTGAAG</p>
mix7	MCF7	mixLIB	

(continuación)

Anticuerpo	Antígeno	Biblioteca usada para selección	Secuencia de nucleótidos/aminoácidos
		células	<p>AAGCCTGGGGCCTCAGTGAGAGTTTCCTGCCAGGCATCT GGATAACATTCAGCAGGTACCAATATGCACCTGGGTGCCA CAGGCCCTGGACAAGGCTTGAGTGGATGGGAGTGATC GACCCCAATAGTGGTAGAGTAAGTTACTCACAGAAAGTTC CAGGACAGAGTTACCATGACCAGGGACACGTCACGAGC ACAGTATACATGGAGCTGAACAGCCCCGAGATCTGAGGAC ACGGCCGTTTATTATTGTGCGAGAGATCGAGGATATTGT AATGGTGGCAGGTGCTTTATGGATGCATTTGACTACTGG GGCCAGGGACAATGGTCAACCGTCTCTTCAAGGTGGAGGC GGTTTAGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGTCC TATGTGCTGACTCACCCACCCCTCATTTGCTGGGGCCCCA GGCAGAGCATCACCATTCCTGCACTGGGAGCAGTTCC AACATCGGGCAGGTTTTCATATACACTGGTACCAGCAG TTTCCAAAACAGCCCCCAACTCCTTATCTATGGTAGT AGTAATCGACCCCTCAGGGTCCCCTGACCGCTTCTCTGGC TCCAGGTCCTGGTCTCCTCAGGCTCCCCTGGCCATCACTGGG CTCCAGGCAGACGATGAGGCTGATTATTACTGTGTGGGA TGGGATGGCAGCCTGAGTGGTTATGTCTTCGGAACTGGG ACCCAGCTCACCGTTTATAGGTGCGGCCGCA [Seq ID 16]</p> <p>EQVQLVQSGAEVKKPGASVRVSCQASGYTFSRYHMHWVR QAPGQGLEWMGVIDPNSGRVSYSQKFDQDRVTMTRDTSTS TVYMEI LNSPRSEDTAVYYCARDRGYCNCGRCFMDAFDYW GQGTMTVTVSSGGGLGGGGSSSYVLTHTPPSLSGAP GQSIITISCTGSSSNI GAGFHIHWYQQFPKTA PKLLIYGS SNRPSGV PDRFSGSRSGSSLAITGLQADDEADYYCVG WDGSLSGYVFGTGTQLTVLGAAA [Seq ID 17]</p>

(continuación)

Anticuerpo	Antígeno	Biblioteca usada para selección	Secuencia de nucleótidos/aminoácidos
mix 8	células MCF7	mixLIB	<p>GAGCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGCGGTGGTC CAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT GGATTGAGCTTCAAGTAACTATGTTATGCACTGGGTCCGC CAGGCTCCAGGCAAGGGCTGGAGTGGTGGCAGTTATA TCACATGATGGAAGCAATAAATACTACGCAGACTCCGTTG AAGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATCCAPAGAAC ACGCTATATCTGCAAA TGA AAGCCCTGAGACCTGAGGAC ACGGCTGTGTATTA CTGTGGAGAA GTAGTGGCTGGTAC CTTCTCTTTGATGCTTTTGATAI CTGGGGCCAAGGGACA ATGGTCACCGTCTCTT CAGGTGGAGCGGTT CAGGGCGGA GGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGGACATCCAGATGACC CAGTCTCCAGACTCCCTGCCCTGTGTCTCTGGGCGGAGG GCCACCATCAACTGCAGTCCAGCCAGAGTGTTTTATAC AGTCCCAACAATAAGAACTACTTAGCTTGGTACCAGCAG AAACCAGGACAGCCCTCTAAGCTGTCTATTACTGGGCA TCTACCCGGGAA TCCGGTGTCCCTGACC GGATTCAGTGGC AGCGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGC CTGCAGGCTGAAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTGCAACAA TATTATAGGATTCGGTGGACGTTCCGGCCAAGGGACGGAAG GTGGAATCAAAACGTGGCGGCGCA [Seq ID 42]</p> <p>EQVQLVQSGGGVVQPGRSLRLS CAASGF SFSNYVMHWVR</p> <p>QAFGKGLEWVAVISHDGSNKYYADSVKGRFTISRDNISKN TLYLQMKSLRPEDTAVYYCARSSGWYLLFDADFIDWGQGT MVTVSSGGGGGGGGGGSDIQMTQSPDLSLPVSLGER ATINCRSSQSVLYSSNNKVIYAWYQQKPGQPPKLLIYWA STRESGVPDFRFGSGSGTDFLTITSSLQAEDEVAVYYCQQ YYRIPWTFGQGTKEIKRAAA [Seq ID 43]</p>

(continuación)

Anticuerpo	Antígeno	Biblioteca usada para selección	Secuencia de nucleótidos/aminoácidos
mix11	celulas MCF7	mixLIB	<p>GAGGAGGTGCAGCTGTTCAGATCTGGGGGAGGTGTGGTAA CGGCCTGGGGGTCCTGAGACTCTCCTGTGCAAGCCTCT GGATTCACTTTGATGATTAAGCATGACCTGGTCCGCGC CAGGCTCCAGGAAAGGGCTGGAGTGGTCTCAGCTATT AGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTTG AAGGGCCGGTTCGCCATCTCCAGAGACAAATCCAAAGAAC ACGCTGTATCTGCAAAAGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC ACGGCCGTATATTACTGTGGAAATCTCGCTACTATGAT AGTAGTGGTTATTACTACACCGTGGACCTGATGCTTTT GATATCTGGGCCCAGGGGCAATGGTCAACCGTCTCTTCA GGTGGAGGCGGTGGAGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCG TCTTCTGAGCTGACTCAACCACCCTCAGTGTCCGTGTC CCAGGACAGACAGCCATCATCACCTGCTCTGGAGATAAA TTGGGGGATAAATAATGCTTCCCTGGTATCAGCACAGGCCA GGCCAGTCGCTGTCTTGGTCACTATCAGGATCCAGG CGGCCCTCAGACATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAAAC TCTGGGAACACAGCCACTCTGACCATCACCGAGGCCACAG GCTTTGGATGAGGCTGACTATTATTGTCAGGCCCTGGGCC GGCAGATCTGTGGTCTTCGGCGGGGGACCCAGCTCACCC GTTTTAGGTGCGGCCGCA [Seq ID 44]</p> <p>EEVQLLQSGGQVWRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMWVR QAPGKLEWVSAISGSGGTYADSVKGRFAISRDN SKN TLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKSRYYDSGGYYTVRPFDAF DIWGQGAMVTVSSGGGGGGGGSSSELVTPPSVSVS PGQTALITCSGDKLGDKYASWYQHRPGQSPVLIYQDSR RPSDI PERFSGNSGNTATLTITEAQAALDEADYYCQAWA GRSVFSGGGLTLVLGAAA [Seq ID 45]</p>

(continuación)

Anticuerpo	Antígeno	Biblioteca usada para selección	Secuencia de nucleótidos/aminoácidos
mix12	células MCF7	mixLIB	<p>GAGGAGGTGCAGCTGTTGCAGTCTGGGGCGGAGGTGAAG AAGCCTGGGGCCCTCAGTGAGAGTTTCCTGCCAGGCATCT GGATACACATTCAGCAGGTACCAATATGCACCTGGGTGCGA CAGCCCTTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGTGATC GACCCCAATAGTGGTAGAGTAAGTTACTCACAGAAAGTTC CAGGACAGAGTCACCATGACCAGGGACACGTTACCGAGC ACAGTATACATGGAGCTGAACAGCCTGAGATCTGAGGAC ACGGCCGTTTATTATTGTGGAGAGATCGAGGATATTGT AATGGTGGCAGGTGCTTTATGGATGCAATTGACTACTGG GGCCAGGGGACCAACGGTCAACCGTCTCCTCAGGTGGAGGC GGTTCAGGGCGGAGGTGGCCCTGGCGGTGGCGGATCGTCC TATGTGCTGACTCAGCCACCCCTCAGCGTCTGGGGCCCCC GGACAGAGGGTCACCATCTCTTGTCTGGAAGCAACTCC AACATCGGACGTAATTGGGTATACTGGTACCAGCAACTC CCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATGTTTAGGAATAAT GAACGGTCTCAGGGTCCCTGACCCGATTTCTCTGGCTCC AAGACTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCCATCAGTGGGCTC CGGTCTGAGGATGAGGGTGATTACTACTGTGCATCATGG GATGACAGTCTGCATGCTTGGGTGTTCCGGCGGGGGACC CAGCTCACCGTTTTAGGTGGCGGGCCCA [Seq ID 46]</p> <p>EEVQLLQSGAEVKKPGASVRVSQASGYTFSRVYHMHVVR QAPGGLEWMGVIDPNSGRVSYSQKFQDRVTMTTRDTFTS TVYMEINSLRSEDTAVYICARDRGYCNNGRCFMDAFDYW GQGTIVTVSSGGGGSGGGPPGGSSYVLTQPPPSASGAP GQRVTISCSGSNSNIGRNWVWYQQLPGTAPKLLMFRNN ERSSGVPDFRFSGSKTGTASLAIISGLRSEDEGDYICASW DDSLHAWVFGGGTQLTVLGAAA [Seq ID 47]</p>

(continuación)

Anticuerpo	Antígeno	Biblioteca usada para selección	Secuencia de nucleótidos/aminoácidos
mix17	células MCF7	mixLIB	<p>GAGCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTA CAGCTGGGGGTCCTGAGACTCTCTGTGAGCCTCT GGATTACACTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGTCCGC CAGGCTCCAGGAAAGGGCTGGAGTGGTCTCAGCTATT AGTGGTAGTGGTAGCACATACCGCAGACTCCGTG AAGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGAGAAATCCAGAAC ACGCTATATCTGCAATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGAC ACGGCTGTGTATTACTGTGGAGACAAACAAGATCCGT GCTTTGATATCTGGGGCCAAAGGACAA TGGTCAACCGTC TCTTCAGGTGGAGCGGTTTCAGGGGAGGTGGCTCTGGC GGTGGGGATCGGACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCC GCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGGAGATCACCATCACT TGCCGGGCAAGTCAGAGCACTAGTAGCGATTTAAATTGG TATCAGCAAAGACCAGGAAAGCCCTAAACTCCTGATC TCTGTTGCATCCACTTTTACAAGTGCCTCCATCAAGG TTCAGTGGCAGTGGTCTGGGACAGATTTTCAGTCTCACC ATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGACTTTGCAACTTACTTC TGTC AACAGAGTTACAGCACCCCGTACACTTTTGGCCAG GGGACCAAAGTGGATATCAAACGGTGGCCGCA [Seq ID 18]</p> <p>EQVQLVQSGGLVQPPGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVR QAPKGLEWVSAISGSGGTYADSVKGRFTISRENSKN TLYLQMNLSLRAEDTAVYYCARQTRVRAFDIWGQGTMTV SSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSALSASVGGRRVIT CRASQSTSSDLNWIYQQRP GKAPKLLISVASTLQSDVPSR FSGSGGTDFTSLTISSLPEDFATYFCQQSYSTPYTFGQ GTKVDIKRAA [Seq ID 19]</p>

(continuación)

Anticuerpo	Antígeno	Biblioteca usada para selección	Secuencia de nucleótidos/aminoácidos
mix23	células MCF7	mixLIB	<p>GAGGAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAAACTTGGTCT CAGCCTGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT GGATTCACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGC CAGGCTCCAGGAAAGGGCTGGAAATGGGTCTCAGCTATT AGTGCTAGTGGTGGCACCACATACTACGCAGATTCCGTG AAGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAAATCCAAAGAAC ACGCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAACTGAGGAC ACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGACAGCCGTGCATAC AGCTATGGTTACCTCTACGTCCTTGTACTACTGGGGCCAG GGCACCTGGTCAACCGTCTCCTCAGGTGGAGCGGTTCA GGGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGGGATCGCAGTCTGCC CTGACTCAGCCTGCCCTCCGTCTGGGTCTCCTGGACAG TCGATCACCATCTCCTGCACCTGGAACCCAGCAATGATGTT GGAGTTATAACCTTGTCTCCTGGTACCAACAACACCCCA GGCAAAGCCCCAAACTCCTGATTTATGAGGGCAGTAAG CGCCCTCAGGGATTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAG ICTGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAG GCTGAGGACGAGGCTGATTAATTAATGATGTCATATATACG AGCAGTGGCACTCCTTATGTCTTCGGAACCTGGGACCCAG CTCACCGTTTTAGGTGGCGCCGCA [Seq ID 48]</p> <p>EEVQLVESGGNLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR QAPGKGLEWVSAISASGGTTYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRTEDETA VYICARDSRAYSYGYLYVFDYWGQ GITLVTVSSGGGGGGGGGGSSALTPASVSGSPGQ SITISCTGTSNDVGSYNLVSWYQQHPGKAPKLLIYEGSK RPSGISNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCMSTY SSGTPYVFGTGTOLTFLGAAA [Seq ID 49]</p>

(continuación)

Anticuerpo	Antígeno	Biblioteca usada para selección	Secuencia de nucleótidos/aminoácidos
mix25	células MCF7	mixLIB	<p>GAGGAGGTGOAGCTGGTGGAGTCTGGGGCTGAGGTGAAG AAGCCTGGGGCCCTCAGTGAGAGTTCCTGCCAGGCATCT GGATAACAATTACACAGGTACCATAATACACTGGGTGCCGA CAGGCCCTGGACAGGGCTTGAGTGGATGGGAGTGATC GACCCCAATAGTGGTAGAATAAGTTACTCACAGAAAGTTC CAGGACAGAGTCAACCATGACCAGGGACACGTCACCGAGC ACAGTCTACATGGAGCTGAACAGCCTGAGATCTGAGGAC ACAGCCATTTAATACTGTGCGAGAGATCGAGGATATTGT AATGGTGGCAGGTGCTTTATGGATGCATTTGACTACTGG GGCCAGGGGACCAACGGTCAACCGTCTCCTCAGGTGGAGGC GGTTCAGCGGGAGGTGGCTCTGGGGTGGCGGATCGCAG TCTGTGTTGACGCGAGCCGCCCTCAGCGTCTGGGACCCCC GGCAGAGGGTCAACCATCGCTTGTTCGGAAGCAGCTCC AACATCGGAATTAATACTGTAAACTGTTACCAGCAGATC CCAGGAACGGCCCCCAAACTCCTCATATAATAATGAT CAGCGCCCTCAGGGTCCCTGACCGATCTCTGGCTCC AAGTCTGCCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGGCTC CAGGTTGACCGATGAGGCTGATTAATACTGCCAGTCCAT GACAGCACCTGGGTGGTTATGCTTCGGAACCTGGGACC CAGCTCACCGTTTTAGGTGGGCCCGCA [Seq ID 50]</p> <p>EEVQLVESGAEVKPKGASVRSVSCQASGYTFTRYHHWVR QAPGQGLEWMGVIDPNSGRISYSQKFDQDRVTMTRDTSIS TVYMEINSLRSEDTAIYYCARDRGYCNIGRRCFMDAFDYW GQGTITVTVSSGGGGGGGGGGSSVLTQPPSASGTP GQRVTIACSGSSSNIQINTVNWYQIIPGTAPKLLIYNND QRPSGVDFDRFSGSKSATSLAIITGLQVDDEADYYCQSY DSSLGGYVFGTGTQLTVLGAAA [Seq ID 51]</p>

(continuación)

Anticuerpo	Antígeno	Biblioteca usada para selección	Secuencia de nucleótidos/aminoácidos
MIX39	células MCF7	MIXLIB	<p>GAGGAGGTGCAGCTGTTGCCAGTCTGGGGGAGGGGTGGTTC CAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT GGATTCAGCTTCAGTAACTATGTTAIGCACTGGGTCCGC CAGGCTCCAGGCAAGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATA TCATATGATGGAAGCAATAAAATACACGCAGACTCCGGTG AAGGCCGATTCACCAATCCAGAGACAATCCAAAGAAC ACGCTATATCTGCAAAATGAAAGGCTGAGACCTGAGGAC ACGGTGTGTATTACTGTGCGAGAAAGTAGTGGCTGGTAC CTTCTTTTGTATGCTTTTGTATATCTGGGGCCAAAGGACA ATGGTCAACCGTCTCTTCAGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGA GGTGGCTTGGCGGTGGCGGATCGGATGTTGTGATGACA CAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCCGTGGCGGAGAGG GCCACCATCAACTGCGAGTCCAGCCAGAGTGTTTTATTTC AGTCCCAACAAATAAGAACTACTTAGCTTGGTACCAGCAG AAACCCAGGACAGCTCCCTAAGCTGCTCATTTACTGGGCA TCTACCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCCGATTCAGTGGC AGCGGTCTGAGACAGATTTCACTTCACCATCAGCAGC CTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTGTCAGCAA TATTATAGGATTCGGTGGACGTTCCGGCCAAAGGGACCCAAA GTGGATATCAAAACGTGCGGCCCGCA [Seq ID 20]</p> <p>EEVQLLQSGGQVVPGRSLRLSLSAASGFSFSNYVMHWVR QAPKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKSN TLYLQMKGLRPEPTAVYYCARSSGWYLLFDADFIDWGQGT MVTVSSGGGSGGGSGGGSDVVMVMTQSPDSLAVSLGER ATINCESSQSVLFSNNKNYLAWYQQKPKGPPKLLIYWA STRESGVPPDRFSGSGSEFTFLTISSLQAEDVAVYYCQQ YYRIPWTFGGQTKVDIKRAAA [Seq ID 21]</p>

(continuación)

Anticuerpo	Antígeno	Biblioteca usada para selección	Secuencia de nucleótidos/aminoácidos
B96/ 4F	celulas MCF7	scFv/B96	<p>ATGAGCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGAGGCTTG GTACAGCCTGGGGGTCCC TGAGACTCTCCTGTGCAGCC TCTGGATTCACTTTAGTACTTATGCCATGAGCTGGGTC CGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGTCTCAGTT ATTAGTGGTAGTGGTCATAACAACAACACTACGCCGACTCC GTGAAGGGCCGGTCAACATATCCAGAGACAATCCCAAG AACACACTATATCTGCAAAATCAACAGCCTGAGAGCCGAC GACACGGCCGTATTACTGTGCGGAGAGATGTGTTAGTC CTACAGAAATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAAGGACCACG GTCACCGTCTCTCAGGTGGAGGTGGTTCAAGCGGAGGT GGCTCTGGCGGTGGCGGATCGGATGTTGTGATGACCCAG TCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTC ACCATCACTTGTGCGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGGTGG TTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAAGGAAAGCCCTAAG CTCTGATCTACGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTC CCATCAAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTC ACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAAGATTTGCA ACTTACATCTGTCAACAGAGTTACAGTAGGCCCGCTCACT TTCGGCGGAGGACCAAGGTGGAATCAAAACGTGCGGGCC GCA [seq ID 52]</p> <p>MEQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWV RQAPGKGLEWVSIVSGSHTTNYADSVKGRVTI SRDNSK NTLYLQINSLRADDTA VYYCARDV LVLQNAFDI WGGGTT VTVSSGGGSGGGGGSDV VMTQSPSSLASV GDRV TITCRASQGISRWLAWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGV</p> <p>PSRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYICQQQSYRPLT FGGGTKVEIKRAAA [seq ID 53]</p>

(continuación)

Anticuerpo	Antígeno	Biblioteca usada para selección	Secuencia de nucleótidos/aminoácidos
B96/ 11L	células MCF7	scFvB96	<p>GAGCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGFTA CAGCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT GGATTCACCTTTAGTACTTATGCCATGAGCTGGTCCGC CAGGCTCAGGGAAAGGGCTGGAAGTGGTCTCAGTTATT AGTGGTAGTGGTCATACAACAATAACCGCGACTCCGGTG AAGGGCCCGTCACCATATCCAGAGACAATCCAAGAAC AACTATACTGCAAAATCAACAGCTGAGAGCCGACGAC ACGCCGTGTAATACTGTGCGAGAGATGTGTAGTCCTA CAGAAATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGACCCACGGTC ACCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGTTCAAGCGGAGGTGGC TCTGGGGTGGCGGATCGGATGTTGTGATGACCCAGTCT CCAATCCTCACTGTCTGCACTGTAGGAGACAGAGTCAAC ATCACTTGTGGGGGAGTCAGGGTATTAGCAGGTGGTTA GCCTGGTATCAACAGAAACCAGGAAAGCCCTAAGCTC CTGATCTACGCTGCATCCAGTTTGCAAAAGTGGGTCCCA TCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACT CTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACT TACATCTGTCAACAGAGTTACAGTAGGCCCGCTCACTTTC GGCGGAGGCCAACAGGTGGAAATCAAAACGTGCGGGCCCA [seq ID 14]</p> <p>EQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMSWVR QAPGKLEWVSVISGSGHTTNYADSVKGRVTSRDNSKN TLYLQINSLRADDTAVYYCARDVFLVQNAFDIWGQGTIV TVSSGGGSGGGGSDVMTQSPSSLSASVGDRTV ITCRASQGISRWLAWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVP SRFSGSGGTDFTLTITSSLPEDFATYICQQQSYSRPLTF GGGTKVEIKRAAA [Seq ID 15]</p>

Tabla 6. Valores cinéticos de anticuerpos de cadena simple originales y madurados por afinidad. El anticuerpo anti-CEA CB37 original no es estable en forma soluble. Los anticuerpos de cadena simple maduros tienen afinidad nanomolar K_a = constante de asociación, K_d = constante de disociación, $K_D = K_a/K_d$, SE = error estándar. Los datos se expresan en Molar.

scFv	k_a (+/-SE)	k_d (+/-SE)	K_D
MB5	2,13E+04 (2,45E+02)	8,55E-03(6,25E-05)	4,01E-07
MB5/C'1	1,53E+05(4,15E+02)	1,45E-03(1,29E-05)	9,46E-09
MB5/C'3	7,11E+04(4,33E+02)	1,64E-03(2,46E-05)	2,31E-08
CB37	-	-	-
CB37/3B	1,27E+05 (9,79E+02)	1,42E-04(3,23E-05)	3,66E-09
CB37/9C	1,00E+05 (5,75E+02)	4,65E-04(2,54E-05)	1,42E-09

5

Este estudio con Biacore proporcionó medidas cuantitativas de la cinética de unión y disociación de scFv-antígeno. La Tabla 6 informa los valores de cinética de los scFv originales maduros por afinidad. Los anticuerpos antiMUC1 maduros MB5/C'1 y MB5/C'3 tienen más de 42 veces y 17 veces mayor afinidad con el antígeno, en comparación con MB5, respectivamente. Los anticuerpos anti-CEA maduros CB37/3B y CB37/9C tienen afinidad nanomolar. Más aún, los anticuerpos maduros son más estables que el CB37 original, que no fue reactivo en forma soluble. Estos resultados indican que el vector pKM19 es una herramienta adecuada para la maduración de los anticuerpos scFv.

10

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> SIGMA-TAU Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.A TECHNOGEN S.C.p.A MINENKOVA, Olga PAVONI, Emiliano
- <120> Vector para la selección eficaz y/o maduración de un anticuerpo y usos del mismo
- <130> PCT 96530
- 10 <150> EP0 502 8501.4
- <151> 27-12-2005
- <160> 102
- 15 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 3770
- 20 <212> DNA
- <213> Escherichia coli

<400> 1

gccaatacgc	caaaccgcct	ctccccgcgc	gttgccgat	tcattaatgc	agctggcacg	60
acaggtttcc	cgactggaaa	gcgggcagtg	agcgcaacgc	aattaatgtg	agttagctca	120
ctcattaggc	accccaggct	ttacacttta	tgcttccggc	tcgtatgttg	tgtggaattg	180
tgagcggata	acaatttcac	acaagatcta	gctattctag	agattacgcc	aagccccgta	240
ttttaccctg	ttaatggaag	cttataaagg	aggaaatcct	catgaaatag	agcaccatcg	300
cactggcact	gttaccgta	ctgttcaccc	cggttaccaa	agcacgtacc	atggtttccc	360
ttgcggccgc	aggagactac	aaagacgacg	acgacaaaga	attcctgcct	caacctcctg	420
tcaatgctgg	cggcggctct	ggtggtggtt	ctggtggcgg	ctctgagggt	ggcggctctg	480
aggggtggcgg	ttctgagggt	ggcggctctg	aggggtggcgg	ttccgggtggc	ggctccggtt	540
ccgggtgattt	tgattatgaa	aaaatggcaa	acgctaataa	gggggctatg	accgaaaatg	600
ccgatgaaaa	cgcgctacag	tctgacgcta	aaggcaaaact	tgattctgtc	gctactgatt	660
acgggtgctgc	tatcgatggt	ttcattgggtg	acgtttccgg	ccttgctaata	ggtaatgggtg	720
ctactgggtga	ttttgctggc	tctaattccc	aaatggctca	agtcgggtgac	ggtgataatt	780
cacctttaat	gaataatttc	cgtcaatatt	taccttcttt	gcctcagtcg	gttgaatgtc	840
gcccttatgt	ctttggcgct	ggtaaaccat	atgaattttc	tattgattgt	gacaaaataa	900
acttattccg	tgggtgcttt	gcgtttcttt	tatatgttgc	cacctttatg	tatgtatttt	960
cgacgtttgc	taacatactg	cgtaataagg	agtccttaagg	atcctaatat	tgttctggat	1020
attaccagca	aggccgatag	tttgagtctt	tctactcagg	caagtgatgt	tattactaat	1080
caaagaagta	ttgcgacaac	ggttaatttg	cgtgatggac	agactctttt	actcgggtggc	1140
ctcactgatt	ataaaaacac	ttctcaggat	tctggcgtac	cgttcctgtc	taaaatccct	1200
ttaatcggcc	tcctgttttag	ctcccgtctt	gattcctaacg	aggaaagcac	gttatacgtg	1260
ctcgtcaaag	caaccatagt	acgcgccctg	tagcggcgca	ttaagcgcgg	cgggtgtggt	1320

ggttacgcg	agcgtgaccg	ctacacttgc	cagcgccta	gcgcccgtc	ctttcgctt	1380
cttccttcc	tttctcgcca	cgttcgccg	ctttccccgt	caagctctaa	atcgggggct	1440
cccttaggg	ttccgattta	gtgctttacg	gcacctcgac	cccaaaaaac	ttgattaggg	1500
tgatggttca	cgtagtgggc	catcgccctg	atagacgggt	tttcgcccct	tgacgttggg	1560
gtccacgttc	tttaatagtg	gactcttggt	ccaaactgga	acaacactca	accctatctc	1620
ggctctattct	tttgatttat	aagggtttt	gccgatttcg	gcctattggg	taaaaaatga	1680
gctgatttaa	caaaaattta	acgcgaattt	taacaaaata	ttaacgttta	caatttaaat	1740
atgtgcttat	acaatcttcc	tgtttttggg	gcttttctga	ttatcaaccg	gggtacatat	1800
gattgacatg	ctagttttac	gattaccgtt	catcgaggt	ggcacttttc	ggggaaatgt	1860
gcgcggaacc	cctatttggt	tatttttcta	aatacattca	aatatgtatc	cgctcatgag	1920
acaataacc	tgataaatgc	ttcaataata	ttgaaaaagg	aagagtatga	gtattcaaca	1980
tttccgtgtc	gcccttattc	ccttttttgc	ggcattttgc	cttcctgttt	ttgctcacc	2040
agaaacgctg	gtgaaagtaa	aagatgctga	agatcagttg	ggtgcacgag	tgggttacat	2100
cgaactggat	ctcaacagcg	gtaagatcct	tgagagtttt	cgccccgaag	aacgttttcc	2160
aatgatgagc	acttttaaaag	ttctgctatg	tggcgcggta	ttatcccgtg	ttgacgccgg	2220
gcaagagcaa	ctcggtcgcc	gcatacacta	ttctcagaat	gacttggttg	agtactcacc	2280
agtcacagaa	aagcatctta	cggatggcat	gacagtaaga	gaattatgca	gtgctgccat	2340
aacatgagt	gataacactg	cggccaactt	acttctgaca	acgatcggag	gaccgaagga	2400
gctaaccgct	tttttgacac	acatggggga	tcatgtaact	cgcttgatc	gttgggaacc	2460
ggagctgaat	gaagccatac	caaacgacga	gcgtgacacc	acgatgcctg	tagcaatggc	2520
aacaacgttg	cgcaaacat	taactggcga	actacttact	ctagcttccc	ggcaacaatt	2580
aatagactgg	atggaggcgg	ataaagttgc	aggaccactt	ctgcgctcgg	cccttccggc	2640
tggctggttt	attgctgata	aatctggagc	cggtgagcgt	gggtctcgcg	gtatcattgc	2700
agcactgggg	ccagatggta	agccctccc	tatcgtagtt	atctacacga	cggggagtca	2760
ggcaactatg	gatgaacgaa	atagacagat	cgctgagata	ggtgcctcac	tgattaagca	2820
ttggtaactg	tcagaccaag	tttactcata	tatactttag	attgatttaa	aacttcattt	2880
ttaatttaaa	aggatctagg	tgaagatcct	ttttgataat	ctcatgacca	aaatccctta	2940
acgtgagttt	tcgttccact	gagcgtcaga	ccccgtagaa	aagatcaaag	gatcttcttg	3000
agatcctttt	tttctgcg	taatctgctg	cttgcaaca	aaaaaaccac	cgctaccagc	3060
gggtggtttg	ttgccggatc	aagagctacc	aactctttt	ccgaaggtaa	ctggcttcag	3120
cagagcgag	ataccaaata	ctgtccttct	agtgtagccg	tagttaggcc	accacttcaa	3180
gaactctgta	gcaccgccta	catacctcgc	tctgctaate	ctgttaccag	tggctgctgc	3240
cagtggcgat	aagtcgtgtc	ttaccgggtt	ggactcaaga	cgatagttac	cggataaggc	3300
gcagcggctg	ggctgaacgg	ggggttcgtg	cacacagccc	agcttggagc	gaacgaccta	3360

caccgaactg agatacctac agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc ccgaagggag 3420
 aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaca ggagagcgca cgagggagct 3480
 tccaggggga aacgcctggg atctttatag tcctgtcggg tttegccacc tctgacttga 3540
 gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc 3600
 ggccTTTTTA cggttcctgg cTTTTgctg gcTTTTgct cacatgttct ttcctgcgtt 3660
 atcccctgat tctgtggata accgtattac cgcctttgag tgagctgata ccgctcgccg 3720
 cagccgaacg accgagcgca gcgagtcagt gagcgaggaa gcggaagagc 3770

<210> 2

<211> 738

5 <212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(738)

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (274)..(274)

15 <223> n is a, c, g, o t

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (387)..(387)

20 <223> n is a, c, g, o t

<400> 2

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

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

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

gga tgg ttc aac cct aat agt ggt ggc aca aac tat gca cag aag ttt 192
 Gly Trp Phe Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

cag ggc agg gtc acc atg acc ggg gac acg tcc acc agc aca ggc tat 240
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Gly Asp Thr Ser Thr Ser Thr Gly Tyr
 65 70 75 80

atg gag ctg agc agg ctg aca tct gac gac gcg ncc gtg tat tat tgt 288
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Thr Ser Asp Asp Ala Xaa Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gcg aga gat cgg gcc tct gct atg ggc gtc tgg ggc caa ggc acc ctg 336
 Ala Arg Asp Arg Ala Ser Ala Met Gly Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

gtc acc gtc tcc tca ggt gga ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct gcc 384
 Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125

ggn Gly	ggc Gly	gga Gly	tcg Ser	cag Gln	tct Ser	gcc Ala	ctg Leu	act Thr	cag Gln	cct Pro	gcc Ala	tcc Ser	gcg Ala	tcc Ser	ggg Gly	432
130																
tct Ser	cct Pro	gga Gly	cag Gln	tca Ser	gtc Val	acc Thr	atc Ile	tcc Ser	tgc Cys	act Thr	gga Gly	acc Thr	agc Ser	agt Ser	gac Asp	480
145																
ggt Val	ggt Gly	ggt Gly	tat Tyr	aac Asn	tat Tyr	gtc Val	tcc Ser	tgg Trp	tac Tyr	caa Gln	cag Gln	cac His	cca Pro	ggc Gly	aaa Lys	528
165																
gcc Ala	ccc Pro	aaa Lys	ctc Leu	atg Met	att Ile	tat Tyr	gac Asp	gtc Val	aat Asn	aag Lys	cgg Arg	ccc Pro	tca Ser	ggg Gly	gtc Val	576
180																
cct Pro	gat Asp	cgc Arg	ttc Phe	tct Ser	ggc Gly	tcc Ser	aag Lys	tct Ser	ggc Gly	aac Asn	acg Thr	gcc Ala	tcc Ser	ctg Leu	acc Thr	624
195																
gac Val	tct Ser	ggg Gly	ctc Leu	cag Gln	gct Ala	gag Glu	gat Asp	gag Glu	gct Ala	gat Asp	tat Tyr	tac Tyr	tgc Cys	agc Ser	tca Ser	672
210																
tat Tyr	gca Ala	ggt Gly	agt Ser	aac Asn	act Thr	ttc Phe	cta Leu	ttc Phe	ggc Gly	gga Gly	ggg Gly	acc Thr	cag Gln	ctc Leu	acc Thr	720
225																
230																
235																
ggt Val	tta Leu	ggt Gly	gcg Ala	gcc Ala	gca Ala											738
245																

<210> 3
 <211> 246
 5 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> característica miscelánea
 10 <222> (92)..(92)
 <223> 'Xaa' en la posición 92 significa Thr, Ala, Pro ó Ser.

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Leu Gly Ala Ala Ala
 245

- <210> 4
- <211> 743
- 5 <212> DNA
- <213> Escherichia coli

- <220>
- <221> CDS
- 10 <222> (1)..(741)

- <400> 4

atg gag gag gtg cag ctg cag gag tct gga gct gag gtg aag aag ccc Met Glu Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro 1 5 10 15	48
ggg gcc tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc acc Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr 20 25 30	96
gcc tcc tat atg cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag Ala Ser Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu 35 40 45	144
tgg atg gga tgg ttc aac cct aat agt ggt ggc aca aac tat gca cag Trp Met Gly Trp Phe Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln 50 55 60	192
aag ttt cag ggc agg gtc acc atg acc ggg gac acg tcc acc agc aca Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Gly Asp Thr Ser Thr Ser Thr 65 70 75 80	240
ggc tat atg gag ctg agc agg ctg aca tct gac gac gcg gcc gtg tat Gly Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Thr Ser Asp Asp Ala Ala Val Tyr 85 90 95	288
tat tgt gcg aga gat cgg gcc tct gct atg ggc gtc tgg ggc caa gga Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Ala Ser Ala Met Gly Val Trp Gly Gln Gly 100 105 110	336
acc ctg gtc acc gtc tcc tca ggt gga ggc ggt tca ggc gga ggt ggc Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly 115 120 125	384
tct ggc ggt ggc gga tcc cag tct gcc ctg act cag cct gcc tcc gtg Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val 130 135 140	432
tct ggg tct cct gga cag tcg atc acc atc tcc tgc act gga acc agc Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser 145 150 155 160	480
agt gac gtt ggt ggt tat aac tat gtc tcc tgg tac caa cag cac cca Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro 165 170 175	528
ggc aaa gcc ccc aaa ctc atg att tat gat gtc agt cat cgg ccc tca Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Ser His Arg Pro Ser 180 185 190	576
ggg att tct aat cgc ttc tct ggc tcc aag tct ggc aac acg gcc tcc Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser 195 200 205	624
ctg acc atc tct agg ctc cag gct gag gac gag gct gat tat tac tgc Leu Thr Ile Ser Arg Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys 210 215 220	672
agc tca tat aca agc agt aac act ttc atc ttc gga act ggg acc cag Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Asn Thr Phe Ile Phe Gly Thr Gly Thr Gln 225 230 235 240	720
ctc acc gtt tta ggt gcg gcc gc Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala 245	743

<211> 247
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

5 <400> 5

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

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

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

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

<210> 6
 <211> 743
 5 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (1)..(741)

<400> 6

atg Met 1	gag Glu	cag Gln	gtg Val	cag Gln 5	ctg Leu	gtg Val	cag Gln	tct Ser	gga Gly 10	gct Ala	gag Glu	gtg Val	aag Lys 15	aag Lys	ccc Pro	48
ggg Gly	gcc Ala	tca Ser	gtg Val 20	aag Lys	gtc Val	tcc Ser	tgc Cys	aag Lys 25	gcc Ala	tct Ser	gga Gly	tac Tyr	acc Thr 30	ttc Phe	acc Thr	96
gcc Ala	tcc Ser	tat Tyr 35	atg Met	cac His	tgg Trp	gtg Val	cga Arg 40	cag Gln	gcc Ala	cct Pro	gga Gly	caa Gln 45	ggg Gly	ctt Leu	gag Glu	144
tgg Trp	atg Met 50	gga Gly	tgg Trp	ttc Phe	aac Asn	cct Pro 55	aat Asn	agt Ser	ggt Gly	ggc Gly	aca Thr 60	aac Asn	tat Tyr	gca Ala	cag Gln	192
aag Lys 65	ttt Phe	cag Gln	ggc Gly	agg Arg	gtc Val 70	acc Thr	atg Met	acc Thr	ggg Gly	gac Asp 75	acg Thr	tcc Ser	acc Thr	agc Ser	aca Thr 80	240
ggc Gly	tat Tyr	atg Met	gag Glu	ctg Leu 85	agc Ser	agg Arg	ctg Leu	aca Thr	tct Ser 90	gac Asp	gac Asp	gcg Ala	gcc Ala	gtg Val 95	tat Tyr	288
tat Tyr	tgt Cys	gcg Ala	aga Arg 100	gat Asp	cgg Arg	gcc Ala	tct Ser	gct Ala 105	atg Met	ggc Gly	gtc Val	tgg Trp	ggc Gly 110	caa Gln	ggc Gly	336
acc Thr	ctg Leu	gtc Val 115	acc Thr	gtc Val	tcc Ser	tca Ser	ggt Gly 120	gga Gly	ggc Gly	ggt Gly	tca Ser	ggc Gly 125	gga Gly	ggc Gly	ggc Gly	384
tct Ser	ggc Gly 130	ggt Gly	ggc Gly	gga Gly	tcg Ser	cag Gln 135	tct Ser	gcc Ala	ctg Leu	act Thr	cag Gln 140	cct Pro	gcc Ala	tcc Ser	gtg Val	432
tct Ser 145	ggg Gly	tct Ser	cct Pro	gga Gly	cag Gln 150	tcg Ser	atc Ile	acc Thr	atc Ile	tcc Ser 155	tgc Cys	act Thr	gga Gly	acc Thr	agc Ser 160	480
agt Ser	gac Asp	gtt Val	ggt Gly	ggt Gly 165	tat Tyr	aac Asn	tat Tyr	gtc Val	tcc Ser 170	tgg Trp	tac Tyr	caa Gln	cag Gln	cac His 175	cca Pro	528
ggc Gly	aaa Lys	gcc Ala	ccc Pro 180	aaa Lys	ctc Leu	atg Met	att Ile	tat Tyr 185	gat Asp	gtc Val	act Thr	aat Asn	cgg Arg 190	cct Pro	tca Ser	576
ggg Gly	gtt Val	tct Ser 195	agt Ser	cgc Arg	ttc Phe	tct Ser	ggc Gly 200	tcc Ser	aag Lys	tct Ser	ggc Gly	aac Asn 205	acg Thr	gcc Ala	tcc Ser	624
ctg Leu	acc Thr 210	atc Ile	tct Ser	gga Gly	ctc Leu	cag Gln 215	act Thr	gag Glu	gac Asp	gag Glu	gct Ala 220	gat Asp	tat Tyr	tac Tyr	tgc Cys	672
aac Asn 225	tca Ser	ttt Phe	aca Thr	agc Ser	agc Ser 230	aac Asn	act Thr	tat Tyr	gtc Val	ttc Phe 235	gga Gly	act Thr	ggg Gly	acc Thr	cag Gln 240	720
ctc Leu	acc Thr	gtt Val	tta Leu	ggt Gly 245	gcg Ala	gcc Ala	gc									743

<210> 7
<211> 247

<212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala
 245

<210> 8
 <211> 750
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

5

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

10

<400> 8

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

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

- <210> 9
- <211> 250
- <212> PRT
- <213> Escherichia coli

5

<400> 9

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Gly Leu Gly Leu Pro Thr Ile Ala Ser Trp Glu Ile Trp
 100 105 110

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

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

Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys Thr Ala Thr Ile Thr Cys Ala
 145 150 155 160

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

Gly Leu Ala Pro Val Leu Val Val Tyr Asp Asp Arg Asp Arg Pro Ser
 180 185 190

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

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

Gln Val Trp Asp Pro Ser Ser Asp His Leu Tyr Val Phe Gly Thr Gly

225

230

235

240

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

<210> 10
 <211> 752
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

5

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

10

<400> 10

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

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

- <210> 11
- 5 <211> 250
- <212> PRT
- <213> Escherichia coli
- <400> 11

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

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

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

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

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

<210> 12
 <211> 752
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

5

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

10

<400> 12

atg gag gag gtg cag ctg gtg cag tct gga gga ggc ttg atc cag ccg Met Glu Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro 1 5 10 15	48
ggg ggg tcc ctg aga ctc tct tgt gta gcc tct gag ttc aac gtc aga Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Glu Phe Asn Val Arg 20 25 30	96
agc aac tac atg agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag Ser Asn Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu 35 40 45	144
tgg gtc tca gtt atg tat gac ggc ggt agt aca tac tac gca gac tcc Trp Val Ser Val Met Tyr Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser 50 55 60	192
gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tct aag aac acg gtg Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val 65 70 80	240
tat ctt caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gtc tat tac Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr 85 90 95	288
tgt gcg aga ggc gga ttg ggg ttg cct aca atc gcg tct tgg gag atc Cys Ala Arg Gly Gly Leu Gly Leu Pro Thr Ile Ala Ser Trp Glu Ile 100 105 110	336
tgg ggc caa ggg aca atg gtc acc gtc tct tca ggt gga ggc ggt tca Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser 115 120 125	384
ggc gga ggt ggc tct ggc ggt ggc gga tcg tcc tat gtg ctg act cag Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Tyr Val Leu Thr Gln 130 135 140	432
cca ccc tcg gtg tca gtg gcc cca gga aag acg gcc acg att acc tgt Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys Thr Ala Thr Ile Thr Cys 145 150 155 160	480
gcg gga aac aat ata gga agt aac agt gta tac tgg tac cag cag aaa Ala Gly Asn Asn Ile Gly Ser Asn Ser Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys 165 170 175	528
cca ggc ctg gcc cct gta ctg gtc gtc tat gat gat aga gac cgg ccc Pro Gly Leu Ala Pro Val Leu Val Val Tyr Asp Asp Arg Asp Arg Pro 180 185 190	576
tca ggg ctc ccc ggg cga ttc tct ggc tcc aaa tcc ggg aac acg gcc Ser Gly Leu Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala 195 200 205	624
acc ctg acc atc agc agg gtc gag gcc ggg gat gag gcc gac tat tct Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Ser 210 215 220	672
tgt cag gtg tgg gat cct agt agt gat cac ctc tat gtc ttc gga act Cys Gln Val Trp Asp Pro Ser Ser Asp His Leu Tyr Val Phe Gly Thr 225 230 235 240	720
ggg acc cag ctc acc gtt tta ggt gcg gcc gc Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala 245 250	752

<211> 250
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

5 <400> 13

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

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

<210> 14
 <211> 741
 5 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (1)..(741)

<400> 14

gag Glu 1	cag Gln	gtg Val	cag Gln	ctg Leu 5	cag Gln	gag Glu	tct Ser	ggg Gly	gga Gly 10	ggc Gly	ttg Leu	gta Val	cag Gln	cct Pro 15	ggg Gly	48
ggg Gly	tcc Ser	ctg Leu	aga Arg 20	ctc Leu	tcc Ser	tgt Cys	gca Ala 25	gcc Ala	tct Ser	gga Gly	ttc Phe	acc Thr	ttt Phe 30	agt Ser	act Thr	96
tat Tyr	gcc Ala	atg Met 35	agc Ser	tgg Trp	gtc Val	cgc Arg	cag Gln 40	gct Ala	cca Pro	ggg Gly	aag Lys	ggg Gly 45	ctg Leu	gag Glu	tgg Trp	144
gtc Val	tca Ser 50	gtt Val	att Ile	agt Ser	ggt Gly	agt Ser 55	ggt Gly	cat His	aca Thr	aca Thr	aac Asn 60	tac Tyr	gcc Ala	gac Asp	tcc Ser	192
gtg Val 65	aag Lys	ggc Gly	cgc Arg	gtc Val	acc Thr 70	ata Ile	tcc Ser	aga Arg	gac Asp	aat Asn 75	tcc Ser	aag Lys	aac Asn	aca Thr	cta Leu 80	240
tat Tyr	ctg Leu	caa Gln	atc Ile	aac Asn 85	agc Ser	ctg Leu	aga Arg	gcc Ala	gac Asp 90	gac Asp	acg Thr	gcc Ala	gtg Val	tat Tyr 95	tac Tyr	288
tgt Cys	gcg Ala	aga Arg	gat Asp 100	gtg Val	tta Leu	gtc Val	cta Leu	cag Gln 105	aat Asn	gct Ala	ttt Phe	gat Asp	atc Ile 110	tgg Trp	ggc Gly	336
caa Gln	ggg Gly	acc Thr 115	acg Thr	gtc Val	acc Thr	gtc Val	tcc Ser 120	tca Ser	ggt Gly	gga Gly	ggt Gly	ggt Gly 125	tca Ser	ggc Gly	gga Gly	384
ggt Gly 130	ggc Gly	tct Ser	ggc Gly	ggt Gly	ggc Gly	gga Gly 135	tcg Ser	gat Asp	gtt Val	gtg Val	atg Met 140	acc Thr	cag Gln	tct Ser	cca Pro	432
tcc Ser 145	tca Ser	ctg Leu	tct Ser	gca Ala	tct Ser 150	gta Val	gga Gly	gac Asp	aga Arg	gtc Val 155	acc Thr	atc Ile	act Thr	tgt Cys	cgg Arg 160	480
gcg Ala	agt Ser	cag Gln	ggt Gly	att Ile 165	agc Ser	agg Arg	tgg Trp	tta Leu	gcc Ala 170	tgg Trp	tat Tyr	caa Gln	cag Gln	aaa Lys 175	cca Pro	528
ggg Gly	aaa Lys	gcc Ala	cct Pro 180	aag Lys	ctc Leu	ctg Leu	atc Ile	tac Tyr 185	gct Ala	gca Ala	tcc Ser	agt Ser	ttg Leu	caa Gln	agt Ser	576
ggg Gly	gtc Val	cca Pro 195	tca Ser	agg Arg	ttc Phe	agt Ser	ggc Gly 200	agt Ser	gga Gly	tct Ser	ggg Gly	aca Thr 205	gat Asp	ttc Phe	act Thr	624
ctc Leu	acc Thr 210	atc Ile	agc Ser	agt Ser	ctg Leu	caa Gln 215	cct Pro	gaa Glu	gat Asp	ttt Phe	gca Ala 220	act Thr	tac Tyr	atc Ile	tgt Cys	672
caa Gln 225	cag Gln	agt Ser	tac Tyr	agt Ser	agg Arg 230	ccg Pro	ctc Leu	act Thr	ttc Phe	ggc Gly 235	gga Gly	ggg Gly	acc Thr	aag Lys	gtg Val 240	720
gaa Glu	atc Ile	aaa Lys	cg Arg	gcg Ala 245	gcc Ala	gca Ala										741

<211> 247
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

5 <400> 15

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

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

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

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

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

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

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

<210> 16
 <211> 771
 5 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (1)..(771)

<400> 16

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

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

<210> 17
 <211> 257
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

5

<400> 17

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

Ala Ser Val Arg Val Ser Cys Gln Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Arg
20 25 30

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

```

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

```

Ala

<210> 18
 <211> 735
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

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

5

<400> 18

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

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

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

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

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

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

<210> 19
<211> 245
<212> PRT
5 <213> Escherichia coli

<400> 19

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

<210> 20
 <211> 765
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(765)

10

<400> 20

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

gaa	gat	gtg	gca	ggt	tat	tac	tgt	cag	caa	tat	tat	agg	att	ccg	tgg	720
Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Tyr	Arg	Ile	Pro	Trp	
225					230					235					240	
acg	ttc	ggc	caa	ggg	acc	aaa	gtg	gat	atc	aaa	cgt	gcg	gcc	gca		765
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Asp	Ile	Lys	Arg	Ala	Ala	Ala		
				245					250					255		

<210> 21

<211> 255

5 <212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 21

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

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

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

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

<210> 22
 <211> 791
 5 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (1)..(786)

<400> 22
 cag gtg cag ctg cag gag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg gcc 48
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc acc ggc tac 96
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 tat atg cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg 144
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 gga tgg atc aac cct aac agt ggt ggc aca aac tat gca cag aag ttt 192
 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 cag ggc agg gtc acc atg acc agg gac acg tcc atc agc aca gcc tac 240
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 atg gag ctg agc agg ctg aga tct gac gac acg gcc gtg tat tac tgt 288
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 gcg aga gat tcg cca caa aat tgt act aat ggt gta tgc cac cgg ggg 336
 Ala Arg Asp Ser Pro Gln Asn Cys Thr Asn Gly Val Cys His Arg Gly
 100 105 110
 agt cat gtc cac tac tac ggt atg gac gtc tgg ggc caa ggc acc ctg 384
 Ser His Val His Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 115 120 125
 gtc acc gtc tct tca ggt ggg ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc 432
 Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140
 ggt ggc gga tcg cag tct gcc ctg act cag cct gcc tcc gcg gcc ggg 480
 Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Ala Ala Gly
 145 150 155 160
 tct cct gga cag tca gtc acc atc tcc tgc act gga acc agc agt gat 528
 Ser Pro Gly Gln Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp
 165 170 175

gtt	ggt	ggt	tat	aac	tat	gtc	tcc	tgg	tac	caa	cag	cac	cca	ggc	aaa	576
Val	Gly	Gly	Tyr	Asn	Tyr	Val	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	His	Pro	Gly	Lys	
			180					185					190			
gcc	ccc	aaa	ctc	atg	att	tat	gac	gtc	aat	aag	cgg	ccc	tca	ggg	gtc	624
Ala	Pro	Lys	Leu	Met	Ile	Tyr	Asp	Val	Asn	Lys	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	
		195					200					205				
cct	gat	cgc	ttc	tct	gcc	tcc	aag	tct	ggc	aac	acg	gcc	tcc	ctg	acc	672
Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Ala	Ser	Lys	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Ser	Leu	Thr	
	210					215					220					
gtc	tct	ggg	ctc	cag	gct	gac	gat	gag	gct	gat	tac	tac	tgc	gct	tca	720
Val	Ser	Gly	Leu	Gln	Ala	Asp	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ser	
	225				230					235					240	
tat	gca	ggc	acc	tac	agt	tat	gtc	ttc	gga	act	ggg	acc	cag	ctc	acc	768
Tyr	Ala	Gly	Thr	Tyr	Ser	Tyr	Val	Phe	Gly	Thr	Gly	Thr	Gln	Leu	Thr	
				245					250					255		
gtt	tta	ggt	gcg	gcc	gca	ggaga										791
Val	Leu	Gly	Ala	Ala	Ala											
			260													

- <210> 23
- <211> 262
- 5 <212> PRT
- <213> Escherichia coli
- <400> 23

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 24
 <211> 786
 5 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (1)..(786)

<400> 24

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

Ala	Arg	Asp	Ser	Pro	Gln	Asn	Cys	Thr	Asn	Gly	Val	Cys	His	Arg	Gly		
			100					105					110				
agt	cat	gtc	cac	tac	tac	ggt	atg	gac	gtc	tgg	ggc	cag	gga	acc	ctg		384
Ser	His	Val	His	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu		
		115					120					125					
gtc	acc	gtc	tcc	tca	ggt	ggg	ggc	ggt	tca	ggc	gga	ggt	ggc	tct	ggc		432
Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly		
	130					135					140						
ggt	ggc	gga	tcg	cag	tct	gcc	ctg	act	cag	cct	gcc	tcc	gcg	gcc	ggg		480
Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ser	Ala	Leu	Thr	Gln	Pro	Ala	Ser	Ala	Ala	Gly		
145					150					155					160		
tgt	ctt	gga	cag	tca	gtc	acc	atc	tcc	tgc	act	gga	acc	agc	agt	gat		528
Cys	Leu	Gly	Gln	Ser	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Asp		
				165					170					175			
gtt	ggt	ggt	tat	aaa	tat	gtc	tcc	tgg	tac	caa	cag	cac	cca	ggc	aaa		576
Val	Gly	Gly	Tyr	Lys	Tyr	Val	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	His	Pro	Gly	Lys		
			180					185					190				
gcc	ccc	aaa	ctc	atg	att	tat	gac	gtc	aat	aag	cgg	ccc	tca	ggg	gtc		624
Ala	Pro	Lys	Leu	Met	Ile	Tyr	Asp	Val	Asn	Lys	Arg	Pro	Ser	Gly	Val		
		195					200					205					
cct	gat	cgc	ttc	ttt	gcc	tcc	aag	tct	ggc	aac	acg	gcc	tcc	ctg	acc		672
Pro	Asp	Arg	Phe	Phe	Ala	Ser	Lys	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Ser	Leu	Thr		
	210					215					220						
gtc	tct	ggg	ctc	cag	gct	gac	gat	gag	gct	gat	tac	tac	tgc	gct	tca		720
Val	Ser	Gly	Leu	Gln	Ala	Asp	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ser		
	225				230					235				240			
tat	gca	ggc	acc	tac	agt	tat	gtc	ttc	gga	act	ggg	acc	cag	ctc	acc		768
Tyr	Ala	Gly	Thr	Tyr	Ser	Tyr	Val	Phe	Gly	Thr	Gly	Thr	Gln	Leu	Thr		
				245					250					255			
gtt	tta	ggt	gcg	gcc	gca												786
Val	Leu	Gly	Ala	Ala	Ala												
			260														

<210> 25
 <211> 262
 5 <212> PRT
 <213> Escherichia coli
 <400> 25

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

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

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

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

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

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

5 <210> 26
 <211> 789
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

 <220>
 <221> CDS

<222> (1)..(789)

<400> 26

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

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

<210> 27
 <211> 263
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli
 <400> 27

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

<210> 28
 <211> 747
 <212> DNA
 5 <213> Escherichia coli

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

10 <400> 28

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

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

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

<210> 29

<211> 249

5 <212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 29

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

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

Pro Met Ile Ser Ser Leu Ser Gly His Val Val Phe Gly Gly Gly Thr
 225 230 235 240

Lys Val Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala
 245

<210> 30
 <211> 747
 5 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (1)..(747)

<400> 30
 cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg gcc 48
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc acc ggc tac 96
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 tat atg cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg 144
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Trp Met
 35 40 45
 gga tgg atc aac cct aac agt ggt ggc aca aac tat gca cag aag ttc 192
 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 cag ggc agg gtc acc atg acc agg gac acg tcc att ggc aca gtc tac 240
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Gly Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 atg gag ttg agc agc ctg aca tct gac gac acg gcc atg tat tat tgt 288
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 gcg aga aac aat gtt gct atg ggt tat act atg gac gtc tgg ggc caa 336
 Ala Arg Asn Asn Val Ala Met Gly Tyr Thr Met Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110
 ggg aca atg gtc acc gtc tct tca ggt gga ggc ggt tca ggc gga ggt 384
 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125
 ggc tct ggc ggt ggc gga tcg cag tct gcc ctg act cag cct gcc tcc 432
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser
 130 135 140
 gcg tcc ggg tct cct gga cag tca gtc acc atc tcc tgc act gga acc 480
 Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr
 145 150 155 160
 agc agt gac gtt ggt ggt tat aac tat gtc tcc tgg tac caa cag cac 528
 Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His
 165 170 175

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

<210> 31
 <211> 249
 5 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

 <400> 31

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

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

<210> 32
 <211> 733
 5 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (1)..(732)

<400> 32

gag Glu 1	gtg Val	cag Gln	ctg Leu	ttg Leu 5	cag Gln	tct Ser	ggg Gly	gcg Ala	gag Glu 10	gtg Val	aag Lys	aag Lys	cct Pro	ggg Gly 15	gcc Ala	48
tca Ser	gtg Val	aag Lys	gtc Val 20	tcc Ser	tgc Cys	aag Lys	gct Ala	tct Ser 25	gga Gly	tac Tyr	acc Thr	ttc Phe	acc Thr 30	ggc Gly	tac Tyr	96
tat Tyr	atg Met	cac His 35	tgg Trp	gtg Val	cga Arg	cag Gln	gcc Ala 40	cct Pro	gga Gly	caa Gln	ggg Gly	ctt Leu 45	gag Glu	tgg Trp	atg Met	144
gga Gly 50	tgg Trp	atc Ile	aac Asn	cct Pro	aac Asn	agt Ser 55	ggt Gly	ggc Gly	aca Thr	aac Asn	tat Tyr 60	gca Ala	cag Gln	aag Lys	ttt Phe	192
cag Gln 65	ggc Gly	aga Arg	gtc Val	acc Thr	atg Met 70	acc Thr	agg Arg	aac Asn	acc Thr	tcc Ser 75	ata Ile	agc Ser	aca Thr	gcc Ala	tac Tyr 80	240
atg Met	gag Glu	ctg Leu	agc Ser 85	agc Ser	ctg Leu	aga Arg	tct Ser	gag Glu	gac Asp 90	acg Thr	gcc Ala	gtg Val	tat Tyr 95	tac Tyr	tgt Cys	288
gcg Ala	ggt Gly	cag Gln	gag Glu 100	gca Ala	cat His	ggg Gly	gac Asp	ggt Gly 105	atg Met	gac Asp	gtc Val	tgg Trp	ggc Gly 110	caa Gln	ggg Gly	336
acc Thr	acg Thr	gtc Val 115	acc Thr	gtc Val	tcc Ser	tcg Ser	gtg Val 120	gag Glu	cga Arg	ggt Gly	ggc Gly	tct Ser 125	ggc Gly	ggt Gly	ggc Gly	384
gga Gly 130	tcg Ser	cag Gln	tct Ser	gcc Ala	ctg Leu	act Thr 135	cag Gln	cct Pro	gcc Ala	tcc Ser 140	gcg Ala	tcc Ser	ggg Gly	tct Ser	cct Pro	432
gga Gly 145	cag Gln	tcg Ser	atc Ile	acc Thr	atc Ile 150	tcc Ser	tgc Cys	act Thr	gga Gly 155	acc Thr	agc Ser	ggt Gly	gac Asp	gtt Val 160	ggt Gly 160	480
ggt Gly	tat Tyr	aac Asn	tat Tyr	gtc Val 165	tcc Ser	tgg Trp	tac Tyr	caa Gln 170	cag Gln	cac His	cca Pro	ggc Gly	aaa Lys	gcc Ala 175	ccc Pro	528
aaa Lys	ctc Leu	atg Met	att Ile 180	tat Tyr	gaa Glu	gtc Val	agt Ser	aat Asn 185	cgg Arg	ccc Pro	tca Ser	ggg Gly	ggt Val 190	tct Ser	aat Asn	576
cgc Arg	ttc Phe	tct Ser 195	ggc Gly	tcc Ser	aag Lys	tct Ser	ggc Gly 200	agc Ser	acg Thr	gcc Ala	tcc Ser	ctg Leu 205	acc Thr	atc Ile	tct Ser	624
ggg Gly 210	ctc Leu	cag Gln	gct Ala	gag Glu	gac Asp	gag Glu 215	gct Ala	gat Asp	tat Tyr	tac Tyr	tgc Cys 220	gtc Val	tca Ser	tat Tyr	aca Thr	672
agc Ser 225	aga Arg	aac Asn	act Thr	tat Tyr	gtc Val 230	ttc Phe	gga Gly	tcc Ser	ggg Gly	acc Thr 235	cag Gln	ctc Leu	acc Thr	ggt Val	tta Leu 240	720
ggt Gly	gcg Ala	gcc Ala	gcg Ala	a												733

<210> 33
 <211> 244
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

5

<400> 33

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

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

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

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

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

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

Ala Gly Gln Glu Ala His Gly Asp Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Val Glu Arg Gly Gly Ser Gly Gly Gly

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

<210> 34
 <211> 372
 5 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (1)..(372)

<400> 34

gag	gtg	cag	ctg	ttg	cag	tct	ggg	gct	gag	gtg	aag	aag	cct	ggg	gcc	48
Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	
1				5					10					15		
tca	gtg	aag	gtc	tcc	tgc	aag	gct	tct	gga	tac	acc	ttc	acc	ggc	tcc	96
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Gly	Ser	
			20					25					30			
tat	att	cac	tgg	gtg	cga	cag	gcc	cct	gga	caa	ggg	ctt	gag	tgg	atg	144
Tyr	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
		35					40					45				
gga	cgg	atg	aac	cct	aac	agt	ggt	gac	aca	aac	tat	gca	cag	aag	ttt	192
Gly	Arg	Met	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	
	50					55					60					
cag	ggc	cgg	gtc	acc	atg	acc	agg	gac	acg	tcc	atc	agc	aca	gcc	tac	240
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr	
65					70					75					80	
atg	gag	ctg	agc	agg	ctg	aga	tct	gac	gac	acg	gcc	gtg	tac	tac	tgt	288
Met	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90				95			
gcg	acg	gag	gga	gtg	gct	tta	cgt	ccc	ggt	gct	ttt	gat	ttc	tgg	ggc	336
Ala	Thr	Glu	Gly	Val	Ala	Leu	Arg	Pro	Gly	Ala	Phe	Asp	Phe	Trp	Gly	
			100					105					110			
caa	ggg	acc	cag	ctc	acc	ggt	tta	ggt	gcg	gcc	gca					372
Gln	Gly	Thr	Gln	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Ala	Ala	Ala					
		115					120									

5 <210> 35
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

10 <400> 35

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

<210> 36
 <211> 756
 5 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (1)..(756)

<400> 36

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

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

<210> 37
 <211> 252
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

5

<400> 37

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

<210> 38

5 <211> 735

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

5 <222> (1)..(735)

<400> 38

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

<210> 39
 <211> 245
 <212> PRT

5

<213> Escherichia coli

<400> 39

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

<210> 40
 <211> 761
 <212> DNA
 5 <213> Escherichia coli

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

10 <400> 40

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

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

<210> 41
 <211> 253
 5 <212> PRT
 <213> Escherichia coli
 <400> 41

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

	195		200		205											
	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu
	210						215					220				
	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Met	Gln	Ser	Ile	Gln	Leu	Pro	Ile	Thr
	225					230					235					240
	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Arg	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ala	Ala			
					245					250						

- <210> 42
- <211> 765
- 5 <212> DNA
- <213> Escherichia coli

- <220>
- <221> CDS
- 10 <222> (1)..(765)

- <400> 42

gag Glu 1	cag Gln	gtg Val	cag Gln	ctg Leu 5	gtg Val	cag Gln	tct Ser	ggg Gly	gga Gly 10	ggc Gly	gtg Val	gtc Val	cag Gln	cct Pro 15	ggg Gly	48
agg Arg	tcc Ser	ctg Leu	aga Arg 20	ctc Leu	tcc Ser	tgt Cys	gca Ala 25	gcc Ala	tct Ser	gga Gly	ttc Phe	agc Ser	ttc Phe 30	agt Ser	aac Asn	96
tat Tyr	gtt Val	atg Met 35	cac His	tgg Trp	gtc Val	cgc Arg	cag Gln 40	gct Ala	cca Pro	ggc Gly	aag Lys	ggg Gly 45	ctg Leu	gag Glu	tgg Trp	144
gtg Val 50	gca Ala	gtt Val	ata Ile	tca Ser	cat His	gat Asp 55	gga Gly	agc Ser	aat Asn	aaa Lys	tac Tyr 60	tac Tyr	gca Ala	gac Asp	tcc Ser	192
gtg Val 65	aag Lys	ggc Gly	cga Arg	ttc Phe	acc Thr 70	atc Ile	tcc Ser	aga Arg	gac Asp	aat Asn 75	tcc Ser	aag Lys	aac Asn	acg Thr	cta Leu 80	240
tat Tyr	ctg Leu	caa Gln	atg Met	aaa Lys 85	agc Ser	ctg Leu	aga Arg	cct Pro	gag Glu 90	gac Asp	acg Thr	gct Ala	gtg Val	tat Tyr 95	tac Tyr	288
tgt Cys	gcg Ala	aga Arg	agt Ser 100	agt Ser	ggc Gly	tgg Trp	tac Tyr	ctt Leu 105	ctc Leu	ttt Phe	gat Asp	gct Ala	ttt Phe 110	gat Asp	atc Ile	336
tgg Trp	ggc Gly	caa Gln 115	ggg Gly	aca Thr	atg Met	gtc Val	acc Thr 120	gtc Val	tct Ser	tca Ser	ggt Gly	gga Gly 125	ggc Gly	ggt Gly	tca Ser	384
ggc Gly 130	gga Gly	ggt Gly	ggc Gly	tct Ser	ggc Gly	ggt Gly 135	ggc Gly	gga Gly	tcg Ser	gac Asp	atc Ile 140	cag Gln	atg Met	acc Thr	cag Gln	432
tct Ser 145	cca Pro	gac Asp	tcc Ser	ctg Leu	cct Pro 150	gtg Val	tct Ser	ctg Leu	ggc Gly	gag Glu 155	agg Arg	gcc Ala	acc Thr	atc Ile	aac Asn 160	480
tgc Cys	agg Arg	tcc Ser	agc Ser	cag Gln	agt Ser	gtt Val	tta Leu	tac Tyr	agc Ser	tcc Ser	aac Asn	aat Asn	aag Lys	aac Asn	tac Tyr	528
				165				170								
tta Leu	gct Ala	tgg Trp	tac Tyr 180	cag Gln	cag Gln	aaa Lys	cca Pro	gga Gly 185	cag Gln	cct Pro	cct Pro	aag Lys	ctg Leu 190	ctc Leu	att Ile	576
tac Tyr	tgg Trp	gca Ala 195	tct Ser	acc Thr	cgg Arg	gaa Glu	tcc Ser 200	ggt Gly	gtc Val	cct Pro	gac Asp	cga Arg 205	ttc Phe	agt Ser	ggc Gly	624
agc Ser 210	ggg Gly	tct Ser	ggg Gly	aca Thr	gat Asp	ttc Phe 215	act Thr	ctc Leu	acc Thr	atc Ile	agc Ser 220	agc Ser	ctg Leu	cag Gln	gct Ala	672
gaa Glu 225	gat Asp	gtg Val	gca Ala	gtt Val	tat Tyr 230	tac Tyr	tgt Cys	cag Gln	caa Gln	tat Tyr 235	tat Tyr	agg Arg	att Ile	ccg Pro	tgg Trp 240	720
acg Thr	ttc Phe	ggc Gly	caa Gln	ggg Gly 245	acg Thr	aag Lys	gtg Val	gaa Glu	atc Ile 250	aaa Lys	cgt Arg	gcg Ala	gcc Ala	gca Ala 255		765

<210> 43
 <211> 255
 <212> PRT

5

<213> Escherichia coli

<400> 43

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 44
 <211> 759
 5 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (1)..(759)

<400> 44

gag Glu 1	gag Glu	gtg Val	cag Gln	ctg Leu 5	ttg Leu	cag Gln	tct Ser	ggg Gly	gga Gly 10	ggt Gly	gtg Val	gta Val	cgg Arg	cct Pro 15	ggg Gly	48
ggg Gly	tcc Ser	ctg Leu	aga Arg 20	ctc Leu	tcc Ser	tgt Cys	gca Ala 25	gcc Ala	tct Ser	gga Gly	ttc Phe	acc Thr	ttt Phe 30	gat Asp	gat Asp	96
tat Tyr	ggc Gly	atg Met 35	acc Thr	tgg Trp	gtc Val	cgc Arg	cag Gln 40	gct Ala	cca Pro	ggg Gly	aag Lys	ggg Gly 45	ctg Leu	gag Glu	tgg Trp	144
gtc Val	tca Ser 50	gct Ala	att Ile	agt Ser	ggg Gly 55	agt Ser	ggg Gly	ggg Gly	agc Ser	aca Thr	tac Tyr 60	tac Tyr	gca Ala	gac Asp	tcc Ser	192
gtg Val 65	aag Lys	ggc Gly	cgg Arg	ttc Phe 70	gcc Ala	atc Ile	tcc Ser	aga Arg	gac Asp	aat Asn 75	tcc Ser	aag Lys	aac Asn	acg Thr	ctg Leu 80	240
tat Tyr	ctg Leu	caa Gln	atg Met	aac Asn 85	agc Ser	ctg Leu	aga Arg	gcc Ala	gag Glu 90	gac Asp	acg Thr	gcc Ala	gta Val	tat Tyr 95	tac Tyr	288
tgt Cys	gcg Ala	aaa Lys	tct Ser 100	cgc Arg	tac Tyr	tat Tyr	gat Asp	agt Ser 105	agt Ser	ggt Gly	tat Tyr	tac Tyr	tac Tyr 110	acc Thr	gtg Val	336
cga Arg	cct Pro	gat Asp 115	gct Ala	ttt Phe	gat Asp	atc Ile	tgg Trp 120	ggc Gly	caa Gln	ggg Gly	gca Ala	atg Met 125	gtc Val	acc Thr	gtc Val	384
tct Ser	tca Ser 130	ggt Gly	gga Gly	ggc Gly	ggg Gly	gga Gly 135	ggg Gly	ggc Gly	tct Ser	ggc Gly	ggt Gly 140	ggc Gly	gga Gly	tcg Ser	tct Ser	432
tct Ser 145	gag Glu	ctg Leu	act Thr	caa Gln	cca Pro 150	ccc Pro	tca Ser	gtg Val	tcc Ser	gtg Val 155	tcc Ser	cca Pro	gga Gly	cag Gln	aca Thr 160	480
gcc Ala	atc Ile	atc Ile	acc Thr	tgc Cys 165	tct Ser	gga Gly	gat Asp	aaa Lys	ttg Leu 170	ggg Gly	gat Asp	aaa Lys	tat Tyr	gct Ala 175	tcc Ser	528
tgg Trp	tat Tyr	cag Gln	cac His 180	agg Arg	cca Pro	ggc Gly	cag Gln	tcg Ser 185	cct Pro	gtc Val	ttg Leu	gtc Val	atc Ile 190	tat Tyr	cag Gln	576
gat Asp	tcc Ser	agg Arg 195	cgg Arg	ccc Pro	tca Ser	gac Asp	atc Ile 200	cct Pro	gag Glu	cga Arg	ttc Phe	tct Ser 205	ggc Gly	tcc Ser	aac Asn	624
tct Ser	ggg Gly 210	aac Asn	aca Thr	gcc Ala	act Thr	ctg Leu 215	acc Thr	atc Ile	acc Thr	gag Glu	gcc Ala 220	cag Gln	gct Ala	ttg Leu	gat Asp	672
gag Glu 225	gct Ala	gac Asp	tat Tyr	tat Tyr	tgt Cys 230	cag Gln	gcc Ala	tgg Trp	gcc Ala	ggc Gly 235	aga Arg	tct Ser	gtg Val	gtc Val	ttc Phe 240	720
ggc Gly	ggg Gly	ggg Gly	acc Thr	cag Gln 245	ctc Leu	acc Thr	ggt Val	tta Leu	ggt Gly 250	gcg Ala	gcc Ala	gca Ala				759

<210> 45

<211> 253

5

<212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 45

5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- <210> 46
- <211> 768
- 5 <212> DNA
- <213> Escherichia coli
- <220>
- <221> CDS
- 10 <222> (1)..(768)
- <400> 46

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

<210> 47
 <211> 256
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

5

<400> 47

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

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

<210> 48
 <211> 765
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(765)

10

<400> 48

gag gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga aac ttg gtt cag cct ggg Glu Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asn Leu Val Gln Pro Gly 1 5 10 15	48
ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttt agc agt Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser 20 25 30	96
tat gcc atg agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gaa tgg	144
Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp 35 40 45	
gtc tca gct att agt gct agt ggt ggc acc aca tac tac gca gat tcc Val Ser Ala Ile Ser Ala Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser 50 55 60	192
gtg aag ggc cgg ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu 65 70 75 80	240
tat ctt caa atg aac agc ctg aga act gag gac acg gct gtg tat tac Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr 85 90 95	288
tgt gcg aga gac agc cgt gca tac agc tat ggt tac ctc tac gtc ttt Cys Ala Arg Asp Ser Arg Ala Tyr Ser Tyr Gly Tyr Leu Tyr Val Phe 100 105 110	336
gac tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca ggt gga ggc Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly 115 120 125	384
ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt ggc gga tcg cag tct gcc ctg Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala Leu 130 135 140	432
act cag cct gcc tcc gtg tct ggg tct cct gga cag tcg atc acc atc Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile 145 150 155 160	480
tcc tgc act gga acc agc aat gat gtt ggg agt tat aac ctt gtc tcc Ser Cys Thr Gly Thr Ser Asn Asp Val Gly Ser Tyr Asn Leu Val Ser 165 170 175	528
tgg tac caa caa cac cca ggc aaa gcc ccc aaa ctc ctg att tat gag Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu 180 185 190	576
ggc agt aag cgg ccc tca ggg att tct aat cgc ttc tct ggc tcc aag Gly Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys 195 200 205	624
tct ggc aac acg gcc tcc ctg acc atc tct ggg ctc cag gct gag gac Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp 210 215 220	672
gag gct gat tat tac tgc atg tca tat acg agc agt ggc act cct tat Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Met Ser Tyr Thr Ser Ser Gly Thr Pro Tyr 225 230 235 240	720
gtc ttc gga act ggg acc cag ctc acc gtt tta ggt gcg gcc gca Val Phe Gly Thr Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala 245 250 255	765

<211> 255
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

5 <400> 49

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

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

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

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

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

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

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

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
 115 120 125

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

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

Ser Cys Thr Gly Thr Ser Asn Asp Val Gly Ser Tyr Asn Leu Val Ser
 165 170 175

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

Gly Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys
 195 200 205

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

Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Met Ser Tyr Thr Ser Ser Gly Thr Pro Tyr
 225 230 235 240

Val Phe Gly Thr Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala
 245 250 255

<210> 50

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

5 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(768)

<400> 50

10

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

<210> 51
 <211> 256
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

5

<400> 51

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

Ala Ser Val Arg Val Ser Cys Gln Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg
 20 25 30

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

Met Gly Val Ile Asp Pro Asn Ser Gly Arg Ile Ser Tyr Ser Gln Lys
 50 55 60

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

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

Cys Ala Arg Asp Arg Gly Tyr Cys Asn Gly Gly Arg Cys Phe Met Asp
 100 105 110

Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly
 115 120 125

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

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

Thr Ile Ala Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ile Asn Thr Val
 165 170 175

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

Asn Asn Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 195 200 205

Lys Ser Ala Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Val Asp
 210 215 220

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Gly Gly
 225 230 235 240

Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala
 245 250 255

<210> 52

<211> 744
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

5 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(744)

<400> 52
 atg gag cag gtg cag ctg cag gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct 48
 Met Glu Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 1 5 10 15
 ggg ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttt agt 96
 Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30
 act tat gcc atg agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag 144
 Thr Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 tgg gtc tca gtt att agt ggt agt ggt cat aca aca aac tac gcc gac 192
 Trp Val Ser Val Ile Ser Gly Ser Gly His Thr Thr Asn Tyr Ala Asp
 50 55 60
 tcc gtg aag ggc cgc gtc acc ata tcc aga gac aat tcc aag aac aca 240
 Ser Val Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 cta tat ctg caa atc aac agc ctg aga gcc gac gac acg gcc gtg tat 288
 Leu Tyr Leu Gln Ile Asn Ser Leu Arg Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 tac tgt gcg aga gat gtg tta gtc cta cag aat gct ttt gat atc tgg 336
 Tyr Cys Ala Arg Asp Val Leu Val Leu Gln Asn Ala Phe Asp Ile Trp
 100 105 110
 ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca ggt gga ggt ggt tca ggc 384
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125
 gga ggt ggc tct ggc ggt ggc gga tcg gat gtt gtg atg acc cag tct 432
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
 130 135 140
 cca tcc tca ctg tct gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act tgt 480
 Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 145 150 155 160
 cgg gcg agt cag ggt att agc agg tgg tta gcc tgg tat caa cag aaa 528
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Arg Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
 165 170 175
 cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc tac gct gca tcc agt ttg caa 576
 Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln
 180 185 190
 agt ggg gtc cca tca agg ttc agt ggc agt gga tct ggg aca gat ttc 624
 Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 195 200 205
 act ctc acc atc agc agt ctg caa cct gaa gat ttt gca act tac atc 672
 Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Ile
 210 215 220

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

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

- <210> 53
- <211> 248
- 5 <212> PRT
- <213> Escherichia coli

<400> 53

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

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

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

Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala
 245

5 <210> 54
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 54

Ser Asn Ser Ala Ala Trp Ser
 1 5

10 <210> 55
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

15 <400> 55

Ser Tyr Tyr Trp Ser
 1 5

20 <210> 56
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 56

Gly Ser Ser Asn Tyr Trp Gly
 1 5

25 <210> 57
 <211> 18
 <212> PRT
 30 <213> Escherichia coli

<400> 57

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

Lys Ser

35 <210> 58
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 58

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

<210> 59

5 <211> 16

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 59

10

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

<210> 60

15 <211> 16

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 60

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

20

<210> 61

<211> 18

<212> PRT

<213> Escherichia coli

25

<400> 61

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

Asp Val

30

<210> 62

<211> 17

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 62

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

Val

35

<210> 63

<211> 17

<212> PRT

40 <213> Escherichia coli

<400> 63

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

Val

5 <210> 64
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 64

Arg Thr Arg Trp Cys Trp Phe Asp Pro
 1 5

10 <210> 65
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

15 <400> 65

Asn Tyr Ser Leu Asn
 1 5

20 <210> 66
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 66

Asn Tyr Ser Phe Asn
 1 5

25 <210> 67
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 67

Ser Tyr Trp Ile Asp
 1 5

35 <210> 68
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

40 <400> 68

Asn Tyr Trp Ile Asp
 1 5

45 <210> 69
 <211> 5
 <212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 69

Ser Tyr Ala Met Asn
1 5

5

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

10

<400> 70

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

Gly

15

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

<400> 71

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

Gly

20

<210> 72
<211> 17
<212> PRT
<213> Escherichia coli

25

<400> 72

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

Gly

30

<210> 73
<211> 17
<212> PRT
<213> Escherichia coli

35

<400> 73

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

Gly

<210> 74
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli
 5
 <400> 74
 Asp Leu Gly Asp Leu Glu Trp Leu His Ser Pro Asp Pro
 1 5 10

 <210> 75
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

 <400> 75
 Asp Leu Gly Asp Leu Asp Trp Leu His Ser Pro Asp Pro
 1 5 10
 15

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

 <400> 76
 Arg Gly Asp ser Gly Thr Leu Trp Gly Asp
 1 5 10

 25
 <210> 77
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

 30
 <400> 77
 Asp Glu Leu Asn Gln Leu Pro Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

 <210> 78
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador sintético
 40
 <400> 78
 30 gaggaagctt ccattaaacg ggtaaatac

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

 <220>
 <22> cebador sintético 3
 50
 <400> 79
 tgcaatggcg gccgctaata ttgtctgga tattaccagc 40

 55
 <210> 80
 <211> 72
 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> cebador sintético

5

<400> 80

agcttcctca tgtaggcggc cgcaggagac tacaagacg acgacgacaa acaccacat 60

caccaccatt aa 72

<210> 81

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial

10

<220>

<223> cebador sintético

15

<400> 81

ggccttaatg gtggtgatgg tgggttttgt cgctcgcgtc tttgtagtct cctgcggccg 60

cctacatgag ga 72

<210> 82

<211> 106

<212> DNA

<213> Artificial

20

<220>

<223> cebador sintético

25

<400> 82

agcttataaa ggaggaaatc ctcatgaaac agagcaccat cgcactggca ctgttaccgt 60

tactgttcac cccggttacc aaagcacgta ccatggtttc cttgac 106

<210> 83

<211> 106

<212> DNA

<213> Artificial

30

<220>

<223> cebador sintético

35

<400> 83

40

ggccgcaagg gaaaccatgg tacgtgcttt ggtaaccggg gtgaacagta acggtaacag 60

tgccagtgcg atggtgctct gtttcatgag gatttcctcc ttata 106

<210> 84

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

45

<220>

<223> cebador sintético

50

<400> 84

gtggtgatgg aattctttgt cgctcgcgtc tttgtagtc 39

<210> 85

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

5 <220>
 <223> cebador sintético

<400> 85
 caccattaag gatcctaata ttgttctgga tattaccagc 40

10 <210> 86
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> cebadores

<400> 86
 20 tctattctga attcgctgaa actgttgaaa gttgtttagc 40

<210> 87
 <211> 38
 <212> DNA
 25 <213> Artificial

<220>
 <223> cebadores

<400> 87
 30 gccaatogga attcctgct caacctcctg tcaatgct 38

<210> 88
 <211> 37
 <212> DNA
 35 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador

<400> 88
 40 gaactgggat cctaagact ccttattacg cagtatg 37

<210> 89
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 50 <223> cebador

<400> 89
 acccgtaagc ttataaagga ggaaatcctc atgaaataga gcaccatcgc 50

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

<220>
 <223> cebador

<400> 90
 65 tagccccctt attagcgttt g 21

<210> 91

<211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> cebador
 <400> 91
 gtcacgctcg gaatcgcat ctgc 24
 10 <210> 92
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> cebador
 <400> 92
 20 tgtcgcaaaa gtaatgagtt tcttttgac tactggggc 39
 <210> 93
 <211> 24
 <212> DNA
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 30 <400> 93
 ctattgccta cggcagccgc tgga 24
 <210> 94
 <211> 58
 35 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 40 <400> 94
 tccgccgaat accacatagg gcaaccacgg ataagaggag ttacagtaat agtcagcc 58
 <210> 95
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 50 <223> cebador
 <400> 95
 tttcgcacag taatatacgg 20
 55 <210> 96
 <211> 18
 <212> DNA .
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> cebador
 <400> 96
 65 tatgtggtat tcggcgga 18
 <210> 97

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

5 <220>
 <223> cebador
 <400> 97 acttcagctc cggacacccg tccggctccg ggtccaccg ctccgccggc tcacgggtgc 60

10 <210> 98
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> cebador
 <400> 98 cggagccgga cgggtgtccg gagctgaagt gacaccgtga gccggcggag cggtggaacc 60

20 <210> 99
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> cebador
 <400> 23
 ctagttcgtc gggttcgtcg gga 99

30 <210> 100
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> cebador
 <400> 100 tcccgacgaa cccgacgaa 19

40 <210> 101
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> cebador
 <400> 101
 ggacacggct gctgtattac tg 22

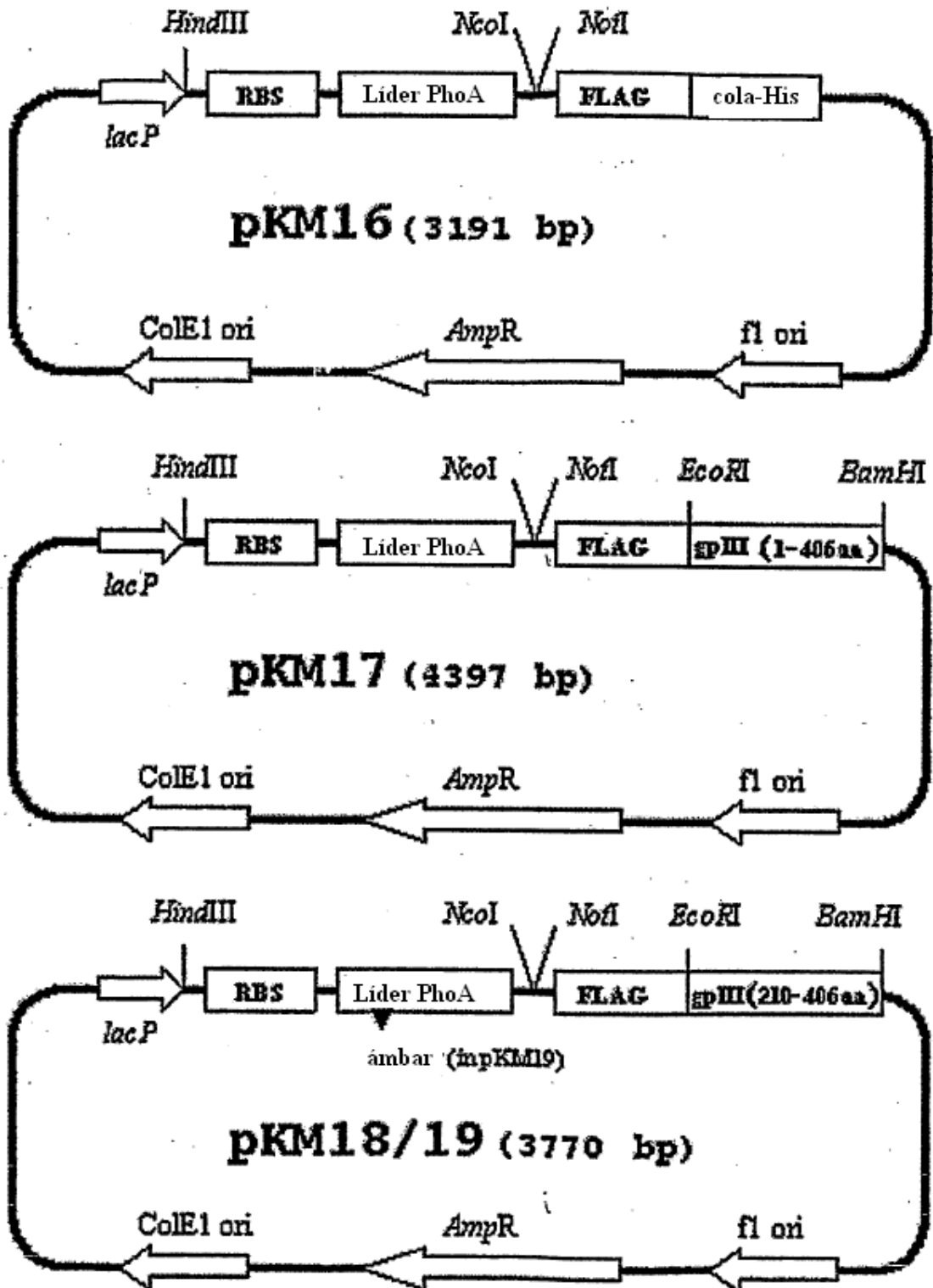
50 <210> 102
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> cebador
 <400> 102
 gctgaggaga cggtgacc 18

REIVINDICACIONES

1. Un vector adecuado para eficiente selección y/o maduración de un anticuerpo recombinante perteneciente al grupo de: ScFv, fragmentos activos de Abs, secuencias humanizadas de Ab, dicho vector **se caracteriza porque**
- 5 i) contiene al menos un elemento capaz de reducir el nivel de expresión del anticuerpo recombinante perteneciente al grupo de: a) un codón de detención suprimido dentro del péptido líder o la secuencia codificadora del anticuerpo; b) un promotor de eficiencia baja que dirige la transcripción de dicha secuencia codificadora del anticuerpo; y
- 10 ii) tiene una mejor eficacia de despliegue de dicho anticuerpo recombinante por medio de: a) fusión de la secuencia codificadora del anticuerpo recombinante a la secuencia que codifica la parte carboxi-terminal de la proteína pIII; y b) por el uso como péptido líder del péptido líder del anticuerpo recombinante de la fosfatasa alcalina de *E. coli*; y c) eliminar cualquier codón ámbar entre la secuencia codificadora del anticuerpo recombinante y la secuencia codificadora de pIII, en el que el nivel de expresión del anticuerpo recombinante se puede reducir con un inhibidor del promotor que dirige la transcripción de dicha secuencia codificadora del anticuerpo.
- 15
2. El vector de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el vector es un plásmido, un fagémido o un fago.
3. Un vector de fagémido de acuerdo con la reivindicación 2 que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1.
4. Una biblioteca de anticuerpo de despliegue en fago que consiste en el vector de acuerdo con la reivindicación 1 a 3 y ADNc, o secuencias de anticuerpo sintéticas o semisintéticas, incluso mutadas por maduración de afinidad de anticuerpos clonados en dicho vector.
- 20
5. La biblioteca de acuerdo con la reivindicación 4 en la que los ADNc derivan de las células productoras de anticuerpo.
6. La biblioteca de acuerdo con la reivindicación 5 en la que las células productoras de anticuerpo son Linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) o Linfocitos de sangre periférica (PBL).
- 25
7. La biblioteca de acuerdo con la reivindicación 6 en la que las células productoras de anticuerpo se aíslan de un sujeto afectado por tumor.
8. La biblioteca de acuerdo con la reivindicación 7 en la que el sujeto afectado por tumor es un sujeto afectado de cáncer de mama.
- 30
9. Una célula huésped transformada con el vector de acuerdo con la reivindicación 1 a 3.
10. Un método para mejorar la selección y/o maduración de un anticuerpo recombinante que comprende la etapa de clonar y expresar ADNc, o secuencias de anticuerpo sintéticas o semisintéticas, incluso mutadas por maduración de afinidad de los anticuerpos en el vector de acuerdo con la reivindicación 1 a 3.

Figura 1



```

1  GCCCAATACG CAAACCGCCT CTCCCCGCGC GTTGGCCGAT TCATTAATG
                                     >Plac<
                                     C

51  AGCTGGCACG ACAGGTTTCC CGACTGGAAA GCGGGCAGTG AGCGCAACGC
101 AATTAATGTG AGTTAGCTCA CTCATTAGGC ACCCCAGGCT TTACACTTTA
151 TGCTTCCGGC TCGTATGTTG TGTGGA
                                     <Plac<
                                     ATTG TGAGCGGATA ACAATTCAC

201 ACAAGATCTA GCTATTCTAG AGATTA
                                     >: péptido alfa >
                                     CGCC AAGCCCC
                                     >fl.seg>
                                     GTA TTTTACCCGT

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

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

                                     >gpIII (parte C-terminal)
C TGCCTCAACC TCCTGTC AAT

426 GCTGGCGGCG GCTCTGGTGG TGGTTCTGGT GGCGGCTCTG AGGGTGGCGG
476 CTCTGAGGGT GGCGGTTCTG AGGGTGGCGG CTCTGAGGGT GGCGGTTCCG
526 GTGGCGGCTC CGGTTCCGGT GATTTTGATT ATGAAAAAAT GGCAAACGCT
576 AATAAGGGGG CTATGACCGA AAATGCCGAT GAAAACGCGC TACAGTCTGA
626 CGCTAAAGGC AAAC TTGATT CTGTCGCTAC TGATTACGGT GCTGCTATCG
676 ATGGTTTCAT TGGTGACGTT TCCGGCCTTG CTAATGGTAA TGGTGCTACT
726 GGTGATTTTG CTGGCTCTAA TTCCCAAATG GCTCAAGTCG GTGACGGTGA
776 TAATTCACCT TTAATGAATA ATTTCCGTCA ATATTACCT TCTTTGCCTC
826 AGTCGGTTGA ATGTCGCCCT TATGTCTTTG GCGCTGGTAA ACCATATGAA
876 TTTTCTATTG ATTGTGACAA AATAAACTTA TTCCGTGGTG TCTTTGCGTT
926 TCTTTTATAT GTTGCCACCT TTATGTATGT ATTTTCGACG TTTGCTAACA
                                     gpIII end>
976 TACTGCGTAA TAAGGAGTCT TAAGGATCC
                                     BamHI

```

Fig. 2

```

>...gpIV
                                TAATA TTGTTCTGGA TATTACCAGC
1030 AAGCCGATA GTTGTGAGTTC TTCTACTCAG GCAAGTGATG TTATTACTAA
1080 TCAAAGAAGT ATTGCGACAA CGGTTAATTT GCGTGATGGA CAGACTCTTT
1130 TACTCGGTGG CCTCACTGAT TATAAAAACA CTTCTCAGGA TTCTGGCGTA
1180 CCGTTCCTGT CTAAAATCCC TTTAATCGGC CTCCTGTTTA GCTCCCCTC
1230 TGATTCTAAC GAGGAAAGCA CGTTATACGT GCTCGTCAA GCAACCATAG
      detención de gpIV final >fl-ori
1280 TACGCGCCCT GTAGCGGCGC ATTAAGCGCG GCGGGTGTGG TGTTACGCG
1330 CAGCGTGACC GCTACACTTG CCAGCGCCCT AGCGCCCGCT CCTTTCGCTT
1380 TCTTCCCTTC CTTCTCGCC ACGTTCGCCG GCTTTCCTCCG TCAAGCTCTA
1430 AATCGGGGGC TCCCTTTAGG GTTCCGATT AGTGCTTTAC GGCACCTCGA
1480 CCCCACAAAA CTGATTAGG GTGATGGTTC ACGTAGTGGG CCATCGCCCT
1530 GATAGACGGT TTTTCGCCCT TTGACGTTGG AGTCCACGTT CTTTAATAGT
1580 GGA CTCTTGT TCCAACTGG AACAACTC AACCCATCT CGGTCTATTC
1630 TTTTGATTTA TAAGGGATT TGCCGATTTC GGCCTATTGG TTAACAAATG
1680 AGCTGATTTA ACAAAAATTT AACCGAATT TTAACAAAT ATTAACGTTT
1730 ACAATTTAAA TATTGCTTA TACAATCTTC CTGTTTTTGG GGCTTTTCTG
      <fl-ORI<
1780 ATTATCAACC GGGGTACAT
                                inicio gpII
                                A TGATTGACAT GCTAGTTTTA CGATTACCGT
1830 TCATCGCAGG TGGCACTTTT CGGGGAAATG TCGCGGGAAC CCCTATTTGT
1880 TTATTTTTCT AAATACATTC AAATATGTAT CCGCTCATGA GACAATAACC
1930 CTGATAAATG CTTCAATAAT ATTGAAAAG GAAGAGTATG AGTATTCAAC
1980 ATTTCCGTGT CGCCCTTATT CCCTTTTTTG CGGCATTTTG CCTTCTGTT
2030 TTTGCT
                                >beta-lactamasa:>
                                CACC CAGAAACGCT GGTGAAAGTA AAAGATGCTG AAGATCAGTT
2080 GGGTGCACGA GTGGGTTACA TCGAACTGGA TCTCAACAGC GGTAAGATCC
2130 TTGAGAGTTT TCGCCCCGAA GAACGTTTTT CAATGATGAG CACTTTTAAA
2180 GTTCTGCTAT GTGGCGCGGT ATTATCCCGT ATTGACGCCG GGCAAGAGCA
2230 ACTCGGTGCG CGCATACT ATTCTCAGAA TGACTTGGTT GAGTACTCAC
2280 CAGTCACAGA AAAGCATCTT ACGGATGGCA TGACAGTAAG AGAATTATGC
2330 AGTGCTGCCA TAACCATGAG TGATAACACT GCGGCCAACT TACTTCTGAC

```


Figura 3

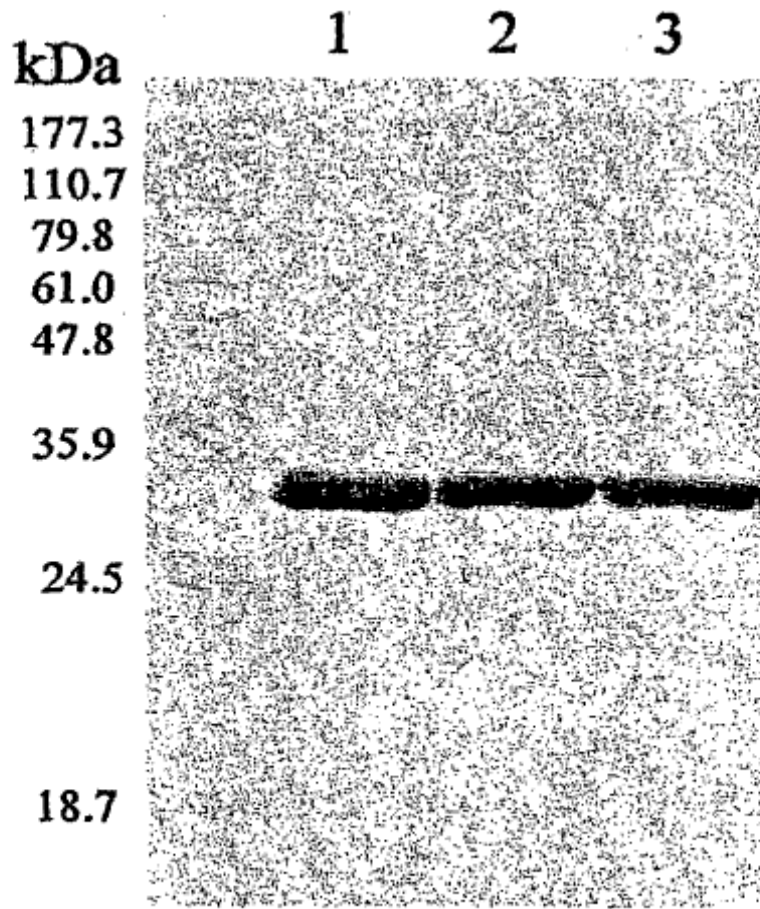


Figura 4

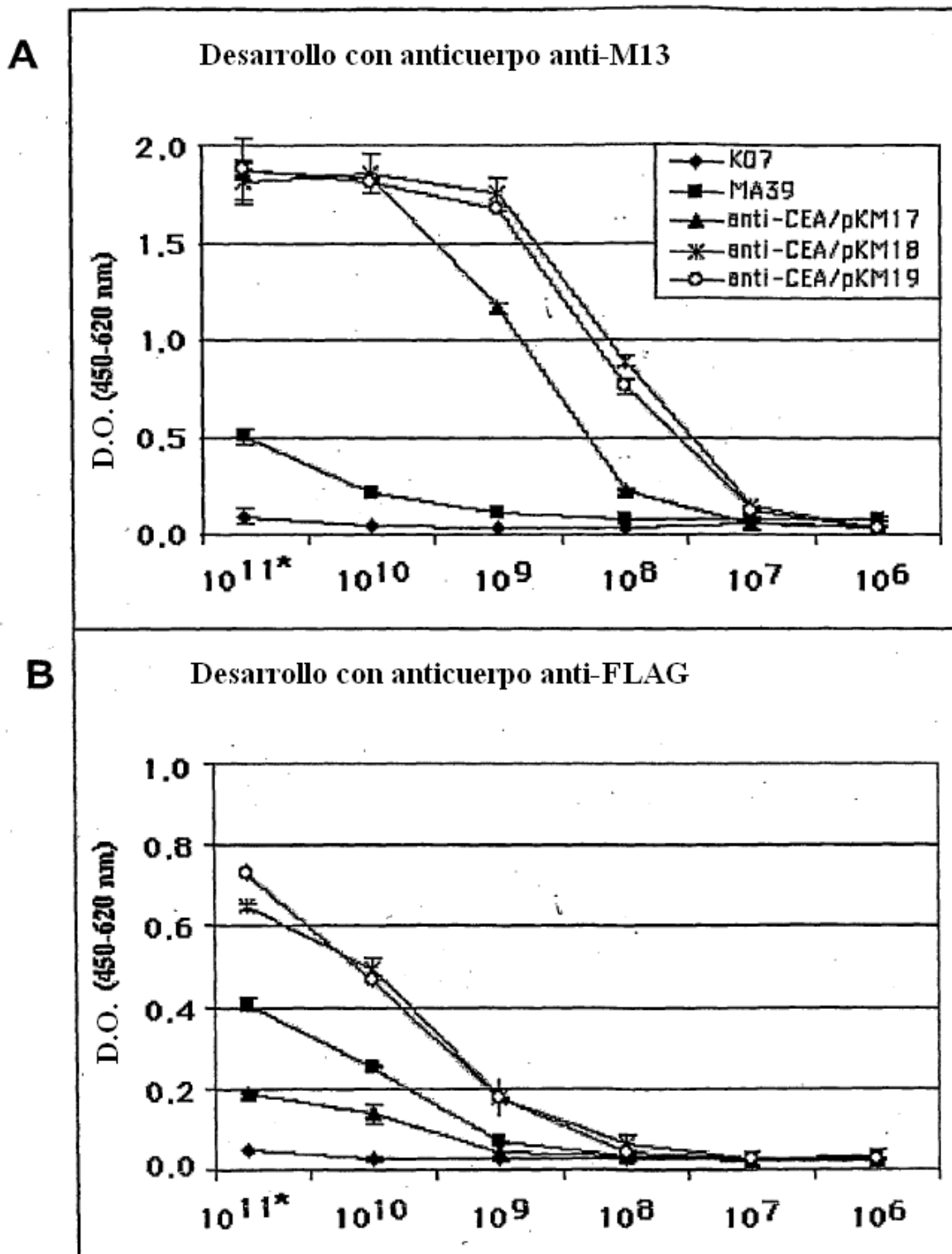
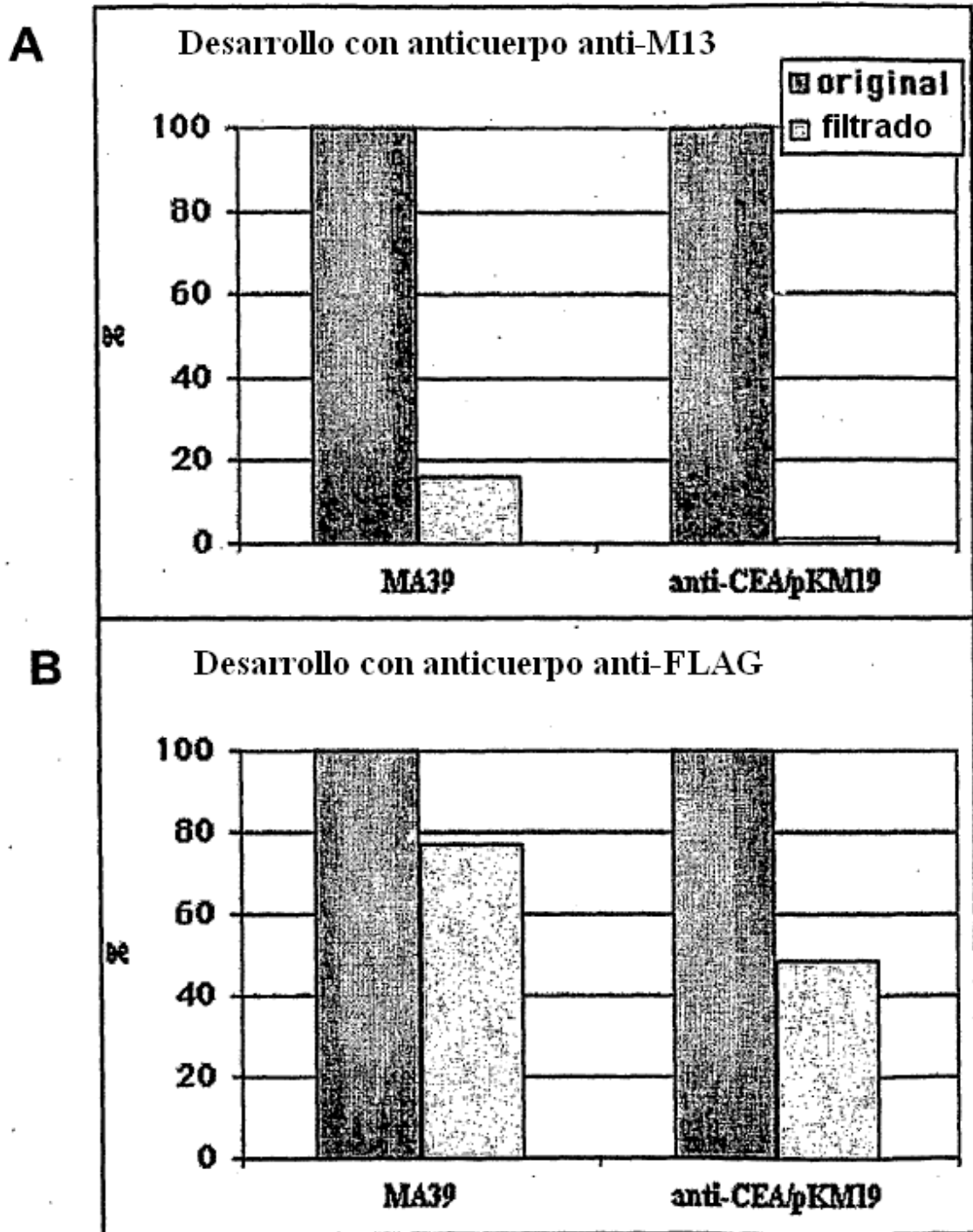


Figura 5



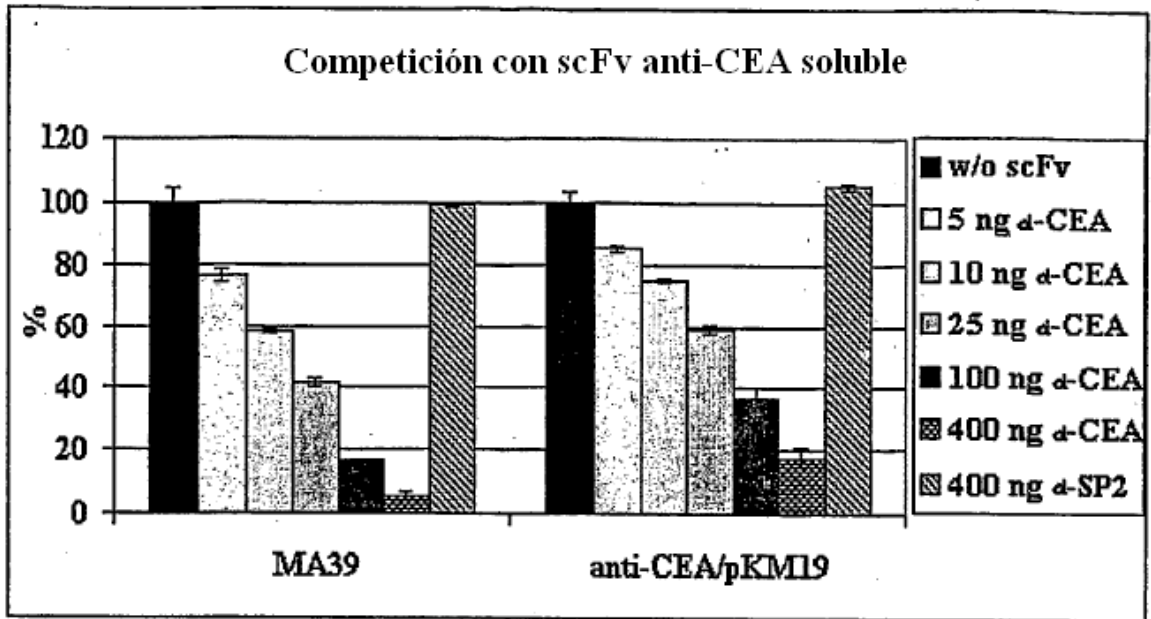


Fig. 6

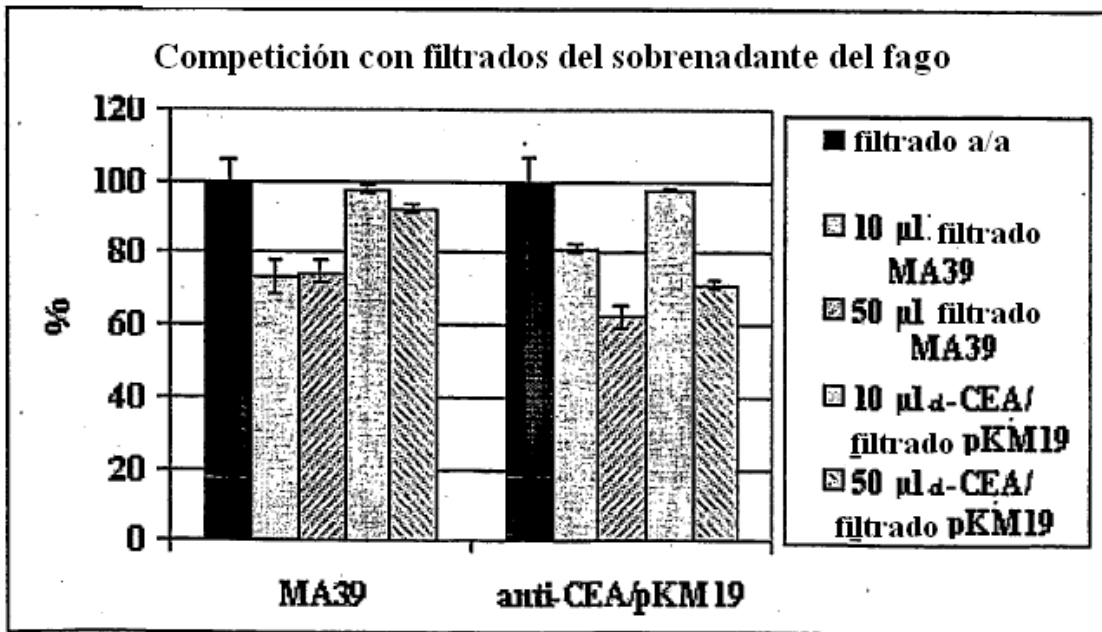
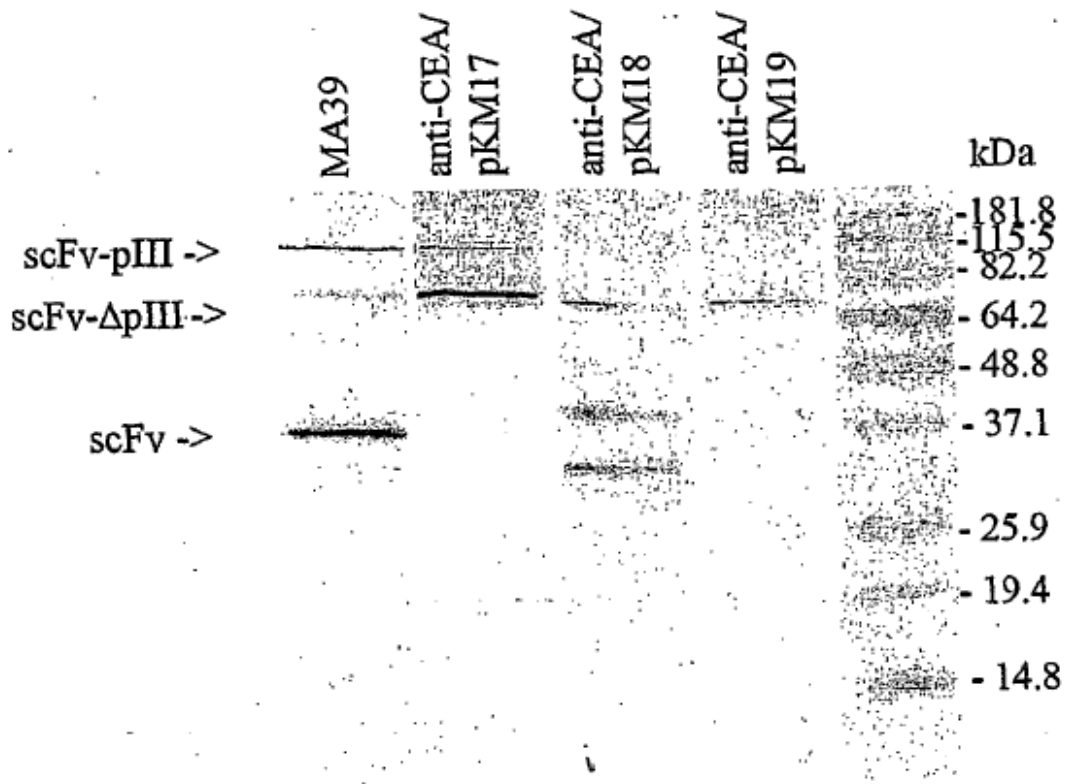


Fig. 7

Figura 8



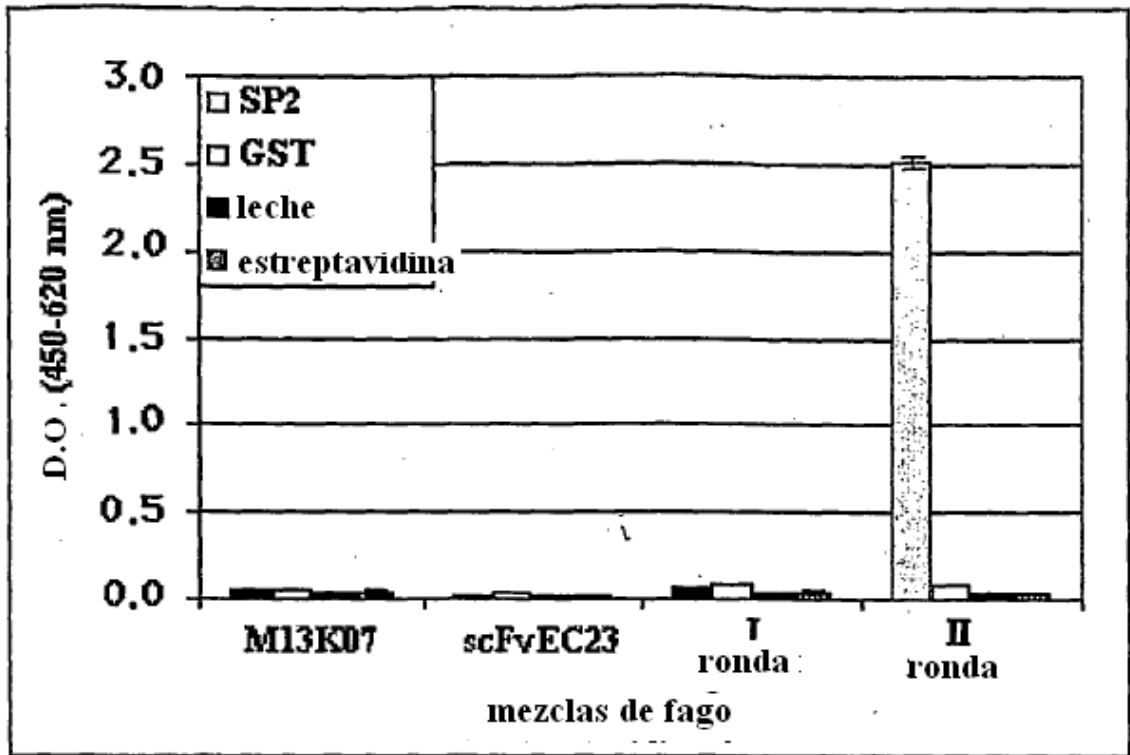


Fig. 9

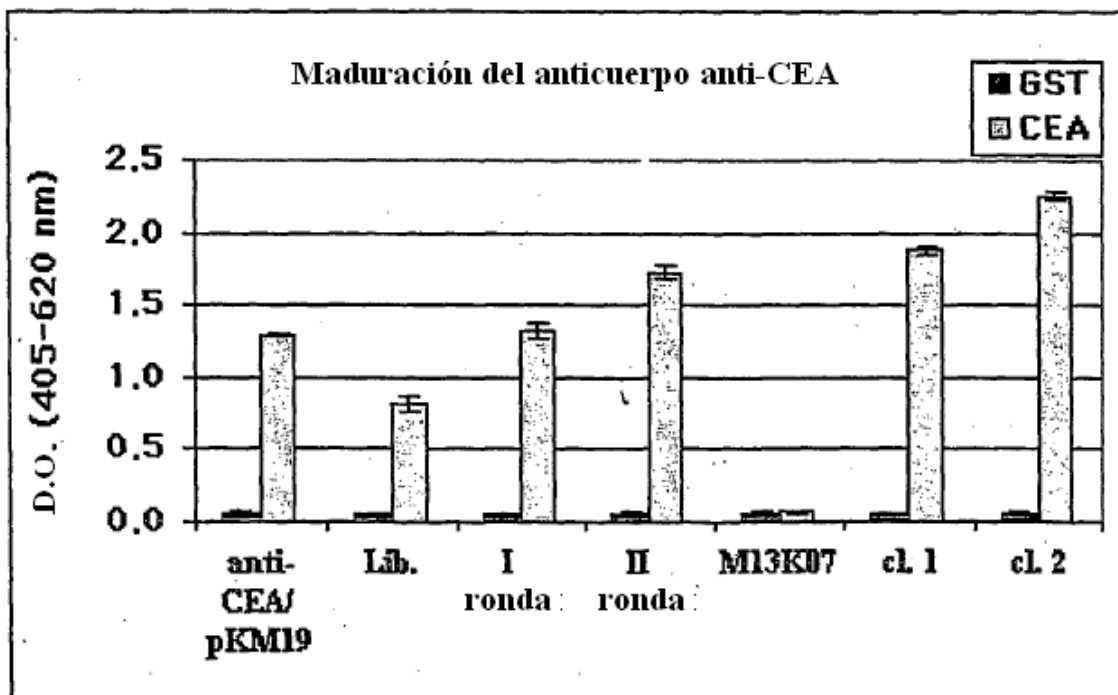


Fig. 10

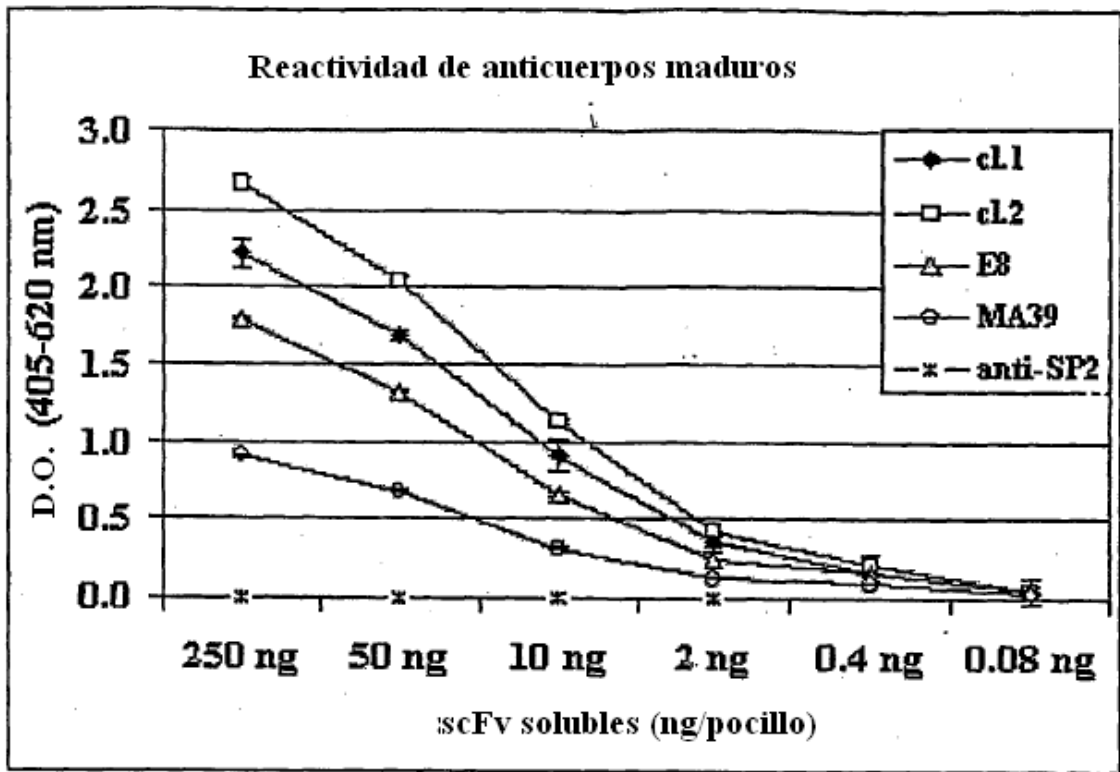


Fig. 11

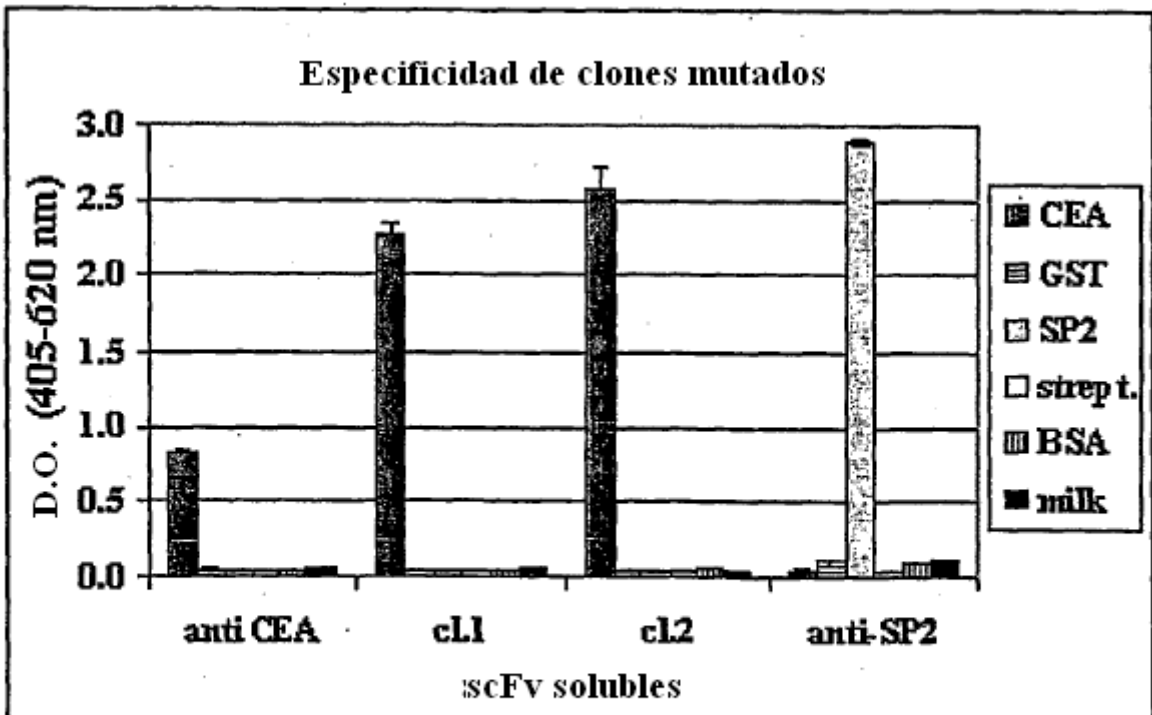


Fig. 12

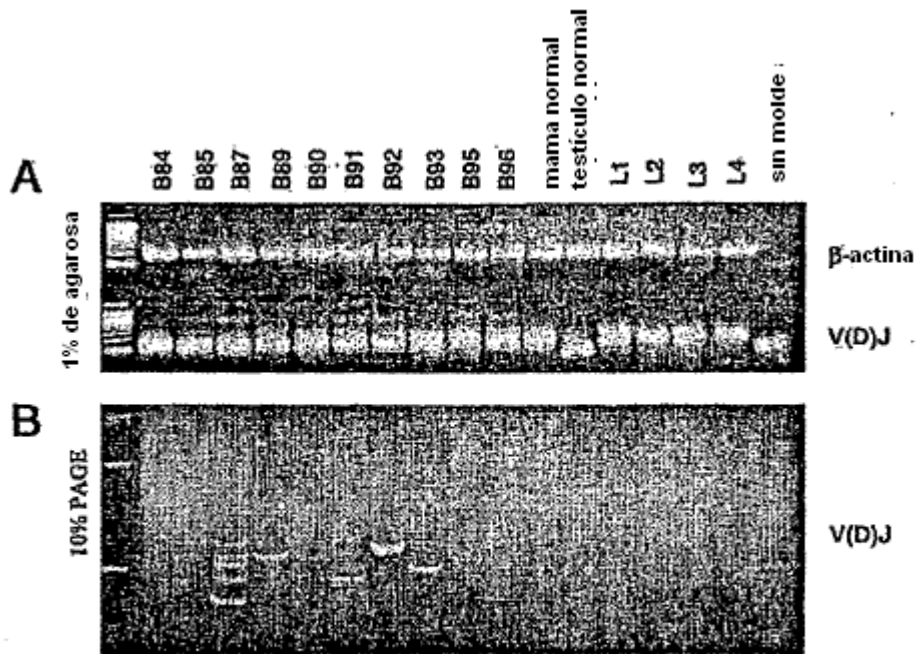


Fig. 13

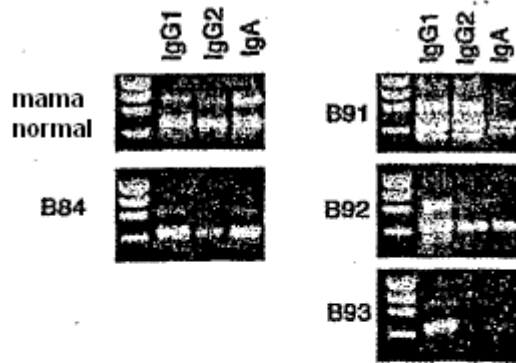


Fig. 14

cadena pesada B92

VH	número de clones	CDR1	CDR2	CDR3
B92-A	8	SNSAAWS	TRYYSKQYNDYALS VKS	WKAFTAVAGPNYYGMDV
B92-B1	5	SYYS	RIYASGRPKYNPSLKS	VYSSSLTDFDYYGLDV
B92-B2	1	-----	-----	-C-----
B92-C1	2	GSSNYWG	SIHYIGTTYINPSFKS	RTRWCWFDP
B92-C2	1	-----	-T-----	-----

cadena pesada B93 :

VH	número de clones	CDR1	CDR2	CDR3
B93-A1	5	NYSLN	AISSSGTYRFYADSLRG	DLGDLEWLHSPDP
B93-A2	1	---F-	---R-----	---D-----
B93-B1	5	SYWID	IIYPDDSDTRYSPSFQG	RGDSGTLWGD
B93-B2	1	N----	-----	-----
B93-C	1	SYAMN	SISGSGIGTYIYANSVOG	DEINQLPGYYFDY

Figura 15

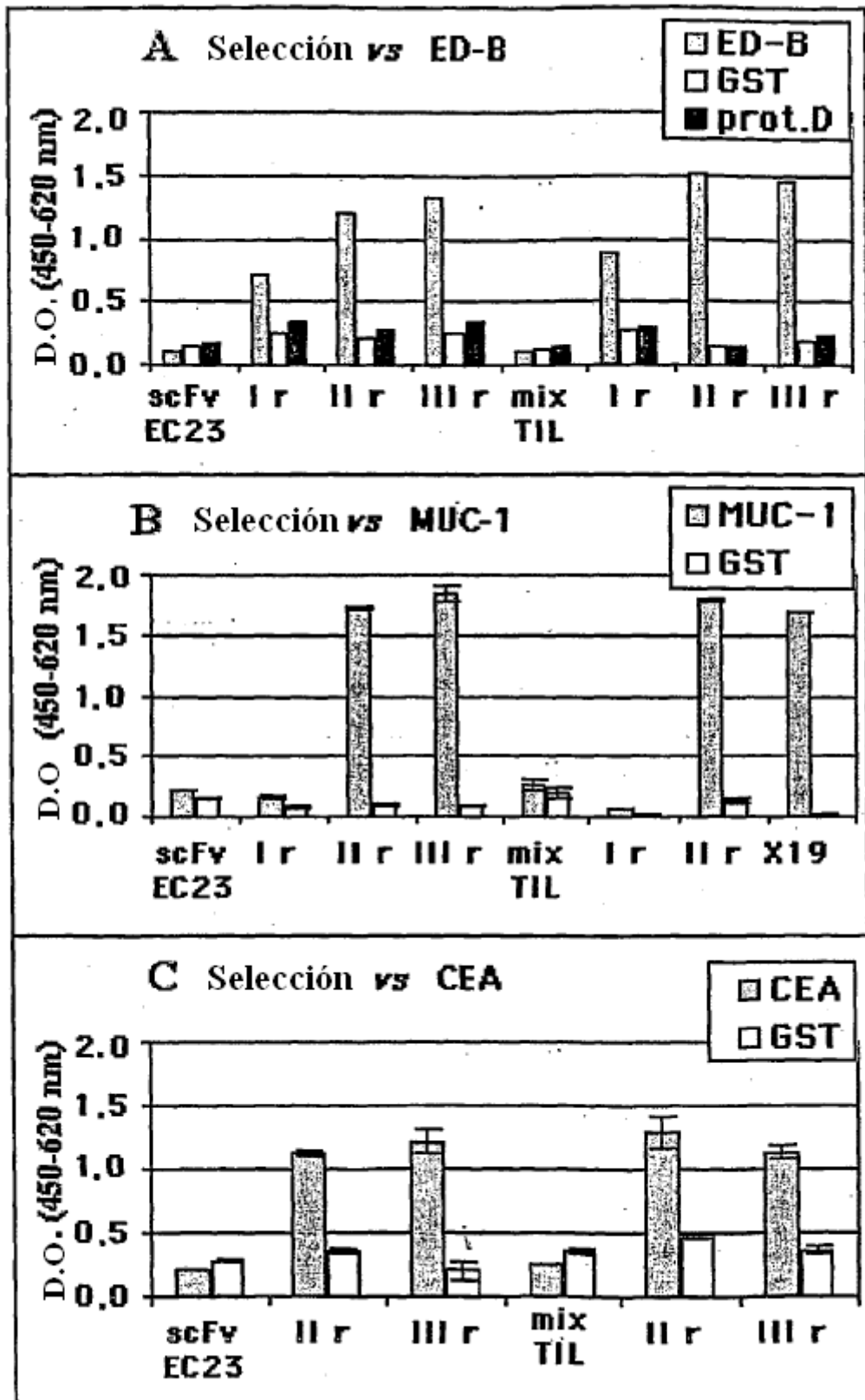


Figura 16

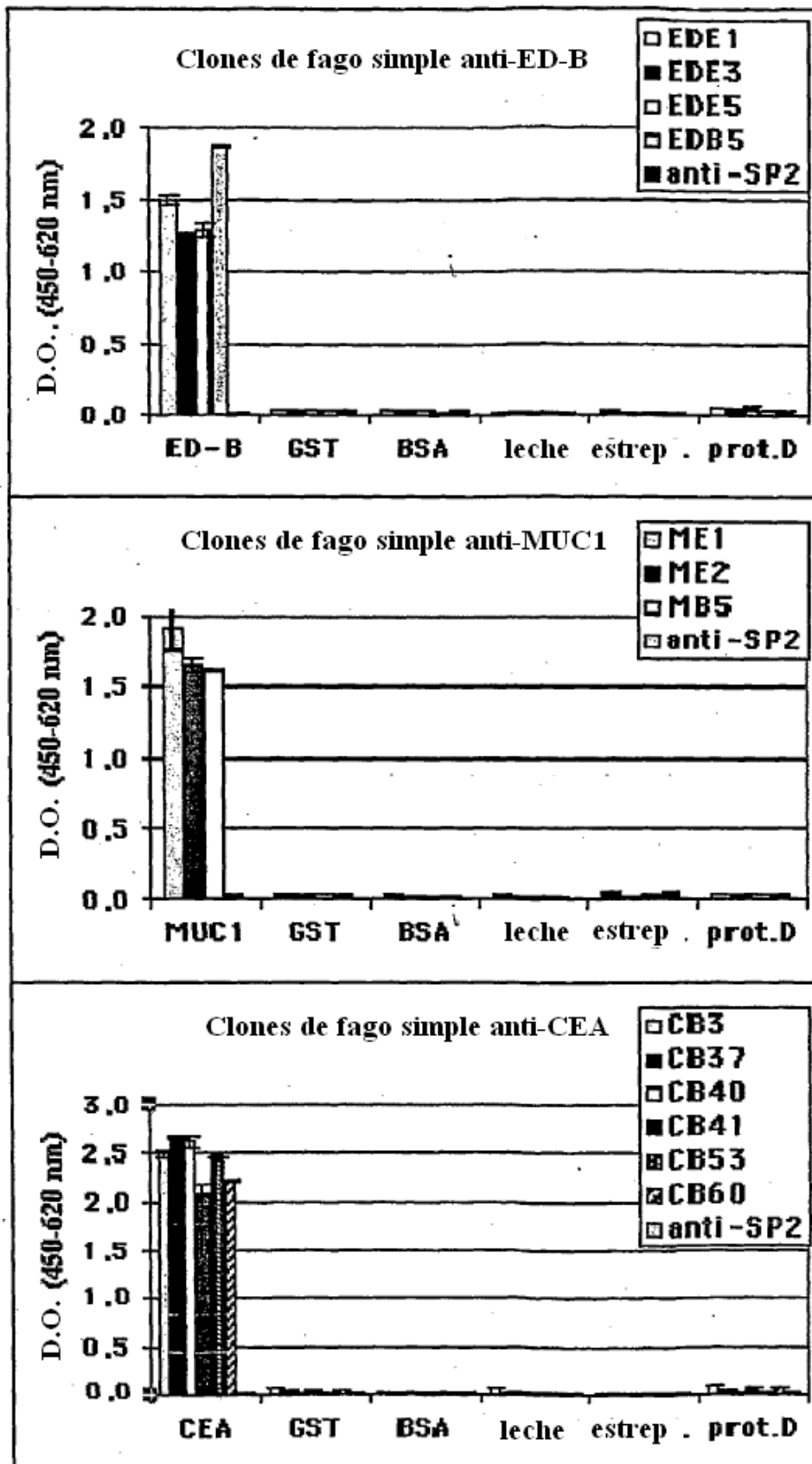


Fig. 17

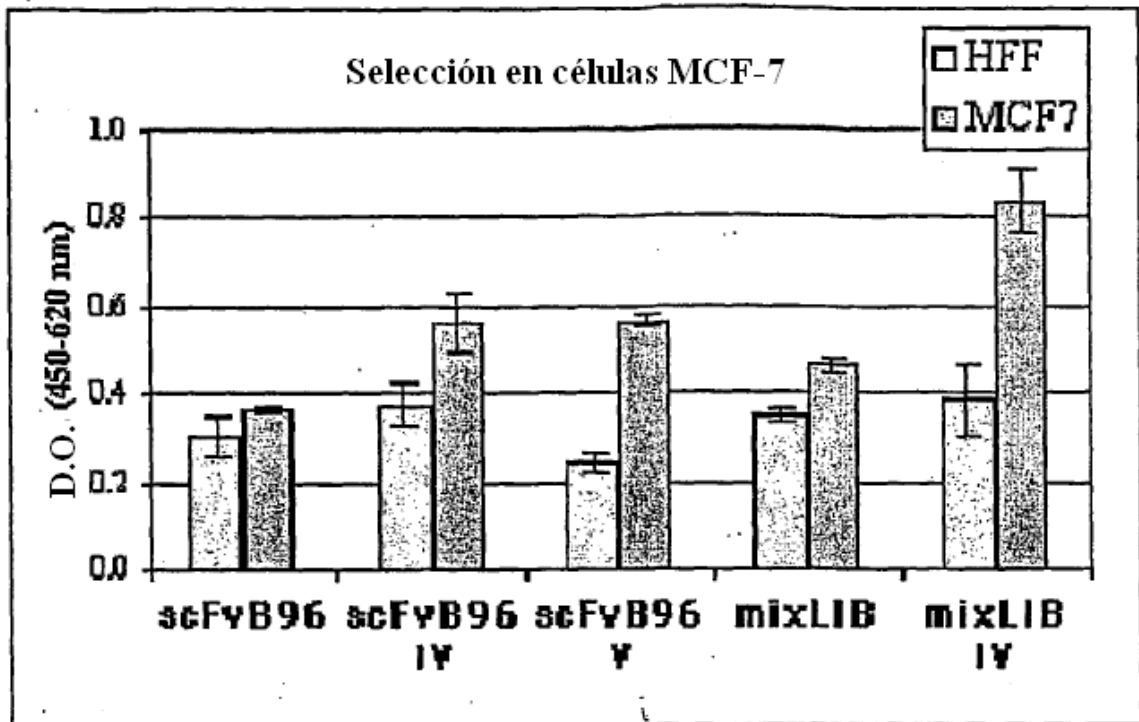


Figura 18

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

Fig. 19

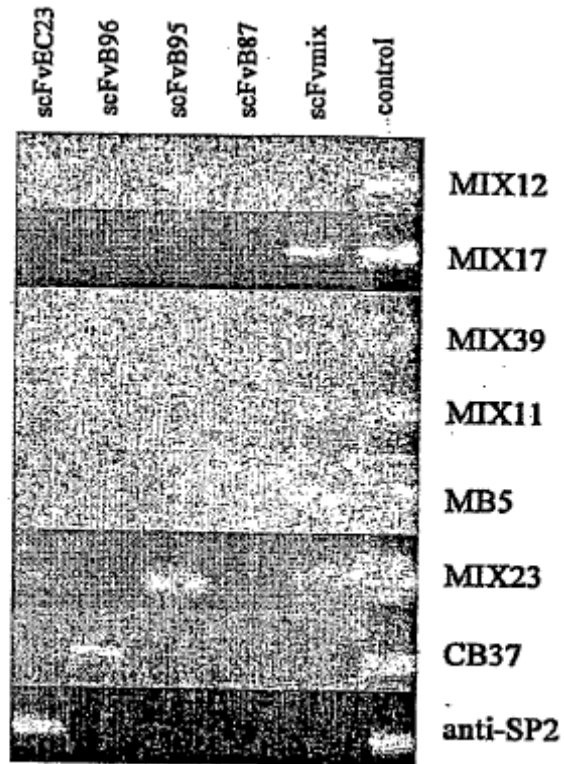


Figura 20

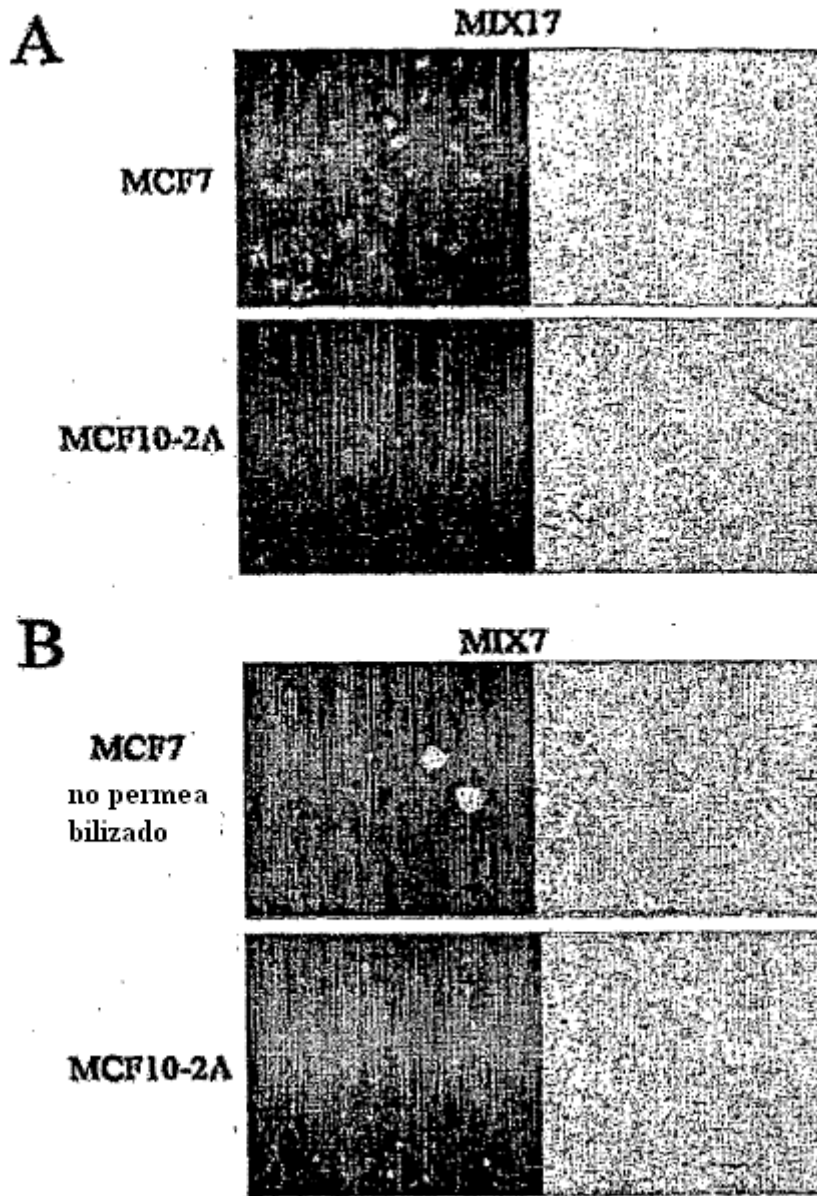


Figura 21

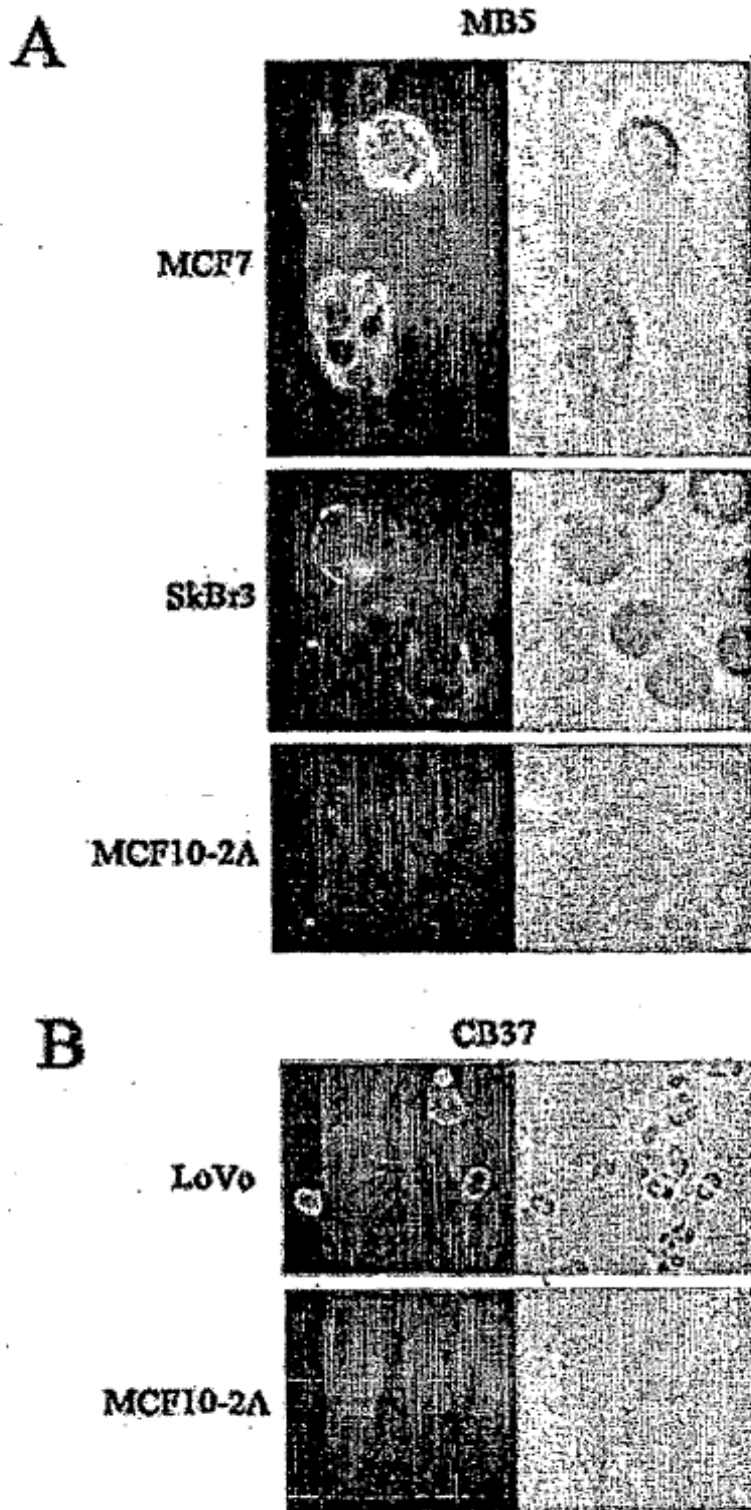


Fig. 22