

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **10.02.1999**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **19.02.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/026291**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17.10.2001**
(Věstník č. 10/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/US99/02949**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/42075**

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 3008

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 39/395

C 07 K 16/28

C 12 N 15/13

(71) Přihlašovatel:

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, Princeton,
NJ, US;

(72) Původce:

Aruffo Alejandro A., Belle Mead, NJ, US;
Hollenbaugh Diane, Newtown, PA, US;
Siadak Anthony W., Seattle, WA, US;
Berry Karen K., Lawrenceville, NJ, US;
Harris Linda J., Seattle, WA, US;
Thorne Barbara A., Issaquah, WA, US;
Bajorath Jurgen, Lynnwood, WA, US;
Huse William D., Del Mar, CA, US;
Wu Herren, San Diego, CA, US;
Watkins Jeffry D., Encinitas, CA, US;

(74) Zástupce:

Kalenský Petr JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Protilátky proti lidským CD40

(57) Anotace:

Nové chimerní a humanizované protilátky proti lidským CD40, které blokují interakci mezi gp39 a CD40. Protilátky CD40 jsou účinné v modulaci humorálních imunních odpovědí proti antigenům dependentním na T-buňkách, kolagenem indukované artritidě a transplantaci kůže a jsou rovněž využitelné pro své protizánětlivé vlastnosti.

Protilátky proti lidským CD40Dosavadní stav techniky

Imunní/zánětlivé odpovědi jsou zprostředkovány komplexní sérií interakcí. Jeden pár receptoru/ligandu, který se ukázal jako důležitý v těchto procesech, je CD40/gp39. Interakce gp39/CD40 zprostředkuje řadu důležitých signálních událostí mezi aktivovanými T-buňkami a jinými efektorovými buňkami imunního systému, které vedou k amplifikaci imunní/zánětlivé odpovědi. Odpovědi na signalizaci prostřednictvím CD40 zahrnují pomoc T-buněk B-buňkám v humorální imunní odpovědi, indukci cytokinů monocyty a expresi adheze molekul endoteliálními buňkami.

CD40 je typ I receptoru na buněčném povrchu a patří do skupiny supergenů receptorů faktoru nekrózy tumoru (TNFR). Ačkoli byl původně identifikován jako antigen B-buněk, dnes se má za to, že jeho exprese je způsobována všemi antigen-presentujícími buňkami (APC), včetně dendritových buněk, keratinocytů a monocytů. Exprese CD40 je rovněž způsobena buněčnými typy, které za určitých podmínek mohou působit jako APC, jako například vaskulárními endoteliálními buňkami nebo buňkami, účastnicími se přímých interakcí s T-buňkami nebo prekursorů T-buněk, jako například epiteliálními buňkami thymu. Nedávno se rovněž ukázalo, že exprese CD40 může být způsobena fibroblasty, eosinofily a aktivovanými T-buňkami. Exprese CD40 byla také pozorována v rakovinných buňkách. Důkazy pro to jsou primárně odvozeny od identifikace některých buněčných linií odvozených od karcinomů a melanomů, které jsou CD40⁺. (Clark a Ledbetter, Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 4494 - 4498 (1986); Schriever a kol., J. Exp. Med. 169, 2043 - 2058 (1989); Caux a kol., J. Exp. Med. 180, 1263 - 1272 (1994); Alderson a kol., J. Exp. Med. 178, 669 - 674 (1993); Young a kol., Int. J. Cancer 43, 786 - 794 (1989); Paulie a kol., Cancer Immunol.

Cancer 43, 786 - 794 (1989); Paulie a kol., Cancer Immunol. Immunother. 20, 23 - 28 (1985); Denfeld a kol., Eur. J. Immunol. 26, 2329 - 2334 (1996); Gaspari a kol., Eur. J. Immunol. 26, 1371 - 1377 (1996); Peguet-Navarro a kol., J. Immunol. 158, 144 - 152 (1997); Hollenbaugh a kol., J. Exp. Med. 182, 33 - 40 (1995); Galy a Spits, J. Immunol. 149, 775 - 782 (1992);

T-buňky. Gp39 je rovněž znám jako CD40L, TRAP, T-BAM a nyní má oficiální označení CD z workshopu o leukocytech CD154. Ve zkouškách in vitro se objevuje gp39 na T-buňkách přibližně 2 až 4 hodiny po aktivaci T-buněk a nejvyšších hladin dosahuje po 6 až 8 hodinách. Hladina proteinu poté rychle klesá a 24 hodin po stimulaci již není detekovatelná. Exprese gp39 byla rovněž detekována na eosinofilech a mastocytech (Noelle a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. 89, 6550 - 6554 (1992); Hollenbaugh a kol., EMBO J. 11, 4313 - 4321 (1992); Spriggs a kol., J. Exp. Med. 176, 1543 - 1550 (1992); Graf a kol., Eur. J. Immunol. 22, 3191 - 3194 (1992); Covey a kol., Mol. Immunol. 31, 471 - 484 (1994); Castle a kol., J. Immunol. 151, 1777 - 1788 (1993); Roy a kol., J. Immunol. 151, 2497 - 2510 (1993); Gauchat a kol., Nature 365, 340 - 343 (1993); Gauchat a kol., Eur. J. Immunol. 25, 863 - 865 (1995); Koshy a kol., J. Clin. Invest. 98, 826 - 837 (1996); Desai-Mehta a kol., J. Clin. Invest. 97, 2063 - 2073 (1996).

CD40 je silný signální receptor, poskytující mechanismus pro aktivované T-buňky k regulaci širokého okruhu imunních a zánětlivých odpovědí. Studie in vitro a in vivo s rekombinantními formami ligandů gp39 a s anti-CD40 monoklonálními protilátkami ukázaly, že signalizace prostřednictvím těchto receptorů vede k buněčné odpovědi u všech známých CD40⁺ buněk a tento výsledek se liší nejen u typu buněk, ale je rovněž modulován souběžnými signálními událostmi zprostředkovanými ostatními receptory.

V B-buňkách například signalizace CD40 ve spojení se signalizací IL-4 receptory vede k proliferaci B-buněk a tvorbě protilátek isotypu IgE, zatímco signalizace CD40 ve spojení se signály z IL-10 receptoru vede k proliferaci B-buněk a tvorbě protilátek isotypu IgG (Gordon a kol., Eur. J. Immunol. 17, 1535 - 1538 (1987); Rousset a kol., J. Exp. Med. 173, 705 - 710 (1991); Jabara a kol., J. Exp. Med. 172, 1861 - 1864 (1990); Gascan a kol., J. Immunol. 147, 8 - 13 (1991). Signalizace CD40 zprostředkovaná gp39 může hrát roli v buněčné imunitě prostřednictvím indukce CD80 a CD86, důležitých kostimulačních molekul T-buněk, které váží CD28 a CTLA4 (Goldstein a kol., Mol. Immunol. 33, 541 - 552 (1996).

Systém receptor/ligand CD40/gp39 je jedním z mnoha systémů, zapojených do produktivní interakce mezi aktivovanými T-buňkami a jinými buňkami imunitního systému. Nicméně řada poznatků ukazuje, že tato interakce je jedinečná a ústřední v regulaci humorální imunní odpovědi u lidí. Zejména defekty v expresi nebo struktuře gp39 se ukázaly jako příčina lidské imunodeficiency známé jako hyper IgM syndrom (HIM), vázaný na X-chromozom. Tato imunodeficiency je charakterizována neschopností postižených jedinců vytvářet jiné protilátky než daného IgM izotypu, což indikuje, že produktivní interakce mezi gp39 a CD40 je nutná pro účinnou humorální odpověď (Allen a kol., Science 259, 990 - 993 (1993); Aruffo a kol., Cell 72, 291 - 300 (1993); Di Santo a kol., Nature 361, 541 - 543 (1993); Fuleihan a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. 90(6), 2170 - 2173 (1993); Korthauer a kol., Nature 361, 539 - 541 (1993); Notarangelo a kol., Immunodef. Rev. 3, 101 - 122 (1992). Podobně poslední údaje indikují, že HIM syndrom, který není vázán na X-chromozom u lidí je způsoben defekty v molekule CD40. Použitím technologie, vedoucí ke knockoutu genu (vyřazení genu z činnosti), byly připraveny myši, kterým chybí CD40 nebo gp39. Tyto myši projevují fenotyp, který má stejné charakteristiky jako HIM syndrom, z čehož lze předpokládat,

že myš může sloužit jako vhodný model, na němž lze zkoušet in vivo účinky léčby buď anti-CD40 nebo anti-gp-39 monoklonálních protilátek, které blokují interakci mezi CD40 a gp39 (Kawabe a kol., Immunity 1, 167 - 178 (1994); Xu a kol., Immunity 1, 423 - 431 (1994); Renshaw a kol., J. Exp. Med. 180, 1889 - 1900 (1994); Castigli a kol., Proc. Natl. Acad. Sci USA 91, 12135 - 12139 (1994).

Účinky in vivo inhibice interakce CD40/gp39 se intenzivně studovaly na normálních myších a myších modelech nemocí za použití křeččí monoklonální protilátky proti myší gp39 (MR1). Imunosupresivní kapacita protilátky se odráží v její schopnosti kompletně inhibovat humorální imunní odpověď na T-buňky dependentní antigeny (Foy a kol., J. Exp. Med. 178, 1567 - 1575 (1993). Na několika myších modelech nemocí imunity se rovněž ukázalo, že tyto nemoci byly inhibovány léčbou protilátkou, včetně těch nemocí, zprostředkovaných buněčnými imunními odpověďmi. Ukázalo se, že modely nemocí byly inhibovány léčbou anti-gp39, včetně arthritidy indukované kolagenem, experimentální alergické encefalomyelitidy, lupus nefritis, rejekce transplantátů a reakce štěpu proti hostiteli (Durine a kol., Science 261, 1328 - 1330 (1993); Berry a kol., nevydané; Gerritse a kol., Proc. Natl. Acad. Sci USA 93, 2499 - 2504 (1995); Mohan a kol., J. Immunol. 154, 1470 - 1480 (1995); Larsen a kol., Transplantation 61, 4 - 9 (1996); Hancock a kol., Proc. Natl. Acad. Sci USA 93, 13967 - 13972 (1996); Parker a kol., Proc. Natl. Acad. Sci USA 92, 9560 - 9564 (1995); Durie a kol., J. Clin. Invest. 94, 1333 - 1338 (1994); Wallace a kol., nevydáno). Úloha CD40/gp39 v amplifikaci buněčné imunní odpovědi může být přímá, prostřednictvím stimulace subpopulace aktivovaných T-buněk, které jsou schopny exprese CD40, nebo nepřímo prostřednictvím indukce cytokinů a expresí důležitých ko-stimulačních molekul buněčného povrchu, jako CD 80 a Cd86, které vážou k T-buňkám receptory CD28 a CTLA-4. Protizánětlivé účinky inhibitorů byly ukázány studiemi na myším modelu poškození plic indukovaném

kyslíkem. Účinky na zánět in vivo se předpokládají na základě výsledků in vitro, které ukazují stimulaci CD40 na buňkách cévního endotelu a monocytech, jejíž výsledkem je exprese molekul buněčné adheze, oxidu dusnatého (NO), metaloproteinázy matrix a prozánětlivých cytokinů (Kiener a kol., J. Immunol. 155, 4917 - 4925 (1995); Malik a kol., J. Immunol. 156, 3952 - 3960 (1995); Hollenbaugh a kol., J. Exp. Med. 182, 33 - 40 (1995)).

Studie s monoklonálními protilátkami proti lidským gp39 na opicích ukázaly, že biologické látky, které inhibují interakci mezi gp39 a CD40 in vivo jsou účinnými imunosupresivními látkami u primátů. Anti-gp39 monoklonální protilátky se ukázaly účinnými v inhibici protilátkových odpovědí na antigeny dependentní na T-buňkách a při ochraně alografních štěpů před rejekcí. Tyto výsledky jsou analogické jako u hlodavců.

Souhrnně ukázaly studie uvedené výše, že látky, které přerušují interakci mezi gp39 a CD40, budou silnými imunosupresivními a protizánětlivými látkami. Proto je zapotřebí účinný způsob blokování interakce CD40/gp39, aby poskytl imunosupresivní a protizánětlivý účinek. Cílem předloženého vynálezu je poskytnout protilátku, která blokuje interakci mezi gp39 a CD40.

Dalším cílem předloženého vynálezu je poskytnout chimerní protilátku účinnou při blokování interakce mezi CD40 a gp39.

Doplňkovým cílem předloženého vynálezu je poskytnout humanizovanou protilátku účinnou při blokování interakce mezi CD40 a gp39.

Dalším cílem předloženého vynálezu je způsob modulace imunní odpovědi podáváním protilátky, chimerní protilátky nebo humanizované protilátky poskytnutého vynálezu. Způsob může být účinný v léčbě řady autoimunních chorob, stejně jako transplantace kůže a jiných orgánů.

Podstata vynálezu

Poskytnutý vynález zahrnuje novou protilátku, výhodněji chimerizovanou monoklonální protilátku proti lidským CD40, která blokuje interakci mezi gp39 a CD40. V jednom ztělesnění poskytnutého vynálezu je zvláště výhodná chimerizovaná monoklonální protilátka proti lidským CD40 nazývána "chi220". Chi220 je chimerní protilátka obsahující rozličné myší a lidské kappa a gama 1 konstantní oblasti. Chi220 se, jako její mateřská myší m-protilátka, váže na CD40 a výsledkem je účinné blokování humorální imunní odpovědi na antigeny dependentní na T-buňkách v režimu závislém na dávkách.

V rámci poskytnutého vynálezu jsou rovněž humanizované protilátky proti CD40, které blokují interakci mezi gp39 a CD40. V jednom ztělesnění poskytnutého vynálezu humanizovaná protilátka je označena jako F4; v jiném ztělesnění humanizovaná protilátka je označena jako L3.17. Výhodné humanizované protilátky poskytnutého vynálezu zahrnují lidské proměnlivé těžké a proměnlivé lehké oblasti s myšími naštěpovanými CDRs.

Protilátky proti CD40 poskytnutého vynálezu, výhodně chimerní a humanizované protilátky zde popsané jsou účinné v modulaci humorální imunní odpovědi proti antigenům dependentním na T-buňkách, arthritidě indukované kolagenem a rejekci transplantátů. Protilátky proti CD40 poskytnutého vynálezu, výhodně chimerní a humanizované protilátky zde popsané jsou rovněž užitečné pro své protizánětlivé vlastnosti (které jsou stejné jako vlastnosti pozorované u anti-gp39).

Protilátky poskytnutého vynálezu, výhodně anti-CD40 chimerní a humanizované protilátky chi220 a anti-CD40 a humanizované protilátky F4 a L3.17 mají široké léčebné uplatnění, zahrnující autoimunní nemoci, zánětlivé nemoci a transplantace. Díky expresi CD40 pozorované v maligních buňkách několika histologických typů je evidentní potenciální uplatnění protilátek proti CD40 v onkologii,

zejména chimerních a humanizovaných protilátek poskytnutého vynálezu.

Následující zkratky jsou používány v poskytnuté přihlášce a jsou známy odborníkům v oboru: APC (antigen presenting cell - buňka prezentující antigen), CDR (complementarity-determining region - oblast, určující komplementaritu), CHO (chinese hamster ovary - vaječník čínského křečka), CIA (collagen-induced arthritis - arthritida indukovaná kolagenem), C_{max} (maximální koncentrace v séru), COS (linie buněčných fibroblastů africké zelené opice), DMARD (disease modifying anti-rheumatic drugs - antirevmatika modifikující průběh choroby), ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay - enzymová imunoanalýza), EPT (end point titers - konečné titry), EU (endotoxin units - jednotky endotoxinu), FAB (antigen binding fragment - fragment vážící antigen), FITC (fluoroisothiokyanát), Hu humanizovaný, h106-2 humanizovaná monoklonální protilátka proti gp39, HAMA (human anti-mouse antibodies - lidské protimýší protilátky), im (intramuskulární), KLH (keyhole limpet hemocyanin -), mAb monoklonální protilátka, MTX (metotrexát), OVA (ovalbumin), PBS (phosphate buffered saline - roztok soli pufrovaný fosforečnanem), PCR (polymerase chain reaction - polymerázová řetězová reakce), PE (phycoeritherin), sc (subkutánní - podkožní), SDS-PAGE (elektroforéza na gelu polyakrylamidu síranu dodecylsodného), SEC (size exclusion chromatography - vylučovací chromatografie), SRBC (sheep red blood cells - ovčí červené krvinky), STR (stirred tank reactor - reakční nádobka s mícháním), TNF (tumor necrosis factor - faktor nekrózy tumoru), VL (proměnná oblast lehkého řetězce protilátky), VH (proměnná oblast těžkého řetězce protilátky).

Nukleová kyselina kódující výhodný lehký řetězec chimerní protilátky poskytnutého vynálezu (chimerní protilátky 2.220) byla uložena v Americké sbírce typů kultur

a bylo jí přiděleno vstupní číslo ATCC _____. Nukleová kyselina kódující výhodný těžký řetězec chimerní protilátky poskytnutého vynálezu (chimerní protilátky 2.220) byla uložena v Americké sbírce typů kultur a bylo jí přiděleno vstupní číslo ATCC _____.

Nukleová kyselina kódující výhodný lehký řetězec humanizované protilátky poskytnutého vynálezu (humanizované protilátky F4) byla uložena v Americké sbírce typů kultur a bylo jí přiděleno vstupní číslo ATCC _____. Nukleová kyselina kódující doplňující výhodný lehký řetězec humanizované protilátky poskytnutého vynálezu humanizované protilátky L3.17) byla uložena v Americké sbírce typů kultur a bylo jí přiděleno vstupní číslo ATCC _____. Nukleová kyselina kódující výhodný těžký řetězec humanizované protilátky poskytnutého vynálezu (F4 a L3.17) byla uložena v Americké sbírce typů kultur a bylo jí přiděleno vstupní číslo ATCC _____.

Tyto zmíněné úschovy budou udržovány za podmínek Budapeštské úmluvy o mezinárodním uznávání úschov mikroorganismů pro účely patentové procedury. Tyto úschovy jsou poskytovány pouze jako výhoda (potřeba) pro odborníky v oboru a nejsou přiznáním, že úschova je požadována podle § 112 U.S.C.35. Sekvence polynukleotidů obsažená v uschovaných látkách, stejně jako sekvence aminokyselin polypeptidů jimi kódovaných jsou zde zahrnuty v odkazech a jsou kontrolními v případě jakéhokoli konfliktu s jakýmkoli popisem sekvencí, zde podaným. Pro přípravu, užití nebo prodej uschovaných látek je možno požadovat licenci a žádná tato licence zde není udělena.

Všechny odkazy citované v této přihlášce, jak výše tak níže, jsou zde zahrnuty v jejich celku.

Přehled obrázků na výkresech

Obrázek 1 ukazuje inhibici navázání sgp39 na Rajiho buňky protilátkami proti lidskému CD40.

Obrázek 2 je schematickým náčrtem protokolu studie u primátů. Dny léčby jsou vyznačeny kosočtverci. Imunizace SRBC a KLH jsou označeny obdélníky a trojúhelníky. Zvířata léčená 2.36 nebyla zahrnuta ve studii po fázi I a zvířata léčená 1.106 nebyla zahrnuta ve studii po fázi II.

Obrázek 3 ukazuje protilátkovou odpověď anti-SRBC u primátů. Obrázek 3a ukazuje výsledky analýzy IgM protilátek proti SRBC. Obrázek 3b ukazuje výsledky analýzy IgG protilátek proti SRBC.

Obrázek 4a ukazuje sekvenci proměnné oblasti lehkého řetězce chi220 zvýrazněně (SEQ ID NO:1) a obrázek 4b ukazuje sekvenci proměnné oblasti těžkého řetězce chi220 zvýrazněně (SEQ ID NO:2). Podtržené sekvence na obrázku 4a a 4b jsou vložené signální sekvence lidské protilátky s nejbližší homologií, které se použily jako templát pro humanizaci.

Obrázek 5 ukazuje výsledky zkoušek in vitro testujících chimerní a humanizované protilátky poskytnutého vynálezu. Obrázek 5a ukazuje navázání chi220 a h220v3 na hCD40-mG2b ve zkoušce založené na metodě ELISA. Obrázek 5b ukazuje inhibici kostimulace lidských B-buněk s protilátkami proti lidským CD40 zprostředkované sgp39.

Obrázek 6 ukazuje IgM anti-SRBC protilátkovou odpověď. Obrázek 6a ukazuje výsledky na opicích získané dávkami 10, 40 nebo 100 mg/kg chi220. Obrázek 6b ukazuje výsledky na opicích získané dávkami 0,1 nebo 1 mg/kg chi220.

Obrázek 7 ukazuje IgG anti-SRBC protilátkovou odpověď. Obrázek 7a ukazuje výsledky na opicích získané dávkami 10, 40 nebo 100 mg/kg chi220. Obrázek 6b ukazuje výsledky na opicích získané dávkami 0,1 nebo 1 mg/kg chi220.

Obrázek 8 ukazuje anti-OVA protilátkovou odpověď u primátů. Obrázek 8a ukazuje výsledky analýzy IgM protilátek anti-OVA. Obrázek 8b ukazuje výsledky analýzy IgG protilátek anti-OVA.

Obrázek 9 ukazuje anti-KLH protilátkovou odpověď u primátů. Obrázek 9a ukazuje výsledky analýzy IgM protilátek anti-KLH. Obrázek 9b ukazuje výsledky analýzy IgG

protilátek anti-KLH.

Obrázek 10 ukazuje srovnání schopnosti protilátky 7E1-G1 a 7E1-G2b snížit IgG protilátkové odpovědi na SRBC.

Obrázek 11 ukazuje závislost inhibice protilátkové odpovědi na SRBC pomocí 7E1-G2b na dávce.

Obrázek 12 ukazuje expresi vektorových map oblasti těžkého řetězce a oblasti lehkého řetězce chimerní protilátky poskytnutého vynálezu.

Obrázek 13 poskytuje sekvenci nukleových kyselin (SEQ ID NO:5) pro expresi vektoru schopnou způsobit expresi těžkého řetězce chimerní protilátky poskytnutého vynálezu. Iniciační kodón ATG (nukleotidy 1000 - 1002), kódující startující Met vložené signální sekvence lidské protilátky jsou zvýrazněny. Nukleotidy 1057 až 1422 (SEQ ID NO:13), které jsou podtržené, poskytují výhodnou sekvenci nukleových kyselin kódující proměnný těžký řetězec protilátky poskytnutého vynálezu.

Obrázek 14 poskytuje sekvenci nukleových kyselin (SEQ ID NO:6) pro expresi vektoru schopnou způsobit expresi lehkého řetězce chimerní protilátky poskytnutého vynálezu. Iniciační kodón ATG (nukleotidy 1005 - 1007), kódující startující Met vložené signální sekvence lidské protilátky jsou zvýrazněny. Nukleotidy 1065 až 1388 (SEQ ID NO:14), které jsou podtržené, poskytují výhodnou sekvenci nukleových kyselin kódující proměnný lehký řetězec protilátky poskytnutého vynálezu.

Obrázek 15 ukazuje řazení proměnných oblastí řetězců myší anti-CD40 a sekvence lidského templátu. Sekvence aminokyselin proměnných oblastí H a L řetězců myší anti-CD40 se použily k identifikaci homologních lidských sekvencí zárodečných linií. Číslování zbytků a definice CDRs (podtrženo) jsou založeny na Kabat a kol. (Kabat E.A. a kol., Sequences of proteins of immunological interest 5.vydání (1991). Washington DC: United States department of Health and Human Services; Kabat E.A. a kol., J. Biol. Chem. 252, 6609 - 6616 (1977)). Rozdíly v sekvenci jsou

25.07.01

určovány vertikálními liniemi a rámcové pozice charakterizované v kombinatorické knihovně exprese jsou označeny hvězdičkou.

Obrázek 16 ukazuje výsledky titrace humanizovaných anti-CD40 variant na imobilizovaném antigenu. Byly charakterizovány bakteriálně expresovaný chimerní anti-CD40 FAB a zvolené varianty z každé z knihoven. Chimerní (plná kolečka), Hu I-19C11 (prázdná kolečka), Hu II-CW43 (prázdné čtverečky), Hu III-2B8 (plné trojúhelníky) a nevýznamné (plné čtverečky) FAB se uvolnily z periplasmatického prostoru 15 ml bakteriální kultury a jednotlivá po sobě jdoucí zředění se inkubovaly s antigenem CD40-Ig imobilizovaným na mikrotitračních destičkách. Vazba protilátek byla kvantifikována způsobem popsáným níže.

Obrázek 18 ukazuje, jak afinita protilátek koreluje s inhibicí vazby rozpustné gp39 na CD40-Ig. Ligand pro receptor CD40, gp39 se zachytil na mikrotitrační destičce. Následně se ko-inkubovala různá množství chimerní (plná kolečka), Hu II-CW43 (prázdné čtverečky), Hu III-2B8 (plné trojúhelníky), Hu II/III-2B12 (prázdné trojúhelníky) a nevýznamné (plné čtverečky) FAB se 2 μ g/ml CD40-Ig na mikrotitrační destičce. Vazba CD40-Ig na gp39 byla kvantifikována způsobem popsáným níže.

Obrázek 18 ukazuje kvantifikaci myších rámcových zbytků v aktivních variantech. Proměnné oblasti nejaktivnějších variant anti-CD40 z knihovny rámcové optimizace Hu I (A) a knihovny rámcové optimizace HCDR3 se sekvenovaly, aby se identifikovaly aminokyseliny na pozicích pracovní knihovny čtecích rámců. Každá jednotlivá varianta se kategorizovala na základě celkového počtu myších zbytků, které se udržely na 8 pozicích pracovní knihovny čtecích rámců. Sekvenovalo se třicet jedna klonů z knihovny Hu I a čtrnáct klonů z knihovny Hu II, což vedlo k identifikaci 24 a 10 jednotlivých variant. Pevná linie indikuje rozdělení sekvencí, jaké se očekává od stejného počtu náhodně zvolených variant.

25.07.01

Podrobný popis vynálezu

Původci poskytli chimerní a humanizované protilátky proti lidským CD40 s imunosupresivními vlastnostmi. Takové protilátky proti lidským CD40 mají zřejmé využití jako léčiva. Původci rovněž poskytli úzce spojené monoklonální protimysí protilátky proti CD40 (úzce spojené s monoklonálními protilátkami proti lidským CD40), které jsou využitelné pro studium účinků monoklonálních protilátek proti CD40 v řadě myších modelů imunních a zánětlivých onemocnění. Vývoj protilátek proti CD40 komplikuje skutečnost, že CD40 je silná signální molekula. Protilátky, které se vážou na tento antigen, lze kategorizovat na základě schopnosti stimulovat signalizaci CD40 stejně jako schopnosti blokovat interakci CD40/gp39.

Monoklonální protilátka proti lidským CD40, předložená přihlašovatelem patentu, která blokuje interakci CD40/gp39, byla zvolena z rozsáhlého seznamu anti-CD40 monoklonálních protilátek. Protilátka, značená 2.220, byla chimerizována a humanizována. "Chimerní" protilátky zahrnují lehký řetězec a těžký řetězec: lehký řetězec zahrnuje proměnnou oblast lehkého řetězce a stálou oblast lehkého řetězce; těžký řetězec zahrnuje proměnnou oblast těžkého řetězce a stálou oblast těžkého řetězce. Chimerní protilátky zahrnují proměnné oblasti jednoho druhu a stálé oblasti jiného druhu (například myší proměnné oblasti spojené s lidskými stálými oblastmi). (Viz například U.S. patenty 4816397 a 4816567). Každá z proměnných oblastí lehkého řetězce (VL) a proměnných oblastí těžkého řetězce (VH) se skládá z "rámcových" oblastí přerušovaných třemi hyperproměnnými oblastmi nazývanými "oblasti určující komplementaritu" nebo "CDRs". "Humanizované" protilátky obsahují protilátky s lidskými proměnnými oblastmi kombinované s CDRs z dárcovského myšího nebo krysího imunoglobulinu. (Viz například U.S. patent 5530101). Humanizované protilátky

obsahující CDRs odvozené z myších proměnných řetězců popsaných zde jsou rovněž zahrnuty v rámci poskytnutého vynálezu.

Nejzřejmější přístupová cesta k humanizaci protilátky se skládá z naštěpování CDRs od dárcovské monoklonální protilátky na lidský rámec (Jones P.T. a kol., *Nature* 321, 522 - 525 (1986)). Nicméně jisté zbytky rámců podporují strukturu CDR a kontaktní antigen štěpující myší CDRs na lidské rámcové templáty mohou snížit vazebnou aktivitu výsledné humanizované monoklonální protilátky (Foote J. a kol., *J. Mol. Biol.* 224, 487 - 499 (1992)). Hodnocení možného příspěvku zbytků specifického rámce na afinitu protilátky přináší dva problémy. Zaprvé je obtížné předvídat, které zbytky rámce hrají klíčovou roli při udržení afinity a specifity u jednotlivé monoklonální protilátky. Zadruhé je pro rámcové pozice, které se liší mezi mateřskou monoklonální protilátkou a lidským templátem, obtížné předvídat, zda aminokyselina odvozená z myšího rodiče nebo lidského templátu přinese aktivnější monoklonální protilátku. Výsledně proto nejsou vždy úspěšné způsoby humanizace protilátek, spoléhající výhradně na predikcích struktury.

Současné znalosti oboru obsahují popis strategie všeobecného inženýrství protilátek, která odpovídá obtížím při zachování aktivity vázat protilátky po humanizaci (Rosok M. J. a kol., *J. Biol. Chem.* 271, 22611 - 22618 (1996)). Potenciálně významné zbytky rámců které se liší mezi mateřskou monoklonální protilátkou a lidským templátem, jsou charakterizovány v jediném stupni syntézou a expresí knihovny kombinatorních protilátek, která obsahuje všechny možné kombinace mateřských a lidských aminokyselin templátu v rámci zkoumané pozice. Varianty ukazující optimální strukturu rámce jsou identifikovány vyhledáváním (screeningem) a následně je (jsou) optimální rámcová struktura (rámcové struktury) určeny sekvenováním DNA. Typicky odhalí sekvencující vícenásobné klony rozhodující

rámcové pozice, nutné pro expresi příslušné aminokyseliny. Obráceně, exprese myší nebo lidské aminokyseliny v pozici pracovní knihovny čtecích rámců ve stejné frekvenci v aktivních klonech je v souladu s méně důležitou funkcí této jednotlivé rámcové pozice. Takto je humanizována verze protilátky, která zabezpečuje vazebnou aktivitu mateřské monoklonální protilátky rychle identifikována na základě funkční vazby.

Proces humanizace protilátky a vyzrání (maturace) afinity se často provádí v šetrných stupních (Rosok, (1996), viz výše; Yelton D. E. a kol., J. Immunol. 155, 1994 - 2004 (1995); Wu H. a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 6037 - 6042 (1998); Baca M. a kol., J. Biol. Chem. 272, 10678 - 10684 (1997); Marks J. D. a kol., J. Biol. Chem. 267, 16007 - 16010 (1992). Za použití modifikované strategie popsané níže byly připraveny vícenásobné humanizace verze myších monoklonálních protilátek 2.220 vykazující afinitu shodnou nebo lepší než chimerní FAB.

Chimerní protilátka anti-CD40, poskytnutá předkladateli vynálezu, je zde označována jako "chi220". Úzce spojená protimyší monoklonální protilátka proti CD40, poskytnutá předkladateli vynálezu, je zde označována jako "7E1". Humanizované protilátky anti-CD40, poskytnuté předkladateli vynálezu, jsou zde označovány jako "F4" a "L3.17".

Byly připraveny dvě varianty izotypu 7E1. Tyto dvě varianty 7E1 jsou využitelné při zkoumání úlohy podílu Fc molekuly při léčbě monoklonální protilátkou proti CD40 v preklinických modelech imunních a zánětlivých onemocnění. Příprava monoklonální protilátky proti myším CD40, kritéria pro volbu té, která je vlastnostmi vhodná k chi220, příprava izotypových variant monoklonálních protilátek a jejich aktivita in vivo na myších modelech imunních nemocí jsou zde rovněž poskytnuty. Studie jak s chi220 tak s jejich mateřskou myší monoklonální protilátkou 2.220 na opicích, stejně jako studie s 7E1 na myších ukázaly, že tyto

anti-CD40 monoklonální protilátky jsou účinné imunosupresivní látky a jejich výsledky budou detailněji diskutovány dále. Studie zde popsané byly prováděny za použití standardní techniky známé odborníkovi v oboru.

Shrnuto, ukázalo se, že protilátky, poskytnuté předkladateli vynálezu snižují humorální imunní odpověď u opic. Stejně tak vykazaly dvě izotypové varianty úzce spojených monoklonálních protilátek proti myším CD40, 7E1 imunosupresivní aktivitu v řadě preklinických modelů studií lidských nemocí. Shrnuto, tyto výsledky ukazují, že chi220, F4 a L3.17 jsou užitečné pro jejich klinické využití při léčbě autoimunních nemocí a transplantací.

Následující příklady slouží pouze ilustrativním účelům a neomezují rozsah vynálezu, který je určen pouze patentovými nároky.

Příklad 1

A. Izolace a charakterizace in vitro

Panel monoklonálních protilátek se připravil proti lidským CD40 za použití standardní technologie hybridomů s lidským proteinem fuze CD40 jako imunogenem. Protilátky se vyhledaly pro vazbu na CD40 pomocí jak buněčné linie CD40⁺, tak proteiny fuze. Zkoušky gp39 vážící se na CD40 a funkční zkoušky stimulace prostřednictvím CD40 se použily k charakterizaci klonovaných protilátek. Zvolené protilátky se poté charakterizovaly pro jejich zkříženou reaktivitu s buňkami primátů, aby se zjistila vhodnost protilátek pro užití v preklinických modelech u primátů.

1. Imunizace a fuze

Provedly se dvě fuze ke generování hybridomů vytvářejících monoklonálních protilátek proti lidským CD40. Imunizace pro vznik imunních lymfocytů se provedly na 6 až 8 týdnů starých samičkách myši BALB/c za použití jako imunogenů rekombinantních proteinů fuze složených

z extracelulární domény lidské CD40 fuzované k zavěšení, CH2 a CH3 domény myší protilátky IgG2b (hCD40-mG2b).

Pro fuzi 40-1 se myš zpočátku imunizovala subkutánně na 3 až 4 místech emulzí (celkově 200 μ l) 30 ug hCD40-mG2b v kompletním Freundově adjuvans. Zvíře se 21. den stejným způsobem podpůrně injikovalo hCD40-mG2b v nekompletním Freundově adjuvans a poté se mu 37. den aplikovala finální pre-fuzová imunizace intravenosní injekcí 30 ug hCD40-mG2b v PBS. Imunizace pro fuzi 40-2 se provedla stejným způsobem s výjimkou toho, že adjuvans Ribi (R-730) nahradil Freundovo adjuvans. Podpůrné imunizace se provedly v 21. a 42. dnu s finální pre-fuzovou injekcí 58. den.

Tři dny po finálních podpůrných injekcích se získaly leukocyty ze sleziny a lymfatických uzlin a fuzovaly se v poměru 3:1 s X63-Ag8.653 myšími myelomovými buňkami za použití standardních metod (Kearney a kol., J. Immunol. 123, 1548 - 1550 (1979); Lane, J. Immunol. 81, 223 - 228 (1985). Suspenze buněk z každé fuze se naočkovala do deseti ploten pro kultivaci, obsahujících každá 96 jamek při destičkové denzitě přibližně 170000 celkových buněk (před fuzí) na jamku.

2. Screening (vyhledávání) a klonování

Použily se dva formáty zkoušek pro identifikaci monoklonálních protilátek u přírodní humanizované CD40. Supernatanty buněčné kultury ze všech jamek se zpočátku podrobily vyhledávání (screeningu) k určení jejich schopnosti vázat CD40-pozitivní EBV-transformované linie lidských B-buněk (1A2-2C) ve formátu založeném na metodě ELISA. Každý supernatant se potom testoval ve formátu založeném na metodě ELISA na reaktivitu s purifikovaným rekombinantním fuzovaným proteinem, skládajícím se z extracelulárních domén lidské CD40 fuzované k zavěšení, CH2 a CH3 domén lidské IgG1 protilátky, hCD40-Ig a stejným způsobem vytvořeným nevýznamným lidským Ig fuzovaným proteinem, Leu8-Ig (Hollenbaugh a kol., EMBO J. 11, 4313

- 4321 (1992). Reaktivita s dříve uvedeným fuzovaným proteinem a nikoli s posledně uvedeným z nich, ve spojení s údaji o buněčné vazbě, ukázala na přítomnost protilátky specifické pro přírodní CD40 u přibližně 200 hlavních jamek.

Klíčovou funkční vlastností pro požadovanou anti-CD40 monoklonální protilátku byla kapacita úplně blokovat interakci CD40 a jejího ligandu gp39. Takto se jako další krok ve výběru protilátky všechny supernatanty ze specifických hlavních jamek CD40 hodnotily s ohledem na jejich schopnost inhibovat vazbu rozpustného rekombinantní myši CD8-lidský gp39 fuzní protein, sgp39, na imobilizovaný hCD40-Ig ve formátu založeném na metodě ELISA. Ty, které kompletně inhibovaly tuto interakci, se následně titrovaly ve stejném formátu, aby se určilo, které jamky obsahovaly nejvyšší titr inhibující protilátky. Deset nejsilněji inhibujících hlavních jamek z této analýzy bylo vybráno ke klonování.

Klonování vhodných buněk vylučujících protilátku se provedla v procesu sestávajícím ze dvou kroků. Buňky z každé hlavní jamky se nejprve "miniklonovaly" při hustotě očkování 10 buněk na jamku, po kterém se CD40-specifický "miniklon" s nejvyšším titrem formálně klonoval pomocí metody limitního vyředování.

3. Další charakterizace

Pro charakterizaci protilátek se použilo šest formátů zkoušek. Byly to inhibice vazby gp39 na lidské B-buňky, inhibice proliferace B-buněk indukované sgp39 spolu s anti-IgM, inhibice syntézy protilátky in vitro B-buňkami indukovanými aktivovanými T-buňkami, přímá kostimulace B-buněk pomocí anti-IgM, kostimulace B-buněk pomocí anti-IgM za přítomnosti lehkého řetězce anti-kappa protilátky imobilizovaného pomocí cross-linking a kostimulace B-buněk pomocí anti-IgM v přítomnosti druhé anti-CD40 monoklonální protilátky, G28-5. Tato monoklonální protilátka je známa svojí kostimulační aktivitou a tím, že

kompletně blokuje interakci CD40/gp39. Pro účely srovnání byla tato protilátka zahrnuta v mnoha zkouškách.

Tyto analýzy vedly k výběru čtyř monoklonálních protilátek: 1.66 (IgG2b), 2.36 (IgG2a), 2.174 (IgG1) a 2.220 (IgG2a). Prováděly se testy k charakterizaci monoklonálních protilátek. V jednom experimentu se inkubovaly buňky z lidské B-buněčné linie Raji s 2 nebo 20 µg/ml různých anti-CD40 monoklonálních protilátek, po této inkubaci následovala druhá inkubace v nezřaděném supernatantu COS buněk obsahujícím protein fuze mCD8-gp39 (sgp39). Vázaný sgp39 se detekoval další inkubací buněk s anti-mCD8 monoklonální protilátkou, značenou FITC a analýzou buněk na FACScanu. Procento inhibice bylo spočítáno dělením střední fluorescence vzorků inkubovaných s protilátkou střední fluorescencí vzorků bez protilátky při první inkubaci (Obrázek 1).

Jak je ukázáno na obrázku 1, každá z těchto čtyř monoklonálních protilátek byla schopna kompletně inhibovat vazbu proteinu fuze sgp39 na linie lidských B-buněk vykazujících vysoké hladiny CD40, ačkoli v případě 2.174 byla ke kompletnímu blokování nutná relativně vysoká koncentrace. Podobné údaje byly získány za použití lidských tonsilárních B-buněk. Zadruhé, každá z nich významně inhibovala tvorbu IgG a IgM ve zkoušce in vitro syntézy protilátky B-buněk dependentních na T-buňkách.

Tři z těchto čtyř protilátek vykazaly omezenou schopnost kostimulace proliferace B-buněk za přítomnosti anti-IgM. Monoklonální protilátka 2.220 byla stálejší ve své schopnosti vyvolat slabou kostimulační aktivitu. Za přidání anti-kappa lehkého řetězce protilátky, použité pro cross-link imobilizaci anti-CD40 monoklonálních protilátek, získala 2.36 významnou kostimulační aktivitu, zatímco aktivita ostatních tří protilátek nebyla ovlivněna. Ukázalo se, že kostimulační schopnost G28-5 byla odlišně modulována, když byla spárována v kombinaci s každou ze čtyř nových anti-CD40 monoklonálních protilátek. Monoklonální protilátky

1.66 a zvláště 2.174 zvyšovaly kostimulaci G28-5, zatímco 2.220 a 2.36 ji snižovaly. Po selekci založené na hodnocení v lidských systémech in vitro byly čtyři anti-CD40 monoklonální protilátky dále zkoušeny pro jejich vhodnost pro hodnocení in vivo ve studiích na primátech jiných než lidech. Dva klíčové prvky analýzy byly relativní potence každé z nich vázat B-buňky primátů a supresi syntézy protilátky B-buněk dependentních na T-buňkách za podmínek in vitro. Zjistilo se, že každá ze čtyř monoklonálních protilátek reagovala zkříženě s B-buňkami *Cynomolgus macaque* (*Macaca fascicularis*). 2.36 a 2.220 vázaly s větší aviditou než 2.174 a 1.66. Nižší zřejmá vaznost monoklonálních protilátek 2.174 a 1.66 nebyla způsobena jejich jednotlivými isotypy, protože jiné isotypově spojené anti-CD40 monoklonální protilátky vykazaly vazebné hladiny srovnatelné s 2.36 a 2.220 (např. G28-5 a 2.118). Tyto výsledky byly v kontrastu s výsledky pozorovanými na lidských B-buňkách, kde každá z monoklonálních protilátek vykazala srovnatelnou vaznost. Schopnost čtyř monoklonálních protilátek snižovat syntézu protilátek opičími B-buňkami se ukázala být ve shodě se schopností vazby.

B. Charakterizace in vivo

Provedly se dvě studie na primátech jiných než člověk za použití myších monoklonálních protilátek proti lidským CD40 ke zhodnocení vhodnosti anti-CD40 jako imunosupresivní látky a ke zvolení vhodné protilátky k dalšímu vývoji. Zaprvé se porovnála clearance a akutní toxicita in vivo čtyř zvolených anti-CD40 monoklonálních protilátek.. Tyto výsledky se použily k volbě dvou protilátek, 2.36 a 2.220, které byly pak testovány ve druhé studii připravené pro hodnocení účinnosti inhibice protilátkové odpovědi na T-dependentní antigen a akutní toxicity.

Studie účinnosti 2.36 a 2.220 na primátech

Na základě předchozích zjištění se hodnotily monoklonální protilátky 2.36 a 2.220 z hlediska jejich schopnosti snižovat T-dependentní protilátkovou odpověď po intravenózním podání opicím *Cynomolgus*. Tato studie byla rozdělena na tři fáze (obrázek 2). Ve fázi I byla každá ze čtyř skupin složených z jednoho nebo dvou samečků a jedné nebo dvou samic opic *Cynomolgus* imunizována intravenózně ve dni 1 ovčími červenými krvinkami (SRBCs) a pak léčena monoklonální protilátkou 2.36, 2.220, 1.106 (IgG1 myší protilátky proti lidské gp39 - pozitivní kontrola) nebo L6 (IgG2a myší protilátky proti lidskému tumorovému antigenu - negativní kontrola) v dávce 20 mg/kg v 1., 3. a 5. dni. Určily se titr IgM a IgG na imunogen SRBC, sérové hladiny testovaných a kontrolních látek, přítomnost protilátek proti testovaným a kontrolním látkám, hladiny sérových imunoglobulinů, počet leukocytů v periferní krvi a frekvence různých subpopulací lymfocytů v periferní krvi. Ve fázi II, poté co se zvířata zbavila testovaných a kontrolních látek, byla imunizována SRBC a druhým antigenem, KLH (keyhole limpet hemocyanin), aby se zhodnotila indukce imunologické tolerance a reversibilita pozorované imunosuprese. Ve fázi III se zvolená zvířata reimunizovala, aby se zjistilo, zda původně snížená protilátková anti-SRBC odpověď se opět vrátila do původního stavu po doplňkovém testu SRBC a zhodnotila se sekundární protilátková odpověď na KLH.

Provedl se experiment, aby se ukázalo, že monoklonální protilátka 2.220 významně snižovala primární protilátkovou odpověď na SRBCs (obrázek 3). Opice se léčily buď monoklonální protilátkou 1.106, L6, 2.36 nebo 2.220 v 1., 3. a 5. dni fáze I dávkou 20mg/kg. Opice se imunizovaly SRBC v 1. dni fáze I, II a III. Obrázek 3a ukazuje výsledky vzorků séra, které byly analyzovány na IgM protilátky proti SRBC. Obrázek 3b ukazuje výsledky vzorků séra, které byly analyzovány na IgG protilátky proti SRBC. Data jsou vyjádřena v geometrickém průměru titru anti-SRBC pro každou skupinu (n=3 nebo 4).

Vrcholová primární odpověď byla inhibována 85 % pro IgM a 98 % IgG. Poté, co clearance monoklonální protilátky 2.220 v seru se dostala pod úroveň detekovatelnosti, vrcholová sekundární odpověď na SRBCs byla stále inhibována 79 % pro IgM a 56 % IgG ve srovnání s kontrolní odpovědí ve fázi I. To bylo v protikladu k pozitivní kontrole, monoklonální protilátka 1.106, kde byla pozorována silná sekundární protilátková odpověď na SRBC. Terciární odpověď na SRBC nebyla inhibována, což ukazuje, že monoklonální protilátka 2.220 indukuje prolongovanou imunosupresi, ale nikoli imunologickou toleranci. Všechna zvířata imunizovaná KLH měla primární a sekundární anti-KLH odpověď, což ukazuje, že imunosuprese je reversibilní. Zvířata léčená 2.36 se nezahrnula do fáze II, protože ve fázi I studie nebyla pozorována významná inhibice.

Průměrné vrcholové sérové koncentrace, které se objevily ihned po poslední dávce, byly 744 $\mu\text{g/ml}$ pro monoklonální protilátku 2.220 a 405 $\mu\text{g/ml}$ pro 2.36. Zatímco sérum se očistilo od monoklonální protilátky 2.36 pod úroveň detekovatelnosti za 15 dnů, u monoklonální protilátky 2.220 se neočistilo až do 29. dne. Obě monoklonální protilátky 2.36 a 2.220 byly imunogenní.

Nebyla žádná klinická pozorování spojená s léčivý, ani změny tělesné hmotnosti, spotřeby potravy nebo změny hematologické nebo hladin sérových Ig u žádného zvířete. Jediným pozorovaným zjištěním, spojeným s léčivý, byly přechodné poklesy v procentuálním zastoupení periferních B-buněk o 70 % u monoklonální protilátky 2.36 a 43 % u monoklonální protilátky 2.220. Návrat B-buněk na normální hladinu se projevil během 2 až 3 týdnů po léčbě.

Shrnuto, monoklonální protilátka 2.220 významně snížila protilátkovou odpověď na SRBCs, zatímco 2.36 nikoli. Ačkoli monoklonální protilátka 2.220 indukovala prolongovanou na antigen specifickou imunosupresi, byla tato imunosuprese reversibilní. Na základě těchto zjištění byla zvolena monoklonální protilátka 2.220 k dalšímu vývoji.

Příklad 2

Příprava chimerní protilátky chi220

K ovlivnění imunogenicity myší monoklonální protilátky protilidské 2.220, připravily se rekombinantní formy, ve kterých se proměnné oblasti fuzovaly k lidským stálým oblastem a srovnávala se jejich účinnost in vitro. Dva použité přístupy byly příprava chimerní protilátky, obsahující nezměněné myší proměnné oblasti a humanizované formy, ve kterých se myší hyperproměnné oblasti (CDRs) naštěpovaly na lidské rámcové sekvence v rámci proměnných oblastí. Chimerní protilátky si udržují vlastnosti vážící antigen, jako mají jejich mateřské protilátky, ale je u nich větší pravděpodobnost, že budou imunogenní. Je méně pravděpodobné, že humanizované protilátky budou imunogenní, ale mutace zavedené při humanizaci mohou ovlivnit vaznost antigenu.

A. Vytvoření a charakterizace in vitro chimerních a humanizovaných protilátek

Oblasti VL a VH anti-CD40 monoklonální protilátky 2.220 se získaly PCR. CDNA se připravila z RNA izolované z hybridomů expresujících 2.220 monoklonální protilátku za použití IgG1-specifického nebo C_K-specifického anti-sense primeru (primeru protismyslové orientace), aby se získaly oblasti VH nebo VL. Poly-G konec se přidal k těmto jednoduchým šroubovicím DNA. Proměnné oblasti se poté amplifikovaly PCR za použití jako sense primeru (primeru smyslové orientace) oligonukleotidu obsahujícího sekvenci poly-C komplementární k poly-G konci a hnízda antisense primerů (primerů protismyslové orientace). Produkt získaný PCR se potom vložil do bakteriálního vektoru za použití restrikčních míst zahrnutých v primerech. Vícenásobné klony se potom sekvenovaly dideoxynukleotidovým sekvenováním. Provedly se dva nezávislé pokusy, které začínaly ve fázi RNA

a získané sekvence byly stejné.

Pro přípravu chimerní formy protilátky se proměnné oblasti amplifikovaly PCR za použití primerů, které zavedly sekvenci, kódující signální sekvenci lidské protilátky, která byla zjištěna jako nejbližší spojená se sekvencí 2.220, jak ukazuje obrázek 4. Podtržené podíly sekvence proměnného lehkého řetězce (obrázek 4a) a sekvence proměnného těžkého řetězce (obrázek 4b) označují vložené signální sekvence lidské protilátky s nejbližší homologií k myši 2.220. Tyto produkty PCR se vložily do vektoru obsahujícího sekvence kódující stálé oblasti lidské kappa nebo lidské λ 1, aby vznikl kompletní lehký nebo těžký řetězec. Vektory rovněž obsahovaly vhodné geny rezistence na léčiva pro přípravu a amplifikaci stálých linií expresujících protein. Protein k iniciální charakterizaci se vytvořil přechodnou expresí z buněk COS, po které následovalo čištění proteinu A.

Pro příklad, linie buněk vytvářejících chimerní protilátku se vytvořily transfekcí buněk CHO DG44 s oddělenými vektory exprese pro lehké a těžké řetězce chimerní protilátky a vysokokopiová elektroporační metoda se použila k podpoře kointegrace. (Viz U.S. Patent 4956288). Těžké a lehké řetězce chi220 se klonovaly do vektorů pD17 a pD16 v tomto pořadí. Oba vektory jsou odvozeny od In Vitro plasmidu pcDNA3 a obsahují následující články (viz obrázek 12): (1) gen rezistence na neomycin z pcDNA3 se nahradil genem myši reduktázy dihydrofolátu (DHFR) za kontroly promotoru SV40 bez enhanceru (rovněž označovaném jako "oslabený DHFR"; stojí za povšimnutí, že pouze promotor byl oslaben, nikoli enzym DHFR - promotor bez enhanceru stále obsahuje SV40 původ replikace, a tak tyto vektory lze použít při přechodných COS transfekcích); (2) gen, o který jde, je expresován z CMV promotoru a signál pro polyadenylaci je z genu hovězího růstového hormonu; (3) kazeta exprese pro gen, o který jde, je obklopena sekvencemi pro ukončení transkripce (například 5' do promotoru a 3' do místa poly

A); (4) vektory obsahující dva odlišné polylinkery s restričními místy, jeden 3' k promotoru pro klonování genu, o který jde, a jeden 5' k promotoru pro linearizaci vektoru před transfekcí; (5) gen rezistence na ampicilin a ColE1 původ pro plasmidovou propagaci v E. coli.

Použité geny těžkého a lehkého řetězce byly genomové produkty s následujícími modifikacemi: (1) kódující sekvence pro signální peptid těžkého řetězce, proměnná oblast a CH1 doména byly přilehlé (neobsahovaly žádné introny) a (2) kódující sekvence pro signální peptid lehkého řetězce a proměnná oblast byly přilehlé.

Jiné vektory exprese, známé odborníkovi v oboru, které jsou schopné exprese chimerní protilátky, jsou předvídaný v poskytnutém vynálezu. Sekvence nukleových kyselin použitelná ve vektoru exprese, schopném exprese těžkého řetězce chimerní protilátky poskytnutého vynálezu je ukázána na obrázku 13; sekvence nukleových kyselin použitelná ve vektoru exprese, schopném exprese lehkého řetězce chimerní protilátky poskytnutého vynálezu je ukázána na obrázku 14.

Kompletní sekvence aminokyselin těžkého a lehkého řetězce chimerní protilátky ("chi220"), zahrnující proměnné a stálé oblasti, je uvedena níže (zvýrazněné aminokyseliny označují proměnný těžký a proměnný lehký řetězec):

Sekvence těžkého řetězce (SEQ ID NO:3)

QIQLVQSGPE	LKKPGETVRI	SCKASGYAFT	TTGMQWVQEM	PGKGLKWIGW	50
INTHSGVPKY	VEDFKGRFAF	SLETSANTAY	LQISNLKNED	TATYFCVRS	100
NGNYDLAYFA	YWGQGLTVTV	SAASTKGPSV	FPLAPSSKST	SGGTAALGCL	150
VKDYPPEPVT	VSWNSGALTS	GVHTFPAVLQ	SSGLYSLSSV	VTVPSSSLGT	200
QTYICNVNHK	PSNTKVDKKV	EPKSCDKTHT	CPPCPAPELL	GGPSVFLFPP	250
KPKDTLMISR	TPEVTCVVVD	VSHEDPEVKF	NWYVDGVEVH	NAKTKPREEQ	300
YNSTYRVVSV	LTVLHQDWLN	GKEYKCKVSN	KALPAPIEKT	ISKAKGQPRE	350
PQVYTLPPSR	DELTKNQVSL	TCLVKGFYPS	DIAVEWESNG	QPENNYKTT	400
PVLDSGDSFF	LYSKLTVDKS	RWQQGNVFSC	SVMHEALHNN	YTQKSLSLSP	450
GK					452

Sekvence lehkého řetězce (SEQ ID NO:4)

```

DIVLTQSPAT LSVTPGDRVS LSCRASQSI DYLHWYQQKS HESPRLLIKY 50
ASHSISGIPS RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGIYYCQH GHSFPWTFGG 100
GTKLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV 150
DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG 200
LSSPVTKSFN RGEN 214

```

Bylo připraveno několik humanizovaných forem 220. Tento proces zahrnuje identifikaci myších a lidských sekvencí zárodečných linií s nejbližší homologií k VH a VL doménám. Myší sekvence zárodečných linií se použily k identifikaci pravděpodobných lokací somatických mutací, které vznikly během procesu vyzrání afinity. Lidské sekvence se potom použily jako templaty a ty oblasti sekvence, u nichž je známo nebo se předpokládá, že jsou důležité ve vazebné specifitě, se nahradily v lidských sekvencích jak VH, tak VL. Struktury těchto sekvencí se potom modelovaly za použití jako templaty proteinu s nejbližší homologií, pro který se rozpustila krystalická struktura. Plasmidy kódující humanizované formy se připravily za použití PCR řízené mutagenese a použily se k přípravě protilátky přechodnou expresí z COS buněk. Zkoušky in vitro se provedly s chimerními a humanizovanými protilátkami poskytnutého vynálezu a jejich výsledky ukazují obrázek 5. Obrázek 5a ukazuje výsledky vazebné zkoušky testující vazbu chi220 a h220v3 na hCD40-mG2b ve zkoušce založené na metodě ELISA. Jamky destiček Immulon-2 se potahly hCD40-mG2b v koncentraci 10 ng/ml v PBS po dobu 2 hodin. Jamky byly blokovány vzorkovým rozpouštědlem (Genetic systems) a přidaly se protilátky v označených koncentracích. Následovala inkubace po dobu 1 hodiny, jamky se promyly, detekovala se přítomnost protilátky za použití IgG kozí protilidské protilátky značené peroxidázou. H220v3 je humanizovaná forma monoklonální protilátky 2.220. Hodnoty jsou průměrem ze dvojitých jamek a sloupce chyb představují

standartní odchylku.

Obrázek 5b ukazuje výsledky zkoušky testující inhibici kostimulace, zprostředkované sgp-39, lidských B-buněk s monoklonálními protilátkami proti lidským CD40. Lidské tonsilární B-buňky v klidové fázi (50000 na jamku) se inkubovaly s proteinem fuze sgp39, 20 µg/ml imunokuličkami (immunobeads) potaženými králičím protilidským IgM a označenými koncentracemi monoklonálními protilátkami proti CD40 nebo pouze mediem ke kontrole na destičkách s 96 jamkami. 72 hodin po iniciaci kultur se všechny jamky označily [³H]thymidinem na hodnotu 1 uCi na jamku a buňky se kultivovaly po dobu dalších 18 hodin. Buňky se potom sklídily a začleněný [³H]thymidin se měřil na počítači scintilace.

Na základě výsledků zkoušek in vitro (obrázky 5a a 5b, které ukazují, že jak chimerní, tak humanizovaná protilátka účinně vázala CD40 a inhibovala stimulaci B-buněk) byla pro další studii zvolena chimerní protilátka.

Příklad 3

Účinnost chi220

A. Chimerní monoklonální protilátka 2.220: Studie účinnosti v jedné dávce na primátech jiných než lidech.

Chi220 se hodnotila na opicích Cynomolgus z hlediska její schopnosti snižovat primární a sekundární humorální imunní odpovědi na antigeny dependentní na T-buňkách. V jedné studii se skupiny čtyř opic imunizovaly ovčími erythrocyty (SRBCs) a dostaly ovalbumin (OVA) k sekundární imunizaci těsně před podáním jedné intravenózní bolusové dávky buď chi220 v dávce 10, 40 nebo 100 mg/kg nebo sterilního roztoku soli pufrované fosforečnanem (PBS) jako kontroly. Bylo pozorováno významné snížení primární humorální imunní odpovědi na SRBCs ve všech třech dávkách, což demonstruje účinnost chi220 u primátů. Byla pozorována

přechodná, na dávce závislá deplece periferních B-buněk u všech opic, léčených chi220 a doba, po kterou se B-buňky dostaly zpět na původní hladinu, rovněž závisela na dávce. Ve dvou nejvyšších dávkách byly pozorovány přechodné mírné poklesy průměrného absolutního počtu periferních T-buněk. Byly také pozorovány přechodné minimální poklesy hladin IgM v séru, ale žádné změny hladin IgG nebo IgA v séru, spojené s podáváním léčiva.

Pro hodnocení indukce imunní tolerance a reversibility imunosupresivní účinnosti se všechny opice imunizovaly OVA, SRBCs a neoantigenem, keyhole limpet hemocyanin (KLH) ve 149. dnu, když sérové hladiny chi220 ve skupině s dávkou 100 mg/kg byly již pod hladinami, o nichž se předpokládá, že jsou imunosupresivní (přibližně 10 µg/ml) a počty periferních B-buněk se vrátily na hladiny před podáním dávky. Anti-SRBC odpověď při nejnižší dávce byla všeobecně srovnatelná s primární anti-SRBC protilátkovou odpovědí u kontrolních opic. Protilátková odpověď na SRBC byla nicméně stále částečně nebo významně snížena u opic léčených dvěma vyššími dávkami.

K dalšímu prozkoumání závislosti imunosuprese a deplece B-buněk na dávce se provedla druhá studie, ve které se další opice (čtyři na skupinu) imunizovaly SRBCs a poté se jim dala chi220 v jedné dávce 0,1 nebo 1,0 mg/kg nebo PBS. Suboptimální imunosuprese protilátkové odpovědi na SRBCs byla pozorována u obou dávek. Mírná deplece periferních B-buněk byla evidentní u opic, které dostaly dávku 1,0 mg/kg chi220 k 8. dni a vrátila se na původní hladinu k 29. dni. Při dávce 0,1 mg/kg byl pozorován pokles průměrného počtu a procentuálního zastoupení periferních B-buněk, ale hodnoty nebyly mimo normální rozmezí procentuálního zastoupení B-buněk. Pro absolutní počty periferních B-buněk nebyly dosud stanoveny limity. U opic, které dostaly dávku 1 mg/kg chi220, byly pozorovány přechodné minimální poklesy počtu periferních T-buněk a mírné poklesy v proliferaci T-buněk ex vivo. A konečně

nebyla prokázána aktivace komplementu ani změny v sérových hladinách IL-6 nebo TNF α , spojené s podáváním léčiva.

Aktivace T-buněk ex vivo, aktivace komplementu a hladiny cytokinů v séru se nehodnotily u opic, které dostaly dávku 10, 40 nebo 100 mg/kg chi220.

V obou studiích se zkoušely vzorky séra po podání chi220 na hladiny testované látky v oběhu a na hodnocení tvorby protilátky proti ní. Farmakokinetická analýza ukázala, že průměrná maximální koncentrace v séru (C_{max}) chi220 nerostla proporcionálně v závislosti na dávce a že biologický poločas chi220 se prodloužil při zvýšení podané dávky. Bylo zjištěno, že chi220 je imunogenní při podání v dávkách 0,1, 1 nebo 10 mg/kg. Při koncentracích v oběhu nad 10 μ g/ml se zdá, že chi220 může snížit protilátkovou odpověď zaměřenou proti ní.

1. Protokol experimentu

V zahajovací studii, která byla zmíněna výše, se přidělily opice Cynomolgus do čtyř skupin, skládajících se ze dvou samců a dvou samic. Všechny opice se 28 dní před podáním chi220 nebo kontroly imunizovaly OVA (5 mg/kg intramuskulárně a 10 mg/kg subkutánně). 1. den se všechny opice imunizovaly SRBCs (1,7 ml/kg 10% suspenze intravenózně) a druhou imunizaci OVA dostaly (5 mg/kg intramuskulárně a 10 mg/kg subkutánně) těsně před podáním jedné intravenózní bolusové dávky buď chi220 v dávkách 10, 40 nebo 100 mg/kg nebo sterilního PBS jako kontroly. Ve 149. dnu, poté co hladiny chi220 v séru poklesly pod domněle imunosupresivní hladiny (přibližně 10 μ g/ml) a hodnoty periferních B-buněk se navrátily na hladiny před podáním dávky ve všech skupinách, se opice imunizovaly OVA, SRBCs a KLH (10 mg/zvíře intramuskulárně). Cílem imunizace KLH bylo ukázat, že opice jsou schopny zahájit imunní odpověď na neoantigen poté, co byly léčeny chi220.

S cílem demonstrovat lepší závislost odpovědi na dávce

u imunosuprese a deplece periferních B-buněk, další opice se v druhé studii (dvě jednoho pohlaví na skupinu) imunizovaly SRBCs a poté dostaly jednu dávku buď chi220 v dávce 0,1 nebo 1,0 mg/kg nebo PBS jako kontrola v 1. dni. Monitorovaly se hematologické parametry a subpopulace lymfocytů periferní krve ve zvolených časech během obou studií. Monitorovaly se sérové chemické parametry u opic, které dostaly dávky chi220 10, 40, nebo 100 mg/kg, ale tyto parametry se nemonitorovaly u opic, které dostaly dávky 0,1 nebo 1,0 mg/kg, protože ve vyšších dávkách nebyla zjištěna žádná pozorování se vztahem k léčivu. Kromě toho se měřily hladiny IgM, IgG a IgA a chi220 v séru. Pro hodnocení účinnosti se zjišťovala tvorba specifických IgM a IgG protilátek proti SRBC a OVA imunogenům ve vhodných vzorcích séra získaných těsně před aplikací imunogenu a po týdnech poté. Tvorba specifických IgM a IgG protilátek proti testované látce u opic, kterým byla aplikována chi220, se měřila před podáním testované látky v 1. dni a po týdnech poté. Při porovnávání protilátkové odpovědi skupinami se použily geometrické průměry titrovaných hodnot. Kromě toho se měřily celková hemolytická aktivita komplementu (CH_{50}) a hodnoty C4d fragmentu a hodnoty TNF- α a IL-6 se určovaly u opic, které dostaly dávky 0,1 nebo 1 mg/kg chi220 ve zvolených časech po podání chi220. Aktivace ex vivo T-buněk periferní krve se rovněž hodnotila po stimulaci konkanavalinem A u opic, které dostaly dávky 0,1 nebo 1 mg/kg chi220 v 17. a 31. dni, aby se hodnotily účinky chi220 na odpověď T-buněk na mitogen. Konečně byly všechny opice pozorovány z hlediska klinických známek toxicity, tělesná hmotnost se zaznamenávala týdně a spotřeba potravy denně.

Opice se imunizovaly SRBC před podáním nosiče nebo chi220 v dávce 10, 40 nebo 100 mg/kg (obrázek 6a) nebo chi220 v dávce 0,1 nebo 1 mg/kg (obrázek 6b) v 1. dni. Vzorky séra se analyzovaly na IgM protilátky proti SRBC pomocí ELISA. Data jsou vyjádřena jako geometrický průměr

konečného titru (end-point titer - EPT) anti-SRBC protilátky pro každou skupinu (n=2 [100 mg/kg po 15 dnech] nebo 4), kde EPT je ekvivalentní reciproční hodnotě nejvyššího zředění séra s absorbancí větší než dvojnásobek průměru pozadí destičky.

2. Výsledky

a. Protilátková odpověď proti SRBC

Při podání opicím v dávkách 10, 40 nebo 100 mg/kg byla chi220 účinná k významnému snížení primární protilátkové odpovědi proti SRBCs. Ve dni s nejvyšší hladinou primární protilátkové IgM odpovědi proti SRBC (8. den), průměrná primární protilátková IgM odpověď proti SRBC se snížila přibližně o 92 až 94 % u opic, léčených chi220 v dávkách 10, 40 nebo 100 mg/kg ve srovnání s kontrolou (obrázek 6a). Průměrná protilátková IgM odpověď proti SRBC ve skupině se nestala pozitivní v průběhu 85. dne při dávkách 10, 40 nebo 100 mg/kg. Ve dni s nejvyšší hladinou primární protilátkové IgG odpovědi proti SRBC (15. den), průměrná primární protilátková IgG odpověď proti SRBC se snížila o 98 až 99 a 85 % u opic, léčených chi220 v dávkách 10, 40 nebo 100 mg/kg v tomto pořadí ve srovnání s kontrolou (obrázek 7a). Vyšší celkové titry protilátky proti SRBC před podáním dávky mohly způsobit zjevnou absenci závislosti imunosuprese na dávce. Celkově, u opic léčených chi220 v dávce 10 nebo 100 mg/kg se nezvyšovala primární protilátková IgG odpověď proti SRBC až do 85. dne. Nicméně dvě opice léčené chi220 v dávce 40 mg/kg měly opožděnou primární protilátkovou IgG odpověď proti SRBC (srovnatelnou s velikostí kontrolní odpovědi), která se stala pozitivní k 31. dni a měla vrchol v 51. dni.

149. den, poté, co hladiny chi220 poklesly pod údajně imunosupresivní hodnoty (přibližně 10 µg/ml) a hladiny B-buněk v periferní krvi se ve všech skupinách vrátily na původní úroveň, se opice podruhé imunizovaly SRBCs. Jak se

předpokládalo, u kontrolních opic se zvýšila silná sekundární protilátková IgG odpověď proti SRBCs.

Opice léčené chi220 v dávce 10 mg/kg vykazovaly primární IgM a IgG protilátkové odpovědi na SRBCs všeobecně srovnatelné s primární odpovědí u kontrolních opic. Protilátková odpověď na SRBCs byla nicméně stále částečně snížena při dávce 40 mg/kg a významně snížena při dávce 100 mg/kg. Ačkoli se u dvou opic léčených chi220 v dávce 40 mg/kg, které předtím vykazaly slabé primární protilátkové odpovědi na SRBC, vytvořily titry IgM a IgG protilátek proti SRBC charakteristické pro sekundární protilátkovou odpověď, protilátkové odpovědi proti SRBC u ostatních dvou opic této skupiny a u zbylých opic léčených chi220 v dávce 100 mg/kg byly stále sníženy přibližně o 90 % ve srovnání s průměrem primární protilátkové odpovědi proti SRBC u kontrolních opic.

Suboptimální imunosuprese protilátkové odpovědi na SRBC byla pozorována po podání 0,1 nebo 1,0 mg/kg chi220 (obrázky 6b a 7b). Zatímco všechny opice léčené chi220 vykazaly pozitivní IgM protilátkovou odpověď a SRBC antigen, celkový průměrný vrchol IgM protilátkové odpovědi proti SRBC se snížil přibližně o 56 % u opic léčených chi220 v dávce 1 mg/kg ve srovnání s průměrným vrcholem kontrolní odpovědi. U opic léčených chi220 v dávce 0,1 mg/kg nebylo pozorováno žádné snížení protilátkové odpovědi na SRBC. Průměrná IgM protilátková odpověď na SRBC dosáhla vrcholu 15. den u kontrolních opic a 8. den u opic, které dostaly 0,1 a 1,0 mg/kg chi220. Celkově se průměrný vrchol IgG protilátkové odpovědi proti SRBC snížil přibližně o 56 % a 42 % u opic léčených chi220 v dávce 0,1 a 1,0 mg/kg v daném pořadí. Průměrná IgG protilátková odpověď na SRBC dosáhla vrcholu 15. den u kontrolních opic a u opic, léčených 1 mg/kg chi220 a 8. den u opic, které dostaly 0,1 mg/kg chi220.

b. Protilátková odpověď proti OVA

Opicím se 1. den podala intravenózní dávka 10, 40 nebo 100 mg/kg chi220. Navíc se všechny opice imunizovaly OVA 28., 1. a 149. den. Vzorky séra se analyzovaly na IgM (obrázek 8a) nebo IgG (obrázek 8b) protilátky proti OVA. Údaje jsou vyjádřeny jako geometrický průměr konečných titrů (EPT) protilátek proti OVA pro každou skupinu ($n=2$ [100 mg/kg po 15 dnech] nebo 4), kde EPT jsou ekvivalentní reciproční hodnotě nejvyššího zředění séra s absorbancí větší než dvojnásobek průměru pozadí destičky.

Tvorba specifických IgM a IgG protilátek proti OVA se monitorovala týdně během studie u opic, které dostaly chi220 v dávkách 10, 40 nebo 100 mg/kg. Primární a sekundární protilátkové odpovědi proti OVA byly velmi proměnlivé a u všech opic všeobecně slabé. (obrázek 8). Opice, kterým se podala chi220 1. den, měly větší titry protilátky proti OVA než opice v kontrolní skupině.

149. den dostaly opice terciární imunizaci OVA. Všechny opice vykazaly pozitivní IgG protilátkové odpovědi na OVA během 7 dnů po imunizaci. Kontrolní opice a opice léčené chi220 v dávce 10 mg/kg měly titry protilátek charakteristické pro terciární protilátkovou odpověď, zatímco opice léčené chi220 v dávce 40 nebo 100 mg/kg měly titry protilátek více charakteristické pro sekundární protilátkovou odpověď.

c. Protilátková odpověď proti KLH

Opicím se 1. den podala intravenózní dávka 10, 40 nebo 100 mg/kg chi220. Navíc se všechny opice imunizovaly KLH 149. den. Vzorky séra se analyzovaly na IgM (obrázek 9a) nebo IgG (obrázek 9b) protilátky proti KLH. Údaje jsou vyjádřeny jako geometrický průměr konečných titrů (EPT) protilátek proti KLH pro každou skupinu ($n=2$ [100 mg/kg po 15 dnech] nebo 4), kde EPT jsou ekvivalentní reciproční hodnotě nejvyššího zředění séra s absorbancí větší než dvojnásobek průměru pozadí destičky.

Ve 149. dnu, poté co hladiny chi220 v séru poklesly pod domněle imunosupresivní hladiny (přibližně 10 $\mu\text{g/ml}$) a hodnoty periferních B-buněk se navrátily na hladiny před podáním dávky ve všech skupinách, se opice imunizovaly KLH (10 mg/zvíře intramuskulárně). Všechny opice vykázaly pozitivní IgM a IgG protilátkové odpovědi na KLH, což ukazuje, že schopnost imunní odpovědi na nový antigen poté nebyla oslabena.

d. Sérové hladiny testovací látky a protilátkové odpovědi proti testovací látce

Vzorky séra se zkoušely po podání chi220, aby se určily hladiny cirkulující testovací látky a hodnotila tvorba protilátky proti ní. Maximální koncentrace chi220 v séru (C_{max}) se objevila tři minuty po podání dávky 10 nebo 40 mg/kg a šest hodin po podání dávky 100 mg/kg. Hodnoty C_{max} chi220 byly 329, 2429 a 2343 $\mu\text{g/ml}$ u opic léčených dávkami 10, 40 nebo 100 mg/kg. Významná variabilita se nicméně objevila u jednotlivých opic ve skupinách léčených dávkami 40 a 100 mg/kg. Průměrný poločas chi220 v séru byl odhadnut přibližně na 114, 173 a 315 hodin u opic léčených dávkami 10, 40 nebo 100 mg/kg.

Průměrné hodnoty C_{max} tři minuty po podání chi220 byly 1,77 a 33 $\mu\text{g/ml}$ pro dávky 0,1 a 1 mg/kg v tomto pořadí. Nebyly pozorovány žádné rozdíly sérových hladin chi220 v závislosti na pohlaví při žádné dávce. Průměrné hodnoty AUC_{inf} byly 15,5 a 847 $\mu\text{g.h/ml}$ pro dávky 0,1 a 1 mg/kg v tomto pořadí. Shrnutí, výsledky studií ukazují, že poločas chi220 se prodlužuje se zvyšující se dávkou. Navíc se zdá, že C_{max} chi220 roste nerovnoměrně s rostoucí dávkou.

Ačkoli IgM odpověď na testovací látku u opic, kterým se podala dávka 10, 40 nebo 100 mg/kg chi220, byla minimální nebo chyběla vůbec, byla pozorována významná IgG odpověď na testovací látku u opic, kterým se podala dávka 10 mg/kg chi220. Průměrná IgG odpověď na testovací látku u opic,

25.07.01

kterým se podala dávka 10 mg/kg chi220, byla pozitivní 29. den, přibližně 1 týden poté, co průměrná koncentrace chi220 v séru poklesla pod hodnotu 10 $\mu\text{g/ml}$ a dosáhla vrcholu ve 36. a 43. dnu při titru o geometrickém průměru 12,627. Výskyt IgG protilátek proti testovací látce u opic, kterým se podala dávka 10 mg/kg chi220 se rovněž shodoval s prvním detekovatelným nárůstem počtu B-buněk následujícím po depleci. Až do posledního dne měření (149. dne) opice, kterým se podala dávka 40 nebo 100 mg/kg chi220, stále nevykázaly pozitivní protilátkovou odpověď proti chi220, ačkoli průměrné sérové hladiny chi220 byly nižší než 10 $\mu\text{g/ml}$ do 57. dne (u skupiny, která dostala 40 mg/kg) nebo do 92. dne (u skupiny, která dostala 100 mg/kg).

Chi220 byla imunogenní při podání v dávce 0,1 nebo 1 mg/kg. Tři ze čtyř opic, kterým se podala dávka 0,1 nebo 1 mg/kg chi220, měly do 15. dne studie slabě pozitivní IgM protilátkovou odpověď proti testovací látce. Tři ze čtyř opic, kterým se podala dávka 1 mg/kg chi220, měly do 22. dne studie významnou IgG protilátkovou odpověď proti testovací látce, která dosáhla vrcholu při titru o výsledném geometrickém průměru 16,618. Celkově vzato, geometrický průměr IgG protilátkové odpovědi na testovací látku nebyl pozitivní u opic, kterým se podala dávka 0,1 mg/kg chi220 a pouze jedna opice které se podala dávka 0,1 mg/kg chi220, měla slabě pozitivní IgG protilátkovou odpověď na testovací látku, která dosáhla vrcholu 22. den při konečném titru 2430. Shrnutí, tyto údaje naznačují, že chi220 je schopna imunosuprese protilátkové odpovědi proti ní při hladinách v séru větších než přibližně 10 $\mu\text{g/ml}$.

Příklad 4

Příprava humanizovaných protilátek F4 a L3.17 proti CD40

Pro humanizaci monoklonálních protilátek se použila řada způsobů známých v oboru. Přístupy založené na struktuře

se ukázaly jako užitečné, ale komplexnost, která vychází z vysokého počtu rámcových zbytků potenciálně se účastnících vazebné aktivity snižuje míru úspěšnosti. Spíše než předvídání optimálního rámce založeného na modelování umožňuje identifikaci aktivních konformací rámce založené na skreeningu početných kombinací přístup knihovny protilátek, který je popsán níže. Přístupy mutagenetické spojené do způsobů výběru umožňují analýzu mnoha variant a mimiky v procesu maturace in vivo (shrnutých v Marks J. D. a kol., J. Biol. Chem. 267, 16007 - 16010 (1992). Mutageneze založená na kodonu umožňuje vytvoření knihoven které charakterizují příspěvek specifických zbytků a takto je účinnější než přístupy náhodné mutageneze. Například vysokokontrolovaná PCR nemůže být použita k syntéze knihoven kombinatorních rámců, popsané níže. Kromě toho náhodná mutageneze vytváří větší a rozmanitější knihovny a naneštěstí většina mutací nezvyšuje vazebnou aktivitu monoklonální protilátky. V důsledku toho musí projít screeningem větší počet klonů, aby se identifikovaly aktivní varianty.

Strategie nazvaná "řízený výběr" se použila k izolaci lidské monoklonální protilátky z fágové knihovny v procesu, sestávajícím ze dvou kroků, který používá hlodavčí monoklonální protilátku jako templát (Jespers L. S. a kol., Bio/Technology 12, 899 - 903 (1994). Nedávno byla popsána variace řízeného výběru používající technologie využívající fágových knihoven, ve které se použil chimerní Fd fragment k výběru L řetězce z knihovny obsahující lidské L řetězce s naštěpovaným myším CDR3 (Rader C. a kol., Proc Natl. Acad. Sci. USA 95, 8910 - 8915 (1998). Následně se použil nejaktivnější L řetězec k výběru H řetězce z knihovny lidských H řetězců obsahující myší HCDR3. Monoklonální protilátky izolované těmito přístupy jsou výhradně lidské (Jespers, viz výše) nebo většinou lidské (Rader, viz výše), ale značná rozmanitost protilátek, která vzniká v každém kroku procesu, způsobuje nutnost použití způsobů zvyšujících

25.07.01

afinitu.

Využily se následující materiály a postupy k přípravě humanizovaných protilátek poskytnutého vynálezu F4 a L3.17 proti CD40:

1. Příprava chimerní protilátky proti CD40

Připravily se a purifikovaly překrývající oligonukleotidy kódující VH a VL (69 - 75 bazí na délku) na základě sekvence myší monoklonální protilátky 2.220 proti CD40. Proměnné H a L domény se syntetizovaly odděleně kombinováním 25 pmol každého z překrývajících se oligonukleotidů s *Pfu* DNA polymerázou (Stratagene) v 50 μ l PCR reakci skládající se z 5 cyklů: denaturace při teplotě 94°C po dobu 20 sekund, chlazení při teplotě 50°C po dobu 30 sekund, dosažení teploty 72°C během 1 minuty a udržování při teplotě 72°C po dobu 30 sekund. Následně se chladicí teplota zvýšila na 55 °C v 25 cyklech. Reversní primer a biotinem značený forward primer se použily, aby se dále amplifikoval 1 μ l fuzního produktu v 100 μ l PCR reakci za použití stejného postupu. Produkty se čistily elektroforézou na agarozovém gelu, podrobily se elektroeluci a fosforylaci pomocí T4 polynukleotidové kinázy (Boehringer Mannheim) a poté se inkubovaly s streptavidinovými magnetickými kuličkami (Boehringer Mannheim) v 5 mM Tris-Cl o pH 7,5, 0,5 mM EDTA, 1 M NaCl a 0,05% Tweenem 20 při teplotě 25°C po dobu 15 minut. Kuličky se promyly a minusová vlákna DNA neznačená biotinem se vymyla inkubací s 0,15 M NaOH při teplotě 25°C po dobu 10 minut. Chimerní anti-CD40 FAB se syntetizovala v modifikovaném M13IX104 vektoru (Kristensson K. a kol., Vaccines 95, 39 - 43 Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, (1995), pojmenovaném M13IX104CS, cestou hybridizační mutageneze (Rosok M. J. a kol., J. Biol. Chem. 271, 22611 - 22618 (1996); Kunkel T. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 488 - 492 (1985) za použití VH a VL oligonukleotidů ve trojnásobném molárním nadbytku uridinylátovaných vektorových templátů. Vektor M13IX104 se modifikoval výměnou cysteinových zbytků na konci

25.07.01

kappa a τ 1 stálých oblastí za serin. Reakce byla elektroporována do DH10B buněk a titrována na buňkách of XL-1 Blue.

2. Příprava kombinatorního rámce a knihoven rámeč/CDR3

Knihovna kombinatorních rámců (Hu I) se syntetizovala stejným způsobem, použitým k přípravě chimerní anti-CD40 s modifikacemi. Syntetizovaly se překrývající se oligonukleotidy kódující rámcové oblasti H a L proměnných domén lidského templátu a myších anti-CD40 CDRs jak je definoval Kabat a kol. (Kabat E.A. a kol., Sequences of proteins of immunological interest 5.vydání, (1991). Washington DC: United States department of Health and Human Services; Kabat E.A. a kol., J. Biol. Chem. 252, 6609 - 6616 (1977). Připravily se degenerované oligonukleotidy kódující jak myší tak lidské aminokyseliny na sedmi VH a jedné VK rámcové pozici (obrázek 15, zbytky označeny hvězdičkou).

Knihovny rámeč/HCDR3 (Hu II) a rámeč/HCDR3/LCDR3 (Hu III) se syntetizovaly stejným způsobem jako knihovna kombinatorních rámců s modifikacemi. Zbytky CDR vybrané pro mutagenезi byly: Ser⁹⁵-Tyr¹⁰² v HCDR3 a Gln⁸⁹-Thr⁹⁷ v LCDR3 (obrázek 15, podtrženo). Oligonukleotidy kódující HCDR3 a LCDR3 se označily pro přeměnu jednoduchého CDR zbytku a syntetizovaly se zavedením NN(G/T) v každé pozici, jak je v oboru popsáno (Glaser S. M. a kol., J. Immunol. 149, 3903 - 3913 (1992). Překrývající se oligonukleotidy kódující myší CDRs z knihovny rámců a ty, které nejsou z knihovny rámců se zkombinovaly s 25 pmol oligonukleotidů kódujících mutované HCDR3 nebo s 25 pmol každého z oligonukleotidů kódujících mutované HCDR3 a LCDR3.

3. Screening fágových expresních knihoven

Hu II a Hu III se nejprve vyhledaly modifikovaným

plakovým přístupem známým v oboru, pojmenovaným capture lift (Watkins J. D. a kol., Anal. Biochem. 256, 169 - 177 (1998)). Ve stručnosti, nitrocelulókové filtry (82-mm) se potahly kozí protilidskou kappa, obsadily 1% BSA a nasadily na agarovou destičku obsahující fágy infikované bakteriální buňky. V zahajovacím screeningu se fágy vysazovaly při hustotě 10^5 fágů na 100mm destičku. Po zachycení fágů expresovaných anti-CD40 variant FAB se filtry inkubovaly po dobu 3 hodin při teplotě 25 °C s 5 ng/ml anti-CD40-Ig v PBS obsahujícím 1 % BSA. Filtry se promyly čtyřikrát PBS, obsahujícím 0,1 % Tweenu 20 a inkubovaly se kozím protimýším IgG_{2b}-alkalickým fosfatázovým konjugátem (Southern Biotechnology) zředěným 3000-krát v PBS obsahujícím 1 % BSA po dobu 1 hodiny při teplotě 25 °C. Filtry se čtyřikrát promyly PBS obsahujícím 0,1 % Tweenu 20 a vyvolaly postupem popsaným Watkinsem (1998), viz výše. K izolaci individuálních klonů, se pozitivní plaky ze zahajovacího screeningu vybraly a vysadily s nižší hustotou (10^3 fágů na 100mm destičku) a vyhledávaly se stejným způsobem.

Hu I kombinatorní knihovna se nejprve prozkoumávala metodou ELISA, která umožňuje rychlé zhodnocení relativních afinit variant (Watkins J. D. a kol., Anal Biochem. 253, 37 - 45 (1997)). Kromě toho se ELISA použila k charakterizaci klonů, identifikovaných screeningem metodou capture lift. Ve stručnosti, mikrotitrační destičky se potahly 5 µg/ml kozí protilidské kappa (Southern Biotechnology) a blokovaly 3% BSA v PBS. Dále se 50 µl FAB ze supernatantu kultury Escherichia coli nebo z buněčného lyzátu inkubovala na destičce po dobu 1 hodiny při teplotě 25 °C, destička se promyla třikrát PBS obsahujícím 0,1 % Tweenu 20 a 0,1 µg/ml CD40-Ig v PBS obsahujícím 1 % BSA po dobu 2 hodin při teplotě 25 °C. Destička se promyla třikrát PBS, obsahujícím 0,1 % Tweenu 20 a přidal se kozí protimýší IgG_{2b}-alkalický fosfatázový konjugát zředěný 3000-krát v PBS obsahujícím 1 % BSA po dobu 1 hodiny při teplotě 25 °C. Destička se třikrát promyla PBS obsahujícím 0,1 % Tweenu 20 a vyvolala

postupem popsaným Watkinsem (1997), viz výše.

4. Sekvenování DNA

Jednoduchá šroubovice DNA se izolovala a geny proměnných oblastí H a L řetězců humanizovaných protilátek poskytnutého vynálezu se sekvenovaly metodou fluorescenční dideoxynukleotidové terminace (Perkin - Elmer, Foster City, CA).

Sekvence nukleových kyselin (SEQ ID NO:7)

a aminokyselin (SEQ ID NO:8) proměnného lehkého řetězce humanizované protilátky F4 je následující:

GAA	ATT	GTG	TTG	ACA	CAG	TCT	CCA	GCC	ACC	CTG	TCT	TTG	TCT	42
E	I	V	L	T	Q	S	P	A	T	L	S	L	S	14
CCA	GGG	GAA	AGA	GCC	ACC	CTC	TCC	TGC	AGG	GCC	AGT	CAG	AGT	84
P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	Q	S	28
ATT	AGC	GAT	TAC	TTA	CAT	TGG	TAC	CAA	CAG	AAA	CCT	GGC	CAG	126
I	S	D	Y	L	H	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	42
GCT	CCC	AGG	CTC	CTC	ATC	TAT	TAC	GCA	TCC	CAC	TCC	ATC	TCT	168
A	P	R	L	L	I	Y	Y	A	S	H	S	I	S	56
GGC	ATC	CCA	GCC	AGG	TTC	AGT	GGC	AGT	GGG	TCT	GGG	ACA	GAC	210
G	I	P	A	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	70
TTC	ACT	CTC	ACC	ATC	AGC	AGC	CTA	GAG	CCT	GAA	GAT	TTT	GCA	252
F	T	L	T	I	S	S	L	E	P	E	D	F	A	84
GTT	TAT	TAC	TGT	CAG	CAT	GGC	CAC	TCT	TTT	CCT	TGG	ACC	TTC	294
V	Y	Y	C	Q	H	G	H	S	F	P	W	T	F	98
GGA	GGG	GGG	ACC	AAG	GTG	GAA	ATT	AAA						321
G	G	G	T	K	V	E	I	K						107

Sekvence nukleových kyselin (SEQ ID NO:9)

a aminokyselin (SEQ ID NO:10) proměnného těžkého řetězce humanizovaných protilátek F4 a 13.17 je následující:

CAG	GTG	CAG	CTG	GTG	CAA	TCT	GGG	TCT	GAG	TTG	AAG	AAG	CCT	42
Q	V	Q	L	V	Q	S	G	S	E	L	K	K	P	14
GGG	GCC	TCA	GTG	AAG	GTT	TCC	TGC	AAG	GCT	TCT	GGA	TAC	GCC	84
G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	A	28

25.07.01

TTC	ACT	ACC	ACT	GGC	ATG	CAG	TGG	GTG	CGA	CAG	GCC	CCT	GGA	126
F	T	T	T	G	M	Q	W	V	R	Q	A	P	G	42
CAA	GGG	CTT	GAG	TGG	ATG	GGA	TGG	ATC	AAC	ACC	CAC	AGC	GGG	168
Q	G	L	E	W	M	G	W	I	N	T	H	S	G	56
GTC	CCA	AAG	TAT	GTC	GAG	GAC	TTC	AAA	GGA	CGG	TTT	GTC	TTC	210
V	P	K	Y	V	E	D	F	K	G	R	F	V	F	70
TCC	TTG	GAC	ACC	TCT	GTC	AGC	ACG	GCA	TAT	CTG	CAG	ATC	AGC	252
S	L	D	T	S	V	S	T	A	Y	L	Q	I	S	84
AGC	CTA	AAG	GCT	GAG	GAC	ACT	GCC	GTG	TAT	TAC	TGT	GCG	AGA	294
S	L	K	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	98
TCT	GGC	AAT	GGG	AAC	TAT	GAC	CTG	GCA	TAC	TTT	AAG	TAT	TGG	336
S	G	N	G	N	Y	D	L	A	Y	F	K	Y	W	112
GGC	CAG	GGA	ACC	CTG	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA					366
G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S					122

Sekvence nukleových kyselin (SEQ ID NO:11)
a aminokyselin (SEQ ID NO:12) proměnného lehkého řetězce
humanizované protilátky L3.17 je následující:

GAA	ATT	GTG	TTG	ACA	CAG	TCT	CCA	GCC	ACC	CTG	TCT	TTG	TCT	42
E	I	V	L	T	Q	S	P	A	T	L	S	L	S	14
CCA	GGG	GAA	AGA	GCC	ACC	CTC	TCC	TGC	AGG	GCC	AGT	CAG	AGT	84
P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	Q	S	28
ATT	AGC	GAT	TAC	TTA	CAT	TGG	TAC	CAA	CAG	AAA	CCT	GGC	CAG	126
I	S	D	Y	L	H	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	42
GCT	CCC	AGG	CTC	CTC	ATC	TAT	TAC	GCA	TCC	CAC	TCC	ATC	TCT	168
A	P	R	L	L	I	Y	Y	A	S	H	S	I	S	56
GGC	ATC	CCA	GCC	AGG	TTC	AGT	GGC	AGT	GGG	TCT	GGG	ACA	GAC	210
G	I	P	A	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	70
TTC	ACT	CTC	ACC	ACT	AGC	AGC	CTA	GAG	CCT	GAA	GAT	TTT	GCA	252
F	T	L	T	I	S	S	L	E	P	E	D	F	A	84
GTT	TAT	TAC	TGT	CAG	CAT	GGC	CAC	TCT	TAT	CCT	TGG	ACC	TTC	294
V	Y	Y	C	Q	H	G	H	S	Y	P	W	T	F	98
GGA	GGG	GGG	ACC	AAG	GTG	GAA	ATT	AAA						321
G	G	G	T	K	V	E	I	K						107

5. Exprese a čištění FAB

Některé FAB se klonovaly do vektoru exprese pod kontrolou arabinosou-regulovaného BAD promotoru. Kromě toho se smyčka šesti histidinů fuzovala ke karboxylovému konci H řetězce, aby se umožnilo čištění nikl-chelátujícími pryskyřicemi. Čištěná FAB se kvantifikovala, jak je popsáno Watkinsem (1997), viz výše.

6. Charakterizační zkoušky

Mikrotitrační destičky Immulon II se potahly 0,1 µg/ml CD40-Ig v PBS obsahujícím 1 % BSA po dobu 16 hodin při teplotě 4 °C a blokovaly se 3% BSA v PBS. Destičky se promyly třikrát PBS, obsahujícím 0,1 % Tweenu 20 a FAB uvolněná z periplasmatického prostoru se zředila seriově trojnásobně v PBS, obsahujícím 1 % BSA a inkubovala s destičkou po dobu 2 hodin při teplotě 25 °C. Potom se destička promyla čtyřikrát PBS, obsahujícím 0,1 % Tweenu 20 a navázání protilátky se detekovalo inkubací s kozím protimyším IgG_{2b}-alkalickým fosfatázovým konjugátem zředěným 2000-krát v PBS obsahujícím 1 % BSA po dobu 1 hodiny při teplotě 25 °C. Destička se čtyřikrát promyla PBS obsahujícím 0,1 % Tweenu 20 a vyvolala kolorimetricky (Watkins (1997), viz výše).

Pro testování variant na inhibici navázání ligandu se mikrotitrační destičky Immulon II potáhly 2 µg/ml protimyší CD8 k zachycení proteinu fuze sgp39, který expresuje CD8 doménu. Destičky se propláchly jednou PBS obsahujícím 0,05 % Tweenu 20 a blokovaly 3 % BSA v PBS. Destička se jednou promyla PBS obsahujícím 0,05 % Tweenu 20 a inkubovala médiem buněčné kultury obsahujícím nasycené hladiny sgp39 po dobu 2 hodin při teplotě 25 °C. Nenavázaný sgp39 se odsál a destička se dvakrát promyla PBS obsahujícím 0,05 % Tweenu 20. Potom se přidalo 25 µl čištěné varianty FAB zředěné seiově 3-krát v PBS a potom 25 µl roztoku 4 µg/ml

CD40-lidský Ig v PBS. Destičky se inkubovaly po dobu 2 hodin při teplotě 25 °C a potom třikrát promyly PBS obsahujícím 0,05 % Tweenu 20. Navázaný CD40-Ig se detekoval po 1-hodinové inkubaci při 25 °C s kozím F(ab')₂ protilidským IgG Fcγ-specifickým křenovým peroxidázovým konjugátem (Jackson) zředěným 10000-krát v PBS. Destička se čtyřikrát promyla PBS obsahujícím 0,05 % Tweenu 20 a vazba se kvantifikovala kolorimetricky inkubací s roztokem 1 mg/ml orto-fenylendiamidihydrochloridu a 0,003% peroxidem vodíku v 50 mM kyseliny citronové, 100 mM hydrogenfosforečnanu sodného o pH 5. Reakce se ukončila přidáním kyseliny sírové do konečné koncentrace 0,36 M a určila se absorbance při 490 nm.

7. Analýza BIAcore

Konstanty kinetiky interakce mezi CD40 a anti-CD40 variantami se určily pomocí resonance plasmonového povrchu (BIAcore). Fuzní protein CD40-Ig se imobilizoval na hydrochlorid (1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]-karbo-diimidu a N-hydroxysukcinimidem aktivovaný snímací čip CM5 injikováním 8 µl roztoku 10 µg/ml CD40-Ig v 10 mM octanu sodného, pH 4. CD40-Ig se imobilizoval při nízké denzitě (přibližně 150 RU), aby se zabránilo znovunavázání FAB během disociační fáze. Aby se získaly asociační konstanty (k_{on}), určil se vazebný poměr při šesti různých koncentracích FAB v rozmezí 25 až 600 nM v PBS při průtokové rychlosti 20 µl/min. Disociační konstanty (k_{off}) se určily jako průměr šesti měření získaných analýzou disociační fáze. Sensogramy se analyzovaly pomocí 3.0 programu BIA hodnocení. K_d se počítala z $K_d = k_{off}/k_{on}$. Zbytková FAB se odstranila po každém měření prolongovanou disociací.

Výsledky analýzy kinetiky humanizovaných protilátek F4 a L3.17 porovnané s chimerní FAB ukazuje tabulka 1:

Tabulka 1:

ID klon	k_{on}	K_{off}	K_d	Poznámka
Chimerní FAB	$8,43 \cdot 10^5$	$2,65 \cdot 10^{-3}$	3,14 nM	Připravena štepením chimerního 2.220 IgG papainem
F4	$2,00 \cdot 10^6$	$4,77 \cdot 10^{-4}$	0,24 nM	Humanizovaná
L3.17	$3,17 \cdot 10^6$	$3,28 \cdot 10^{-4}$	0,10 nM	Humanizovaná

8. Výsledky humanizace

Jak je uvedeno výše, rámcové sekvence proměnné oblasti myší monoklonální protilátky anti-CD40 se použily k identifikaci nejvíce homologních lidských zárodečných sekvencí. Zbytky rámce H řetězce byly ze 74 % identické lidským zárodečným sekvencím VH7 (7 - 4,1) a JH4, zatímco L řetězec byl ze 75 % identický příslušným lidským zárodečným sekvencím VKIII (L6) a JK4. Řazení proměnných sekvencí H a L řetězců ukazuje obrázek 15. Zbytky CDR, jak je definoval Kabat a kol. (Kabat E.A. a kol., Sequences of proteins of immunological interest, 5.vydání, 1991. Washington DC: United States department of Health and Human Services; Kabat E.A. a kol., J. Biol. Chem., 252, 6609 - 6616, 1977) jsou podtrženy a byly vyloučeny z analýzy homologie. Zbytky rámců, kde byly odlišnosti mezi myšími monoklonálními protilátkami a lidskými templáty, se hodnotily jednotlivě.

Na základě strukturní a sekvenční analýzy lze říci, že protilátkové CDRs s výjimkou HCDR3 vykazují omezený počet hlavních konformací řetězce, pojmenovaných kanonické struktury (Chothia C. a kol., J. Mol. Biol. 196, 901 - 917 (1987); Chothia C. a kol., Nature 342, 877 - 883

(1989). Navíc se identifikovaly určité zbytky rozhodující pro určení konformace hlavního řetězce loopů CDR (Chothia (1987), viz výše, Chothia (1989), viz výše). Kanonické rámcové zbytky myší anti-CD40 se proto identifikovaly a zjistilo se, že aminokyseliny ve všech rozhodujících kanonických pozicích v rámci rámců H a L řetězců lidských templátů jsou identické s příslušnými myšími zbytky.

Myší povrchové aminokyseliny, které se normálně nenacházejí v lidských protilátkách, pravděpodobně přispívají k imunogenicitě humanizované monoklonální protilátky (Padlan E. A., Mol. Immunol. 28, 489 - 498 (1991)). Proto se analyzovaly zbytky rámců, v nichž jsou odlišnosti mezi myší anti-CD40 a lidskými templáty a na základě expozice rozpouštědla se predikovalo, zda jsou skryty nebo lokalizovány na povrchu (Padlan (1991), viz výše). U reziduí rámců vystavených rozpouštědлу distálních na CDRs se nepředpokládalo, že by významně přispívaly k vazbě antigenu a proto s výjimkou dvou zbytků H řetězců se všechny změnilly na příslušnou lidskou aminokyselinu, aby se snížila potenciální imunogenicitá. Bylo predikováno, že zbytky 28 a 46 H řetězce byly vystaveny rozpouštědлу. Nicméně H28 je umístěn uvnitř oblasti HCDR1, jak ji definoval Chothia a kol., viz výše a potenciálně interaguje s antigenem. Navíc lysin v H46 v myší monoklonální protilátce je něco neobvyklého a významně se liší od kyseliny glutamové lidského templátu. Proto se myší a lidské zbytky na H28 a H46 expresovaly v kombinatorické knihovně (obrázek 15, hvězdičky).

Zbývající odlišné zbytky rámců, u všech z nich bylo predikováno, že jsou většinou skryty uvnitř protilátky, se hodnotily z hlediska:

(1) blízkosti k CDRs; (2) způsobilosti kontaktovat doménu na opačném vlákně VK - VH interface; (3) příbuznosti odlišných aminokyselin; (4) předpokládaného významu v modulaci aktivity CDR, jak ho definoval Studnicka (Studnicka G. M. a kol., Protein Eng. 7, 805 - 814 (1994)). Většina rozdílů

ve skrytých zbytcích rámce L řetězce se týkala aminokyselin v pozicích, které se nepovažují za pravděpodobně přímo zapojené do konformace CDR. Nicméně L49 je umístěna do sousedství s LCDR2, potenciálně kontaktuje VH doménu, není ve vztahu k lidskému zbytku a může být zahrnuta do určení konformace LCDR2. Z těchto důvodů byly jak myší tak lidské aminokyseliny v L49 expresovány v kombinatorické knihovně rámců (obrázek 15, hvězdičky).

Analýza sekvence myšího H řetězce a lidského templátu byla komplexnější. Zbytek H9 je prolin v myší monoklonální protilátce, zatímco lidský templát obsahuje nesouvisející serinový zbytek. Pozice H9 může rovněž hrát roli při modulaci konformace CDR a proto byla zvolena jako místo kombinatorní knihovny (obrázek 15, hvězdičky). Zbývající skryté zbytky rámce, které se lišily mezi myší anti-CD40 a templátem H řetězce byly v rámcových pozicích 38, 39, 48 a 91. Myší monoklonální protilátka proti CD40 obsahovala glutamin a kyselinu glutamovou v pozicích H38 a H39 v tomto pořadí, zatímco lidský templát obsahoval arginin a glutamin. Zbytek H38 je v blízkosti HCDR1, záměna glutamin--arginin není zpětně proveditelná a exprese glutaminu na tomto místě u myších protilátek je něco neobvyklého. Podobně, záměna glutamové kyseliny za glutamin je nekonzervativním rozdílem pro skryté aminokyseliny, H39 je potenciální VK kontaktní zbytek a kyselina glutamová je něco neobvyklého u myších monoklonálních protilátek. Zbytek H48 je ve značné blízkosti k HCDR2 a o H91 se předpokládá, že je místem velmi rizikovým (Studnicka (1994), viz výše, Harris L. a kol., Prot. Sci. 4, 306 - 310 (1995), které potenciálně kontaktuje VK doménu. Jak myší tak lidské zbytky se tedy expresovaly v pozicích H38, 39, 48 a 91 (obrázek 15, hvězdičky).

Shrnuto, knihovna rámců se skládala z myších CDRs naštěpovaných do lidských templátů. Navíc jeden zbytek rámce na L řetězci a sedm zbytků rámce na H řetězci se považuje za potenciálně důležité pro udržení aktivity monoklonální protilátky. Všechna tato místa se charakterizovala syntézou

kombinatorní knihovny, která expresovala všechny možné kombinace myších a lidských aminokyselin, nalezených v těchto zbytcích. Celková diversita této knihovny, nazvané HU I, byla 2^8 nebo 256 variant (tabulka 2, níže).

Tabulka 2: Souhrn knihoven fágově expresovaných anti-CD40 protilátek

Knihovna	Pozice knihovny	Velikost*	Screenováno ⁺
Hu I	rámec	256	$2,4 \times 10^3$
Hu II	rámec, HCDR3	$1,1 \times 10^5$	$2,0 \times 10^6$
Hu III	rámec, HCDR3, LCDR3	$3,1 \times 10^7$	$5,5 \times 10^5$

* Množství jedinečných klonů založené na sekvenci DNA. Třicet dva kodóny se použily ke kódování všech 20 aminokyselin na každé pozici CDR.

⁺ Knihovna Hu I byla screenována metodou ELISA za použití protilátek expresovaných v bakteriálních kulturách v malém měřítku (Watkins (1997), viz výše). Knihovny Hu II a Hu III se nasadily na XL-1 Blue buňky na agaru při hustotě 10^5 plaků na 100mm misku a screenovaly se metodou capture lift (Watkins (1998), viz výše).

Knihovna Hu I se expresovala v bakteriálních kulturách v malém měřítku (< 1 ml), stejná množství FAB uvolněné z periplasmatického prostoru se zachycovala na mikrotitrační destičce a vazebná aktivita protilátek se porovnávala přímo metodou ELISA (Watkins (1997), viz výše). Ačkoli byly identifikovány varianty, které váží cílový antigen s afinitami srovnatelnými nebo lepšími než chimerní FAB, většina screenovaných klonů z Hu I byla méně aktivní než chimerní anti-CD40 FAB. Přibližně 6 % náhodně vybraných variant Hu I vykazovalo vazebné aktivity srovnatelné

s chimerní FAB (data nejsou uvedena). Identifikace vícečetných variant Hu I s aktivitou srovnatelnou s chimerní CD40 je v souladu s výkladem, že nejvíce rozhodující zbytky rámců byly obsaženy v kombinatorní knihovně.

Aktivní klony se dále charakterizovaly titrací na imobilizovaný antigen, potvrzující identifikaci vícečetných variant se zvýšenou afinitou. Například klon 19C11 váže receptor pro CD40 s větší afinitou než chimerní FAB, jak ukazuje změna titračního profilu (obrázek 16, prázdná kolečka versus plná kolečka). Sekvencování DNA 34 neaktivnějších klonů vedlo k identifikaci 24 jedinečných kombinací rámců, z nichž každá obsahuje 2 až 6 myších zbytků rámce (data nejsou uvedena).

LCDR3 a HCDR3 kontaktují antigen přímo, interagují s jinými CDRs a často významně ovlivňují afinitu a specificitu protilátek (Wilson I. A. a kol, Curr. Opin. Struct. Biol. 3, 113 - 118 (1993), Padlan E. A., Mol. Immunol. 31, 169 - 217 (1994). Navíc jsou konformace LCDR3 a HCDR3 určeny částečně určitými zbytky rámců. K identifikaci neaktivnější protilátky se použila mutageneze založená na kodonu (Glaser S. M. a kol., J. Immunol. 149, 3903 - 3913 (1992), aby se syntetizovaly oligonukleotidy, které zavedou mutace do každé pozice v HCDR3, vždy pouze jednu, vznikající při expresi všech 20 aminokyselin v každém zbytku CDR. Žádný oligonukleotid nekódoval více než jednu změnu aminokyseliny. Zásoba oligonukleotidů kódujících knihovnu HCDR3 se smíchala s překrývajícími se oligonukleotidy, kódujícími kombinatorní rámec a jinými CDRs, aby se vytvořila knihovna rámec/HCDR3. Diverzita této knihovny, pojmenované Hu II byla $1,1 \times 10^5$ (tabulka 2, viz výše). Knihovna pro LCDR3 se syntetizovala stejným způsobem. Oligonukleotidy kódující LCDR3, HCDR3 a kombinatorní rámec se použily pro vytvoření knihovny rámec/HCDR3/LCDR3 pojmenované Hu III. Velké množství kombinací rámec/CDR3 vzniklo v knihovně s komplexitou $3,1 \times 10^7$ (tabulka 2, viz výše).

Kombinováním mutací v LCDR3 a/nebo HCDR3 s knihovnou rámců vzrostla potenciální diverzita humanizovaných variant anti-CD40 z 256 na více než 10^7 . Aby se i tyto knihovny screenovaly efektivněji, použila se modifikovaná plaková zkouška, nazvaná capture lift (Watkins (1998), viz výše). Ve stručnosti, fágy infikované bakterie se nasadily na agarové destičky a následně se pokryly nitrocelulózovými filtry, které byly potaženy reagentem specifickým na FAB. Po zachycení téměř stejných množství fágově expresované FAB se filtry zkoušely 5 ng/ml CD40-Ig fuzního proteinu. Protože filtry byly zkoušeny antigenem o koncentraci významně nižší než je K_d FAB, byly detekovatelné jen varianty se zvýšenou afinitou. Vícečetné klony vykazující vyšší afinitu se identifikovaly po screeningu více než 10^6 variant z knihovny Hu II a více než 10^5 variant z knihovny Hu III za použití 82mm filtrů obsahujících přibližně 10^5 variant na filtr.

Z důvodu vysoké denzity fágů na filtrech se pozitivní plaky sesbíraly a znovu nasadily při nižší denzitě a opět screenovaly. Následně se charakterizovaly metodou ELISA varianty vytvářející nejintenzivnější kolorimetrický signál ve zkoušce capture lift. Jak se očekávalo, většina klonů identifikovaných screenem capture lift vázala CD40 lépe než chimerní FAB. Titrace variant na imobilizovaný CD40-Ig identifikovala vícečetné klony vykazující afinitu větší než chimerní a humanizované FAB (obrázek 16, porovnej prázdné čtverečky a plné trojúhelníky s kolečky).

Mutace rámec/CDR, které propůjčují zvýšenou afinitu, se identifikovaly sekvenováním DNA. Sekvence jedinečných proměnných oblastí se identifikovaly v 10/13 Hu II variantách a 3/4 Hu III variantách. Jak varianty Hu II tak Hu III obsahovaly 1 až 5 myších zbytků rámců a 0 až 2 mutace CDR3, jak níže shrnuje tabulka 3.

Tabulka 3. Simultánní optimalizace zbytků rámce a CDR identifikuje varianty s vyšší afinitou

Knihovna	Klon	Zbytky myšího rámce*	CDR mutace
	chimerní	(43)	0
Hu I	19C11	(2) H28, 48	0
Hu II	CW43	(3) H9, 28, 91	HCDR3, ¹⁰¹ A→R
	2B12	(5) H9, 28, 38, 46, 48	HCDR3, ¹⁰¹ A→K
Hu III	2B12	(5) H9, 28, 38, 46, 48	HCDR3, ¹⁰¹ A→K
	2B8	(1) H28	HCDR3, ¹⁰¹ A→K
			LCDR3, ⁹⁶ R→Y

* Počet zbytků myších rámců, které se liší od nejvíce homologních lidských zárodečných sekvencí založených na definici CDRs, podané Kabatem a kol., viz výše. Počet zbytků myších rámců lišících se od lidského templátu je označen v závorkách. Všechny rozdíly rámců mezi myší monoklonální protilátkou humanizovanými versemi jsou umístěny na H řetězci (H) v označených pozicích za použití systému číslování, použitého Kabatem a kol.

Afinity bakteriálně expresovaných chimerních FAB a zvolených variant z každé z knihoven se charakterizovaly důkladněji za použití měření povrchové plasmonové rezonance, aby se určily asociační a disociační konstanty čištěné FAB s imobilizovaným CD40-Ig. Chimerní anti-CD40 měla disociační konstantu $K_d = 3,14 \text{ nM}$ a v souladu s výsledky screeningu mnoho variant vykazovalo vyšší afinitu. Dva z nejlepších klonů, F4 a L3.17 měly K_d 0,24 nM a 0,10 nM (v daném pořadí) (tabulka 1). Zlepšené afinity variant anti-CD40 byly převážně výsledkem pomalejších disociačních konstant, protože asociační konstanty byly velmi podobné u všech variant (v rozmezí $0,9 \text{ až } 3,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

Konečně se varianty, vykazující zvýšenou afinitu testovaly na jejich způsobilost blokovat vazbu ligandu gp39

na receptor CD40. Všechny varianty inhibovaly vazbu rozpustného proteinu fuze CD40-Ig na imobilizovaný antigen gp39 v závislosti na dávce, která korelovala s afinitou FAB (obrázek 17). Například nejsilnějším inhibitorem vazby ligandu na protein fuze CD40-Ig byla varianta 2B8, což byla rovněž varianta s nejvyšší afinitou k CD40 (obrázek 17). Varianta 2B8 vykazala přibližně 17-krát vyšší afinitu k CD40 než chimerní FAB a inhibovala vazbu ligandu přibližně 7-krát účinněji.

Příklad 5

Systém myšího modelu

Poskytovatelé patentu rovněž vyvinuli a testovali in vivo krysí protimysí monoklonální protilátku označenou 7E1-G2b a jejího předchůdce, 7E1-G1. Příprava této protilátky se provedla, aby se prozkoumaly možnosti léčby anti-CD40 u myších modelů autoimunní, zánětlivé a posttransplantační nemoci. Primárním cílem systému myšího modelu bylo připravit protimysí modelový systém, který napodoboval kompletní silnou blokádu interakce gp39/CD40, jako má 2.220, zatímco by měl slabou kostimulační aktivitu a testovat ji in vivo na standardních modelech nemoci.

A. Izolace a charakterizace protimysích CD40 monoklonálních protilátek 7E1-G1 a 7E1-G2b

1. Imunizace, fuze a charakterizace

Rekombinantní myší protein fuze CD40 a imunoglobulinu skládající se z extracelulární oblasti myší Cd40 fuzovaný k zavěšení, CH2 a CH3 domény myší IgG2a protilátky (mCD40-mIg) se použily pro imunizaci 8 týdnů starých samic krys Lewis cestou inokulace do tlapky. Tři dny po poslední imunizaci se fuzovaly leukocyty z odtékajících mízních uzlin s X63-Ag8.653 buňkami myšího myelomu, aby se vytvořily heterohybridomy krysa x myš. Jamky obsahující protilátku specifickou pro přírodní myší CD40 se identifikovaly pro reaktivitu s původním mCD40-mIg imunogenem metodou ELISA

a pro reaktivitu s CD40 pozitivními myšími B-buňkami lymfomové buněčné linie (WEHI-231, ATCC CRL-1702). Supernatanty se pak testovaly na způsobilost inhibovat navázání mCD40-mIg na rozpustný rekombinantní protein fuze mCD8-myší gp39, mgp39, myší ekvivalent sgp39. Přibližně dvanáct z původních jamek s nejsilnějšími inhibitory se klonovaly pomocí metody limitního vyředování.

Po klonování se provedly funkční zkoušky se supernatanty kultur a čištěnou protilátkou, aby se přesněji ohodnotila způsobilost anti-CD40 monoklonální protilátky inhibovat interakci myší gp39 s CD40 a určit jejich stimulační vlastnosti. Inhibiční vlastnosti se měřily schopností inhibovat vazbu mgp39 na WEHI-231 za použití standardních postupů, známých v oboru. Stimulační vlastnosti se měřily indukci pevné homotypové adheze WEHI-231 buněk a proliferací slezinných B-buněk za přítomnosti protilátky a anti-IgM za použití postupů, známých v oboru. Z těchto výsledků se určily tři monoklonální protilátky (5A3, 7E1-G1 a 8E1), které jsou nejvíce podobné protilidské CD40 monoklonální protilátce 2.220 s ohledem na blokádu gp39/CD40 a na úroveň kostimulační aktivity.

2. Výběr 7E1 jako přednostně použitelné protimysí CD40 monoklonální protilátky

Studie in vivo na myších byly zaměřeny na identifikaci, která z blokujících/nestimulujících anti-CD40 monoklonálních protilátek nejsilněji snižuje specifické protilátkové odpovědi na T-dependentní antigen. Studovalo se snížení IgG protilátkové odpovědi na SRBC u myší pomocí protimysí CD40 monoklonální protilátky. Skupiny pěti myší BALB/c se imunizovaly IV (intravenózně) 1×10^8 SRBCs a souběžně se léčily ip (intraperitoneálně) 1 mg protimysími CD40 monoklonálními protilátkami 5A3, 7E1-G1 nebo 8E1. Jako kontroly se skupiny stejně imunizovaných myší léčily MR1 (křeččí protimysí gp39, pozitivní kontrola, 250 ug), 6E9 (kryší protilidský gp39, negativní kontrola, 1 mg) nebo PBS. Myši se hodnotily na titry IgG anti-SRBC metodou ELISA 7.,

14., 21. a 35. den. Výsledky ukazují, že při podání jedné dávky v době expozice antigenem SRBCs se projevuje monoklonální protilátka 7E1-G1 jako účinnější supresor IgG odpovědi na SRBC ve srovnání s monoklonálními protilátkami 5A3 nebo 8E1, a proto byla vybrána jako přednostně použitelná anti-CD40 monoklonální protilátka pro studie na myších.

3. Izotypová záměna variant monoklonální protilátky 7E1-G1

7E1-G1 neměl charakteristiky efektorové funkce srovnatelné s charakteristikami chimerní 2.220 protilidské CD40 monoklonální protilátky (například krysí IgG1 není tak účinný jako lidský IgG1 při fixaci komplementu a Fc receptorové interakci) a profil suprese specifické protilátky in vivo není u 7E1-G1 tak kompletní jako byl pozorován u monoklonální protilátky 2.220 u primátů. Hledala se tedy protilátka, mající specifitu 7E1, ale s kryším izotypem podobnějším lidské IgG1 ve svých efektorových schopnostech. K tomu se připravila přírodní izotypová záměnná varianta 7E1 z IgG1 na IgG2b pomocí metody sib-selekce (Hae a kol., J. Immunol. Methods 103(1), 59 - 67 (1987)). Stručně, anti-CD40 monoklonální protilátka izotypu IgG2b se identifikovala metodou ELISA mezi supernatanty z destičky s 96 jamkami, která byla nasazena buňkami při 1000 buňkách/jamku s původním 7E1 hybridomem. Následné serie nasazení a identifikace IgG2b pozitivních jamek při nasazovací hustotě 200 a poté 20 buněk na jamku následovaných dvěma seriemi klonování pomocí metody limitního vyředování vedly k izolaci clonal IgG2b záměnných variant 7E1, 7E1-G2b.

7E1-G2b je všeobecně uznávaná záměnná varianta IgG1 jak bylo ukázáno na třech skupinách údajů. Zaprvé, sekvenování N-konce těžkého řetězce ukázalo, že obě verze byly shodné ve zbytcích prvních 35 aminokyselin. Zadruhé, analýza PCR používající primery specifické pro proměnný těžký řetězec CDRs 7E1-G1 získala spojení vhodné velikosti z cDNA, získané buď z 7E1-G1 nebo z 7E1-G2b a nikoli dvou

dalších nesouvisejících protilátek. Konečně hodnocení vazebné aktivity čištěných podílů těchto dvou verzí na imobilizovaný mCD40-hIg metodou ELISA za použití anti-kappa zbytkového reagenta podalo zásadně stejné titrační křivky.

B. Studie in vivo

1. Srovnání in vivo 7E1-G1 a 7E1-G2b v modelu protilátkové odpovědi

7E1-G1 se srovnávala s 7E1-G2b na účinnost in vivo za použití SRBCs jako antigenu dependentního na T-buňkách. Skupiny tří až pěti zvířat se imunizovaly iv (intravenózně) SRBC a souběžně léčily ip (intraperitoneálně) protilátkami 7E1-G1 nebo 7E1-G2b v dávkách 1, 0,25 nebo 0,1 mg látky v 0. dni, jak ukazuje obrázek 10. Protimyšší gp39 monoklonální protilátka MR1 sloužila jako pozitivní kontrola na imunosupresivní účinek. Monoklonální protilátky 6E9 a PBS sloužily v daném pořadí jako kontroly irelevantní monoklonální protilátkou a žádnou monoklonální protilátkou. Myši se hodnotily na titry anti-SRBC metodou ELISA 7., 14. a 21. den. Titry představovaly spočtené zředění séra, aby se získala hodnota OD = 0,3 v testu ELISA. Jak ukazuje obrázek 10, 7E1-G2b snížil IgG protilátkovou odpověď na SRBCs v dávkách, v nichž jí nesnížil 7E1-G1.

2. Závislost odpovědi na dávce 7E1-G2b v myším modelu T-dependentního antigenu

7E1-G2b se zkoušel na modelu primární imunní odpovědi dependentní na T-buňkách za použití SRBC jako antigenu. 7E1-G2b se testoval v různých dávkách, aby se určila nejnižší účinná dávka. Myši BALB/c (n=5) se intravenózně injikovaly 1×10^8 SRBCs a léčily se jednou injekcí 7E1-G2b v indikovaných dávkách nebo MR1 (protimyšší gp39) nebo PBS podanou ve stejný čas jako antigen v 1. dni. Obrázek 11 ukazuje IgG odpověď proti SRBC v 7., 16. a 28. dni. Uváděné hodnoty jsou hodnoty absorbance při měření metodou ELISA při zředění séra 1/50. Sloupce chyb představují standartní odchylku.

Jak ukazuje obrázek 11, jednodávková léčba 7E1-G2b v dávce 25 $\mu\text{g}/\text{myš}$ (1,25 mg/kg) snížila IgG imunní odpověď o 87 % 16. den a úplná suprese se dosáhla dávkami 50 nebo 100 μg 16. den. Ve 28. dni dávka 50 $\mu\text{g}/\text{myš}$ snížila IgG odpověď o 89 % a dávka 100 $\mu\text{g}/\text{myš}$ způsobila úplnou supresi. Stojí za povšimnutí, že MR1 se použila jako pozitivní kontrola pro imunosupresi v suboptimální dávce 100 $\mu\text{g}/\text{myš}$.

3. 7E1-G2b v preventivním myším modelu kolagenem indukované arthritidy (CIA)

Standardní experimentální myší model pro revmatoidní arthritidu, model kolagenem indukované arthritidy (CIA) se použil pro určení účinku 7E1-G2b na prevenci arthritidy. Samcům myší DBA/1J o stáří 6 až 8 týdnů se injikovalo 200 μg kuřecího kolagenu typu II (CII) v kompletním Freundově adjuvans intradermálně 0. den. Léčba 7E1-G2b v dávce 250 μg na jednu dávku se podala intraperitoneálně každé 4 dny, počínaje 7. dnem. Kontrolní skupina se léčila PBS ve stejném dávkovacím schematu. Všem myším se podal CII v nekompletním Freundově adjuvans 21. den. U myši byla denně pozorována velikost otoku tlapky a subjektivně skórována na stupnici 0 až 3, kde 3 se rovnalo maximálnímu otoku a erythemu. Tlapky se rovněž denně měřily posuvným měřítkem. Udávané klinické skóre bylo odvozeno od součtu skóre každé tlapky v okamžiku vykrvácení a děleno celkovým počtem zvířat v každé skupině. Uváděné hodnoty jsou průměrným rozmezím skupin.

Rozvoj arthritidy a tím způsobený zánět kloubů u myši byl úplně inhibován léčbou 7E1-G2b, jak ukazuje tabulka 4 níže. Myši léčené 7E1-G2b byly v průběhu 90 dnů úplně bez nemoci.

Tabulka 4. Léčba kolagenem indukované arthritidy

Skup. T _x	Incidence arthritidy	Medián (rozmezí) den nástupu	Medián (roz.) klin. skóre	Medián (roz.) rozměr tlapky
7E1-G1	0/5	0	0	0,075
7E1-G2b	0/5	0	0	0,075
kontrola PBS	4/4	30 (27-32)	3,5 (3-4)	0,114 (0,110-0,117)

Jak bylo ukázáno výše, protilátky poskytnutého vynálezu jsou silnými imunomodulátory s léčebným využitím u řady nemocí.

Poskytnutý vynález zahrnuje chimerní a humanizované protilátky jak byly popsány výše s doplňujícími konzervativními substitucemi aminokyselin, které nemají žádný podstatný efekt na navázání CD40. Konzervativní substituce typicky zahrnuje substituci jedné aminokyseliny za jinou se stejnými charakteristikami, tedy substituce v rámci těchto skupin: valin, glycin; glycin, alanin; valin, izoleucin, leucin; kyselina asparagová, kyselina glutamová; asparagin, glutamin; serin, threonin; lysin, arginin; a fenylalanin, tyrosin.

V jednom ohledu je poskytnutý vynález zaměřen na produkci chimerních a/nebo humanizovaných protilátek, jak je popsáno výše, expresí rekombinantních segmentů DNA kódujících myší lehký proměnný řetězec a myší těžký proměnný řetězec (nebo jejich části), připojené k segmentům DNA kódujícím lidské stálé oblasti. Příkladné sekvence DNA označené v souladu s poskytnutým vynálezem kódují polypeptidové řetězce zahrnující veškerou oblast lehkého proměnného řetězce nebo její část jak ukazuje SEQ ID NO:1 nebo její depozitní ATCC klon a/nebo veškerou oblast těžkého proměnného řetězce nebo její část jak ukazuje SEQ ID NO:2 nebo její depozitní ATCC klon.

V rámci poskytnutého vynálezu jsou rovněž zahrnuty odhalené oblasti lehkého a těžkého proměnného řetězce a jejich aktivní nebo funkční části. Imunologicky kompetentní nebo funkční formy proteinu nebo jejich části se zde rovněž nazývají jako "oblast lehkého/těžkého proměnného řetězce nebo jejich biologicky aktivní část". V tomto případě jejich biologicky aktivní část zahrnuje část zmíněného lehkého nebo těžkého řetězce, která, pokud je začleněna do protilátky, stále umožňuje, aby protilátka vážala lidský CD40.

Zvláště jsou v rámci poskytnutého vynálezu zahrnuty sekvence nukleových kyselin kódující proměnný lehký řetězec a proměnný těžký řetězec protilátky poskytnutého vynálezu. Například nukleotidy 1057 až 1422 (SEQ ID NO:5) na obrázku 13 poskytují výhodnou sekvenci nukleových kyselin kódující proměnný těžký řetězec protilátky poskytnutého vynálezu; nukleotidy 1065 až 1388 (SEQ ID NO:6) na obrázku 14 poskytují výhodnou sekvenci nukleových kyselin kódující proměnný lehký řetězec protilátky poskytnutého vynálezu. SEQ ID NO:7 a SEQ ID NO:11 ukazují výhodnou sekvenci nukleových kyselin kódující proměnný lehký řetězec humanizovaných protilátek poskytnutého vynálezu; SEQ ID NO:9 ukazuje výhodnou sekvenci nukleových kyselin kódující proměnný těžký řetězec humanizované protilátky poskytnutého vynálezu. Plasmidy zahrnující polynukleotidy, které ukazují SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11 byly deponovány s ATCC.

Chimerní a/nebo humanizované protilátky, které se váží na lidský CD40 a které zahrnují polypeptidy, které jsou značně homologní nebo vykazují značnou shodnost sekvence se sekvencemi proměnného lehkého a těžkého řetězce odhalenými zde, jsou rovněž uvažovány v poskytnutém vynálezu. Například chimerní protilátky zahrnující oblast lehkého řetězce, vykazující shodnost nejméně v asi 85 % sekvence, výhodněji nejméně v asi 90 % sekvence a ještě výhodněji nejméně v asi 95 % sekvence a nejvýhodněji nejméně v asi 98 % sekvence s oblastí lehkého řetězce, jak ji ukazuje SEQ ID NO:4 jsou

zahrnuty do rámce poskytnutého vynálezu. Zvláště jsou rovněž zahrnuty do rámce poskytnutého vynálezu chimerní protilátky zahrnující proměnnou oblast lehkého řetězce, vykazující shodnost nejméně v asi 85 % sekvence, výhodněji nejméně v asi 90 % sekvence a ještě výhodněji nejméně v asi 95 % sekvence a nejvýhodněji nejméně v asi 98 % sekvence s proměnnou oblastí lehkého řetězce, jak ji ukazuje SEQ ID NO:1. Rovněž jsou zahrnuty do rámce poskytnutého vynálezu humanizované protilátky zahrnující oblast lehkého řetězce, vykazující shodnost nejméně v asi 85 % sekvence, výhodněji nejméně v asi 90 % sekvence a ještě výhodněji nejméně v asi 95 % sekvence a nejvýhodněji nejméně v asi 98 % sekvence s oblastí lehkého řetězce, jak ji ukazují SEQ ID NO:8 a/nebo SEQ ID NO:12. Doplnkově jsou zahrnuty do rámce poskytnutého vynálezu chimerní protilátky zahrnující oblast těžkého řetězce, vykazující shodnost nejméně v asi 85 % sekvence, výhodněji nejméně v asi 90 % sekvence a ještě výhodněji nejméně v asi 95 % sekvence a nejvýhodněji nejméně v asi 98 % sekvence s oblastí těžkého řetězce, jak ji ukazuje SEQ ID NO:3. Zvláště jsou rovněž zahrnuty do rámce poskytnutého vynálezu chimerní protilátky zahrnující proměnnou oblast těžkého řetězce, vykazující shodnost nejméně v asi 85 % sekvence, výhodněji nejméně v asi 90 % sekvence a ještě výhodněji nejméně v asi 95 % sekvence a nejvýhodněji nejméně v asi 98 % sekvence s proměnnou oblastí těžkého řetězce, jak ji ukazuje SEQ ID NO:2. Doplnkově jsou zahrnuty do rámce poskytnutého vynálezu humanizované protilátky zahrnující oblast těžkého řetězce, vykazující shodnost nejméně v asi 85 % sekvence, výhodněji nejméně v asi 90 % sekvence a ještě výhodněji nejméně v asi 95 % sekvence a nejvýhodněji nejméně v asi 98 % sekvence s oblastí těžkého řetězce, jak ji ukazuje SEQ ID NO:10.

Segmenty DNA typicky dále zahrnují sekvence kontroly exprese DNA operativně spojené se sekvencemi kódujícími chimerní nebo humanizovanou protilátku, obsahující přirozeně asociované nebo heterologní oblasti promotoru. Výhodně

sekvence kontroly exprese budou eukaryotické promotorové systémy ve vektorech schopných transformace nebo transfekce eukaryotických hostitelských buněk, ale rovněž lze použít kontrolní sekvence pro prokaryotické hostitele. Když se vektor začlenil do vhodné buňky, udržuje se hostitel za podmínek vhodných pro vysokou úroveň exprese sekvence nukleotidů a, je-li to žádoucí, může následovat sběr a čištění proměnného lehkého řetězce, těžkého řetězce, dimerů lehkého/těžkého řetězce nebo nedotčené protilátky, vázících se fragmentů nebo jiných forem imunoglobulinů. (Viz Beychok S., Cells of Immunoglobulin Synthesis, Academic Press, N. Y. (1979)). Protilátky s jednoduchým řetězcem lze rovněž produkovat spojením sekvencí nukleových kyselin, kódujících oblasti VL a VH zde odhalených s DNA kódující polypeptidový linker.

Prokaryotičtí hostitelé, jako je *E. coli* a jiné mikroby, jako kvasinky, lze použít k expresi protilátky poskytnutého vynálezu. Navíc k mikroorganismům lze rovněž použít buněčnou kulturu savčích tkání k expresi a produkci protilátky poskytnutého vynálezu. Eukaryotické buňky lze preferovat, protože v oboru bylo vyvinuto mnoho vhodných linií hostitelských buněk, schopných sekrece nedotčených imunoglobulinů, do nichž lze zahrnout CHO buněčné linie, různé COS buněčné linie, HeLa buňky, myelomové buněčné linie a hybridomy. Exprese vektorů pro tyto buňky může zahrnovat sekvence kontroly exprese, jako je promotor nebo enhancer a místa nezbytná pro zpracování informace, jako jsou místa vázící ribozomy, místa spojení RNA, místa polyadenylace a transkripční terminátorové sekvence, všechny známé v oboru.

Vektory obsahující segmenty DNA, které jsou předmětem zájmu (tedy sekvence kódující těžký a/nebo lehký řetězec a sekvence kontroly exprese) lze přenést do hostitelské buňky dobře známými způsoby, které se liší v závislosti na typu buněčného hostitele. Například transfekce chloridem vápenatým se běžně používá u prokaryotických buněk, zatímco

působení fosforečnanem vápenatým nebo elektroporaci lze použít u jiných buněčných hostitelů. (iz například Maniatis a kol., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1982)).

Když jsou expresovány, mohou se celé protilátky, jejich dimery, jednotlivé lehké a těžké řetězce nebo jiné formy imunoglobulinů poskytnutého vynálezu čistit podle standardních postupů v oboru, zahrnujících precipitaci síranem amonným, metodu sloupcové afinity, sloupcovou chromatografii, elektroforézu na gelu a podobně. Výhodné jsou významně čisté imunoglobuliny s nejméně 90 až 95% homogenitou a nejvýhodnější jsou ty s 98 až 99% homogenitou pro farmaceutické použití.

Protilátky poskytnutého vynálezu najdou typicky své uplatnění v léčbě nemocí zprostředkovaných protilátkově a/nebo zprostředkovaných T-buňkami. Typické stavy nemoci vhodné pro léčbu zahrnují reakci štěpu proti hostiteli a rejekci transplantátu, autoimunní nemoci jako diabetes I. typu, lupénka, roztroušená skleróza, revmatoidní artritida, systémový lupus erythematosus a myastenia gravis.

Protilátky a farmaceutické přípravky poskytnutého vynálezu jsou zejména užitečné při parenterálním podání, například subkutánně, intramuskulárně nebo intravenózně. Farmaceutické přípravky pro parenterální podání budou obvykle zahrnovat roztok protilátky rozpuštěné ve vhodném nosiči, výhodně ve vodném nosiči. Lze použít řadu vodných nosičů, dobře známých v oboru, například vodu, pufrovanou vodu, roztok chloridu sodného, glycinu a podobně. Tyto roztoky jsou sterilní a celkově bez obsahu částic. Tyto farmaceutické přípravky lze sterilizovat konvenčními dobře známými postupy. Tyto přípravky mohou obsahovat farmaceuticky vhodné pomocné látky jsou-li nutné proto, aby se přiblížily fyziologickým podmínkám, jako jsou pH adjustující a pufrovací látky, toxicitu adjustující látky a podobně, například octan sodný, chlorid sodný, chlorid draselný, chlorid vápenatý, mléčnan sodný, lidský albumin

atd.

Přípravky obsahující protilátky poskytnutého vynálezu lze podat pro profylaktické nebo léčebné účely. Při léčebném podání se přípravky podávají pacientovi, který již trpí nemocí v množství dostatečném pro léčbu nebo přinejmenším pro částečné zpomalení nemoci a jejích komplikací. Množství dostatečné, aby tohoto dosáhlo, se definuje jako "terapeuticky účinná dávka". Množství účinná pro toto použití budou záviset na tom, jak těžký je stav nemoci a celkový stav pacientova vlastního imunitního systému a může je určit odborník v oboru.

Při profylaktickém podání se přípravky podávají pacientovi, který ještě netrpí nemocí, aby se zvýšila pacientova odolnost (snížila imunní odpověď). Takové množství dostatečné, aby tohoto dosáhlo, se definuje jako "profylakticky účinná dávka". Přesná množství pro toto použití budou opět záviset na stavu pacientova zdraví a celkové úrovni jeho imunity. Výhodné profylaktické použití je k prevenci rejekce transplantátu, například rejekci transplantované ledviny.

Ačkoli byl poskytnutý vynález popsán v některých podrobnostech cestou ilustrací a příkladů kvůli jasnosti a porozumění, bude zřejmé, že určité změny a modifikace lze uskutečnit v rámci připojených patentových nároků.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Proměnná oblast lehkého řetězce, která zahrnuje celou sekvenci aminokyselin nebo její biologicky aktivní část, jak je ukázána v SEQ ID NO:1 (obrázek 4a).

2. Proměnná oblast těžkého řetězce, která zahrnuje celou sekvenci aminokyselin nebo její biologicky aktivní část, jak je ukázána v SEQ ID NO:2 (obrázek 4b).

3. Chimerní protilátka, která váže lidský CD40 a zahrnuje lehký řetězec a těžký řetězec, kde zmíněný lehký řetězec zahrnuje proměnnou oblast lehkého řetězce podle nároku 1.

4. Chimerní protilátka, která váže lidský CD40 a zahrnuje lehký řetězec a těžký řetězec, kde zmíněný těžký řetězec zahrnuje proměnnou oblast těžkého řetězce podle nároku 2.

5. Chimerní protilátka podle nároku 3, kde zmíněný těžký řetězec zahrnuje proměnnou oblast těžkého řetězce podle nároku 2.

6. Chimerní protilátka, která váže lidský CD40 a zahrnuje lehký řetězec a těžký řetězec, výše zmíněný lehký řetězec zahrnuje celou sekvenci aminokyselin nebo její biologicky aktivní část, jak je ukázána v SEQ ID NO:4 a výše zmíněný těžký řetězec zahrnuje celou sekvenci aminokyselin nebo její biologicky aktivní část, jak je ukázána v SEQ ID NO:3

7. Molekula nukleové kyseliny, která zahrnuje sekvenci nukleotidů kódující proměnnou oblast lehkého řetězce podle nároku 1.

8. Molekula nukleové kyseliny, která zahrnuje sekvenci nukleotidů kódující proměnnou oblast těžkého řetězce podle nároku 2.

25.07.01

9. Vektor exprese, který zahrnuje sekvenci nukleových kyselin podle nároku 7.
10. Vektor exprese, který zahrnuje sekvenci nukleových kyselin podle nároku 8.
11. Humanizovaná protilátka, která zahrnuje část proměnné oblasti lehkého řetězce podle nároku 1.
12. Humanizovaná protilátka, která zahrnuje část proměnné oblasti těžkého řetězce podle nároku 2.
13. Farmaceutický přípravek, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje chimerní protilátku podle nároku 5.
14. Farmaceutický přípravek, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje chimerní protilátku podle nároku 6.
15. Chimerní protilátka, která váže lidský CD40 a zahrnuje proměnnou oblast lehkého řetězce a proměnnou oblast těžkého řetězce, ve které výše zmíněná proměnná oblast lehkého řetězce zahrnuje sekvenci aminokyselin mající nejméně 90% shodnost sekvence s proměnnou oblastí lehkého řetězce podle nároku 1.
16. Chimerní protilátka, která váže lidský CD40 a zahrnuje proměnnou oblast lehkého řetězce a proměnnou oblast těžkého řetězce, ve které výše zmíněná proměnná oblast těžkého řetězce zahrnuje sekvenci aminokyselin mající nejméně 90% shodnost sekvence s proměnnou oblastí těžkého řetězce podle nároku 2.
17. Způsob léčení pacienta trpícího poruchou zprostředkovanou T-buňkami, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje podávání terapeuticky účinné dávky

2007-01-23

farmaceutického přípravku podle nároku 14 zmíněnému pacientovi.

18. Molekula nukleové kyseliny podle nároku 7, která zahrnuje sekvenci nukleotidů, jak je ukázána v SEQ ID NO:6.

19. Molekula nukleové kyseliny podle nároku 8, která zahrnuje sekvenci nukleotidů, jak je ukázána v SEQ ID NO:5.

20. Chimerní protilátka podle nároku 6, která zahrnuje sekvenci aminokyselin lehkého řetězce, jak je ukázána v SEQ ID NO:4 a sekvenci aminokyselin těžkého řetězce, jak je ukázána v SEQ ID NO:3.

21. Humanizovaná protilátka podle nároku 11, která zahrnuje proměnnou oblast lehkého řetězce, jak je ukázána v SEQ ID NO:8.

22. Humanizovaná protilátka podle nároku 11, která zahrnuje proměnnou oblast těžkého řetězce, jak je ukázána v SEQ ID NO:10.

23. Humanizovaná protilátka podle nároku 12, která zahrnuje proměnnou oblast lehkého řetězce, jak je ukázána v SEQ ID NO:8.

24. Humanizovaná protilátka podle nároku 12, která zahrnuje proměnnou oblast těžkého řetězce, jak je ukázána v SEQ ID NO:10.

25. Humanizovaná protilátka podle nároku 11, která zahrnuje proměnnou oblast lehkého řetězce, jak je ukázána v SEQ ID NO:8 a proměnnou oblast těžkého řetězce, jak je ukázána v SEQ ID NO:10.

26. Humanizovaná protilátka podle nároku 11, která zahrnuje

proměnnou oblast lehkého řetězce, jak je ukázána v SEQ ID NO:12.

27. Humanizovaná protilátka podle nároku 26, která zahrnuje proměnnou oblast těžkého řetězce, jak je ukázána v SEQ ID NO:10.

27. Humanizovaná protilátka podle nároku 11, která zahrnuje proměnnou oblast lehkého řetězce, jak je ukázána v SEQ ID NO:12 a proměnnou oblast těžkého řetězce, jak je ukázána v SEQ ID NO:10.

28. Farmaceutický přípravek, v y z n a ě u j í c í s e t í m, že obsahuje humanizovanou protilátku podle nároku 25.

29. Farmaceutický přípravek, v y z n a ě u j í c í s e t í m, že obsahuje humanizovanou protilátku podle nároku 28.

Seznam sekvencí

<110> Aruffo, Alejandro A.
 Siadak, Anthony W.
 Berry, Karen K.
 Harris, Linda
 Thorne, Barbara A.
 Bajorath, Jurgen
 Huse, William D.
 Wu, Herren
 Watkins, Jeffry D.

<120> PROTI LÁTKY PROTI LIDSKÉ CD40

<130> DB2a sekvence

<140> 09/247,352

<141> 1999-02-10

<150> 09/026,291

<151> 1998-02-19

<160> 14

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 108

<212> PRT

<213> Lidské a myší

<400> 1

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Tyr
 20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser His Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Gln His Gly His Ser Phe Pro Trp

67

25.07.01

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 2

<211> 122

<212> PRT

<213> Lidské a myší

<400> 2

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

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

Gly Met Gln Trp Val Gln Glu Met Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Ile
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Val Glu Asp Phe
 50 55 60

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

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 3

<211> 451

<212> PRT

<213> Lidské a myší

<400> 3

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

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

25.07.01

Gly Met Gln Trp Val Gln Glu Met Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Ile
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Val Glu Asp Phe
 50 55 60

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

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445

Pro Gly Lys
 450

<210> 4

<211> 214

<212> PRT

<213> Lidské a myší

<400> 4

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Tyr
 20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile

70

25.07.01

35

40

45

Lys Tyr Ala Ser His Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Gln His Gly His Ser Phe Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 5

<211> 8614

<212> DNA

<213> Lidská a myší

<400> 5

gacggatcgg gagatctgct aggtgacctg aggcgcgccg gcttcgaata gccagagtaa 60
cctttttttt taattttatt ttattttatt tttagatgg agtttgccgc cgaatctcccg 120
atccccatg gtcgactctc agtacaatct gctctgatgc cgcatagtta agccagtatc 180
tgctccctgc ttgtgtgtg gaggtcgctg agtagtgccg gagcaaaatt taagctacaa 240
caaggcaagg cttgaccgac aattgcatga agaactctgct taggggttagg cgttttgccg 300
tgcttcgcga tgtacgggcc agatatacgc gttgacattg attattgact agttattaat 360

7 25.07.01

agtaatcaat tacgggggtca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac 420
 ttacggtaaa tggcccgccct ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa 480
 tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggact 540
 atttacggta aactgcccac ttggcagtac atcaagtgt tcatatgcca agtacgcccc 600
 ctattgacgt caatgacggt aaatggcccg cctggcatta tgcccagtac atgaccttat 660
 gggactttcc tacttggcag tacatctacg tattagtcat cgctattacc atgggtgatgc 720
 ggttttggca gtacatcaat gggcgtggat agcggtttga ctacgggga tttccaagtc 780
 tccaccccat tgacgtcaat gggagtttgt tttggcacca aaatcaacgg gactttccaa 840
 aatgtcgtaa caactccgcc ccattgacgc aaatgggagg taggcgtgta cgggtggagg 900
 tctatataag cagagctctc tggctaaacta gagaacccac tgcttactgg cttatcgaaa 960
 ttaatacgac tcaactatagg gagacccaag cttggtacca tggactggac ctggagaatc 1020
 ctcttcttgg tggcagcagc aacagggtgcc cactcccaga tccagttggt gcaatctgga 1080
 cctgagctga agaagcctgg agagacagtc aggatctcct gcaaggcttc tgggtatgcc 1140
 ttcacaacta ctggaatgca gtgggtgcaa gagatgccag gaaagggttt gaagtggatt 1200
 ggctggataa acacccactc tggagtgcc aaatatgtag aagacttcaa gggacggttt 1260
 gccttctctt tggaaacctc tgccaacact gcatatttac agataagcaa cctcaaaaat 1320
 gaggacacgg ctacgtattt ctgtgtgaga tccgggaatg gtaactatga cctggcctac 1380
 tttgcttact ggggccaagg gacactggtc actgtctctg cagctagcac caagggccca 1440
 tcggtcttcc ccctggcacc ctctccaag agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc 1500
 tgcttggta aggactactt cccgaaccg gtgacggtgt cgtggaactc aggcgccctg 1560
 accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc ctacagtcct caggactcta ctccctcagc 1620
 agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg ggcacccaga cctacatctg caacgtgaat 1680
 cacaagcca gcaacaccaa ggtggacaag aaagtgtgtg agaggccagc acaggggagg 1740
 aggtgtctg ctggaagcca ggctcagcgc tcctgcctgg acgcatcccg gctatgcagc 1800
 cccagtccag ggcagcaagg caggcccggt ctgcctcttc acccgagggc ctctgccgc 1860
 cccactcatg ctcagggaga gggctctctg gctttttccc caggctctgg gcaggcacag 1920
 gctaggtgcc cctaaccag gccctgcaca caaaggggca ggtgctgggc tcagacctgc 1980
 caagagccat atccgggagg accctgcccc tgacctaac ccaccccaaa ggccaaactc 2040
 tccactccct cagctcggac acctctctc ctcccagatt ccagtaactc ccaatcttct 2100
 ctctgcagag cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccacctgccc caggtaagcc 2160
 agcccaggcc tcgccctcca gctcaaggcg ggacaggtgc cctagagtag cctgcatcca 2220
 gggacaggcc ccagccgggt gctgacacgt ccacctccat ctcttctca gcacctgaac 2280
 tcctgggggg accgtcagtc ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct 2340
 cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca 2400
 agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg 2460
 agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca ggcctctcac cgtcctgcac caggactggc 2520
 tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggctt ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga 2580
 aaaccatctc caaagccaaa ggtgggaccc gtgggtgctg agggccacat ggacagaggc 2640
 cggctcggcc caccctctgc cctgagagt accgctgtac caacctctgt cctacaggg 2700
 cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatccc gggatgagct gaccaagaac 2760
 caggtcagcc tgacctgct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatgc cgtggagtgg 2820
 gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccagc ctcccgtgct ggactccgac 2880
 ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggaggca gcagggaac 2940
 gtcttctcat gctcgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 3000
 tcctgtctc cgggtaaatg agtgcgacgg ccggcaagcc ccgctcccc gggctctcgc 3060
 ggtcgcagga ggtgcttgg cagtacccc ctgtacatac ttcccgggcg ccagcatgg 3120
 aaataaagca cccagcgtg ccctgggccc ctgcgagact gtgatggtt tttccacggg 3180
 tcaggccgag tctgaggcct gagtggcatg agggaggcag agcgggtccc actgtcccca 3240

cactggccca ggctgtgcag gtgtgcctgg gccccctagg gtgggggtca gccaggggct 3300
 gccctcggca ggggtggggga tttgccagcg tggccctccc tccagcagca cctgccctgg 3360
 gctggggccac gggaagccct agggagccct ggggacagac acacagcccc tgcctctgta 3420
 ggagactgtc ctgttctgtg agcgccctg tctcccgac ctccatgcc actcgggggc 3480
 atgcctagtc catgtgcgta gggacaggcc ctccctcacc catctacccc cagggcacta 3540
 acccctggct gccctgcccc gcctcgcacc cgcattggga cacaaccgac tccggggaca 3600
 tgcactctcg ggccctgtgg agggactggg gcagatgccc acacacacac tcagcccaga 3660
 cccgttcaac aaaccccgca ctgaggttgg cgggccacac ggccaccaca cacacacgtg 3720
 cagcctcac acacggagcc tcaccggggc gaactgcaca gacccagac cagagcaagg 3780
 tctcgcaca cgtgaacact cctcggacac agggcccccac gagccccacg cggcacctca 3840
 agggccacga gcctctcggc agcttctcca catgctgacc tgctcagaca aaccagccc 3900
 tcctctcaca aggggtgcccc tgcagccgcc acacacacac aggggatcac acaccacgtc 3960
 acgtccctgg cctggccca cttcccagtg ccgcccttc ctgcaggacg gatcagcctc 4020
 gactgtgect tctagttgcc agccatctgt tgtttgcccc tccccgtgc cttccttgac 4080
 cctggaagggt gccactccca ctgtcctttc ctaataaaat gaggaaattg catcgcattg 4140
 tctgagtagg tgtcattcta ttctgggggg tggggtgggg caggacagca agggggagga 4200
 ttgggaagac aatagcaggc atgctgggga tgcggtgggc tctatggctt ctgaggcgga 4260
 aagaaccagc tggggctcta gggggtatcc ccacgcgccc tgtagcggcg cattaagcgc 4320
 ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac cgctacactt gccagcggcc tagcggccgc 4380
 tcctttcgct ttcttcctt ctttctcgc cagttcggc gggcctctca aaaaagggaa 4440
 aaaaagcatg catctcaatt agtcagcaac catagtcccg cccctaactc cgccatccc 4500
 gccctaact ccgcccagtt ccgcccattc tccgccccat ggctgactaa ttttttttat 4560
 ttatgcagag gccgaggccg cctcggcctc tgagctattc cagaagtagt gaggaggctt 4620
 ttttggaggc ctaggctttt gcaaaaagct tggacagtc agggctgcga tttcgcgcca 4680
 aacttgacgg caatcctagc gtgaaggctg gtaggatttt atccccgctg ccatcatggg 4740
 tcgaccattg aactgcacg tcgccgtgtc ccaaaatatg gggattggca agaacggaga 4800
 cctaccctgg cctccgctca ggaacgagtt caagtacttc caaagaatga ccacaacctc 4860
 ttcagtggaa ggtaaacaga atctggtgat tatgggtagg aaaacctggg tctccattcc 4920
 tgagaagaat cgacctttaa aggacagaat taatatagtt ctcagtagag aactcaaaga 4980
 accaccacga ggagctcatt ttcttgccaa agtttggat gatgccttaa gacttattga 5040
 acaaccggaa ttggcaagta aagtagacat ggtttggata gtcggaggca gttctgttta 5100
 ccagggaaggc atgaatcaac caggccacct tagactcttt gtgacaagga tcatgcagga 5160
 atttgaaagt gacacgtttt tccagaaat tgatttgggg aaatataaac ttctccaga 5220
 ataccaggc gtcctctctg aggtccagga ggaaaaaggc atcaagtata agtttgaagt 5280
 ctacgagaag aaagactaac aggaagatgc tttcaagttc tctgctcccc tctaaagct 5340
 atgcattttt ataagaccat gggacttttg ctggctttag atctctttgt gaaggaacct 5400
 tacttctgtg gtgtgacata attggacaaa ctacctacag agatttaaag ctctaaggta 5460
 aatataaaat ttttaagtgt ataattgttt aaactactga ttctaattgt ttgtgtattt 5520
 tagattccaa cctatggaac tgatgaatgg gagcagtggt ggaatgcctt taatgaggaa 5580
 aacctgtttt gctcagaaga aatgccatct agtgatgatg aggtactgc tgactctcaa 5640
 cattctactc ctccaaaaaa gaagagaaag gtagaagacc ccaaggactt tccttcagaa 5700
 ttgctaagtt ttttgagtca tgctgtgttt agtaatagaa ctcttgcttg ctttgctatt 5760
 tacaccacaa aggaaaaagc tgcactgcta tacaagaaaa ttatggaaaa atattctgta 5820
 acctttataa gtaggcataa cagttataat cataacatac tgttttttct tactccacac 5880
 aggcatagag tgtctgctat taataactat gctcaaaaat tgtgtacctt tagcttttta 5940
 atttgtaaag gggtaataa ggaatatttg atgtatagtg ccttgactag agatcataat 6000
 cagccatacc acattttag aggttttact tgctttaaaa aacctccac acctccccct 6060
 gaacctgaaa cataaaatga atgcaattgt tgttgtaaac ttgtttattg cagcttataa 6120

73 25.07.01

```

tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt tttcactgca 6180
ttctagttgt ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttat catgtctgga tcggctggat 6240
gacctccag cgcggggatc tcatgctgga gttcttcgcc caccccaact tgtttattgc 6300
agcttataat ggttacaaat aaagcaatag catcacaaat ttcacaaata aagcattttt 6360
ttcactgcat tctagttgtg gtttgtccaa actcatcaat gtatcttatc atgtctgtat 6420
accgtcgacc tctagctaga gcttggcgta atcatgggtca tagctgtttc ctgtgtgaaa 6480
ttgttatccg ctcaaatc cacacaacat acgagccgga agcataaagt gtaaagcctg 6540
gggtgcctaa tgagtgaagt aactcacatt aattgcgttg cgctcactgc ccgctttcca 6600
gtcgggaaac ctgtcgtgcc agctgcatta atgaatcggc caacgcgcgg ggagaggcgg 6660
tttgcttatt gggegtcttt ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct cggctcgttcg 6720
gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaa ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg 6780
ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa 6840
ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct ccgccccctc gacgagcatc aaaaaaatcg 6900
acgtcaagt cagaggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg cgtttcccc 6960
tggaagctcc ctctgctgct ctctgttcc gacctgccg cttaccggat acctgtccgc 7020
ctttctccct tcgggaagcg tggcgcttcc tcaatgctca cgctgtaggt atctcagttc 7080
ggtgtaggtc gttcgtcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgttc agcccgaccg 7140
ctgcgcctta tccgtaact atcgtcttga gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc 7200
actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga 7260
gttcttgaag tgggtggcta actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc 7320
tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaacaaac 7380
caccgctggt agcgggtggt tttttgttg caagcagcag attacgcgc gaaaaaagg 7440
atctcaagaa gatccttga tctttctac ggggtctgac gctcagtga acgaaaactc 7500
acgttaaggg attttggta tgagattatc aaaaaggatc ttacactaga tctttttaa 7560
ttaaaaatga agttttaaat caatctaaag tatatatgag taaacttgg ctgacagtta 7620
ccaatgctta atcagtgagg cacctatctc agcgatctgt ctatttcgtt catccatagt 7680
tgctgactc ccgctcgtgt agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag 7740
tgctgcaatg ataccgcgag acccagctc accggtcca gatttatcag caataaacca 7800
gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg tctgcaact ttatccgcct ccattccagtc 7860
tattaattgt tgccgggaag ctagagtaag tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaacgt 7920
tggtgccatt gctacaggca tctgtgtgtc acgctcgtcg tttggtatgg cttcattcag 7980
ctccggttcc caacgatcaa ggcgagttac atgatcccc atgttgtgca aaaaagcgg 8040
tagctccttc ggtctccga tctgtgtcag aagtaagttg gccgcagtgt tatcactcat 8100
ggttatggca gcactgcata attctcttac tgtcatgcca tccgtaagat gcttttctgt 8160
gactggtgag tactcaacca agtcattctg agaatagtgt atgcggcgac cgagttgctc 8220
ttgcccggcg tcaatacggg ataataccgc gccacatagc agaactttaa aagtgtcat 8280
cattgaaaaa cgttcttcgg ggogaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag 8340
ttcgatgtaa cccactcgtg cacccaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt 8400
ttctgggtga gaaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggaataa gggcgacacg 8460
gaaatgttga atactcatc tcttctttt tcaatattat tgaagcatt atcagggtta 8520
ttgtctcatg agcggatata tatttgaatg tatttagaaa aataaaciaa taggggttcc 8580
gcgcacattt ccccgaaaag tgccacctga cgtc 8614

```

<210> 6

<211> 8858

<212> DNA

<213> Lidská a myší

44:25:07:01

<400> 6

gacggatcgg gagatctgct agcccgggtg acctgaggcg cgccggcttc gaatagccag 60
 agtaaccttt ttttttaatt ttattttatt ttatttttga yatggagttt ggccgcatc 120
 tcccgatccc ctatggcga ctctcagrac aatctgctct gatgccgat agttaagcca 180
 gtatctgctc cctgcttgtg tgttgagggt cgctgagtag tgcgcgagca aaatttaagc 240
 tacaacaagg caaggcttga ccgacaattg catgaagaat ctgcttaggg ttaggcgttt 300
 tgcgctgctt cgcgatgtac gggccagata tacgcgttga cattgattat tgactagtta 360
 ttaatagtaa tcaattacgg ggtcattagt tcatagccca tatatggagt tccgcgttac 420
 ataacttacg gtaaattggc cgctggctg accgccaac gaccccgcc cattgacgtc 480
 aataatgacg tatgttccca tagtaacgcc aatagggact ttccattgac gtcaatgggt 540
 ggactattta cggtaaactg cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac 600
 gcccctatt gacgtcaatg acggtaaattg gcccgctgg cattatgcc agtacatgac 660
 cttatgggac tttcctactt ggagctacat ctacgtatta gtcacgcta ttaccatggt 720
 gatgcggttt tggcagtaca tcaatgggag tggatagcgg tttgactcac ggggatttcc 780
 aagtctccac ccattgacg tcaatgggag tttgttttgg caccaaaatc aacgggactt 840
 tccaaaatgt cgtaacaact ccgcccatt gacgcaaattg ggcggtaggc gtgtacggtg 900
 ggaggtctat ataagcagag ctctctggct aactagagaa cccactgctt actggcttat 960
 cgaaattaat acgactcact ataggagac ccaagcttgg taccatggaa gccccagctc 1020
 agcttctctt cctcctgcta ctctggctcc cagataccac cgagacatt gttctgactc 1080
 agtctccagc caccctgtct gtgactccag gagatagagt ctctctttcc tgcagggccca 1140
 gccagagtat tagcgactac ttactctggt atcaacaaaa atccatgag tctccaaggc 1200
 ttctcatcaa atatgcttcc cattccatct ctgggatccc ctccagggtc agtggcagtg 1260
 gatcagggtc agatttctact ctcagtatca acagtgtgga acctgaagat gttggaattt 1320
 attactgtca acatggctac agctttccgt ggacgttcgg tggaggcacc aagctggaaa 1380
 tcaaacgtaa gtctcgagtc tctagataac cggtaaatcg gtcaatcgat tgggaattcta 1440
 aactctgagg gggctggatg acgtggccat tctttgcta aagcattgag tttactgcaa 1500
 ggtcagaaaa gcatgcaaa cctcagaat ggctgcaaa agctccaaca aaacaattta 1560
 gaactttatt aaggaatagg gggaagctag gaagaaactc aaaacatcaa gattttaaat 1620
 acgcttcttg gtctccttgc tataattatc tgggataagc atgctgtttt ctgtctgtcc 1680
 ctaacatgcc cttatccgca aacaacacac ccaagggcag aactttgtta cttaaaccac 1740
 atcctgtttg cttctttcct gaggaactgt ggctgcacca tctgtcttca tcttccgcc 1800
 atctgatgag cagttgaaat ctggaactgc ctctgttgtg tgcctgtga ataacttcta 1860
 tcccagagag gccaaagtac agtgggaagg ggataacgcc ctccaatcgg gtaactccca 1920
 ggagagtgtc acagagcagg acagcaagga cagcacctac agcctcagca gcaccctgac 1980
 gctgagcaaa gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc tgcgaagtca cccatcaggg 2040
 cctgagctcg ccgctcaca agagcttcaa caggggagag tgttagaggg agaagtgcct 2100
 ccacctgtc ctacgttcca gcctgacccc ctccatcct ttggcctctg accctttttc 2160
 cacaggggac ctacccctat tgcggtcctc cagctcatct ttcacctcac cccctcctc 2220
 ctcttgggt ttaattatgc taatgttga ggagaatgaa taaataaagt gaatctttgc 2280
 acctgtggtt tctctcttcc ctcatttaat aattattatc tgttgtttta ccaactactc 2340
 aatttctctt ataagggact aaatatgtag tcatcctaag gcacgtaacc atttataaaa 2400
 atcatccttc attctatttt accctatcat cctctgcaag acagtcctcc ctcaaaccac 2460
 caagccttct gtcctcacag tcccctgggc catggtagga gagacttgc tcttgtttt 2520
 cccctcctca gcaagccctc atagtccttt ttaagggtga caggtcttac agtcatatat 2580
 cttttgattc aattccctga gaatcaacca aagcaaattt ttcaaaagaa gaaacctgct 2640
 ataaagagaa tcattcattg caacatgata taaaataaca acacaataaa agcaattaaa 2700
 taaacaaaca atagggaat gtttaagttc atcatggtac ttagacttaa tggaatgtca 2760
 tgccttattt acatttttaa acagggtactg agggactcct gtctgccaag ggccgtattg 2820

4 25.07.01

agtactttcc acaacctaata ttaatccaca ctatactgtg agattaaaaa cattcattaa 2880
 aatgtttgcaa aggtttctata aagctgagag acaaataatat tctataactc agcaatccca 2940
 cttctagatg actgagtgct cccacccacc aaaaaactat gcaagaatgt tcaaagcagc 3000
 tttattttaca aaagccaaaa attggaaata gcccgattgt ccaacaatag aatgagttat 3060
 taaactgtgg tatgtttata cattagaata cccaatgagg agaattaaca agctacaact 3120
 atacctactc acacagatga atctcataaa aataatgtta cataagagaa actcaatgca 3180
 aaagatatgt tctgtatgtt ttcattccata taaagttcaa aaccaggtaa aaataaagtt 3240
 agaaaatttg atggaaaatta ctcttagctg ggggtgggag agtttagtgc tgggagaaga 3300
 caagaagggg cttctggggg cttggtaatg ttctgttctt cgtgtggggg tgtgcagtta 3360
 tgatctgtgc actgttctgt atacacatta tgcttcaaaa taacttcaca taaagaacat 3420
 cttataccca gttaatatag agaagaagaa taagtaatat gtcaagacca acgcagctgg 3480
 taagtggggg cctgggatca aatagctacc tgctaatcc tgccwcttg agccctgaat 3540
 gagtctgcct tccagggtc aaggtgctca acaaaacaac aggcctgcta ttttctggc 3600
 atctgtgccc tgtttggcta gctaggagca cacatacata gaaattaaat gaaacagacc 3660
 ttcagcaagg ggacagagga cagaattaac cttgcccaga cactggaaac ccatgtatga 3720
 aactcacat gtttggaag ggggaagggc acatgtaaat gaggactctt cctcattcta 3780
 tggggcactc tggccctgcc cctctcagct actcatccat ccaacacacc tttctaagta 3840
 cctctctctg cctacactct gaaggggttc aggagtaact aacacagcat cccttccctc 3900
 aaatgactga caatcccttt gtctgtctt gtttttctt ccagtcagta ctgggaaagt 3960
 ggggaaggac agtcatggag aaactacata aggaagcacc ttgcccttct gcctcttgag 4020
 aatgttgatg agtatcaaat ctttcaaaact ttggaggttt gagtaggggt gagactcagt 4080
 aatgtccctt ccaatgacat gaacttgctc actcatccct gggggccaaa ttgaacaatc 4140
 aaaggcaggc ataatccagt tatgaattct tgcggcgct tgctagcttc acgtgttgga 4200
 tccaaccgag gaagggccct attctatagt gtcacctaaa tgctagagct cgctgatcag 4260
 cctcgactgt gccttctagt tgccagccat ctgttgtttg cccctcccc gtgccttctt 4320
 tgacctgga aggtgccact cccactgtcc tttcctaata aaataggaa attgcatcgc 4380
 attgtctgag taggtgtcat tctattcttg ggggtggggg ggggcaggac agcaaggggg 4440
 aggatrggga agacaatagc aggcattgtg gggatgcggg gggctctatg gcttctgagg 4500
 cggaagaac cagctggggc tctagggggg atccccacgc gccctgtagc ggcgattaa 4560
 gcgcggcggg tgtggtggtt acgcgcagcg tgaccgctac acttgccagc gccctagcgc 4620
 ccgctccttt cgtttcttc ccttctttt tcgccacgtt cgccgggcct ctcaaaaaag 4680
 ggaaaaaag catgcatctc aattagtcag caaccatagt ccgccccct actccgcccc 4740
 tcccgcctt aactccgccc agttccgccc attctccgcc ccatggctga ctaatttttt 4800
 ttatttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag tagtgaggag 4860
 gcttttttg aggcctaggc ttttgcaaaa agcttggaca gctcagggt gcgatttcgc 4920
 gccaaacttg acggcaatcc tagcgtgaag gctggtagga ttttatcccc gctgccatca 4980
 tggttcgacc attgaactgc atcgtcgccg tgtcccaaaa tatggggatt ggcaagaacg 5040
 gagactacc ctggcctccg ctccaggaacg agttcaagta cttccaaaga atgaccacaa 5100
 cctcttcagt ggaaggtaaa cagaatctgg tgattatggg taggaaaacc tggttctcca 5160
 ttcctgagaa gaatcgacct ttaaaggaca gaattaatat agttctcagt agagaactca 5220
 aagaaccacc acgaggagct cattttcttg ccaaaagttt ggatgatgcc ttaagactta 5280
 ttgaacaacc ggaattggca agtaaagtag acatggtttg gatagtcgga ggcagttctg 5340
 tttaccagga agccatgaat caaccaggcc accttagact ctttgtgaca aggatcatgc 5400
 aggaatttga aagtgcacgc tttttcccag aaattgattt ggggaaatat aaacttctcc 5460
 cagaataccc aggcgtctc tctgaggtcc agggagaaaa aggcattcaag tataagtttg 5520
 aagtctacga gaagaaagac taacaggaag atgctttcaa gttctctgct cccctcctaa 5580
 agctatgcat ttttataaga ccatgggact tttgctggct ttagatctct ttgtgaagga 5640
 accttacttc tgtggtgtga cataattgga caaactacct acagagattt aaagctctaa 5700

46 25.07.01

ggtaaatata aaatttttta gtgtataatg tggttaaacta ctgattctaa ttgtttgtgt 5760
 atttttagatt ccaacctatg gaactgatga atgggagcag tgggtggaatg cctttaatga 5820
 ggaaaacctg ttttgctcag aagaaatgcc atctagtgat gatgaggcta ctgctgactc 5880
 tcaacattct actcctccaa aaaagaagag aaaggtagaa gaccccaagg actttccttc 5940
 agaattgcta agttttttga gtcagtctgt gtttagtaat agaactcttg cttgctttgc 6000
 tatttacacc acaaaggaaa aagctgcact gctatacaag aaaattatgg aaaaatattc 6060
 tgtaaccttt ataagtaggc ataacagtta taatcataac atactgtttt ttcttactcc 6120
 acacaggcat agagtgtctg ctattaataa ctatgctcaa aaattgtgta ccttttagctt 6180
 ttttaattgt aaaggggtta ataaggaata tttgatgtat agtgccttga ctagagatca 6240
 taatcagcca taccacattt gtagaggttt tacttgcttt aaaaaacctc ccacacctcc 6300
 cctgaacct gaaacataaa atgaatgcaa ttgttgttgt taacttggtt attgcagctt 6360
 ataatggtta caaataaagc aatagcatca caaatttcac aaataaagca tttttttcac 6420
 tgcattctag ttgtgggttg tccaaactca tcaatgtatc ttatcatgtc tggatcggct 6480
 ggatgatcct ccagcgcggg gatctcatgc tggagtctct cgccacccc aacttgttta 6540
 ttgcagctta taatggttac aaataaagca atagcatcac aaatttcaca aataaagcat 6600
 ttttttact gcattctagt tgtgggttgt ccaaactcat caatgtatct tatcatgtct 6660
 gtataccgtc gacctctagc tagagcttgg cgtaatcatg gtcatactgt tttcctgtgt 6720
 gaaattgtta tccgctcaca attccacaca acatacgagc cggaagcata aagtgtaaag 6780
 cctgggggtgc ctaatgagtg agctaactca cattaattgc gttgcgctca ctgccgctt 6840
 tccagtcggg aaacctgtcg tgccagctgc attaatgaat cggccaacgc gcggggagag 6900
 gcggtttgcg tattggggcg tcttccgctt cctcgctcac tgactcgctg cgctcggtcg 6960
 ttcggtgcg gcgagcggtt tcagctcact caaaggcggt aatacgggta tccacagaat 7020
 caggggataa cgcaggaaaag aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta 7080
 aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata ggctccgccc cctgacgag catcacaaaa 7140
 atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcggttc 7200
 cccctggaag ctccctcggt cgctctctg ttcgacctt gccgcttacc ggatacctgt 7260
 cgcctttct ccttcggga agcgtggcg tttctcaatg ctacgctgt aggtatctca 7320
 gttcgggtgta ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gttcagcccc 7380
 accgctgcgc cttatccggt aactatcgtc ttgagtcaca cccgtaaga cagacttat 7440
 cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta 7500
 cagagttctt gaagtgggtg octaactacg gctacactag aaggacagta tttggtatct 7560
 gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac 7620
 aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa 7680
 aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag tggaaacgaaa 7740
 actcacgtta agggattttg gtcagtgat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt 7800
 taaattaaaa atgaagtttt aaatcaatc aaagtatata tgagttaaact tggctcgaca 7860
 gttaccaatg cttaatcagt gaggcacct tctcagcgat ctgtctatct cgttcatcca 7920
 tagttgcctg actccccgtc gtgtagataa ctacgatacg ggagggtta ccatctggcc 7980
 ccagtgtgc aatgataaccg cgagaccac gctcaccggc tccagattta tcagcaataa 8040
 accagccagc cggaagggcc gagcgcagaa gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc 8100
 agtctattaa ttgttgccgg gaagctagag taagtagttc gccagttaat agtttgcgca 8160
 acgttggtgc cattgctaca ggcacgtgg tgtcacgctc gtcgtttggt atggctcat 8220
 tcagctccgg tcccaacga tcaaggcgag ttacatgat ccccatgttg tgcaaaaaag 8280
 cggtagctc cttcggtcct ccgacgttg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac 8340
 tcatggttat ggcagcactg cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt 8400
 ctgtgactgg tgagtactca accaagtcac tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt 8460
 gctcttgccc ggcgtcaata cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc 8520
 tcatcattgg aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat 8580

47 25.07.01

ccagttcgat gtaacccact cgtgcaccca actgatcttc agcatctttt actttcacca 8640
gcgtttcttg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaagga ataagggcga 8700
cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg 8760
gttattgtct catgagcgga tacatatattg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg 8820
ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctgacgtc 8858

<210> 7

<211> 321

<212> DNA

<213> Lidské a myši

<400> 7

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtattagc gattacttac attggtacca acagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctattac gcatccact ccactcttg catccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcat ggccactctt ttccttggac cttcggaggg 300
gggaccaagg tggaaattaa a 321

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> Lidská a myši

<400> 8

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Tyr
20 25 30

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

Tyr Tyr Ala Ser His Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Gly His Ser Phe Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 9

48 25.07.01

<211> 366

<212> DNA

<213> Lidská a myší

<400> 9

caggtgcagc tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctgggggcctc agtgaagggtt 60
 tcctgcaagg cttctggata cgccttcact accactggca tgcagtgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacaccc acagcggggt cccaaagtat 180
 gtcgaggact tcaaaggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaggac actgccgtgt attactgtgc gagatctggc 300
 aatgggaact atgacctggc atactttaag tattggggcc agggaaccct ggtcaccgtc 360
 tcctca 366

<210> 10

<211> 122

<212> PRT

<213> Lidské a myší

<400> 10

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Val Glu Asp Phe
 50 55 60

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

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Gly Asn Gly Asn Tyr Asp Leu Ala Tyr Phe Lys Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 11

<211> 321

<212> DNA

<213> Lidská a myší

49 25.07.01

<400> 11

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gattattagc gattacttac attggtacca acagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctattac gcatccact ccatctctgg catccagacc 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttactctca cactagcag cctagagcct 240
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcat ggccactott atccttggac cttcggaggg 300
 gggaccaagg tggaaattaa a 321

<210> 12

<211> 107

<212> PRT

<213> Lidské a myši

<400> 12

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Tyr
 20 25 30

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

Tyr Tyr Ala Ser His Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Gly His Ser Tyr Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 13

<211> 366

<212> DNA

<213> Lidská a myši

<400> 13

cagatccagt tgggtgcaatc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaggatc 60
 tcctgcaagg cttctgggta tgccttcaca actactggaa tgcagtgggt gcaagagatg 120
 ccaggaaaagg gtttgaagtg gattggctgg ataaacaccc actctggagt gcaaaaatat 180
 gtagaagact tcaagggacg gtttgccttc tctttggaaa cctctgcaa cactgcatat 240
 ttacagataa gcaacctcaa aaatgaggac acggctacgt atttctgtgt gagatccggg 300

80 25.07.01

aatggtaact atgacctggc ctactttgct tactggggcc aagggaact ggtcactgtc 360
tctgca 366

<210> 14

<211> 324

<212> DNA

<213> Lidská a myší

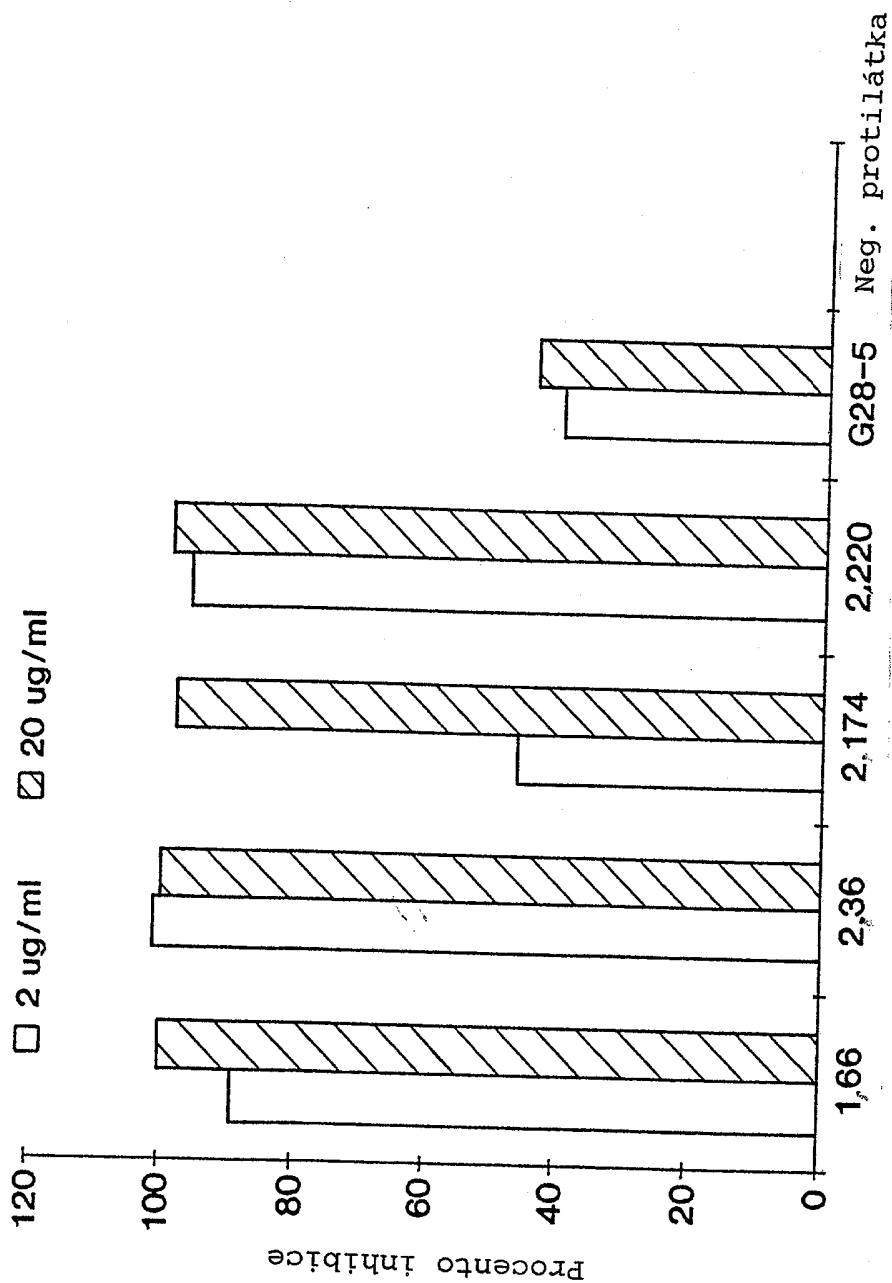
<400> 14

gacattgttc tgactcagtc tccagccacc ctgtctgtga ctccaggaga tagagtctct 60
ctttcctgca gggccagcca gagtattagc gactacttac actgggatca acaaaaatca 120
catgagtctc caaggcttct catcaaata gtttccatt ccatctctgg gatccccctc 180
aggttcagtg gcagtggatc agggtcagat ttcaactctca gtatcaacag tgtggaacct 240
gaagatgttg gaatttatta ctgtcaacat ggtcacagct ttccgtggac gttcgggtga 300
ggcaccaagc tggaaatcaa acgt 324

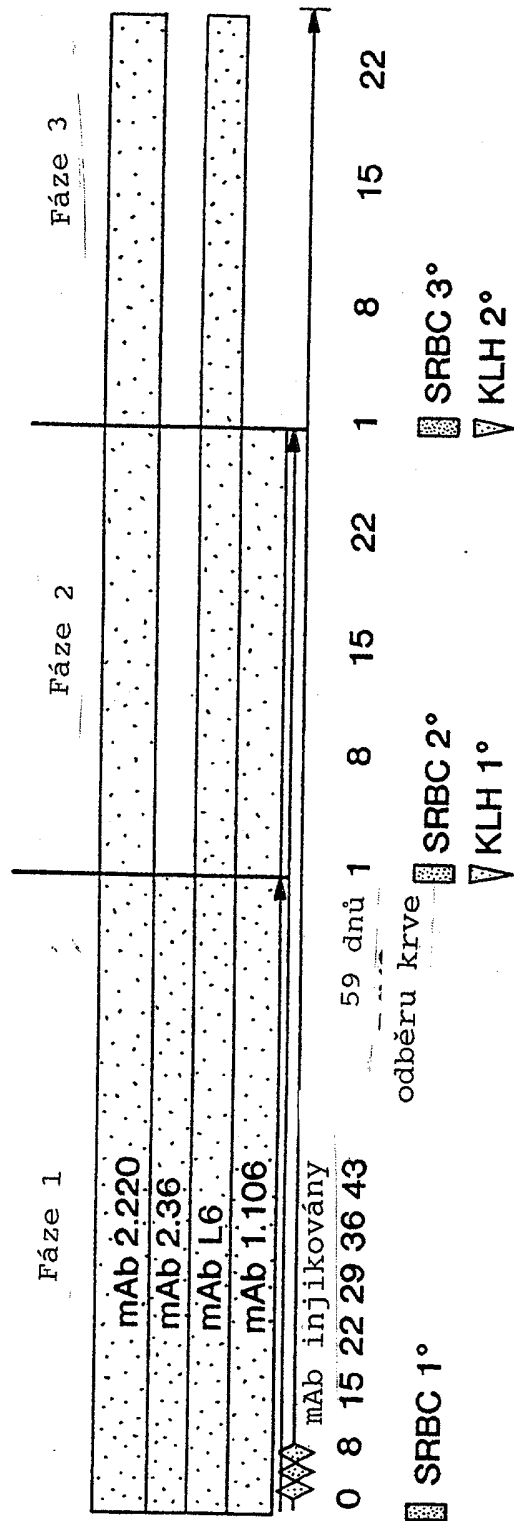
25.07.01

PV 2070 - 3008

561185

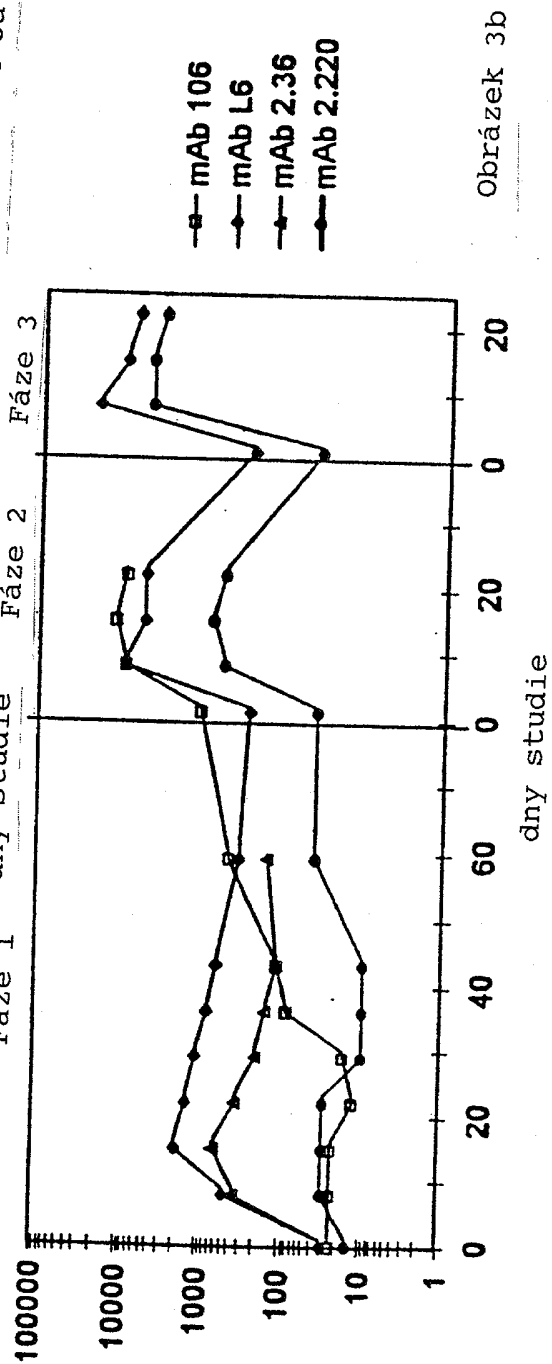
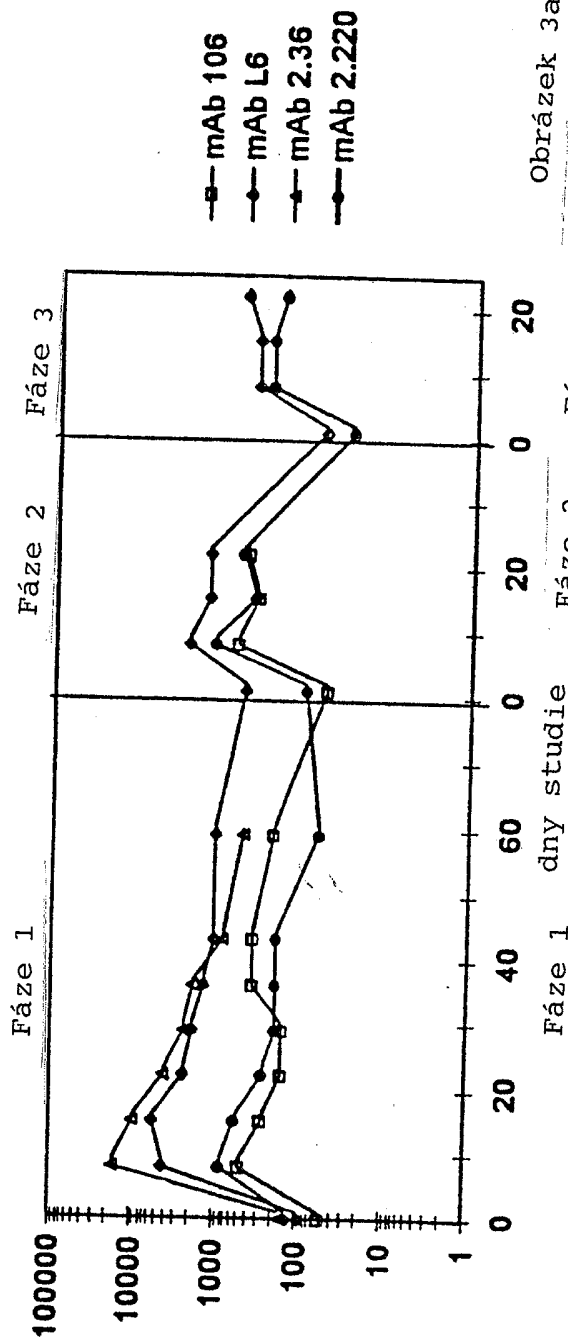


Obrázek 1



Obrázek 2

25.07.01



A) Proměnná oblast lehkého řetězce (SEQ ID NO:1) .

MEAPAOLLFLLLWLPDTTGDIVLTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQSISDYLHWYQQKS
HESPRLLIKYASHSISGIPSRFSGSGSDFTLSINSVEPEDVGIYYCQHGHSPWTFGG
GTKLEIKR

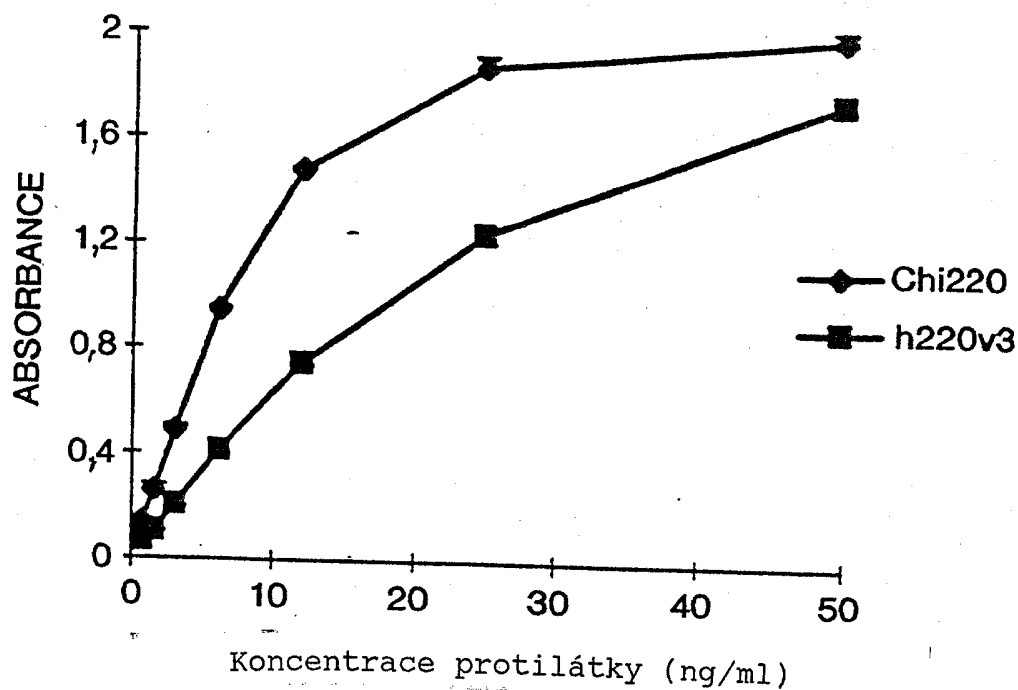
B) Proměnná oblast těžkého řetězce (SEQ ID NO:2) .

MDWTWRILFLVAAATGAHSQIQLVQSGPELKKPGETVRISCKASGYAFTTGMQWVQEMP
GKGLKWIGWINTHSGVPKYVEDFKGRFALSETSANTAYLQISNLKNEDTATYFCVRSNG
GNYDLAYFAYWGQGLVTVSA

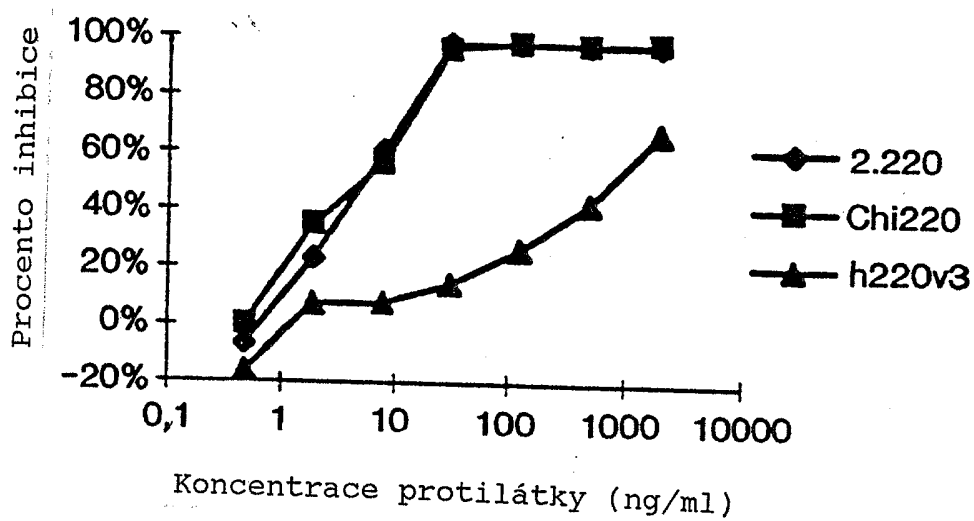
Obrázek 4

250701

25.07.01

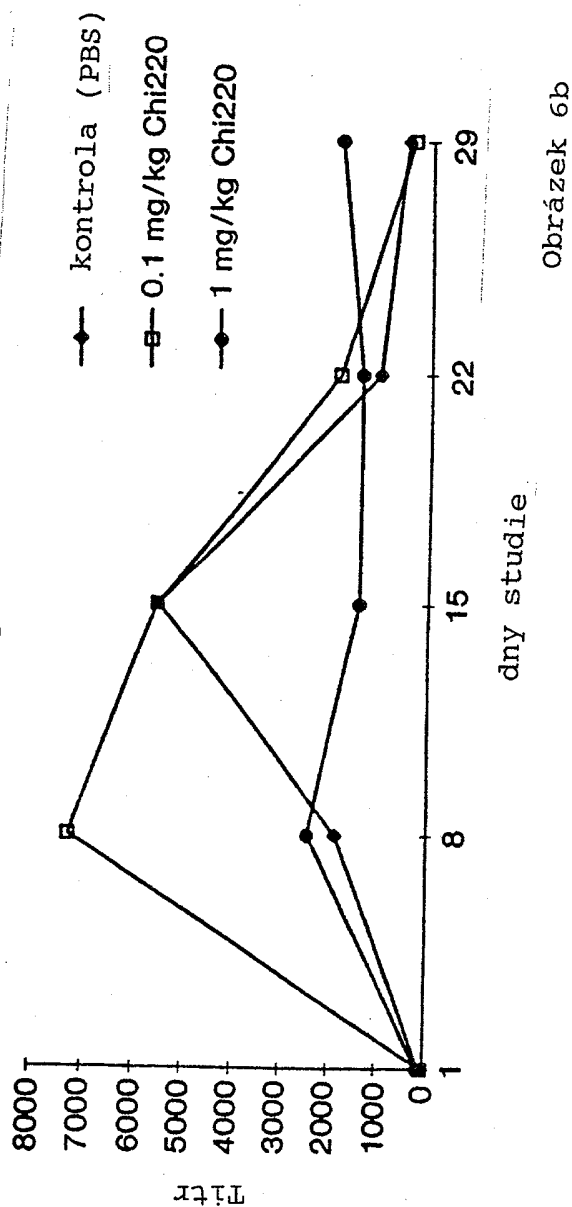
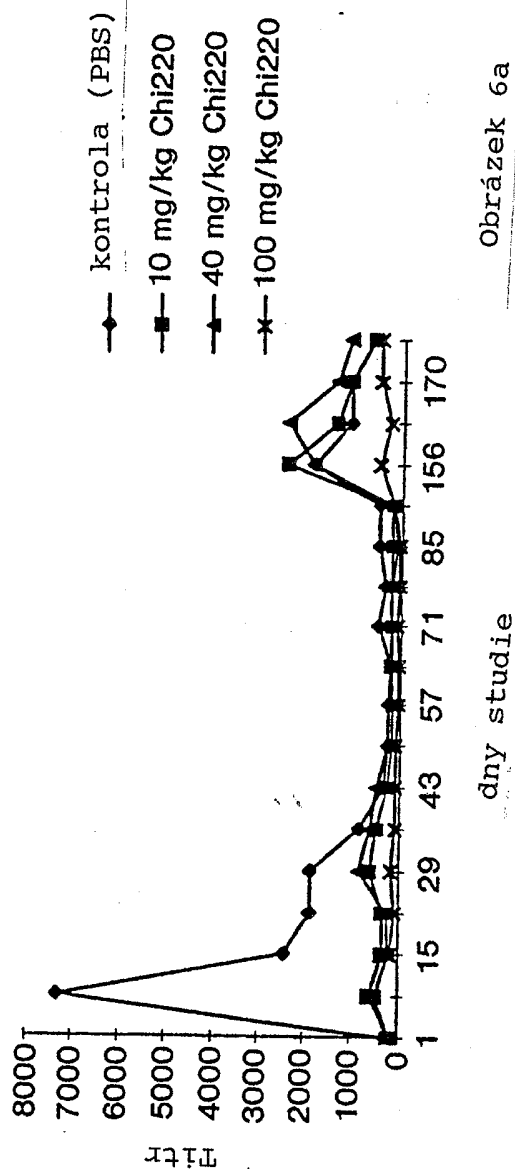


Obrázek 5a

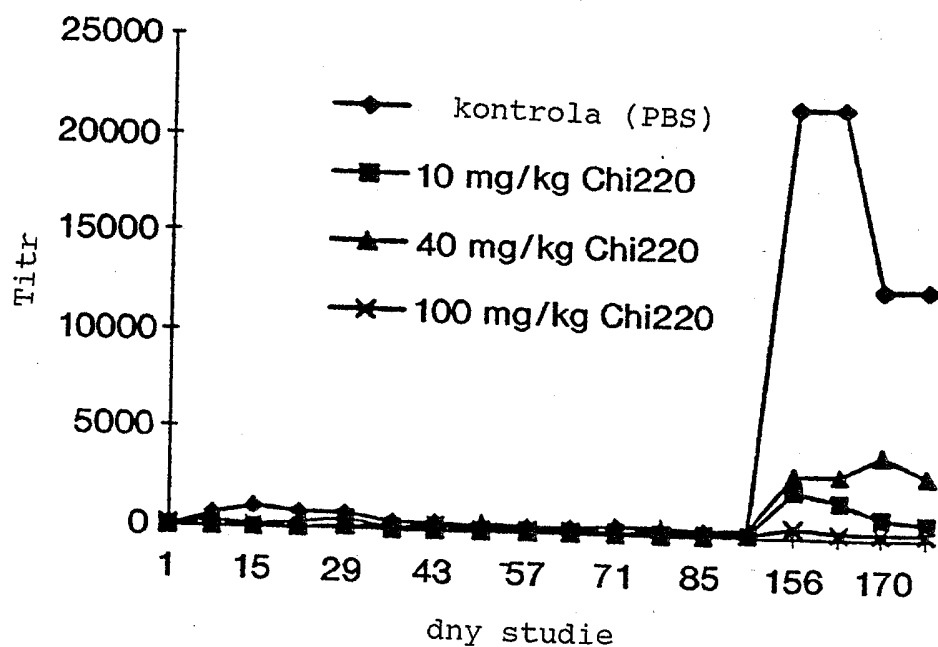


Obrázek 5b

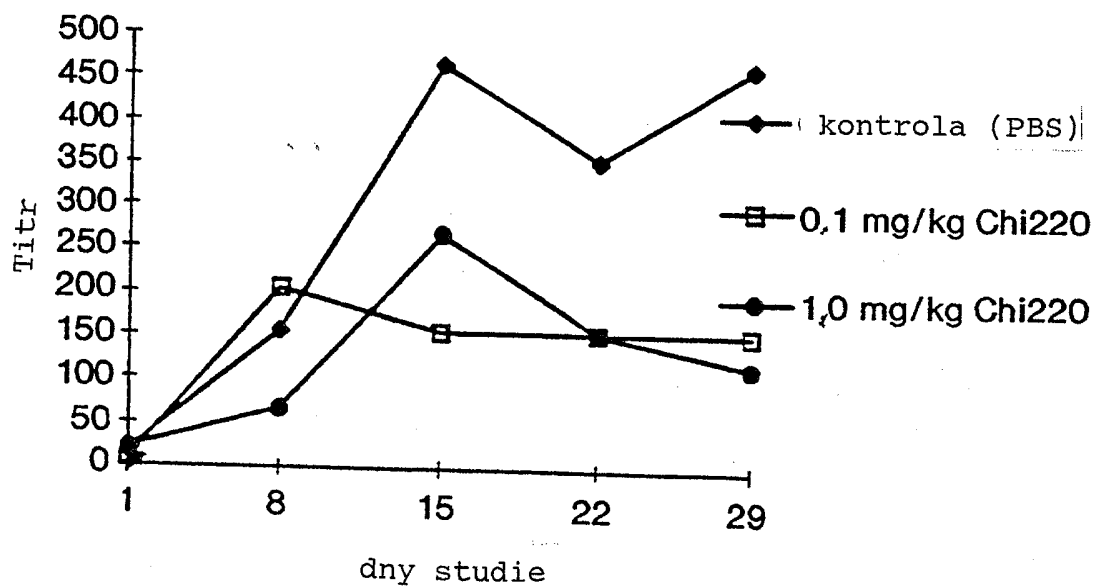
25.07.01



25.07.01

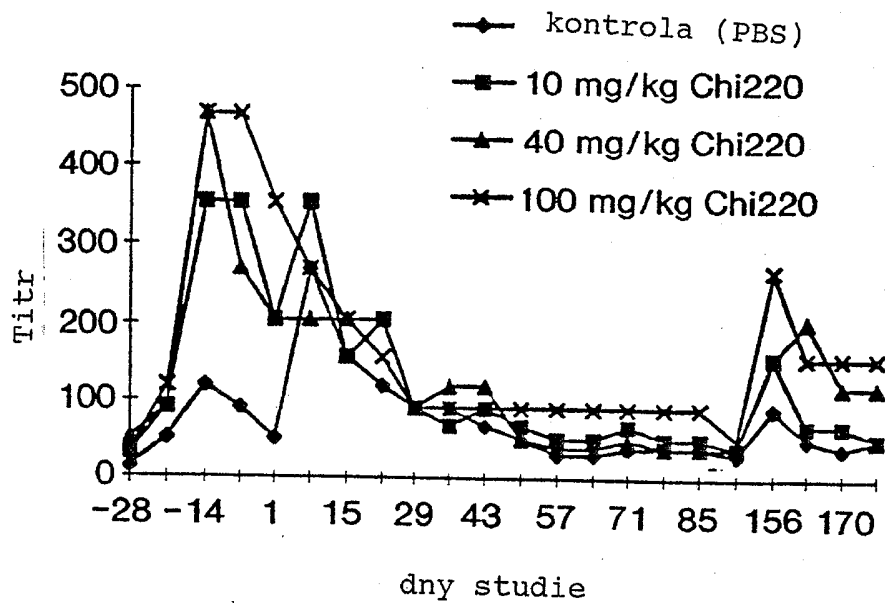


Obrázek 7a

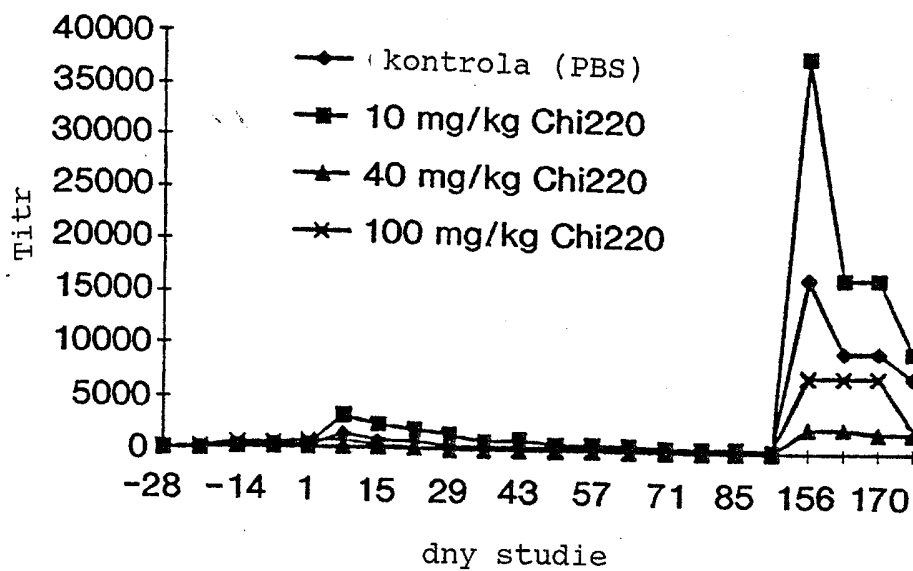


Obrázek 7b

25.07.01

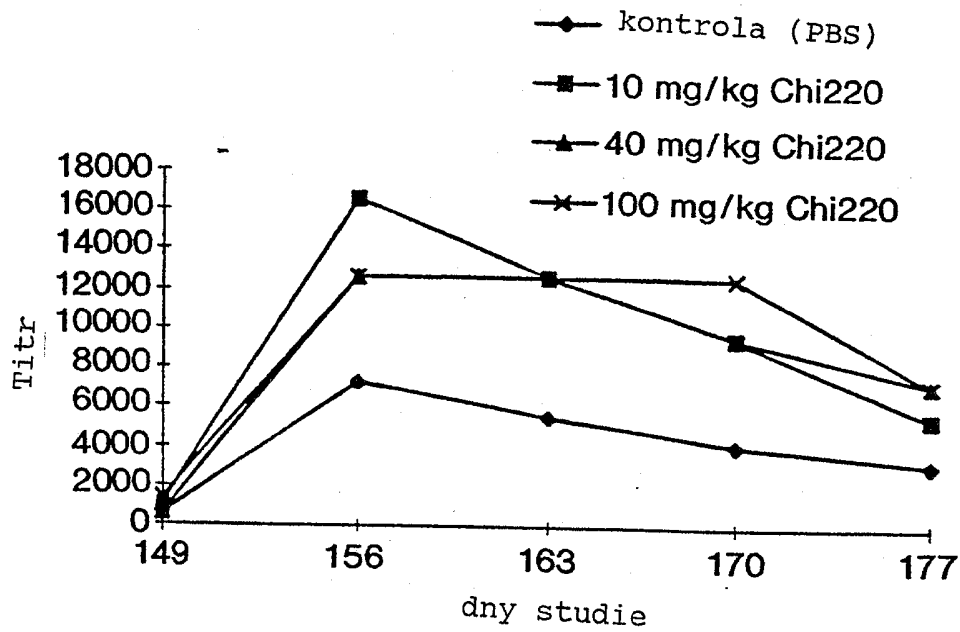


Obrázek 8a

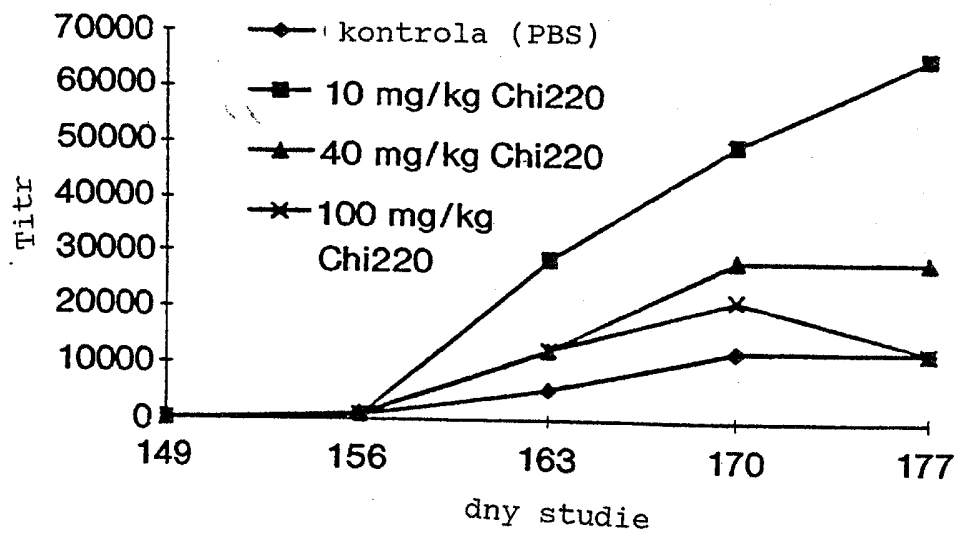


Obrázek 8b

25.07.01

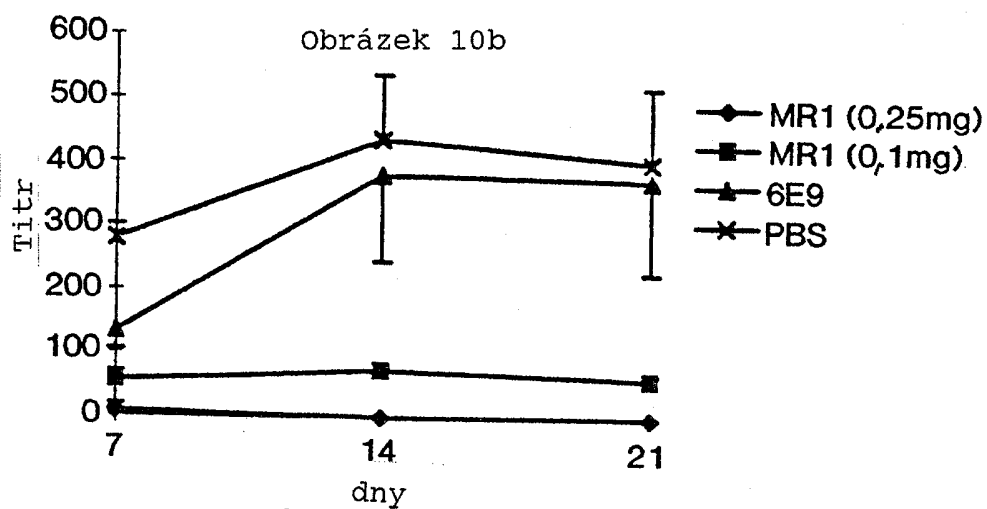
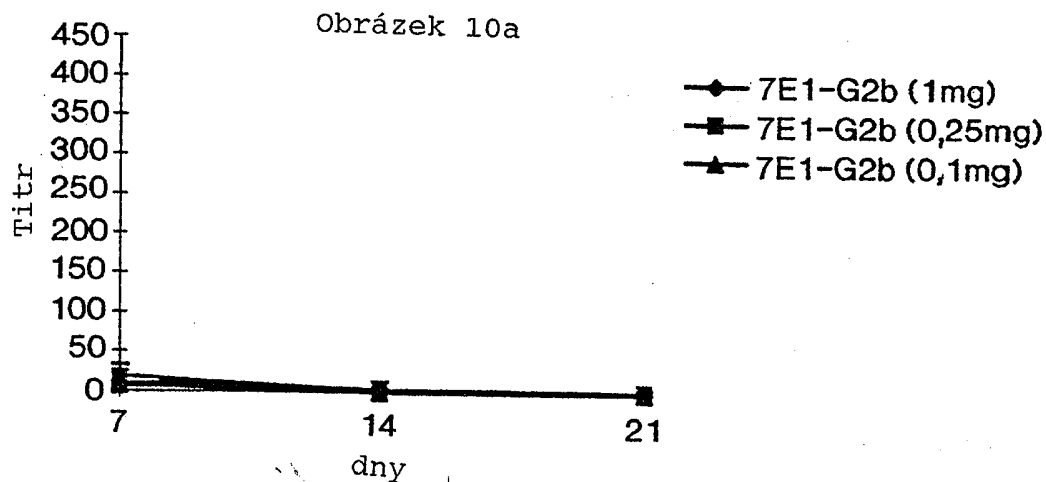
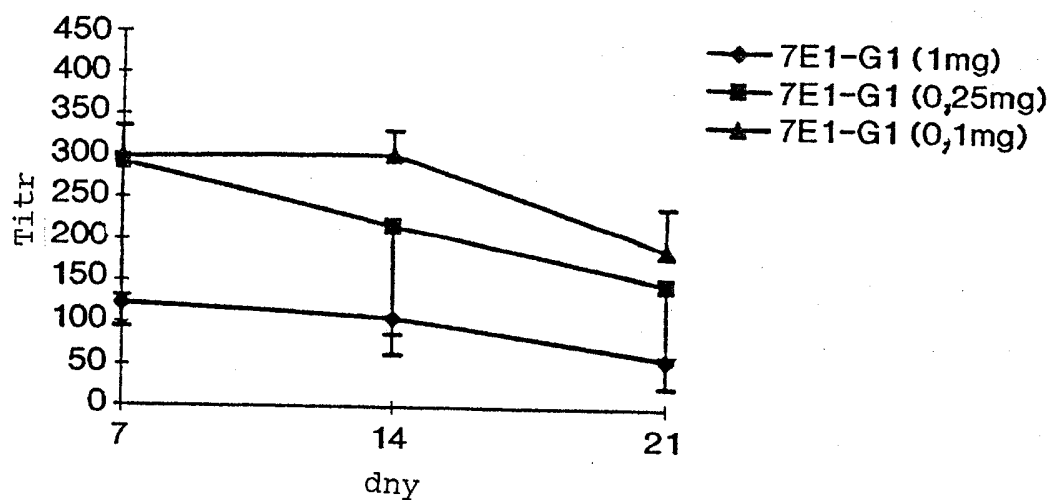


Obrázek 9a

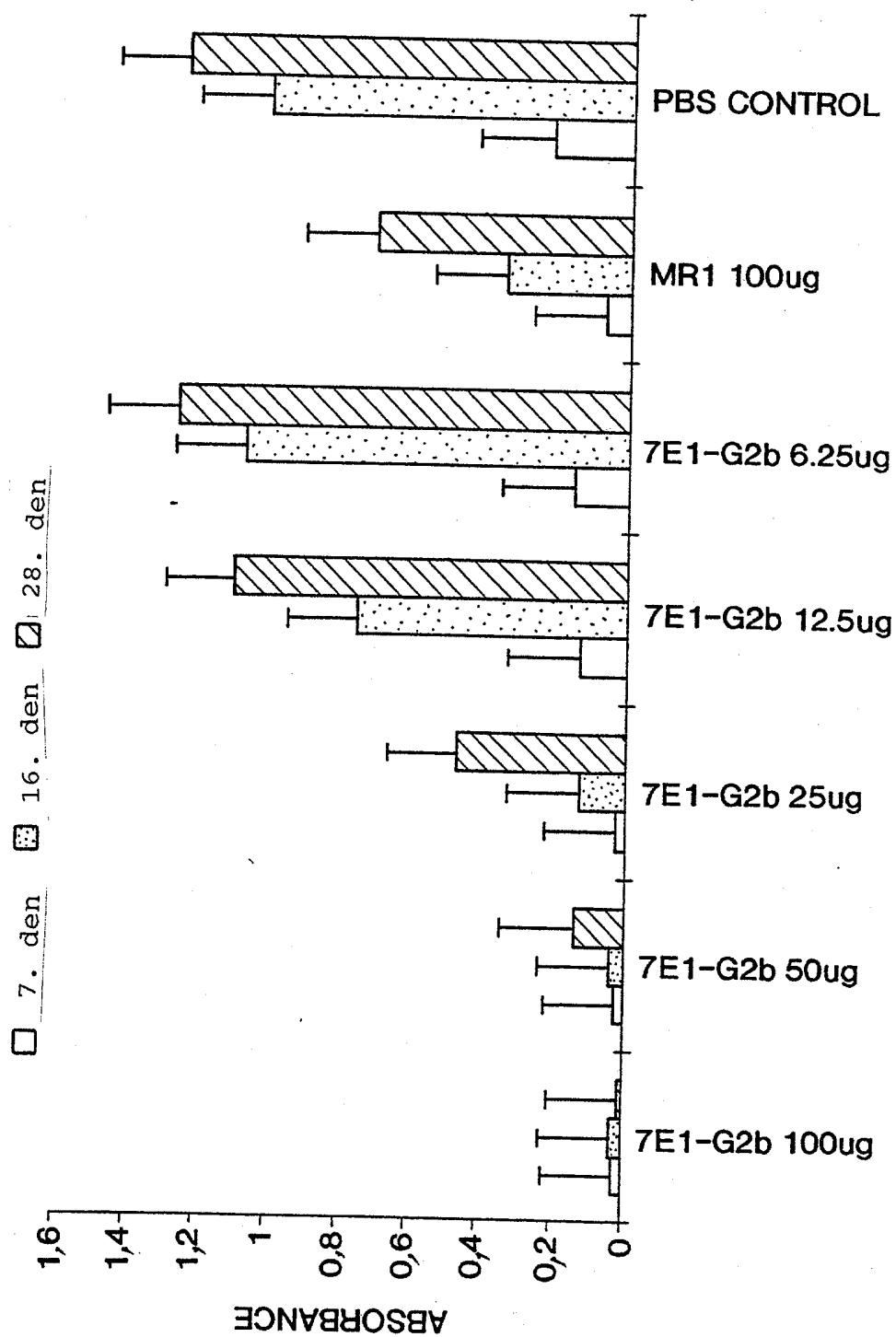


Obrázek 9b

25.07.01

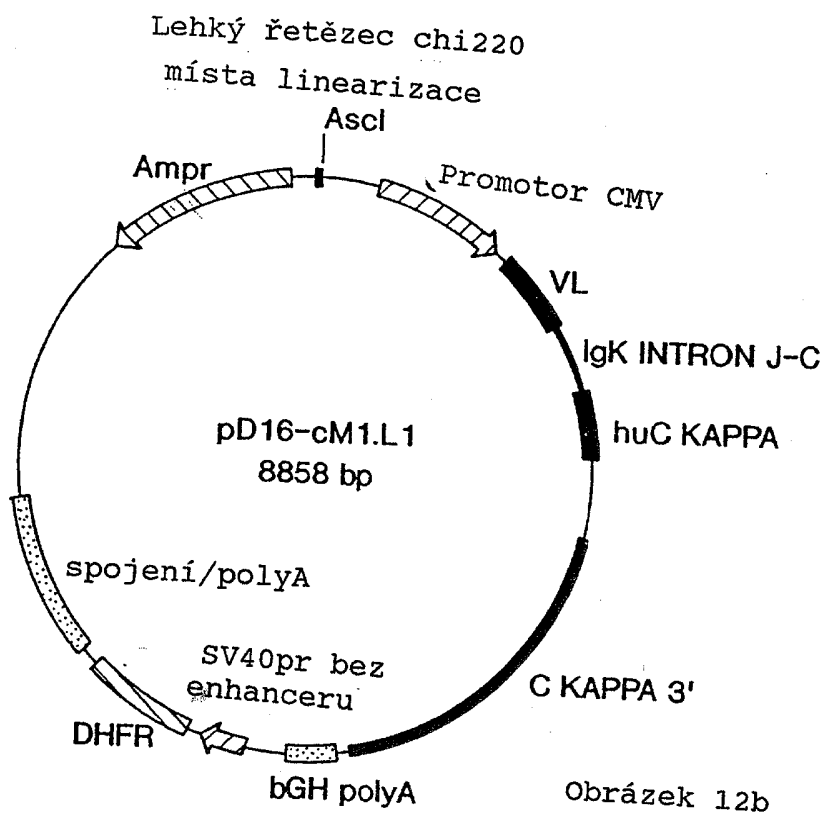
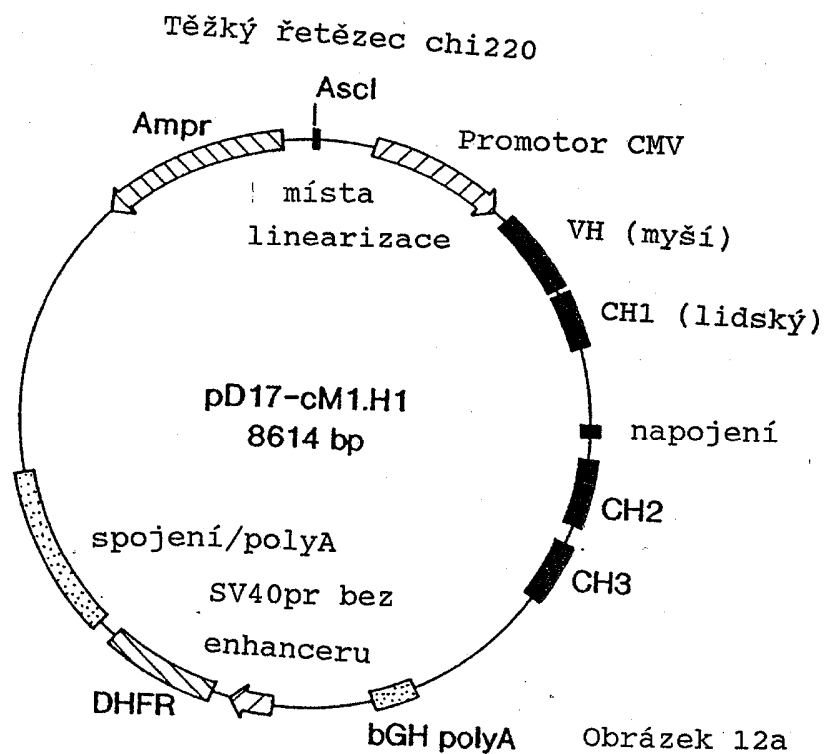


25.07.01



Obrázek 11

25.07.01



25.07.01

1 GACGGATCGG GAGATCTGCT AGGTGACCTG AGGCGCGCCG GCTTCGAATA GCCAGAGTAA
 61 CCTTTTTTTT TAATTTTATT TTATTTTATT TTTGAGATGG AGTTTGGCGC CGATCTCCCG
 121 ATCCCCTATG GTCGACTCTC AGTACAATCT GCTCTGATGC CGCATAGTTA AGCCAGTATC
 181 TGCTCCCTGC TTGTGTGTTG GAGGTGCTG AGTAGTGCGC GAGCAAAATT TAAGCTACAA
 241 CAAGGCAAGG CTTGACCGAC AATTGCATGA AGAATCTGCT TAGGGTTAGG CGTTTTCGCG
 301 TGCTTCGCGA TGTACGGGCC AGATATACGC GTTGACATTG ATTATTGACT AGTTATTAAT
 361 AGTAATCAAT TACGGGGTCA TTAGTTCATA GCCCATATAT GGAGTTCCGC GTTACATAAC
 421 TTACGGTAAA TGGCCCGCCT GGCTGACCGC CCAACGACCC CCGCCCATTG ACGTCAATAA
 481 TGACGTATGT TCCCATAGTA ACGCCAATAG GGACTTTCCA TTGACGTCAA TGGGTGGACT
 541 ATTTACGGTA AACTGCCCCA TTGGCAGTAC ATCAAGTGTA TCATATGCCA AGTACGCCCC
 601 CTATTGACGT CAATGACGGT AAATGGCCCC CCTGGCATTG TGCCAGTAC ATGACCTTAT
 661 GGGACTTTCC TACTTGGCAG TACATCTACG TATTAGTCAT CGCTATTACC ATGGTGATGC
 721 GGTTTTGGCA GTACATCAAT GGGCGTGGAT AGCGGTTTGA CTCACGGGGA TTTCCAAGTC
 781 TCCACCCCAT TGACGTCAAT GGGAGTTTGT TTTGGCACCA AAATCAACGG GACTTTCCAA
 841 AATGTCGTAA CAACTCCGCC CCATTGACGC AAATGGGCGG TAGGCGTGTA CGGTGGGAGG
 901 TCTATATAAG CAGAGCTCTC TGGCTAACTA GAGAACCCAC TGCTTACTGG CTTATCGAAA
 961 TTAATACGAC TCACTATAGG GAGACCCAAG CTTGGTACCA TGGACTGGAC CTGGAGAATC
 1021 CTCTTCTTGG TGGCAGCAGC AACAGGTGCC CACTCCCGA TCCAGTTGGT GCAATCTGGA
 1081 CCTGAGCTGA AGAAGCCTGG AGAGACAGTC AGGATCTCCT GCAAGGCTTC TGGGTATGCC
 1141 TTCACAACTA CTGGAATGCA GTGGGTGCAA GAGATGCCAG GAAAGGGTTT GAAGTGGATT
 1201 GGCTGGATAA ACACCCACTC TGGAGTGCCA AAATATGTAG AAGACTTCAA GGGACGGTTT
 1261 GCCTTCTCTT TGGAAACCTC TGCCAACACT GCATATTTAC AGATAAGCAA CCTCAAAAAT
 1321 GAGGACACGG CTACGTATTT CTGTGTGAGA TCCGGGAATG GTAACATGA CCTGGCCTAG
 1381 TTTGCTTACT GGGGCCAAGG GACACTGGTC ACTGTCTCTG CAGCTAGCAC CAAGGGCCCA
 1441 TCGGTCTTCC CCCTGGCACC CTCTTCCAAG AGCACCTCTG GGGGCACAGC GGCCCTGGGC
 1501 TGCCTGGTCA AGGACTACTT CCCCAGAACG GTGACGGTGT CGTGGAATC AGGCGCCCTG
 1561 ACCAGCGGCG TGCACACCTT CCGGCTGTC CTACAGTCCT CAGGACTCTA CTCCCTCAGC
 1621 AGCGTGGTGA CCGTGCCCTC CAGCAGCTTG GGCACCCAGA CCTACATCTG CAACGTGAAT
 1681 CACAAGCCCA GCAACACCA GGTGGACAAG AAAGTTGGTG AGAGGGCCAGC ACAGGGAGGG
 1741 AGGGTGTCTG CTGGAAGCCA GGCAGACCGT TCCTGCCTGG ACGCATCCCG GCTATGCAGC
 1801 CCCAGTCCAG GGCAGCAAGG CAGGCCCGGT CTGCTCTTTC ACCCGGAGGC CTCTGCCCGC
 1861 CCCACTCATG CTCAGGGAGA GGGTCTTCTG GCTTTTTCCT CAGGCTCTGG GCAGGCACAG
 1921 GCTAGGTGCC CCTAACCCAG GCCCTGCACA CAAAGGGGCA GGTGCTGGGC TCAGAACTGC
 1981 CAAGAGCCAT ATCCGGGAGG ACCCTGCCCC TGACCTAAGC CCACCCCAA GGCCAACTC
 2041 TCCACTCCCT CAGCTCGGAC ACCTTCTCTC CTCCCAGATT CCAGTAACTC CCAATCTTCT
 2101 CTCTGCAGAG CCCAAATCTT GTGACAAAAC TCACACATGC CCACCGTGCC CAGGTAAGCC
 2161 AGCCCAGGCC TCGCCCTCCA GCTCAAGGCG GGACAGGTGC CCTAGAGTAG CCTGCATCCA
 2221 GGGACAGGCC CCAGCCGGGT GCTGACACGT CCACCTCCAT CTCTTCCTCA GCACCTGAAC
 2281 TCCTGGGGGG ACCGTCAGTC TTCCTCTTCC CCCCAAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT
 2341 CCGGACCCC TGAGGTCACA TGGCTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCTGAGGTCA
 2401 AGTTCAACTG GTACGTGGAC GGCCTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG
 2461 AGCAGTACAA CAGCACGTAC CGTGTGGTCA GCGTCTCAC CAGGACTGGC CCCATCGAGA
 2521 TGAATGGCAA GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CCTCCAGCC CCCATCGAGA
 2581 AAACCATCTC CAAAGCCAAA GGTGGGACCC GTGGGGTGCG AGGGCCACAT GGACAGAGGC
 2641 CGGCTCGGCC CACCCTCTGC CCTGAGAGTG ACCGCTGTAC CAACCTCTGT CCCTACAGGG
 2701 CAGCCCCGAG AACCACAGGT GTACACCCTG CCCCCATCCC GGGATGAGCT GACCAAGAAC
 2761 CAGGTCAGCC TGACCTGCCT GGTCAAAGGC TTCTATCCCA GCGACATCGC CGTGGAGTGG
 2821 GAGAGCAATG GGCAGCCGGA GAACAACTAC AAGACCACGC CTCCCGTGCT GGACTCCGAC
 2881 GGCTCCTTCT TCCTCTACAG CAAGCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC
 2941 GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC ACTACACGCA GAAGAGCCTC
 3001 TCCCTGTCTC CGGGTAAATG AGTGCGACGG CCGGCAAGCC CCCGCTCCCC GGGCTCTCGC

```

3061 GGTGCGCACGA GGATGCTTGG CACGTACCCC CTGTACATAC TTCCCGGGCG CCCAGCATGG
3121 AAATAAAGCA CCCAGCGCTG CCCTGGGCCC CTGCGAGACT GTGATGGTTC TTTCCACGGG
3181 TCAGGCCGAG TCTGAGGCCT GAGTGGCATG AGGGAGGCAG AGCGGGTCCC ACTGTCCCCA
3241 CACTGGCCCA GGCTGTGCAG GTGTGCCTGG GCCCCCTAGG GTGGGGCTCA GCCAGGGGCT
3301 GCCCTCGGCA GGGTGGGGGA TTTGCCAGCG TGGCCCTCCC TCCAGCAGCA CCTGCCCTGG
3361 GCTGGGCCAC GGGAAAGCCCT AGGAGCCCCCT GGGGACAGAC ACACAGCCCC TGCCTCTGTA
3421 GGAGACTGTC CTGTTCTGTG AGCGCCCCCTG TCCTCCCGAC CTCCATGCCC ACTCGGGGGC
3481 ATGCCCTAGTC CATGTGCGTA GGGACAGGCC CTCCCTCACC CATCTACCCC CACGGCACTA
3541 ACCCCTGGCT GCCCTGCCCA GCCTCGCACC CGCATGGGGA CACAACCGAC TCCGGGGACA
3601 TGCACTCTCG GGCCCTGTGG AGGGACTGGT GCAGATGCCC ACACACACAC TCAGCCCAGA
3661 CCCGTTCAAC AAACCCCGCA CTGAGGTTGG CCGGCCACAC GGCCACCACA CACACACGTG
3721 CACGCCTCAC ACACGGAGCC TCACCCGGGC GAACTGCACA GCACCCAGAC CAGAGCAAGG
3781 TCCTCGCACA CGTGAACACT CCTCGGACAC AGGCCCCCAC GAGCCCCACG CGGCACCTCA
3841 AGGCCACGA GCCTCTCGGC AGCTTCTCCA CATGCTGACC TGCTCAGACA AACCCAGCCC
3901 TCCTCTCACA AGGGTGCCCC TGCAGCCGCC ACACACACAC AGGGGATCAC ACACCAGTC
3961 ACGTCCCTGG CCCTGGCCCA CTTCCAGTG CCGCCCTTCC CTGCAGGACG GATCAGCCTC
4021 GACTGTGCCT TCTAGTTGCC AGCCATCTGT TGTITGCCCC TCCCCCGTGC CTTCTTGAC
4081 CCTGGAAGGT GCCACTCCCA CTGTCCCTTC CTAATAAAAT GAGGAAATTG CATCGCATTG
4141 TCTGAGTAGG TGTCATTCTA TTCTGGGGGG TGGGGTGGGG CAGGACAGCA AGGGGGAGGA
4201 TTGGGAAGAC AATAGCAGGC ATGCTGGGGA TGCGGTGGGC TCTATGGCTT CTGAGGCGGA
4261 AAGAACCAGC TGGGGCTCTA GGGGGTATCC CCACGCGCCC TGTAGCGGCG CATTAAAGCGC
4321 GCGGGGTGTG GTGGTTACGC GCAGCGTGAT CGCTACACTT GCCAGCGCCC TAGCGCCCGC
4381 TCCTTTCGCT TTCTTCCCTT CCTTCTCGC CACGTTCCGC CACGTTCCCG GGGCCTCTCA AAAAAGGGAA
4441 AAAAAGCATG CATCTCAATT AGTCAGCAAC CATTAGTCCC CCCCTAACTC CGCCCATCCC
4501 GCCCCTAACT CCGCCCACTT CCGCCCATTC TCCGCCCCAT GGCTGACTAA TTTTTTTTAT
4561 TTATGCAGAG GCCGAGGCCG CCTCGGCCCTC TGAGCTATTC CAGAAGTAGT CAGGAGGCTT
4621 TTTTGGAGGC CTAGGCTTTT GCAAAAAGCT TGGACAGCTC AGGGCTGCGA TTTCGCGCCA
4681 AACTTGACGG CAATCCTAGC GTGAAGGCTG GTAGGATTTT ATCCCCGCTG CCATCATGGT
4741 TCGACCATTG AACTGCATCG TCGCCGTGTC CAAAATATG GGGATTGGCA AGAACGGAGA
4801 CCTACCCTGG CCTCCGCTCA GGAACGAGTT CAAGTACTTC CAAAGAATGA CCACAACCTC
4861 TTCAGTGGAA GGTAACAGA ATCTGGTGAT TATGGGTAGG AAAACCTGGT TCTCCATTCC
4921 TGAGAGAAT CGACCTTTAA AGGACAGAAAT TAATATAGTT CTCAGTAGAG AACTCAAAGA
4981 ACCACCAGCA GAGCTCATT TTCTTGCCAA AAGTTTGGAT GATGCCTTAA GACTTATTGA
5041 ACAACCGGAA TTGGCAAGTA AAGTAGACAT GGTITGGATA GTCGGAGGCA GTTCTGTTTA
5101 CCAGGAAGCC ATGAATCAAC CAGGCCACCT TAGACTCTTT GTGACAAGGA TCATGCAGGA
5161 ATTTGAAAGT GACACGTTTT TCCAGAAAT TGATTTGGGG AAATATAAAC TTCTCCAGAA
5221 ATACCCAGGC GTCCTCTCTG AGGTCCAGGA GGAAAAAGGC ATCAAGTATA AGTTTGAAGT
5281 CTACGAGAAG AAAGACTAAC AGGAAGATGC TTTCAAGTTC TCTGCTCCCC TCCTAAAGCT
5341 ATGCATTTTT ATAAGACCAT GGGACTTTTG CTGGCTTTAG ATCTCTTTGT GAAGGAACCT
5401 TACTTCTGTG GTGTGACATA ATTTGGACAAA CTACCTACAG AGATTTAAAG CTCTAAGGTA
5461 AATATAAAAT TTTTAAAGTG ATAATGTGTT AAACCTACTG TTCTAATTGT TTGTGTATTT
5521 TAGATTCCAA CCTATGGAAC TGATGAATGG GAGCAGTGGT GGAATGCCTT TAATGAGGAA
5581 AACCTGTTTT GCTCAGAAGA AATGCCATCT AGTGATGATG AGGCTACTGC TGACTCTCAA
5641 CATTCTACTC CTCCAAAAAA GAAGAGAAAG GTAGAAGACC CCAAGGACTT TCCTTCAGAA
5701 TTGCTAAGTT TTTTGAGTCA TGCTGTGTTT AGTAATAGAA CTCTTGCTTG CTTTGCTATT
5761 TACACCACAA AGGAAAAAGC TGCACTGCTA TACAAGAAAA TTATGGAAAA ATATTCTGTA
5821 ACCTTTATAA GTAGGCATAA CAGTTATAAT CATAACATAC TGTTTTTTCT TACTCCACAC
5881 AGGCATAGAG TGTCTGCTAT TAATAACTAT GCTCAAAAAT TGTGTACCTT TAGCTTTTTA
5941 ATTTGTAAAG GGGTTAATAA GGAATATTTG ATGTATAGTG CCTTGACTAG AGATCATAAT
6001 CAGCCATACC ACATTTGTAG AGGTTTTACT TGCTTTAAAA AACCTCCCAC ACCTCCCCCT
6061 GAACCTGAAA CATAAAATGA ATGCAATTGT TGTTGTTAAC TTGTTTATTG CAGCTTATAA

```

25.07.01

```

6121 TGGTTACAAA TAAAGCAATA GCATCACAAA TTTCACAAAT AAAGCATTTT TTTCACTGCA
6181 TTCTAGTTGT GGT TTGTCCA AACTCATCAA TGTATCTTAT CATGTCTGGA TCGGCTGGAT
6241 GATCCTCCAG CGCGGGGATC TCATGCTGGA GTTCTTCGCC CACCCCAACT TGT TTATTGC
6301 AGCTTATAAT GGT TACAAAT AAAGCAATAG CATCACAAAT TTCACAAATA AAGCATTTTT
6361 TTTCACTGCAT TCTAGTTGTG GTTGTCCAA ACTCATCAAT GTATCTTATC ATGTCTGTAT
6421 ACCGTCGACC TCTAGCTAGA GCTTGGCGTA ATCATGGTCA TAGCTGTTTC CTGTGTGAAA
6481 TTGTTATCCG CTCACAATTC CACACAACAT ACGAGCCGGA AGCATAAAGT GTAAAGCCTG
6541 GGGTGCCTAA TGAGTGAGCT AACTCACATT AATTGCGTTG CGCTCACTGC CCGCTTTCCA
6601 GTCGGGAAAC CTGTCGTGCC AGCTGCATTA ATGAATCGGC CAACGCGCGG GGAGAGGCGG
6661 TTTGCGTATT GGGCGCTCTT CCGCTTCCTC GCTCACTGAC TCGCTGCGCT CGGTCTGTCG
6721 GCTGCGGCGA GCGGTATCAG CTCACTCAAA GGCGGTAATA CGGTTATCCA CAGAATCAGG
6781 GGATAACGCA GGAAAGAACA TGTGAGCAAA AGGCCAGCAA AAGGCCAGGA ACCGTAAAAA
6841 GGCCGCGTTG CTGGCGTTTT TCCATAGGCT CCGCCCCCTT GACGAGCATC ACAAAAATCG
6901 ACGCTCAAGT CAGAGGTGGC GAAACCCGAC AGGACTATAA AGATAACCAG CGTTTCCCCC
6961 TGGAAGCTCC CTCGTGCGCT CTCCTGTTCC GACCCTGCCG CTTACCGGAT ACCTGTCCCG
7021 CTTTCTCCCT TCGGGAAGCG TGGCGCTTTC TCAATGCTCA CGCTGTAGGT ATCTCAGTTC
7081 GGTGTAGGTC GTTCGCTCCA AGCTGGGCTG TGTGCACGAA CCCCCCGTTC AGCCCGACCG
7141 CTGCGCCTTA TCCGGTAACT ATCGTCTTGA GTCCAACCCG GTAAGACACG ACTTATCGCC
7201 ACTGGCAGCA GCCACTGGTA ACAGGATTAG CAGAGCGAGG TATGTAGGCG GTGCTACAGA
7261 GTTCTTGAAG TGGTGGCCTA ACTACGGCTA CACTAGAAGG ACAGTATTTG GTATCTGCGC
7321 TCTGCTGAAG CCAGTTACCT TCGGAAAAAG AGTTGGTAGC TCTTGATCCG GCAAACAAAC
7381 CACCGCTGGT AGCGGTGGTT TTTTGTGTTG CAAGCAGCAG ATTACGCGCA GAAAAAAGG
7441 ATCTCAAGAA GATCCTTTGA TCTTTTCTAC GGGGTCTGAC GCTCAGTGGA ACGAAAACTC
7501 ACGTTAAGGG ATTTTGGTCA TGAGATTATC AAAAAGGATC TTCACCTAGA TCCTTTTAAA
7561 TTA AAAATGA AGTTTTAAAT CAATCTAAAG TATATAGTAG TAAACTTGGT CTGACAGTTA
7621 CCAATGCTTA ATCAGTGAGG CACCTATCTC ATCGATCTGT CTATTTTCGT CATCCATAGT
7681 TGCCTGACTC CCCGTCGTGT AGATAACTAC GATACGGGAG GGCTTACCAT CTGGCCCCAG
7741 TGCTGCAATG ATACCGCGAG ACCCAGGCTC ACCGGCTCCA GATTTATCAG CAATAAACCA
7801 GCCAGCCGGA AGGGCCGAGC GCAGAAAGTG TCCTGCAACT TTATCCGCCT CCATCCAGTC
7861 TATTAATTGT TGCCGGGAAG CTAGAGTAAG TAGTTCGCCA GTTAATAGTT TGCGCAACGT
7921 TGTTGCCATT GCTACAGGCA TCGTGGTGTC ACGCTCGTCG TTTGGTATGG CTTCAATCAG
7981 CTCCGGTTCC CAACGATCAA GGCCTCCGA TCGTTGTCAG AAGTAAGTTG GCCGCAGTGT TATCACTCAT
8041 TAGCTCCTTC GGTCTCCGA TCGTTGTCAG AAGTAAGTTG GCCGCAGTGT TATCACTCAT
8101 GGT TATGGCA GCACTGCATA ATTCTCTTAC TGTCATGCCA TCCGTAAGAT GCTTTTCTGT
8161 GACTGGTGAG TACTCAACCA AGTCATTCTG AGAATAGTGT ATGCGGCGAC CGAGTTGCTC
8221 TTGCCCCGCG TCAATACGGG ATAATACCGC GCCACATAGC AGAACTTTAA AAGTGCTCAT
8281 CATTGGAAAA CGTTCCTTCG GCGGAAAACT CTCAAGGATC TTACCGCTGT TGAGATCCAG
8341 TTCGATGTAA CCCACTCGTG CACCCAACTG ATCTTCAGCA TCTTTTACTT TCACCAGCGT
8401 TTCTGGGTGA GCAAAAACAG GAAGGCAAAA TGCCGCAAAA AAGGGAATAA GGGCGACACG
8461 GAAATGTTGA ATACTCATAC TCTTCCTTTT TCAATATTAT TGAAGCATTT ATCAGGGTTA
8521 TTGTCTCATG AGCGGATACA TATTTGAATG TATTTAGAAA AATAAACAAA TAGGGGTTCC
8581 GCGCACATTT CCCCAGAAAAG TGCCACCTGA CGTC

```

1 GACGGATCGG GAGATCTGCT AGCCCGGGTG ACCTGAGGCG CGCCGGCTTC GAATAGCCAG
 61 AGTAACCTTT TTTTAAATT TTATTTTATT TTATTTTGA GATGGAGTTT GGCGCCGATC
 121 TCCCGATCCC CTATGGTCCG CTCTCAGTAC AATCTGCTCT GATGCCGCAT AGTTAAGCCA
 181 GTATCTGCTC CCTGCTGTG TGTGGAGGT CGCTGAGTAG TGCGCGAGCA AAATTTAAGC
 241 TACAACAAGG CAAGGCTTGA CCGACAATTG CATGAAGAAT CTGCTTAGGG TTAGGCGTTT
 301 TGCGCTGCTT CGCGATGTAC GGGCCAGATA TACGCGTTGA CATTGATTAT TGACTAGTTA
 361 TTAATAGTAA TCAATTACGG GGTCAATTAGT TCATAGCCCA TATATGGAGT TCCGCGTTAC
 421 ATAACCTTACG GTAAATGGCC CGCCTGGCTG ACCGCCCAAC GACCCCCGCC CATTGACGTC
 481 AATAATGACG TATGTTCCCA TAGTAACGCC AATAGGGACT TTCCATTGAC GTCAATGGGT
 541 GGAGTATTTA CGGTAAACTG CCCACTTGGC AGTACATCAA GTGTATCATA TGCCAAGTAC
 601 GCCCCCTATT GACGTCAATG ACGGTAAATG GCCCGCCTGG CATTATGCCC AGTACATGAC
 661 CTTATGGGAC TTTCCTACTT GGCAGTACAT CTACGTATTA GTCATCGCTA TTACCATGGT
 721 GATGCGGTTT TGGCAGTACA TCAATGGGCG TGGATAGCGG TTTGACTCAC GGGGATTTCC
 781 AAGTCTCCAC CCCATTGACG TCAATGGGAG TTTGTTTTGG CACCAAAATC AACGGGACTT
 841 TCCAAAATGT CGTAACAAC CCGCCCCATT GACGCAAATG GGCGGTAGGC GTGTACGGTG
 901 GGAGGTCTAT ATAAGCAGAG CTCTCTGGCT AACTAGAGAA CCCACTGCTT ACTGGCTTAT
 961 CGAAATTAAT ACGACTCACT ATAGGGAGAC CCAAGCTTGG TACCATGGAA GCCCCAGCTC
 1021 AGCTTCTCTT CCTCCTGCTA CTCTGGCTCC CAGATACCAC CGGAGACATT GTTCTGACTC
 1081 AGCTCTCCAG CACCCTGTCT GTGACTCCAG GAGATAGAGT CTCTCTTTCC TGCAGGGCCA
 1141 GCGAGAGTAT TAGCGACTAC TTACACTGGT ATCAACAAA ATCACATGAG TCTCCAAGGC
 1201 TTCTCATCAA ATATGCTTCC CATTCCATCT CTGGGATCCC CTCCAGGTTT AGTGGCAGTG
 1261 GATCAGGGTC AGATTTCACT CTCAGTATCA ACAGTGTGGA ACCTGAAGAT GTTGGAAATTT
 1321 ATTACTGTCA ACATGGTCAC AGCTTTCCGT GGACGTTCCG TGGAGGCACC AAGCTGGAAT
 1381 TCAAACGTAA GTCTCGAGTC TCTAGATAAC CGGTCAATCG GTCAATCGAT TGGAAATCTA
 1441 AACTCTGAGG GGGTCGGATG ACGTGGCCAT TCTTTGCCTA AAGCATTGAG TTTACTGCAA
 1501 GGTCAGAAAA GCATGCAAAG CCCTCAGAAT GGCTGCAAAG AGCTCCAACA AAACAATTTA
 1561 GAACCTTATT AAGGAATAGG GGGAAGCTAG GAAGAACTC AAAACATCAA GATTTTAAAT
 1621 ACGCTTCTTG GTCTCCTTGC TATAATTATC TGGGATAAGC ATGCTGTTTT CTGTCTGTCC
 1681 CTAACATGCC CTTATCCGCA AACAAACAC CCAAGGGCAG AACTTTGTGA CTTAAACACC
 1741 ATCCTGTTTG CTTCTTTTCT CAGGAACCTG GGCTGCACCA TCTGTCTTCA TCTTCCCGCC
 1801 ATCTGATGAG CAGTTGAAAT CTGGAACCTG CTCTGTTGTG TGCCTGCTGA ATAACTTCTA
 1861 TCCAGAGAG GCAAAGTAC AGTGGAAGGT GGATAACGCC CTCCAATCGG GTAACCTCCA
 1921 GGAGAGTGTC ACAGAGCAGG ACAGCAAGGA CAGCACCTAC AGCCTCAGCA GCACCTGAC
 1981 GCTGAGCAAA GCAGACTACG AGAAACACAA AGTCTACGCC TGCGAAGTCA CCCATCAGG
 2041 CCTGAGCTCG CCCGTCACAA AGAGCTTCAA CAGGGGAGAG TGTTAGAGGG AGAAGTGCCC
 2101 CCACCTGCTC CTCAGTTCCA GCCTGACCCC CTCCCATCCT TTGGCCTCTG ACCCTTTTTC
 2161 CACAGGGGAC CTACCCCTAT TGCGGTCTCT CAGCTCATCT TTCACCTCAC CCCCCTCCTC
 2221 CTCCTTGGCT TTAATTATGC TAATGTTGGA GGAGAATGAA TAAATAAAGT GAATCTTTGC
 2281 ACCTGTGGTT TCTCTCTTTC CTCATTTAAT AATTATTATC TGTTGTTTTA CCAACTACTC
 2341 AATTTCTCTT ATAAGGGACT AAATATGTAG TCATCCTAAG GCACGTAACC ATTTATAAAA
 2401 ATCATCCTTC ATTCTATTTT ACCCTATCAT CCTCTGCAAG ACAGTCTCTC CTCAAACCCA
 2461 CAAGCCTTCT GTCCTCACAG TCCCCTGGGC CATGGTAGGA GAGACTTGCT TCCTTGTTTT
 2521 CCCCTCCTCA GCAAGCCCTC ATAGTCTTTT TTAAGGGTGA CAGGTCTTAC AGTCATATAT
 2581 CCTTTGATTC AATTCCCTGA GAATCAACCA AAGCAAATTT TTCAAAAGAA GAAACCTGCT
 2641 ATAAAGAGAA TCATTCATTG CAACATGATA TAAATAACA ACACAATAAA AGCAATTAAA
 2701 TAAACAAACA ATAGGGAAAT GTTTAAGTTC ATCATGGTAC TTAGACTTAA TGGAAATGTCA
 2761 TGCCTTATTT ACATTTTAA ACAGGTACTG AGGGACTCCT GTCTGCCAAG GGCCGTATTG
 2821 AGTACTTTCC ACAACCTAAT TTAATCCACA CTATACTGTG AGATTAAAA CATTATTAA
 2881 AATGTTGCAA AGGTTCTATA AAGCTGAGAG ACAAATATAT TCTATAACTC AGCAATCCCA
 2941 CTTCTAGATG ACTGAGTGTC CCCACCCACC AAAAACTAT GCAAGAATGT TCAAAGCAGC
 3001 TTTATTTACA AAAGCCAAAA ATTGGAAATA GCCCGATTGT CCAACAATAG AATGAGTTAT

```

3061 TAAACTGTGG TATGTTTATA CATTAGAATA CCCAATGAGG AGAATTAACA AGCTACAAC
3121 ATACCTACTC ACACAGATGA ATCTCATAAA AATAATGTTA CATAAGAGAA ACTCAATGCA
3181 AAAGATATGT TCTGTATGTT TTCATCCATA TAAAGTTCAA AACCAGGTAA AAATAAAGTT
3241 AGAAATTTGG ATGGAAATTA CTCTTAGCTG GGGGTGGGCG AGTTAGTGCC TGGGAGAAGA
3301 CAAGAAGGGG CTTCTGGGGT CTTGGTAATG TTCTGTTCCCT CGTGTGGGGT TGTGCAGTTA
3361 TGATCTGTGC ACTGTTCTGT ATACAGATTA TGCTTCAAAA TAACTTCACA TAAAGAACAT
3421 CTTATACCCA GTTAATAGAT AGAAGAGGAA TAAGTAATAG GTCAAGACCA ACGCAGCTGG
3481 TAAAGTGGGG CCTGGGATCA AATAGCTACC TGCCTAATCC TGCCWCCTTG AGCCCTGAAT
3541 GAGTCTGCCT TCCAGGGCTC AAGGTGCTCA ACAAAACAAC AGGCCTGCTA TTTTCTGGC
3601 ATCTGTGCCC TGTTTGGCTA GCTAGGAGCA CACATACATA GAAATTAAT GAAACAGACC
3661 TTCAGCAAGG GGACAGAGGA CAGAATTAAC CTTGCCCAGA CACTGGAAAC CCATGTATGA
3721 ACACCTCACAT GTTTGGGAAG GGGGAAGGGC ACATGTAAAT GAGGACTCTT CCTCATTTCTA
3781 TGGGGCACTC TGGCCCTGCC CCTCTCAGCT ACTCATCCAT CCAACACACC TTTCTAAGTA
3841 CCTCTCTCTG CCTACACTCT GAAGGGGTTT AGGAGTAACT AACACAGCAT CCCTTCCCTC
3901 AAATGACTGA CAATCCCTTT GTCCTGCTTT GTTTTCTTTT CCAGTCAGTA CTGGGAAAGT
3961 GGGGAAGGAC AGTCATGGAG AAACACATA AGGAAGCACC TTGCCCTTCT GCCTCTTGAG
4021 AATGTTGATG AGTATCAAAT CTTTCAAAC TGGAGGTTT GAGTAGGGGT GAGACTCAGT
4081 AATGTCCCTT CCAATGACAT GAACTTGCTC ACTCATCCCT GGGGGCCAAA TTGAACAATC
4141 AAAGGCAGGC ATAATCCAGT TATGAATTCT TGCGGCCGCT TGCTAGCTTC ACGTGTGGGA
4201 TCCAACCGCG GAAGGGCCCT ATTCTATAGT GTCACCTAAA TGCTAGAGCT CGCTGATCAG
4261 CCTCGACTGT GCCTTCTAGT TGCCAGCCAT CTGTTGTTTG CCCCTCCCCC GTGCCTTCCT
4321 TGACCCCTGA AGGTGCCACT CCCACTGTCC TTTCCTAATA AAATGAGGAA ATTGTCATCGC
4381 ATTGTCTGAG TAGGTGTCAT TCTATTCTGG GGGGTGGGGT GGGGCAGGAC AGCAAGGGGG
4441 AGGATTGGGA AGACAATAGC AGGCATGCTG GGCATGCGGT GGGCTCTATG GCTTCTGAGG
4501 CGGAAAGAAC CAGCTGGGGC TCTAGGGGGT ATCCCCACGC GCCCTGTAGC GGCGCATTAA
4561 GCGCGGCGGG TGTGGTGGTT ACGCGCAGCG TGACCGCTAC ACTTGCCAGC GCCCTGCGC
4621 CCGCTCCTTT CGCTTCTTTC CCTTCCTTTC TCGCCACGTT CGCCGGGCCCT CTCAAAAAAG
4681 GGAAAAAAG CATGCATCTC AATTAGTCAG CAACCATAGT CCCGCCCTA ACTCCGCCCA
4741 TCCCGCCCCCT AACTCCGCCC AGTTCGCCC ATTCTCCGCC CCATGGCTGA CTAATTTTTT
4801 TTATTTATGC AGAGGCCGAG GCCGCTCGG CCTCTGAGCT ATTCCAGAAG TAGTGAGGAG
4861 GCTTTTGTGG AGGCCTAGGC TTTTGCAAAA AGCTTGAGCA GCTCAGGGCT GCGATTTTCG
4921 GCCAAACTTG ACGGCAATCC TAGCGTGAAG GCTGGTAGGA TTTTATCCCC GCTGCCATCA
4981 TGGTTCGACC ATTGAACGTC ATCGTCGCGG TGTCCCAAAA TATGGGGATT GGCAAGAACC
5041 GAGACCTACC CTGGCCTCCG CTCAGGAACG AGTTCAAGTA CTTCCAAAGA ATGACCACAA
5101 CCTCTTCAGT GGAAGGTAAA CAGAATCTGG TGATTATGGG TAGGAAAACC TGTTTCTCCA
5161 TTCCTGAGAA GAATCGACCT TTAAAGGACA GAATTAATAT AGTTCTCAGT AGAGAACTCA
5221 AAGAACCACC ACGAGGAGCT CATTTTCTTG CCAAAGTTT GGATGATGCC TTAAGACTTA
5281 TTGAACAACC GGAATTGGCA AGTAAAGTAG ACATGGTTTG GATAGTCGGA GGCAGTTCTG
5341 TTTACCAGGA AGCCATGAAT CAACCAGGCC ACCTTAGACT CTTTGTGACA AGGATCATGC
5401 AGGAATTTGA AAGTGACACG TTTTCCCAG AAATTGATTT GGGGAAATAT AAACCTTCTC
5461 CAGAATACCC AGGCGTCCCT TCTGAGGTCC AGGAGGAAAA AGGCATCAAG TATAAGTTTG
5521 AAGTCTACGA GAAGAAAGAC TAACAGGAAG ATGCTTTCAA GTTCTCTGCT CCCCTCCTAA
5581 AGCTATGCAT TTTTATAAGA CCATGGGACT TTTGCTGGCT TTAGATCTCT TTGTGAAGGA
5641 ACCTTACTTC TGTGGTGTGA CATAATTGGA CAAACTACCT ACAGAGATT TTTGTTGTGT
5701 GGTAAATATA AAATTTTTTA GTGTATAATG TGTAAACTA CTGATTCTAA CTTTAAATGA
5761 ATTTTAGATT CCAACCTATG GAACTGATGA ATGGGAGCAG TGGTGAATG CTTTAAATGA
5821 GGAAACCTG TTTTGCTCAG AAGAAATGCC ATCTAGTGAT GATGAGGCTA CTGCTGACTC
5881 TCAACATTCT ACTCCTCCAA AAAAGAAGAG AAAGGTAGAA GACCCCAAGG ACTTTCCTTC
5941 AGAATTGCTA AGTTTTTTGA GTCATGCTGT GTTTAGTAAT AGAACTCTTG CTTGCTTTGC
6001 TATTTACACC ACAAAGGAAA AAGCTGCACT GCTATACAAG AAAATTATGG AAAAATATTC
6061 TGTAACCTTT ATAAGTAGGC ATAACAGTTA TAATCATAAC ATACTGTTTT TTCTTACTCC

```

```

6121 ACACAGGCAT AGAGTGTCTG CTATTAATAA CTATGCTCAA AAATTGTGTA CCTTTAGCTT
6181 TTTAATTTGT AAAGGGGTTA ATAAGGAATA TTTGATGTAT AGTGCCTTGA CTAGAGATCA
6241 TAATCAGCCA TACCACATTT GTAGAGGTTT TACTTGCTTT AAAAAACCTC CCACACCTCC
6301 CCCTGAACCT GAAACATAAA ATGAATGCAA TTGTTGTTGT TAACTTGTTT ATTGCAGCTT
6361 ATAATGGTTA CAAATAAAGC AATAGCATCA CAAATTTTCA AAATAAAGCA TTTTTTTTCA
6421 TGCATTCTAG TTGTGGTTTG TCCAAACTCA TCAATGTATC TTATCATGTC TGGATCGGCT
6481 GGATGATCCT CCAGCGCGGG GATCTCATGC TGGAGTTCTT CGCCCCACCC AACTTGTTTTA
6541 TTGCAGCTTA TAATGGTTAC AAATAAAGCA ATAGCATCAC AAATTTTACA AATAAAGCAT
6601 TTTTTTCACT GCATTCTAGT TGTGGTTTGT CCAAACCTCAT CAATGTATCT TATCATGTCT
6661 GTATACCGTC GACCTCTAGC TAGAGCTTGG CGTAATCATG GTCATAGCTG TTTCTGTGT
6721 GAAATTGTTA TCCGCTCACA ATTCCACACA ACATACGAGC CGGAAGCATA AAGTGTAAG
6781 CCTGGGGTGC CTAATGAGTG AGCTAACTCA CATTAAATTGC GTTGCCTCA CTGCCCGCTT
6841 TCCAGTCGGG AAACCTGTCTG TGCCAGCTGC ATTAATGAAT CGGCCAACGC GCGGGGAGAG
6901 GCGGTTTGGC TATTGGGCGC TCTTCCGCTT CCTCGCTCAC TGACTCGCTG CGCTCGGTCTG
6961 TTCGGCTGCG CGCAGCGGTA TCAGTCACT CAAAGGCGGT AATACGGTTA TCCACAGAAT
7021 CAGGGGATAA CGCAGGAAAG AACATGTGAG CAAAAGGCCA GCAAAGGCC AGGAACCGTA
7081 AAAAGGCCGC GTTGCTGGCG TTTTTCATA GGCTCCGCCC CCCTGACGAG CATCACAAAA
7141 ATCGACGCTC AAGTCAGAGG TGGCGAAACC CGACAGGACT ATAAAGATAC CAGGCGTTTC
7201 CCCCTGGAAG CTCCTCGTG CGCTCTCTG TCCGACCCTT GCGCTTACC GGATACCTGT
7261 CCGCCTTTCT CCCTTCGGGA AGCGTGCGC TTTCTCAATG CTCACGCTGT AGGTATCTCA
7321 GTTCGGTGTA GGTCTGTCGC TCCAAGCTGG GCTGTGTGCA CGAACCCCC GTTCAGCCCC
7381 ACCGCTGCGC CTTATCCGGT AACTATCGTC TTGAGTCCAA CCCGGTAAGA CACGACTTAT
7441 CGCCACTGGC AGCAGCCACT GGTAACAGGA TTAGCAGAGC GAGGTATGTA GCGGGTGCTA
7501 CAGAGTTCTT GAAGTGGTGG CCTAACTACG GCTACACTAG AAGGACAGTA TTTGGTATCT
7561 GCGCTCTGCT GAAGCCAGTT ACCTTCGGAA AAAGAGTTGG TAGCTCTTGA TCCGGCAAAC
7621 AAACCACCGC TGGTAGCGGT GGTTTTTTTT TTTGCAAGCA GCAGATTACG CGCAGAAAAA
7681 AAGGATCTCA AGAAGATCCT TTGATCTTTT CTACGGGGTC TGACGCTCAG TGGAAACGAA
7741 ACTCAGTTA AGGGATTTTG GTCATGAGAT TATCAAAAAG GATCTTCACC TAGATCCTTT
7801 TAAATTAAAA ATGAAGTTTT AAATCAATCT AAAGTATATA TGAGTAACT TGGTCTGACA
7861 GTTACCAATG CTTAATCAGT GAGGCACCTA TCTCAGCGAT CTGTCTATTT CGTTCATCCA
7921 TAGTTGCCTG ACTCCCCGTC GTGTAGATAA CTACGATACG GGAGGGCTTA CCATCTGGCC
7981 CCAGTGCTGC AATGATACCG CGAGACCCAC GCTCACCGGC TCCAGATTTA TCAGCAATAA
8041 ACCAGCCAGC CGGAAGGGCC GAGCGCAGAA GTGGTCCTGC AACTTTATCC GCCTCCATCC
8101 AGTCTATTAA TTGTTGCCGG GAAGCTAGAG TAAGTAGTTC GCCAGTTAAT AGTTTGCGCA
8161 ACGTTGTTGC CATTGCTACA GGCATCGTGG TGTCACGCTC GTCGTTTGGT ATGGCTTCAT
8221 TCAGCTCCGG TTCCCAACGA TCAAGGCGAG TTACATGATC CCCCATGTTG TGCAAAAAAG
8281 CGGTTAGCTC CTTCCGGTCCT CCGATCGTTG TCAGAAGTAA GTTGGCCGCA GTGTTATCAC
8341 TCATGGTTAT GGCAGCACTG CATAATTCTC TACTGTTCAT GCCATCCGTA AGATGCTTTT
8401 CTGTGACTGG TGAGTACTCA ACCAAGTCAT TCTGAGAATA GTGTATGCGG CGACCGAGTT
8461 GCTCTTGCCC GCGTCAATA CGGGATAATA CCGCGCCACA TAGCAGAACT TAAAAGTGC
8521 TCATCATTGG AAAACGTTCT TCGGGGCGAA AACTCTCAAG GATCTTACCG CTGTTGAGAT
8581 CCAGTTTCGAT GTAACCCACT CGTGCACCCA ACTGATCTTC AGCATCTTTT ACTTTCACCA
8641 GCGTTTCTGG GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC AAAATGCCGC AAAAAAGGGA ATAAGGGCGA
8701 CACGGAAATG TTGAATACTC ATACTCTTCC TTTTTCATA TTATTGAAGC ATTTATCAGG
8761 GTTATTGCTC CATGAGCGGA TACATATTTG AATGTATTTA GAAAAATAAA CAAATAGGGG
8821 TTCCGCGCAC ATTTCCCCGA AAAGTGCCAC CTGACGTC

```

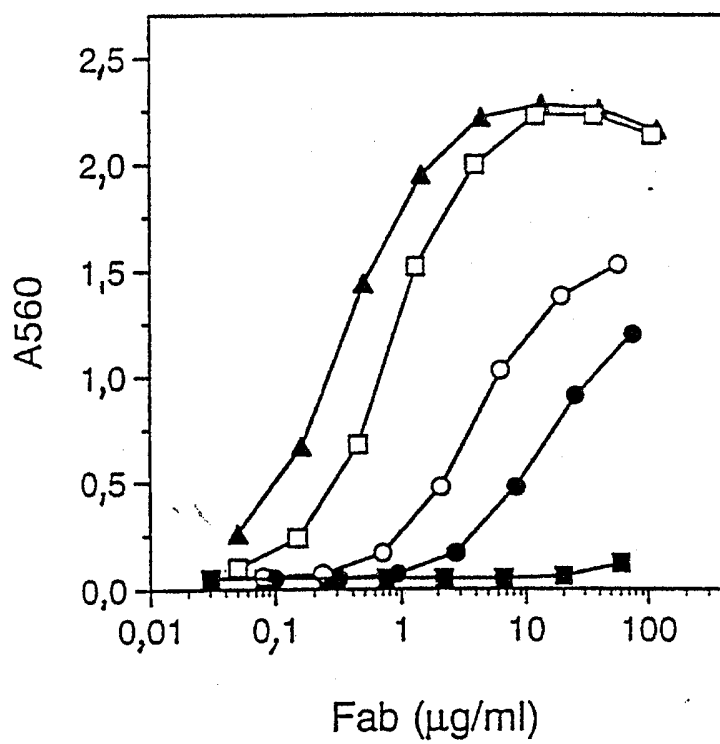
230701

 V_H doména

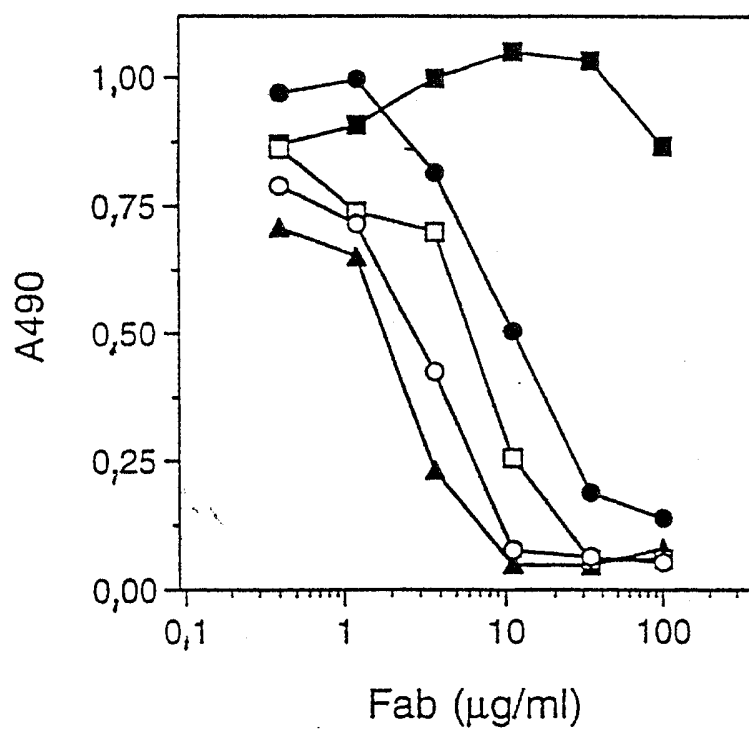
Obrázek 15

25.07.01

Obrázek 16



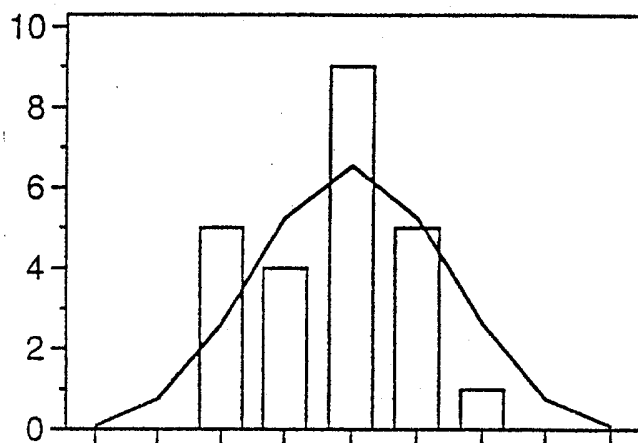
Obrázek 17



25.07.01

Identifikované specifické varianty

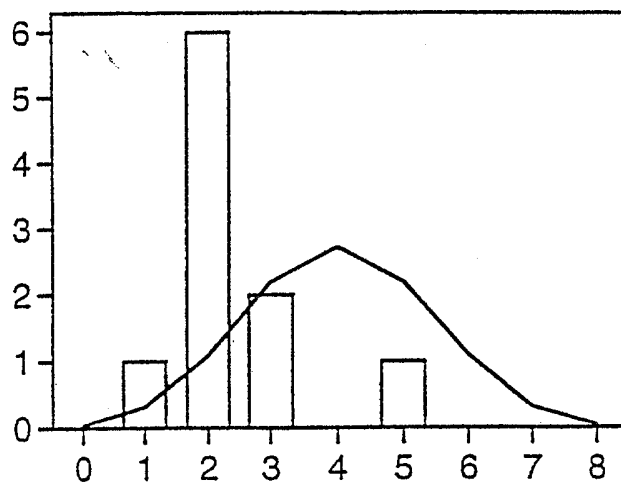
Obrázek 18a



Myší rámcová rezidua

Identifikované specifické varianty

Obrázek 18b



Myší rámcová rezidua