

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

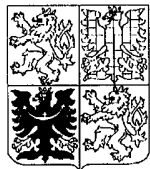
2000 - 1927

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 15/21	A 01 K 67/027
C 07 K 14/435	C 12 N 15/00
A 61 K 38/17	A 61 P 37/00
A 61 K 31/40	
A 61 K 31/19	
A 61 K 31/66	
A 61 K 31/35	
G 01 N 33/68	

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **26.11.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **26.11.1997 26.06.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/9725046 1998/9813917**

(33) Země priority: **GB GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **11.10.2000**
(Věstník č. 10/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/GB98/03530**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/27104**

(71) Přihlašovatel:

OXFORD VACS LTD., London, GB;

(72) Původce:

Nuttall Patricia Ann, Culham, GB;

Paesen Guido Christian, Oxford, GB;

(74) Zástupce:

Všetečka Miloš JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Vazebné molekuly pro histamin a serotonin

(57) Anotace:

Řešení se týká vazebných molekul pro histamin a serotonin, které mají vazebné místo s přesnou molekulovou konfigurací, která je nutná, aby propůjčila molekule vysokou afinitu k histaminu. Jedná se o proteiny, peptidy a chemické sloučeniny, které mají tuto molekulovou konfiguraci a mohou se tudíž vázat s vysokou afinitou k histaminu. Tyto molekuly mohou být použity při regulaci účinku histaminu nebo serotoninu, detekci a kvantifikaci histaminu nebo serotoninu a v léčení různých nemocí a alergií. Molekuly mohou být také použity jako složky vakcín namířených proti ektoparazitům sajícím krev.

Vazebné molekuly pro histamin a serotonin

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká vazebných molekul pro histamin a serotonin. Konkrétně se předkládaný vynález týká vazebných molekul pro histamin a serotonin majících vazebné místo s přesnou molekulovou konfigurací, která je nutná, aby propůjčila molekule vysokou afinitu k histaminu. Jako příklady provedení vynálezu jsou uvedeny proteiny, peptidy a chemické sloučeniny, které mají tuto molekulovou konfiguraci a mohou se tudíž vázat s vysokou afinitou k histaminu. Molekuly podle předkládaného vynálezu mohou být použity pro regulaci působení histaminu nebo serotoninu, jsou tedy použitelné pro detekci a kvantifikaci histaminu nebo serotoninu a také pro léčení různých nemocí a alergií.

Dosavadní stav techniky

Vazoaktivní aminy jako je histamin a serotonin jsou mediátory zánětu a regulátory určitých fyziologických procesů u zvířat, včetně lidí. Histamin je přítomen v sekrečních granulích žírných buněk a bazofilech a je tvořen dekarboxylací histidinu. Vyskytuje se také v námelu a v rostlinách a může být syntetizován uměle z histidinu nebo kyseliny citronové.

Hlavní účinek histaminu u lidí je stimulace žaludeční sekrece, kontrakce většiny tkáně hladkého svalstva, srdeční stimulace, vazodilatace a zvýšená vaskulární permeabilita. Kromě své regulační úlohy v imunitních reakcích a zánětlivých procesech moduluje histamin také tvorbu mnoha cytokinů v organismu (včetně těch, které řídí zánět), a může také interferovat s expresí cytokinových receptorů. Navíc histamin podporuje hojení ran.

Hlavní patofyziologické působení histaminu je jako činidlo stimulující sekreci žaludeční kyseliny a jako mediátor reakcí přecitlivělosti typu I, jako je kopřivka a senná rýma. Histamin a jeho receptory mají také patologické aspekty svých funkcí. Hrají dominantní úlohu u alergií, jako je astma, alergická rýma, atopická dermatitida a potravinové a lékové alergie, které postihují velký počet lidí a jsou důležitou příčinou nemocí a úmrtnosti. Histamin nebo jeho receptory mohou být také zapojeny buď přímo nebo nepřímo do autoimunitních nemocí, např. artritidy, a do růstu nádorů (Falus, 1994).

Hormon serotonin (také znám jako 5-hydroxytryptamin) je jak vazokonstriktor, tak neurotransmitter. Může také zvyšovat vaskulární permeabilitu, indukovat dilatace kapilár a způsobit kontrakci hladkého svalstva mimo cévy. Serotonin se vyskytuje v mozku a střevních tkáních a je tvořen epifýzou a krevními destičkami. Patologické aspekty týkající se serotoninu zahrnují abnormální krevní tlak, migrénu, psychologické poruchy, respirační nemoci a ischemickou chorobu srdeční. Agonisté a antagonisté serotoninu se používají k léčení některých těchto poruch, ale mají často nežádoucí vedlejší účinky.

Antihistaminika se hodně používají, zejména pro léčení alergií. Většina těchto léků jsou sloučeniny, které jsou strukturálně příbuzné histaminu a vážou se na jeho receptor(y), a tím zabraňují interakci histaminu se svým receptorem. Takové léky, jaké jsou v současnosti dostupné, mají často nežádoucí vedlejší účinky (například ospalost) a nejsou vždy vysoce účinné.

Histamin dosahuje svého účinku působením na specifické histaminové receptory, které jsou tří hlavních typů H_1 , H_2 a H_3 , rozlišitelné pomocí selektivních antagonistů a agonistů. Antagonisté histaminu H_1 a H_2 mají klinické použití, ale

antagonisté histaminu H_3 jsou v současnosti používány hlavně jako výzkumný nástroj. Zdá se, že intracelulární histamin je zapojen do buněčného růstu (podpora růstu nádorů) a obnovy tkání. Má se za to, že jsou v těchto procesech zapojeny doposud nedefinované intracelulární histaminové receptory (Falus, 1994).

Histaminové receptory jsou předmětem soustředěného výzkumu po celou řadu let. Avšak jsou k dispozici pouze útržkovité informace, co se týká struktury aktivního místa těchto molekul, receptor H_3 vskutku nebyl ještě klonován. Nedostatek jakékoli přímé informace o struktuře těchto proteinů je pravděpodobně způsoben faktem, že proteiny histaminového receptoru jsou membránové proteiny, které se denaturují v nepřítomnosti lipidu a jdou v důsledku toho velmi obtížně krystalizovat.

Na základě faktu, že receptory typu H_1 , a H_2 a patří do široké třídy sedmi transmembránových receptorů spojených s proteinem G, se předpokládá, že mají převážně strukturu alfa-šroubovice. Na těchto receptorech se prováděl velký počet studií s místně cílenou mutagenezí, které ukázaly určité zbytky, které jsou důležité pro vazbu histaminu. Má se za to, že v receptoru H_2 k vazebné kapse pro histamin přispívají Asp⁹⁸, Asp¹⁸⁶ a Thr¹⁹⁰ (Gantz a kol., 1992).

Obvyklí antagonisté receptoru H_1 se široce používají jako antihistaminika pro léčení alergických reakcí včetně alergické rýmy (senné rýmy), kopřivky, poštipání hmyzem a přecitlivělosti na léky. Dává se přednost lékům, které postrádají sedativní účinek nebo antagonistům muskarinových receptorů. Antagonisté receptoru H_1 jsou také používány jako antiemetika pro prevenci kinetóz nebo jiných příčin nauzey včetně vážné ranní nevolnosti. Účinek antagonistů muskarinových receptorů některých antihistaminik pravděpodobně přispívá k účinnosti, ale také způsobuje vedlejší účinky.

Některí antagonisté receptoru H_1 , jsou dosti silná sedativa a pro tento svůj účinek mohou být využívána.

Ale v současnosti používání antagonisté receptoru H_1 mají četné nežádoucí účinky. Když se použijí pouze pro čisté antihistaminové působení, je všechen vliv na CNS nežádoucí. Když se použijí pro svůj sedativní nebo antiemetický účinek, jsou nežádoucí některé z účinků na CNS, jako je závrať, hučení v uších a únava. Nadměrné dávky mohou způsobit excitaci a u dětí mohou vyvolat křeče. Periferní antimuskarinové působení je vždy nežádoucí. Nejběžnější z nežádoucích vedlejších účinků je suchost v ústech, ale může se také objevit rozostřené vidění, zácpa a retence moči. Jsou také pozorovány nežádoucí účinky, které nemají vztah k farmaceutickému působení léčiva. Jsou tedy dosti běžné gastrointestinální poruchy, zatímco po lokální aplikaci těchto léčiv může následovat alergická dermatitida.

Antagonisté H_2 jsou často používány jako inhibitory sekrece žaludeční kyseliny. Jsou používány jako léky volby v léčení peptického vředu, jako léky druhé linie v léčení Zollinger-Ellisonova syndromu a pro léčení refluxní ezofagitidy. Byly hlášeny nežádoucí účinky, které zahrnují průjem, závrať, bolesti svalů, prchavé vyrážky a překrvení žaludku. Některí antagonisté receptoru H_2 mohou vyvolat gynekomastii u mužů a zmatenost u starších pacientů.

Kromě těchto nežádoucích účinků působí někteří antagonisté histaminu nesnáze, jestliže se berou společně s alkoholem nebo jinými léky. Například antihistaminikum Seldan používané v kombinaci s antibiotiky a protihoubovými léky může vyvolat život ohrožující vedlejší účinky.

Často je pozorováno, že léky používané k potlačení působení histaminu nejsou vždy úspěšné. Důvody, proč mají omezenou účinnost, se mohou týkat specifčnosti těchto léků pro pouze podskupinu histaminových receptorů, obzvláště když

určitá skupina podmínek vyžaduje interferenci s větší skupinou receptorů. Molekuly, které se doopravdy vážou na samotný histamin, kompetují o vazbu na histamin se všemi receptory a mohou být tak vhodnější pro léčení určitých stavů.

Jsou tudíž velice potřební účinní antagonisté histaminu a serotoninu, kteří nevyvolávají vedlejší účinky, které zmenšují jejich použitelnost v léčení chorob u lidí a zvířat.

Je také velice potřebná kvantifikace histaminu například v potravinových produktech, různých tělesných tekutinách (např. plazmě nebo moči) nebo supernatantech z buněčných kultur, například pro sledování vlivu určitých alergenů, nebo pro indikaci potenciální specifické antagonistické léčby alergické reakce. Systémy používané v současnosti (radioimunotesty a testy ELISA) používají protilátky proti histaminu nebo histaminovým derivátům. Ale histamin není silně imunogenní, což ztěžuje úkol vypěstovat protilátky proti histaminu s vysokou afinitou, a většina kvantifikačních systémů, které jsou v současnosti používány, není příliš citlivá nebo vyžaduje modifikaci měřeného histaminu (například pomocí metylace nebo acylace). Použití molekul, které se vážou na histamin v jeho přirozené formě, což by nahradilo protilátky v testech jako jsou výše uvedené, by poskytlo vysoce senzitivní systém pro měření nemodifikovaného histaminu. Podobně by mohly být použity molekuly, které se váží k serotoninu, pro jeho kvantifikaci.

Molekuly schopné vázat histamin byly dříve identifikovány u ektoparazitů, kteří se živí krví. Například bylo zjištěno, že hemový protein nesoucí oxid dusnatý (nitroforin) váže histamin, tento protein se vyskytuje ve slinách dravých ploštic čeledi zákeřnicovitých (rody *Triatoma*, *Rhodnius*, např. *Rhodnius prolixus* (Ribeiro a Walker, 1994). Izolace čtyř proteinů vázajících vazoaktivní aminy (VABPs) z roztočů je popsána v současně projednávané mezinárodní patentové

příhláše č. PCT/GB97/01372, jejímž přihlašovatelem je také přihlašovatel předkládaného vynálezu. Obsah PCT/GB97/01372 je v úplnosti formou odkazu zahrnut do předkládané přihlášky.

Tyto proteiny vážou histamin a jsou navzájem blízce příbuzné. Jmenují se MS-HBP1, FS-HBP1, FS-HBP2 a D.RET6. některé z těchto molekul také vážou serotonin (například FS-HBP2). V jiných případech, jako například v případě D.RET6, se má za to, že vazba serotoninu mění afinitu molekuly k histaminu. Sekvence DNA, které kódují tyto proteiny, jsou v současnosti užívány k izolaci dalších příbuzných proteinů téže rodiny ze stejného živočišného druhu a druhů odlišných.

Zdá se, že tyto molekuly jsou výrazně odlišné od proteinů vázajících histamin z jakékoliv rodiny H_1 , H_2 nebo H_3 , a vážou histamin jiným způsobem. Objasnění struktury vazebného místa pro histamin těchto molekul by výrazně urychlilo racionální navrhování účinných antagonistů histaminu, u kterých by byly nepravděpodobné vedlejší účinky, které jsou spojené s obvyklými antihistaminiky.

Podstata vynálezu

První aspekt předkládaného vynálezu poskytuje sloučeninu vázající histamin nebo serotonin, která je schopná vázat histamin nebo serotonin s disociační konstantou menší než 10^{-7} M a která má vazebné místo obsahující aminokyselinový zbytek fenylalanin, isoleucin nebo leucin v pozici I, tryptofan v pozici II a aspartát nebo glutamát v pozici III a IV, přičemž zbytky I až IV jsou umístěny v podstatě stejně jako zbytky 108, 42, 39 a 82, v příslušném pořadí, v každé ze sekvencí id. č. 1 nebo 2, nebo zbytky 107, 41, 38 a 78 v sekvenci id. č. 3 nebo zbytky 122, 54, 50 a 95 v sekvenci id. č. 4, a její funkční ekvivalenty. Dále bude toto vazebné

místo nazýváno „první vazebné místo“. Proteiny identifikované v sekvencích id. č. 1 až 4 jsou známy jako FS-HBP1, FS-HBP2, MS-HBP1 a D.RET6, v uvedeném pořadí.

Druhý aspekt předkládaného vynálezu poskytuje sloučeninu vázající histamin nebo serotonin, která je schopná vázat histamin nebo serotonin s disociační konstantou menší než 10^{-7} M a která má vazebné místo obsahující aminokyselinový zbytek fenylalanin nebo isoleucin ve zbytku I, tryptofan ve zbytku II a aspartát nebo glutamát ve zbytcích III a IV, přičemž zbytky I až IV jsou umístěny v podstatě stejně jako zbytky 98, 137, 24 a 120, v příslušném pořadí, v každé ze sekvencí id. č. 1 nebo 2, nebo zbytky 95, 138, 23 a 120 v sekvenci id. č. 3 nebo zbytky 112, 149, 35 a 135 v sekvenci id. č. 4, a její funkční ekvivalenty. Dále bude toto vazebné místo nazýváno „druhé vazebné místo“.

Třetí aspekt vynálezu poskytuje sloučeninu vázající histamin nebo serotonin, která je schopná vázat histamin nebo serotonin s disociační konstantou menší než 10^{-7} M, a která obsahuje jak první, tak druhé vazebné místo popsané výše nebo jejich funkční ekvivalenty. U některých sloučenin vázajících histamin, které obsahují jak první, tak i druhé vazebné místo (jako je D-RET6), se má za to, že vazba serotoninu ke sloučenině mění afinitu sloučeniny k histaminu.

Další chemické sloučeniny s účinkem se vztahem k serotoninu mohou mít také vliv na vazbu histaminu ke sloučenině vázající histamin, která obsahuje jak první, tak druhé vazebné místo. Tyto příbuzné sloučeniny zahrnují cysteinylleukotrieny (jako je leukotrien D4 a leukotrien E4), faktor stimulující destičky a tromboxany.

Čtvrtý aspekt vynálezu poskytuje sloučeninu vázající histamin nebo serotonin, která je schopná vázat histamin nebo serotonin s disociační konstantou menší než 10^{-7} M, a která obsahuje sekvenci D.RET6 (sekvence id. č. 4) nebo její

fragment, a která obsahuje první a druhé vazebné místo, jak je definováno výše nebo jeho funkční ekvivalenty, přičemž vazba serotoninu ke sloučenině zvyšuje afinitu sloučeniny k histaminu.

Vazebným místem je míněna specifická oblast sloučeniny, která se přímo podílí na vazbě molekuly histaminu nebo serotoninu. Samotná vazba v tomto místě obsahuje událost molekulového rozpoznávání mezi vazebným místem a molekulami histaminu nebo serotoninu, což je regulováno funkční komplementaritou tvarů, velikostí, nábojů, vodíkových vazeb (můstků), hydrofobními interakcemi a pi-interakcemi a van der Waalovými silami. Interakce mohou také zahrnovat kovalentní chemické vazby.

Termínem „funkční ekvivalent“ se označují sloučeniny, které mají požadované vazebné místo a zahrnují každou makromolekulární nebo molekulární jednotku, která se váže na histamin nebo serotonin s disociační konstantou 10^{-7} M nebo menší, a která má rovnocenně komplementární tvar s tvarem vazebného místa molekul vázajících histamin nebo serotonin identifikovaných v jakékoli z sekvencí id. č. 1 až 4. Funkčně rovnocenný komplementární tvar může zajistit každý vodíkový, kyslíkový, fosforový a dusíkový atom, který je umístěn v podstatě tak, jak je ukázáno ve strukturách zde popsaných.

Běžné metody vytváření sloučenin s afinitou k požadované molekule byly až donedávna relativně jednoduché. Ale velikou rychlostí se rozvinula teorie kombinační chemie a tvorba kombinačních knihoven a usnadnila se tak racionální konstrukce a vylepšování molekul s požadovanými vlastnostmi. Tyto techniky mohou být použity ke tvorbě molekul majících vazebná místa totožná nebo podobná s vazebnými místy histaminu nebo serotoninu zde popsanými.

Tyto sloučeniny mohou být tvořeny pomocí racionálního navrhování, například s použitím technik standardní syntézy v kombinaci s modelováním molekul a počítačovými znázorňovacími programy. Při těchto technikách je „vedoucí“ sloučenina s rámcem podobným vazebnému místu histaminu nebo serotoninu optimalizována pomocí kombinace rozmanitých skeletů a substituentů sloučenin.

Jako alternativa nebo jako jeden krok při navrhování molekulové jednotky s ohledem na strukturu, může být použita kombinační chemie ke tvorbě nebo vylepšení struktury sloučenin, které napodobují histaminové nebo serotoninové vazebné místo u sloučenin, které vážou histamin nebo serotonin prostřednictvím tvorby obdobných kombinatorických seskupení kolem rámcového skeletu. Tyto kroky mohou zahrnovat standardní syntézu peptidu nebo organické molekuly s odštěpením pevné fáze a rekombinační proces nebo paralelní syntézu kombinatorické jednotky s použitím buď techniky pevné fáze nebo roztoku (viz například Hogan, 1997 a odkazy tam uváděné).

Jako alternativu nebo jako část histaminové nebo serotoninové vazebné molekuly podle předkládaného vynálezu mohou funkční ekvivalenty obsahovat fragmenty nebo varianty proteinů ukázaných na obrázcích 1 až 4 nebo blízce příbuzných proteinů projevujících významnou sekvenční homologii. Fragmenty je míněna každá část celé proteinové sekvence, která si podrží schopnost vázat vazoaktivní aminy s disociační konstantou 10^{-7} M nebo menší. V souladu s tím fragmenty obsahující jednoduché nebo mnohonásobné delece aminokyselin od každého konce proteinu nebo od vnitřních úseků primární aminokyselinové sekvence tvoří jeden aspekt předkládaného vynálezu. Varianty mohou například zahrnovat mutanty obsahující substituce aminokyselin, inserce nebo delece ze sekvence divokého typu z obrázků 1 až 4.

Odborníkovi je jasné, že zbytky, které přispívají k vazbě vazoaktivních aminů ve čtyřech proteinech zde jednoznačně určených, jsou udržovány v relevantní pozici pro vazbu histaminu nebo serotoninu rámcovou strukturou proteinu. Tudíž zbytky proteinového rámce jsou zodpovědné za přesné umístění vazebných aminokyselin.

V souladu s tím se předpokládá, že každý molekulový rámec schopný si podržet tyto aminokyselinové postranní řetězce v pozicích potřebných pro vazbu histaminu nebo serotoninu, bude vhodný pro použití podle předkládaného vynálezu. Obzvláště vhodné budou cyklické peptidy držené v přesném rámci svými vazebnými skupinami a vazbami. Postranní řetězce aminokyselin mohou být drženy v pozici v podstatě totožné s jejich pozicí v histaminovém nebo serotoninovém vazebném místě nativních sloučenin vázajících histamin nebo serotonin. Cyklické peptidy výhodně obsahují 6 až 30 aminokyselin, výhodně 8 až 20 aminokyselin. Zejména výhodný je cyklický oktapeptid Ala-Glu-Ala-Phe-Ala-Glu-Ala-Trp.

Biologicky aktivní peptidy s histaminovými nebo serotoninovými vazebnými místy podle předkládaného vynálezu mohou být tvořeny s použitím fágových knihoven. Nukleové kyseliny kódující aminokyselinové zbytky identifikované jako podílející se na vazbě histaminu nebo serotoninu, spolu s nukleovými kyselinami kódujícími okolní rámcové zbytky, mohou být fúzovány za vzniku polypeptidové jednotky o 10 až 1000 zbytcích, výhodně mezi 25 až 100 zbytky. Fúzí tohoto fragmentu nukleové kyseliny s fragmentem kódujícím fágový protein, například pIII bakteriofágu fd, může být fúzní molekula exponována na povrchu fága. Screening fágové knihovny histaminem nebo serotoninem pak vede k identifikaci požadovaných klonů. Tyto klony pak mohou být podrobeny opakovaným kolům mutagenese a screeningu, aby se zlepšila afinita vytvořených molekul k histaminu nebo serotoninu.

Zbytky s fyzikálními vlastnostmi analogickými se zbytky, které obsahují histaminové nebo serotoninové vazebné místo, mohou také tvořit část molekuly podle předkládaného vynálezu. Například, s ohledem na protein FS-HBP2, každý z nabitých zbytků glutamátu nebo aspartátu může zaujmout pozici 39 a 82 v sekvenci. V pozici 108 v sekvenci, se uvažuje o tom, že každý hydrofobní aminokyselinový zbytek může zaujmout toto místo, za předpokladu, že jsou uspokojeny sterické vztahy s ohledem na molekulovou konfiguraci vazebného místa. V této pozici jsou výhodné zbytky fenylalanin, isoleucin a leucin. V pozici 42 je výhodný tryptofan.

Kromě toho v pozici 100 sekvence sloučeniny vázající histamin je výhodné, když je přítomný tyrosinový zbytek. Má se za to, že tato molekula přispívá ke stabilitě histaminu ve vazebném místě. Každá molekulová struktura, která podrží tento aminokyselinový postranní řetězec nebo jeho ekvivalent na této pozici tvoří aspekt předkládaného vynálezu.

Díky variacím v délce a sekvenci čtyřech proteinů zde jednoznačně popsanych, se způsob číslování zbytků mezi proteiny liší. Ale z přiřazení ukázaného na obrázku 22 je zřejmé, které zbytky odpovídají zbytkům číslaným podle sekvence FS-HBP2.

Počítá se s tím, že proteiny podle předkládaného vynálezu mohou být stabilizovány prostřednictvím disulfidových můstků ve struktuře. Například cysteinové zbytky nacházející se v pozicích 48, 169, 119 a 148 z FS-HBP2 jsou zachovány ve všech čtyřech proteinech vázajících histamin dosud identifikovaných. Dva disulfidové můstky jsou vytvořeny v FS-HBP2, jeden mezi cysteinovými zbytky 48 a 169, další mezi 148 a 119. V souladu s tím se mohou vyskytovat u každého proteinového fragmentu navrženého tak, aby napodoboval strukturu vazebného místa pro histamin nebo serotonin přírodní

sloučeniny, tyto cysteinové zbytky v sekvenci tak, že jeden nebo oba disulfidové můstky se tvoří v proteinové struktuře.

Je výhodné, že kromě vysoké afinity, se kterou sloučeniny podle předkládaného vynálezu vážou histamin nebo serotonin, je tato vazebná vlastnost také specifická pro histamin nebo serotonin. Výhody, které tato specifičnost sloučeninám propůjčuje, jsou odborníkovi zřejmé. Například pro použití jako léčivo nebo pro kvantifikaci obsahu histaminu v roztoku, je nanejvýš důležité, že jiné sloučeniny než histamin nejsou vázány sloučeninami podle předkládaného vynálezu. V případě léčiva může nedostatek specifičnosti vést k nežádoucím vedlejším účinkům, při použití při kvantifikaci histaminu může nespecifičnost vést k matoucím a nepřesným výsledkům.

Pátý aspekt vynálezu poskytuje protein obsahující aminokyselinovou sekvenci uvedenou v sekvenci id. č. 5. Tato sekvence kóduje protein slinných žláz z *Rhipicephalus appendiculatus* nazývaný Ra-Res. Jeho primární sekvence byla odvozena z cDNA, která byla získána screeningem cDNA knihovny slinné žlázy *R. appendiculatus* antisérem z morčete, u kterého se vyvinula rezistence proti roztočům *R. appendiculatus*.

Šestý aspekt vynálezu poskytuje protein obsahující aminokyselinovou sekvenci uvedenou v sekvenci id. č. 6. Tato sekvence kóduje protein nazývaný Av-HBP z roztočů *Amblyomma variegatum*. Předběžné výsledky vazebných studií histaminu svědčí pro ekvilibrační disociační konstantu (K_d) 7,3 nM.

Sedmý aspekt vynálezu poskytuje protein obsahující aminokyselinovou sekvenci uvedenou v sekvenci id. č. 7 nebo sekvenci id. č. 8. Tyto sekvence kódují proteiny nazývané Ih/Bm-HBP1 a Ih/Bm-HBP2 a byly izolovány ze smíšené cDNA expresní knihovny *Boophilus microplus/Ixodes hexagonus*. Knihovna byla podrobena screeningu se sondami konstruovanými z produktů RT-PCR získaných s RNA slinných žláz *Boophilus microplus/Ixodes hexagonus* s použitím degenerovaných primerů,

které byly navrženy na základě konzervovaných domén v HBP z *R. appendiculatus* (FS-HBP1, FS-HBP2, MS-HBP1 a D.RET6).

Osmý aspekt vynálezu poskytuje protein obsahující aminokyselinovou sekvenci uvedenou v sekvenci id. č. 9, aminokyselinovou sekvenci uvedenou v sekvenci id. č. 10, a aminokyselinovou sekvenci uvedenou v sekvenci id. č. 11. Tyto sekvence kódují proteiny nazývané Ih/Bm-HBP3, Ih/Bm-HBP4 a Ih/Bm-HBP5. Tyto sekvence byly také izolovány ze smíšené cDNA expresní knihovny *Boophilus microplus/Ixodes hexagonus* zmíněné výše. Jejich sekvence ukazují přesvědčivou podobnost se sekvencí HBP z *R. appendiculatus* (FS-HBP1, FS-HBP2, MS-HBP1 a D.RET6), ale obsahují také rozsáhlé domény, které se nevyskytují v tradičních sekvencích (viz obrázek 22).

Jak je odborníkovi jasné, vynález zahrnuje funkčně totožné deriváty a fragmenty proteinových sekvencí uvedených v sekvencích id. č. 6 až 11. V tomto kontextu se termín „funkčně totožný“ používá k označení derivátů a fragmentů, které si uchovávají schopnost vázat vazoaktivní aminy nebo které obsahují epitopy, které mohou být použity při vývoji vakcín protilátek, které jsou namířeny proti některému z proteinů Ra-Res, Av-HBP, Ih/Bm-HBP1, Ih/Bm-HBP2, Ih/Bm-HBP3, Ih/Bm-HBP4 nebo Ih/Bm-HBP5. Deriváty mohou být odvozeny ze sekvencí těchto proteinů divokého typu jednoduchými nebo mnohočetnými substitucemi, adicemi, inzercemi a/nebo delecemi aminokyselin nebo chemickými modifikacemi jedné nebo více aminokyselin, například deglykosylací glykosylovaných forem.

Vynález také zahrnuje proteiny v téže rodině jako Ra-Res, Av-HBP, Ih/Bm-HBP1, Ih/Bm-HBP2, Ih/Bm-HBP3, Ih/Bm-HBP4 nebo Ih/Bm-HBP5. Protein se považuje za patřící do téže rodiny jako kterýkoliv z těchto proteinů, jestliže 40 % nebo více z aminokyselin v sekvenci je zachováno. Například proteiny mohou být tímto způsobem srovnávány při použití příkazu „srovnej“ ("pile up", viz příručka programů GCG Wisconsin

package, 1994, kdy hodnoty paramterů jsou "gap creating penalty" = 2,50, "gap extension penalty" = 0,05).

Proteiny podle těchto aspektů vynálezu zahrnují přirozené biologické varianty nebo geografické variace uvnitř druhů, ze kterých proteiny pocházejí.

Například derivát může obsahovat další protein nebo polypeptid fúzovaný s jedním z těchto proteinů na jeho aminovém nebo karboxylovém konci nebo vložený dovnitř sekvence. Cílem přidaného polypeptidu může být pomocná funkce při detekci, expresi nebo separaci a purifikaci proteinu nebo může propůjčit proteinu další vlastnosti, jaké jsou potřeba.

Syntetické molekuly navržené tak, aby napodobily terciární strukturu nebo aktivní místo proteinů Ra-Res, Av-HBP, Ih/Bm-HBP1, Ih/Bm-HBP2, Ih/Bm-HBP3, Ih/Bm-HBP4 nebo Ih/Bm-HBP5 tvoří další aspekt podle vynálezu.

Pro mnoho aplikací mohou být sloučeniny podle předkládaného vynálezu fúzovány s efektorovou nebo reportérovou molekulou, jako je značka, toxin nebo biologicky aktivní molekula. Tyto molekuly mohou obsahovat další protein nebo polypeptid fúzovaný ke sloučenině vázající histamin nebo serotonin na jejím aminovém nebo karboxylovém konci nebo přidaný vnitřně. Cílem dalšího polypeptidu může být pomocná funkce při detekci, expresi nebo separaci a purifikaci proteinu nebo může propůjčit proteinu další vlastnosti, jaké jsou potřeba.

Obzvláště vhodní kandidáti pro fúzi jsou reportérové molekuly, jako je luciferáza, zelený fluorescenční protein nebo křenová peroxidáza. Značením volby mohou být radioaktivní značky nebo molekuly, které se detekují spektroskopicky, například fluorescenční nebo fosforescenční chemické skupiny. Mohou být také použity vazebné molekuly, jako je streptavidin nebo biotin. Kromě tohoto mohou být fúzovány další peptidy nebo polypeptidy ke sloučenině vázající histamin nebo

serotonin. Vhodné peptidy mohou být například β -galaktosidáza, glutathion-S-transferáza, luciferáza, polyhistidinové značky, sekreční signální peptidy, oblast Fc protilátky, peptid FLAG, domény vázající celulózu, kalmodulin a protein vázající maltózu. Protilátky nebo peptidy namířené proti sloučeninám vázajícím histamin nebo serotonin účinněji, co se týče místa působení (například protilátky proti membránovým proteinům žírných buněk), mohou být také fúzovány ke sloučeninám vázajícím histamin nebo serotonin.

Fúzní molekuly mohou být fúzovány chemicky s použitím metod, jako je chemické zesíťení. Vhodné metody jsou odborníkovi známe a mohou zahrnovat například zesíťení thiolových skupin cysteinových zbytků nebo zesíťení s použitím formaldehydů. Chemické zesíťení je ve většině případů použito k fúzi neproteinových sloučenin, jako jsou cyklické peptidy a značky.

Když je potřeba fúzovat dvě proteinové molekuly, je často metodou volby genetická fúze molekul. Aby vznikl rekombinantní fúzní protein, jsou geny nebo části genů, které kódují požadované proteiny nebo proteinové fragmenty, vytvořeny metodami genetického inženýrství tak, aby vytvořily jeden kontinuální gen uspořádaný tak, že kodony dvou genových sekvencí jsou transkribovány ve shodném čtecím rámci.

Sloučeniny podle předkládaného vynálezu mohou také zahrnovat sloučeniny vázající histamin nebo serotonin navázané na nosič, který může být použit pro odstranění, izolaci nebo extrakci histaminu nebo serotoninu z tělesných tkání, krve nebo potravinových produktů. Nosič může zahrnovat každý vhodný inertní materiál a patří sem např. gely, magnetické a další perličky, mikrosféry, vazebné kolony a pryskyřice.

Je-li proteinové povahy, může sloučenina vázající histamin nebo serotonin pocházet z každého organismu, který má protein stejné rodiny jako až doposud identifikované sloučeniny

vázající histamin nebo serotonin. Proteinovou rodinou je míněna skupina polypeptidů, které sdílejí společnou funkci a projevují obecnou sekvenční homologii mezi motivy vyskytujícími se v polypeptidových sekvencích. Sekvenční homologii je míněno, že polypeptidové sekvence jsou příbuzné prostřednictvím divergence ze společného předka.

Výhodně proteiny nebo proteinové fragmenty pocházejí z ektoparazitů, kteří se živí krví, pavouků, škorpiónů nebo hadů nebo dalších jedovatých živočichů. Výhodně proteiny nebo proteinové fragmenty pocházejí z roztočů, nejvýhodněji roztočů *Ixodidae*, jako je například *Rhipicephalus appendiculatus*.

Nejvýhodněji proteinové sloučeniny podle předkládaného vynálezu pocházejí z kteréhokoliv z proteinů FS-HBP1, FS-HBP2, MS-HBP1, a D.RET6, Ra-Res, Av-HBP, Ih/Bm-HBP1, Ih/Bm-HBP2, Ih/Bm-HBP3, Ih/Bm-HBP4 nebo Ih/Bm-HBP5.

Proteinové nebo peptidové sloučeniny podle vynálezu jsou výhodně exprimovány v rekombinantní formě prostřednictvím exprese kódující DNA v expresním vektoru v hostitelské buňce. Tyto expresní metody jsou odborníkovi dobře známy a mnoho jich je detailně popsáno v příručce "DNA cloning: a practical approach, Volume II: Expression systems", editor D.M. Glover (IRL Press, 1995) nebo v "DNA cloning: a practical approach, Volume IV: Mammalian systems", editor D.M. Glover (IRL Press, 1995). Proteinové sloučeniny mohou být také připraveny s použitím známých technik genetického inženýrství, jako je místně cílená nebo náhodná mutageneze, jak je popsáno například v příručce "Molecular Cloning: a Laboratory Manual", 2. vydání, (Sambrook, a kol., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) nebo v "Protein Engineering: A practical approach" (editor A.R. Rees a kol., IRL Press, 1993).

Pro hostitele volby mohou být vybrány vhodné expresní vektory. Vektor může obsahovat rekombinantní molekulu DNA kódující sloučeniny podle předkládaného vynálezu operativně

spojenou s expresní kontrolní sekvencí nebo klonovací nosič pro rekombinantní DNA nebo vektor obsahující takovou rekombinantní molekulu DNA pod kontrolou promotoru rozpoznávaného transkripčními mechanismy hostitele.

Vhodní hostitelé zahrnují obecně používané prokaryotické druhy, jako je *E. coli*, nebo eukaryotické kvasinky, které mohou exprimovat vysoké hladiny rekombinantních proteinů a které mohou být snadno pěstovány ve velkých množstvích. Savčí buněčné linie pěstované *in vitro* jsou také vhodné, zejména při použití expresních systémů používající viry, jako je bakulovirový expresní systém, který jako hostitele používá hmyzí buňky. Sloučeniny mohou být také exprimovány *in vivo*, například v larvách hmyzu nebo v savčích tkáních.

Devátý aspekt předkládaného vynálezu poskytuje farmaceutický přípravek obsahující sloučeninu vázající histamin nebo serotonin podle prvního nebo druhého aspektu vynálezu nebo protein podle třetího, čtvrtého, pátého, šestého, sedmého nebo osmého aspektu vynálezu, ve spojení s farmaceuticky přijatelným excipientem. Vhodné excipienty jsou odborníkovi dobře známy a patří k nim například fyziologický roztok pufrovaný fosfáty (0,01M fosfátová sůl, 0,138M NaCl, 0,0027M KCl, pH 7,4). Farmaceutické přípravky mohou také obsahovat další konzervační látky, aby se zajistilo dlouhodobé uskladnění.

Podle ještě dalšího aspektu předkládaný vynález poskytuje použití sloučenin vázajících histamin nebo serotonin podle prvního, druhého, třetího nebo čtvrtého aspektu vynálezu, proteinu podle, pátého, šestého, sedmého nebo osmého aspektu vynálezu nebo farmaceutických přípravků podle devátého aspektu vynálezu pro léčení. Sloučeniny vázající histamin nebo serotonin, proteiny nebo přípravky mohou být použity jako protizánětlivá činidla nebo mohou být použity pro vazbu histaminu nebo serotoninu u savců, a tím regulovat jejich

působení a kontrolovat patologické účinky. To způsobuje jejich vychytávání (sekvestraci), a tak snižuje účinnou koncentraci histaminu nebo serotoninu v těle. To má za následek zmírnění nebo dokonce úplné odstranění fyziologické reakce, v závislosti na použité dávce. Sloučeniny vázající histamin nebo serotonin podle předkládaného vynálezu mohou být také použity jako protizánětlivá činidla nebo činidla proti účinku alergických reakcí v organismu.

Podle tohoto aspektu vynálezu mohou být sloučeniny vázající histamin nebo serotonin, proteiny nebo přípravky použity ve spojení se serotoninem, aby se změnila afinita sloučenin k histaminu. Například je zde pro sloučeninu D.RET6 ukázáno, že serotonin významně zvyšuje afinitu sloučeniny pro histamin. Sloučeniny účinkem podobné serotoninu mohou být také použity, jako jsou cysteinyl leukotrieny (jako je leukotrien D₄ nebo E₄), faktor stimulující destičky nebo tromboxany.

Sloučenina vázající histamin nebo serotonin podle prvního, druhého, třetího nebo čtvrtého aspektu vynálezu nebo protein podle, pátého, šestého, sedmého nebo osmého aspektu vynálezu mohou tvořit výhradní aktivní složku přípravku nebo mohou tvořit část terapeutického komplexu, jako je složka krémů pro místní podávání při štípnutí hmyzem, kousnutí hadem nebo škorpiónem nebo na kůži postiženou dermatitidou. Proteiny mohou být také použity jako nosičské molekuly pro histamin nebo serotonin a sloučeniny příbuzné histaminu nebo serotoninu, v krémech, olejích, prášcích nebo pilulkách, aby se zajistilo pomalé uvolňování navázaného histaminu nebo serotoninu.

Vynález také zahrnuje použití sloučenin podle předkládaného vynálezu jako složek vázajících histamin nebo serotonin v soupravách pro detekci nebo kvantifikaci hladin histaminu nebo serotoninu (například v krvi, tekutině z nosního výplachu, tkáních nebo potravinových produktech).

Taková souprava bude připomínat soupravu pro radioimunotest a bude zahrnovat sloučeninu vázající histamin nebo serotonin podle předkládaného vynálezu, přičemž detekcí se míní, že umožní přesnou kvantifikaci množství histaminu nebo serotoninu v tekutině. K měřenému vzorku je přidáno dané množství radioaktivně značeného histaminu nebo serotoninu, například histaminu nebo serotoninu značeného tritiem. Histamin nebo serotonin ve vzorku pak bude kompetovat se značeným histaminem nebo serotoninem o vazbu na omezené množství vazebných míst, které mají sloučeniny vázající histamin nebo serotonin ve vzorku také přítomné. Množství histaminu nebo serotoninu, které je ve vzorku přítomné, tak může být přesně stanoveno.

Jeden aspekt předkládaného vynálezu zahrnuje tyto soupravy obsahující sloučeniny vázající histamin nebo serotonin podle předkládaného vynálezu. Sloučeniny vázající histamin nebo serotonin mohou být navázány na magnetické perličky, agarózové perličky nebo mohou být fixovány ke dnu mnohojamkové destičky. To umožní odstranění nenavázaného značeného histaminu nebo serotoninu ze vzorku po inkubaci. Jako alternativa může být protein navázán na perličky pro SPA ("Scintillation Proximity Assay"), v tom případě není nutné odstranit nenavázaný ligand. Při použití řady standardů neznačeného histaminu nebo serotoninu mohou být výsledky získané s těmito standardy srovnány s výsledky získanými pro měřený vzorek.

Sloučeniny vázající histamin nebo serotonin podle prvního, druhého, třetího nebo čtvrtého aspektu vynálezu nebo proteiny podle, pátého, šestého, sedmého nebo osmého aspektu vynálezu mohou být také použity pro detekci histaminu nebo serotoninu. Každá technika v oboru běžná může být použita v takové detekční metodě a může zahrnovat použití přenosových ("blotting") technik (Towbin a kol., 1979), vazebných kolon, zpožďování (retardace) na gelu, chromatografie nebo jakékoliv další vhodné metody, které jsou v oboru široce používány.

V dalším provedení sloučenina vázající histamin nebo serotonin může být fúzována buď geneticky nebo synteticky k dalšímu proteinu, jako je alkalická fosfatáza, luciferáza nebo peroxidáza, aby se usnadnila její detekce.

Může být výhodné zahrnout serotonin nebo příbuznou sloučeninu do souprav podle tohoto aspektu vynálezu, aby se změnila afinita sloučeniny vázající histamin k histaminu. Tyto příbuzné sloučeniny zahrnují cysteinylleukotrieny (jako je leukotrien D₄ nebo E₄), faktor stimulující destičky nebo tromboxany. To je obzvláště výhodné, když je sloučenina D.RET6 nebo její funkční ekvivalent použit jako aktivní sloučenina vázající histamin v soupravě.

Vynález také zahrnuje použití sloučenin vázající histamin nebo serotonin podle prvního, druhého, třetího nebo čtvrtého aspektu vynálezu nebo proteinů podle, pátého, šestého, sedmého nebo osmého aspektu vynálezu jako histamin nebo serotonin vázajících jednotek navázaných na nosič, který může být použit pro odstranění, izolaci nebo extrakci histaminu nebo serotoninu (z tělesných tkání, krve nebo potravinových produktů). Nosičem je jakýkoliv vhodný materiál a patří sem např. gely, perličky, mikrosféry, vazebné kolony a pryskyřice. Sloučenina vázající histamin nebo serotonin může být například chemicky nebo enzymaticky navázána na reaktivní skupiny na těchto nosičích.

Předkládaný vynález také zahrnuje použití sloučeniny vázající histamin nebo serotonin podle prvního, druhého, třetího nebo čtvrtého aspektu vynálezu nebo proteinu podle, pátého, šestého, sedmého nebo osmého aspektu vynálezu jako nástroje pro studium zánětlivých procesů, procesů spojených se zánětem nebo jiných fyziologických účinků vazoaktivních aminů, jako je úloha histaminu při tvorbě gastrických vředů. Například sloučeniny vázající histamin nebo serotonin mohou být použity pro depleci histaminu nebo serotoninu v tkáňových

kulturách nebo v zanícené zvířecí tkáni, aby se studovala důležitost histaminu nebo serotoninu v těchto systémech. Sloučeniny vázající histamin nebo serotonin mohou být předem inkubovány se serotoninem nebo příbuznou sloučeninou, aby se zvýšila afinita sloučenin k histaminu.

Předkládaný vynález také poskytuje použití sloučenin vázající histamin nebo serotonin podle prvního, druhého, třetího nebo čtvrtého aspektu vynálezu a proteinu podle, pátého, šestého, sedmého nebo osmého aspektu vynálezu jako imunogenů při použití jako vakcín proti mnohobuněčným (metazoickým) parazitům a zejména jako protektivních imunogenů při potlačování nemocí způsobených členovci a dalšími metazoickými parazity. Vhodní kandidáti pro vakcinaci zahrnují domestikovaná zvířata, jako je dobytek, kozy, ovce, psi, kočky a další zvířata, která vyžadují ochranu proti metazoickým parazitům, obzvláště roztočům. Vakcína může obsahovat adjuvans typu, který je v oboru velmi dobře znám.

Molekuly nukleové kyseliny obsahující nukleotidovou sekvenci kódující sloučeninu vázající histamin nebo serotonin podle prvního, druhého, třetího nebo čtvrtého aspektu vynálezu nebo kódující protein podle, pátého, šestého, sedmého nebo osmého aspektu vynálezu tvoří další aspekty vynálezu. Tyto molekuly zahrnují DNA, cDNA a RNA, jakož i syntetické druhy nukleových kyselin.

Komplementární DNA kódující konkrétní molekuly vázající histamin nebo serotonin podle proteinů FS-HBP1, FS-HBP2, MS-HBP1, D.RET6, Ra-Res, Av-HBP, Ih/Bm-HBP1, Ih/Bm-HBP2, Ih/Bm-HBP3, Ih/Bm-HBP4 nebo Ih/Bm-HBP5 jsou zde popsány na obrázcích 1 až 11 (nukleotidy a aminokyseliny jsou určeny svými standardními jednopísmennými zkratkami).

Výhodná molekula nukleové kyseliny podle vynálezu obsahuje nukleotidový fragment totožný nebo komplementární s jakoukoliv částí kterékoliv nukleotidové sekvence ukázané na obrázcích 1

až 11, která kóduje sloučeninu vázající histamin nebo serotonin nebo sekvence, která je vznikla její degenerací nebo je s ní v podstatě homologní, nebo která s uvedenou sekvencí hybridizuje. Termínem „v podstatě homologní“ jsou míněny sekvence projevující alespoň 60% sekvenční homologii. „Hybridizující sekvence“ zahrnuté do předmětu vynálezu jsou ty, které se vážou za standardních nestringentních podmínek (6 x SSC/50% formamid při teplotě místnosti) a jsou odmyty za podmínek nízké stringence (2 x SSC, při teplotě místnosti nebo 2 x SSC, 40 °C) nebo výhodně za standardních podmínek vysoké stringence, např. 0,1 x SSC, 65 °C (kde SSC = 0,15M NaCl, 0,015M citrát sodný, pH 7,2).

Sekvence nukleových kyselin podle vynálezu mohou být jednovláknová nebo dvouvláknová DNA, cDNA nebo RNA. Sekvence nukleových kyselin výhodně obsahují DNA.

Vynález také zahrnuje klonovací a expresní vektory obsahující sekvence DNA podle vynálezu. Tyto expresní vektory mají zavedeny příslušné transkripční a translační kontrolní sekvence, například zesilující prvky, oblasti promotor-operátor, terminační stop sekvence, sekvence pro stabilitu mRNA, startovací a stop kodony nebo vazebná místa pro ribozomy, spojené do čtecího rámce s molekulami nukleové kyseliny podle vynálezu.

Kromě toho v nepřítomnosti přirozeného účinného signálního peptidu v proteinové sekvenci může být výhodné, aby byl rekombinantní protein secernován určitým hostitelem. Další složky těchto vektorů mohou tudíž zahrnovat sekvence nukleových kyselin kódujících sekreční signální a sekvence pro další "opravování" proteinu.

Vektory podle vynálezu zahrnují plazmidy a viry (včetně bakteriofága a eukaryotických virů). V oboru je dobře známo a dokumentováno mnoho takových vektorů a expresních systémů.

Obzvláště vhodné virové vektory zahrnují vektory založené na bakulovirech, adenovirech a virech vakcinie.

Expres heterologních polypeptidů a polypeptidových fragmentů v prokaryotických buňkách jako jsou *E. coli* je v oboru dobře zavedena, viz například "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", (2. vydání, Sambrook, a kol., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) nebo "DNA cloning: a practical approach, Volume II: Expression systems", editor D.M. Glover (IRL Press, 1995). Expres v eukaryotických buňkách v kultuře je také možností odborníkovi dostupná pro produkci heterologních proteinů, viz například O'Reilly a kol., "Baculovirus expression vectors - a laboratory manual" (Oxford University Press, 1994) nebo "DNA cloning: a practical approach, Volume IV: Mammalian systems", editor D.M. Glover (IRL Press, 1995).

Vhodné vektory mohou být vybrány nebo konstruovány pro expresi proteinů vázajících histamin nebo serotonin, které obsahují příslušné regulační sekvence, včetně promotorových sekvencí, terminátorových sekvencí, polyadenylačních sekvencí, zesilovacích sekvencí, markerových genů a dalších sekvencí, jak je vhodné. Pro další detaily viz "Molecular Cloning: A Laboratory Manual". Mnoho známých technik a protokolů pro manipulaci nukleových kyselin, například příprava konstruktů nukleových kyselin, mutageneze, sekvencování, zavedení DNA do buněk a genová exprese, a analýza proteinů je detailně popsáno v příručce "Short Protocols in Molecular Biology", 2. vydání, Ausubel a kol., (editor, John Wiley & Sons, 1992) nebo "Protein Engineering: A practical approach" (editor A.R. Rees a kol., IRL Press, 1993). Například v eukaryotických buňkách jsou vektory volby založeny na virech.

Další aspekt předkládaného vynálezu poskytuje hostitelskou buňku obsahující nukleovou kyselinu kódující sloučeninu vázající histamin nebo serotonin podle prvního, druhého

třetího nebo čtvrtého aspektu vynálezu nebo kódující protein podle pátého, šestého, sedmého nebo osmého aspektu vynálezu. Ještě další aspekt poskytuje způsob obsahující zavedení těchto nukleových kyselin do hostitelské buňky nebo organismu.

Pro vnesení nukleové kyseliny lze použít každou dostupnou techniku. U eukaryotických buněk vhodné techniky mohou zahrnovat transfekci pomocí fosforenanu vápenatého, DEAE-dextranu, elektroporaci, transfekci zprostředkovanou lipozomy nebo transdukcí s použitím retroviru nebo dalších virů, jako je vakcinie nebo u hmyzích buněk bakulovirus. U bakteriálních buněk mohou vhodné techniky zahrnovat transformaci pomocí chloridu vápenatého, elektroporaci nebo transfekci používající bakteriofága.

Vnesení nukleové kyseliny může být následováno vyvoláním nebo umožněním exprese nukleové kyseliny, např. kultivací hostitelských buněk v podmínkách pro expresi genu.

V jednom provedení je nukleová kyselina podle vynálezu integrována do genomu (např. chromozomu) hostitelské buňky. Integrace může být podporována vložением sekvencí, které podporují rekombinaci s genomem, podle standardních technik.

Transgenní zvířata transformovaná tak, že exprimují nebo nadměrně exprimují v zárodečné linii jednu nebo více sloučenin vázajících histamin nebo serotonin, jak jsou zde popsány, tvoří ještě další aspekt vynálezu, spolu se způsobem jejich produkce. Nyní existuje mnoho technik pro vnášení transgenů do embrya nebo zárodečné linie organismu, jak je například doloženo v práci Watson a kol. ("Recombinant DNA", 2. vydání, Scientific American Books, 1994).

Je známa celá řada technik a mohou být použity pro vnesení vektorů podle předkládaného vynálezu do prokaryotických nebo eukaryotických buněk. Vhodné transformační nebo transfekční techniky jsou dobře popsány v práci "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", (2. vydání, Sambrook, a kol., Cold Spring

Harbor Laboratory Press, 1989). V eukaryotických buňkách mohou být expresní systémy buď tranzientní, přechodné (např. epizomální) nebo permanentní, trvalé (chromozomová integrace) podle potřeb systému. Viz například "Short Protocols in Molecular Biology", 2. vydání, Ausubel a kol., (editor, John Wiley & Sons, 1992).

Všechny dokumenty uvedené v textu jsou zahrnuty formou odkazu.

Různé aspekty a provedení předkládaného vynálezu budou nyní popsány detailněji pomocí příkladů, se zvláštním odkazem na proteinové sloučeniny vázající histamin nebo serotonin izolované z roztočů. Je zřejmé, že vynález lze modifikovat v detailech, aniž by došlo k odchýlení od vynálezecké myšlenky předkládaného vynálezu.

Popis obrázků

Obrázek 1 je sekvence FS-HBP1 (sekvence id. č. 1) ukazující sekvenční primery a sekvenční strategii.

Obrázek 2 je sekvence FS-HBP2 (sekvence id. č. 2) ukazující sekvenční primery a sekvenční strategii.

Obrázek 3 je sekvence MS-HBP1 (sekvence id. č. 3) ukazující sekvenční primery a sekvenční strategii.

Obrázek 4 je sekvence D.RET6 (sekvence id. č. 4) ukazující sekvenční primery a sekvenční strategii.

Obrázek 5 je sekvence ra-RES (sekvence id. č. 5). Asparaginové zbytky, které jsou částí předpokládaných glykosylačních rozpoznávacích míst jsou podtrženy a zvýrazněny kurzívou. Klikatá čára označuje možné amidační místo I, dvojitá čára ukazuje předpokládaný polyadenylační signál a poly-A konec je vyznačen tučným písmem.

Obrázek 6 je sekvence Av-HBP (sekvence id. č. 6). Sekvence cDNA Av-HBP a jeho dedukovaná primární struktura. cDNA má

pozoruhodně dlouhou nekódující oblast, po směru od stop-kodonu.

Obrázek 7 je sekvence Ih/Bm-HBP1 (sekvence id. č. 7).

Obrázek 8 je sekvence Ih/Bm-HBP2 (sekvence id. č. 8).

Obrázek 9 je sekvence Ih/Bm-HBP3 (sekvence id. č. 9).

Obrázek 10 je sekvence Ih/Bm-HBP4 (sekvence id. č. 10).

Obrázek 11 je sekvence Ih/Bm-HBP5 (sekvence id. č. 11).

Obrázek 12 je 12% SDS-polyakrylamidový gel obarvený stříbrem ukazující frakce získané z niklové pryskyřicové kolony použité k purifikaci rekombinantního D.RET6 exprimovaného ve hmyzích buňkách. A, proteklá frakce, B, první promytá frakce (10 objemů fosfátového pufru, pH 6,5), C, druhá promytá frakce (s 5mM imidazolem), D, třetí promytá frakce (s 10mM imidazolem), E, čtvrtá promytá frakce (s 15mM imidazolem), F, pátá promytá frakce (s 20mM imidazolem), G, eluční frakce s 300mM imidazolem, H, purifikovaný D.RET6 po iontoměničové chromatografii.

Obrázek 13 je 12% SDS-polyakrylamidový gel obarvený stříbrem ukazující D.RET6 nadměrně exprimovaný ve hmyzích buňkách. Dráhy A a B ukazují purifikovaný D.RET6 jako monomer (25 kD), dimer (50 kD) a trimer (85 kD) a dráha C je po deglykosylaci. Štěpené oligosacharidy byly zadrženy v plnicím gelu a jsou viditelné na vrcholu dráhy C. Nadbytek PNGázy-F se jeví jako pás přibližné velikosti 30 kD. Dráha D ukazuje purifikovanou monomerní formu D.RET6.

Obrázek 14 ukazuje detekci pomocí westernového přenosu proteinu vázajícího nativní histamin v extraktu ze slinných žláz *Dermacentor reticulatus*. Dráha A, neredukovaná forma, dráha B, redukováná forma, dráha C, deglykosylovaná forma.

Obrázek 15: určení IC_{50} tří neznáčených kompetitorů, např. histaminu, 1-metylhistaminu a 3-metylhistaminu vytvořením kompetitivní vazebné křivky rekombinantního D.RET6. Graficky odvozené IC_{50} neznáčených ligandů zmíněných výše při 50%

odstranění radioaktivního histaminu z vazebného místa jsou 133 nM, 750 μ M a 365 μ M.

Obrázek 16 ukazuje saturační křivky vazby histaminu v nepřítomnosti (plná čára) nebo přítomnosti (přerušovaná čára) serotoninu. ♦ žádný serotonin, ■ 2,4 μ M a Δ 23,8 μ M serotonin.

Obrázek 17: Radioaktivní vazebný test histaminu rekombinantního D.RET6 v nepřítomnosti (A) a v přítomnosti serotoninu v 2,4 μ M (B) a 23,8 μ M (C).

Obrázek 18: Zobrazení histaminu navázaného ve vazebné kapse místa vázajícího histamin cyklického peptidu.

Obrázek 19: Trojrozměrné zobrazení histaminu navázaného ve vazebné kapse místa vázajícího histamin cyklického peptidu.

Obrázek 20: a) pásové schéma ukazující uspořádání molekul A a B v asymetrické jednotce FS-HBP2. List 13 je označen A -I a α šroubovice 1-3. Ligandy histaminu jsou znázorněny jako kuličky a spojovací tyčky, spolu s Tyr100. Šipka označuje směr pohledu v b) a orámovaná oblast ukazuje část zvětšenou v c). b) Tento obraz ukazuje šroubovici a protaženou kličku, která uzavírá válcový vchod. c) Prostorový obraz jednotlivých kontaktů vodíkovou vazbou mezi zbytky v molekulách A a B. d) Superponované stopy C- α molekul A a B (provedeno s použitím SHP, (Stuart a kol., 1979)).

Obrázek 21: Prostorové zobrazení H (a), L (b) a apo-L c) histamin vázajících míst. V každém případě je okolo ligandu zobrazena mapa $2|F_o|-|F_c|$. Obrázek ukazuje strukturu jádra proteinové trubice, zbytky v kontaktu a prvky sekundární struktury jsou označeny. Na c) navázaná struktura L (zakreslená transparentně) byla superponována do souřadnic apo.

Obrázek 22: Porovnání z cDNA odvozených aminokyselinových sekvencí různých HBP, vytvořených s použitím příkazů „srovnej“

("pile up") programu Genetics Computer Group (viz Programová příručka Wisconsin Package, verze 8, 1994, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA, 53711).

Příklady provedení vynálezu

Roztoči

Roztoči byli pěstováni podle Jones a kol. (1988), jak je detailně popsáno v současně projednávané mezinárodní patentové přihlášce č. PCT/GB97/01372, jejíž obsah je zde plně zahrnut formou odkazu.

Identifikace proteinů FS-HBP1, FS-HBP2, MS-HBP1, a D.RET6 a klonování kódujících genů je také popsáno v PCT/GB97/01372 (viz příklady 1, 2 a 3).

Knihovna Ra-d0 (*Rhipicephalus appendiculatus*) byla konstruována z mRNA ze slinných žláz hladových roztočů *R. appendiculatus* (127 samečků, 124 samiček). Knihovna Av (*Amblyomma variegatum*) byla konstruována s mRNA ze slinných žláz částečně nakrmených dospělých roztočů *A. variegatum* (50 samečků, krmených 6-7 dnů, a 50 samiček, krmených 4 až 5 dnů). Knihovna Ih/Bm (smíšená knihovna *Ixodes hexagonus* a *Boophilus microplus*) byla konstruována se sloučenou mRNA ze slinných žláz částečně nakrmených roztočů *Boophilus microplus* (30 samiček) a tři dny krmených klíšťat *Ixodes hexagonus* (20 samečků/20 samiček).

Příklad 1

Klonování a sekvencování knihoven *Amblyomma variegatum*, *Ixodes hexagonus* a *Boophilus microplus*

S použitím soupravy "RNase Total Pure extraction kit" (Bioline Ltd., Velká Británie) byla izolována celková RNA ze slinných žláz částečně nakrmených roztočů *Amblyomma*

variegatum, *Ixodes hexagonus* a *Boophilus microplus*. Vzorky RNA byly vystaveny reakcím s reverzní transkriptázou a polymerázové řetězové reakci (RT-PCR) s použitím systému "Titan One-Tube RT-PCR" (Boehringer Mannheim) a degenerovaných primerů:

5'-AAYGGNGARCAYCARGAYGCNTGGAA, a

5'-KTRTMRTCNGTNRYYCCANARYTCRTA,

jejichž sekvence byla založen na konzervativních doménách v HBP z *Rhipicephalus appendiculatus*.

Cyklovací podmínky PCR byly podle doporučení výrobce, ale pro nasedání primerů byla použita teplota 48 °C. Produkty RT-PCR byly ligovány do vektoru pGEM-T (Promega) a částečně sekvencovány, s použitím primerových míst SP6 a T7 ohraničujících klonovací místo. Inzerty, jejichž odvozené aminokyselinové sekvence vykazovaly podobnost s původními HBP z *Rhipicephalus* byly značeny digoxigeninem, při použití soupravy "High Prime DNA labeling kit" (Boehringer Mannheim), a byly použity jako sondy pro screening knihoven. Ke zviditelnění hybridizace sondy byla použita anti-digoxigeninová protilátka konjugovaná s alkalickou fosfatázou. Knihovna Ra-d0 byla podrobena screeningu (podle Mierendorfa a kol., 1978) se sérem z morčete, které mělo získanou rezistenci proti roztočům *R. appendiculatus* po opakované infekci.

Fagemidy pBluescript SK(-) pozitivních klonů byly vystřiženy *in vivo*, s použitím pomocného fága R408, jak je popsáno v Short a kol. (1988).

Příklad 2

Expres rekombinantního proteinu

Expres a purifikace FS-HBP1, FS-HBP2, MS-HBP1 je detailně popsána v příkladu 3 v patentové přihlášce PCT/GB97/01372.

1) Konstrukce klonů pro D.RET6

Při použití expresního systému založeného na *E. coli* byla subklonována DNA sekvence kódující D.RET6 (od Glu29 do Leu 109) jako BclI/XhoI fragment do pET-23a(+) štěpeného BamHI/XhoI, do stejného čtecího rámce jako značka 6 x His, s použitím techniky PCR s následujícími primery:

5'-TATATGATCAGAAAACCCGCTCTGGG-3' a

5'-TATACTCGAGCCAGGGTTCGCCGT-3'

(jsou podtržena rozpoznávací místa enzymů). Rekombinantní plazmid byl transformován do hostitelského kmene AD494(DE3) pLysS, který používá systém T7 a úspěšnost procedury byla potvrzena sekvencováním.

D.RET6 byl také exprimován v bakteriích. Bakteriální transformanty byly pěstovány ve 37 °C v médiu LB (Luria-Bertani) obsahujícím ampicilin a chloramfenikol. Kultura byla indukována v exponenciální růstové fázi (OD₆₀₀ přibližně 0,5) při použití 0,5-1 mM isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosidu (IPTG) pěstována dále po alespoň 4 hodiny před sklizením (stočení při 4500 x g, 4 °C, 5 minut). Pelet byl resuspendován v lyzačním pufru obsahujícím 6M ureu, 20mM Tris, pH 8, a 500mM NaCl, krátce podroben sonikaci na ledu, přidalo se několik kapek Triton-X 100 a promíchával se kroužením ve 4 °C po dobu 5 minut. Supernatant byl odebrán po stočení v 7500 x g, 4 °C po dobu 30 minut.

D.RET6 byl také exprimován v bakulovirovém expresním systému. Fragment DNA obsahující úplnou kódující sekvenci D.RET6 byl amplifikován s použitím oligonukleotidů:

5'-TATGAAGATGCAGGTAGTGC-3' a

5'-ATATGATCAGCCAGGGTTCGCCGT-3'.

Výsledný produkt PCR byl opatřen slepými konci, štěpen s BclI a ligován s transferovým vektorem pAcCL29-1-6xHis (Livingstone, 1989), který byl připraven tak, aby měl slepý

konec v místě *SacI* a adhezivní konec v místě *BamHI*. Ligační produkt byl pak přenesen do *E. coli* (XL1-Blue) a byly pěstovány transformanty pro produkci plazmidu. Plazmid byl zkontrolován kompletním sekvencováním, zda neobsahuje žádnou nežádoucí mutaci. Buňky Sf9 byly současně transfekovány v různých poměrech rekombinantním transferovým vektorem a DNA viru polyhedrosy *Autographa californica* štěpenou *Bsu36I* (BacPAK6) v přítomnosti 8 µg lipofektinu (Gibco BRL) na reakci o objemu 24 µl.

Co se týče exprese, byly rekombinantní bakuloviry identifikovány jako plaky negativní na galaktosidázu po vysetí na agar Seaplaque. Předpokládané rekombinantní klony byly ještě jednou purifikovány pomocí plaků. Klon z infikovaného buněčného lyzátu Sf21, který dával pozitivní výsledek na westernovém přenosu (blotu) při použití polyklonálního protibakteriálního exprimovaného antiséra D.RET6, byl amplifikován a použit pro produkci rekombinantního proteinu. Pro každou další produkci fúzního proteinu byly buňky Sf9 infikovány těmito bakuloviry v MOI přibližně 5 a pěstovány 2-3 dny před sbíráním supernatantu stočením v 1000 x g po dobu 5 minut. Po precipitaci supernatantu 60% sulfátem amonným byl pelet odstraněn. Pelet získaný při precipitaci 100% sulfátem amonným byl opět rozpuštěn v pufru A (50mM fosforečnan sodný, 300mM NaCl a 10% glycerol, pH 8).

2) Purifikace proteinů a produkce antisér

Purifikační kroky byly stejné pro bakteriální i bakulovirové expresní systémy. Krátce, pryskyřice s Ni^{2+} -nitrilo-trioctovou kyselinou, předem ekvilibrovaná v pufru A, byla přidána k supernatantu nebo roztoku. Po inkubaci na třepačce (2 hodiny 4 °C) byla pryskyřice přenesena na kolonu a promyta 20 objemy fosfátového pufru (50mM fosforečnan sodný, 300mM NaCl a 10% glycerol, pH 6,5). Protein

byl eluován 5 objemy 300mM imidazolu, pH 8, koncentrován a rozpouštědlo bylo nahrazeno fyziologickým roztokem pufrovaným fosfáty při použití filtrační jednotky Centricon-10 (Amicon). Rekombinantní D.RET6 byl dále purifikován na koloně HiTrap SP (Pharmacia) s použitím gradientu 0,1-0,6M NaCl v 50mM MES, pH 6,2.

Aby se určila lokalizace a rozpustnost exprimovaného proteinu v *E. coli*, byly odebrány vzorky z kultury bakteriálních transformant před a 4 hodiny po indukci IPTG a byly zpracovány podle protokolu popsáného v příručce k soupravě "Qiaexpressionist" (QIAGEN). Krátce, vzorky byly stočeny, lyzovány cyklem zmrazování a rozmrazování a krátkou sonikací, a poté stočeny, aby se oddělily nerozpustné proteiny a cytosolová rozpustná proteinová frakce. V dalších vzorcích z tkáňové kultury byly buňky peletovány a podrobeny osmotickému šoku, nejdříve resuspendací v roztoku 30mM Tris obsahujícím 20% sacharózu (pH 8) a inkubací při teplotě místnosti za třepání v přítomnosti 1mM EDTA. Buňky byly pak sebrány a resuspendovány v nízkoosmotickém ledově chladném roztoku (5mM MgSO₄). Proteiny uvolněné do roztoku byly sebrány stočením. Všechny frakce spolu s frakcí před indukcí byly analyzovány prostřednictvím 12% SDS-PAGE.

Příprava fúzních proteinů pro produkci protilátek a technika pro imunizaci malým množstvím antigenu jsou popsány v práci Sambrook a kol., 1989. Krátce, anti-D.RET6 antisérum z morčete bylo připraveno opakovanou (3 x) intraperitoneální imunizací morčete homogenizovanými řezy 10% SDS-PAGE gelu, které obsahovaly mikrogramové množství purifikovaného D.RET6 exprimovaného bakteriemi ve fyziologickém roztoku pufrovaném fosfáty.

3) Elektroforéza a westernový přenos ("western blotting")

Gely SDS-PAGE a westernové bloty ukazující expresi FS-HBP1, FS-HBP2, MS-HBP1, byly uvedeny v patentové přihlášce PCT/GB97/01372 (viz také obrázky 6 a 7).

Roztočům byly vyňaty slinné žlázy (a další tkáně) v různých časových bodech během období krmení a byly homogenizovány v PBS. Homogenáty byly centrifugovány v 10 000 g po dobu 5 minut a supernatanty byly podrobeny elektroforéze na polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným (SDS-PAGE, podle Laemli 1970).

Obrázky 8 a 9 ukazují expresi D.RET6 v *E. coli* a hmyzích buňkách.

Pro westernové bloty byly proteiny přeneseny na nitrocelulózu (Gelman Sciences) pomocí polosuchého elektrického přenosu (Kyhse-Anderson, 1984) s použitím AE-6675 Horizblot MS-HBP1 od prvního dne odpoledne do konce období krmení.

Obrázek 14 ukazuje analýzu exprese proteinu D.RET6 westernovým blotem.

4) Exprese a purifikace proteinu Av-HBP

Kódující oblast cDNA Av-HBP byla amplifikována pomocí PCR (95 °C po 30'', 50 °C po 30'', 72 °C po 30'', 18 cyklů) při použití dopředního primeru navrženého tak, aby přidal místo SacI do protisměru od startovacího kodonu (5'-TATGAGCTC ATGAACTCTGCCTTGTGG, místo SacI je podtrženo), a reverzního primeru (5'-TATGGATCCGGGGTGGCCTCACCG) obsahujícího místo BamHI (podtrženo). Produkt byl ligován mezi místa SacI a BamHI v transferovém vektoru pAcCl29.1 (Livingstone a Jones, 1989), který byl modifikován inzercí šesti histidinových kodonů a stop kodonu, po směru od rozpoznávacího místa BamHI (viz již citovaný předchozí patent). To mělo za následek přidání sekvence Ile(His)₆ na karboxylový konec Av-HBP.

Současná transfekce buněk *Spodoptera Sf21* transferovými vektory a bakulovirem (BacPak6) a amplifikace rekombinantního viru byly provedeny postupem podle Kitts a Possee (1993). Buňky *Trichoplusia ni* (High Five, Invitrogen) a médium TC100 obsahující 10% fetální bovinní sérum (Gibco BRL) byly použity pro expresi proteinu. Po 60 hodinách inkubace ve 28 °C byl secernovaný protein precipitován z média sulfátem amonným (ve 45-80% saturační frakci) a opět rozpuštěn v pufru 50mM fosfátu sodného (pH 8,0) obsahujícím 300mM NaCl a 10% glycerol (pufr A). Záchytné perličky (Clontech) byly přidány, aby zachytily proteiny označené oligohistidinem (inkubace 1 hodinu ve 4 °C). Perličky byly nanесeny do kolony o objemu 10 ml a promyty pufrem A (20 objemů), a pak pufrem s 50mM fosforečnanem sodným (pH 7,0), obsahujícím 300mM NaCl a 10% glycerol (20 objemů), a nakonec pufrem s 50mM fosforečnanem sodným (pH 7,0, 20 objemů). Protein byl eluován při použití 200mM imidazolu v pufru fosforečnanu sodného (100mM, pH upraveno na 8,0).

Příklad 3

Charakterizace proteinů

1) Testy na vazbu histaminu

S purifikovanými rekombinantními proteiny byly provedeny testy na vazbu histaminu, jako jsou vysvětleny v práci Warlowa a Bernarda (1987). Tato metoda používá proteinovou precipitaci, aby se oddělil volný protein od navázaného ligandu (radioaktivně značeného histaminu), přidáním polyetylglykolu (molekulová hmotnost 8000) a stočením. Ve všech pokusech byly prováděny chromatografie na tenké vrstvě v systému rozpouštědla acetátu amonném po čtyřech hodinách

inkubace pro ujištění, že nedošlo k žádné metabolické přeměně histaminu.

U FS-HBP1, FS-HBP2, MS-HBP1, a rHBP byla získána satureovatelná vazba ^3H -histaminu (viz obrázek 20 v přihlášce PCT/GB97/01372).

Co se týče Av-HBP, byl inkubován napůl purifikovaný rekombinantní protein s různým množstvím histaminu s tritiem, a pomocí kapalínového scintilačního počítače se určovalo množství navázané radioaktivní značky. Separace volného a navázaného ligandu se dosáhlo podle metody popsané v práci Warlowa a Bernarda (1987), která používá polyetylglykol (PEG 8000) k precipitaci proteinu. Výsledky (neuvedeny) nasvědčují, že rovnovážná disociační konstanta (K_d) pro histamin je okolo 7,3 nM.

2) Test na vazbu radioaktivně značeného ligandu (radioligandu) D.RET6

Rekombinantní D.RET6 byl naředěn 1,5% γ -globulinem (Sigma) a použit v jedné řadě pokusů. 50 μl proteinového roztoku se inkubovalo s 50 μl $[2,5\text{-}^3\text{H}]\text{histaminu diHCl}$ (1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) při ředění 1:2500 (Amersham) při teplotě místnosti po dobu alespoň 3 hodin se stoupající koncentrací neznačeného histaminu nebo bez histaminu. Všechny testy se prováděly v celkovém objemu 200 μl . Inkubace byla ukončena přidáním 125 μl PEG 8000 (36% (hmotnost/objem) v PBS) a stočením v mikrocentrifuze maximální rychlostí po dobu 12 minut, aby se sebral navázaný protein. Zkumavky byly stočeny ještě jednou, aby se odstranil veškerý supernatant bez porušení peletů. Pak byly pelety znovu rozpuštěny v PBS. Byly přidány tři mililitry tekutého scintilačního koktejlu (Beckman) a měřila se radioaktivita při použití kapalínového scintilačního počítače (Wallac, 1217 Rackbeta).

Ve druhé řadě pokusů byl použit kompetitivní vazebný test pro srovnání tří neznačených kompetitivních ligandů (histamin, 1-metylhistamin a 3- metylhistamin).

Aby se studoval vliv serotoninu na vazebnou aktivitu pro histamin, bylo ke každým 200 μ l vazebného testu přidáno 10 μ l PBS (jako kontrolní pokus) nebo 10 μ l serotoninu (50 μ M nebo 500 μ M).

Co se týče analýzy dat, afinitní konstanta ligandu byla určena ze Scatchardových diagramů, jak bylo dříve popsáno Hulmem ("Receptor-Ligand Interactions", IRL Press, Oxford, 1992). Pro proložení závislosti experimentálními daty byla použita nelineární regrese (Motulsky, FASEB J., 1, 365-374, 1987) a byly vytvořeny dvě asymptotické přímky, jak bylo již popsáno jinde (Feldman, Analytical Biochem., 48, 317, 1972).

Z vynesené křivky byly narýsovány dvě asymptotické přímky podle Feldmana (1972) odpovídající dvěma vazebným místům histaminu přibližné K_d 6×10^{-8} M a 2×10^{-6} M. Srovnání schopnosti histaminu a jeho metylderivátů nahradit radioaktivní histamin ukázalo, že vazba prostřednictvím D.RET6 byla specifická pro histamin (obrázek 15). Překvapivě saturační křivky a odpovídající Scatchardovy diagramy pro vazbu histaminu v přítomnosti serotoninu odhalily významné synergické působení (obrázky 15 a 16). V konečné koncentraci 2,38 μ M serotoninu byla K_d pro dvě vazebná místa pro histamin $1,1 \times 10^{-9}$ M a 1×10^{-6} M a při 23,8 μ M serotoninu $1,3 \times 10^{-9}$ M a 1×10^{-6} M.

Bylo tedy zjištěno, že v přítomnosti serotoninu se vazebná afinita D.RET6 ke svému ligandu, histaminu, zvýšila šedesátkrát. Nedávno bylo publikováno, že externí stimuly (včetně serotoninu) regulují aktivitu savčího receptoru H_1 , podněcující zvýšenou afinitu k ligandu (Bloemers, S.M., Verheule, S., Peppelenbosch, M.P., Smit, M.J., Tertoolen, L.G.J. a De Laat, S. The Journal of Biological Chemistry,

273(4), 2249-2255, 1998). Ačkoliv molekulové detaily zůstávají nejasné, pro vysvětlení zvýšené afinity k histaminu byla navržena konformační změna v receptoru H_1 (Bloemers, 1998). Zdá se tedy možné, že synergické působení serotoninu na protein roztoče vázající histamin vyvine zrušení serotoninem indukované zvýšené vazebné afinity receptorů H_1 . Takový mechanismus by tudíž mohl umožnit proteinu roztoče překonat serotoninem zcitlivěné histaminové receptory hostitele v místě sání. Protože dospělý *D. reticulatus* saje na celé řadě domestikovaných i divokých zvířat, včetně psa, koně, dobytka, ovčí, jelena, lišky, zajíce a ježka, synergické působení serotoninu by mohlo zajistit flexibilitu pro výkonnost proteinu roztoče vázajícího histamin v rozsahu hemostatických reakcí specifických pro hostitele.

Tento náález má důležité důsledky pro navrhování molekul s vazebnou aktivitou pro histamin a poskytuje důležité porozumění mechanismu účinku těchto roztočových proteinů, spolu s molekulami navrženými pro napodobení jejich působení. Například, aby se změnila afinita těchto molekul pro histamin, může být serotonin podáván současně v příslušném množství.

Příklad 4

Krystalizace proteinů

Purifikovaný FS-HBP2 byl dialyzován proti 10mM histaminu ve vodě (pH histaminového roztoku bylo upraveno na hodnotu 6,8 použitím NaOH) a koncentrován pomocí centrifugačních jednotek Centricon 10 (Amicon) na konečnou koncentraci proteinu 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Visící kapka 3 μl roztoku protein/histamin spojená se 25 μl matečného roztoku byla ponechána ekvilibrovat při teplotě místnosti s 1 ml matečného roztoku [0,1M pufr MES (pH 6,5), obsahující 0,01M hexahydrát chloridu kobaltu a 1,8M síran amonný (Hampton Research)].

Nativní data při rozlišení 2,24 Å a derivovaná data na 3 Å byla sbírána při teplotě místnosti při použití vlastních zobrazovacích destičkových detektorů "Mar-research" připojených k rotačním anodovým generátorům "Rigaku". Zmrazená nativní a semi-apo data se sbírala (při rozlišení 1,24 Å a 1,35 Å) na synchrotronu Brookhaven National Laboratory při použití Brandeisova jednomodulového CCD detektoru (viz tabulka 1). Semi-apo krystal byl připraven imerzí do několikrát vyměněného matečného roztoku bez histaminu během týdne před sběrem dat. Jako zmrazovací roztok byl použit matečný roztok obsahující 30% glycerol. Krystaly byly přechovávány v 100 K při použití zařízení Cryostream (Oxford Cryosystems). Zmrazení mělo za následek zřetelnou změnu rozměrů jednotkové buňky, s osami b a c menšími a osou a trochu větší než při teplotě místnosti. Difrakční data byla zpracována s programy DENZO a SCALEPACK (Otwinowski a Minor, 1997).

Fázování a tvorba modelu

Struktura byla řešena pomocí MIR při použití derivátů cis-platiny a acetátu trimetylolova (Holden a Rayment, 1991) (tabulka 1). Zpočátku byla pro každý nový derivát sbírána 10-15° data. Sběr dat pokračoval pouze u krystalů, které vykazovaly výraznější izomorfní odlišnosti, jinak byly přeneseny zpět do matečného roztoku pro další ponoření.

Diferenciační Pattersonovy mapy umožnily po prozkoumání lokalizovat dvě vazebná místa pro každý těžký kov. Další místa a společný počátek pro tyto dva deriváty byly nalezeny pomocí Fourierovy metody. Acetát trimetylolova zavádí určitý stupeň neizomorfie (viz tabulka 1). Redukce dat, změna měřítko a výpočet izomorfních odchylek se provádělo vlastními programy 3DSCALE a DIFFER (Stuart a kol., 1979). Fáze MIR byly vypočítány pomocí MLPHARE (Otwinowski, 1991) a vylepšeny

"vyrovnáváním" pomocí programu GAP (Grimes a Stuart, nepublikováno).

Výchozí mapy odhalily přítomnost dvou molekul v asymetrické jednotce. Operátor nekystalografické symetrie týkající se těchto molekul byl určen a upřesněn pomocí GAP začínajícím z koordinát vazebných míst těžkých kovů a pozice markeru vybrané z mapy elektronové denzity. Zprůměrování nekystalografické symetrie poskytlo mapu elektronové denzity vysoké kvality, která mohla být snadno interpretována. K interpretaci mapy elektronové denzity se použil FRODO (Jones, 1985) a O (Jones, 1991).

Tabulka 1

(a) Stanovení struktury a upřesnění

	Jednotková buňka (a,b,c)	Rozlišení (Å)	celkový počet odrazů	počet jedinečných odrazů
Nativní	77,0, 77,8, 80,1	20-2,27	127,028	22,222
Cis Pt	76,9, 77,8, 80,1	20-3	35,045	9,898
TML	76,2, 78,9, 80,1	20-3	41,086	9,938

	Úplnost (%)	R-přechod	% isomorfní diference	Počet míst	Fázovací síla
Nativní	94,8	5,2	-	-	-
Cis Pt	97,6	8,0	20,5	6	1,6/1,3
TML	97,1	7,7	32,6	2	1,0/0,8

(b) Statistické hodnoty upřesnění

	Nativní 2	Apo
jednotková buňka (a,b,c)	77,5, 74,8, 78,6	77,5, 74,4, 77,9
Rozsah rozlišení (Å)	20,0 - 1,24	20 - 1,35
Počet odrazů	108,735	76,301
R-faktor	18,4%	18,7 %
Počet atomů proteinu	2744	2744
Počet molekul vody	529	537
RMS odchylka délky vazby	0,013Å	0,014 Å
RMS odchylka úhlu vazby	1,5°	1,6°
Průměrný B-faktor (protein: A a B	11 Å ²	20 Å ²
Průměrný B-faktor (ligand, místo H)	5 Å ²	17 Å ²
Průměrný B-faktor (ligand, místo L)	5 Å ²	S
Průměrný B-faktor (voda)	26 Å ²	36 Å ²

Upřesnění a analýza

Počáteční mapa okamžitě odhalila, že FS-HBP2 má topologii lipokalinu. Souřadnice proteinu vázajícího kyselinu retinovou (IRBP) byly použity jako počáteční rámec pro konstrukci modelu. Počáteční model byl zpřesňován proti souboru dat získaných při teplotě místnosti (Native1, viz tab. 1) pomocí XPLOR (Brtinger, 1992) (pevné těleso, poziční a B-faktorové upřesnění). Výsledný model byl upřesněn proti souboru dat s vyšším rozlišením (Native2). Upřesnění na tuhé těleso vedlo ke zlepšení oprátorů NCS, což umožnilo poziční a B-faktorové upřesnění k rozlišení 1,24 Å. Další upřesňování obsahovalo anisotropní zjemňování B faktoru a simulované spojení.

Molekuly histaminu a vody pak byly zahrnuty s korekcí na okolní rozpouštědlo. V průběhu upřesňování byla modifikována stereochemická omezení, takže byly nakonec zanedbány elektrostatické síly a van der Waalsovy síly.

Pro validaci struktury byl užit PROCHECK (Laskowski a kol., 1993). Pro přiřazení sekundární struktury byl užit DSSP (Kabsch a Sander, 1983). K superpozici struktury byl užit SHP (Stuart a kol.). Atomové souřadnice použité pro srovnávání byly získány z proteinové databáze Protein Databank, Brookhaven National Laboratory.

Strukturní determinace rFS-HBP2

Komplex FS-HBP2-histamin krystalizuje v ortorombické prostorové skupině ($P2_12_12_1$) se dvěma molekulami v každé asymetrické jednotce. Velikost jednotkové buňky je proměnlivá, zejména při zmrazení (tabulka I). Struktura byla vyřešena užitím dvou derivátů těžkých atomů a pak upřesněna pomocí XPLOR (Brunger 1992), což poskytlo výsledný model s rozumnou stereochemií (odchylka RMS vazby 0,013 Å) a R-faktorem 18,4 % pro všechna data v rozlišovacím rozmezí 20 až 1,24 Å (viz tabulka 1). 91,1 % reziduí spadalo do nejvýhodnějšího úseku Ramachdranova vynesení, žádná rezidua nebyla v nedovolené oblasti. Dvě krystalograficky odlišné molekuly (A a B) jsou velmi podobné (rms odchylka pro atomy C je 0,6 Å). Významné rozdíly jsou ve smyčkách v kontaktních bodech krystalu (viz obr. 20) (konformace postranního řetězce rezidua Val21 se také odlišuje mezi A a B molekulou, ale je nepravděpodobné, že by tím byla ovlivněna biologická funkce). Obě molekuly obsahují dva histaminy, navázané v místech označených H a L. Chyba souřadnic pro většinu atomů jiných než vodík je menší než 0,2 Å (Luzzatti a kol., 1952).

Molekuly A a B v krystalu mají jeden rozsáhlý kontakt, vodíkové vazby hlavního řetězce spojují krátký řetězce za

oblastí α 3-helixu (zbytky A143 až A146) s koncem B řetězce molekuly B (zbytky B54 až B57). (obr. 20a,c). Další vodíkové vazby spojují A150 ND2 s B25 O a A167 OG s B59 OD1. Tyto molekuly nejsou spojeny dvojnásobnou osou. Několik zbytků na povrchu proteinu projevuje několik konformací v krystalu, avšak ty nehrají žádnou roli ve strukturních a funkčních interakcích, o kterých se pojednává dále. Podle vynikající difrakce krystalografické B-faktory jsou poněkud nízké (tabulka 1), což ukazuje, že molekula má značně pevné jádro. Zpřesněný model molekuly A obsahuje zbytky A1 až A171 nativního proteinu společně se značkou Ile-(His)6 vnesenou na karboxylový konec metodami genového inženýrství. Ačkoliv bylo možné v této oblasti vystopovat průběh polypeptidové řetězce, pozice tří His postranních řetězců nebyla jasná, takže byly modelovány jako Ala. Pro značku (His)6 v molekule B nebyla získána žádná hustota (zbytek B1 byl také zanedbán díky poruše)

Celková struktura

Hlavní část molekuly (přibližný rozměr 33 Å x 38 Å x 45 Å) je osmiřetězcový antiparalelní β -válec, jehož topologie řadí FS-HBP2 do nadrodiny lipokalinu (viz obr. 13 a Flower 1996). Lipokaliny jsou typicky extracelulární proteiny, které transportují malé hydrofobní ligandy s různou mírou specifity. FS-HBP2 β -válec nese 2 molekuly histaminu a protein je doplněn částečně helikální extenzí N-konce a karboxylového konce (viz obr. 13a). Vzhledem k vysoké míře sekvenční podobnosti lze očekávat, že celková struktura všech tří Ra-HBP je velmi podobná (RMS odchylka mezi C α atomy je přibližně 1 Å).

Jedinečné vlastnosti

Některé vlastnosti, které mají funkční význam, odlišují FS-HBP2 od ostatních lipokalinů.

Neobvykle prodloužený aminokoncový úsek FS-HBP2 nejdříve nejprve prochází podél válce a vytváří vodíkové vazby s β -řetězcí F a G, než vytvoří $\alpha 1$ a $\alpha 2$ helix. Podstatná část $\alpha 2$ helixu je umístěna přes "ústí" válce v interakci se zbytky na hraně, čímž vytváří významnou bariéru mezi vazebnými kapsami a vnějškem (obr. 20a,b). jedna strana helixu je držena na místě vodíkovými vazbami se smyčkou spojující řetězce B a C. Druhá strana helixu je vázána vodíkovými vazbami k řetězcům F a G (smyčka F-G zvláště vyčnívá v HBP, v souladu s její funkční rolí).

Tak jako u jiných lipokalinů, je zde $\alpha 3$ -helix, který přiléhá ke středu válce. Ve FS-HBP2 je helix připojen k válci na svých koncích dvěma disulfidickými můstky (Cys 119 k Cys148 a Cys48 k cys168).

Strukturně konzervativní oblasti (SCR) ležící v těsné blízkosti, byly identifikovány jakožto složky určující prostorové uspořádání lipokalinu (Flower 1996). Oblasti SCR obsahují 3/10 helixu následované sekvencí Gly-X-Trp v řetězcí A. ve FS-HBP2 α -helix nahrazuje 3/10 helixu a Asn-Val-Tyr (zbytky 27 až 29) nahrazují "podpisovou" sekvenci. Domény SCR několika lipokalinů obsahují motiv Thr-Asp-Tyr. I když FS-HBP2 neobsahuje "podpisovou" sekvenci, jsou zde konformační podobnosti v této oblasti (např. charakteristický zlom v řetězcí F). Poslední konzervativní úsek, mezi řetězcem H a $\alpha 3$, obsahuje Arg nebo Lys v blízkosti konzervativního Trp v SCRI. V HBP2 tato smyčka obsahuje tripeptid Thr-Asp-tyr (139 až 141), který se obvykle vyskytuje v SCR2. Překvapivě HBP2 obsahuje ještě několik dalších sekvenčních prvků, které připomínají špatně umístěné fragmenty lipokalinu (ačkoliv

sekvence Glu-Lys-Val-Thr-Ala v řetězci D dokonale souhlasí s ekvivalentním úsekem epididymálním vazebným proteinem kyseliny retinové, viz Newcomer 1993).

Snad nejvíce překvapujícím jedinečným rysem struktury HBP je přítomnost dvou vazebných míst pro ligand v jádře válce. Jedna z histaminových molekul se váže po celé šířce vazebné kapsy, což vyžaduje, aby řetězce G a H byly odstraněny ze zbytku listu, čímž se deformuje kanonický vzorec vodíkové vazby.

Dvě vazebná místa, která se liší afinitou pro histamin

Aby bylo možné analyzovat relativní afinity dvou vazebných míst pro histamin a ověřit konformační důsledky vazby histaminů, byl učiněn pokus odstranit histamin z preformovaných krystalů. Pevný režim ponořování krystalů do matečného roztoku (bez histaminu) byl dodržován při získávání dat ve 100K. Difrakční data odhalila, že histamin byl ztracen z jednoho vazebného místa u obou krystalograficky nezávislých molekul, zatímco druhé místo zůstalo plně obsazené. Z toho bylo odvozeno, že v krystalu má jedno místo mírně vyšší rychlost obratu. Podobné chování dvou molekul v různých prostředích v krystalu napovídá, že jedno místo, označené H, má vyšší vnitřní afinitu než druhé místo, označené L. Pozorované interakce ligand-protein podporují toto přiřazení.

Vazebná místa jsou lokalizována mimo střed na opačných koncích válce (obr. 20a). Neobvykle pro lipokalin (ale v souladu s hydrofilní povahou ligandu) obě vazebné kapsy ukrývají velký počet nabitých zbytků uvnitř válce. Tyto zbytky jsou kritickými složkami vazebných míst histaminu (viz obr. 21a,b). RMS rozdíl v délce stabilizujících vodíkových vazeb mezi A a B molekulou je 0,08 Å, z tohoto hlediska nejsou molekuly odlišné. Postranní řetězec zbytku Tyr100 a přemostující molekula vody vytvářejí stěnu oddělující místa

H a L. Avšak síť vodíkových vazeb spojuje tato dvě místa, jejichž ložja jsou téměř plně konzervativní pro různé HBP. V místě H histaminový ligand leží kolmo k podélné ose válce, což vede k pokřivení struktury HBP ve srovnání s ostatními lipokaliny. Aromatické postranní řetězce Trp42 a Phe108 jsou uspořádány paralelně, ale mírně excentricky, takže vytvářejí silné Π - Π vrstevné interakce (McGaughey a kol., 1998) s imidazolovou skupinou molekuly histaminu. Fenolový kruh Tyr100 je kolmý k rovině imidazolového kruhu histaminu, což přispívá k dalším Π - Π interakcím. Existuje rozsáhlá síť vodíkových vazeb mezi atomy dusíku histaminu a karboxylovými skupinami Glu (82 a 135) a Asp (39 a 110), jak přímo nebo prostřednictvím molekul vody. Na základě jeho okolí lze usuzovat, že vazebné místo H je vázáno v dikationtové formě.

V místě L je molekula histaminu umístěna paralelně s válcem s imidazolovou skupinou směřující ke středu válce. Typy interakcí v místě L jsou podobné s místem H, ale poněkud méně výhodné. Imidazolový kruh histaminu je v interakci s fenolovým kruhem postranního řetězce Phe98, které jsou téměř kolmé. Existují tu další van der Waalsovy interakce s fenolovým kruhem Tyr29, zatímco Ser20, Asp24 OE1, Tyr100 OH a Asp120 OE2 tvoří vodíkové vazby s atomy dusíku histaminu.

Tyr100 má proto roli při vazbě molekul histaminů, třebaže užívá různé druhy interakcí. Žádné uspořádané molekuly vody nejsou přítomny v místě L a výpočty objemu ukazují, že histamin je mírně méně těsně nahloučen v tomto místě, Analýza B-faktoru však potvrdila, že oba histaminové ligandy jsou pevně vázány (tabulka 1). Poněkud horší "napasování" histaminu v místě L vede k otázce, zda by mohla být přirozeným ligandem v této kapse jiná sloučenina než histamin.

Struktura FS-HBP2 s jednou histaminovou vazbou

Struktura FS-HBP2 bez histaminu v L místě byla stanovena u obou molekul A i B, ačkoliv v molekule B je patrný zbytek histaminu (míra obsazení přibližně 10 %). Model pro tuto „semi-apo“ strukturu má R-faktor 18,7 % (tabulka 1). Strukturní detaily jsou v podstatě shodné pro molekulu A i molekulu B. Čtyři molekuly vody nahradily histamin v poloze L, z nichž jedna zaujala polohu atomu C β histaminu (obr. 21c), zatímco ostatní destabilizují tím, že zaujaly ekvivalentní polohy atomů dusíku histaminu. Odstranění histaminu z místa L způsobilo jen malou změnu (řádově několika desetiny Å, celková změna RMS v pozici Cot je pouze 0,1 Å) a konformace postranního řetězce zůstala v podstatě nezměněna (obrázek 21c). Histamin zůstal vázán v plné míře obsazení v místě H, což je v souladu s mnohem vyšší afinitou tohoto místa.

Důsledky sekvenční variace v rámci rodiny HBP

Sekvenční variace mezi třemi HBP se vyskytuje i pro zbytky přímo se podílející na vazbě histaminu, zejména se to týká těch, které přispívají ke kapse L. Celkově FS-HBP2 připomíná více FS-HBP1 než MS-HBP1, avšak L-kapsa FS-HBP2 je ve skutečnosti více podobná kapse MS-HBP1 než FS-HBP1, i přes to, že celkově FS-HBP2 připomíná více FS-HBP1. V FS-HBP1 histidinový a tyrosinový zbytek nahradily Ser20 a Asp120. Tyto změny musejí podstatně modifikovat jak tvarové tak nábojové charakteristiky ve vazebné kapse. Na rozdíl od mnohých změn v L místě, pouze substituce Phe108 za Leu se dotýká H místa v FS-HBP1. Kds pro FS-HBP2 a MS-HBP1 jsou podobné, a asi 10x nižší než pro FS-HBP21, což předpokládá, že modifikace v L místě modulují pozorované vazebné afinity. Modelování struktury FS-HBP1 ukazuje, že ztráty aromatických zbytků mohou otevřít vnitřní dutinu, což by mohlo změnit specifitu.

MS-HBP3, protein specifický pro samce, má výraznější změny v porovnání s FS-HBP2, včetně inzercí a delecí v oblastech

smyček. MS-HBP1 obsahuje další Cys (150), který je pravděpodobně na povrchu molekuly a je zodpovědný za vytvoření kovalentních dimerů zmíněných již výše. Předpokládané glykosylační místo, Asn61 je také pravděpodobně přístupné rozpouštědлу (obrázek 13).

Příklad 5

Konstrukce syntetického cyklického peptidu s vazebnou aktivitou pro histamin

Existují dva řetězce v proteinech vázajících histamin, znázorněné na obr. 17 a 18, a sice A a B. Každý řetězce váže dva histaminy, jeden v množství μmol a druhý v pmol . Výzkum geometrie těchto čtyřech vazebných míst je sumarizován v tab. 2 a 3 dále.

Tyto údaje ukazují, že v pmol vazebných kapsách je kladně nabitý kvartrerní dusík v „ocásku“ histaminu vázán ke dvěma záporně nabitým zbytkům (Asp110 a Glu135). Podobně také, kladně nabitý imidazolový kruh je vázán ke dvěma negativně nabitým zbytkům (Glu 82 a Asp39) prostřednictvím dvou atomů dusíku v kruhu. Jsou zde také dva aromatické kruhy pro interakce pozitivních nábojů mezi atomem dusíku imidazolového kruhu a Trp42 a Phe108.

1. Návrh peptidu

Analýza aktivních míst vedla k návrhu, že pro napodobení vazebných míst histaminu je třeba vzít v úvahu dva odlišné typy interakce. První typ interakce je mezi kladně nabitými centry (dusíkový „ocásek“ a imidazolový kruh) a negativně nabitými zbytky. Druhý typ interakce je mezi kladně nabitým imidazolovým kruhem a aromatickým kruhem.

To vedlo k návrhu několika systémů cyklických peptidů, které obsahují záporně nabitě zbytky, např. Glu a aromatické

zbytky, např. Phe. Počáteční modelové studie ukázaly, že cyklické hexapeptidy by nebyly dostatečně flexibilní, aby umožnily rozpoznání histaminu. Modelování systémů cyklických oktapeptidů ukázalo, že ty by mohly umožnit vazbu histaminu.

Sekvence navrženého oktapeptidu byla:

Ala-Glu-Ala-Phe-Ala-Glu-Ala-Trp

Obrázky 17 a 18 ukazují minimalizovanou konformaci systému cyklický oktapeptid/histamin. Tyto obrázky ukazují předpokládaný způsob vazby mezi histaminem a cyklickým peptidem. Na obou „koncích“ cyklického peptidu jsou dva záporně nabitě Glu zbytky, které vytvářejí interakci s kladně nabitým dusíkovým „ocáskem“ a imidazolovým kruhem. Zbytky Phe a Trp na opačných stranách imidazolového kruhu umožňují interakci aromatického kruhu s kladným nábojem.

Interakční vzdálenosti mezi různými centry (kladný náboj od negativního náboje a kladný náboj od aromatické skupiny) jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2

Průměrné vzdálenosti histidin - peptid

Interakce	Vzdálenost Å
Histidinová značka - kyselý C Glu	3,66
Imidazolový kruh - kyselý C Glu	3,53
Imidazolový kruh - centroid Phe	4,91
Imidazolový kruh - centroid Trp	4,94

Systém číslování atomů.

Tabulka 3

Silná vazebná místa

Atom Hst	Zbytek	Atom	Řetězec A Å	Řetězec B Å
1	Tyr 36	OH	3,32	3,4
1	Asp 110	Kyselý C	3,37	3,66
1	Glu 135	Kyselý C	3,88	3,84
2	Glu 82	Kyselý C	3,33	3,37
3	Asp 39	Kyselý C	3,44	3,35
3	Trp 42	Centroid kruhu	3,7	3,97
3	Phe 108	Centroid kruhu	4,1	4,21

Tabulka 4

Slabá vazebná místa Hst

Atom Hst	Zbytek	Atom	Řetězec A Å	Řetězec B Å
1	Ser 20	C=O	2,85	2,83
1	Ser 20	OH	3,07	3,13
1	Asp 24	Kyselý C	2,88	3,12
1	Tyr 29	Centroid	3,23	3,21
1	Asp 120	O	3,64	2,71
2	Asp 24	O	2,64	2,66
3	Tyr 100	OH	2,80	2,78

Citovaná literatura

- Goode, B.L. and Feinstein, S.C. (1992) "Speedprep" purification of template for double-stranded DNA sequencing. *Bio Techniques* 12, 374-375.
- Hogan J.C. (1997) *Nature Biotech.* 15, 328-330.
- Holden H.M. and Rayment I. (1991) *Archives of Biochemistry and Biophysics* 291, 187-194.
- Janknecht R., de Martynoff G., Lou L., Hipskind R.A., Nordheim A. and Stunnenberg H.G. (1991) Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. *PNAS USA* 88, 8972-8976.
- Jones L.D., Davies C.R., Steele G.M. and Nuttall P.A. (1988). The rearing and maintenance of Ixodid and Argasid ticks in the laboratory. *Animal Technology* 39, 99-106.
- Kitts P.A. and Possee R.D. (1993) A method for producing recombinant baculovirus expression vectors at high frequency. *BioTechniques* 14, 810-817.
- Kyhse-Anderson J. (1984) Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* 10, 203-209.
- Laemmli V.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Livingstone C. and Jones I. (1989) Baculovirus expression vectors with single strand capability. *Nucleic Acids Res.* 17, 2366.
- Maley F., Trimble R.B., Tarentino A.L. and Plummer T.H. Jr. (1989) Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. *Anal. Biochem.* 180, 195-204.
- Matsudaira P. (1987). Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.* 262, 10035-10038.
- Mierendorf R.C. and Pfeffer D. (1987) Direct sequencing of denatured plasmid DNA. *Methods Enzymol.* 152, 556-562.
- O'Reilly *et al.*, (1994) *Baculovirus expression vectors - a laboratory manual*, Oxford University Press.

- Program Manual for the Wisconsin Package, version 8 (1994) Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711.
- Protein Expression in Current Protocols in Molecular Biology (Chapter 16). Editors : F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingson, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl. Published by John Wiley and Sons, Inc.
- Rees A.R. *et al.*, eds, *Protein Engineering: A practical approach*, IRL Press 1993.
- Ribeiro J.M. and Walker F.A. (1994) High-affinity histamine-binding and antihistaminic activity of the salivary nitric oxide-carrying heme protein (nitrophorin) of *Rhodnius prolixus*. *J. Exp. Med.* **180**, 2251-2257.
- Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory.
- Sanger F. and Coulson A.R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J.Mol. Biol.* **94**, 441-448.
- Schägger, H. and von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-379.
- Short J.M., Fernandez J.M., Sorge J.A. and Juse W.D. (1988) λ ZAP: a bacteriophage λ expression vector with *in vivo* excision properties. *Nucl. Acids Res.* **16**, 7583-7600.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
- Wang H. and Nuttal P.A. (1995). Immunoglobulin G binding proteins in male *Rhipicephalus appendiculatus* ticks. *Parasite Immunology* **17**, 517-524.
- Warlow R.S. and Bernard C.C.A. (1987). Solubilization and characterization of moderate and high affinity histamine binding sites on human blood mononuclear cells. *Molec. Immun.* **24**, 27-37.
- Watson *et al.*, *Recombinant DNA* (2nd edition), Scientific American Books.

- a 82, v příslušném pořadí, v každé ze sekvencí id. č. 1 nebo 2, nebo zbytky 107, 41, 38 a 78 v sekvenci id. č. 3 nebo zbytky 122, 54, 50 a 95 v sekvenci id. č. 4, a druhé vazebné místo obsahující aminokyselinový zbytek fenylalanin nebo isoleucin ve zbytku I, tryptofan ve zbytku II a aspartát nebo glutamát ve zbytcích III a IV, přičemž zbytky I až IV jsou umístěny v podstatě stejně jako zbytky 98, 137, 24 a 120, v příslušném pořadí, v každé ze sekvencí id. č. 1 nebo 2, nebo zbytky 95, 138, 23 a 120 v sekvenci id. č. 3 nebo zbytky 112, 149, 35 a 135 v sekvenci id. č. 4, a její funkční ekvivalenty.
4. Sloučenina vázající histamin nebo serotonin podle nároku 1 nebo 3 navíc obsahující ve zbytku V tyrosinový zbytek, přičemž zbytek V je umístěn v podstatě stejně jako zbytek 100 v každé ze sekvencí id. č. 1 nebo 2, zbytek 97 v sekvenci id. č. 3 nebo zbytek 114 v sekvenci id. č. 4, a její funkční ekvivalenty.
5. Sloučenina vázající histamin nebo serotonin podle nároku 2 nebo 3 navíc obsahující ve zbytku V tyrosinový zbytek, přičemž zbytek V je umístěn v podstatě stejně jako zbytek 29 v proteinové sekvenci každé ze sekvencí id. č. 1 nebo 2, zbytek 28 v sekvenci id. č. 3 nebo zbytek 40 v sekvenci id. č. 4, a její funkční ekvivalenty.
6. Sloučenina vázající histamin nebo serotonin podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, přičemž uvedená sloučenina je stabilizována pomocí jednoho nebo obou disulfidových můstků tvořených mezi cysteiny 48 a 169 a cysteiny 148 a 119 v proteinové sekvenci každé ze sekvencí id. č. 1 nebo 2, cysteiny 47 a 175 a cysteiny

151 a 119 ze sekvence id. č. 3 nebo cysteiny 162 a 134 ze sekvence id. č. 4.

7. Sloučenina vázající histamin nebo serotonin podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, která obsahuje peptid, nebo fragment kteréhokoliv z proteinů FS-HBP1, FS-HBP2, MS-HBP1 nebo D.RET6.
8. Sloučenina vázající histamin nebo serotonin podle nároku 7, která obsahuje cyklický polypeptid.
9. Sloučenina vázající histamin nebo serotonin podle nároku 8, přičemž cyklický polypeptid obsahuje sekvenci Ala-Glu-Ala-Phe-Ala-Glu-Ala-Trp.
10. Sloučenina vázající histamin nebo serotonin podle kteréhokoliv z nároků 1 až 9, která obsahuje syntetickou sloučeninu.
11. Protein obsahující Ra-Res aminokyselinovou sekvenci uvedenou v sekvenci id. č. 5 nebo funkčně rovnocenný derivát nebo jeho funkčně rovnocenný fragment.
12. Protein obsahující Av-HBP aminokyselinovou sekvenci uvedenou v sekvenci id. č. 6 nebo funkčně rovnocenný derivát nebo jeho funkčně rovnocenný fragment.
13. Protein obsahující Ih/Bm-HBP1 aminokyselinovou sekvenci uvedenou v sekvenci id. č. 7 nebo funkčně rovnocenný derivát nebo jeho fragment.

14. Protein obsahující Ih/Bm-HBP2 aminokyselinovou sekvenci uvedenou v sekvenci id. č. 8 nebo funkčně rovnocenný derivát nebo jeho fragment.
15. Protein obsahující Ih/Bm-HBP3 aminokyselinovou sekvenci uvedenou v sekvenci id. č. 9 nebo funkčně rovnocenný derivát nebo jeho fragment.
16. Protein obsahující Ih/Bm-HBP4 aminokyselinovou sekvenci uvedenou v sekvenci id. č. 10 nebo funkčně rovnocenný derivát nebo jeho fragment.
17. Protein obsahující Ih/Bm-HBP5 aminokyselinovou sekvenci uvedenou v sekvenci id. č. 11 nebo funkčně rovnocenný derivát nebo jeho fragment.
18. Sloučenina vázající histamin nebo serotonin podle kteréhokoliv z nároků 1 až 10 nebo protein podle kteréhokoliv z nároků 11 až 17 vytvořený technologií rekombinantní DNA.
19. Sloučenina vázající histamin nebo serotonin nebo protein podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, která se váže specificky na histamin.
20. Sloučenina vázající histamin nebo serotonin nebo protein podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, která má k sobě připojenou efektorovou nebo reportérovou molekulu.
21. Sloučenina vázající histamin nebo serotonin nebo protein podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, která pochází z ektoparazitů, kteří se živí krví, pavouků, škorpiónů nebo hadů a jedovatých živočichů.

22. Sloučenina vázající histamin nebo serotonin nebo protein podle nároku 21, který pochází z roztočů.
23. Sloučenina vázající histamin nebo serotonin nebo protein podle nároku 22, který pochází z roztočů *Ixodidae*.
24. Sloučenina vázající histamin nebo serotonin nebo protein podle nároku 23, který pochází z *Rhipicephalus appendiculatus*, *D. reticulatus*, *Amblyomma variegatum*, *Boophilus microplus* nebo *Ixodes hexagonus*.
25. Sloučenina vázající histamin nebo serotonin nebo protein podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, která je spojená s jednou nebo více sacharidovými skupinami.
26. Sloučenina vázající histamin nebo serotonin nebo protein podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, která je spojená s jedním nebo více peptidy nebo polypeptidy.
27. Sloučenina vázající histamin nebo serotonin nebo protein podle nároku 26, která je geneticky nebo chemicky fúzována s jedním nebo více peptidy nebo polypeptidy.
28. Sloučenina vázající histamin nebo serotonin nebo protein podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, která je připojená ke značce nebo toxinu.
29. Sloučenina vázající histamin nebo serotonin nebo protein podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, která je navázána na nosič jako je pryskyřice.

30. Terapeutický nebo diagnostický přípravek v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje sloučeninu vázající histamin nebo serotonin nebo protein podle kteréhokoliv z předcházejících nároků.
31. Terapeutický nebo diagnostický přípravek podle nároku 30 v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje navíc serotonin.
32. Terapeutický nebo diagnostický přípravek podle nároku 31 v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje navíc cysteinylleukotrien, faktor stimulující destičky nebo tromboxan.
33. Vakcína v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje sloučeninu vázající histamin nebo serotonin podle kteréhokoliv z nároků 1 až 10 nebo protein podle kteréhokoliv z nároků 11 až 17.
34. Sloučenina vázající histamin nebo serotonin nebo protein podle kteréhokoliv z nároků 1 až 29 nebo přípravek podle kteréhokoliv z nároků 30 až 32 pro použití v léčení.
35. Sloučenina vázající histamin nebo serotonin nebo protein podle kteréhokoliv z nároků 1 až 29 pro použití jako léčivo.
36. Použití sloučeniny vázající histamin nebo serotonin nebo proteinu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 29 jako léčiva.
37. Sloučenina vázající histamin nebo serotonin nebo protein podle kteréhokoliv z nároků 1 až 29 pro použití ve vakcíně.

38. Použití sloučeniny vázající histamin nebo serotonin nebo proteinu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 29 ve vakcíně.
39. Sloučenina vázající histamin nebo serotonin nebo protein podle kteréhokoliv z nároků 1 až 29 pro použití při detekci nebo kvantifikaci histaminu v lidském, zvířecím, rostlinném a potravinovém materiálu.
40. Sloučenina vázající histamin nebo serotonin podle kteréhokoliv z nároků 1 až 29 pro použití při depleci nebo odstranění histaminu z potravinových produktů, buněčných kultur nebo z lidského, zvířecího, rostlinného a potravinového materiálu.
41. Sloučenina vázající histamin nebo serotonin podle kteréhokoliv z nároků 1 až 29 pro použití při vazbě nebo detekci histaminu u lidí nebo zvířat.
42. Sloučenina vázající histamin nebo serotonin nebo protein podle kteréhokoliv z nároků 1 až 29 pro použití jako antihistaminikum, protizánětlivé léčivo nebo při léčení alergie.
43. Sloučenina vázající histamin nebo serotonin nebo protein podle kteréhokoliv z nároků 1 až 29 pro použití jako nástroj vědeckého zkoumání týkajícího se úlohy histaminu v biologických procesech.
44. Použití sloučeniny vázající histamin nebo serotonin podle kteréhokoliv z nároků 1 až 29 ve spojení s farmaceuticky přijatelným nosičem pro výrobu léčiva pro léčení nebo prevenci zánětu nebo alergické reakce u lidí nebo zvířat.

45. Sloučenina nukleové kyseliny, která kóduje molekulu nebo protein vázající histamin nebo serotonin podle kteréhokoliv z nároků 1 až 29 nebo která hybridizuje s uvedenou molekulou nukleové kyseliny za standardních hybridizačních podmínek.
46. Molekula nukleové kyseliny podle nároku 45, která zahrnuje DNA, cDNA nebo RNA.
47. Klonovací nebo expresní vektor obsahující molekulu nukleové kyseliny podle každého z nároků 45 nebo 46.
48. Vektor podle nároku 47, který je založen na viru.
49. Hostitelská buňka transformovaná nebo transfekovaná vektorem podle každého z nároků 47 nebo 48.
50. Transgenní zvíře, které bylo transformováno molekulou nukleové kyseliny podle každého z nároků 45 nebo 46 nebo vektorem podle každého z nároků 47 nebo 48.

31.07.00

PV 2000-1927

1/31

17670

Obr. 1

FS-HBP1

T3→

1 AGAAAGCCCAACATGAAGCTTCTGCTCTCTCTTGCCTTCGTCTTAGCTCTCAGCCAAGTTA 60
M K L L L S L A F V L A L S Q V K

61 AAGCCGATAAGCCAGTTTGGGCGGATGAAGCGGCAAACGGGGAACACCAAGACGCCTGGA 120
A D K P V W A D E A A N G E H Q D A W K
↑

121 AGCATCTCCAAAACTCGTTGAAGAGAATTACGACTTGATAAAAGCCACCTACAAGAACG 180
H L Q K L V E E N Y D L I K A T Y K N D

181 ACCCAGTTTGGGGTAACGACTTCACCTGCGTGGGTACTGCAGCGCAGAATTTGAACGAGG 240
P V W G N D F T C V G T A A Q N L N E D
T3a→←T7c

241 ACGAGAAGAACGTTGAAGCATGGTTTATGTTTATGAATAATGCTGATACCGTATACCAAC 300
E K N V E A W F M F M N N A D T V Y Q H

301 ATACTTTTGAAGGGCGACTCCTGATAAAATGTACGGTTACAATAAGGAAAACGCCATCA 360
T F E K A T P D K M Y G Y N K E N A I T

361 CATATCAAACAGAGGATGGGCAAGTTCTCACAGACGTCCTTGCAATTCTCTGACGACAATT 420
Y Q T E D G Q V L T D V L A F S D D N C

421 GCTATGTCATCTACGCTCTTGGCCCCAGATGGAAGTGGAGCAGGTTACGAACTCTGGGCTA 480
Y V I Y A L G P D G S G A G Y E L W A T

481 CCGATTACACGGATGTTCCAGCCAGTTGTCTAGAGAAGTTCAATGAGTATGCTGCAGGTC 540
D Y T D V P A S C L E K F N E Y A A G L
T3b→←T7d

541 TGCCGGTACGGGACGTATACACAAGTGATTGCCTCCAGAAATAACTTGGGCATATCGTAA 600
P V R D V Y T S D C L P E *

601 TTTCAACTTCAAAGTGTGTTATTGTCAGCATATGTCTCGAGTGTGTTGATGTAGTGCCTTC 660

661 GATGATGCCATTCACTCTAGGTTTCGGGTGTTCCGGTACTTTATGCTCACTGCCGACGGCCA 720

721 GCACGAGTACTCGAAATAAAGTATTTCTGAAATCGGAAAAAAAAAAAAA 770
←T7

1 GCCGCGACGGAACCTTCGAAGGAAGTCAGCATGAAGCTTCTCATACTCTCTCTTGGCCCTCG 60
M K L L I L S L A L V

61 TCCTCGCCCTCAGCCAGSTTAAGGGAAATCAGCCAGATTGGGCGGATGAAGCGGCAAATG 120
L A L S Q V K G N O P D W A D E A A N G
↑

121 GTGCACACCAAGACGCCTGGAAGAGTCTGAAAGCGGACGTTGAAAACGTTTACTACATGG 180
A H Q D A W K S L K A D V E N V Y Y M V

181 TGAAGGCCACCTATAAGAATGACCCAGTGTGGGGCAATGACTTCACTTGCCTGGGTGTTA 240
K A T Y K N D P V W G N D F T C V G V M

T3b ← T7a

241 TSGCAAATGATGTCAACGAGGATGAGAAGAGCATTCAAGCAGAGTTTTTGTATTATGAATA 300
A N D V N E D E K S I Q A E F L F M N N

301 ATGCTGACACAAACATGCAATTCGCCACTGAAAAGGTGACTGCTGTAAAATGTATGGTT 360
A D T N M Q F A T E K V T A V K M Y G Y

361 ACAATAGGGAAAACGCCTTCAGATACGAGACGGAGGATGGCCAAGTTTTTCACAGACGTCA 420
N R E N A F R Y E T E D G Q V F T D V I

421 TTGCATACTCTGATGACAACCTGCGATGTCATCTACGTTTCTGGCACAGACGGAAATGAGG 480
A Y S D D N C D V I Y V P G T D G N E E
→

481 AAGGTTACGAACTATGGACTACGGATTACGACAACATTCCAGCCAATTGTTTAAATAAGT 540
G Y E L W T T D Y D N I P A N C L N K F
←

541 TTAATGAGTACGCTGTAGGTAGGGAGACAAGGGATGTATTACAAGTGCTTGCCTAGAGT 600
N E Y A V G R E T R D V F T S A C L E
→

601 AATAACTTCAGAAATGTCGTTCTTTCAAAGCGAAAACCAACAATGTGAACATCGGCTTGC 660
←

661 TGTGCTCGACGTAGCCAGCGATAATGTTGTTTTCTGGGTTTCTGGGTTTGGATACTTTT 720

721 AGCCACTGCCGAAGAGCTGTAAAGGTAATGAAAAATAAAATGTTCAAGAGTGTGAAAAAA 780

← T7

781 AAAAAAAAAAAAAA 793

3/31

Obr. 3

MS-HBPI

T3→

1 AAAGCACTCAACATGAAGGTTCTTTTGTGGTTCTTGGAGCTGCTCTTTGCCAGAATGCA 60
M K V L L L V L G A A L C Q N A

61 GATGCAAACCCAACATGGGCGAACGAAGCTAAATTGGGATCCTACCAAGACGCTGGAAG 120
D A N P T W A N E A K L G S Y Q D A W K
↑

122 ASCCTTCAGCAAGACCAAAACAAGAGATACTATTTGGCACAAGCGACACAAACGACTGAC 180
S L Q Q D Q N K R Y Y L A Q A T Q T T D

181 GCGGTATGGGGTGAAGAGTTTACTTGTGTGAGTGTACGGCTGAGAAGATTGGAAGAAA 240
G V W G E E F T C V S V T A E K I G K K

241 AACTTAACGCTACGATCCTCTATAAAAAATAAGCACCTTACTGACCTGAAAGAGAGTCAT 300
K L N A T I L Y K N K H L T D L K E S H
=====

301 GAAACAATCACTGTCTGGAAGCATAACGACTACACAACGGAGAATGGCATCAAGTACGAG 360
E T I T V W K A Y D Y T T E N G I K Y E

361 ACGCAAGGGACAAGGACGCAGACTTTTGAAGATGTCTTTGTATTCTCTGATTACAAGAAG 420
T Q G T R T Q T F E D V F V F S D Y K N

421 TGCGATGTAATTTTCGTTCCCAAAGAGAGAGGAAGCGACGAGGGCGACTATGAATTGTGG 480
C D V I F V P K E R G S D E G D Y E L W

481 STTAGTGAAGACAAGATTGACAAGATTCCCGATTGCTGCAAGTTTACGATGGCGTACTTT 540
V S E D K I D K I P D C C K F T M A Y F

541 GCCCAACAGCAGGAGAAGACGGTTTCGTAATGTATACACTGACTCATCATGCAAACCAGCA 600
A Q Q Q E K T V R N V Y T D S S C K P A

601 CCAGCTCAGAACTGATATTCTGGTAATGCTTGAACCGTAATGCTTCGACCTGCAGTCTAG 660
P A Q N *

661 AAACATTTACCACCATCAGGCTGATTATCTTACCGTAGTTTCTTAGGTCTTGTCTTTGA 720

721 ATAAATAGTTCCCTGCATTGACAAAAA 753
←T7

31.07.00

4/31

Obr. 4

T3→

1 ATGAAGATGCAGGTAGTGCTCTTACTTACCTTTGTTAGCGCGCCCTCGCCACTCAAGCG 60
 1 M K M Q V V L L L T F V S A A L A T Q A 20

61 GAGACTACATCTGCGAAAGCAGGAGAAAACCCGCTCTGGGCGCATGAGGAACTACTTGGG 120
 21 E T T S A K A G E N P L W A H E E L L G 40
 ↑

121 AAATATCAAGATGCCTGGAAAAGCATCGATCAGGSCGTGTCCGTGACTTATGTCTTGGCA 180
 41 K Y Q D A W K S I D Q G V S V T Y V L A 60

181 AAGACAACATATGAGAATGACACAGGATCATGGGGATCCCAGTTAAGTGCCTCCAGGTA 240
 61 K T T Y E N D T G S W G S Q F K C L Q V 80
 ← →

241 CAAGAAATAGAAAGAAAGGAAGAAGACTATACAGTTACATCTGTTTTACCTTTAGAAAT 300
 81 Q E I E R K E E D Y T V T S V F T F R N 100

301 GCGTCTTCTCCAATCAAGTATTACAACGTGACAGAAACAGTGAAGGCCGTTTTTCAATAT 360
 101 A S S P I K Y Y N V T E T V K A V F Q Y 120

361 GGATACAAAAACATAAGGAATGCAATTGAATACCAAGTGGGCGGTGGACTTAACATAACC 420
 121 G Y K N I R N A I E Y Q V G G G L N I T 140

421 GACACGCTCATTTTCACTGATGGAGAATTATGCGATGTTTTCTATGTTCCCAATGCAGAT 480
 141 D T L I F T D G E L C D V F Y V P N A D 160
 ← →

481 CAAGSTTGTGAGCTCTGGGTCAAAAAGAGTCACTACAAACACGTACCAGACTACTGCACG 540
 161 Q G C E L W V K K S H Y K H V P D Y C T 180

541 TTCGTGTTCAATGTTTTCTGTGCGAAAGACAGGAAAACCTACGATATATTTAATGAAGAA 600
 181 F V F N V F C A K D R K T Y D I F N E E 200

601 TGTGTTTATAACGGCGAACCCCTGGCTTTAAAGGCAAAAAATCTATAAAATACGGTTTCTG 660
 201 C V Y N G E P W L * 220

661 TAGTAAGTACTAATAGCAAGTAGTTGAATAATAAAAAGATTGTAAGTGCAAAAAAAA 719 ←T7

31.07.00

5/31 Obr. 5

Ra-Res

1 CAACTGATCACTAAAATGTTCTTGC GGGTTTCTTCATTTTCGGCGCTGCCGTCCTCTCA 60
M F L A G F F I F G A A V L S

61 GTTTTGGCTGAGGAGACACCTAATGATAGATGTACTACACACACTCCTAATGGATGGCAG 120
V L A E E T P N D R C T T H T P N G W Q

121 TTTCTCAAGAAAGGCAAGAGATACGATATGAAACAGAGAACCTTCCAAACACCTAACTCA 180
F L K K G K R Y D M K Q R T F Q T P N S

181 GACGACACTAAATGCCTGTCCAGTACTATCGACGGAAAGAATGAAAATAACCATACAGTA 240
D D T K C L S S T I D G K N E N N H T V

241 CAAGCAACGATAAGATATCGAAATGGTTATGAAGGAAAATGGGACACCATCCGCCAGGAG 300
Q A T I R Y R N G Y E G K W D T I R Q E

301 TACGAGTTCCCCAACTACACTGCAGGAGACTACAACCTCCATGAAGACAACAGACAAATCC 360
Y E F P N Y T A G D Y N S M K T T D K S

361 CCGCCTCCGCCGGCATCATACCTGTTTGGATATACTGGAAGCTCTTGTGCCGTGGTGTAC 420
P P P P A S Y L F G Y T G S S C A V V Y

421 GTGAATTCCATTGGACCTGTTCGTAGCAATTCTGAAAACCCACCAGAAAGACTCACAGCA 480
V N S I G P V R S N S E N P P E R L T A

481 AGTCAGGAAAGTGCACAACGCGATTGCGTCCTTTGGGTCGATCACGATGAAAAAGCTACC 540
S Q E S A Q R D C V L W V D H D E K A T

541 CAAGAACAATGCTGTGAAGATTTCTTCAAGACCCACTGCAAAGAGACTGTCCATGTCATA 600
Q E Q C C E D F F K T H C K E T V H V I

601 TACGACGTGAATAGATGCAAGGAGAATGGCAGTGAATAACACGATGCCGGGAATGGCATG 660
Y D V N R C K E N G S E *

661 GCGACTTCATTTATGAAGGAAGACTTCCACAGATGTGAAACTTGCCTTCATTTTGCTTGT 720

721 TACTTTAGACCAACATATTCTTCCTTTTCCGACTTCAATGATATGATCTAGGTTGTAAAA 780

781 AGAGCGTTTTTAATAAAGAAAGTATTAGCATCGATGATGGAAATATAAAAAAA 832

31.07.00

6/31

Av-HBP

Obr. 6

1 GCGACCGCGCCCAGCCGTACAGAACAAATAGCCTTCGTTGCAAACGTGCAGCGTAGTCGG 60

61 ATGCCTAGTTAAACACCACACACACGTAAGTAGACGAACTGGCTTCGCTTCCAGCA 120

121 CCAAGCAGGTCATCGTCTGGTCCACTGACGATGAAGTCTGCCTTGTGGGTTTTACTAGGA 180
M N S A L W V L L G

181 TCATCCTTATGGCTGCATACGGTAGCGTTCATGATTCACATGGGCAGATGAAGGCAGG 240
S S L W L H T V A F M I P T W A D E G R

241 TTTGGCAAGTACCAGAACGCCTGGAAGGCCCTGAATCAGCGGATTAACACAACACATGTC 300
F G K Y Q N A W K A L N Q R I N T T H V

301 CTTGTGAGGTCAACGTATATCGACAATCCATATTTATGGGGCAAGAACTTCTCATGCGTA 360
L V R S T Y I D N P Y L W G K N F S C V

361 CGCGCTCGAACTGTGGAAGTCTTTCCCAGCAGCAAGACTGTGGAAGTGGAGTTTAGTTTC 420
R A R T V E V F P S S K T V E L E F S F

421 AGAAACAGGACTGGTATATTGTGCATGAGAAATCAAACGGTTCGAGCTGGAAAGGATTAC 480
R N R T G I L C M R N Q T V R A G K D Y

481 TTTTATCATCAGCCTAACGCCTTCGAATTCATGCTGAGAGGTAACAGGTCGTTTCTAAC 540
F Y H Q P N A F E F M L R G N R S F S N

541 GCTGTCATGTTTACCGACGGAATGACATGTAATCTGCTCAGCTTTCATACCAGCGCAAC 600
A V M F T D G M T C N L L S F P Y Q R N

601 AAACCACAATGCGAACTATGGGTGAAGGACACGCGCTCGACAACATTCCCCCTTGTTCG 660
K P Q C E L W V K D T R V D N I P P C C

661 TCGTTCATGTTTCGACTATTTGTGCCCCACAGCCTCGTCCATTCATCATTTACGACAAAGCA 720
S F M F D Y L C P Q P R P F I I Y D K A

31.07.00

7/31

721 ATGTGCACGGTGAGGCCACCCCGCTAGAAAGAAAAGGGATGAAAAGGCTACTCGAAGAAG 780
M C T V R P P R *

781 CAACAACCAATCAGTGCCCACAAGAGAACCGTTCCAGTCCTGCGAAAGTTGCGCCTCCCA 840

841 AAACACATACATTTCACTGCAAAGATGACCGATGCAGTCGCAAATTCGTGTCCTAGAACT 900

901 CAAGTGCTGTTTTGGAAACTCGGAAAGGAGACAGTAGAAGCTAACTGCTGTGATACCTAG 960

961 GCCAGGCATTTCCGTCGGGCACTGTTTTTATGAATAGGGTAGGGTGAAAGTATTTTGGC 1020

1021 TTTGCTGTGGCCCAATAAATAGCGTATATTAGCGGACTAGCATCGAAGTTCCAGATGCTA 1080

1081 TAAAGCAGCTAAAACTCACTTCTGCCTGGAACCTTCGATAGGTATTGAATAGATCATGCGC 1140

1141 GCACAGAAAAGAAAAGTATCAATCAAAACATAAAAAGCATTCTTCGCATGTGCGCAAAGC 1200

1201 ATTCCCTAAGTCCACGCTAAAAATAGGTGTCATTTTCATATAGCATCGAGTTCTATACGTT 1260

1261 CTTAAGATGCTACCGGTCATTCATTCCTTTCTCGTCTATGCCTCATGGATCTGAACCAAG 1320

1321 TTCTTCTATTGCCTCCTTGTTTTCCGGTAGCTACAGAGTTCAGCAGCACCATTGCTAGTG 1380

1381 CATATTTTATCTTCGTGCTGTGTTTGTGCGAGTATATTTTCTGCCTATTCACGATATTT 1440

1441 GCACAATGTAATAAAACATTTGCCTGCCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1488

Obr. 6 (pokr.)

31.07.00

8/31

lh/Bm-HBP1

Obr. 7

1 CTCCAGCTCTGCTTCGACGATGAAGGCTCTCCTGATCGCTGTCGGCTACCTGGCTGCCGT 60
M K A L L I A V G Y L A A V

61 CACAGCGGCACCCCAAGCTTCGCCTTCCTCTCCGAGGAACGAACCACTCAAGAATACTAC 120
T A A P Q A S P S S P R N E P L K N T T

121 GTGGCACAGCAAGGAAGTGAATAATTATCAAGATGCGTGGAAGTCCATCAATCAAAACGT 180
W H S K E L K N Y Q D A W K S I N Q N V

181 CAGCACTACCTACTACTTCCTCAGATCAACCTACAACAACGACAGTGTCTGGGGTAAAAA 240
S T T Y Y F L R S T Y N N D S V W G K N

241 TTTCACCTGTCTTAGCGTCACGGTGACATCGAAACATGAATCAACGTTACCCGTCGAATA 300
F T C L S V T V T S K H E S T F T V E Y

301 TAACACCACGTACAAAAATCAGAGCCAACAATGGGTGAGCATGACGGAAAACGTCACGGC 360
N T T Y K N Q S Q Q W V S M T E N V T A

361 CGTGCAGGAGGAGGGCTACGACGTAAAAATATCATTGAGTGGACAACAGAGAATAACAC 420
V Q E E G Y D V K N I I Q W T T E N N T

421 AAAGTTCAATGATACTGTTGTTTTACGGACGGCCAGACTTGTGATCTGTTGTACATCCC 480
K F N D T V V F T D G Q T C D L L Y₄ I P

481 GTACAAAGAAAACGGTTACGAGCTGTGGGTGCGTTCCGATTACCTGCAGAACACTCCAAC 540
Y K E N G Y E L W V R S D Y L Q N T P T

541 GTGCTGCCAGTTCATCTTTGACCTCGTCGCATTGGGACGTACCACGTACAATATCTCCAC 600
C C Q F I F D L V A L G R T T Y N I S T

601 TCCTGACTGCGTGACCAAAACCTCTCGTTAGACCGTGAAAGCCGCGGCTTATGCTACTCG 660
P D C V T K T S R *

661 ACTGCTCAGGTTGGAAGAGTAGGGAGCCCCGACGCGCACTACTACTAAAAATGATTCCAA 720

721 ATAAAGTATTCAAACATTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 760

31.07.00

9/31

lh/Bm-HBP2

Obr. 8

1 AGTGACTCCTGCTCTGCTTCGACGATGAAGGCTCTCCTGATCGCTGTCGTCTACCTGACT 60
M K A L L I A V V Y L T

61 GCCGTCACAGCGGCAGACCAAGCTCCGCCTTCCTCTACGAGGAATGAACCACTCGAGAAA 120
A V T A A D Q A P P S S T R N E P L E K

121 ACTACCTGGCACAACCAGACACTGGGACGTTATCAAGATGCGTGGAAGTCCATCAATCAA 180
T T W H N Q T L G R Y Q D A W K S I N Q

181 AGCGTCGGCACTACCTACTACTTCCTCAGATCAACCTACAACAACGACAGCGTGTGGGGT 240
S V G T T Y Y F L R S T Y N N D S V W G

241 AAAAATTTACCTGTCTTAGCGTCACGGTGACATCGAAATATGAATCAACGTTACCGTC 300
K N F T C L S V T V T S K Y E S T F T V

301 GAATATAACACCACGTACAAAAATCAGAGCCAACAATGGGTCAGCATGTTCGGAACCGTC 360
E Y N T T Y K N Q S Q Q W V S M S E N V

361 ACGGCCGTGCAGGAGGGCGGCTACAGTGTTAAAAACATTCATTGAGTGGACAACGGAGAAT 420
T A V Q E G G Y S V K N I I Q W T T E N

421 AACACAAAGTTCAATGATACTGTTGTTTTACGGACGGCCAGACTTGTGATGTGTTATAC 480
N T K F N D T V V F T D G Q T C D V L Y

481 ATCCCGTACAAAGAAGACGGTTACGAGCTGTGGGTGCGTTTCGGAATACCTGCAGAACACT 540
I P Y K E D G Y E L W V R S E Y L Q N T

541 CCAACGTGCTGCCAGTTCATCTTTGACCTCGTCGCATTGGGACGTACCACGTACAATATC 600
P T C C Q F I F D L V A L G R T T Y N I

601 TCCACTCCTAACTGCGTGGCCACCACCGCTGGTTAGACAATGCAAGCCGCGGCTTAATTT 660
S T P N C V A T T A G *

661 ACTCGACCGCTCAGGTTGGAAGTGCCGGGAGCCTCGACGGGCACTACTACTTAAATGAT 720

721 TTCGAATAAAGTATTCAAGCATTCTGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 765

Ih/Bm-HBP-3

1 GATGGCGCTCAGATTGCACTTCTGCTGGCGTGCATCGTCACGGCATGTGGCTGGAGAAC 60
 M A L R F A L L L A C I V T A C G W R T

 61 ACGGATTCAAGAGAAAGGTCCCGAGAACCAACCCCTCTCATGAACACCCACGTTTGGGAAA 120
 R I Q E K G P E N N P L M N T Q R L G K

 121 AATGCAAGACGCATGGAAGAGTCTGGAAAAGGCAACAAATCAGTCGTATGCTTGGTGTT 180
 M Q D A W K S L E K A T N Q S Y V L V F

 181 CCGCTCAAGAAATCAGAACCAAGAGATATCCTGCGTGACGTGAGGGCTAGTAATATAAA 240
 R S R N H E P E I S C V Y V R A S N I N

 241 TAATGACACTAAAACGTCAACTTATACCAAGAACATATTACAATATGACGGCAACGCAAC 300
 N D T K T A T Y T R T Y Y N M T A N A T

 301 CATGACGGTGAATTATCTGCAAGAGCTCTGAAGCAAGTGGACTATGAGTCGGAAAAATGT 360
 M T V N Y T A R A L K Q V D Y E S E N V

 361 CGTACGAGTAAACCTGACAGGTGGGTCCCGAGCAACGATACAGTCCCTCTTGGAAAGCTA 420
 V R V N L T G G V P S N D T V P L G S Y

 421 CGAATACGTCGAGTACGGTAATTACTCTGCAATAGCTCATCGACACCCCTTTTGGATGC 480
 E Y V E Y G N Y S C N S S S T P F L D A

 481 TGTGCAAAATGGCATCGCAAGGGCAATCCAGAGGGCCGGATATCGAAGGGCGCACATATCT 540
 V Q M A S Q G Q S R G P D I E G R T Y L

Obr. 9

10/31

310700

Obr. 9
(pokr.)

11/31

541 AGACTTCTACGTCGTCACAAATCAACCATCGTGCAATGTCCTGAAGTCCCGCTCCTGGG 600
D F Y V V Y N Q P S C N V L K S P L L G

601 AGGTGCTTGTGACTTTTGGGTGACAGAAATCCGAGTTGCAAAAAGCACTAAATAAGACATC 660
G A C D F W V T E S E L Q K A L N K T S

661 AGAGAAGAAAAACAAAGCTAGAACGAGAGCAAGGAAAGCTGGAGGAGATTCCGATGA 720
E K K K T K L E A R A R K A G G D S D D

721 CCAGGGACCTGAACTGGAGGTCGTCTTCAAAAATCTGCCCCCTCCCTGCCGCGCAGCGTT 780
Q G P E L E V V F K N L P P P C R A A F

781 CATAACTTCCTGCGGCTATCCAACCTTTCTTATGTACAACAAGACCATCTGTAATCGAAC 840

I T S C G Y P T F L M Y N K T I C N R T

841 GGATTCTGCTGCGGTGTGAACGTCCTCCCTGCGAGCAAGTAGAACGTCCTCGTGAAGACAGCAG 900
D S A A V *

901 GAAGATAGTTGACTGTTTGTGGCGGAATGTGACTACTAGTCTGAATCATTAAAAAAGAT 960

961 TCNGCTGACGGGTGTGGCGGGAACCTTTTAAATGAAATTGGTGCATACTTGTGTGAAAGAC 1020

1021 AAAAATAAAACAATATGTTACTCCTC 1046

31.07.00

31.07.00

12/31

lh/Bm-HBP4

Obr. 10

1 GGAAACCAGGATGGCGCTCAGATTTGCACTTCTGCTGGCGTGCATCGTCACGGCATGTGG 60
M A L R F A L L L A C I V T A C G

61 CTGGAGAACACGGATTCAAGAGAAAAGGTCCCGAGAACAACCCTCTCATGAACACCCAACG 120
W R T R I Q E K G P E N N P L M N T Q R

121 TTTGGGAAAAATGCAAGACGCATGGAAGAGTCTGGAAAAGGCAGCAAATCAGACGTATGT 180
L G K M Q D A W K S L E K A A N Q T Y V

181 CTTGGTGTTCGCTCAAGAAATCACGAACCAGATATATCCTGCGTCTACGTGAGAGCTAG 240
L V F R S R N H E P D I S C V Y V R A S

241 TAATTTAGATAATGCAACTAAAACCTGCAGATTATACCAGAACATATTACAATATGACGGC 300
N L D N A T K T A D Y T R T Y Y N M T A

301 AAAACAAAACGTGTCTGGTAAATTATACTGCAAGAGCTCTGAAGCAAGTGGACTATGAGTC 360
K Q N V S V N Y T A R A L K Q V D Y E S

361 GGAAAATGTCTGACGAGTAAACCTGACAGGTGGGGTCCCCAGTAACGATACAGTTCCTCC 420
E N V V R V N L T G G V P S N D T V P P

421 TGGAAGCTTCGAATACGTCGAGTACGGTAATTACTCCTGCAATAGCTCATCGACACCCTT 480
G S F E Y V E Y G N Y S C N S S S T P F

481 TTTGGATGCTGTGCAAATGGCATCGCAAGGGCAATCCTGGGGGCCGGATGTGCAAGGGCG 540
L D A V Q M A S Q G Q S W G P D V E G R

31.07.00

13/31

541 CACATATCTAGATTTCTACGTCGTCTACAATCAACCGTCGTGCAATGTCCTGAAGTCCCC 600
T Y L D F Y V V Y N Q P S C N V L K S P

601 GCTCCTGGGAGGTGCTTGTGACTTCTGGGTGCCACAATCAGAGTTGGACAAGGTACTAA 660
L L G G A C D F W V P Q S E L D K V L N

661 CAAAAAAGGAGATAAGAAAAAGCCAGCTAAGTCAAGCAGTCAAAATGGAGACGAAGGTT 720
K K G D K K K P A K S S S Q N G D E G S

721 TGATGCCGAGCAACCTGAACTGGAGGCCATCTTTAAACATCTACCCCCTCCCTGCCGCGC 780
D A E Q P E L E A I F K H L P P P C R A

781 AGCGTTCATAACTTCCTGCGGCTATCCAAATTTTCTCATGTACAACAAGACGATCTGTAA 840
A F I T S C G Y P N F L M Y N K T I C N

841 TGCAGCGGGTCATGCTGCGAACTGAACGTCCTCTGCGAACGAGTAGAGCGTGCGTAAAA 900
A A G H A A N *

901 CAACTGGTCTGAATCTTTTAAGAAATTCGGCAAAGTGCGGGTGGCGCGAACTTTTATCAA 960

961 ACTGGTCATACATGTGAAAGAAAAAAATAAAACAAAATGTGCATAAAAAAAAAAAAAAAAA 1020

1021 AAAAA 1025

Obr. 10 (pokr.)

Ih/Bm-HBP-5

1 CGAAGAGCAGGTACGATTCGAATCTTTGCAATGGACATTCGCAGCGCTGTTTGTTCGCG 60
M D I R S A V L F A

61 TGCATCGTCTCGGCGTGTGTGGCTTTTGGCGCTGGACAACACGGAGGGTAACATAAAAG 120
C I V S A C C G F W R W T T R R V T K K

121 CCTGATAACAGCCCTCTGTTGAACAACCAACATCTTGGTCTTTTCCAGGACGCATGGAAG 180
P D N S P L L N N Q H L G L F Q D A W K

181 ACTATAGAAGAGACGTCCTCAATGATACGTATGTCCTGATGTTCCGCTCAAAACATTACGAC 240
T I E E T S N D T Y V L M F R S K H Y D

241 CACGAGAACAAGGCTAAATGTGTCTTCGTAACGGCAATATATTACTGACTCCCGGAACAAA 300
H E N K A K C V F V T A N I T D S R N K

301 ACTGCCAATTACACAATAACGTATTACGATACACAAACAATAACATCCACAATTTTACA 360
T A N Y T I T Y Y D T T T N T S N N F T

361 ATCCCAGTGAGAGCTCTGAACCAAACCTGACTACTACTAGAAAAATGTGATTCGAGCAAGC 420
I P V R A L N Q T D Y S L E N V I R A S

421 TTCAAACGGCGACACTCCAAGCTCTACTCCAGCCCCCTCCCGGAAGCAGCGGTACATTTCAG 480
F N G D T P S S T P A P P G S S V Y I Q

481 TATAATAATGTTACCTGCTACGCCCCAATATCACCCATTTTCAAAATAATGGAATCAGTGCA 540
Y N N V T C Y A Q Y H P F S N N G I S A

Obr. 11

14/31

340700

Obr. 11
(pokr.)

15/31

541 AAATATGATGAAATGCCCGGATGGCCGAAATTAATTTGTTTCGACAATTTTATTTGGTGCT 600
K Y D E M P R D G R N Y L F D N F I G A

601 TACTTGGACTTCTACGTGGTGTTCAGCCAGCCGACATGCAACGTTCTCAGAGTCCGAGAA 660
Y L D F Y V V F S Q P T C N V L R V R E

661 GGATGTGACTTCTGGCTAAGGAAAACTGAGTTGCCAAGCCTACTGAAAGCAGCAGAAAAAT 720
G C D F W L R K T E L P S L L K A A E N

721 GATGACAACGATAACACGGAATCGCTGAAGAAGTATTTGGGAAAGAAATAATAATACT 780
D D N D N T E S L K N Y W E R R I N N T

781 AAAACAAGATTTCGACATAATACTAAGAAATGTAAGATGTACGTACAACGTTATTCATTT 840
K T R F R H N T K K C K M Y V Q R Y S I

841 GAGAAGGCTGAAGATGTCTTTAAAAACACTGCTTTTAAACACCTCCCTCCGACTGCCGC 900
E K A E D V F K N T A F K H L P S D C R

901 TTTGCCTTCTGGCCGCTTGTGGAAATCCAGCATTACACAATATACGACCCAGAAAAACATGT 960
F A F L A A C G N P A F T I Y D P E T C

961 AATAGCTCCCTGCCAGCTAATATGGCAGAAAAGTTAAATGAGCTATTTCACTTCATGTTTCG 1020
N S S L P A N M A E S *

1021 ACCGTATGCCCTGGTATGCAAGAAGGTGAGGTTGGACAGGATACTTCCGAATATTTTTC 1080

1081 AGTCTGCCTTGTACGCACGAAATAACAAAAATATCTGTTGAAGCCNCAACNNNNNAANA 1140

1141 ANAAAAAANAATAA 1156

31.07.00

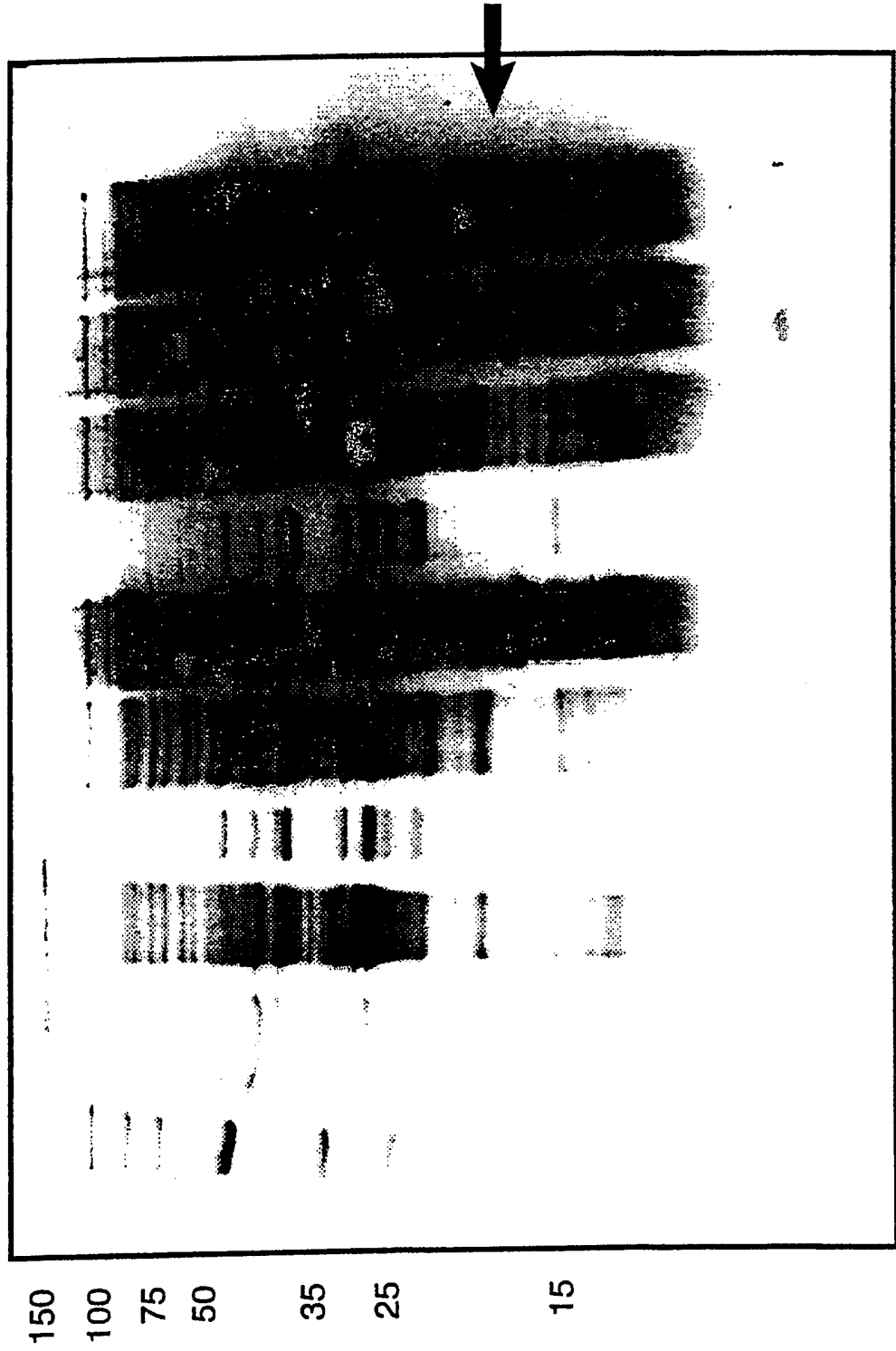
16/31

PRE-IPTG
INDUKCE

POST-IPTG
INDUKCE

ČASOVÝ PRŮBĚH
EXPRES (HODINY)

M A B C A B C 0 4 8

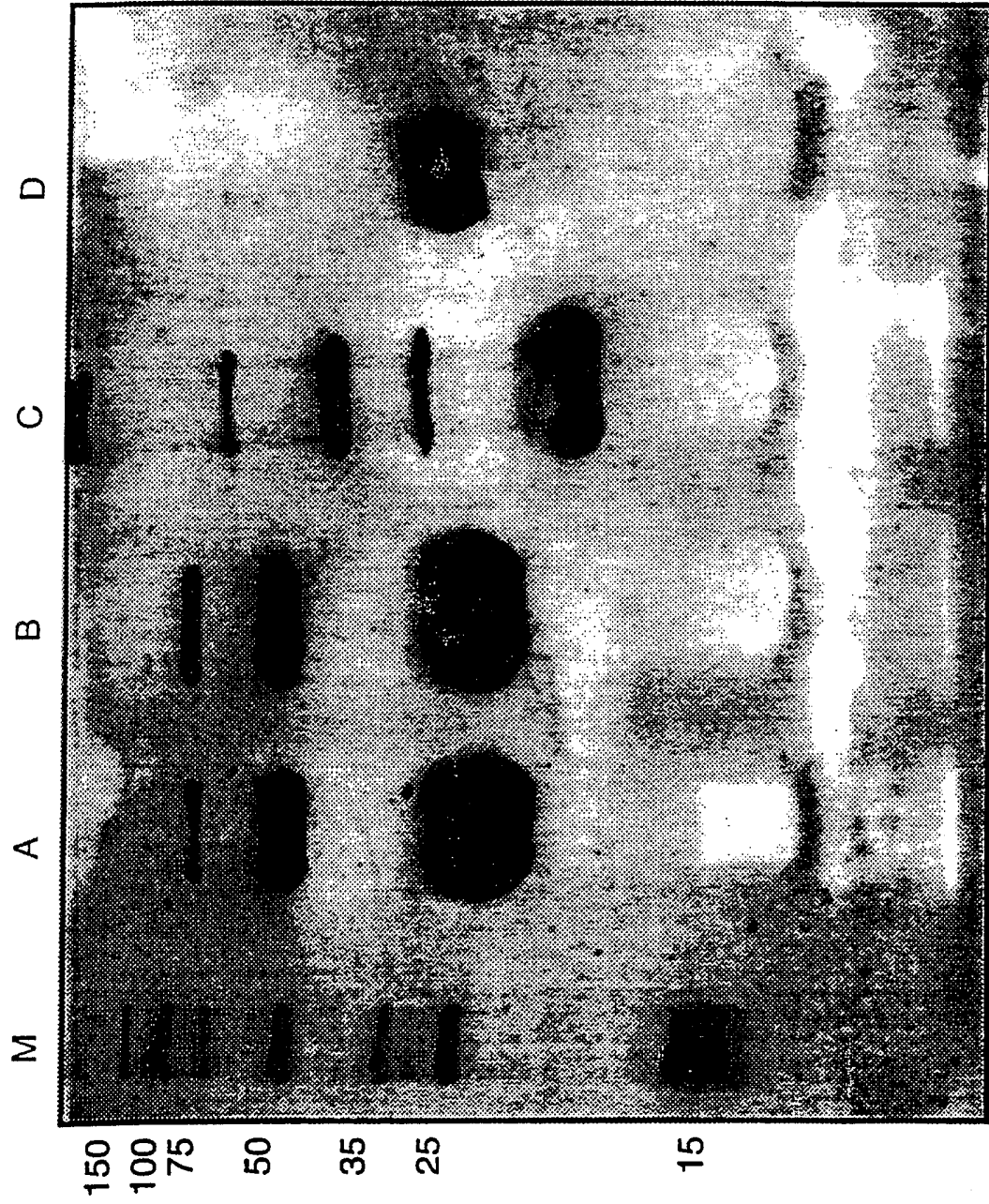


Obr. 12

31.07.00

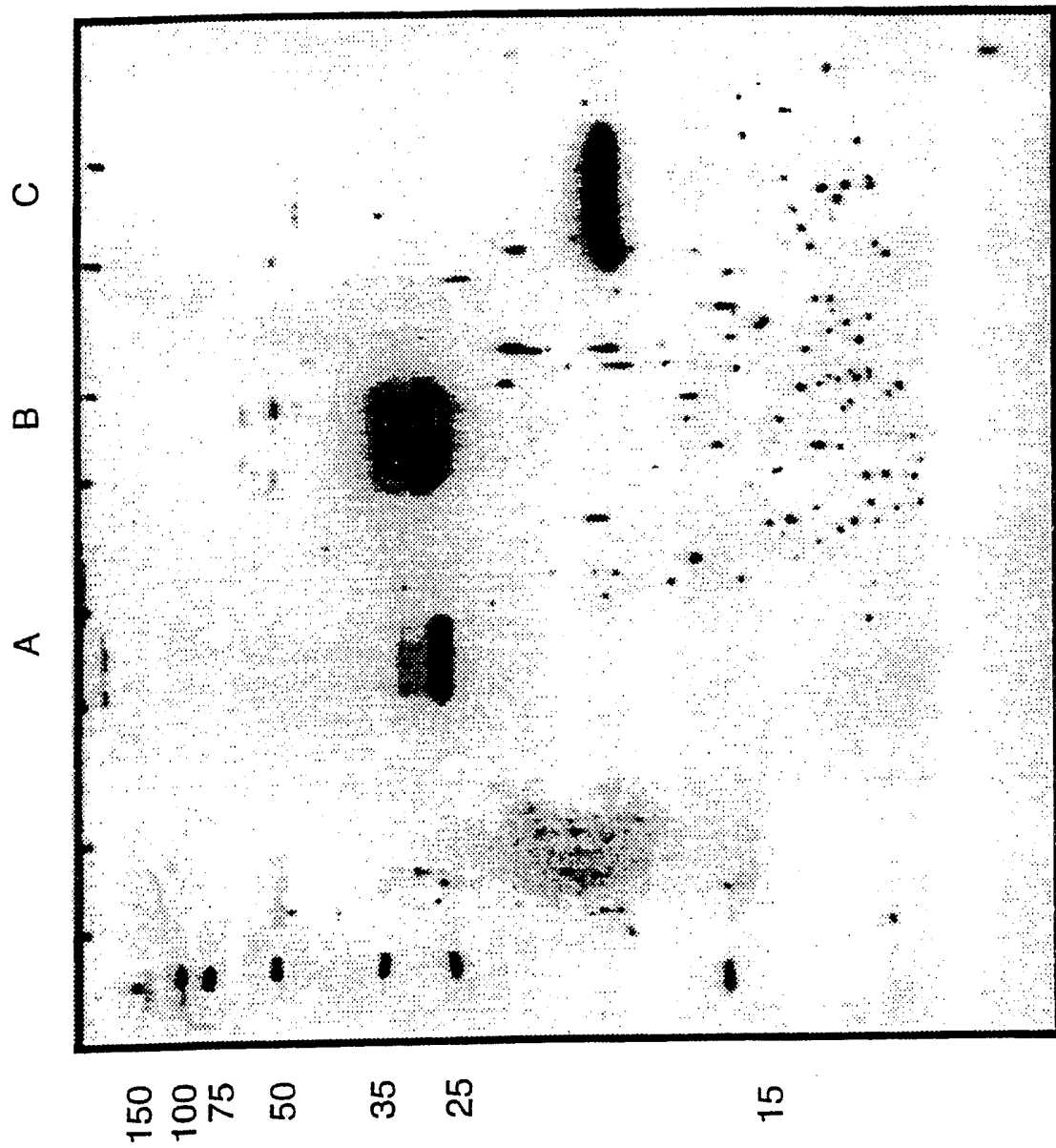
17/31

Obr. 13



31.07.00

18/31

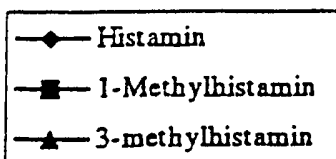
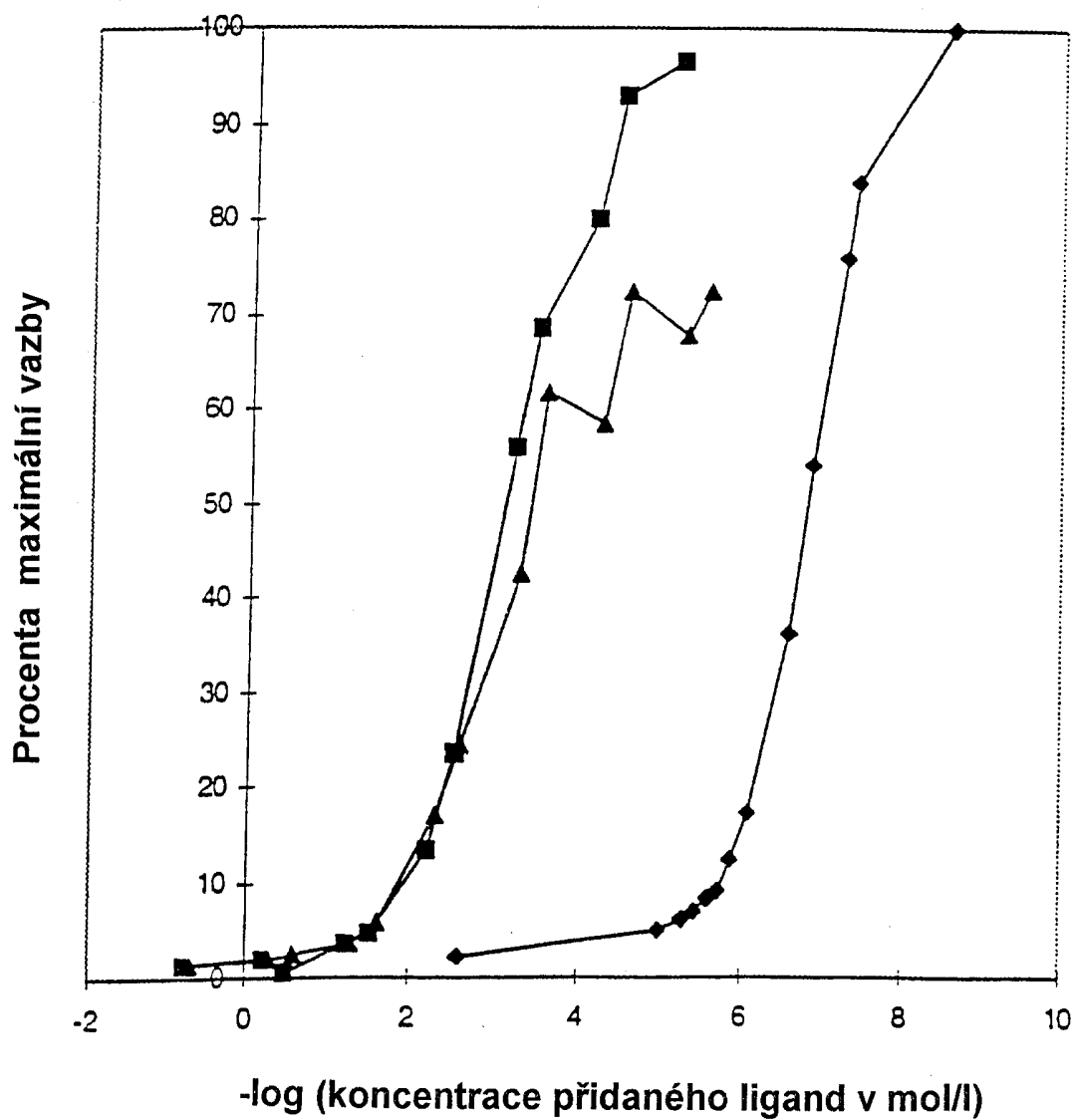


Obr. 14

19/31

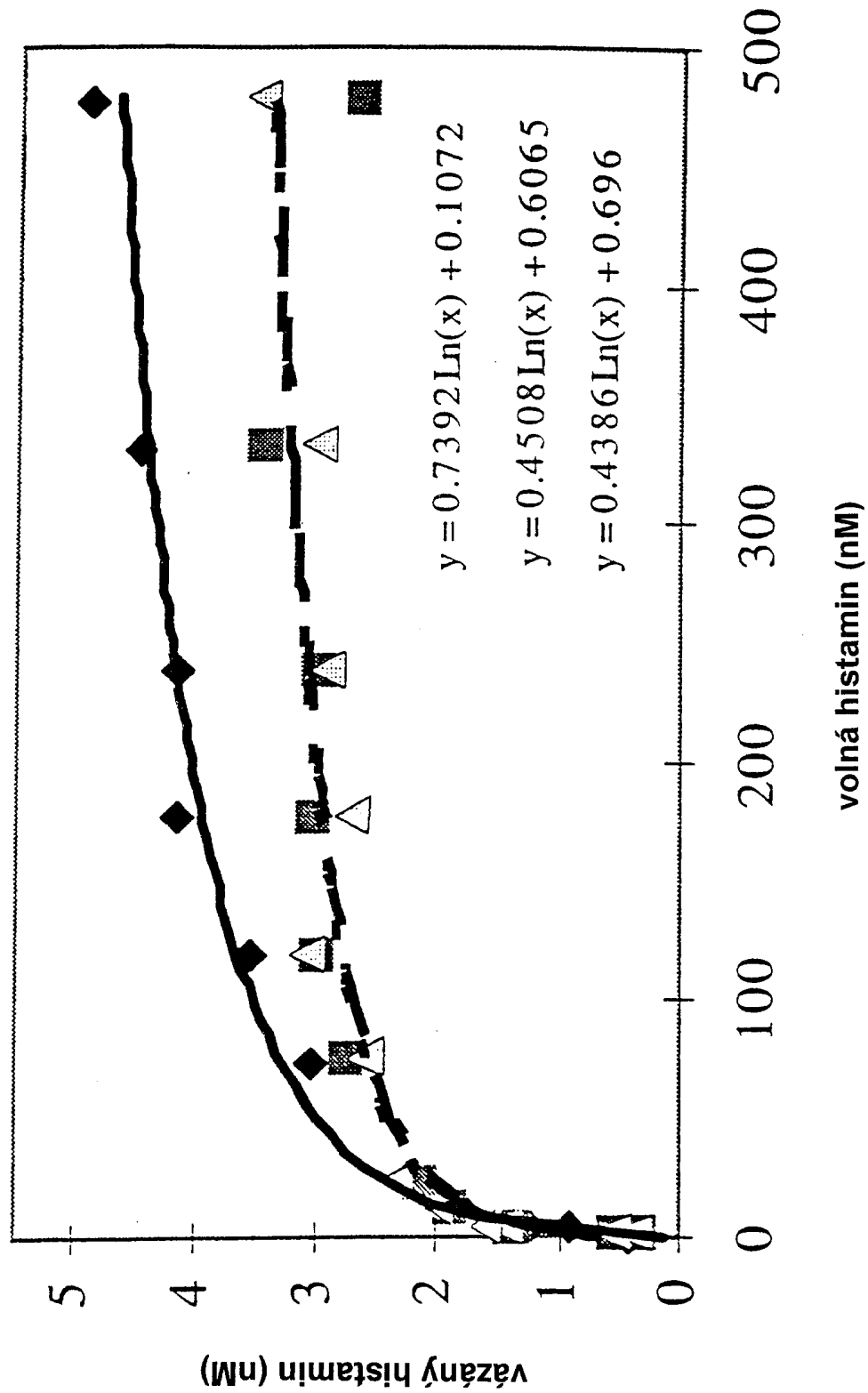
Obr. 15

Vazebná aktivita derretinu k histaminu
a její substituce metylovou skupinou



Obr. 16

Saturační křivka vazby histaminu

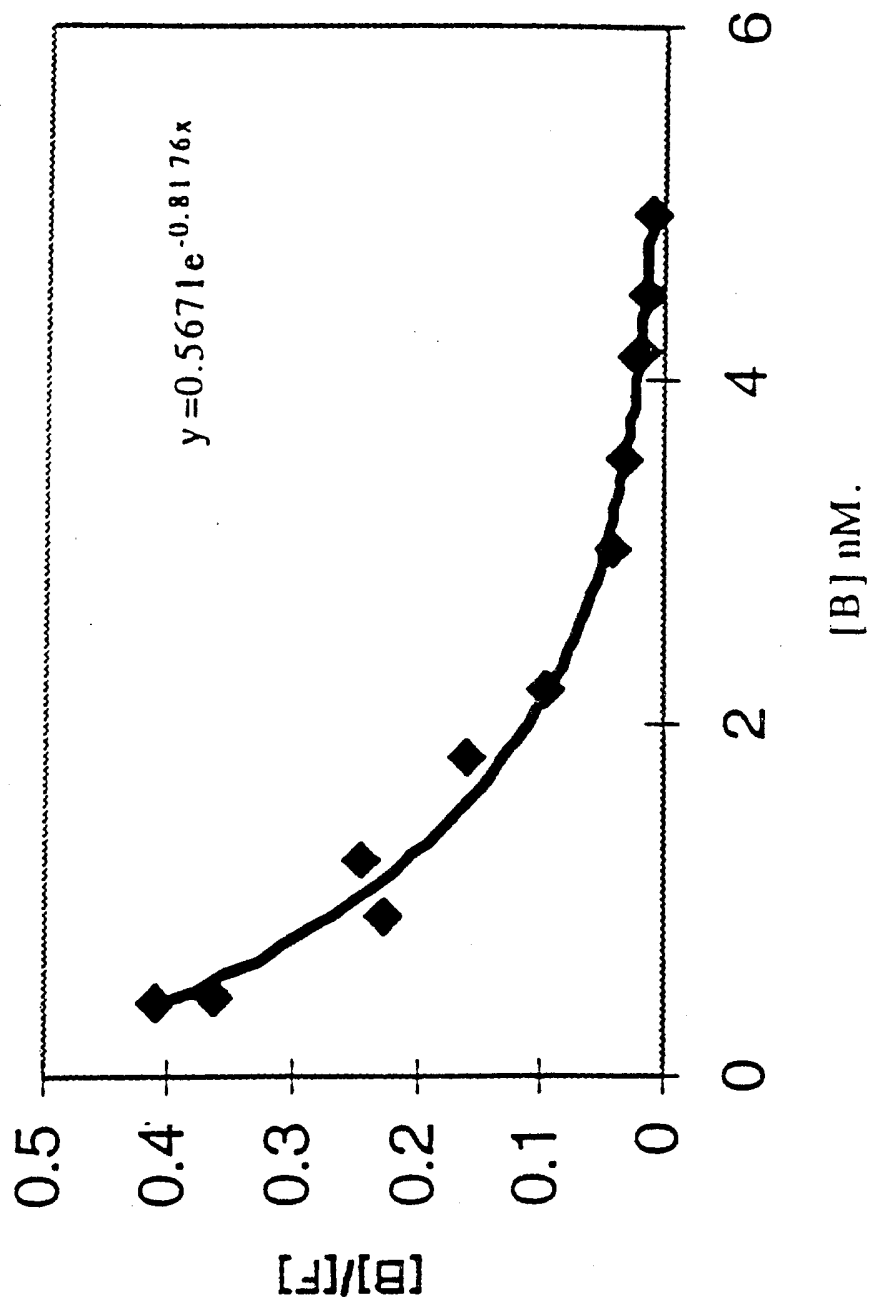


20/31

31.07.00

Obr. 17

Scatchard (bez 5-HT)

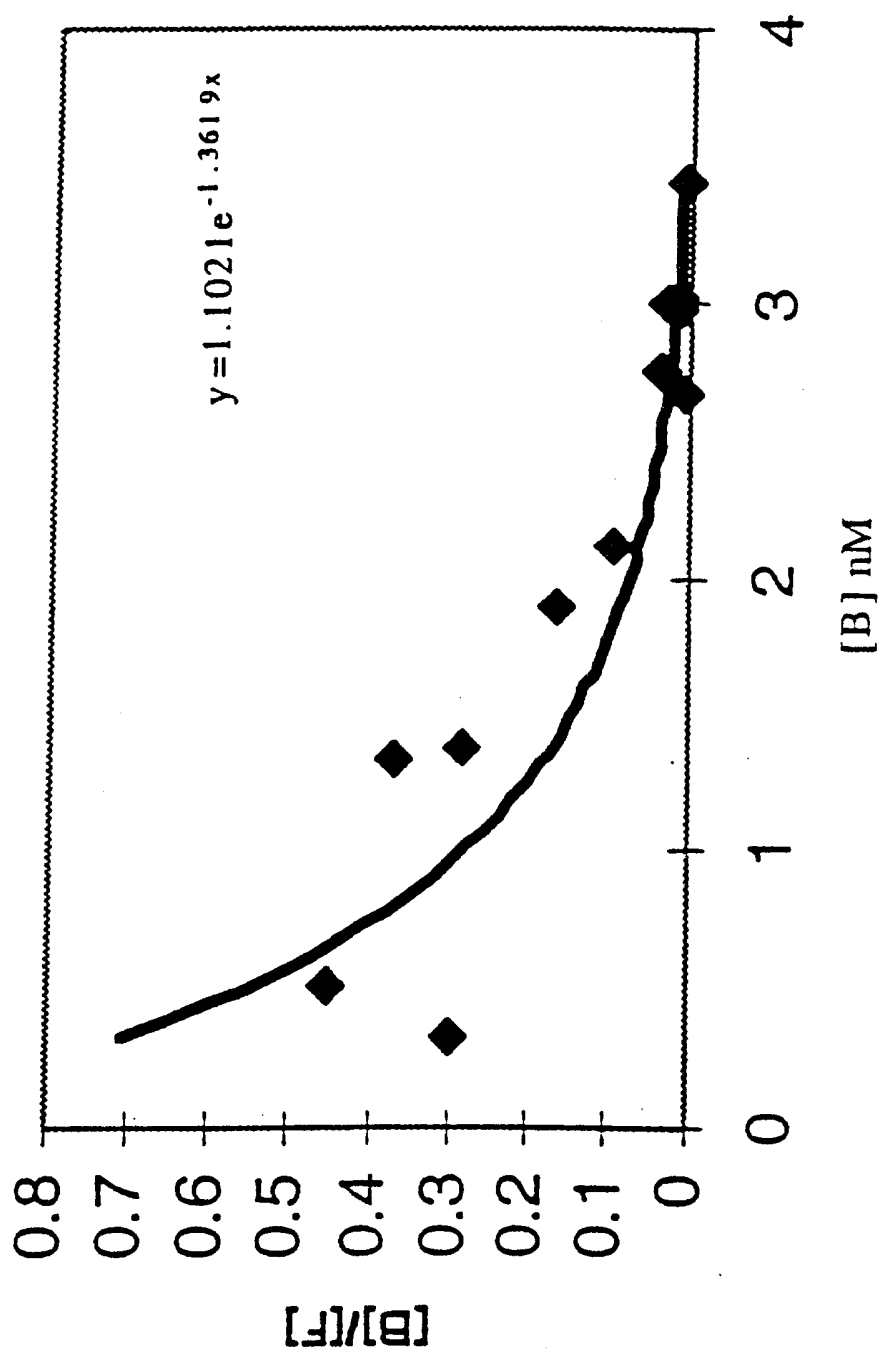


21/31

31.07.00

Obr. 17 (pokr.)

Scatchard (+2,38mM 5-HT)



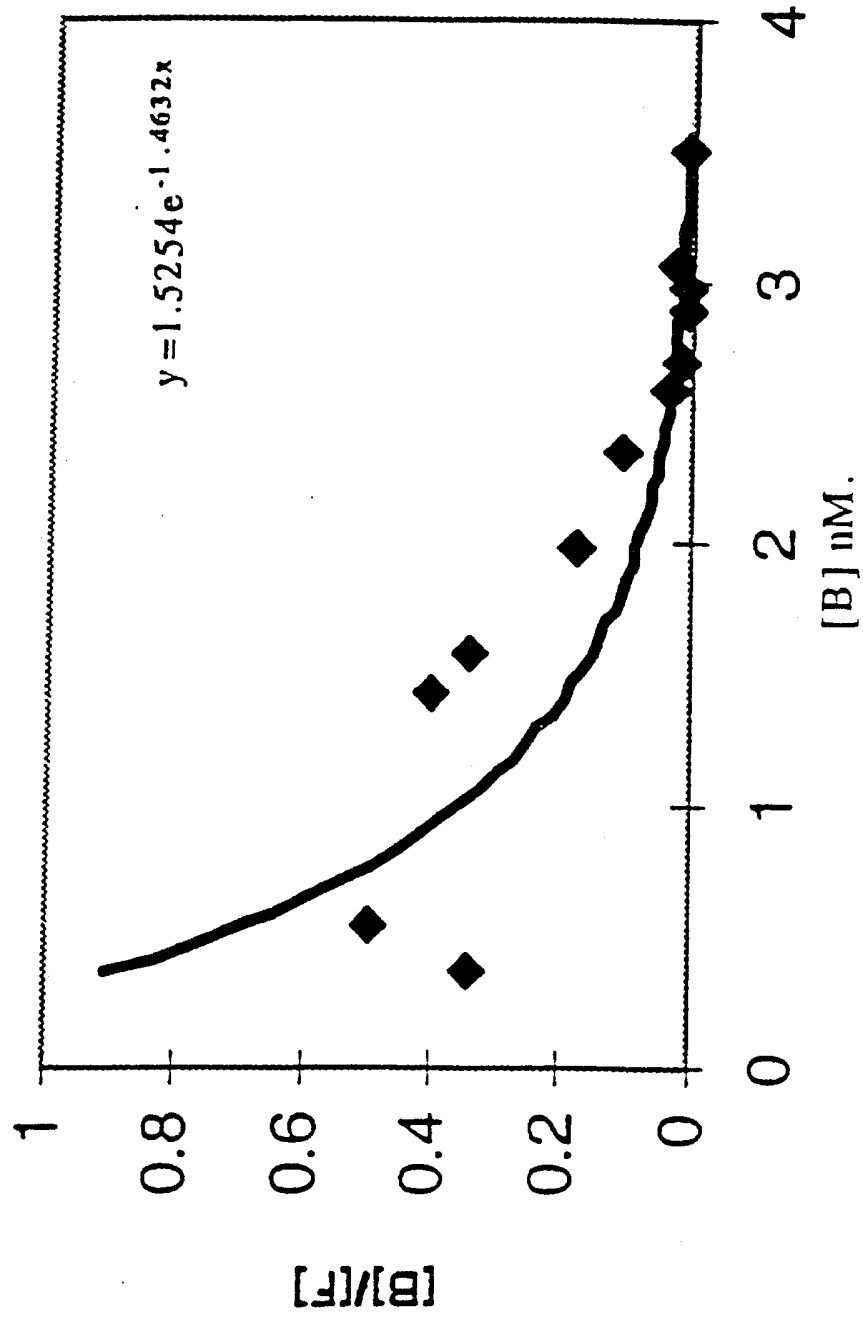
22/31

31.07.00

23/31

Obr. 17 (pokr.)

Scatchard (+23,8mM 5-HT)



31.07.00

24/31

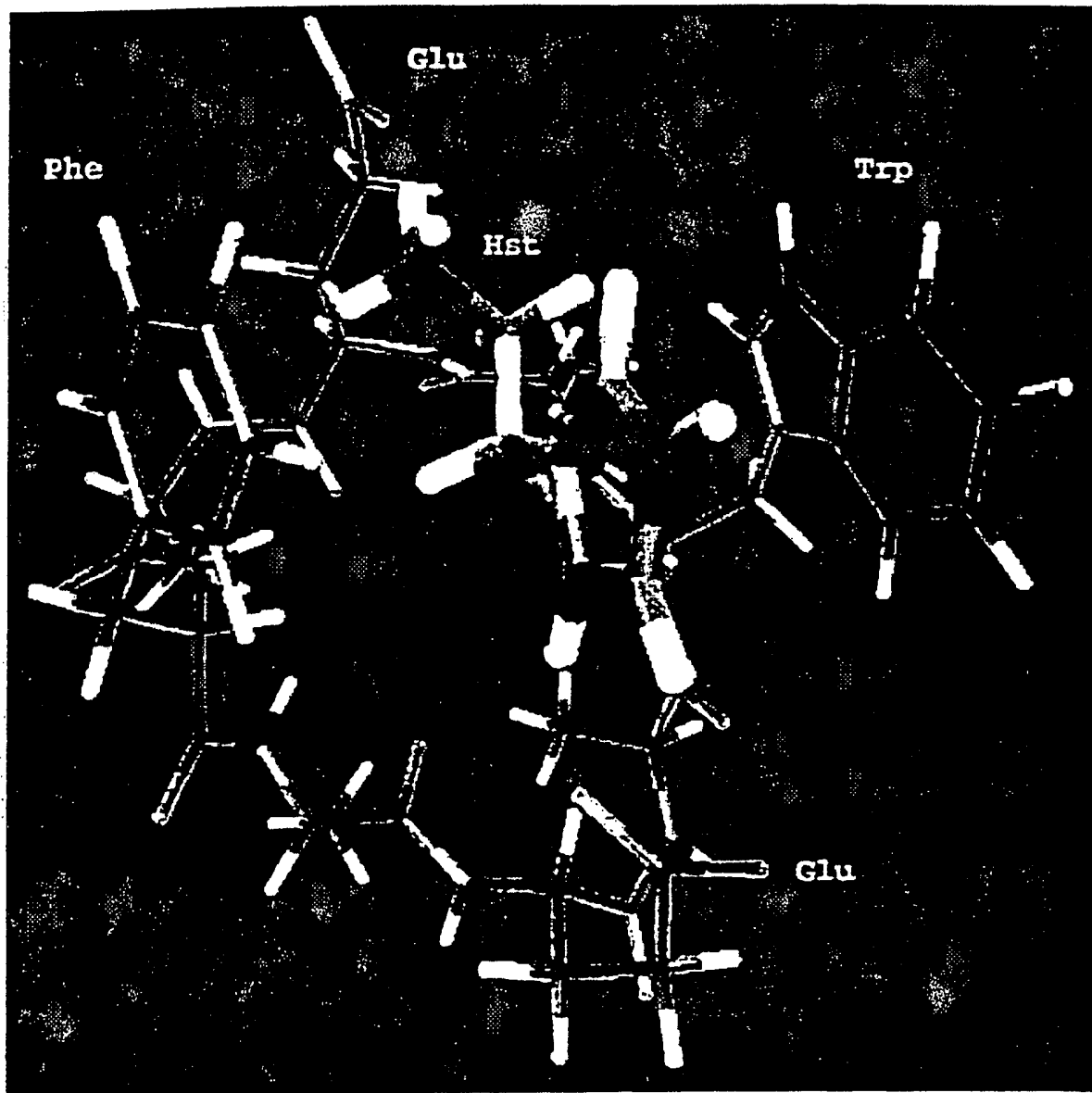


Obr. 18

31.07.00

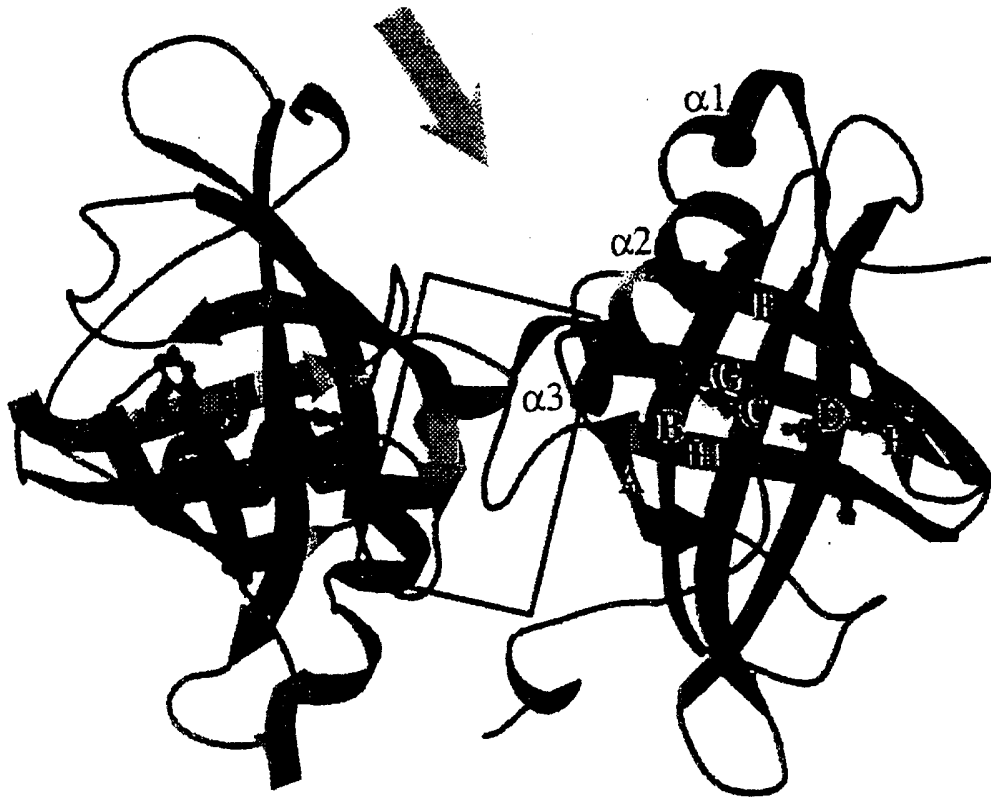
25/31

Obr. 19

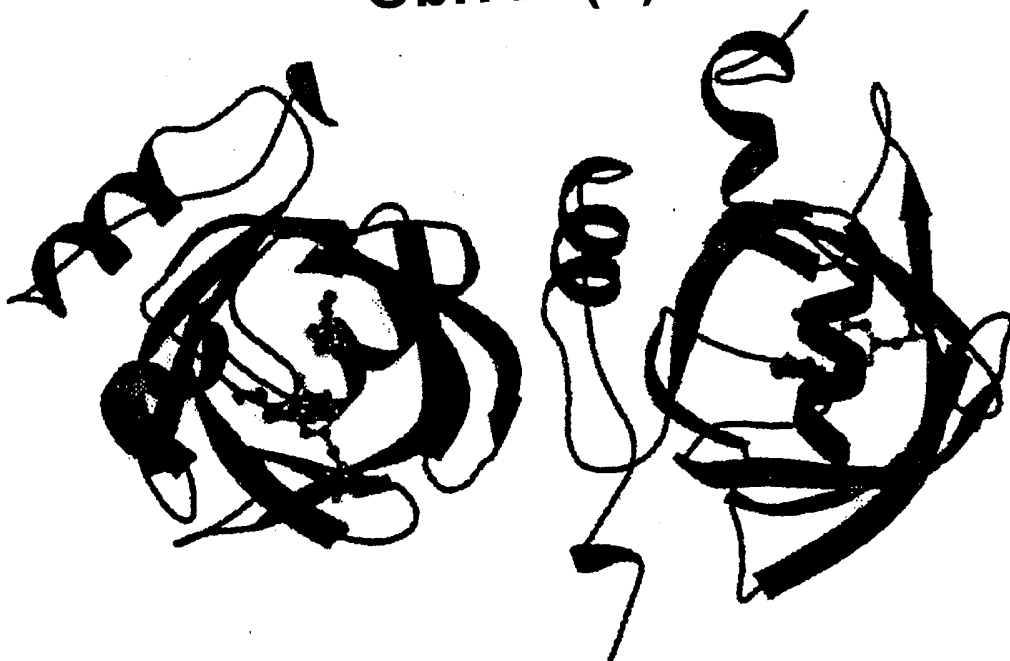


26/31

Obr. 20(a)

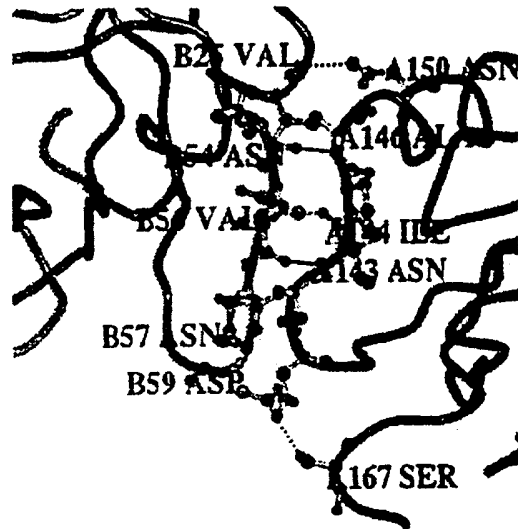
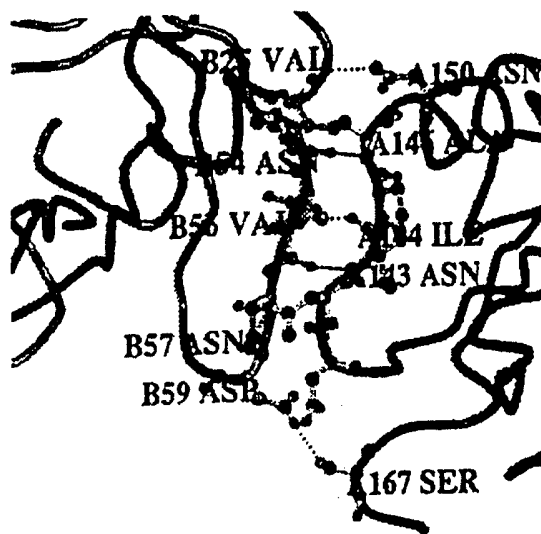


Obr. 20(b)

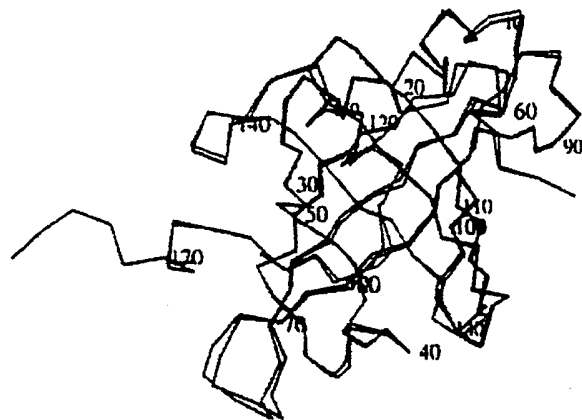
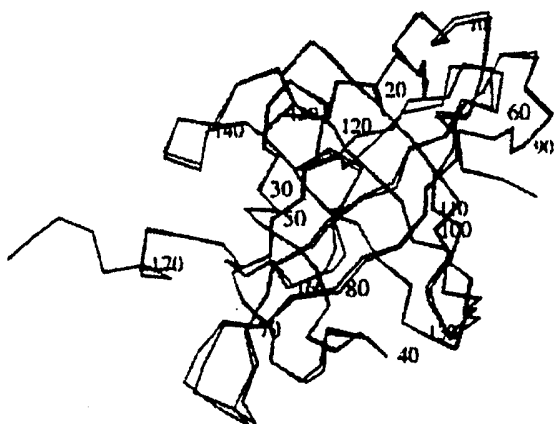


27/31

Obr. 20(c)

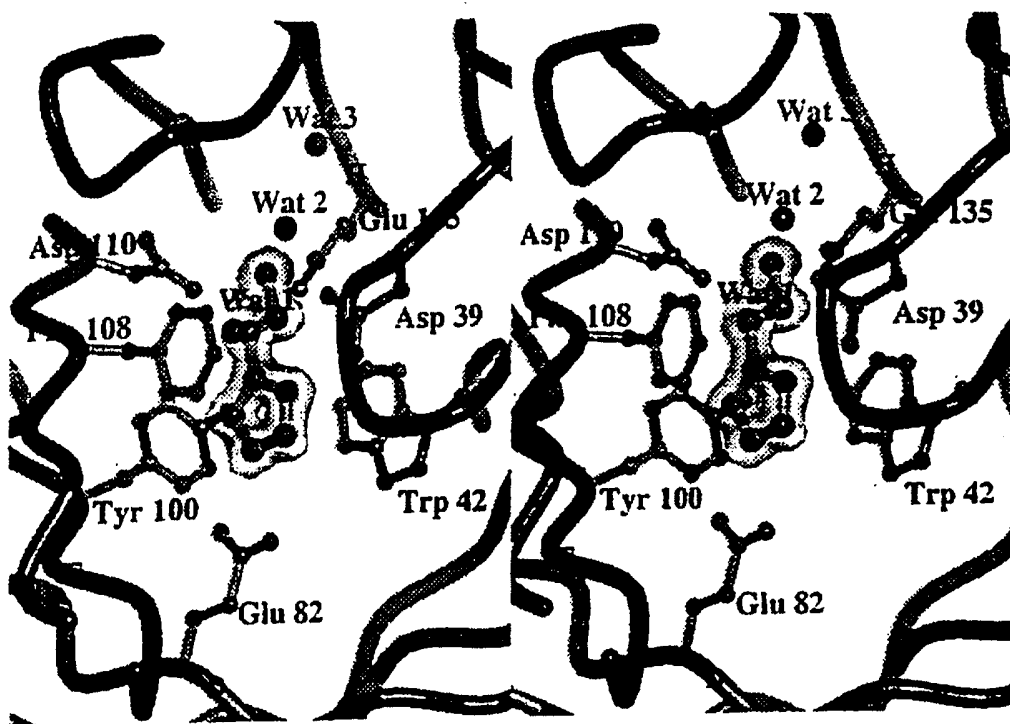


Obr. 20(d)

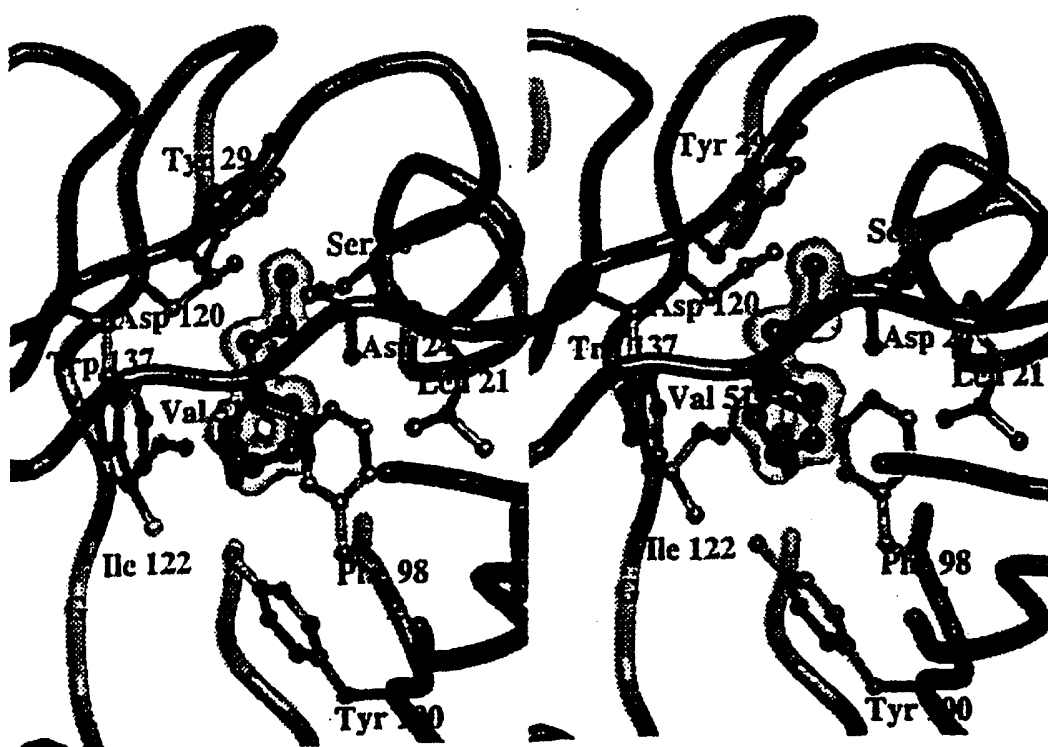


28/31

Obr. 21(a)



Obr. 21(b)



29/31

7V 2010-1924

C12N 15/12

Obr. 21(c)



31/31

ihhbp3	LDAV	QMASQ	QSGSR	GGP	DD	IEGR	TYL	D	FYV	VYV	VYV	Q	P	S	C	N	V	L	C	K	S	P	L	L	G	G	A	C	203
ihhbp4	LDAV	QMASQ	QSGSR	GGP	DD	IEGR	TYL	D	FYV	VYV	VYV	Q	P	S	C	N	V	L	C	K	S	P	L	L	G	G	A	C	203
ihhbp5	SNNGIS	AKYDE	MPRD	GRN	YLF	DNFI	GA	Y	L	D	D	F	Y	V	S	Q	D	N	C	C	R	-	-	-	-	-	-	-	212
FS-HBP1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	152
FS-HBP2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	153
MS-HBP1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	153
ihhbp1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	160
ihhbp2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	160
D.RET6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	163
avhbp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	154
ra-res	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	164

ihhbp3	DFWV	T	E	S	E	L	Q	K	A	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	235		
ihhbp4	DFWV	P	Q	S	E	L	D	K	V	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	234		
ihhbp5	DFWL	R	K	T	E	L	P	S	L	L	K	A	A	E	N	D	D	N	D	N	T	E	S	L	K	N	Y	W	E	R	268
FS-HBP1	ELWA	T	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	158	
FS-HBP2	ELWT	T	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	159	
MS-HBP1	ELWV	S	E	D	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	161	
ihhbp1	ELWV	R	S	D	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	168	
ihhbp2	ELWV	R	S	E	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	168	
D.RET6	ELWV	K	K	S	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	171	
avhbp	ELWV	K	D	T	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	162	
ra-res	ELWV	D	H	D	E	K	A	T	Q	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	176	

ihhbp3	GDS	D	D	Q	Q	G	P	E	L	E	V	V	F	K	N	L	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	285
ihhbp4	EGS	D	A	E	Q	P	E	L	E	A	I	F	F	K	H	L	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	284
ihhbp5	SIE	K	A	E	D	V	F	K	N	T	A	Y	I	F	F	K	H	L	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	321
FS-HBP1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	190
FS-HBP2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	190
MS-HBP1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	200
ihhbp1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	203
ihhbp2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	203
D.RET6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	209
avhbp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	198
ra-res	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	207

Obr. 22(pokr.)