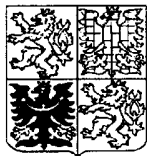


PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

287 296

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 1994 - 1757

(22) Přihlášeno: 15.01.1993

(30) Právo přednosti:
23.01.1992 EP 1992/92101069

(40) Zveřejněno: 15.12.1994
(Věstník č. 12/1994)

(47) Uděleno: 21.08.2000

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 11.10.2000
(Věstník č. 10/2000)

(86) PCT číslo: PCT/EP93/00082

(87) PCT číslo zveřejnění: WO 93/15210

(13) Druh dokumentu: B6

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 15/62

C 12 N 15/13

C 07 K 16/00

C 07 K 16/46

(73) Majitel patentu:

MERCK PATENT GESELLSCHAFT MIT
BESCHRÄNKTER HAFTUNG, Darmstadt, DE;

(72) Původce vynálezu:

Plückthun Andreas, München, DE;
Pack Peter, München, DE;

(74) Zástupce:

Hořejš Milan JUDr. ing., Národní 32, Praha 1,
11000;

(54) Název vynálezu:

**Protilátkový konstrukt a konstrukční kit pro
jeho selektivní přípravu**

(57) Anotace:

Protilátkový konstrukt, skládající se ze dvou monomerních fúzních proteinů, které jsou spojeny nekovalentní interakcí, kde každá monomerní jednotka se skládá z (i) jednofetězcového Fv fragmentu, scFV, (ii) linkerového peptidu nebo peptidu pantového regionu nebo jeho fragmentu a (iii) amfifilního helikálního peptidu, obsahujícího leucinovou zipper sekvenci, ve který každým sedmým aminokyselinovým zbytkem je leucinový zbytek nebo sekvenci, nesoucí alespoň dva negativně nebo pozitivně nabitě aminokyselinové zbytky, přičemž uvedený helikální peptid je schopen dimerizovat s helikálním peptidem jiného monomerního fúzního proteinu nekovalentní interakcí, přičemž scFV fragment (i) je fúzován přes peptid linkeru/pantu (ii) s amfifilním peptidem (iii) k jeho C-konci. Konstrukční kit pro selektivní přípravu individuálního protilátkového konstruktů popsaného výše, který zahrnuje odděleně uspořádané jednotlivé monomerní fúzní proteiny definované výše.

CZ 287296 B6

Protilátkový konstrukt a konstrukční kit pro jeho selektivní přípravuOblast techniky

5

Vynález se týká protilátkového konstruktů a konstrukčního kitu pro jeho selektivní přípravu. Obecně se vynález opírá o novou třídu antigen vázajících molekul, která obsahuje Fv – fragmenty protilátky, ale nepoužívá konstantní protilátkové domény. Tyto látky mohou také dimerizovat s jinými molekulami fragmentů protilátek nebo s molekulami neprotilátkového fragmentu za vzniku bi- nebo multifunkčních fúzních proteinů protilátkových fragmentů a takzvaných miniprotilátek. Nové fúzní proteiny mohou být užity v široké oblasti diagnostické a terapeutické medicíny.

15

Dosavadní stav techniky

V následujícím textu se používá těchto zkratk:

	Fv	nekovalentně asociované heterodimery V_L a V_H
20	scFv	jednořetězcová Fv oblast
	V_L	variabilní doména lehkého řetězce
	V_H	variabilní doména těžkého řetězce
	MW	molekulová hmotnost
	AA	aminokyselina
25	C_H	těžký řetězec konstantního regionu
	C_L	lehký řetězec konstantního regionu
	ELISA	enzymově spřažené imunochemické stanovení na pevném povrchu
	RIA	radioimunoanalýza
	Fab	fragment protilátky získaný zpracováním papainem
30	F(ab)2	fragment protilátky získaný zpracováním pepsinem
	IgG	imunoglobulin G
	SDS–PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfonem sodným
	OD ₂₈₀	optická denzita při 280 nm
	PBS	roztok chloridu sodného pufrovaný fosforečnanem
35	BSA	hovězí sérový albumin

Již několik let existuje zvýšený zájem v oblasti biotechnologie o modifikaci přirozeně se vyskytujících protilátek za účelem získání specifitějších a individuálnějších druhů protilátek. Proto byla pozornost zaměřena na výrobu (modifikovaných) fragmentů protilátek.

40

Všechny přirozeně se vyskytující protilátky všech tříd mají alespoň dvě vazebná místa. To jim umožňuje vázat se k povrchu s větší funkční afinitou (takzvanou aviditou) než monovalentní fragmenty, jako jsou Fab fragmenty. Během posledních několika let byly popsány metody (Skerra a Plückthun, 1988, Science 240, 1038–1040, Better a spol., 1988, Science 240, 1041–1043), kterými mohou být funkční protilátkové fragmenty produkovány v *Escherichia coli*. Tyto fragmenty zahrnují Fv fragment (heterodimer, obsahující V_H a V_L) a Fab fragment (obsahující kompletní lehký řetězec s doménou V_L a C_L , jakož i první dvě domény těžkých řetězců V_H a C_H).

Fv fragment má však sklon disociovat na V_H a V_L a proto je výhodné připojit kovalentně dvě domény. Jednou z cest jejich připojení je vytvoření peptidového linkeru mezi nimi, buď v orientaci V_H –linker– V_L nebo V_L –linker– N_H (Bird a spol., 1988, Science 242, 423, Huston a spol., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5879). Výsledné fragmenty jsou nazývány jednořetězcové Fv fragmenty.

Všechny tyto fragmenty jsou však monovalentní. Tento vynález poskytuje metodu, jak konstruovat malou dimerizací domény na bázi peptidů, tvořících amfipatické helixy. Tyto peptidy budou nazývány jako interkalační, ale tento výraz vyjadřuje pouze schopnost cíleného spojení a ne omezení, týkajícího se jednotlivé struktury dimerizačního rozhraní.

5

I když je metoda zde popsána v zásadě aplikovatelná jak na Fab, Fv nebo scFv fragmenty, jsou to tyto posledně uvedené, pro které je její použití nejvýhodnější. V tomto případě mohou být konstruovány bivalentní fragmenty velmi malé velikosti a může být zabráněno i disociaci na V_L a V_H jakož i špatnému spojení fragmentových řetězců, např. $V_L - V_L$.

10

Protilátkové fragmenty malé velikosti jsou zvláště výhodné v mnoha aplikacích. V diagnostických aplikacích (např. ELISA, RIA atd.), snižují menší molekuly povrchu problémy nespécifických interakcí, které často jak známo, vyvolávají konstantní domény. Totéž platí o použití protilátkových fragmentů jako ligandů v afinitní chromatografii. V diagnostikách nebo terapii tumorů je důležité, že významný podíl injikované protilátky penetruje tkáň a lokalizuje se do tumoru a toto je závislé na rozměrech molekul (Colcher a spol., 1990, J. Natl. Cancer Inst. 82, 1191–1197). Výtěžky exprese a účinnost sekrece rekombinantních proteinů jsou také funkcí velikosti řetězce (Skerra – Plückthun, 1991, Protein Eng. 4, 971) a z tohoto hlediska jsou preferovány malé proteiny. Z mnoha důvodů jsou tedy výhodné molekuly malé velikosti.

20

Dosud snížení rozměrů molekul protilátky znamená přípravu proteolytických fragmentů. Nejmenší bivalentní fragmenty (Fab)₂ fragmenty, jsou ještě dvojnásobkem velikosti fragmentů podle předloženého vynálezu. Nové fragmenty tedy kombinují tři rysy: a) malou velikost, b) bivalentnost nebo bifunkčnost a c) schopnost funkční exprese v E. coli.

25

V mnoha oblastech existuje velký zájem o bifunkční protilátky. Bifunkční protilátky mohou být definovány jako mající dvě rozdílné specifity buď pro dva rozdílné antigeny nebo pro dva epitopy na stejném antigenu.

30

V současnosti existuje mnoho metod pro produkci bifunkčních protilátek. Avšak žádná z existujících metod neposkytuje produkci bifunkčních protilátek in vivo, ale spíše poskytují směs druhů molekul, která vždy vyžaduje komplikované a nákladné dělicí postupy.

35

Lze rozlišit čtyři základní metody. V první se používá chemické zesítnění, které může výhodně užívat heterobifunkční zesíťovač. Při této metodě byly celé protilátky (Staerz – a spol., 1985, Nature 314, 628, Perez a spol., 1985, Nature 316, 354–356), Fab fragmenty (Carter a spol., 1992, Biotechnology 10, 163) a scFv fragmenty (Cumber a spol., 1992, J. Immunol. 149, 120) chemicky zesítněny po čištnění.

40

Druhá z uvedených metod zahrnuje fúzi dvou hybridomů za vzniku takzvaného heterohybridomu nebo „quadromu“. Při této metodě se jakýkoliv lehký řetězec může párovat s jakýmkoliv těžkým řetězcem a dva těžké řetězce mohou poskytovat homodimery nebo heterodimery za vzniku velmi komplikovaných směsí produktu (Milstein – Cuello, 1983, Nature 305, 537).

45

Třetí metoda se podobá druhé a zahrnuje transfekci dvou expresních plazmidů kodujících těžký a lehký řetězec druhé protilátky do hybridomové buňky (Lenz – Weidle, 1990, Gene 87, 213) nebo retrovirálního vektoru (De Monte a spol., 1990, Acad. Sci. 87, 2941–2945). Avšak po zavedení je směs produktů identická s druhým postupem.

50

Konečně byly protilátky redukovány, míseny a reoxidovány (Staerz – Bevan, 1986, Immunology Today 7). Opět byly získány velmi komplikované směsi produktů vyžadující náročné postupy dělení a kontroly kvality.

55

Je tedy stále zapotřebí vyvinout postup umožňující přímou izolaci výlučně heterodimerních protilátek bez komplikované přípravy vyžadované po chemickém zesítnění. Podle předloženého

vynálezu je tento problém řešen (i) kovalentním navázáním odpovídající V_H a V_L domény do scFV fragmentu a (ii) použitím dimerizačních domén umožňujících pouze tvorbu heterodimerů, jako jsou určité leucinové zippery a deriváty.

- 5 Dalším důležitým ohledem, který byl brán v úvahu při tomto vynálezu, byla snaha co nejvíce snížit molekulovou hmotnost bispecifické protilátky z důvodů podrobně uvedených výše. Toho bylo dosaženo za použití scFv fragmentů.

10 Až dosud bylo popsáno mnoho použití bispecifických protilátek a při většině z nich by bylo možno dosáhnout užitku z této nové technologie. Například bispecifické protilátky jsou velmi zajímavé v terapii tumorů. Jedno raménko protilátky se může vázat k tumorovému markeru, druhé raménko k T–buněčnému epitopu, toxinu nebo radionuklid vázajícímu peptidu nebo proteinu pro přenos zabíječské funkce co nejbližší k tumorové buňce. V diagnostice se může jedno raménko vázat k analyzované látce, jež je předmětem zájmu, a druhé k základu, který může
15 být snadno kvantifikován, například enzymu. Konečně při buněčných aplikacích může být výhodné dosáhnout vyšší selektivity vazby, když dva rozdílné epitopy nebo komplex stejného proteinu mohou být rozpoznány nebo když dva různé proteiny mohou být rozpoznány na témže buněčném povrchu.

20

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je protilátkový konstrukt, skládající se ze dvou monomerních fúzních proteinů, které jsou spojeny nekovalentní interakcí, kde každá monomerní jednotka se skládá z
25

i) jednořetězcového Fv fragmentu, scFV,

(ii) linkerového peptidu nebo peptidu pantového regionu (hinge region) nebo jeho fragmentu a

30 (iii) amfifilního helikálního peptidu, obsahujícího leucinovou zipper sekvenci, ve který každým sedmým aminokyselinovým zbytkem je leucinový zbytek nebo sekvenci, nesoucí alespoň dva negativně nebo pozitivně nabitě aminokyselinové zbytky, přičemž uvedený helikální peptid je schopen dimerizovat s helikálním peptidem jiného monomerního fúzního proteinu nekovalentní interakcí,
35

přičemž scFV fragment (i) je fúzován přes peptid linkeru/pantu (ii) s amfifilním peptidem (iii) k jeho C–konci.

40 Ve výhodném provedení je předmětem vynálezu bivalentní protilátkový konstrukt definovaný výše, kde scFV fragmenty (i) mají různou antigenní specifitu.

Helikálním peptidem (iii) je výhodně helixový svazek, skládající se z helixu, obrátky a dalšího helixu.

45 V jednom provedení vynálezu může být k C–konci amfifilního peptidu (iii) fúzován druhý protein (iv). Tímto druhým proteinem (iv) je přednostně toxin, chelátorový peptid, protein vázající kov nebo peptid obsahující specifické vazebné místo enzymu, T–buňky nebo jejich fragmentů.

50 Předmětem vynálezu je dále také konstrukční kit pro selektivní přípravu individuálního protilátkového konstruktů definovaného výše, který zahrnuje odděleně uspořádané jednotlivé monomerní fúzní proteiny definované výše.

Vynález se opírá o zjištění, že protilátkové fragmenty fúzních proteinů, obsahujících Fv – fragmenty, by mohly být produkovány metodami genetického inženýrství se specifickými a zlepšenými vlastnostmi.

5 Výraz „nekovalentní interakce“ zahrnuje každé za normálních podmínek existující stabilní spojení, které nezahrnuje kovalentní vazbu, například spojení Van der Waalovými silami, (sterická) interdigitace amfifilních peptidů, zejména peptidových helixů nebo peptidů nesoucích opačné náboje aminokyselinových zbytků. Odpovídající účinné peptidy jsou výše a dále označovány názvem interaktivní nebo interkalační peptidy.

10

Amfifilní peptidy obsahují až 50 aminokyselin. Výhodně obsahují 10 až 30 aminokyselin. Ve výhodném provedení vynálezu je interaktivní peptid svazkem peptidových helixů (obsahujících helix, obrátku a další helix, viz výše). V dalším provedení je interaktivním peptidem leucinový zipper, obsahující peptid, mající několik opakujících se aminokyselin, kde každou sedmou aminokyselinou je leucinový zbytek. V jiném případě podle vynálezu nese peptid pozitivně nebo negativně nabitě zbytky, například lysin (pozitivně nabitý) nebo kyselinu glutamovou (negativně nabitá) tak, že se tento peptid může vázat na další peptid (druhé monomerní jednotky) nesoucí opačné náboje.

15

20 Fv – fragment a interkalační peptid jsou spojeny spolu buď přímo nebo linkerovým peptidem, výhodně linkerovým peptidem. Ve výhodném provedení je linkerovým peptidem sekvence pantového regionu protilátky.

Jak je definováno, Fv – fragment obsahuje V_L a V_H region protilátky. Fv – fragment podle 25 vynálezu je výhodně jednořetězcový fragment. Jednořetězcové fragmenty mohou být získány standardními technikami, využívajícími molekul standardních linkerů.

Do rozsahu vynálezu spadají dimerní fúzní proteiny, skládající se ze dvou monomerních fúzovaných proteinů, kde je spojení monomerních jednotek uskutečněno na základě nekovalentní interakce identických nebo rozdílných peptidů, kde alespoň jednou monomerní jednotkou je fúzní 30 protein protilátka – Fv – fragment.

Jestliže dimer obsahuje dva Fv – fragmenty, mohou být Fv – fragmenty stejné (identická antigenová vazebná místa) nebo rozdílné (rozdílná antigenová vazebná místa). V takových případech 35 mohou být získány mono- a bispecifické (Fv) – miniprotilátky. Podle vynálezu jsou preferovány bispecifické miniprotilátky.

Interaktivní peptidy mohou být stejné nebo rozdílné, výhodně jsou identické. Interkalační peptidy mohou být spojeny v paralelním nebo v antiparalelním uspořádání.

40

Do rozsahu vynálezu tedy především spadá dimerní fúzní protein, skládající se ze dvou Fv – fragmentů s rozdílnou specifitou (antigenovými vazebnými místy) a identických interkalačních helixových peptidů, přičemž protilátkové fragmenty a peptidy jsou spolu spojeny sekvencí pantového regionu.

45

Do rozsahu vynálezu spadá i dimer, skládající se z monomerní jednotky obsahující Fv – fragment a další monomerní jednotky, kde Fv – fragment je nahrazen neprotilátkovým peptidem. Neprotilátkovým peptidem může být toxin podobný ricinu, chelátorový nebo kov vázající peptid nebo enzym (například markerový enzym) nebo peptid nesoucí detegovatelné značení (například 50 radioizotop).

Neprotilátkový peptid může také nést odpovídající vazebné místo pro uvedené skupiny, zahrnující vazebná místa cílená k T – buňkám nebo fragmentům T – buněk.

Do rozsahu vynálezu spadají i monomery a dimery, jak jsou definovány výše, kde interaktivní peptid(y) je(jsou) dále fúzován(y) na C – konci k cíleným proteinům/peptidům, jak jsou uvedeny výše, obsahujících odpovídající vazebná místa. Výsledné funkční proteiny a miniprotilátky jsou tak více funkční.

5

Monomerní protilátkový fúzní protein definovaný výše lze získat postupem, při němž jsou geny, kodující Fv – fragment, interaktivní peptid a, je-li to žádoucí, spojovací (linkerový) peptid klonovány do jednoho expresního plazmidu, hostitelská buňka je transformována uvedeným plazmidem a kultivována v živném roztoku a monomerní fúzní protein je exprimován v buňce nebo sekretován do média.

10

Výše definovaný dimerní fúzní protein lze získat postupem, při němž jsou geny, kodující kompletní monomerní fúzní proteiny nebo jejich části, klonovány alespoň do jednoho expresního plazmidu, hostitelská buňka je transformována uvedeným(i) expresním(i) plazmidem(y) a kultivována v živném roztoku a buď je kompletní dimerní fúzní protein exprimován v buňce nebo do média nebo jsou monomerní fúzní proteiny separátně exprimovány a nekovalentní spojení mezi dvěma monomerními jednotkami se uskuteční v médiu nebo in vitro a v případě, že byly klonovány pouze části fúzních proteinů, jsou další stupně konstrukce proteinů provedeny obvyklými standardními technikami.

15

20

Dimerní Fv – fragmenty, obsahující fúzní proteiny podle vynálezu vykazují vysokou aviditu vůči odpovídajícím antigenům a dostatečnou stabilitu. Tyto nové bivalentní nebo bifunkční molekuly mohou být připraveny jako složené a sestavené molekuly v E.coli. Tyto miniprotilátky jsou kompatibilní s funkční expresí při sekreci.

25

Oligomerizační domény byly vybrány jako mající malou molekulovou hmotnost a tak, aby byly kompatibilní s transportem fúzního proteinu membránou. Jsou založeny na dvou rozdílných typech amfifilních helixů.

30

Amfifilní helixy jsou známé zejména ale ne výlučně, pro spojení ve dvou rozdílných molekulárních strukturách: čtyřhelixových svazcích a spletených klubkách (coiled coil). Dežén a tvorba helixových svazků byly studovány dříve (Eisenberg a spol., 1986, Proteins 1, 16–22, Ho a deGrado, 1987, J. Am. Chem. Soc. 109, 6751–6758, Regan a deGrado, 1988, Science 241, 976–978, Hill a spol., 1990, Science 294, 543–546). Tyto molekuly jsou také známy z přírodních proteinů (Richardson, 1981, Adv. Prot. Chem. 34, 167).

35

Čtyřhelixový svazek může být vytvořen buď čtyřmi separátními molekulami (každá tvořená jedním helixem), dvěma molekulami, obsahujícími každá dva helixy (spojené jako helix – otáčka – helix) nebo jednou molekulou, obsahující motiv helix – otáčka – helix – otáčka – helix. Pro demerizaci nebo multimerizaci jsou vhodné pouze první dvě.

40

Tři variance tohoto posledního tématu byly testovány. Nejprve byl použit jeden helix sekvence udávané Eisenbergem a spol. (1986) (Proteins 1, 16–22). V druhém provedení byla tato sekvence prodloužena malým hydrofilním peptidem končícím cysteinem. Jakmile byly helixy spojeny, byly hydrofilní peptidy udržovány v dostatečně těsném kontaktu tak, že mohou kolidovat a může být vytvořena disulfidová vazba za oxidačních podmínek, jako v periplazmě E.coli. Ve třetí variaci byly použity dva helixy v tandemu, odděleně od krátkou otočku kodujícího peptidu.

45

Ve druhém deženu se použijí peptidy, které mohou tvořit tak zvané struktury „coiled-coil“. Takové peptidy se objevují v transkripčních faktorech jako je např. GCN4 z kvasinky a byly nazvány leucinové zipy („zipper“) (Landschulz a spol., 1988, Science 240, 1759–1764). Krystalová struktura těchto látek byla vyřešena nedávno (O’Shea a spol., 1991, Science 254, 539–544) a vykazuje paralelní uspořádání helixů.

50

Kovalentní spojení helixů je možné velmi malým prodloužením peptidu, obsahujícím opět cystein. Protože helixy jsou nyní paralelní, může být peptidové prodloužení mnohem kratší, protože vzdálenost je mnohem menší.

5 Různé dimerizační prostředky (interkalační helixy) nicméně nejsou fúzovány k doméně protilátky přímo. Je výhodně zavést flexibilní peptid mezi konec scFv fragmentu a začátek helixu. Například byla použita spodní pantová oblast vyššího IgG3. Může však být použito mnoho pantů. Není to vyžadováno dimerizací jako takovou, ale poskytuje se spojení dvou scFv domén podobné
10 antigenním vazebným místům celé protilátky. Tímto způsobem dvě vazebná místa zabírají větší vzdálenosti v prostoru a tím mohou dosáhnout okolních antigenů na pevném povrchu.

Přirozeně se vyskytující panty protilátek jsou výhodnými provedeními pantů v bivalentních miniprotilátkách. V případě bifunkčních miniprotilátek mohou být kratší panty, protože jsou molekuly z různých povrchů zesíťeny tak těsně, jak je to možné, a flexibilita dimerů není
15 nezbytná. Volba pantu je řízena požadovaným zbytkem sekvence, délkou (Argos, 1990, J. Mol. Biol. 211, 943–958), kompatibilitou se svinutím a stabilitou amfifilních helixů (Richardson – Richardson, 1988, Science 240, 1648–1652), sekrecí a rezistencí vůči proteasám.

Předložený vynález pracuje s peptidy jako dimerizačními prostředky, které by měly být co
20 nejmenší. Jedním preferovaným provedením je použití peptidů, které mohou tvořit amfipatické helixy. Tyto helixy chrání hydrofobní povrch při dimerizaci nebo i multimerizaci. Helixy tohoto typu jsou charakterizovány tím, že mají hydrofobní místa na lící straně helixu a obsahují dostatečný počet helix – tvořících zbytků. Pravidla pro takové peptidy jsou popsány Eisenbergem a spol. 1986, O'Shea – a spol. 1991 (Science 254, 539–549), 1992 (Cell 68, 699–708).

25 Přírodní peptidy tohoto typu byly shledány tak zvanými leucinovými zippery, které se vyznačují periodickým výskytem leucinu (každý sedmý zbytek) a jiných hydrofilních zbytků (např. valinu) také každý sedmý zbytek. Jak jsou nyní tyto principy chápány (O'Shea a spol. 1991, 1992, cit. lit.), může být sekvence měněna pro inkorporaci zbytků, které činí asociaci homodimerů nežádoucí, ale preferují asociaci heterodimerů. Taková změna sekvence například může
30 zahrnovat inkorporaci nábojových můstků, jako v homodimerech, stejné náboje se odpuzují a v heterodimeru opačné náboje je přitahují (viz dále).

Předložený vynález může být také rozšířen na bifunkční miniprotilátky. V takovém případě
35 dimerizační prostředky (interkalační peptidy) se používají jen pro tvorbu heterodimerů, ale ne homodimerů. Výhodným provedením této části vynálezu jsou dva rozdílné „coiled-coil“ helixy, jako jsou přirozeně se vyskytující leucinové zippery, např. z transkripčních faktorových proteinů jun a fos (O'Shea a spol., 1989, Science 245, 646–648).

40 V dalším provedení vynálezu může být konstantní scFv – pant – helix prodloužen na c–konci za vzniku fúzního proteinu. Např. fúze k enzymu může být provedena použitím takových bivalentních konstruktů v diagnostikách. Takovými enzymy jsou např. alkalická fosfatáza, luciferáza nebo křenová peroxidáza. Výhodou takového protilátka–enzym fúzního proteinu by mělo být, že bivalentnost protilátky by měla vést k zvýšené vazbě k povrchem vázanému antigenu. Výhodou
45 proti fúznímu proteinu připravenému konvenční technologií (tj. chemickou kopulací protilátky ke zdroji enzymu) by měla být větší konzistence vsádka–vsádka, homogenita produktu a mnohem jednodušší způsob přípravy, zejména z E–coli v jediném stupni.

50 Stejný model lze užít i u miniprotilátek, které mohou být prodlouženy na C–konci pro inkorporaci toxinu. Takové imunotoxiny by měly být bivalentní nebo i bispecifické a kombinovat tak výhody výše uvedených protilátkových fragmentů spojených výše s výhodami imunotoxinů známých v terapii nádorů. Podobně peptid nebo protein, vázající kov, by měl být geneticky spojen pro použití v radioimunoterapii nebo zobrazení nádorů. Stejně výhody pro jakýkoliv geneticky kodovaný hybridní protein platí i pro fúze protilátka – enzym.

55

V dalším provedení vynálezu může být vytvořen konstrukt typu scFv – pant – helix k dimerizaci s dalším proteinem fúzovaným k dimerizační doméně, zcela analogicky jak je popsáno výše pro tvorbu bispecifických miniprotilátek. V takovém postupu by scFv fragment měl být např. spojen s helixem fos proteinu. Takový cizí protein, který by mohl být zpracován za vzniku heterodimerů s scFv fragmentem, zahrnuje enzymy vhodné v diagnózách, toxiny, peptidy vázající kovy nebo proteiny vhodné v radioterapii nebo radiozobrazení.

Použitím principů tohoto vynálezu mohou přítomné dimerizační domény také sloužit pro účely čištění. Rekombinantní protein jakéhokoli typu může být fúzován k dimerizační doméně např. k pant – fos – zipper. Po koexpresi s scFv – pan – jun může být heterodimer čištěn v jednom stupni afinitní kolonou na scFv – specifitu.

V alternativním provedení „opačný“ zipper připojený ke kolonovému nosiči, zachycuje protein–pant–zipper, když prochází kolonou jako surový buněčný extrakt.

Eluce čistého fúzního proteinu z kolony je možná použitím nesvinující teploty zipperu. Následné oddělení od dimerizační domény je proveditelné zavedením proteolytického místa, např. pro faktor Xa srážení krve, do pantu (Nagai Thogerson, 1987, Meth. Enzymol. 152, 461–481).

Zvláštní výhodou miniprotilátek popsaných v tomto vynálezu, je schopnost komplexní funkčnosti v *Escherichia coli*. V případě homobivalentních konstruktů se použije dimerizační princip, který umožňuje tvorbu homodimerů. Příklady, popsané výše, zahrnují „coiled–coil“ helix (leucinový zipper) kvasinkového proteinu GCN4 nebo helixy z antiparalelního 4 – šroubovicového svazku. V tomto případě je scFv fragment exprimován za přítomnosti bakteriální signální sekvence a nese na konci genu scFv fragmentu kodomů pro pant a dimerizační helix nebo helix – otočku – helix. Helixy jsou kompatibilní se sekrecí k periplazmatickému prostoru, kde probíhá svinutí proteinu, tvorba disulfidu a komplexace. Za těchto podmínek se homodimerní proteiny tvoří samy a mohou být přímo izolovány v dimerní formě.

Jsou-li požadovány heterobivalentní konstrukty, je nutné spojit dva rozdílné scFv fragmenty nebo jeden scFv fragment s odlišným proteinem. Ve výhodném provedení vynálezu jsou oba spojované proteiny exprimovány ve stejné buňce, výhodně stejným plazmidem, výhodně jako dicistronní operon. Dežén umělých dicistronních operonů je vysvětlen např. v práci (Skerra a spol. 1991, Protein Eng. 4, 971). Protože spojení musí probíhat v periplazmě, protože scFv fragment může být svinut pouze v oxidačním prostředí, musí být oba proteiny transportovány a oba musí být opatřeny signální sekvencí. Dimerizační peptidy musí být zvoleny tak, že promotují spojení dvou rozdílných proteinů, ale brání spojení případných homodimerů.

Příklady takových proteinů jsou leucin zipper peptidy proteinů fas a jun (viz výše).

Jestliže nejsou exprimovány ve stejné buňce, měly by scFv – pant – zipper konstrukty být spolu míseny jako surový buněčný extrakt nebo čištěný protein a zpracovány zvýšenou teplotou. V nepřítomnosti opačného zipperu, např. scFv – pant – jun – zipper konstrukt je schopen tvořit homodimery. Po krátkém zahřívání na teplotu tání kolem 40 °C, se zipperu neočekávaného homodimeru svinují a tvoří stabilnější heterodimer (O’Shea a spol., 1992, Cell 68, 699–708). Bez zvýšení teploty není tvorba heterodimerů in vitro možná, jak je prokázáno experimentálně.

Popis obrázků na připojených výkresech

50

Obr. 1 scFv – expresní vektor pLISC–SE, obsahující scFv – fragment

Obr. 2 dicistronní scFv – pant – zipper expresní vektor pACKxFyJ

- Obr. 3 Funkční ELISA
 Koncentrace afinitně čistěných proteinů, měřeno jako OD₂₈₀ (vertikální osa), vztaženo k molárnímu počtu vazebných míst na jamku (horizontální osa). ELISA plotny byly pokryty fosfocholin – BSA a čistěné fosfocholin – specifická protilátka – proteiny byly navázány a detegovány anti – McP603 antisérem.
- 5 a) Porovnání různých protilátek
 b) Porovnání protilátky scHLXc s ScFV a celým IgA.
- 10 Obr. 4 Funkční anti–lysozom ELISA,
 PC – afinitně čistěné vzorky koexprimované anti – PC – anti – lysozom bispecifické miniprotilátky.
 + a – na horizontální ose znamená: plus inhibitor (+) a bez inhibitoru (–).
- 15 Připojený seznam sekvencí je číslován následovně:
- S.I.N.1: Celá nukleotidová a aminokyselinová sekvence pLISC–vektoru.
 S.I.N.2: Genová kazeta interkalačního GCNL–leucin zipperu (nukleotidová a aminofselinová sekvence).
 20 S.I.N.3: Genová kazeta, kodující interkalační antiparalelní helix–otočka–helix (nukleotidová a aminofselinová sekvence).
 S.I.N.4: Genová kazeta, kodující interkalační jun–zipper a IgG3–pant oblast.
 S.I.N.5: Genová kazeta, kodující interkalační fos–zipper a IgG3–pant oblast.
 S.I.N.6: Genová kazeta, kodující interkalační jun–zipper a označený linker.
 25 S.I.N.7: Genová kazeta, kodující interkalační fos–zipper a označený linker.

Příklady provedení vynálezu

- 30 Příklad 1 Konstrukce vektorů pro sekretované jednořetězcové fragmenty, obsahující restriční místo pro zavedení genů pro interkalační peptidy.

Rekombinantní DNA–techniky byly provedeny podle Sambrooka a spol. (1989, Molecular Cloning: A laboratory manual. Druhé vydání. Cold Spring Harbor Laboratory, New York). Funkční exprese jednořetězcových Fv–fragmentů a miniprotilátek v E. coli JM83 byla provedena s vektory podobnými pASK–lisc (Skerra a spol., 1991, Protein Eng. 4, 971). Místně řízená mutagenese byla přímo provedena v těchto vektorech podle Kunkela a spol. (1987, Meth. Enzymol. 154, 367–382) a Geisselsodera a spol. (1987, Biotechniques 5, 786–791) použitím helper fága M13KO7 (Vieira Messing, 1987, Meth. Enzymol. 153, 3–11). Byla provedena SDS–PAGE podle Flinga a Gregersona (1986, Anal. Biochem. 155, 83–88). Koncentrace afinitně čistěných proteinů byly měřeny jako OD₂₈₀ za použití vypočtených extinkčních koeficientů (Gill a van Hippel, 1989, Anal. Biochem. 1982, 319–326). Použije se vektor jako pASK 40 (Skerra a spol., 1991, Protein Eng. 4, 971), který obsahuje počátek replikace, regulující promotor, bakteriální signální sekvenci následovanou násobným klonovacím místem, transkripční terminátor a počátek pro jednořetězcové fágy. Gen pro jednořetězcový Fv fragment je sestaven následovně: nukleotidová sekvence V_H domény je přímo následována linkerovou sekvencí kodující výhodně asi 15 zbytků, výhodně sekvencí (Gly₄Ser)₃, následovanou přímo sekvencí V_L domény. Alternativně sekvence V_L domény může být přímo následována sekvencí linkeru, následovanou sekvencí V_H domény.

45
50

Jestliže protilátka má známou sekvenci, může být kompletní gen scFv fragmentu sestaven ze syntetických oligonukleotidů. Podrobně je experimentální postup pro takovou syntézu protilátkového genu uveden např. v práci Plückerthuna a spol. (1987, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 52, 105–112).

55

Jsou-li geny V_H V_L domén přítomny v jiných vektorech, může být gen pro scFv fragment kompleťován z restrikčních fragmentů. Například restrikční fragment kodující většímu V_H domény může být vyříznut z jiného plazmidu a fragment, kodující V_L doménu může být vyříznut z plazmidu. Zbylé kusy V_L a V_H a linker pro scFv fragment mohou být poskytnuty kazetami syntetických oligonukleotidů, které je nutno ligovat standardní metodou (Sambrook a spol., 1989, cit. literatura). Směs fragmentů je ligována do vektoru pASK40 nebo podobného plazmidu, obsahujícího pár vhodných restrikčních míst.

Jestliže geny protilátky nebyly předem klonovány, mohou být přímo získány z hybridomové buňky produkující protilátku polymerázovou řetězcovou reakcí (PCR, PCR metoda je popsána v práci McPherson a spol., 1991, PCR—A Practical Approach Oxford University Press, New York). Primery vhodné pro amplifikaci V_H a V_L domén byly uvedeny v pracích (Orlandi a spol., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 3833–3837, Huse a spol., 1989, Science 246, 1275–1281, Larrick a spol., 1989, Bio-technology 7, 934–938). Metoda získání mRNA z hybridomu je v těchto pracích rovněž popsána. Separátní V_H a V_L geny mohou být klonovány do separátních vektorů a scFv gen sestaven podle zásad vysvětlených dříve.

Jestliže ligované fragmenty nevedou ke správnému čtecímu rámečku scFv fragmentu, precizní fúze se signální sekvencí kodonů umístěna na plazmidu může být generována místně řízenou mutagenézí. Sestavení oligonukleotidů a realizace jsou možné pro každého odborníka v oboru.

Takto získaný scFv expresní plazmid obsahuje dva kodony pro bakteriální signální sekvenci, přímo následované první variabilní doménou (V_H nebo V_L), linker a druhou variabilní doménu (V_L nebo V_H) pod kontrolou řízeného promotoru.

Na 3' konci tohoto genu, odpovídajícímu C-konci scFv proteinu, je zavedeno unikátní restrikční místo do expresního plazmidu, umožňující inzerci kazet kodujících interkalační peptidy. Restrikční místo je zavedeno místně řízenou mutagenézí metodou podle Kunkela (1987, Meth. Enzymol. 154, 367–382).

Příklad kompletní sekvence vhodného jednořetězcového Fv expresního plazmidu pLISC–SE pro příjem interkalačního peptidu je uveden na obr. 1 a sekvence id. čísla (S.I.N.) 1 (viz seznam sekvencí).

Příklad 2 Dezen a konstrukce genové kazety kodující interkalační peptidy leucinového zipperu.

Genová kazeta, opatřená restrikčními místy kompatibilními s restrikčním místem na 3'konci scFv fragmentu genu, musí kodovat sekvenci pantu (připojení scFv fragmentu k interkalačnímu peptidu) a samotný interkalační peptid. Pantová oblast může však být vynechána.

Jako příklad se horní pantová oblast myšního IgG3 (Dangl a spol., 1988, EMBO J.7, 1989–1994), s následovanou sekvencí leucinové zipperové sekvence kvasinkového proteinu GCN4 (Oas a spol., 1990, Biochemistry T29, 2891–2894), zpětně translatuje do často užívaných E.Coli kodonů (S.I.N.:2). Oligonukleotidy jsou syntetizovány a ligovány do vektoru pLISC–SE předem štěpeného pomocí EcoRi a Hind III.

Příklad 3 Dezen a konstrukce genové kazety, kodující interkalační peptidy čtyřšroubovicového svazku.

Analogicky příkladu 2 se sekvence horní pantové oblasti myšního IgG3, následovaná sekvencí helix–otáčka–helix čtyřšroubovicového svazku (Eisenberg a spol., 1986, citovaná literatura)

zpětně translatuje do často užívaných E.coli kodonů (S.I.N.:3). Oligonukleotidy jsou syntetizovány a ligovány do vektoru pLISC-SE předem štěpeného pomocí EcoRI a Hind III.

- 5 Příklad 4 Dezen a konstrukce dvou genových kazet, kodujících interkalační peptidy leucinového zipperu a jejich ko-expresi.

10 Analogicky příkladu 2 se sekvence horní pantové oblasti myšího IgG3 následovaná sekvencí zipperové sekvence jun proteinu (O'Shea a spol., 1992, citovaná literatura) zpětně translatuje do často používaných E.coli kodonů (S.I.N.:4). Syntetizují se oligonukleotidy a ligují do vektoru pLISC-SE, předem štěpeného EcoRI a Hind III.

15 V paralelní reakci se sekvence horní pantové oblasti myšího IgG3, následovaná sekvencí zipper sekvence fos proteinu (O'Shea a spol., 1992, Cell 68, 699-708) zpětně translatuje do nejčastěji užívaných E.coli kodonů (S.I.N.:5). Oligonukleotidy se syntetizují a ligují do vektoru pLISC-SE předem štěpeného EcoRI a Hind III. Tyto dva vektory tak kodují každý jiný protilátkový scFv fragment, následovaný pantovým peptidem a rozdílným leucin zipperovým peptidem. Pro ko-expresi dvou scFv fragmentů je celý scFv-pant-zipper gen fos- obsahujícího produktu vyříznut z vektoru jako Xba I-Hind III fragment a ligován do vektoru, pLISC-SE-scFv-jun, obsahujícího
20 vždy scFv gen jiné protilátky.

Nově získaný vektor pak exprimuje scFv₁-linker₁-fos-zipper a scFv₂-linker₂-jun-zipper z jediného promotoru jako dicistronní operon.

- 25 Zlepšená sekvence pro pantovou oblast v kontextu fos a jun zipperů je uvedena v S.I.N.:6 a 7. Pant je kratší a není proto náchylný k proteolýze. V případech, kdy je vzdálenost mezi dvěma vazebnými místy méně důležitá, mohou být takové kratší panty výhodné. V takovém případě byl „konec“ scFv fragmentu zkrácen a EcoRI místo, které obdrží geny pro interkalační peptidy bylo posunuto čtyři zbytky proti směru.

30

Příklad 5 Čištění bivalentní miniprotilátky z E.coli.

35 E.coli JM83 nesoucí plazmid konstruovaný jako v příkladech 2 a 3 rostou na O.D. 550 rovnou 0,5 a indukují se IPTG na konečnou koncentraci 1 mM. Buňky se odstředí, resuspendují v BBS pufru (200 mM boritan sodný, 160 mM NaCl, pH 8,0) a suspenze se nechá projít French-lisem. V tomto příkladu se použije fosforylcholin vázající miniprotilátka. Miniprotilátka se čistí fosforylcholin afinitní chromatografií (Chesebro a Metzger, 1972, Biochemistry 11, 766-771).

40

Příklad 6 Čištění bispecifické miniprotilátky z E.coli.

45 E.coli JM83 nesoucí plazmid konstruovaný jako v příkladech 2 a 3 a obsahující dicistronní strukturální gen pro dva různé scFv (obr. 2) rostou na O.D. 550 rovnou 0,5 a indukují se IPTG na konečnou koncentraci 1 mM. Buňky se odstředí, resuspendují v BBS pufru (200 mM boritan sodný, 160 mM NaCl, pH 8,0) a suspenze se nechá projít French lisem).

50 V tomto příkladu se použije bispecifická protilátka, obsahující jak specifitu pro fosforylcholin, tak benzoylamicillin. Miniprotilátka se čistí pomocí fosforylcholin afinitní chromatografie jak se popsáno (Chesebro a Metzger, 1972, citovaná literatura).

Příklad 7 Povrchová vazba bivalentní miniprotilátky.

ELISA–platny (Nunc, Macrosorp) byly potaženy asi 400 g/ml fosfocholin–BSA v PBS pufru (20 mM fosfát, pH 7,2, 115 mM NaCl). Haptenové činidlo bylo připraveno z nitrofenyl-fosfocholinu (Sigma), který byl redukován a diazotován v podstatě jak je popsáno (Chesebro – Metzger, 1972, citovaná literatura) a azokopulací byl připojen k BSA (Sigma) v pufru boritan-salinický roztok (52,5 mM boritan sodný, pH 9, 120 mM NaCl) při asi 4 °C po 48 hodin s následující dialýzou proti PBS. Po blokování nepotaženého povrchu ploten 5 % odstředěným mlékem (Nestle) v PBS pufru po alespoň 2 hodiny, byl periplazmatický extrakt nebo čistěný protein inkubován v BBS pufru na plotně po 90 min při teplotě místnosti. Po pečlivém promytí (3krát) byly zbývající funkční protilátkové fragmenty detegovány standardními postupy (Harlow a Lane, 1988, „Antibodies, A Laboratory Manual“, Cold Spring Harbor Laboratory, 555–592) použitím králičí anti–McPC603 séra a anti–králičího imunoglobulinu, připojeného k peroxidáse (Sigma) podle Gallatiho (1979, Clin. Chem. Clin. Biochem. 17, 1–4).

Enormní zvýšení vazby a tím citlivosti je pozorováno u všech miniprotilátkových konstruktů ve srovnávání s monomerním scFv fragmentem. Toto je v souladu se současnou vazbou dvou nebo i více vazebných míst ke stejnému povrchu. Tato avidita fúzního proteinu scHLXc je srovnatelná s přirozenou protilátkovou McP603, která by mohla být detegována antigenem potaženou ELISA, zatímco monomerní scFv fragment by mohl být detegován stonásobně vyššími koncentracemi (obr. 3a, b). Celková vazba je téměř úplně inhibovatelná rozpustným haptinem, s výjimkou monomerního scFv fragmentu. Termodynamická afinita přirozené protilátky k rozpustnému fosfocholinu je asi $1,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ a tak relativně slabá (Metzger a spol., 1971, Proceedings of the 1st Congress of Immunology, Academic Press, New York, str. 253–267), a je tak zjevně nevhodný pro komplex monomerní fragment–hapten k přečkání opakovaných promývacích stupňů funkční ELISA (Kemeny a Challacombe, 1988, „ELISA and other solid phase immunoassays“, Wiley – Sons, New York).

30 Příklad 8 Povrchová vazba bifunkčních miniprotilátek.

Koexprimované bifunkční miniprotilátky rozpoznávající fosfocholin jedním raménkem a lysozym druhým raménkem byly čistěny fosfocholin (PC) afinitní chromatografií a testovány na lysozymovou specifitu. ELISA–plotna byla potažena lysozymem a byla provedena ELISA jak je popsáno výše v příkladu 7. Tři různé přípravky vykazují vazbu k antigen–povrchu, která je kompletně inhibovatelná rozpustným lysozymem. (obr. 4).

SEQ ID NO: 1

ACCCGACACC	ATCGAATGGC	GCAAAACCTT	TCGCGGTATG	GCATGATAGC	50
GCCCGGAAGA	GAGTCAATTC	AGGGTGGTGA	ATGTGAAACC	AGTAACGTTA	100
TACGATGTCC	CAGAGTATGC	CGGTGTCTCT	TATCAGACCG	TTTCCCGCGT	150
GGTGAACCAG	GCCAGCCACG	TTTCTGCGAA	AACGCGGGAA	AAAGTGGGAAG	200
CGGCGATGGC	GGAGCTGAAT	TACATTCCCA	ACCGCGTGGC	ACAACAACCTG	250
GCGGGCAAAC	AGTCGTTGCT	GATTGGCGTT	GCCACCTCCA	GTCTGGCCCT	300
GCACGCGCCG	TCGCAAATTG	TCGCGGCGAT	TAAATCTCGC	GCCGATCAAC	350
TGGGTGCCAC	CTGTGTGGTG	TCGATGGTAG	AACGAAGCGG	CGTCGAAGCC	400
TGTAAAGCGG	CGGTGCACAA	TCTTCTCGCG	CAACGCGTCA	GTGGGCTGAT	450
CATTAACTAT	CCGCTGGATG	ACCAGGATGC	CATTGCTGTG	GAAGCTGCCT	500
GCACTAATGT	TCCGGCGTTA	TTTCTTGATG	TCTCTGACCA	GACACCCATC	550
AACAGTATTA	TTTTCTCCCA	TGAAGACGGT	ACGCGACTGG	GCGTGGAGCA	600
TCTGGTCCGA	TTGGGTCACC	AGCAAATCGC	GCTGTTAGCG	GGCCCATTAA	650
GTTCTGTCTC	GGCGCGTCTG	CGTCTGGCTG	GCTGGCATAA	ATATCTCACT	700
CGCAATCAAA	TTCAGCCGAT	AGCGGAACGG	GAAGGCGACT	GGAGTGCCAT	750
GTCCGGTTTT	CAACAAACCA	TGCAAATGCT	GAATGAGGGC	ATCGTTCCCA	800
CZGCGATGCT	GGTTGCCAAC	GATCAGATGG	CGCTGGGCGC	AATGCGCGCC	850
ATTACCGAGT	CCGGGCTGCG	CGTTGGTGCG	GATGTCTCGG	TAGTGGGATA	900
CGCAGATACC	GAAGACAGCT	CATGTTATAT	CCCGCCGTTA	ACCACCATCA	950
AACAGGATTT	TCGCCTGCTG	GGGCAAACCA	GCGTGGACCG	CTTGCTGCAA	1000
CTCTCTCAGG	GCCAGGCGGT	GAAGGGCAAT	CAGCTGTTGC	CCGTCTCACT	1050
GGTGAANAAG	AAAACCACCC	TGGCGCCCAA	TACGCAAACC	GCCTCTCCCC	1100
GCGCGTTGGC	CGATTCATTA	ATGCAGCTGG	CACGACAGGT	TTCCCGACTG	1150
GAAAGCGGGC	AGTGAGCGCA	ACGCAATTAA	TGTGAGTTAG	CTCACTCATT	1200
AGGCACCCCA	GGCTTTACAC	TTTATGCTTC	CGGCTCGTAT	GTTGTGTGGA	1250
ATTGTGAGCG	GATAACAATT	TCACACAGGA	AACAGCTATG	ACCATGATTA	1300
CGAATTTCTA	GATAACGAGG	GCAAAAA---ATG	AAA AAG ACA	GCT ATC	1345
			Met Lys Lys Thr Ala Ile		
			1	5	
GCG ATT GCA GTG GCA CTG GCT GGT TTC GCT ACC GTA GCG CAG	1387				
Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln					
	10	15	20		
GCC GAA GTT AAA CTG GTA GAG TCT GGT GGT GGT CTG GTA CAG	1429				
Ala Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln					
	25	30			
CCG GGT GGA TCC CTG CGT CTG TCT TGC GCT ACC TCA GGT TTC	1471				
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe					
	35	40	45		
ACC TTC TCT GAC TTC TAC ATG GAG TGG GTA CGT CAG CCC CCG	1513				
Thr Phe Ser Asp Phe Tyr Met Glu Trp Val Arg Gln Pro Pro					
	50	55	60		
GGT AAA CGT CTC GAG TGG ATC GCA GCT AGC CGT AAC AAA GGT	1555				
Gly Lys Arg Leu Glu Trp Ile Ala Ala Ser Arg Asn Lys Gly					
	65	70	75		
AAC AAG TAT ACC ACC GAA TAC AGC GCT TCT GTT AAA GGT CGT	1597				
Asn Lys Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg					
	80	85	90		

TTC ATC GTT TCT CGT GAC ACT AGT CAA TCG ATC CTG TAC CTG	1639
Phe Ile Val Ser Arg Asp Thr Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Leu	
95 CAG ATG AAT GCA TTG CGT GCT GAA GAC ACC GCT ATC TAC TAC	1681
Gln Met Asn Ala Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr	
105 TGC GCG CGT AAC TAC TAT GGC AGC ACT TGG TAC TTC GAC GTT	1723
Cys Ala Arg Asn Tyr Tyr Gly Ser Thr Trp Tyr Phe Asp Val	
120 TGG GGT GCA GGT ACC ACC GTT ACC GTT TCT TCT GGT GGT GGT	1765
Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly	
135 GGT TCT GGT GGT GGT GGT TCT GGT GGT GGT TCT GAT ATC	1807
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile	
150 GTT ATG ACC CAG TCT CCG AGC TCT CTG TCT GTA TCT GCA GGT	1849
Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Val Ser Ala Gly	
165 GAA CGT GTT ACC ATG TCT TGC AAA TCT TCT CAG TCT CTG CTG	1891
Glu Arg Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu	
175 AAC TCT GGT AAC CAG AAA AAC TTC CTG GCG TGG TAT CAG CAA	1933
Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln	
190 AAG CCT GGC CAA CCG CCG AAA CTG CTG ATC TAC GGT GCG TCG	1975
Lsy Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser	
205 ACC CGT GAA TCT GGT GTT CCG GAC CGT TTT ACC GGT AGC GGT	2017
Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly	
220 AGC GGT ACC GAC TTC ACT CTG ACC ATC TCT TCT GTA CAG GCT	2059
Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala	
235 GAA GAT CTG GCT GTT TAC TAC TGT CAA AAC GAC CAC TCT TAC	2101
Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp His Ser Tyr	
245 CCG CTG ACC TTT GGC GCC GGC ACC AAA CTG GAA CTG AAG CGC	2143
Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg	
260 GCT AAC GGT GAA TTC-TGATAAGCTTGA CCTGTGAAGT GAAAAATGGC	2190
Ala Asn Gly Glu Phe *	
275 GCACATTGTG CGACATTTTT TTTGTCTGCC GTTTACCGCT ACTGCGTCAC	2240
GGATCCCCAC GCGCCCTGTA GCGGCGCATT AAGCGCGGCG GGTGTGGTGG	2290
TTACGCGCAG CGTGACCGCT ACACTTGCCA GCGCCCTAGC GCCCGCTCCT	2340
TTCGCTTTCT TCCCTTCCTT TCTCGCCACG TTCGCCGGCT TTCCCGTCA	2390
AGCTCTAAAT CCGGGCATCC CTTTAGGGTT CCGATTTAGT GCTTTACGGC	2440
ACCTCGACCC CAAAAAAPT GATTAGGGTG ATGGTTCACG TAGTGGGCCA	2490
TCGCCCTGAT AGACGGTTTT TCGCCCTTTG ACGTTGGAGT CCACGTTCTT	2540
TAATAGTGA CTCTTGTTCC AAACCTGGAAC AACACTCAAC CCTATCTCGG	2590
TCTATTCTTT TGATTTATAA GGGATTTTGC CGATTTCCGGC CTATTGGTTA	2640

AAAAATGAGC	TGATTTAACA	AAAATTTAAC	GCGAATTTTA	ACAAAATATT	2690
AACGTTTACA	ATTTTCAGGTG	GCACTTTTCG	GGGAAATGTG	CGCGGAACCC	2740
CTATTTGTTT	ATTTTTCTAA	ATACATTCAA	ATATGTATCC	GCTCATGAGA	2790
CAATAACCCT	GATAAATGCT	TCAATAATAT	TGAAAAAGGA	AGAGTATGAG	2840
TATTC AACAT	TTCCGTGTCG	CCCTTATTCC	CTTTTTTGCG	GCATTTTGCC	2890
TTCCTGTTTT	TGCTCACCCA	GAAACGCTGG	TGAAAGTAAA	AGATGCTGAA	2940
GATCAGTFFG	GTGCACGAGT	GGTTACATC	GAACTGGATC	TCAACAGCGG	2990
TAAGATCCTT	GAGAGTTTC	GCCCCGAAGA	ACGTTTTCCA	ATGATGAGCA	3040
CTTTTAAAGT	TCTGCTATGT	GGCGCGGTAT	TATCCCCTAT	TGACGCCGGG	3090
CAAGAGCAAC	TCCGTCGCCC	CATACACTAT	TCTCAGAATG	ACTTGCTTGA	3140
GTACTCACCA	GTCACAGAAA	AGCATCTTAC	GGATGGCATG	ACAGTAAGAG	3190
AATTATGCAG	TGCTGCCATA	ACCATGAGTG	ATAACACTGC	GGCCAACTTA	3240
CTTCTGACAA	CGATCGGAGG	ACCGAAGGAG	CTAACCGCTT	TTTTGCACAA	3290
CATGGGGGAT	CATGTAATC	GCCTTGATCG	TTGGGAACCG	GAGCTGAATG	3340
AAGCCATACC	AAACGACGAG	CGTGACACCA	CGATGCCTGT	AGCAATGGCA	3390
ACAACAATTG	GCAAACCTAT	AACTGGCGAA	CTACTTACTC	TAGCTTCCCG	3440
GCAACAATTA	ATAGACTGGA	TGGAGGCGGA	TAAAGTTGCA	GGACCACTTC	3490
TGCGCTCGGC	CCTTCCGGCT	GGCTGGTTTA	TTGCTGATAA	ATCTGGAGCC	3540
GGTGAGCGTG	GGTCTCGCGG	TATCATTGCA	GCACTGGGGC	CAGATGGTAA	3590
GCCCTCCCGT	ATCGTAGTTA	TCTACACGAC	GGGGAGTCAG	GCAACTATGG	3640
ATGAACGAAA	TAGACAGATC	GCTGAGATAG	GTGCCTCACT	GATTAAGCAT	3690
TGTTAACTGT	CAGACCAAGT	TTACTCATAT	ATACTTTAGA	TTGATTTAAA	3740
ACTTCATTTT	TAATTTAAAA	GGATCTAGGT	GAAGATCCTT	TTTGATAATC	3790
TCATGACCAA	AATCCCTTAA	CGTGAGTTTT	CGTCCACTG	AGCGTCAGAC	3840
CCCCTAGAAA	AGATCAAAGG	ATCTTCTTGA	GATCCTTTTT	TTCTGCGCGT	3890
AATCTGCTGC	TTGCAAACAA	AAAAACCACC	GCTACCAGCG	GTGGTTTGTT	3940
TGCCGGATCA	AGAGCTACCA	ACTCTTTTTC	CGAAGGTAAC	TGGCTTCAGC	3990
AGAGCGCAGA	TACCAAATAC	TGTCCTTCTA	GTGTAGCCGT	AGTTAGGCCA	4040
CCACTTCAAG	AACTCTGTAG	CACCGCCTAC	ATACCTCGCT	CTGCTAATCC	4090
TGTTACCAGT	GGCTGCTGCC	AGTGGCGATA	AGTCGTGTCT	TACCGGGTTG	4140
GACTCAAGAC	GATAGTTACC	GGATAAGGCG	CAGCGGTCCG	GCTGAACGGG	4190
GGGTTGCTGC	ACACAGCCCA	GCTTGGAGCG	AACGACCTAC	ACCGAAGTGA	4240
GATACCTACA	GCGTGAGCTA	TGAGAAAGCG	CCACGCTTCC	CGAAGGGAGA	4290
AAGGCGGACA	GGTATCCGGT	AAGCGGCAGG	GTCGGAACAG	GAGAGCGCAC	4340
GAGGGAGCTT	CCAGGGGGAA	ACGCCTGGTA	TCTTTATAGT	CCTGTCCGGT	4390
TTGCCACCT	CTGACTTGAG	CGTCGATTTT	TGTGATGCTC	GTCAGGGGGG	4440
CGGAGCCTAT	GGAAAAACGC	CAGCAACCGG	GCCTTTTTTAC	GGTTCTCTGG	4490
CTTTTGCTGG	CCTTTTGCTC	ACATG			4515

SEQ ID NO: 2

```

GGT GAA TTC CCC AAA CCT AGT ACT CCC CCT GGC AGC AGC CGC ATG 45
Gly Glu Phe Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Arg Met
1  ↑                    5                    10                    15
      L----- Igg3-hinge ----- L-----
AAA CAG CTG GAA GAT AAA GTT GAA GAG CTT CTT TCG AAA AAC TAC 90
Lys Gln Leu Glu Asp Lys Val Glu Glu Leu Leu Ser Lys Asn Tyr
      20                    25                    30
----- GCN4-ripper -----
CAC CTC GAA AAT GAA GTT GCG CGC CTC AAA AAA CTT GTT GGT GAA 135
His Leu Glu Asn Glu Val Ala Arg Leu Lys Lys Leu Val Gly Glu
      35                    40                    45
-----
CGC TGATAAGCTT GAC 151
Arg      ↑
---stop
    
```

SEQ ID NO: 3

```

GGT GAA TTC CCC AAA CCT AGC ACC CCC CCT GGC AGC AGT GGT GAA 45
Gly Glu Phe Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly Glu
1  ↑                    5                    10                    15
      L----- Igg3-hinge ----- L-----
CTG GAA GAG CTG CTT AAG CAT CTT AAA GAA CTT CTG AAG GGC CCC 90
Leu Glu Glu Leu Leu Lys His Leu Lys Glu Leu Leu Lys Gly Pro
      20                    25                    30
----- bundle-helix A ----- L-----
CGC AAA GGC GAA CTC GAG GAA CTG CTG AAA CAT CTG AAG GAG CTG 135
Arg Lys Gly Glu Leu Glu Glu Leu Leu Lys His Leu Lys Glu Leu
      35                    40                    45
-----turn----- L----- bundle-helix B -----
CTT AAA GGT GAA TTC TGATAAGCTT GACCTGTGAA GTGAAAAAAT G 191
Leu Lys Gly Glu Phe
      ↑      50      ↑
-----stop-----
    
```

SEQ ID NO: 4

```

GGT GAA TTC CCC AAA CCT AGT ACT CCC CCT GGC AGC AGC CGT ATC 45
Gly Glu Phe Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Arg Ile
1  ↑          5          10          15
      L-----IgG3-hinge-----J L-----
GCT CGT CTC GAG GAA AAA GTT AAA ACC CTG AAA GCT CAG AAC TCC 90
Ala Arg Leu Glu Glu Lys Val Lys Thr Leu Lys Ala Gln Asn Ser
      20          25          30
----- jun-zipper -----
GAA CTG GCT TCC ACC GCT AAC ATG CTG CGT GAA CAG GTT GCT CAG 135
Glu Leu Ala Ser Thr Ala Asn Met Leu Arg Glu Gln Val Ala Gln
      35          40          45
----- jun-zipper -----
CTG AAA CAG AAA GTT ATG AAC TAC TGATAAGCTT GACCTGTGAA G 180
Leu Lys Gln Lys Val Met Asn Tyr
      50
-----J stop

```

SEQ ID NO: 5

```

GGT GAA TTC CCC AAA CCT AGT ACT CCC CCT GGC AGC AGC CTG ACC 45
Gly Glu Phe Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Leu Thr
1  ↑          5          10          15
      L-----IgG3-hinge-----J L-----
GAC ACC CTG CAG GCT GAA ACC GAC CAG CTG GAA GAC AAA AAA TCC 90
Asp Thr Leu Gln Ala Glu Thr Asp Gln Leu Glu Asp Lys Lys Ser
      20          25          30
----- fos-zipper -----
GCT CTG CAG ACC GAA ATC GCT AAC CTG CTG AAA GAA AAA GAA AAA 135
Ala Leu Gln Thr Glu Ile Ala Asn Leu Leu Lys Glu Lys Glu Lys
      35          40          45
----- fos-zipper -----
CTG GAA TTT ATC CTG GCT GCT TAC TGATAAGCTT GACCTGTGAA G 180
Leu Glu Phe Ile Leu Ala Ala Tyr
      50
-----J stop

```

SEQ ID NO: 6

```

GGT GAA TTC CCG TCT GGT AAC GAA GCT CGT ATC GCT CGT CTC GAG 45
Gly Glu Phe Pro Ser Gly Asn Glu Ala Arg Ile Ala Arg Leu Glu
1  ↑                    5                    10                    15
      L----- linker ----- J-----
GAA AAA GTT AAA ACC CTG AAA GCT CAG AAC TCC GAA CTG GCT TCC 90
Glu Lys Val Lys Thr Leu Lys Ala Gln Asn Ser Glu Leu Ala Ser
      20                    25                    30
----- jun-zipper -----
ACC GCT AAC ATG CTG CGT GAA CAG GTT GCT CAG CTG AAA CAG AAA 135
Thr Ala Asn Met Leu Arg Glu Gln Val Ala Gln Leu Lys Gln Lys
      35                    40                    45
----- jun-zipper -----
GTT ATG AAC TAC TGATAAGCTT GACCTGTGAA GTGAAAAATG GCG 180
Val Met Asn Tyr ↑
----- J stop

```

SEQ ID NO: 7

```

GGT GAA TTC GGT CCG TCT GGT AAC GAA CTG ACC GAC ACC CTG CAG 45
Gly Glu Phe Gly Pro Ser Gly Asn Glu Leu Thr Asp Thr Leu Gln
1  ↑                    5                    10                    15
      L----- linker ----- J----- fos-zipper -----
GCT GAA ACC GAC CAG CTG GAA GAC AAA AAA TCC GCT CTG CAG ACC 90
Ala Glu Thr Asp Gln Leu Glu Asp Lys Lys Ser Ala Leu Gln Thr
      20                    25                    30
----- fos-zipper -----
GAA ATC GCT AAC CTG CTG AAA GAA AAA GAA AAA CTG GAA TTT ATC 135
Glu Ile Ala Asn Leu Leu Lys Glu Lys Glu Lys Leu Glu Phe Ile
      35                    40                    45
----- fos-zipper -----
CTG GCT GCT TAC TGATAAGCTT GACCTGTGAA GTGAAAAATGGCG 180
Leu Ala Ala Tyr ↑
----- J stop

```

Seznam sekvencí:

(1) Obecná informace:

- 5 i) přihlašovatel:
 A) jméno: Merck Patent GmbH
 B) ulice: Frankfurter Str. 250
 C) město: D-6100 Darmstadt 1
 E) země: Německo
 10 F) poštovní kod (ZIP): 4119
 G) telefon: 06151 72 7022
 H) telefax: 0615172 7191
- ii) název vynálezu: Monomerní a dimerní fragmenty protilátkových fúzních proteinů
 15
- iii) počet sekvencí: 14
- iv) počítačová čtecí forma:
 A) typ média: floppy disk
 20 B) počítač: IBM P kompatibilní
 C) operační systém: PC-DOS/MS-DOS
 D) Software: Patent In Release č. 1,0, Version č. 1,25 (EPO)
- v) údaje o přihlášce:
 25 č. přihlášky: WO 93-00082

(2) Informace o sekvenci SEQ ID NO: 1:

- 30 i) charakteristiky sekvence:
 A) délka: 4515 párů bází
 B) typ: nukleová kyselina
 C) řetězec: dvojitý
 D) topologie: cirkulární
- 35 ii) typ molekuly: DNA (genomová)
- iii) hypotetická: ne
- iv) anti-sense: ne
 40
- v) typ fragmentu: N-terminální
- vi) originální zdroj:
 A) organismus: syntetická, E.coli- a myší původ
 45
- vii) bezprostřední zdroj:
 B) klon: pLISC-SE
- ix) rysy:
 50 A) jméno/klíč: CDS
 B) lokace: 1328..2158
 D) jiné informace: /produkt = „jediný řetězec Fv fragmentu (protilátky)“
 /pozn.= „kompletní sekvence pLISC-SE vektoru“

x) publikační informace:

A) autoři: Plack Peter

Plueckthun, Andreas

B) název: Miniprotilátky: použití amfipatických helixů k produkci funkčních, flexibilně spojených dimerních Fv fragmentů s vysokou aviditou v E.coli

C) časopis: Biochemistry

D) svazek: 31

E) vydání: 6

F) strany: 1579–1584

G) datum: 1992

xi) popis sekvence: SEQ ID NO: 1:

ACCCGACACC ATCGAATGGC GCAAAACCTT TCGCGGTATG GCATGATAGC GCCCGGAAGA	60
GAGTCAATTC AGGGTGGTGA ATGTGAAACC AGTAACGTTA TACGATGTCG CAGAGTATGC	120
CGGTGTCTCT TATCAGACCG TTCCCGCGT GGTGAACCAG GCCAGCCACG TTTCTGCGAA	180
AACGCGGGAA AAAGTGGAA GCGCGATGGC GGAGCTGAAT TACATTCCCA ACCGCGTGGC	240
ACAACAAC TG GCGGGCAAAC AGTCGTTGCT GATTGGCGTT GCCACCTCCA GTCTGGCCCT	300
GCACGCGCCG TCGCAAATG TCGCGGCGAT TAAATCTCGC GCCGATCAAC TGGGTGCCAG	360
CTGTGTGGTG TCGATGGTAG AACGAAGCGG CGTCGAAGCC TGTAAGCGG CGGTGCACAA	420
TCTTCTCGCG CAACGCGTCA GTGGGCTGAT CATTAACTAT CCGCTGGATG ACCAGGATGC	480
CATTGCTGTG GAAGCTGCCT GCACTAATGT TCCGGCGTTA TTTCTTGATG TCTCTGACCA	540
GACACCCATC AACAGTATTA TTTTCTCCCA TGAAGACGGT ACGCGACTGG GCGTGGAGCA	600
TCTGGTCGCA TTGGGTCACC AGCAAATCGC GCTGTTAGCG GGCCCATTA GTTCTGTCTC	660
GGCGCGTCTG CGTCTGGCTG GCTGGCATAA ATATCTCACT CGCAATCAAA TTCAGCCGAT	720
AGCGGAACGG GAAGGGGACT GGAGTGCCAT GTCCGGTTTT CAACAAACCA TGCAAATGCT	780
GAATGAGGGC ATCGTTCCCA CTGCGATGCT GGTGCCAAAC GATCAGATGG CGCTGGGCGC	840
AATGCGCGCC ATTACCGAGT CCGGGCTGCG CGTTGGTGCG GATGTCTCGG TAGTGGGATA	900
CGCAGATACC GAAGACAGCT CATGTTATAT CCCGCCGTTA ACCACCATCA AACAGGATTT	960
TCGCCTGCTG GGGCAAACCA GCGTGGACCG CTTGCTGCAA CTCTCTCAGG GCCAGGCGGT	1020
GAAGGGCAAT CAGCTGTTGC CCGTCTCACT GGTGAAAAGA AAAACCACCC TGGCGCCCAA	1080

TACGCAAACC GCCTCTCCCC GCGCGTTGGC CGATTCATTA ATGCAGCTGG CACGACAGGT 1140

TTCCCGACTG GAAAGCGGGC AGTGAGCGCA ACCCAATTAA TGTGAGTTAG CTCACTCATT 1200

AGGCACCCCA GGCTTTACAC TTTATGCTTC CGGCTCGTAT GTTGTTGTTGA ATTGTGAGCG 1260

GATAACAATT TCACACAGGA AACAGCTATG ACCATGATTA CGAATTTCTA GATAACGAGG 1320

GCAAAAA ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCG ATT GCA GTG GCA CTG GCT GGT 1369
 Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly
 1 5 10

TTC GCT ACC GTA GCG CAG GCC GAA GTT AAA CTG GTA GAG TCT GGT GGT 1417
 Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly
 15 20 25 30

GGT CTG GTA CAG CCG GGT GGA TCC CTG CGT CTG TCT TGC GCT ACC TCA 1465
 Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser
 35 40 45

GGT TTC ACC TTC TCT GAC TTC TAC ATG GAG TGG GTA CGT CAG CCC CCG 1513
 Gly Phe Thr Phe Ser Asp Phe Tyr Met Glu Trp Val Arg Gln Pro Pro
 50 55 60

GGT AAA CGT CTC GAG TGG ATC GCA GCT AGC CGT AAC AAA GGT AAC AAG 1561
 Gly Lys Arg Leu Glu Trp Ile Ala Ala Ser Arg Asn Lys Gly Asn Lys
 65 70 75

TAT ACC ACC GAA TAC ACC GCT TCT GTT AAA GGT CGT TTC ATC GTT TCT 1609
 Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Ile Val Ser
 80 85 90

CGT GAC ACT AGT CAA TCG ATC CTG TAC CTG CAG ATG AAT GCA TTG CGT 1657
 Arg Asp Thr Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ala Leu Arg
 95 100 105 110

GCT GAA GAC ACC GCT ATC TAC TAC TGC GCG CGT AAC TAC TAT GGC AGC 1705
 Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Tyr Tyr Gly Ser
 115 120 125

ACT TGG TAC TTC GAC GTT TGG GGT GCA GGT ACC ACC GTT ACC GTT TCT 1753
 Thr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 130 135 140

TCT GGT GGT GGT GGT TCT GGT GGT GGT GGT TCT GGT GGT GGT GGT TCT 1801
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 145 150 155

GAT ATC GTT ATG ACC CAG TCT CCG AGC TCT CTG TCT GTA TCT GCA GGT 1849
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Val Ser Ala Gly
 160 165 170

GAA CGT GTT ACC ATG TCT TGC AAA TCT TCT CAG TCT CTG CTG AAC TCT Glu Arg Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser 175 180 185 190	1897
GGT AAC CAG AAA AAC TTC CTG GCG TGG TAT CAG CAA AAG CCT GGC CAA Gly Asn Gln Lys Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln 195 200 205	1945
CCG CCG AAA CTG CTG ATC TAC GGT GCG TCG ACC CGT GAA TCT GGT GTT Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val 210 215 220	1993
CCG GAC CGT TTT ACC GGT AGC GGT AGC GGT ACC GAC TTC ACT CTG ACC Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr 225 230 235	2041
ATC TCT TCT GTA CAG GCT GAA GAT CTG GCT GTT TAC TAC TGT CAA AAC Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn 240 245 250	2089
GAC CAC TCT TAC CCG CTG ACC TTT GGC GCC GGC ACC AAA CTG GAA CTG Asp His Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu 255 260 265 270	2137
AAG CGC GCT AAC GGT GAA TTC TGATAAGCTT GACCTGTGAA GTGAAAAATG Lys Arg Ala Asn Gly Glu Phe 275	2188
GCGCACATTG TGCGACATTT TTTTGTCTG CCGTTTACCG CTACTGCGTC ACGGATCCCC	2248
ACGCGCCCTG TAGCGGCGCA TTAAGCGCGG CGGGTGTGGT GGTTACGGC AGCGTGACCG	2308
CTACACTGCG CAGCGCCCTA GCGCCCGCTC CTTTCGCTTT CTTCCTTCC TTTCTCGCCA	2368
CGTTCGCCGG CTTTCCCCGT CAAGCTCTAA ATCGGGGCAT CCCTTTAGGG TTCCGATTTA	2428
GTGCTTTACG GCACCTCGAC CCCAAAAAAC TTGATTAGGG TGATGGTTCA CGTAGTGGGC	2488
CATCGCCCTG ATAGACGGTT TTTGCCCCCT TGACGTTGGA GTCCACGTTT TTTAATAGTG	2548
GACTCTTGTT CCAAACCTGGA ACAACACTCA ACCCTATCTC GGTCTATTCT TTTGATTTAT	2608
AAGGGATTTT GCCGATTTG GCCTATTGGT TAAAAAATGA GCTGATTTAA CAAAAATTTA	2668
ACGCGAATTT TAACAAAATA TTAACGTTTA CAATTTACAG TGGCACTTTT CGGGGAAATG	2728
TGCGCGGAAC CCCTATTTGT TTATTTTTCT AAATACATTC AAATATGTAT CCGCTCATGA	2788
GACAATAACC CTGATAAATG CTTCAATAAT ATTGAAAAAG GAAGAGTATG AGTATTCAAC	2848
ATTTCCGTGT CGCCCTTATT CCCTTTTTTG CGGCATTTTG CCTTCCTGTT TTTGCTCACC	2908
CAGAAACGCT GGTGAAAGTA AAAGATGCTG AAGATCAGTT GGGTGCACGA GTGGGTTACA	2968

TCGAACTGGA TCTCAACAGC GGTAAGATCC TTGAGAGTTT TCGCCCCGAA GAACGTTTTTC	3028
CAATGATGAG CACTTTTAAA GTTCTGCTAT GTGGCGCGGT ATTATCCCGT ATTGACGCCG	3088
GGCAAGAGCA ACTCGGTTCG CGCATACACT ATTCTCAGAA TGACTIONGTT GAGTACTCAC	3148
CAGTCACAGA AAAGCATCTT ACGGATGGCA TGACAGTAAG AGAATTATGC AGTGCTGCCA	3208
TAACCATGAG TGATAAACA CTGCGCAACT TACTTCTGAC AACGATCGGA GGACCGAAGG	3268
AGCTAACCGC TTTTTTGCAC AACATGGGGG ATCATGTAAC TCGCCTTGAT CGTTGGGAAC	3328
CGGAGCTGAA TGAAGCCATA CCAAACGACG AGCGTGACAC CACGATGCCT GTAGCAATGG	3388
CAACAACGTT GCGCAAATA TTAAGTGGCG AACTACTTAC TCTAGCTTCC CGGCAACAAT	3448
TAATAGACTG GATGGAGGCG GATAAAGTTG CAGGACCACT TCTGCGCTCG GCCCTTCCGG	3508
CTGGCTGGTT TATTGCTGAT AAATCTGGAG CCGGTGAGCG TGGGTCTCGC GGTATCATTG	3568
CAGCACTGGG GCCAGATGGT AAGCCCTCCC GTATCGTAGT TATCTACACG ACGGGGAGTC	3628
AGGCAACTAT GGATGAACGA AATAGACAGA TCCCTGAGAT AGGTGCCTCA CTGATTAAGC	3688
ATTGGTAACT GTCAGACCAA GTTTACTCAT ATATACTTTA GATTGATTTA AACTTTCATT	3748
TTTAATTTAA AAGGATCTAG GTGAAGATCC TTTTGATAA TCTCATGACC AAAATCCCTT	3808
AACGTGAGTT TTCGTTCCAC TGAGCGTCAG ACCCCGTTAGA AAAGATCAAA GGATCTTCTT	3868
GAGATCCTTT TTTTCTGCGC GTAATCTGCT GCTTGCAAAC AAAAAACCA CCGCTACCAG	3928
CGGTGGTTTG TTTGCCGGAT CAAGAGCTAC CAACTCTTTT TCCGAAGGTA ACTGGCTTCA	3988
GCAGAGCGCA GATACCAAAT ACTGTCTTTC TAGTGTAGCC GTAGTTAGGC CACCACTTCA	4048
AGAACTCTGT AGCACCGCCT ACATACCTCG CTCTGCTAAT CCTGTTACCA GTGGCTGCTG	4108
CCAGTGGCGA TAAGTCGTGT CTTACCGGGT TGGACTCAAG ACGATAGTTA CCGGATAAGG	4168
CGCAGCGGTC GGGCTGAACG GGGGGTTCGT GCACACAGCC CAGCTTGGAG CGAACGACCT	4228
ACACCGAACT GAGATACCTA CAGCGTGAGC TATGAGAAAAG CGCCACGCTT CCCGAAGGGA	4288
GAAAGGCGGA CAGGTATCCG GTAAGCGGCA GGGTCGGAAC AGGAGAGCGC ACGAGGGAGC	4348
TTCCAGGGGG AAACGCCTGG TATCTTTATA GTCTGTCTGG GTTTCGCCAC CTCTGACTTG	4408
AGCGTCGATT TTTGTGATGC TCGTCAGGGG GCGGAGCCT ATGGAAAAAC GCCAGCAACG	4468
CGGCCTTTTT ACGGTTCTCTG GCCTTTTGCT GGCCTTTTGC TCACATG	4515

(2) Informace o SEQ ID NO: 2:

- 5 i) charakteristiky sekvence:
 A) délka: 277 aminokyselin
 B) typ: aminokyselina
 C) topologie: lineární
- 10 ii) typ molekuly: protein

xi) popis sekvence: SEQ ID NO: 2:

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

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 225 230 235 240

Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp His
 245 250 255

Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 260 265 270

Ala Asn Gly Glu Phe
 275

(2) Informace o SEQ ID NO: 3:

- 5 i) charakteristiky sekvence:
 A) délka: 151 párů bází
 B) typ: nukleová kyselina
 C) řetězec: dvojitý
 D) topologie: lineární
- 10 ii) typ molekuly: DNA (genomová)
- iii) hypotetická: ne
- 15 iv) anti-sense: ne
- v) typ fragmentu: N-terminální
- vi) originální zdroj:
 20 A) organismus: syntetický (dedukován z kvasinkových + myších sekvencí)
- ix) rysy:
 A) jméno/klíč: CDS
 B) lokace: 1..138
 25 D) jiná informace: /produkt=„interkalační peptid“
 /pozn.=„genová kazeta interkalačního GCN4-leucinového zipperu“
- ix) rysy:
 30 A) jméno/klíč: směs.rysy
 B) lokace: 10..39
 D) jiná informace: /produkt=„imunoglobulinová spojovací oblast“
 /poznámka=„IgG3-pant“
- ix) rysy:
 35 A) jméno/klíč: směs.rysy
 B) lokace: 40..138
 D) jiná informace: /produkt=„GCN4-zipper“

ix) popis sekvence: SEQ ID NO: 3:

GGT GAA TTC CCC AAA CCT AGT ACT CCC CCT GGC AGC AGC CGC ATG AAA	48
Gly Glu Phe Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Arg Met Lys	
1 5 10 15	
CAG CTG GAA GAT AAA GTT GAA GAG CTT CTT TCG AAA AAC TAC CAC CTC	96
Gln Leu Glu Asp Lys Val Glu Glu Leu Leu Ser Lys Asn Tyr His Leu	
20 25 30	
GAA AAT GAA GTT GCG CGC CTC AAA AAA CTT GTT GGT GAA CGC	138
Glu Asn Glu Val Ala Arg Leu Lys Lys Leu Val Gly Glu Arg	
35 40 45	
TGATAAGCTT GAC	151

5 (2) Informace o SEQ ID NO: 4:

- i) charakteristiky sekvence:
 A) délka: 46 aminokyselin
 B) typ: aminokyselina
 D) topologie: lineární

ii) typ molekuly: protein

xi) popis sekvence: SEQ ID NO: 4:

Gly Glu Phe Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Arg Met Lys	
1 5 10 15	
Gln Leu Glu Asp Lys Val Glu Glu Leu Leu Ser Lys Asn Tyr His Leu	
20 25 30	
Glu Asn Glu Val Ala Arg Leu Lys Lys Leu Val Gly Glu Arg	
35 40 45	

(2) Informace o SEQ ID NO: 5:

- i) charakteristiky sekvence:
 A) délka: 181 párů bází
 B) typ: nukleová kyselina
 C) řetězec: dvojitý
 D) topologie: lineární

ii) typ molekuly: DNA (genomická)

iii) hypotetická: ne

iii) anti-sense: ne

v) typ fragmentu: N-terminální

vi) originální zdroj:

- A) organismus: syntetický

ix) rysy:

A) jméno/klíč: CDS

B) lokace: 1..150

5 D) jiná informace: /produkt=„interkalační peptid“
/pozn.=„genová kazeta kodující interkalační antiparalelní helix–otáčka–helix“

ix) rysy:

A) jméno/klíč: směs–rysy

10 B) lokace: 10..39

D) jiná informace: /produkt=„iminoglobulin spojovací oblast“
/pozn.=„IgG3–pant“

ix) rysy:

15 A) jméno/klíč: směs–rysy

B) lokace: 40..87

D) jiná informace: /produkt=„helix peptid“
/pozn.=„spletený–helix A“

ix) rysy:

20 A) jméno/klíč: směs–rysy

B) lokace: 88..150

D) jiná informace: /produkt=„helix peptid“
/pozn.=„spletený–helix B“

25

xi) popis sekvence: SEQ ID NO: 5:

GGT GAA TTC CCC AAA CCT AGC ACC CCC CCT GGC AGC AGT GGT GAA CTG	48
Gly Glu Phe Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly Glu Leu	
1 5 10 15	
GAA GAG CTG CTT AAG CAT CTT AAA GAA CTT CTG AAG GGC CCC CGC AAA	96
Glu Glu Leu Leu Lys His Leu Lys Glu Leu Leu Lys Gly Pro Arg Lys	
20 25 30	
GGC GAA CTC GAG GAA CTG CTG AAA CAT CTG AAG GAG CTG CTT AAA GGT	144
Gly Glu Leu Glu Glu Leu Leu Lys His Leu Lys Glu Leu Leu Lys Gly	
35 40 45	
GAA TTC TGATAAGCTT GACCTGTGAA GTGAAAAAAT G	181
Glu Phe	
50	

30 (2) Informace o sekvenci SEQ ID NO: 6:

i) charakteristiky sekvence:

A) délka: 50 aminokyselin

B) typ: aminokyselina

35 D) topologie: lineární

ii) typ molekuly: protein

xi) popis sekvence: SEQ ID NO: 6:

```

Gly Glu Phe Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly Glu Leu
  1                               5                               10                               15
Glu Glu Leu Leu Lys His Leu Lys Glu Leu Leu Lys Gly Pro Arg Lys
                               20                               25                               30
Gly Glu Leu Glu Glu Leu Leu Lys His Leu Lys Glu Leu Leu Lys Gly
                               35                               40                               45
Glu Phe
  50

```

5 (2) Informace o sekvenci SEQ ID NO: 7:

i) charakteristiky sekvence:

- 10 A) délka: 180 párů bází
 B) typ: nukleová kyselina
 C) řetězec: dvojitý
 D) topologie: lineární

ii) typ molekuly: DNA (genomická)

15 iii) hypotetický: ne

iii) anti-sense: ne

v) typ fragmentu: N-terminální

20 vi) původní zdroj:

- A) organismus: syntetický, dedukován z lidských a myších sekvencí

ix) rysy:

- 25 A) jméno/klíč: CDS
 B) lokace: 1..159
 D) jiná informace: /produkt=„interkalační peptid“
 /pozn.=„genová kazeta kodující interkalační jun-zipper a IgG3-pant obl...“

30 ix) rysy:

- A) jméno/klíč: směs-rysy
 B) lokace: 10..39
 D) jiná informace: /produkt=„imunoglobulinová spojovací oblast“
 /pozn.=„IgG3-pant oblast (myši)“

35 ix) rysy:

- A) jméno/klíč: směs-rysy
 B) lokace: 40..159
 D) jiná informace: /produkt=„jun-zipper“

xi) popis sekvence: SEQ ID NO: 7:

```

GGT GAA TTC CCC AAA CCT AGT ACT CCC CCT GGC AGC AGC CGT ATC GCT      48
Gly Glu Phe Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Arg Ile Ala
  1                5                10                15

CGT CTC GAG GAA AAA GTT AAA ACC CTG AAA GCT CAG AAC TCC GAA CTG      96
Arg Leu Glu Glu Lys Val Lys Thr Leu Lys Ala Gln Asn Ser Glu Leu
          20                25                30

GCT TCC ACC GCT AAC ATG CTG CGT GAA CAG GTT GCT CAG CTG AAA CAG      144
Ala Ser Thr Ala Asn Met Leu Arg Glu Gln Val Ala Gln Leu Lys Gln
          35                40                45

AAA GTT ATG AAC TAC TGATAAGCTT GACCTGTGAA G                          180
Lys Val Met Asn Tyr
          50

```

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

- i) charakteristiky sekvence:
 A) délka: 53 aminokyselin
 B) typ: aminokyselina
 10 D) topologie: lineární

ii) typ molekuly: protein

xi) popis sekvence: SEQ ID NO: 8:

15

```

Gly Glu Phe Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Arg Ile Ala
  1                5                10                15

Arg Leu Glu Glu Lys Val Lys Thr Leu Lys Ala Gln Asn Ser Glu Leu
          20                25                30

Ala Ser Thr Ala Asn Met Leu Arg Glu Gln Val Ala Gln Leu Lys Gln
          35                40                45

Lys Val Met Asn Tyr
          50

```

(2) Informace o SEQ ID NO: 9:

- 20 i) charakteristiky sekvence:
 A) délka: 180 párů bází
 B) typ: nukleová kyselina
 C) řetězec: dvojitý
 25 D) topologie: lineární

ii) typ molekuly: DNA (genomová)

iii) hypotetická: ne

iii) anti-sense: ne

v) typ fragmentu: N-terminální

5 vi) originální zdroj:

A) organismus: syntetický, dedukovaný z lidských a myších sekvencí

ix) rysy:

A) jméno/klíč: CDS

10 B) lokace: 1..159

D) jiná informace: /produkt=„interkalační peptid“

/pozn.=„genová kazeta kodující interkalační fos-zipper a IgG3-pant“

ix) rysy:

15 A) jméno/klíč: směs-rysy

B) lokace: 10..39

D) jiná informace: /produkt=„imunoglobulin spojovací oblast“

/pozn.=„IgG3-pant (myši)“

20 ix) rysy:

A) jméno/klíč: směs-rysy

B) lokace: 40..159

D) jiná informace: /produkt=„fos-zipper“

25 xi) popis sekvence: SEQ ID NO: 9:

GGT GAA TTC CCC AAA CCT AGT ACT CCC CCT GGC AGC AGC CTG ACC GAC	48
Gly Glu Phe Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Leu Thr Asp	
1 5 10 15	
ACC CTG CAG GCT GAA ACC GAC CAG CTG GAA GAC AAA AAA TCC GCT CTG	96
Thr Leu Gln Ala Glu Thr Asp Gln Leu Glu Asp Lys Lys Ser Ala Leu	
20 25 30	
CAG ACC GAA ATC GCT AAC CTG CTG AAA GAA AAA GAA AAA CTG GAA TTT	144
Gln Thr Glu Ile Ala Asn Leu Leu Lys Glu Lys Glu Lys Leu Glu Phe	
35 40 45	
ATC CTG GCT GCT TAC TGATAAGCTT GACCTGTGAA G	180
Ile Leu Ala Ala Tyr	
50	

(2) Informace o SEQ ID NO: 10:

30

i) charakteristiky sekvence:

A) délka: 53 aminokyselin

B) typ: aminokyselina

D) topologie: lineární

35

ii) typ molekuly: protein

xi) popis sekvence: SEQ ID NO: 10:

```

Gly Glu Phe Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Leu Thr Asp
 1           5           10           15
Thr Leu Gln Ala Glu Thr Asp Gln Leu Glu Asp Lys Lys Ser Ala Leu
          20           25           30
Gln Thr Glu Ile Ala Asn Leu Leu Lys Glu Lys Glu Lys Leu Glu Phe
          35           40           45
Ile Leu Ala Ala Tyr
          50

```

5 (2) Informace o SEQ ID NO: 11:

i) charakteristiky sekvence:

- A) délka: 180 párů bází
 B) typ: nukleová kyselina
 C) řetězec: dvojitý
 D) topologie: lineární

10

ii) typ molekuly: DNA (genomický)

15

iii) hypotetická: ne

iii) anti-sense: ne

v) typ fragmentu: N-terminální

20

vi) originální zdroj:

- A) organismus: syntetický, dedukovaný z lidských sekvencí

ix) rysy:

25

- A) jméno/klíč: CDS
 B) lokace: 1..147
 D) jiná informace: /produkt=„interkalační peptid“
 /pozn.=„genová kazeta kodující interkalační jun-zipper a linker“

30

ix) rysy:

- A) jméno/klíč: směs-rysy
 B) lokace: 10..27
 D) jiná informace: /produkt=„syntetický linker“

35

ix) rysy:

- A) jméno/klíč: směs-rysy
 B) lokace: 28..147
 D) jiná informace: /produkt=„jun-zipper“

xi) popis sekvence: SEQ ID NO: 11:

```

GGT GAA TTC CCG TCT GGT AAC GAA GCT CGT ATC GCT CGT CTC GAG GAA      48
Gly Glu Phe Pro Ser Gly Asn Glu Ala Arg Ile Ala Arg Leu Glu Glu
  1             5             10             15

AAA GTT AAA ACC CTG AAA GCT CAG AAC TCC GAA CTG GCT TCC ACC GCT      96
Lys Val Lys Thr Leu Lys Ala Gln Asn Ser Glu Leu Ala Ser Thr Ala
             20             25             30

AAC ATG CTG CGT GAA CAG GTT GCT CAG CTG AAA CAG AAA GTT ATG AAC      144
Asn Met Leu Arg Glu Gln Val Ala Gln Leu Lys Gln Lys Val Met Asn
             35             40             45

TAC TGATAAGCTT GACCTGTGAA GTGAAAAATG GCG      180
Tyr

```

5 (2) Informace o SEQ ID NO: 12:

- i) charakteristiky sekvence:
 A) délka: 49 aminokyselin
 B) typ: aminokyselina
 D) topologie: lineární

10

ii) typ molekuly: protein

xi) popis sekvence: SEQ ID NO: 12:

15

```

Gly Glu Phe Pro Ser Gly Asn Glu Ala Arg Ile Ala Arg Leu Glu Glu
  1             5             10             15

Lys Val Lys Thr Leu Lys Ala Gln Asn Ser Glu Leu Ala Ser Thr Ala
             20             25             30

Asn Met Leu Arg Glu Gln Val Ala Gln Leu Lys Gln Lys Val Met Asn
             35             40             45

Tyr

```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 13:

- 20 i) charakteristiky sekvence:
 A) délka: 180 párů bází
 B) typ: nukleová kyselina
 C) řetězec: dvojitý
 D) topologie: lineární

25

ii) typ molekuly: DNA (genomická)

iii) hypotetická: ne

30

iii) anti-sense: ne

v) fragment typ: N-terminální

vi) originální zdroj:

A) organismus: syntetický, dedukovaný z lidských sekvencí

5 ix) rysy:

A) jméno/klíč: CDS

B) lokace: 1..147

D) jiná informace: /produkt=„interkalační peptid“

/pozn.=„genová kazeta kodující interkalační fos–zipper a linker“

10

ix) rysy:

A) jméno/klíč: směs–rysy

B) lokace: 10..27

D) jiná informace: /produkt=„syntetický linker“

15

ix) rysy:

A) jméno/klíč: směs–rysy

B) lokace: 28..148

D) jiná informace: /produkt=„fos–zipper“

20

xi) popis sekvence: SEQ ID NO: 13:

GGT GAA TTC GGT CCG TCT GGT AAC GAA CTG ACC GAC ACC CTG CAG GCT	48
Gly Glu Phe Gly Pro Ser Gly Asn Glu Leu Thr Asp Thr Leu Gln Ala	
1 5 10 15	
GAA ACC GAC CAG CTG GAA GAC AAA AAA TCC GCT CTG CAG ACC GAA ATC	96
Glu Thr Asp Gln Leu Glu Asp Lys Lys Ser Ala Leu Gln Thr Glu Ile	
20 25 30	
GCT AAC CTG CTG AAA GAA AAA GAA AAA CTG GAA TTT ATC CTG GCT GCT	144
Ala Asn Leu Leu Lys Glu Lys Glu Lys Leu Glu Phe Ile Leu Ala Ala	
35 40 45	
TAC TGATAAGCTT GACCTGTGAA GTGAAAAATG GCG	180
Tyr	

25 (2) Informace o SEQ ID NO: 14:

i) charakteristiky sekvence:

A) délka: 49 aminokyselin

B) typ: aminokyselina

30

D) topologie: lineární

ii) typ molekuly: protein

xi) popis sekvence: SEQ ID NO: 14:

Gly Glu Phe Gly Pro Ser Gly Asn Glu Leu Thr Asp Thr Leu Gln Ala
1 5 10 15

Glu Thr Asp Gln Leu Glu Asp Lys Lys Ser Ala Leu Gln Thr Glu Ile
20 25 30

Ala Asn Leu Leu Lys Glu Lys Glu Lys Leu Glu Phe Ile Leu Ala Ala
35 40 45

Tyr

5

PATENTOVÉ NÁROKY

10

1. Protilátkový konstrukt, skládající se ze dvou monomerních fúzních proteinů, které jsou spojeny nekovalentní interakcí, kde každá monomerní jednotka se skládá z

15

(i) jednořetězcového Fv fragmentu, scFV,

(ii) linkerového peptidu nebo peptidu pantového regionu nebo jeho fragmentu a

20

(iii) amfifilního helikálního peptidu, obsahujícího leucinovou zipper sekvenci, ve které každým sedmým aminokyselinovým zbytkem je leucinový zbytek nebo sekvenci, nesoucí alespoň dva negativně nebo pozitivně nabitě aminokyselinové zbytky, přičemž uvedený helikální peptid je schopen dimerizovat s helikálním peptidem jiného monomerního fúzního proteinu nekovalentní interakcí,

25

přičemž scFV fragment (i) je fúzován přes peptid linkeru/pantu (ii) s amfifilním peptidem (iii) k jeho C-konci.

30

2. Protilátkový konstrukt podle nároku 1, kde scFV fragmenty (i) mají různou antigenní specifitu, který je bivalentní.

35

3. Protilátkový konstrukt podle nároku 1 nebo 2, kde helikální peptid (iii) je helixový svazek, skládající se z helixu, obrátky a dalšího helixu.

4. Protilátkový konstrukt podle nároků 1 až 3, kde k C-konci amfifilního peptidu (iii) je fúzován druhý protein (iv).

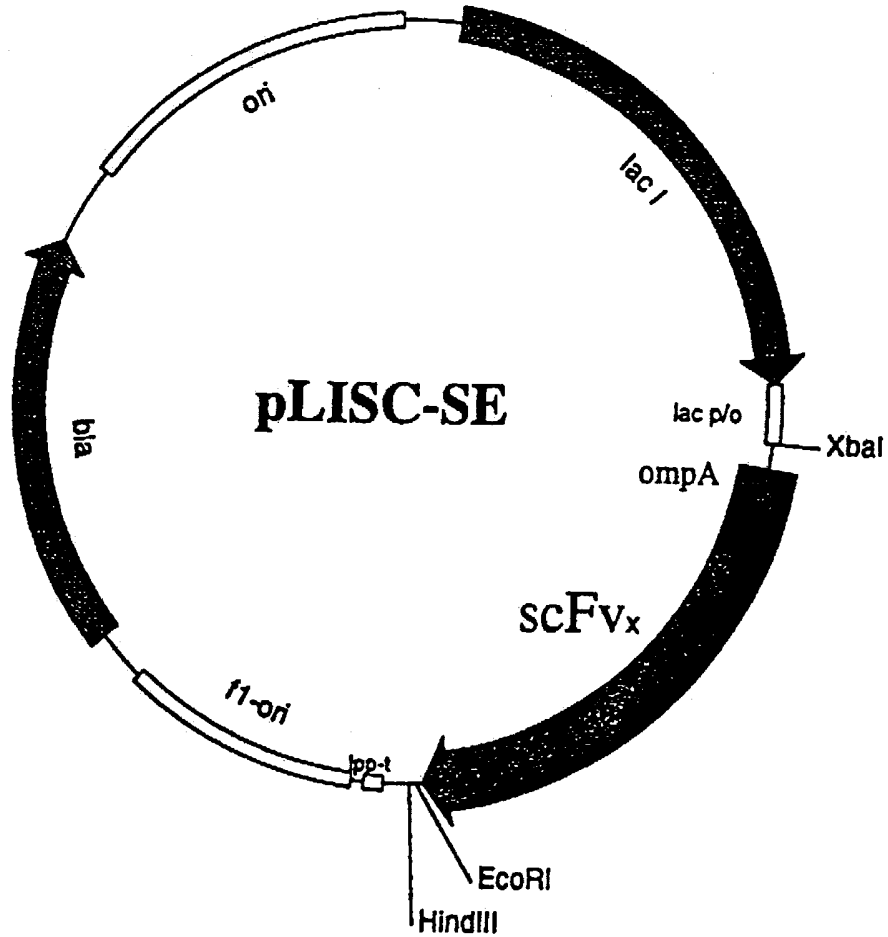
40

5. Protilátkový konstrukt podle nároku 4, kde druhým proteinem (iv) je toxin, chelátorový peptid, protein vázající kov nebo peptid obsahující specifické vazebné místo enzymu, T-buňky nebo jejich fragmentů.

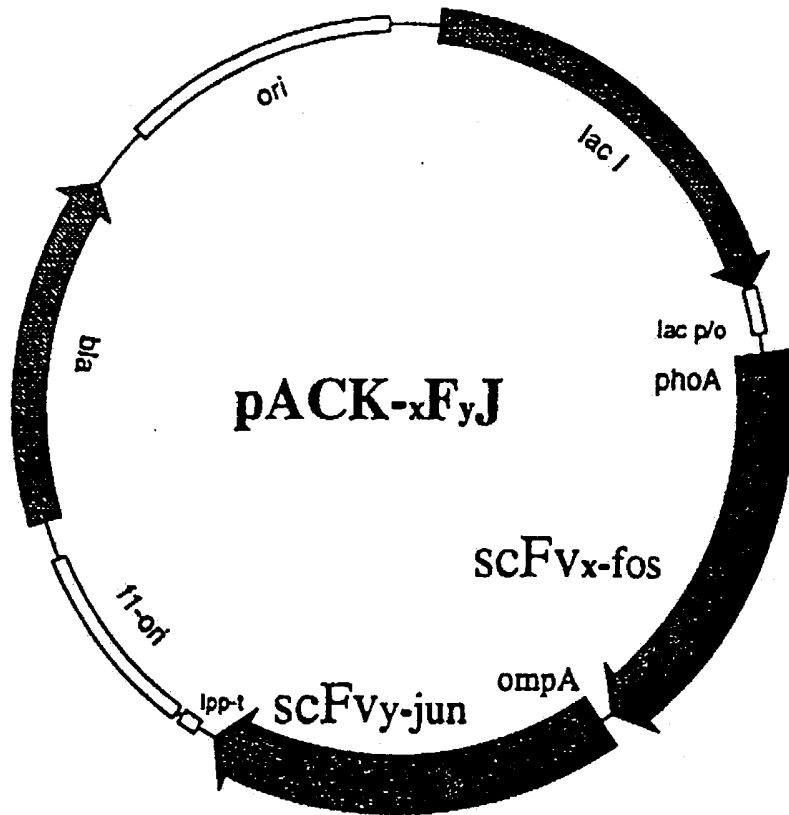
45

6. Konstrukční kit pro selektivní přípravu individuálního protilátkového konstruktu podle nároků 1 až 5, vyznačující se tím, že zahrnuje odděleně uspořádané jednotlivé monomerní fúzní proteiny definované v kterémkoliv z nároků 1 až 5.

4 výkresy

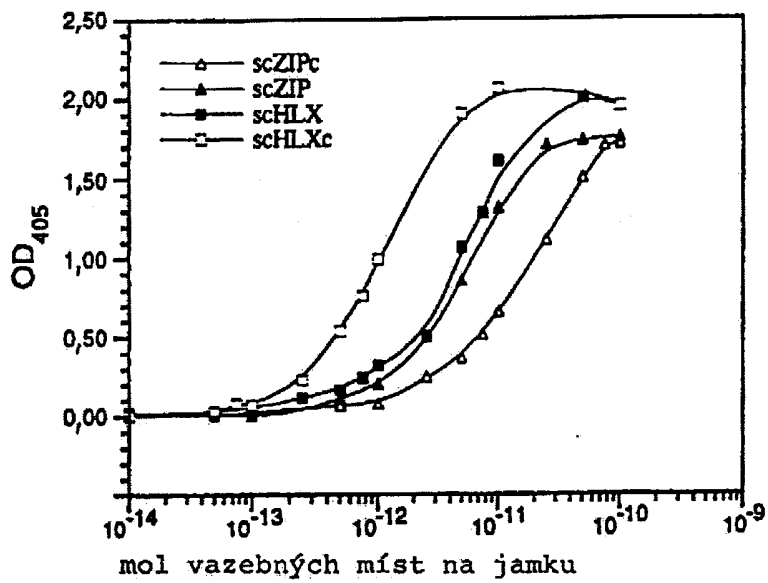


Obr. 1

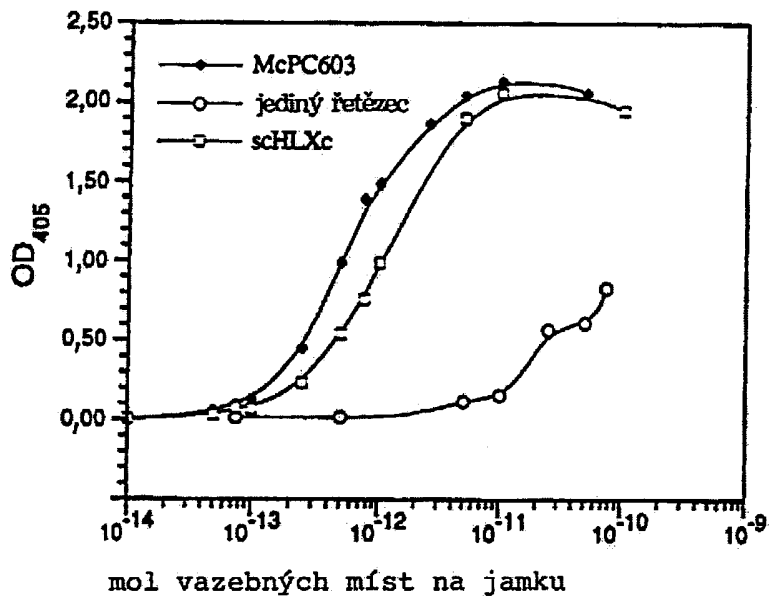


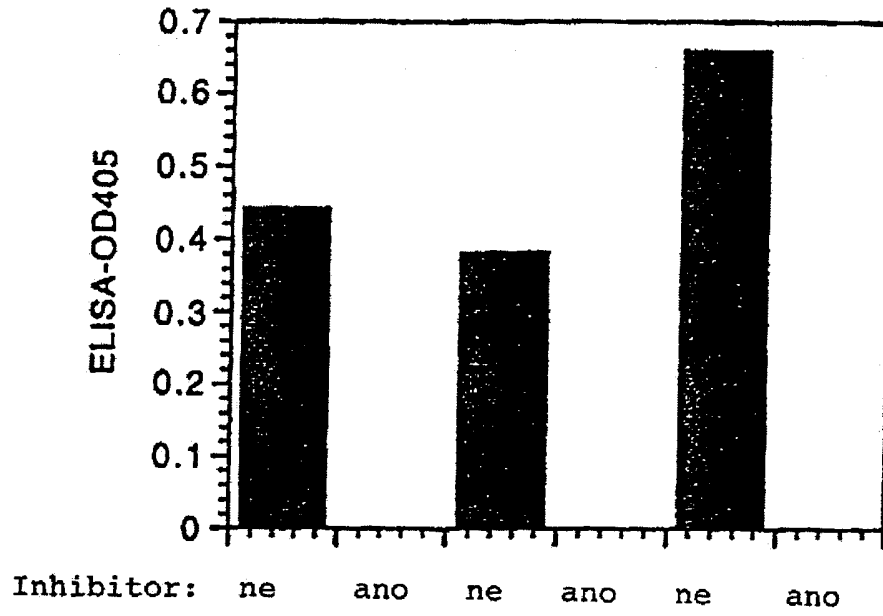
Obr. 2

Obr. 3a



Obr. 3b





Obr. 4

Konec dokumentu
