

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1997-1963**
(22) Přihlášeno: **22.12.1995**
(30) Právo přednosti: **23.12.1994 US 1994/363131**
06.06.1995 US 1995/467420
06.06.1995 US 1995/470110
(40) Zveřejněno: **15.10.1997**
(Věstník č. 10/1997)
(47) Uděleno: **12.07.2006**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **16.08.2006**
(Věstník č. 8/2006)
(86) PCT číslo: **PCT/US1995/017082**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1996/021000**

(11) Číslo dokumentu:

297 045

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C12N 15/02 (2006.01)
C12N 15/03 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 5/20 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
C07H 15/12 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:
WO 93/16184; EP 0367596.

(73) Majitel patentu:
SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION,
Philadelphia, PA, US
SMITHKLINE BEECHAM PLC, Brentford, GB

(72) Původce:
Ames Robert S., Havertown, PA, US
Appelbaum Edward Robert, Blue Bell, PA, US
Chaiken Irwin M., Gladwyn, PA, US
Cook Richard M., Wexford, PA, US
Gross Mitchell Stuart, Wayne, PA, US
Holmes Stephen Dudley, Epsom, GB
McMillan Lynette Jane, Ardmore, PA, US
Theisen Timothy Wayne, Phoenixville, PA, US

(74) Zástupce:
JUDr. Pavel Zelený, Háfkova 2, Praha 2, 12000

(54) Název vynálezu:
**Hlodavčí neutralizační monoklonální
protilátka, způsob pro její produkci, kompozice
s jejím obsahem a použití, hybridom a jím
produkovaná protilátka, fab fragment,
komplementaritu určující region, molekula
nukleové kyseliny a její sekvence, plasmid a
hostitelská buňka**

(57) Anotace:
Je poskytnuta hlodavčí neutralizační monoklonální protilátka specifická pro lidský interleukin 5, hybridom, neutralizační fab fragment nebo jeho f(ab')₂ fragment, pozměněná protilátka obsahující těžký řetězec a lehký řetězec, komplementaritu určující region těžkého a lehkého řetězce, molekula nukleové kyseliny kódující takový region, chimérická protilátka obsahující těžký řetězec a lehký řetězec, farmaceutická kompozice s obsahem pozměněné protilátky, a použití této protilátky pro výrobu léčiva pro léčbu stavů asociovaných s excesivní produkcí eosinofilů, izolovaná sekvence nukleové kyseliny, rekombinantní plasmid obsahující sekvenci nukleových kyselin, hostitelská buňka transfekovaná rekombinantním plasmidem, způsob pro produkci pozměněných protilátek a monoklonální protilátka produkovaná hybridomem.

CZ 297045 B6

Hlodavčí neutralizační monoklonální protilátka, způsob pro její produkci, kompozice s jejím obsahem a použití, hybridom a jím produkováná protilátka, fab fragment, komplementaritu určující region, molekula nukleové kyseliny a její sekvence, plasmid a hostitelská buňka

5

Oblast techniky

Tento vynález se obecně týká protilátek a pozměněných protilátek, které jsou použitelné v léčbě a diagnostice stavů zprostředkovaných IL-5 a excesivní produkcí eosinofilů. Vynález se týká mAb, Fab, chimérických a humanizovaných protilátek. Tento vynález se konkrétně týká hlodavčí neutralizační monoklonální protilátky specifické pro lidský interleukin 5, hybridomu, neutralizačního fab fragmentu nebo jeho f(ab')₂ fragmentu, pozměněné protilátky obsahující těžký řetězec a lehký řetězec, komplementaritu určujícího regionu těžkého a lehkého řetězce, molekuly nukleové kyseliny kódující takový region, chimérické protilátky obsahující těžký řetězec a lehký řetězec, farmaceutické kompozice s obsahem pozměněné protilátky, a použití této protilátky pro výrobu léčiva pro léčbu stavů asociovaných s excesivní produkcí eosinofilů, izolované sekvence nukleové kyseliny, rekombinantního plasmidu obsahujícího sekvenci nukleových kyselin, hostitelské buňky transfekované rekombinantním plasmidem, způsobu pro produkci pozměněných protilátek a monoklonální protilátky produkové hybridomem.

Dosavadní stav techniky

Eosinofily jsou předpokládány v patogenesi mnoha zánětlivých chorobných stavů včetně alergických poruch asociovaných s hypersenzitivní reakcí v plicní tkáni (Butterfield et al., Immunopharmacology of Eosinophils, H. Smith and R. Cook, Eds., str. 151 – 192, Academic Press, London (1993)). Vhodným příkladem je astma, choroba charakterizovaná reversibilní obstrukcí dýchacích cest vedoucí k nespecifické bronchiální přecitlivělosti. Tento následek je závislý na generování chronické zánětlivé reakce na úrovni bronchiální mukosy a charakteristickou infiltrací makrofágy, lymfocyty a eosinofily. Eosinofily pravděpodobně hrají centrální úlohu v iniciaci poškození mukosy typickém pro tuto chorobu (Corrigan et al., Immunol. Today, 13: 501 – 507 (1992)). Zvýšený počet aktivovaných eosinofilů byl popsán v cirkulaci, bronchiální sekreci a v parenchymu plic pacientů s chronickým astmatem, a závažnost choroby, jak je měřena velkou škálou testů plicních funkcí, koreluje s počtem eosinofilů v krvi (Griffen et al., J. Aller. Clin. Immunol., 67: 548 – 558 (1991)). Zvýšený počet eosinofilů, často v procesu degranulace, byl také získán v tekutině bronchoalveolární laváže (BAL) od pacientů, u kterých proběhla pozdní astmatická reakce, a redukce počtu eosinofilů, obvykle jako následek terapie steroidy, je asociována se zlepšením klinických symptomů (Bousquet et al., N. Eng. J. Med., 323: 1033 – 1039 (1990)).

Interleukin 5 (IL-5) je homodimerní glykoprotein produkováný predominantně aktivovanými CD4+ T lymfocyty. U lidí je IL-5 široce odpovědný za kontrolu růstu a diferenciaci eosinofilů. Zvýšené hladiny IL-5 jsou detekovány ve výplších bronchoalveolární laváže od astmatiků (Motojima et al., Allergy 48: 98 – (1994)). Myši, které jsou transgenní pro IL-5 vykazují značnou eosinofilii v periferní krvi a tkáních za absence antigenní stimulace (Dent et al., J. Exp. Med., 172: 1425 (1990)) a u anti myších IL-5 monoklonálních protilátek byl ukázán účinek v redukci eosinofilie v krvi a tkáních myší (Hitoshi et al., Int. Immunol. 3: 135 (1995)) stejně jako eosinofilie asociované s parazitární infekcí a expozicí alergenu u experimentálních zvířat (Coffman et al., Science 4: 308 – 310 (1998) Sher et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 83: 61 – 65 (1990), Chand et al., Eur. J. Pharmacol., 211: 121 – 123 (1992)).

Ačkoliv kortikosteroidy jsou extrémně účinné v supresi počtu eosinofilů a jiných složek zánětu u astma, jsou zvažovány vzhledem ke svým vedlejším účinkům jak u těžkých astmatiků, tak v poslední době i u astmatiků středního a mírného stupně. Jediná další hlavní protizánětlivá léčivá

terapie – kromoglykáty (kromolyn sodný a nedocromil) – je významně méně účinná než kortikosteroidy a její přesný mechanismus účinku zůstává neznámý.

Nedávné výzkumy se zaměřily na nové inhalační steroidy, bronchodilatancia s delším účinkem a agens účinkující na nových biochemických a farmakologických cílech (např. aktivátory draslíkových kanálů, antagonisté leukotrienů, inhibitory 5–lipooxygenasy atd.). Ideálním léčivem by bylo to, které by kombinovalo účinnost steroidů s bezpečností spojenou s použitím kromolynu sodného, a ještě by mělo zvýšenou selektivitu a rychlejší nástup účinku. IL–5 neutralizující protilátky mohou být potenciálně užitečné v léčbě s eosinofilií spojených příznaků u lidí.

Proto v oboru existuje potřeba pro vysoce afinitní antagonisty IL–5, jako jsou neutralizační monoklonální protilátky proti lidskému interleukinu 5, které budou redukovat diferenciaci a proliferaci eosinofilů (tj. akumulaci eosinofilů) a tak eosinofilní zánětlivou reakci.

Podstata vynálezu

Předmětem tohoto vynálezu je hlodavčí neutralizační monoklonální protilátka specifická pro lidský interleukin 5 a mající vazebnou afinitu charakterizovanou disociační konstantou rovnou nebo menší než $3,5 \times 10^{-11}$ M, kde aminokyselinové sekvence CDR1, CDR2 a CDR3 těžkého řetězce jsou uvedeny v SEQ ID NO: 7, 8, 9 nebo 7, 8, 14 a aminokyselinové sekvence CDR1, CDR2 a CDR3 lehkého řetězce jsou uvedeny v SEQ ID NO: 10, 11, 12 nebo 10, 11, 13, stejně jako 47, 48.

Předmětem tohoto vynálezu je také hybridom mající identifikující charakteristiky buněčné linie SK119–2B6.206.75(1), uložený pod ATCC přístupovým číslem HB 11783, SK119–2E3.39.40.2, uložený pod ATCC přístupovým číslem HB 11782, SK119–2F2.37.80.12, uložený pod ATCC přístupovým číslem HB 11781 nebo 4A6(1)G1F7, uložený pod ATCC přístupovým číslem HB 11943, jakož i hybridom mající identifikující charakteristiky buněčné linie SK119–24G9.8.20.5, uložené pod ATCC přístupovým číslem HB 11870, nebo 5D3(1)F5D6, uložené pod ATCC přístupovým číslem HB 11942.

Předmětem tohoto vynálezu je dále neutralizační Fab fragment nebo jeho $F(ab')_2$ fragment produkovaný delecí Fc regionu u monoklonální protilátky popsané výše, jakož i produkovaný přeskupením řetězců, kde je Fd těžký řetězec monoklonální protilátky popsané výše exprimován s myším lehkým řetězcem ve filamentosní fágové Fab zobrazující knihovně nebo kde je lehký řetězec monoklonální protilátky popsané výše exprimován s myším těžkým řetězcem ve filamentosní fágové Fab zobrazující knihovně.

Předmětem tohoto vynálezu je též pozměněná protilátka obsahující těžký řetězec a lehký řetězec, kde jsou úseky základní struktury (frameshift region) uvedeného těžkého a lehkého řetězce z alespoň jedné vybrané protilátky a aminokyselinové sekvence komplementaritu určujících regionů každého uvedeného řetězce jsou z monoklonální protilátky popsané výše.

Předmětem vynálezu je dále komplementaritu určující region (CDR) těžkého nebo lehkého řetězce imunoglobulinu.

Předmětem tohoto vynálezu je taktéž molekula nukleové kyseliny kódující komplementaritu určující region (CDR) imunoglobulinu.

Předmětem tohoto vynálezu je také chimérická protilátka obsahující těžký řetězec a lehký řetězec, kde uvedená protilátka je charakterizována disociační konstantou rovnou nebo menší než $3,5 \times 10^{-11}$ M pro lidský interleukin 5, kde jsou konstantní regiony uvedeného lehkého a těžkého řetězce z alespoň jedné vybrané protilátky a aminokyselinové sekvence variabilních regionů každého uvedeného řetězce jsou z monoklonální protilátky popsané výše.

Předmětem tohoto vynálezu je rovněž farmaceutická kompozice, jejíž podstata spočívá v tom, že obsahuje pozměněnou protilátku popsanou výše a farmaceuticky akceptovatelný.

- 5 Předmětem tohoto vynálezu je dále použití pozměněné protilátky popsané výše pro výrobu léčiva pro léčbu stavů asociovaných s excesivní produkcí eosinofilů.

Předmětem tohoto vynálezu je také izolovaná sekvence nukleové kyseliny.

- 10 Předmětem tohoto vynálezu je rovněž rekombinantní plasmid obsahující sekvenci nukleových kyselin vymezenou výše, jakož i hostitelská buňka transfekovaná takovým rekombinantním plasmidem.

- 15 Předmětem tohoto vynálezu je dále způsob pro produkci pozměněných protilátek podle nároku 1, specifických pro lidský interleukin 5, jehož podstata spočívá v tom, že zahrnuje kultivaci buněčné linie transfekované rekombinantním plasmidem uvedeným svrchu pod kontrolou vybraných regulačních sekvencí schopných řízení jeho exprese v uvedených buňkách.

- 20 Předmětem tohoto vynálezu je konečně monoklonální protilátka produkovaná hybridomem popsaným výše.

Dále se uvádějí různé aspekty tohoto vynálezu a jejich podrobnější objasnění.

- 25 V prvním aspektu předkládaný vynález poskytuje hlodavčí (např. krysy nebo myši) neutralizační monoklonální protilátky specifické pro lidský interleukin 5 a mající vazebnou afinitu charakterizovanou disociační konstantou rovnou nebo menší $3,5 \times 10^{-11}$ M jak je popsána v podrobném popisu. Příkladem takových monoklonálních protilátek jsou myši monoklonální protilátky 2B6, 2E6 a 2F2 a krysí monoklonální protilátka jako je 4A6. Jiným aspektem vynálezu jsou hybridomy jako je SK119-2B6.206.75 (1), SK119-2E3.39.40.2, SK119-2F2.37.80.12, 4A6(1)G1F7 a 30 5D3(1)F5D6.

- V příbuzném aspektu předkládaný vynález poskytuje jejich neutralizační Fab fragmenty nebo F(ab)₂ fragmenty specifické pro lidský interleukin 5 produkované deletováním Fc regionu hlodavčích neutralizačních monoklonálních protilátek podle předkládaného vynálezu.

- 35 V ještě dalším příbuzném aspektu předkládaný vynález poskytuje jejich neutralizační Fab fragmenty nebo F(ab)₂ fragmenty specifické pro lidský interleukin 5 produkované technikou přesunu řetězců, kde je těžký (nebo lehký) imunoglobulinový řetězec, izolovaný z hlodavčích neutralizačních monoklonálních protilátek podle vynálezu exprivován s lehkým (nebo těžkým) řetězcem 40 imunoglobulinové knihovny izolovaným z interleukinem 5 imunizovaných hlodavců, ve filamentosním fázi Fab zobrazené knihovně.

- V ještě dalším příbuzném aspektu předkládaný vynález poskytuje změněnou protilátku specifickou pro lidský interleukin 5, která obsahuje komplementaritu určující regiony (CDR) odvozené 45 od non-lidské neutralizační monoklonální protilátky (mAb) charakterizované disociační konstantou rovnou nebo menší $3,5 \times 10^{-11}$ pro lidský interleukin 5 a molekulou nukleové kyseliny kódující stejné. Pokud je pozměněnou protilátkou humanizovaná protilátka, pak sekvence, která kóduje komplementaritu určující regiony (CDR) z non-lidského imunoglobulinu jsou insertovány do prvního imunoglobulinového partnera, ve kterém alespoň jeden, a preferovaně všechny 50 komplementaritu určující regiony (CDR) prvního imunoglobulinového partnera jsou nahrazeny CDR z non-lidské monoklonální protilátky. Preferovaně je první imunoglobulinový partner operativně navázán na druhý imunoglobulinový partner, který obsahuje všechny nebo část konstantního řetězce imunoglobulinů.

V příbuzném aspektu předkládaný vynález poskytuje CDR odvozené od non-lidských neutralizačních monoklonálních protilátek (mAb) charakterizovaných disociační konstantou rovnou nebo menší $3,5 \times 10^{-11}$ pro lidský interleukin 5 a molekulou nukleové kyseliny kodující takové CDR.

- 5 V ještě dalším aspektu je zde poskytnuta chimérická protilátka obsahující konstantní regiony lidských těžkých a lehkých řetězců a variabilní regiony těžkých a lehkých řetězců odvozených od non-lidských neutralizačních monoklonálních protilátek charakterizovaných disociační konstantou rovnou nebo menší $3,5 \times 10^{-11}$ pro lidský interleukin 5.
- 10 V ještě dalším aspektu předkládaný vynález poskytuje farmaceutickou kompozici, která obsahuje jeden (nebo více) výše popsanych pozměněných protilátek a farmaceuticky akceptovatelný nosič.

- V dalším aspektu předkládaný vynález poskytuje způsob pro léčbu stavů u lidí asociovaných s excesivní produkcí eosinofilů podáním účinného množství farmaceutické kompozice podle
- 15 vynálezu uvedeným lidem.

- V ještě dalším aspektu předkládaný vynález poskytuje způsob pro, a složky užitečné v, rekombinantní produkci pozměněných protilátek (např. zpracovaných protilátek, CDR, Fab nebo $F(ab)'_2$ fragmentů, nebo jejich analog), které jsou odvozené od non-lidských neutralizačních monoklonálních protilátek (mAb) charakterizovaných disociační konstantou rovnou nebo menší $3,5 \times 10^{-11}$ pro lidský IL-5. Tyto složky zahrnují izolované sekvence nukleových kyselin kódujících tento, rekombinantní plasmidy obsahující sekvence nukleových kyselin pod kontrolou vybrané regulačních sekvencí, které jsou schopné řízení jejich exprese v hostitelských buňkách (preferovaně savčích) transfektovaných rekombinantními plasmidy. Metoda produkce vyžaduje kultivo-
- 20 vání transfektované hostitelské linie podle předkládaného vynálezu za takových podmínek, že alterovaná protilátka, preferovaně humanizovaná protilátka, je exprivována v uvedených buňkách a izolování exprivovaného produktu z těchto buněk.

- Ještě dalším aspektem vynálezu je způsob pro diagnostiku stavů asociovaných s excesivní produkcí eosinofilů u lidí, který zahrnuje získání vzorku biologické tekutiny od pacienta a umožnění kontaktu protilátek a pozměněných protilátek podle vynálezu s takovým vzorkem za takových podmínek, že je tvořen komplex IL-5/(monoklonální nebo pozměněná) protilátka a detekování přítomnosti nebo absence uvedeného komplexu IL-5/protilátka.
- 30

- Jiné aspekty a výhody předkládaného vynálezu jsou popsány dále v podrobném popisu a v jeho preferovaných provedeních.
- 35

Popis obrázků na připojených výkresech

- 40
- Obr. 1 (SEQ ID NO: 1 až 15) ilustruje variabilní region těžkého řetězce pro myší protilátku 2B6, a myší/lidskou 2B6 chimérickou protilátku. Orámečkové oblasti značí CDR.
- Obr. 2 (SEQ ID NO: 2 a 16) ilustruje variabilní region lehkého řetězce pro myší protilátku 2B6, a myší/lidskou 2B6 chimérickou protilátku. Orámečkové oblasti značí CDR.
- 45 Obr. 3 (SEQ ID NO: 3) ilustruje variabilní region těžkého řetězce pro myší protilátku 2F2. Orámečkové oblasti značí CDR.
- Obr. 4 (SEQ ID NO: 4) ilustruje variabilní region lehkého řetězce pro myší protilátku 2F2. Orámečkové oblasti značí CDR.
- Obr. 5 (SEQ ID NO: 5) ilustruje variabilní region těžkého řetězce pro myší protilátku 2E3. Orámečkové oblasti značí CDR.
- 50 Obr. 6 (SEQ ID NO: 6) ilustruje variabilní region lehkého řetězce pro myší protilátku 2E3. Orámečkové oblasti značí CDR.

Obr. 7 (SEQ ID NO: 7–14) ilustruje těžké a lehké řetězce CDR z myších protilátek 2B6, 2F2 a 2E3.

Obr. 8 (SEQ ID NO: 18, 19) ilustruje variabilní region těžkého řetězce pro humanizovanou protilátku 2B6. Orámečkování označuje CDR.

5 Obr. 9 (SEQ ID NO: 20, 21) ilustruje variabilní region lehkého řetězce pro humanizovanou protilátku 2B6. Orámečkování označuje CDR.

10 Obr. 10 je schematická kresba plasmidu pCDIL5HZHC1.0 využívaného pro expresi genu humanizovaného těžkého řetězce v savčích buňkách. Plasmid obsahuje beta laktamový gen (BETA LAC), SV-40 zdroj replikace (SV40), cytomegalovirovou promotorovou sekvenci (CMV), signální sekvenci, humanizovaný těžký řetězec, poly A signál z hovězího růstového hormonu (BGH), betaglobinový promotor (beta globin), gen dihydrofolát reduktasy (DHFR) a jiný poly A signál BGH sekvence na pUC19 pozadí.

Obr. 11 je schematická kresba plasmidu pCNIL5HZLC1.0 využívaného pro expresi genu humanizovaného lehkého řetězce v savčích buňkách.

15 Obr. 12 (SEQ ID NO: 61, 62) ilustruje variabilní region NewM těžkého řetězce pro humanizovanou protilátku 2B6. Orámečkování označuje CDR.

Obr. 13 (SEQ ID NO: 69, 70) ilustruje variabilní region REI lehkého řetězce pro humanizovanou protilátku 2B6. Orámečkování označuje CDR.

20 Podstata vynálezu

Předkládaný vynález poskytuje škálu protilátek, pozměněných protilátek a jejich fragmentů, které jsou charakterizovány vazebnou specifitou pro lidský IL-5, neutralizační aktivitou a vysokou afinitou pro lidský IL-5 jak je doloženo na příkladu myší monoklonální protilátky 2B6. Protilátky podle předkládaného vynálezu byly připraveny konvenčními technikami hybridomů, fágovými kombinatoriálními knihovnami, přeskupování imunoglobulinových řetězců, a humanizačními technikami pro generování nových neutralizačních protilátek. Tyto produkty jsou použitelné v terapeutických a farmaceutických kompozicích pro léčbu IL-5 zprostředkovaných chorob, např. astmatu. Tyto produkty jsou také využitelné v diagnostice IL-5 zprostředkovaných stavů měření (např. enzymem vázanou imunosorbentní zkouškou (ELISA)) endogenní hladiny IL-5 u lidí nebo IL-5 uvolňované ex vivo z aktivovaných buněk.

35 I. Definice

35 „Pozměněná protilátka“ označuje protein kódovaný pozměněným imunoglobulin kódujícím regionem, který může být získán expresí ve vybraném hostiteli. Takové pozměněné protilátky jsou zpracované protilátky (např. chimérické nebo humanizované protilátky) nebo fragmenty protilátky postrádající celý nebo část konstantního regionu imunoglobulinu, např. Fv, Fab, nebo F(ab)₂ a podobně.

40 „Pozměněný imunoglobulin kódující region“ označuje sekvenci nukleových kyselin kódující pozměněnou protilátku podle vynálezu. Pokud je pozměněnou protilátkou CDR-roubovaná nebo humanizovaná protilátka, pak jsou sekvence kódující komplementaritu určující regiony (CDR) z non-lidského imunoglobulinu insertovány do prvního imunoglobulinového partnera obsahujícího sekvence lidských variabilních úseků základní struktury. Volitelně je první imunoglobulinový partner operativně navázán na druhý imunoglobulinový partner.

50 „První imunoglobulinový partner“ označuje sekvenci nukleové kyseliny kódující lidský úsek základní struktury nebo variabilní region lidského imunoglobulinu, ve kterém jsou nativní (nebo přirozeně se vyskytující) CDR kódující regiony nahrazeny CDR kódující regiony donorové protilátky. Lidský variabilní region může být těžký řetězec imunoglobulinu, lehký řetězec, (nebo oba řetězce), nebo jejich analoga nebo funkční fragmenty. Takové CDR regiony umístěné uvnitř

variabilního regionu protilátek (imunoglobulinů) mohou být určeny metodami v oboru známými. Například Kabat et al., (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4. vydání, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)) popisuje pravidla pro zaměření CDR. Kromě toho jsou známé počítačové programy, které jsou užitečné pro identifikaci CDR regionů/struktur.

„Neutralizační“ označuje protilátku, která inhibuje aktivitu IL-5 zabráněním vazby lidského IL-5 na jeho specifický receptor nebo inhibicí signalizace IL-5 prostřednictvím tohoto receptoru, pokud vazba proběhla. mAb je neutralizační, jestliže je 90% účinná, lépe 95% účinná a nejlépe 100% účinná v inhibici IL-5 aktivity, jak je měřena v biotestu B13 buněk (IL-5 neutralizační test, viz příklad 2C).

Termín „vysoce afinitní“ označuje protilátku mající vazebnou afinitu charakterizovanou K_d rovnou nebo menší než $3,5 \times 10^{-11}$ M pro lidský IL-5, jak je určeno optickými biosenzorickými analýzami (viz příklad 2D).

„Vazebnou specifitou pro lidský IL-5“ je míněna vysoká afinita pro lidský, nikoliv pro myši, IL-5.

„Druhý imunoglobulinový partner“ označuje jinou nukleotidovou sekvenci kódující protein nebo peptid, na který je první imunoglobulinový partner fúzován v rámečku nebo prostřednictvím volitelné konvenční linkerové sekvence (např. operativně navázán). Preferovaně to je imunoglobulinový gen. Druhý imunoglobulinový partner může obsahovat sekvenci nukleové kyseliny kódující celý konstantní region pro stejné (tj. homologní – první a druhá pozměněná protilátka jsou odvozeny od stejného zdroje) nebo adiční (tj. heterologní) požadované protilátky. Může to být těžký nebo lehký řetězec imunoglobulinu (nebo oba řetězce jako část jednoho polypeptidu). Druhý imunoglobulinový partner není omezen na určitou třídu nebo izotyp imunoglobulinů. Kromě toho, druhý imunoglobulinový partner může obsahovat část konstantního regionu imunoglobulinu, jak je nacházeno ve Fab nebo $F(ab)_2$ (tj. diskrétní část vhodného lidského konstantního regionu nebo úseku základní struktury). Takový druhý imunoglobulinový partner může také obsahovat sekvenci kódující integrální membránový protein přítomný na zevním povrchu hostitelské buňky, např. jako část fágové knihovny, nebo sekvenci kódující protein pro analytickou nebo diagnostickou detekci, např. křenovou peroxidasu, β -galaktosidasu, atd.

Termíny Fv, Fc, Fd, Fab nebo $F(ab)_2$ jsou použité v jejich standardním významu (viz např. Harlow et al., Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)).

Jak je zde použito popisuje „zpracovaná protilátka“ typ pozměněné protilátky, tj. kompletně syntetickou protilátku (např. chimérickou nebo humanizovanou protilátku v protikladu k fragmentu protilátky), ve které je část variabilních domén lehkého a/nebo těžkého řetězce vybrané akceptorové protilátky nahrazena analogickými částmi z jedné nebo více donorových protilátek, které jsou specifické pro vybraný epitop. Například mohou takové molekuly zahrnovat protilátky charakterizované humanizovaným těžkým řetězcem asociovaným s nemodifikovaným lehkým řetězcem (nebo chimérickým lehkým řetězcem) nebo vice versa. Zpracované protilátky mohou také být charakterizovány alterací sekvence nukleové kyseliny kódujících úseky základní struktury variabilní domény lehkého a/nebo těžkého řetězce akceptorové protilátky tak, aby získala vazebnou specifitu donorové protilátky. Tyto protilátky mohou obsahovat nahrazení jedné nebo více CDR (preferovaně všech) z akceptorové protilátky s CDR z donorové protilátky, jak je zde popsáno.

„Chimérická protilátka“ označuje typ zpracované protilátky, která obsahuje přirozeně se vyskytující variabilní region (lehký a těžký řetězec) odvozený od donorové protilátky v asociaci s konstantními regiony lehkých a těžkých řetězců odvozených od akceptorové protilátky.

„Humanizovaná protilátka“ označuje typ zpracované protilátky, která má CDR odvozené od non-lidského donorového imunoglobulinu, a zbývající z imunoglobulinu odvozené části molekuly odvozené od jednoho (nebo více) lidských imunoglobulinů. Kromě toho mohou být zbytky úseků základní struktury pozměněny tak, aby se zachovala vazebná afinita (viz např. Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 8: 10029 – 10032 (1989), Hodgson et al., Bio/Technology, 9:421 (1991)).

Termín „donorová protilátka“ označuje protilátku (monoklonální nebo rekombinantní), která přispívá sekvencí nukleové kyseliny svých variabilních regionů, CDR, nebo jiných funkčních fragmentů nebo jejich analog prvním imunoglobulinovému partneru, takže poskytuje pozměněný imunoglobulinový kódující region a výslednou exprimovanou pozměněnou protilátku s antigenní specifitou nebo neutralizační aktivitou charakteristickou pro donorovou protilátku. Jednou donorovou protilátkou vhodnou pro použití v tomto vynálezu je non-lidská neutralizační monoklonální protilátka (tj. myši) označená jako 2B6. Protilátka 2B6 je definována jako vysoce afinitní, lidský IL-5 specifická (tj. nerozpoznávající myši IL-5) neutralizační protilátka izotypu IgG₁ mající DNA variabilního lehkého řetězce s aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO: 1 a 15, v příslušném pořadí, na vhodném myším IgG konstantním regionu.

Termín „akceptorová protilátka“ označuje protilátku (monoklonální nebo rekombinantní) heterologní k donorové protilátce, která přispívá všemi (nebo jakoukoliv částí, ale preferovaně všemi) sekvencemi nukleových kyselin kódujícími své úseky základní struktury těžkého a/nebo lehkého řetězce a/nebo své konstantní řetězce těžkého a/nebo lehkého řetězce k prvním imunoglobulinovému partneru. Preferovaně je lidská protilátka akceptorovou protilátkou.

„CDR“ je definována jako aminokyselinová sekvence komplementarity určujícího regionu protilátky, kterými jsou hypervariabilní regiony lehkých a těžkých řetězců imunoglobulinů. Viz např. Kabat et al., (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4. vydání, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987). Existují tři CDR těžkého řetězce a tři CDR lehkého řetězce (nebo CDR regiony) ve variabilní části imunoglobulinu. Tak „CDR“ jak je zde použito označuje všechny tři CDR těžkého řetězce nebo všechny tři CDR lehkého řetězce (nebo jak CDR těžkého, tak CDR lehkého řetězce, je-li to vhodné).

CDR poskytuje většinu kontaktních zbytků pro vazbu protilátky na antigen nebo epitop. Žádoucí CDR pro tento vynález jsou odvozeny od variabilních sekvencí těžkého a lehkého řetězce donorové protilátky, a zahrnují analoga přirozeně se vyskytující CDR, kterážto analoga se také podílejí na nebo si uchovávají stejnou vazebnou specifitu pro antigen a/nebo neutralizační schopnost jako donorová protilátka, ze které byly odvozeny.

„Podílením se na vazebné specifitě pro antigen nebo na neutralizační schopnosti“ je míněno například to, že ačkoliv mAb 2B6 může být charakterizována jistým stupněm afinity pro antigen, může mít CDR kódovaný sekvencí nukleových kyselin 2B6 za vhodných strukturálních podmínek nižší nebo vyšší afinitu. Je očekáváno, že CDR 2B6 za takových podmínek nebudou nikdy rozpoznávat stejný epitop jako 2B6. Příkladné těžké řetězce CDR 2B6 zahrnují SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9; a příkladné lehké řetězce CDR 2B6 zahrnují SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11; a SEQ ID NO: 12.

„Funkční fragment“ je částečná variabilní sekvence těžkého nebo lehkého řetězce (např. malé delece v amino nebo karboxy konci variabilního regionu imunoglobulinu), která si uchovává stejnou vazebnou specifitu pro antigen a/nebo neutralizační schopnost jako má protilátka, ze které byl fragment odvozen.

„Analog“ je aminokyselinová sekvence modifikovaná alespoň jednou aminokyselinou, kde uvedená modifikace může být chemická nebo substituce nebo přeskupení několika aminokyselin (tj. ne více než 10), kde tato modifikace umožňuje, aby si aminokyselinová sekvence uchovávala biologické charakteristiky, např. vazebnou specifitu pro antigen a vysokou afinitu, nemodifikované sekvence. Například, mohou být konstruovány (silentní) mutace, cestou substituce, kde jsou

vytvořena jistá restriční místa pro endonukleasy uvnitř nebo v sousedství CDR–kódujících regionů.

Analoga mohou také vzniknout jako alelická variace. „Alelické variace nebo modifikace“ jsou alterace sekvence nukleových kyselin kódujících aminokyselinovou nebo peptidovou sekvenci podle vynálezu. Takové variace nebo modifikace mohou být provedeny prostřednictvím degenerace genetického kódu nebo mohou být záměrně vytvořeny pro poskytnutí žádoucích charakteristik. Tyto variace nebo modifikace mohou nebo nemusí vést k jakékoliv alteraci v kódované aminokyselinové sekvenci.

Termín „efektorové agens“ označuje neproteinovou molekulu nosiče, se kterou může být pozměněná protilátka a/nebo přirozený nebo syntetický lehký nebo těžký řetězec donorové protilátky nebo jiný fragment donorové protilátky asociován s konvenčními prostředky. Takové neproteinové nosiče zahrnují konvenční nosiče používané na poli diagnostiky, například polystyrenové nebo jiné plastické korálky, polysacharidy, např. jak jsou použity v BIAcore (Pharmacia) systému, nebo jiné neproteinové substance použitelné v medicíně a bezpečné při podání člověku a zvířatům. Jiná efektorová agens mohou zahrnovat makrocycly, pro chelaci atomu těžkého kovu, nebo radioizotopy. Taková efektorová agens mohou být také užitečná pro zvýšení poločasu pozměněné protilátky, např. polyethylen glykol.

II. Vysoce afinitní IL–5 monoklonální protilátky

Pro použití v konstrukci protilátek, pozměněných protilátek a fragmentů podle vynálezu mohou být použity ne–lidské druhy (např. hovězí dobytek, ovce, opice, kuřata, hlodavci (např. krysy nebo myši) atd.) pro generování požadovaného imunoglobulinu za prezentace nativního lidského IL–5 nebo jeho peptidového epitopu. Konvenční hybridomové techniky jsou využity pro poskytnutí hybridomových buněčných linií secernujících non–lidské mAb proti IL–5. Takové hybridomy jsou potom vyšetřovány na vazbu za použití IL–5 navázaného na 96–jamkové plotny, jak je popsáno v příkladech, nebo alternativně za použití biotinylovaného IL–5 navázaného na streptavidinem potaženou plotnu.

Jednou příkladnou vysoce afinitní, neutralizační mAb podle předkládaného vynálezu je mAb 2B6, myší protilátka, která může být použita pro vývoj chimérické nebo humanizované protilátky, popsané přesněji v příkladu 1 níže. 2B6 mAb je charakterizována antigenovou vazebnou specificitou pro lidský IL–5, s K_d menší než $3,5 \times 10^{-11}$ M (okolo $2,2 \times 10^{-11}$ M) pro IL–5. K_d pro IL–5 pro Fab fragment z 2B6 (viz příklad 3H) je okolo 9×10^{-11} M, jak bylo určeno optickým biosenzorem. MAb 2B6 se jeví jako blokující vazebnou interakci mezilidským IL–5 a α –řetězcem lidského IL–5 receptoru.

Jinou žádoucí donorovou protilátkou je myší mAb 2E3. Tato mAb je charakterizována izotypem IgG_{2a}, a má disociační konstantu pro hIL–5 menší než $3,5 \times 10^{-11}$ M (okolo $2,0 \times 10^{-11}$ M).

Ještě jinou žádoucí donorovou protilátkou je krysí mAb 4A6. Tato mAb je charakterizována tím, že má disociační konstantu pro hIL–5 menší než $3,5 \times 10^{-11}$ M (okolo $1,8 \times 10^{-11}$ M). Kromě toho se mAb 4A6 zdá být blokující vazebnou interakci mezi lidským IL–5 a β –řetězcem lidského IL–5 receptoru.

Tento vynález není omezen na použití 2B6 mAb, 2E3 mAb nebo jejich hypervariabilních (tj. CDR) sekvencí. Jakékoliv jiné vhodné vysoce afinitní IL–5 protilátky charakterizovány tím, že mají disociační konstantu menší než $3,5 \times 10^{-11}$ M pro lidský IL–5 a korespondující anti IL–5 CDR mohou být za ně zaměněny. Kdekoliv je v následujícím popisu donorová protilátka identifikována jako 2B3 nebo 2E3, je toto provedeno pouze pro ilustraci a zjednodušení popisu.

III. Fragmenty protilátky

Předkládaný vynález také zahrnuje použití Fab fragmentů nebo $F(ab')_2$ fragmentů odvozených od mAb namířené proti lidskému IL-5. Tyto fragmenty jsou použitelné jako agens protektivní in vivo proti IL-5 a eosinofily zprostředkovaným stavům nebo in vitro jako část IL-5 diagnostiky. Fab fragment obsahuje celý lehký řetězec a aminoterminální část těžkého řetězce; a $F(ab')_2$ fragment je fragment tvořený dvěma Fab fragmenty navázanými disulfidovou vazbou. MAb 2B6, 2E3 a jiné podobné vysoce afinitní, IL-5 vážící protilátky poskytují zdroj Fab fragmentů a $F(ab')_2$ fragmentů, které mohou být získány konvenčními prostředky, např. štěpením mAb vhodnými proteolytickými enzymy, papainem a/nebo pepsinem, nebo rekombinantními metodami. Tyto Fab a $F(ab')_2$ fragmenty jsou použitelné sami o sobě jako terapeutická, profylaktická nebo diagnostická agens, a jako donory sekvencí obsahující variabilní regiony a CDR sekvence využitelné v tvorbě rekombinantních nebo humanizovaných protilátek, jak jsou zde popsány.

Fab a $F(ab')_2$ fragmenty mohou být konstruovány cestou kombinatorní fágové knihovny (viz Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433 – 455 (1994)) nebo metodou mísení imunoglobulinových řetězců (viz např. Marks et al., Bio/Technology, 10: 779 – 783 (1992), oboje je zde uvedeno jako odkaz), kde F_d nebo v_H imunoglobulinu z vybrané protilátky (např. 2B6) je umožněno asociovat s repertoárem lehkých řetězců imunoglobulinů, v_L (nebo v_K) za tvorby nových Fab. Naopak, lehkému řetězci z vybraného imunoglobulinu může být umožněna asociace s repertoárem těžkých řetězců imunoglobulinů, v_H (nebo F_d), za tvorby nových Fab. Neutralizující IL-5 Fab byly získány tehdy, pokud F_d mAb 2B6 byla umožněna asociace s repertoárem lehkých řetězců imunoglobulinů, jak je podrobněji popsáno v příkladech. Proto je možné získat neutralizační Fab s jedinečnými sekvencemi (nukleotidovými a aminokyselinovými) technikou přeskupování řetězců.

IV. Požadované anti-IL-5 aminokyselinové a nukleotidové sekvence

mAb 2B6 nebo jiné protilátky popsané výše mohou přispívat sekvencemi, jako jsou peptidové sekvence variabilního těžkého a/nebo lehkého řetězce, sekvence úseku základní struktury CDR sekvence, funkční fragmenty a jejich analoga, a jejich kódující sekvence nukleových kyselin, které jsou použitelné v projektování a získávání různých pozměněných protilátek, které jsou charakterizovány vazebnou specifitou pro antigen donor protilátky.

Jako jeden příklad poskytuje předkládaný vynález sekvence lehkého řetězce a variabilního těžkého řetězce z IL-5 myší protilátky 2B6 a sekvence od nich odvozené. Variabilní region těžkého řetězce 2B6 je ilustrován na obrázku 1. CDR kódující regiony jsou ukázány orámečkovánými políčky a jsou poskytnuty v SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8; a SEQ ID NO: 9. Variabilní region lehkého řetězce klonu 2B6 je ilustrován na obrázku 2. CDR kódující regiony jsou poskytnuty SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11; a SEQ ID NO: 12.

Variabilní region humanizovaného těžkého řetězce je ilustrován na obrázku 8 (SEQ ID NO: 18 a 19). Signální sekvence je také poskytnuta v SEQ ID NO: 17. Jiné vhodné signální sekvence, odborníkům známé, mohou být zaměněny za zde ukázané signální sekvence. CDR aminokyselinové sekvence tohoto konstruktu jsou identické s nativním myším a chimérickým těžkým řetězcem CDR a jsou poskytnuty SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8; a SEQ ID NO: 9. Příkladná (syntetická) variabilní sekvence humanizovaného lehkého řetězce je ilustrována na obrázku 9 (SEQ ID NO: 20 a 21).

Sekvence nukleových kyselin podle vynálezu, nebo její fragmenty, kódující peptidové sekvence variabilního lehkého a těžkého řetězce jsou také použitelné pro mutagenní zavedení specifických změn do sekvence nukleových kyselin kódujících CDR nebo regiony úseků základní struktury, a pro inkorporaci vzniklých modifikovaných nebo fúzních sekvencí nukleových kyselin do plasmidů pro expresi. Například, substituce v nukleotidové sekvenci pracovních a CDR kódujících

regionů byly použity pro vytvoření míst pro restriční enzymy, které usnadňují inzerci mutovaných CDR (a/nebo pracovních) regionů. Tyto CDR kódující regiony byly použity pro konstrukci humanizovaných protilátek podle vynálezu.

- 5 Pokud je brána do úvahy degenerace genetického kódu, pak mohou být konstruovány různé kódující sekvence, které kódují aminokyselinové sekvence variabilního lehkého a těžkého řetězce, a CDR sekvence podle vynálezu, stejně jako jejich funkční fragmenty a analoga, které si zachovávají vazebnou specifitu pro antigen donorové protilátky. Izolované sekvence nukleových kyselin podle vynálezu, nebo jejich fragmenty, kódující peptidové sekvence variabilního řetězce nebo CDR mohou být použity pro produkci pozměněných protilátek, např. chimérických nebo humanizovaných protilátek, nebo jiných upravených protilátek podle vynálezu, pokud jsou operativně kombinovány s druhým imunoglobulinovým partnerem.

- 15 Mělo by být zmíněno, že kromě izolovaných sekvencí nukleových kyselin kódujících části pozměněné protilátky a protilátek zde popsanych jsou v předkládaném vynálezu obsaženy také jiné sekvence nukleových kyselin, jako například ty, které jsou komplementární k nativním CDR kódujícím sekvencím nebo jsou komplementární k modifikovaným lidským úsekům základní struktury sousedícím s CDR kódující regiony. Použitelné DNA sekvence zahrnují ty sekvence, které hybridizují za podmínek přísné hybridizace (viz T. Maniatis et al., Molecular Cloning (A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory (1982), str. 387 až 389) na DNA sekvence. Příkladem takových podmínek přísné hybridizace je hybridizace při 4XSSC při 65 °C, po čemž následuje promytí v 0,1XSSC při 65 °C po 1 hodinu. Alternativním příkladem podmínek přísné hybridizace je 50% formamid, 4XSSC při 42 °C. Preferovaně jsou tyto hybridizující DNA sekvence délky alespoň 18 nukleotidů, tj. okolo velikosti CDR.

- 25 V. Pozměněné imunoglobulinové molekuly a pozměněné protilátky

- Pozměněné imunoglobulinové molekuly mohou kódovat pozměněné protilátky, které zahrnují upravené protilátky jako jsou chimérické protilátky a humanizované protilátky. Požadovaný pozměněný imunoglobulin kódující region obsahuje CDR kódující region, který kóduje peptid mající antigenní specifitu IL-5 protilátky, preferovaně vysoce afinitní protilátky jak je ta, která je poskytnuta předkládaným vynálezem, insertovaný do prvního imunoglobulinového partnera (lidského pracovního regionu nebo variabilního regionu lidského imunoglobulinu).

- 35 Preferovaně je první imunoglobulinový partner operativně navázán na druhý imunoglobulinový partner. Druhý imunoglobulinový partner je definován výše a může obsahovat sekvenci kódující druhý region požadované protilátky, například Fc region. Druhý imunoglobulinový partner může také obsahovat sekvence kódující jiný imunoglobulin, na který je fúzován konstantní region lehkého nebo těžkého řetězce v rámečku nebo prostřednictvím linker sekvence. Upravené protilátky namířené proti funkčním fragmentům nebo analogům IL-5 mohou být projektovány tak, aby vznikla zvýšená vazba se stejnou protilátkou.

- Druhý imunoglobulinový partner může být také asociován s efektorovým agens jak je definováno výše, včetně neproteinové molekuly nosiče, na který může být druhý imunoglobulinový partner operativně navázán konvenčními prostředky.

- Fúze nebo vazba mezi druhými imunoglobulinovými partnery, např. sekvencemi protilátky, a efektorovým agens může být provedena s jakýmkoliv vhodnými prostředky, např. běžnými kovalentními nebo iontovými vazbami, proteinovou fúzí, nebo hetero-bifunkčními cross-linkery, např. karbodiimidem, glutaraldehydem a podobně. Takové techniky jsou v oboru známy a jsou popsány v běžných chemických a biochemických textech.

Navíc, konvenční linkerové sekvence, které jednoduše poskytují požadované množství prostoru mezi druhým imunoglobulinovým partnerem a efektorovým agens, mohou být také konstruovány

v pozměněném imunoglobulin kódujícím regionu. Charakter takových linkerů je odborníkům dobře znám.

5 Kromě toho, signální sekvence pro molekuly podle vynálezu mohou být modifikovány pro zvýšenou expresi. Příkladem je 2B6 humanizovaná protilátka mající signální sekvenci a CDR odvozenou od sekvence myšního těžkého řetězce, má původní signální peptid nahrazen jinou signální sekvencí (SEQ ID NO: 17).

10 Příkladná pozměněná protilátka obsahuje peptidové nebo proteinové sekvence variabilního těžkého a/nebo lehkého řetězce mající antigenní specifitu mAb 2B6, např., V_H a V_L řetězce. Ještě jiná požadovaná pozměněná protilátka podle vynálezu je charakterizována aminokyselinovou sekvencí obsahující alespoň jeden, a preferovaně všechny, CDR variabilního regionu těžkého a/nebo lehkého řetězce molekuly myší protilátky 2B6 se zbývající sekvencí odvozenou z lidského zdroje, nebo jeho funkčního fragmentu nebo analoga. Viz např. humanizované V_H a V_L regiony (obrázek 8 a 9).

15 V ještě dalším provedení může být upravená protilátka podle vynálezu připojena na další agens. Například může být použito postupu rekombinantní DNA technologie pro produkci upravené protilátky podle vynálezu, jejíž Fc fragment nebo CH2 CH3 doména úplné molekuly protilátky byla nahrazena enzymem nebo jinou detekovatelnou molekulou (tj. polypeptidovým efektoem nebo reporterovou molekulou).

25 Druhý imunoglobulinový partner může také být operativně navázán na neimunoglobulinový peptid, protein nebo jeho fragment heterologní k CDR obsahující sekvenci mající antigenní specifitu myší 2B6. Výsledný protein může vykazovat jak antigenní specifitu pro IL-5, tak charakteristiky neimunoglobulinu při expresi. Takovou charakteristikou fúzního partnera může být např. funkční charakteristika jako je jiná vazebná nebo receptorová doména, nebo terapeutická charakteristika, pokud je fúzní partner sám o sobě terapeutický protein, nebo jiné antigenní charakteristiky.

30 Jiný požadovaný protein podle tohoto vynálezu může obsahovat úplnou molekulu protilátky mající kompletní lehký a těžký řetězec, nebo jakýkoliv její diskretní fragment, jako je Fab nebo $F(ab')_2$ fragment, dimer těžkých řetězců nebo jakékoliv jejich minimální rekombinantní fragmenty jako je F_v nebo jednořetězcová protilátka (SCA) nebo jakoukoliv jinou molekulu se stejnou specifikou jako vybraná donorová protilátka, např. mAb 2B6 nebo 2E3. Takový protein může 35 být použit pro tvorbu pozměněné protilátky nebo může být použit ve své nefúzované formě.

Kdekoliv je druhý imunoglobulinový partner odvozen od protilátky jiné než je donorová protilátka, např. od úseku základní struktury nebo konstantního regionu jakéhokoliv izotypu nebo třídy imunoglobulinu, vzniká upravená protilátka. Upravené protilátky mohou obsahovat imunoglobulinové (Ig) konstantní regiony a variabilní úseky základní struktury z jednoho zdroje, např. akceptorové protilátky a jeden nebo více (preferovaně všechny) CDR z donorové protilátky, např. anti-IL-5 protilátky zde popsané. Kromě toho, alterace, např. delece, substituce nebo adice na úrovni nukleových kyselin nebo aminokyselin úseků základní struktury lehkých a/nebo těžkých variabilních domén, akceptorový mAb, nebo donorových CDR regionů, mohou být provedeny 45 tak, aby se zachovala vazebná specifita donorové protilátky pro antigen.

Takové upravené protilátky jsou projektovány tak, aby využily jeden (nebo oba) variabilní těžké a/nebo lehké řetězce IL-5 mAb (volitelně modifikované jak je popsáno) nebo jeden nebo více dále identifikovaných těžkých nebo lehkých řetězců CDR (viz také obrázek 7). Upravené protilátky podle vynálezu jsou neutralizační, tj. požadovaným způsobem blokují vazbu IL-5 proteinu 50 na receptor a také blokují nebo brání proliferaci IL-5 dependentních buněk.

Takové upravené protilátky mohou zahrnovat humanizované protilátky obsahující úseky základní struktury vybraného lidského imunoglobulinu nebo subtypu, nebo chimérické protilátky obsahující konstantní regiony lidského lehkého a těžkého řetězce fúzované s fragmenty IL-5 protilátky. 55

Vhodná lidská (nebo jiná zvířecí) akceptorová protilátka může být vybrána z konvenční databáze, a např. KABAT[®] databáze, Los Alamos databáze a Swiss Protein databáze, podle homologie nukleotidové a aminokyselinové sekvence donorové protilátky. Lidská protilátka charakterizovaná homologií k úsekům základní struktury donorové protilátky (na aminokyselinovém základě) může být vhodná pro poskytnutí konstantního regionu těžkého řetězce a/nebo úseků základní struktury variabilního regionu těžkého řetězce pro inzerci donorových CDR. Vhodná akceptorová protilátka schopná poskytnout konstantní nebo variabilní úseky základní struktury lehkého řetězce může být vybrána stejným způsobem. Mělo by být uvedeno, že není požadováno, aby těžké a lehké řetězce akceptorové protilátky pocházely ze stejného akceptorové protilátky.

Výhodně jsou heterologní úseky základní struktury a konstantní regiony vybrány ze tříd a izotypů lidských protilátek, jako je IgG (subtypy 1 až 4), IgM, IgA a IgE. Nicméně akceptorová protilátka nemusí obsahovat pouze proteinové sekvence lidského imunoglobulinu. Například může být konstruován gen, ve kterém je DNA sekvence kódující část řetězce lidského imunoglobulinu fúzována na DNA sekvenci kódující neimunoglobulinovou aminokyselinovou sekvenci, jako je polypeptidová efektorová nebo reporterová molekula.

Jeden příklad určité požadované humanizované protilátky obsahuje CDR z 2B6 insertované do úseků základní struktury vybrané sekvence lidské protilátky. Pro neutralizační humanizované protilátky jsou jeden, dva nebo preferovaně tři CDR z variabilních regionů těžkého řetězce a/nebo lehkého řetězce IL-5 protilátky insertovány do úseků základní struktury vybrané sekvence lidské protilátky za náhrady nativních CDR této další protilátky.

Preferovaně, v humanizované protilátce byly variabilní domény lidských lehkých a těžkých řetězců upraveny jednou nebo více CDR záměnami. Je možné použít všech šest CDR, nebo různé kombinace méně než šesti CDR. Preferovaně je nahrazeno všech šest CDR. Je možné nahradit CDR pouze v lidském těžkém řetězci, za použití jako lehkého řetězce nemodifikovaného lehkého řetězce z lidské akceptorové protilátky. Ještě alternativně může být kompatibilní lehký řetězec vybrán z jiné lidské protilátky pomocí běžné databáze protilátek. Zbytek upravené protilátky může být odvozen od jakéhokoliv vhodného lidského akceptorového imunoglobulinu.

Upravená humanizovaná protilátka tak má strukturu přirozené lidské protilátky nebo jejího fragmentu, a má kombinaci vlastností požadovaných pro účinné terapeutické použití, např. léčbu IL-5 zprostředkovaných zánětlivých onemocnění u lidí, nebo pro diagnostické použití.

Jako jiný příklad může upravená protilátka obsahovat tři CDR variabilního regionu lehkého řetězce 2E3 (SEQ ID NO: 0, a 13) a tři CDR variabilního regionu těžkého řetězce 2B6 (SEQ ID NO: 7, 8 a 9). Vzniklá humanizovaná protilátka by měla být charakterizována stejnou vazebnou specifitou pro antigen a vysokou afinitou jako 2B6.

Odborník pochopí, že upravené protilátky mohou být dále modifikovány změnami v aminokyselinách variabilní domény bez nutného ovlivnění specifity a vysoké afinity donorové protilátky (tj. analoga). Je předkládáno, že aminokyseliny lehkého a těžkého řetězce mohou být substituovány jinými aminokyselinami jak ve variabilní doméně úseků základní struktury, tak v CDR nebo v obojím.

Kromě toho může být konstantní region pozměněn pro zvýšení nebo snížení selektivních vlastností molekul podle předkládaného vynálezu. Například dimerizací, navázáním na Fc receptory nebo schopností vázat a aktivovat komplement (viz např. Angal et al., Mol. Immunol. 30: 105 – 108 (1993), Xu et al., J. Biol. Chem. 269: 3469 – 3474 (1994), Winter et al., EP 307,434-B).

Pozměněná protilátka, která je chimérickou protilátkou se odlišuje od humanizovaných protilátek, jak jsou popsány výše tím, že poskytuje kompletní variabilní regiony lehkého a těžkého řetězce non-lidské donorové protilátky, včetně úseků základní struktury, v asociaci s konstantními regiony lidského imunoglobulinu pro oba řetězce. Je předpokládáno, že chimérické proti-

látky, které si uchovávají další ne-lidské sekvenční příbuzné humanizovaným protilátkám podle vynálezu, mohou vyvolat signifikantní imunitní odpověď u lidí.

5 Takové protilátky jsou užitečné v zabránění a léčbě IL-5 zprostředkovaných onemocnění, jak je uvedeno dále.

VI. Produkce pozměněných protilátek a upravených protilátek.

10 Preferovaně jsou v konstrukci protilátek, preferovaně humanizovaných protilátek podle vynálezu, použity variabilní sekvenční lehkého a těžkého řetězce a CDR mAb 2B6 nebo jiných vhodných donorových mAb (např. 2E3, 2F2, 4A6 atd.) a jejich kódující sekvenční nukleových kyselin, v následujícím procesu. Stejně nebo podobné techniky mohou být také použity pro generování jiných provedení vynálezu.

15 Hybridom produkující vybranou donorové mAb, např. myší protilátku 2B6, je konvenčně klonován a DNA jejich variabilních regionů lehkého a těžkého řetězce je získána technikami v oboru známými, např. technikou popsanou v Sambrook et al., (Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. vydání, Cold Spring Harbor Laboratory (1989)). Tyto variabilní lehké a těžké regiony 2B6 obsahující alespoň CDR kódující regiony a ty části úseků základní struktury lehkých a těžkých variabilních regionů akceptorové mAb, které jsou požadovány pro zachování vazebné specifity donorové mAb, stejně jako zbývající od imunoglobulinu odvozené části protilátkového řetězce odvozeného od lidského imunoglobulinu jsou získány za použití polynukleotidových primerů a reversní transkriptázy. CDR kódující regiony jsou identifikovány za použití známé databáze a srovnáním s jinými protilátkami.

25 Myší/lidská chimérická protilátka může potom být připravena a testována na vazebnou schopnost. Taková chimérická protilátka obsahuje celé V_H a V_L regiony ne-lidské donorové protilátky v asociaci s konstantními regiony lidského Ig pro oba řetězce.

30 Homologní úseky základní struktury variabilního regionu těžkého řetězce byly identifikovány za použití počítačové databáze, např. KABAT[®], a lidské protilátky mající homologii k 2B6 byly vybrány jako akceptorové protilátky. Sekvenční syntetických variabilních regionů těžkého řetězce obsahující 2B6 CDR-kódující regiony uvnitř úseků základní struktury lidské protilátky byly projektovány s volitelnou nukleotidovou náhradou v úsecích základní struktury pro inkorporování restričních míst. Tato projektovaná sekvenční byla potom syntetizována za použití dlouhých syntetických oligomerů. Alternativně může být projektovaná sekvenční syntetizována přesahujícími oligonukleotidy, amplifikovanými polymerasovou řetězovou reakcí (PCR) a s opravou chyb.

Vhodné variabilní pracovní regiony lehkého řetězce byly projektovány podobným způsobem.

40 Humanizované protilátky mohou být odvozeny od chimérické protilátky, nebo preferovaně mohou být vyrobeny synteticky inzercí CDR kódujících regionů z lehkého a těžkého řetězce donorových mAb vhodným způsobem do vybraných úseků základní struktury lehkého a těžkého řetězce. Alternativně může být humanizovaná protilátka podle vynálezu připravena standardní technikou mutagenese. Tak obsahuje vzniklá humanizovaná protilátka lidské úseky základní struktury a donorové mAb CDR, kódující regiony. Následná manipulace residuů úseku základní struktury možná. Vzniklá humanizovaná protilátka může být exprimována v rekombinantních buňkách, např. COS, CHO nebo myelomových buňkách. Jiné humanizované protilátky mohou být připraveny za použití této techniky na jiné vhodné IL-5 specifické, neutralizační, vysoce afinitní ne-lidské protilátky.

55 Konvenční expresní vektor nebo rekombinantní plasmid je produkován umístěním těchto kódujících sekvencí pro pozměněnou protilátku v operativní asociaci s běžnými regulačními kontrolními sekvencemi schopnými kontroly replikace a exprese v, a/nebo sekrece z, hostitelské buňky. Regulační sekvenční zahrnují promotorové sekvenční, např. CMV promotor a signální sekvenční,

5 které mohou být odvozeny od jiných známých protilátek. Obdobně může být produkován druhý expresní vektor mající DNA sekvenci kódující komplementární lehký a těžký řetězec protilátky. Preferovaně je tento druhý expresní vektor identický s prvním kromě toho, že je uvažována kódující sekvence a selektovatelné markery pro co možná nejlepší zajištění toho, aby každý polypeptidový řetězec byl funkčně exprimován. Alternativně, kódující sekvence lehkého a těžkého řetězce pro pozměněnou protilátku mohou být umístěny na jednom vektoru.

10 Vybraná hostitelská buňka je kotransfektována běžnými technikami jak prvním, tak druhým vektorem (nebo jednoduše transfektována jedním vektorem) pro vytvoření transfektované hostitelské buňky podle vynálezu obsahující rekombinantní nebo syntetické lehké a těžké řetězce. Transfektovaná buňka je potom kultivována běžnými technikami za produkce upravené protilátky podle vynálezu. Humanizované protilátka, která obsahuje asociaci obou rekombinantních těžkého a/nebo lehkého řetězce, je v kultuře vyšetřována vhodným testem, jako je ELISA nebo RIA. Podobné běžné techniky mohou být využity pro konstrukci jiných pozměněných protilátek a molekul podle vynálezu.

20 Vhodné vektory pro kroky klonování a subklonování použité v metodách a konstrukci kompozic podle tohoto vynálezu mohou být vybrány odborníkem v oboru. Například konvenční pUC série klonovaných vektorů mohou být použity. Jedním použitým vektorem je pUC19, který je komerčně dostupný od zásobovacích firem, jako je Amersham (Buckinghamshire, United Kingdom) nebo Pharmacia (Uppsala, Sweden). Kromě toho, jakýkoliv vektor, který je schopen snadné replikace, má hojnost klonovacích míst a selektovatelných genů (např. pro antibiotickou resistenci), a je snadno manipulovatelný může být použit pro klonování. Tak není selekce klonovacího vektoru limitujícím faktorem tohoto vynálezu.

25 Podobně mohou být vektory použité pro expresi upravených protilátek podle vynálezu vybrány odborníkem z jakýchkoliv běžných vektorů. Vektory také obsahují selektovatelné regulační sekvence (jako jsou CMV promotory), které řídí replikaci a expresi heterologních DNA sekvencí ve vybraných hostitelských buňkách. Tyto vektory obsahují výše popsané DNA sekvence, které kódují upravenou protilátku nebo pozměněný imunoglobulin kódující region. Kromě toho mohou vektory inkorporovat vybrané imunoglobulinové sekvence modifikované inzercí požadovaných restrikčních míst pro snadnou manipulaci.

35 Expresní vektory mohou také být charakterizovány geny vhodnými pro amplifikační expresi heterologních DNA sekvencí, např. savčího genu pro dihydrofolát reduktázu (DHFR). Jiné preferované vektorové sekvence obsahují poly A signální sekvence, jako jsou ty z hovězího růstového hormonu (BGH) a betaglobinové promotorové sekvence (betaglopro). Zde použitelné expresní vektory mohou být syntetizovány technikami, které jsou odborníkům dobře známé.

40 Složky takových vektorů, např. replikony, selekční geny, enhancery, promotory, signální sekvence a podobně, mohou být získány z komerčních nebo přirozených zdrojů nebo mohou být syntetizovány známými postupy pro použití v řízení exprese a/nebo sekrece produktu rekombinantní DNA ve vybraném hostiteli. Pro tento účel mohou být vybrány jiné vhodné expresní vektory, které jsou v oboru známy pro savčí, bakteriální, hmyzí, kvasinkovou a houbovou expresi.

45 Předkládaný vynález také obsahuje buněčné linie transfektované rekombinantním plasmidem obsahujícím kódující sekvence upravených protilátek nebo jejich pozměněných imunoglobulinových molekul. Hostitelské buňky použitelné pro klonování a jiné manipulace s těmito klonujícími vektory jsou také konvenční. Nicméně, nejvhodnější je, pokud jsou pro replikaci a jiné kroky v konstrukci pozměněných protilátek podle tohoto vynálezu použity buňky z různých kmenů *E. coli*.

55 Vhodnými hostitelskými buňkami nebo buněčnými liniemi pro expresi upravených protilátek podle vynálezu jsou preferovaně savčí buňky jako je CHO, COS, fibroblastové buňky (např. 3T3), a myeloidní buňky, a nejlépe CHO nebo myeloidní buňky. Lidské buňky mohou být pou-

žity, což umožňuje modifikaci molekuly lidskými glykosylačními vzorky. Alternativně mohou být použity jiné eukaryotické buněčné linie. Selekce vhodných savčích hostitelských buněk a metod pro transformaci, kultivaci, amplifikaci, vyšetření a produkci produktu a purifikaci jsou v oboru známé. Viz Sambrook et al., citován výše.

5

Bakteriální buňky se mohou ukázat jako užitečné pro expresi rekombinantních Fab podle předkládaného vynálezu (viz např. Pluckthun, A., Immunol. Rev. 130: 151 – 188 (1992)). Nicméně, vzhledem k tendenci proteinů exprimovaných v bakteriálních buňkách být v neskládané nebo nevhodně skládané formě nebo v neglykosylované formě měl by být jakýkoliv Fab produkováný v bakteriální buňce vyšetřován na zachování vazebné schopnosti pro antigen. Pokud bude molekula exprimovaná bakteriální buňkou produkována ve správně složené formě, pak bude bakteriální buňka vhodným hostitelem. Například, různé kmeny *E. coli* použité pro expresi jsou v oblasti biotechnologie dobře známé jako hostitelské buňky. Různé kmeny *B. subtilis*, *Streptomyces*, jiné *Bacilli* a podobně mohou být také použity v této metodě.

15

Pokud je to žádoucí, jsou různé kmeny kvasinek odborníků známé také dostupné jako hostitelské buňky, stejně jako hmyzí buňky, např. *Drosophila* a *Lepidoptera* a virové expresní systémy. Viz např. Miller et al., Genetic Engineering, 8: 277 – 298, Plenum Press (1986) a odkazy zde citované.

20

Obecné metody, podle kterých mohou být vektory podle vynálezu konstruovány, metody transfekce vyžadované pro produkci hostitelských buněk podle vynálezu a kultivační metody nezbytné pro produkci pozměněných protilátek podle vynálezu z takových hostitelských buněk jsou vše běžné techniky. Obdobně, jednou produkováná pozměněná protilátka podle vynálezu může být purifikována z obsahu kultury podle v oboru standardních postupů, včetně precipitace síranem amonným, afinitních kolon, kolonové chromatografie, gelové elektroforesy a podobně. Takové techniky jsou v oboru známé a neomezují tento vynález.

Ještě jiná metoda exprese humanizovaných protilátek může využívat expresi v transgenních zvířatech, jak je popsána v U.S. patentu 4873316. Ten se týká expresních systémů využívajících zvířecího kaseinového promotoru, který, pokud je transgenně inkorporován do savce, umožňuje samicím produkovat požadovaný rekombinantní protein v jejich mléce.

Po expresi požadovanou metodou je upravená protilátka vyšetřována na in vitro aktivitu použitím vhodného testu. Pro hodnocení kvalitativní a kvantitativní vazby upravené protilátky na IL–5 jsou použity běžné nynější ELISA test formáty. Navíc mohou být použity jiné in vitro testy pro verifikaci neutralizační účinnosti před následnými lidskými klinickými studiemi provedenými pro hodnocení persistence upravené protilátky v těle vzhledem k obvyklému mechanismu clearans.

40

Podle postupů popsaných pro humanizované protilátky připravené z 2B6 může odborník také konstruovat humanizované protilátky z jiných donorových IL–5 protilátek, sekvencí variabilního regionu a CDR peptidů zde popsaných. Upravené protilátky mohou být produkovány s úseky základní struktury variabilních regionů potenciálně rozpoznávaných jako „vlastní“ příjemci upravené protilátky. Mírné modifikace variabilních úseků základní struktury mohou být nástrojem pro značné zvýšení vazby antigenu bez zjevné zvýšené imunogenicity pro příjemce. Takové upravené protilátky mohou účinně léčit IL–5 zprostředkované chorobné stavy u lidí.

VII. Terapeutické/profylaktické použití

50

Tento vynález se také týká metod pro léčbu lidí trpících s eosinofilií spojenými symptomy, jako je astma, kde tato metoda obsahuje podání účinné dávky protilátek obsahujících jednu nebo více upravených protilátek nebo pozměněných protilátek zde popsaných, nebo jejich fragmentů.

Terapeutická odpověď indukovaná za použití molekul podle tohoto vynálezu je produkována vazbou na lidský IL-5 a tak následným blokem eosinofilní stimulace. Tak molekuly podle předkládaného vynálezu, pokud jsou v přípravcích a formulacích vhodných pro terapeutické použití, jsou vysoce žádoucí pro tyto osoby trpící alergickou a/nebo atopickou odpovědí, nebo odpovědí

5 asociovanou s eosinofilií, jako například je alergická rhinitis, astma, chronická eosinofilní pneumonie, alergická bronchopulmonární aspergilosa, coeliakie, eosinofilní gastroenteritis, Churg–Straussův syndrom (periarteritis nodosa plus atopie), eosinofilní myalgický syndrom, hypereosinofilní syndrom, edematosní reakce včetně episodárního angioedemu, infekce helmity, kde eosinofilii mohou hrát protektivní roli, onchocercální dermatitis a atopická dermatitis.

10 Pozměněné protilátky, protilátky a jejich fragmenty podle tohoto vynálezu mohou být použity v konjunkci s jinými protilátkami, zejména s lidskými mAb reaktivními s jinými markery (epitopy) odpovědnými za stavy, proti kterým je upravená protilátka podle vynálezu namířena.

15 Terapeutická agens podle vynálezu jsou považována za žádoucí pro léčbu alergických stavů od asi 2 dní do asi 3 týdnů, nebo podle potřeby. Další léčba může například být žádoucí pokud se jedná o léčbu sezónní rhinitidy a podobně. Toto reprezentuje znatelný pokrok oproti nyní užívanému infusnímu protokolu předchozí léčby IL-5 zprostředkovaných onemocnění. Dávka a trvání léčby je ve vztahu k relativním přetrvávání molekul podle předkládaného vynálezu v lidské cirkulaci, a může být odborníkem upraveno na léčeném stavu a celkovém stavu pacienta.

20

Způsob podání terapeutického agens podle vynálezu může být jakoukoliv vhodnou cestou, kterou se dostane agens do hostitele. Pozměněné protilátky, upravené protilátky a jejich fragmenty a farmaceutické kompozice podle vynálezu jsou zejména použitelné pro parenterální podání, tj. subkutánně, intramuskulárně, intravenosně nebo intranasálně.

25

Terapeutická agens podle vynálezu mohou být připravena jako farmaceutické kompozice obsahující účinné množství upravené (např. humanizované) protilátky podle vynálezu jako aktivní přísadu ve farmaceuticky akceptovatelném nosiči. V profylaktickém agens podle vynálezu je

30 preferována vodná suspenze nebo roztok obsahující upravenou protilátku, preferovaně pufrovaný na fyziologickou hodnotu pH, s výhodou ve formě připravené pro injekci. Kompozice pro parenterální podávání bude obecně obsahovat roztok upravené protilátky podle tohoto vynálezu nebo směs těchto protilátek rozpuštěnou ve farmaceuticky akceptovatelném nosiči. Mohou se použít různé vodné nosiče, např. 0,4 % fyziologický roztok, 0,3 % roztok glycerinu a podobně.

35 Tyto roztoky jsou sterilizovány a obecně zbaveny materiálu ve formě částic. Tyto roztoky mohou být sterilizovány běžnými, dobře známými technikami sterilizace (např. filtrací). Kompozice mohou obsahovat farmaceuticky akceptovatelné pomocné substance jak jsou požadovány pro přiblížení fyziologickým podmínkám jako je pH upravující a pufrovací agens, atd. Koncentrace protilátky podle vynálezu se může v takových farmaceutických formulacích velmi lišit, tj. od méně než asi 0,5%, obvykle alespoň okolo 1% do více než 15 nebo 20% hmotnosti a bude primárně vybrána na podkladě objemu kapaliny, viskozitě atd., podle vybraného způsobu podání.

40

Tak mohou být připraveny farmaceutické kompozice podle vynálezu pro intramuskulární podání, které obsahují 1 ml sterilní pufrované vody a okolo 1 ng až do 100 mg, např. okolo 50 ng až asi

45 30 mg a lépe okolo 5 až 25 mg upravené protilátky podle vynálezu. Obdobně mohou být vyrobeny farmaceutické kompozice podle vynálezu, které obsahují asi 250 ml sterilního Ringerova roztoku a asi 1 až asi 30 a preferovaně 5 až 25 mg upravené protilátky podle vynálezu. Aktuální metody pro přípravu parenterálně podatelných kompozic jsou dobře známé a jasné odborníkům a jsou podrobněji popsány, například, v Remington's Pharmaceutical Science, 15. vydání, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania.

50

Je preferováno, aby terapeutická agens podle vynálezu, pokud je ve farmaceutickém přípravku, bylo ve formě jednotkové dávky. Vhodná terapeuticky účinná dávka může být snadno určena odborníkům. Pro účinnou léčbu zánětlivých onemocnění u lidí nebo jiných zvířat by měla být

55 jedna dávka od přibližně 0,1 až přibližně 20 mg na 70 kg tělesné hmotnosti proteinu nebo proti-

látky podle vynálezu podána parenterálně, preferovaně i.v. nebo i.m. (intramuskulárně). Taková dávka může být, pokud to je nutné, opakovaně podána ve vhodných časových intervalech vybraných lékařem v průběhu zánětlivé odpovědi.

- 5 Pozměněné protilátky nebo upravené protilátky podle tohoto vynálezu mohou také být použity pro diagnostické účely, jako pro určení IL–5 zprostředkovaných onemocnění nebo sledování postupu léčby takových onemocnění. Jako diagnostická reagens mohou být tyto pozměněné protilátky konvenčně značeny pro použití v ELISA a jiných konvenčních testech pro měření IL–5 hladiny v séru, plasmě nebo jiné vhodné tkáni, nebo jeho uvolňování lidskými buňkami v kultuře.
- 10 Vlastnosti testu, ve kterém jsou pozměněné protilátky použity jsou běžné a neomezují tento objev.

- 15 Tak se v jednom provedení předkládaný vynález týká metody pro diagnostiku alergií a jiných stavů asociovaných s excesivní produkcí eosinofilů u pacientů, kde tato metoda obsahuje kroky určení množství lidského IL–5 ve vzorku (plasmě nebo tkáni) získaného od uvedeného pacienta a srovnání uvedeného určeného množství s průměrným množstvím lidského IL–5 v normální populaci, kde přítomnost signifikantně zvýšeného množství IL–5 ve vzorku od pacienta je známou alergií a jiných stavů asociovaných s excesem produkce eosinofilů.

- 20 Protilátky, pozměněné protilátky nebo jejich fragmenty zde popsane mohou být lyofilizovány pro skladování a rekonstituovány ve vhodném nosiči před použitím. Tato technika byla ukázána jako účinná pro běžné imunoglobuliny a mohou být využity v oboru známé lyofilizační a rekonstituční techniky.

- 25 Následující příklady ilustrují různé aspekty vynálezu včetně konstrukce příkladných upravených protilátek a jejich exprese ve vhodných vektorech a hostitelských buňkách, a nejsou konstruovány jako omezení rozsahu tohoto vynálezu. Všechny aminokyseliny jsou identifikovány běžným třípísmenným nebo jednopísmenným kodem. Všechny nezbytné restriční enzymy, plasmidy a jiná reagens a materiály byly získány z komerčních zdrojů, pokud není jinak uvedeno. Všechny
- 30 obecné klonovací ligace a jiné rekombinantní DNA metody byly provedeny podle T. Maniatis et al., citovaný výše, nebo jeho druhé edice (1989), vyd. Sambrook et al., stejným vydavatelem („Sambrook et al.“).

35 Příklady provedení vynálezu

Příklad 1 – Produkce mAb k hIL–5

- 40 Lidský IL–5 byl exprimován v *Drosophila Schneider 2* (S₂) buňkách a purifikován do homogeneity. Myší IL–5 byl exprimován v Baculovirus za použití *Spodoptera frugiperda* 21 (Sf21) buněk a purifikován do homogeneity. Monoklonální protilátka TRFK–5 (neutralizační krysí anti–myší protilátka) byla získána od Genzyme Corp. (Cambridge, MA).

45 A. Imunizační postup

- Rekombinantní lidský IL–5 (IL–5) byl použit jako imunogen pro panel sedmi CAF₁ samic myší (Charles River, Wilmington, MA). Zvířata obdržela tři subkutánní injekce IL–5 ve fosfátem pufrovaném salinickém roztoku (PBS) emulsifikovaném v poměru jedna ku jedné s TiterMAX™
- 50 (CytoRx Corp., Norcross, GA) v průběhu čtyř měsíců, počáteční dávka antigenu byla 50 µg (mikrogramů) a dosycovací dávka byla 25 a 10 µg (mikrogramů). Po dosycení byly odebrány vzorky séra a byly testovány na vazbu na IL–5 a neutralizační aktivitu prostřednictvím receptového vazebného inhibičního testu a B13 proliferačního testu (nebo IL–5 neutralizačního testu (příklad 2C)). Všechny myši produkovaly vzorky séra, které vázaly IL–5. Zvířata vybraná jako

dárci sleziny byly dosycena intravenosně 10 µg (mikrogramy) rekombinantního lidského IL-5 před eutanasií.

B. Vývoj hybridomů

Postup fúze, prvně popsany Kohlerem et al., (Nature, 256: 495 (1975)), byl použit s modifikacemi k provedení techniky za použití monovrstvy buněk (Kennet et al., Vyd., „Hybridomas: A new dimension in biological analysis“, str. 368 – 377, Plenum Press, New York). Buňky sleziny ze dvou dárcovských myši byly shromážděny a fúze byla provedena za použití poměru 50 milionů buněk sleziny ku 10 milionům SP2/0/Ag14 myelomových buněk. Jamky obsahující buňky produkující protilátku k IL-5 byly expandovány a supernatant byl vyšetřován v IL-5 receptor vazebném inhibičním testu, a B13 (neutralizačním) proliferačním testu (popsaném níže).

Bylo izolováno šestnáct hybridomů, které secernovaly mAb reaktivní s IL-5. Supernatanty hybridomů byly smíseny s jodinovaným IL-5, přidány k membránovému extraktu připravenému z Drosophila buněk exprimujících α-řetězec IL-5 receptoru (IL-5R) a byly testovány na inhibici vazby na receptor. Jedenáct supernatantů hybridomů inhibovalo z více než 60% vazbu jodovaného IL-5 na α-řetězec IL-5 receptoru. Tři mAb, 2B6, 2E3 a 2F2 také inhibovali z více než 70% proliferaci myších B13 buněk v odpovědi na lidský, ale ne na myší IL-5. Pět z hybridomů, z nichž čtyři blokovaly vazbu a/nebo proliferaci (1C6, 2B6, 2e3 A 2f2) a 1, který nebyl neutralizující (24G9), bylo opakovaně subklonováno na jemném agaru pro generování stabilních klonálních buněčných linií. Supernatanty z klonovaných linií byly vyšetřovány na zkříženou reaktivitu ELISA a nevázaly lidský IL-5α, IL-5β, IL-4, IL-8, M-CSF ani TGFα. mAb byly purifikovány a vazebná afinita byla hodnocena za použití analýzy optickým biosensorem (BIAcore) v rozsahu 10 až 100 pM. Supernatanty z těchto linií byly izotypovány za použití myších izotypovacích reagens (PharMingen, San Diego, CA). Souhrn afinit a IC₅₀ pro neutralizační aktivity mAb je prezentován v tabulce 1 (příklad 2).

Podobnou metodou byly odvozeny kryší hybridomy z imunizovaných krys, za použití srovnatelného protokolu imunizace a kryších myelomů jak bylo popsáno pro myši. Dva kryší hybridomy, které produkovaly mAb vážící IL-5, 4A6 a 5D3, byly identifikovány. Podobně jako u mAb 2B6, 2E3 a 2F2 bylo u mAb 4A6 a 5D3 shledáno, že jsou neutralizující v B13 testu popsaném níže.

C. Uložení hybridomů

Hybridomová buněčná linie SK119-2B6.206.75 (1) produkující monoklonální protilátku 2B6 byla uložena v American Type Culture Collection (ATCC) Rockville, MD, USA, pod přírůstkovým číslem HB 11783, a byla akceptována jako depositum pro účely patentování v souladu s Budapešťskou smlouvou 1977 upravující uskladnění mikroorganismů za účelem patentovacích postupů.

Hybridomová buněčná linie SK119-2E3.39.40.2 produkující monoklonální protilátku 2E3 byla uložena v American Type Culture Collection (ATCC) Rockville, MD, USA, pod přírůstkovým číslem HB 11782, a byla akceptována jako depositum pro účely patentování v souladu s Budapešťskou smlouvou 1977 upravující uskladnění mikroorganismů za účelem patentovacích postupů.

Hybridomová buněčná linie SK119-2F2.37.80.12 produkující monoklonální protilátku 2F2 byla uložena v American Type Culture Collection (ATCC) Rockville, MD, USA, pod přírůstkovým číslem HB 11781, a byla akceptována jako depositum pro účely patentování v souladu s Budapešťskou smlouvou 1977 upravující uskladnění mikroorganismů za účelem patentovacích postupů.

Hybridomová buněčná linie SK119-24G9.8.20.5 produkující monoklonální protilátku 24G9 byla uložena v American Type Culture Collection (ATCC) Rockville, MD, USA, pod přírůstkovým

číslem HB 11780, a byla akceptována jako depositum pro účely patentování v souladu s Budapešťskou smlouvou 1977 upravující uskladnění mikroorganismů za účelem patentovacích postupů.

- 5 Hybridomová buněčná linie 4A6(1)G1F7 produkující monoklonální protilátku 4A6 byla uložena v American Type Culture Collection (ATCC) Rockville, MD, USA, pod přírůstkovým číslem HB 11943, a byla akceptována jako depositum pro účely patentování v souladu s Budapešťskou smlouvou 1977 upravující uskladnění mikroorganismů za účelem patentovacích postupů.
- 10 Hybridomová buněčná linie 5D3(1)F5D6 produkující monoklonální protilátku 5D3 byla uložena v American Type Culture Collection (ATCC) Rockville, MD, USA, pod přírůstkovým číslem HB 11942, a byla akceptována jako depositum pro účely patentování v souladu s Budapešťskou smlouvou 1977 upravující uskladnění mikroorganismů za účelem patentovacích postupů.

15

Příklad 2 – Testy

A. ELISA

- 20 Jednotlivé jamky MaxiSorb[™] imunoploten (Nunc, Naperville, IL) byly potaženy 0,2 µg IL-5 v 0,05 uhlíčitánovém pufru pH 9,6. Po inkubaci přes noc při 4 °C byly plotny vypláchnuty PBS obsahujícím 0,025% Tween[®]20 a blokovány 1% BSA v PBS s 0,025% Tween[®]20 po dvě hodiny při pokojové teplotě. Naředěný supernatant hybridomů byl přidán do IL-5 potažených jamek a byl inkubován po dvě hodiny při pokojové teplotě. Po vypláchnutí ploten byl přidán anti-mýší
- 25 IgG a IgM (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) v 1/7500 ředění v PBS obsahujícím 1% BSA a 0,025% Tween[®]20. O dvě hodiny později byly plotny znovu promyty a bylo přidáno 0,2 ml 0,1 M citrátového pufru pH 4,75 obsahujícího 0,1% peroxid močoviny a 1 mg/ml ortho-fenylenediamin. Po 15 minutách byly plotny čteny při 450 nm na VMax[™] čtečce mikroplothen (Molecular Devices, Menlo Park, CA).

30

B. Test inhibice vazby receptoru

- Membránový extrakt *Drosophila* S2 buněk exprimujících α -řetězec lidského IL-5 receptoru (IL-5R) byl použit k měření účinku protilátky na IL-5 vazbu na receptor. Pro přípravu membrán bylo
- 35 10⁹ buněk peletováno při 1000 x g při 4 °C po 10 minut. Buněčné pelety byly zmrazeny v lázni suchý led/ethanol po 15 minut. Pelety byly rozmrazeny, resuspendovány v 10 ml PBS při 4 °C a peletovány při 1000 x g po 10 minut. Pelety buněk byly potom promyty 2X v PBS a resuspendovány v 13,5 ml hypotonického pufru (10 mM Tris pH 7,5, 3 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, 1 mM fenylmethylsulfonylfluorid, 1 µM leupeptin, 1 µM pepstatin A) a inkubovány na ledu po
 - 40 5 minut. Buněčná suspenze byla homogenizována v 15 ml Dounce homogenizéru a převedena do konečné koncentrace 0,25 M sukrosy roztokem 2,5 M sukrosy. Byla odstraněna buněčná drť 15 minutovou centrifugací při 1000 x g. Buněčné membrány byly peletovány při 100 000 x g při 4 °C po 90 minut a resuspendovány v 50 ml 10 mM Tris pH 7,5, 3 mM MgCl₂, 250 mM sukrosy a uskladněny při -70 °C.

45

- Testy s *Drosophila* membránami obsahujícími receptor byly provedeny na MultiscreenGV[™] plotnách (Millipore Corp., Bedford, MA) za použití kultivačního média M3 *Drosophila* tkání (Lindquist et al., *Drosophila* Inf. Serv., 58: 163 (1982)) obsahujícím 25 mM HEPES pufru pH 7,2 a 0,1% BSA (vazebný pufr). Jamky byly předem blokovány 0,1 ml vazebného pufru. 50 µl testovaného vzorku, v trojím provedení, bylo přidáno do jamek po čemž následovalo 25 µl jodovaného (¹²⁵I) IL-5. Po 20 minutové inkubaci při pokojové teplotě bylo do jamek přidáno 25 µl membránového extraktu *Drosophila* S2 buněk exprimujících α -řetězec lidského IL-5R. Po jedné hodině další inkubace byly membrány shromážděny vakuovou filtrací a promyty; 3X vazebným pufrem. Filtry byly sušeny a hodnoceny.

50

C. IL-5 neutralizační test

Myší IL-5/IL-5 dependentní buněčná linie LyH7.B13 (B13) byla získána díky laskavosti R. Palacios, Basel Institute of Immunology, Switzerland. Buňky byly subkultivovány dvakrát týdně v RPMI 1640 médiu (GibcoBRL, Renfrewshire, UK) doplněném L-glutaminem, neesen-
ciálními aminokyselinami, pyruvátém sodným, penicilin-streptomycinem (vše GibcoBRL), plus 2-merkaptethanolem (5×10^{-5} M, Sigma), 10% fetálním hovězím sérem (Globefarm, Surrey, UK) a 1 – 10 jednotkami myšího IL-5. Pro testy byly buňky trojnásobně kultivovány po 48 hodin (5000 buněk/jamku) na 96 jamkových plotnách s kulatým dnem za přítomnosti vhodných ředění testovaných vzorků a pulsovány uCi ^3H -thymidinem (Amersham, Bucks, UK) po konečné 4 hodiny. Byly upraveny pro scintilační hodnocení v 1205 Betaplate (LKB Wallac, Beds, UK).

D. Optický biosensor

Kinetická a ekvilibrační vazebné vlastnosti s imobilizovaným hIL-5 a protilátkami byly měřeny za použití BIAcore optického biosensoru (Pharmacia Biosensor, Uppsala, Sweden). Kinetická data byla hodnocena za použití vztahů popsaných dříve (Karlsson et al., J. Immunol. Meth., 145: 229 – 240 (1991)) a jsou zde uvedena ve své úplnosti jako odkaz.

Tři neutralizační protilátky, jmenovitě 2B6, 2E3 a 2F2, měly velmi podobný potenciál inhibice ^{125}I -IL-5 vazby na membránový receptor a neutralizace proliferace B-buněk a také velmi podobné afinity pro IL-5 (viz tabulka 1). Byly určeny nukleotidové sekvence V_H a V_L z těchto tří mAb 2 IgG₁ a 1 IgG_{2a}, v příslušném pořadí. Získané sekvence byly velmi podobné, s odlišnostmi pouze v několika reziduích.

Tabulka 1

Afinita a neutralizační aktivita mAb reaktivních s lidským IL-5

mAb	K _d (pM) ^a	neutralizace		
		vazebná IC ₅₀ (nM) ^b	proliferace IC ₅₀ ^c	100% inhibice ^c
2B6	22	1	70	200
2E3	20	1	90	600
2F2	13	1	150	340
1C6	86	43	12200	ND
24G9	ND	>133	>100000	ND
4A6	18	>88	28	100
5D3	ND	ND	100	10000

^a určeno analýzou optickým biosensorem (BIAcore) (25 °C)

^b inhibice ^{125}I -IL-5 vazby na IL-5R (α -řetězec) z *Drosophila* membrán

^c inhibice proliferace (v pM) B13 buněk v odpovědi na 8 pM lidského IL-5

ND – žádná data

Příklad 3 – Izolace a charakterizace IL-5 Fab z kombinatoriální knihovny

A. PCR a konstrukce kombinatorní knihovny

5

RNA purifikovaná ze slezin tří myší byla reversně transkribována cDNA kitem (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) za použití buď primeru (dT)15 dodaného s kitem nebo 3' Fd (IgG1, IgG2a a IgG3) a primery kappa lehkého řetězce jak je popisuje Huse et al., (Science, 246: 1275 (1983)) a Kang, S. A. (Methods: Companion Methods Enzymol., 2: 111 (1991)), což je zde uvedeno jako odkaz. Imunoglobulinové cDNA byly amplifikovány PCR za použití primerů a podmínek tepelných cyklů, jak je popisuje Huse et al., výše. Pro všechny reakce byla použita Hot Start technika za použití AmpliWaxTM PCR Gem 100 (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT) korálků a protokolu výrobce. PCR produkty byly purifikovány na gelu, tráveny a ligovány do pMKFabGene3 vektoru (Ames et al., J. Immunol. 152: 4572 (1994)). Titr knihovny po ligaci s Fd cDNA byl $5,1 \times 10^7$ CFU a po ligaci s kappa cDNA byl $1,5 \times 10^6$ CFU. XL1-Blue buňky (Stratagene, La Jolla, CA) transformované fagemidovou knihovnou byly infikovány pomocným fágem VCSM13 (Stratagene) a fág byl připraven jak popisuje Barbas a Lerner (Methods: Companion Methods Enzymol., 2: 119 (1991)).

20 B. Biopanning

Čtyři mikrotitrační jamky (Immulon II Removawell Strips, Dynatech Laboratories Inc., Chantilly, VA) byly potaženy přes noc při 4 °C IL-5 (1 µg/jamku) v 0,1 M bikarbonátu, pH 8,6. Jamky byly promyty vodou a blokovány PBS obsahujícím 3% BSA při 37 °C po 1 hodinu. Bloku-
 25 kující roztok byl odstraněn a knihovna byla přidána do mikrotitračních jamek (50 µl/jamku) a inkubována při 37 °C po 2 hodiny. Jamky byly promyty 10 krát TBP/Tween® (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5% Tween® 20) a jednou H₂O před elucí adherentního fágu s 0,1 M HCl, upraveného na pH 2,2 glycinem, obsahujícím 1 mg/ml BSA.

30 C. Odběr kolonií

Odběr kolonií z klonů izolovaných ze třetího a čtvrtého kola biopanningu byly zpracovány jak je popsáno (Barbas a Lerner, výše). Filtry byly inkubovány po 1 hodinu při pokojové teplotě s 0,5 –
 35 1,0 uCi ¹²⁵I-IL-5, který byl jodinován za použití Bolton-Hunterova reagens (NEN, Billerica, MA) podle výrobcem doporučeného postupu, v PBS obsahujícím 1% BSA, byly promyty PBS 0,25% Tween a exponovány na Kodak XAR filmu. Kolonie exprimující IL-5-reaktivní Fab byly detekovány autoradiografií.

D. Příprava solubilních Fab

40

Fágemidové DNA byly tráveny NheI a SpeI pro odstranění genu III a smoligovány. XL1-Blue buňky byly transformovány, a izolované klony byly kultivovány přes noc při 37 °C v 5,0 ml super bujonu (SB) média (30 g trypton, 20 g kvasinkový extrakt, 10 g 3-(N-morfolino)propan-sulfonová kyselina, MOPS s pH upraveným na 7) obsahujícím 1% glukosu a 50 µg/ml
 45 karbencilinu. Buňky z 1 ml této kultury byly peletovány při 3500 rpm po 10 minut na Beckman GS-6R centrifuse a byly použity pro inokulaci 5 ml SB obsahujícího 50 µg/ml karbencilinu. Kultury byly třepány po 1 hodinu při 37 °C, byl přidán izopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG; 1 mM) a kultury byly přeneseny do 28 °C přes noc. Solubilní Fab byl připraven z periplasmatických extraktů lýzou buněčných pelet po 20 minut při 4 °C ve 20% sukrose suspendované ve 30 mM Tris pH 8,0, po čemž následovala centrifugace na Mikrofuge po 10 minut.
 50 Fab koncentrace byla hodnocena western blotem za srovnání vzorků obsahujících známá množství myší Fab. Různé bakteriální periplasmatické extrakty obsahovaly podobné koncentrace Fab, v rozsahu 1 až 20 µg/ml, jak bylo zhodnoceno western blot analýzou.

E. Purifikace Fab

Chelační peptid byl zpracován do karboxy-terminálního konce těžkého řetězce pomoc při proteinové purifikaci. Po odstranění M13 gen III kódujícího regionu, prostřednictvím trávení

5 NheI a SpeI, byl pár přesahujících oligonukleotidů.

(SEQ ID NO: 43) 5'-CTAGCCACCACCACCACCACCTAA-3';

(SEQ ID NO: 44) 5'-GGTGGTGGTGGTGGTGGTGATTGATC-5'

kódující šest histidinových residuí subklonován do Fab expresního vektoru. Indukce Fab exprese byla provedena jak je popsáno výše. Po indukci přes noc při 28 °C byl připraven periplasmatický lysát buněčné pelety 30 minutovou inkubací při 4 °C ve 20% sukrose, 30 mM TRIS pH 8,0.

10 Močovina a Brij-35 detergenty byly přidány do čirého supernatantu do konečné koncentrace 2M a 1%, respektive. Po promíchání při pokojové teplotě po 1 hodinu byl ošetřený a čirý supernatant zaveden při 0,5 ml/ml přímo na 5 ml Nickel-NTA kovovou chelační kolonu (1,5 x 3 cm) ekvilibrovanou pufrům A (100 mM Na-fosfát, 10 mM Tris, 0,3 M NaCl, 2 M Urea, pH 8,0). Po promytí 4 objemy kolony (20 ml) byl navázaný materiál eluován 6 objemy kolony (30 ml) reversním pH

15 gradientem pd pH 8 do pH 4 ve stejném pufru jako je uvedeno výše. Purifikované Fab eluovaly z kolony v ostrém symetrickém píku při pH 5,5. Byly více než z 90% čisté a prosté DNA.

F. Fab ELISA

20 Immulon II plotny (Dynatech) byly potaženy přes noc při 4 °C proteinem suspendovaným (1 mg/ml; 50 ml na jamku) v 0,1 M bikarbonátového pufru, pH 8,6. Ředění a promytí bylo provedeno v PBS obsahujícím 0,05% Tween™ 20. Plotny byly promyty a blokovány po 1 hodinu PBS obsahujícím 1% BSA při pokojové teplotě. Různá ředění bakteriálních supernatantů obsahujících solubilní Fab, nebo purifikované Fab, byla přidána do ploten. Po jednohodinové inkubaci byly plotny promyty a byla přidána biotinilovaná koží anti-mýši kappa (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL) (1:2000 ředění; 50 µg/jamku) po jednu

25 hodinu. Plotny byly promyty a byla přidána streptavidinem značená křenová peroxidasa (1:2000 ředění; 50 µg/jamku) po jednu hodinu. Plotny byly promyty, byl přidán ABTS peroxidasa substrát (100 µg/jamku; Kirjegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) a optická densita při

30 405 nm byla čtena na UVmax™ (Molecular Devices) čteče mikroploten.

G. Izolace a charakterizace Fab z kombinatoriální knihovny

Fág nesoucí Fab k IL-5 byl vybrán z knihovny opakovanými koly biopanorámování proti mikrotitrovým jamkám potaženým IL-5. Po 4 kolech selekce byly IL-5 reaktivní Fab identifikovány

35 testem sběru kolonií za použití ¹²⁵I-IL-5. Bylo identifikováno třicet čtyři kolonií ze třetího kola a čtyři kolonie ze čtvrtého kola, které vázaly značený IL-5. Vazba IL-5 byla potvrzena přímou vazbou ELISA za použití supernatantů kultury exprimující Fab-genIII fúzní protein. DNA byla izolována z těchto kolonií a po odstranění kódujícího regionu M13 genu III byla indukována

40 exprese solubilního Fab. Byla připravena periplasmatická frakce a byla testována ELISA na vazbu IL-5. Fab se vázaly specificky na IL-5 s žádnou demonstrovatelnou vazbou na jiný protein, rC5a.

Neředěné periplasmatické extrakty (obsahující 1 až 20 µg/ml Fab) byly testovány v testu inhibice

45 IL-5R vazby (Příklad 2). Žádný z Fab neinhiboval vazbu jodovaného IL-5 na IL-5Rα z více než 35%.

H. Konverse neutralizační mAb na Fab

50 Fd a kappa cDNA mAb (2B6) byly izolovány PCR za použití podmínek popsanych výše. Fragments purifikované na gelu byly subklonovány do pMKFFabGene3 vektoru, který byl modifiko-

- ván tak, aby obsahoval hexa-His sekvenci 3' genu III cDNA, což vedlo ke vzniku plasmidu pMKFabGene3H. Funkční, IL-5 vážící Fab klon obsahující 2B6 těžký a lehký řetězec byl identifikován testem sběru kolonií. Za odstranění genu III cestou NheI/SpeI trávení a samoligace těžkého řetězce byl fúzován do rámečku s hexa-His, což umožnilo purifikaci jak je popsána výše.
- 5 Tento Fab inhiboval vazbu na receptor na dávce závislým způsobem s IC_{50} přibližně 7,5 $\mu\text{g/ml}$, podobně jako rodičovská protilátka 2B6.

I. Konstrukce a vyšetřování knihovny s přeskupenými řetězci

- 10 cDNA kódující Fd neutralizační mAb 2B6 byla subklonována jako XhoI/SpeI fragment do pMKFabGene3H, který obsahoval SstI/XbaI fragment místo cDNA lehkého řetězce. Tento fagemid byl tráven SstI a XbaI a ligován do SstI/XbaI tráveného lehkého řetězce PCR produktu odvozeného od IL-5 imunizované myši (popsáno výše). Titr knihovny byl po ligaci 4×10^5 CFU. Biopanorámování a test sběru kolonií byly provedeny stejně jako je popsáno výše pro kombina-
- 15 torní knihovnu.

- Knihovna byla konstruována párováním cDNA kódující Fd neutralizační mAb 2B6 se stejným repertoárem lehkých řetězců, odebraných z IL-5 imunizované myši, použité ke generování kombinatorní knihovny. Tato knihovna s přeskupenými řetězci byla podrobena 4 kolům biopanorámování s imobilizovaným IL-5 a výsledné kolonie byly testovány na IL-5 reaktivitu za použití
- 20 testu sběru kolonií. Pozitivní kolonie, které vázaly jodinovaný IL-5, byly dále testovány ELISA a testem IL-5R α vazby. Dva z Fab, 2 a 15, získaných z knihovny s přeskupenými řetězci blokovaly vazbu IL-5 na IL-5R α a inhibovaly IL-5 dependentní proliferaci v B13 testu. Sekvence těchto dvou Vks byly podobné sekvencím 2B6 Vk, původnímu partneru lehkého řetězce pro 2B6 V_H. Sekvence lehkého řetězce pro Fab 2 a 15 jsou SEQ ID NO: 45 a 46, v příslušném pořadí. Pro
- 25 Fab 2 jsou CDR 1–3 SEQ ID NO: 10, 11 a 47, v příslušném pořadí. Pro Fab 15 jsou CDR 1–3 SEQ ID NO: 10, 11 a 48, v příslušném pořadí.

- Všechny aminokyselinové sekvence protilátky uvedené dále v příkladech 4 a 5 používají číslování podle KABAT, které umožňuje variabilitu v délce CDR a pracovních regionů. To znamená,
- 30 že klíčové aminokyseliny jsou vždy označeny stejným číslem bez ohledu na množství aminokyselin, které jim předcházejí. Například, cystein předcházející CDR1 všech lehkých řetězců je vždy v pozici 23 podle KABAT a tryptofan po CDR1 je vždy v pozici 35 podle KABAT, ačkoliv může CDR1 obsahovat více než 17 aminokyselin.

35

Příklad 4 – Humanizovaná protilátka

- Jedna humanizovaná protilátka byla projektována tak, aby obsahovala myší CDR v pracovním regionu lidské protilátky. Tato humanizovaná verze IL-5 specifické myší protilátky 2B6 byla
- 40 připravena za použití následujících manipulací.

A. Klonování genu

- 45 mRNA byla izolována z příslušných 2B6, 2F2 a 2E3 hybridomových buněčných linií (viz příklad 3) za použití kitu získaného od Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN) a byla reversně transkribována za použití primeru (dT)₁₅ dodaného s cDNA kitem (Boehringer Mannheim) za vytvoření cDNA. PCR primery specifické pro myší imunoglobulin byly použity pro amplifikaci cDNA kódující domény v rozsahu od aminokyseliny #9 (KABAT číslování) variabilního regionu
- 50 těžkého řetězce po pantový region a od aminokyseliny #9 (KABAT číslování) variabilního regionu lehkého řetězce po konec konstantního regionu. Nezávislými PCR reakcemi bylo získáno několik klonů každého řetězce protilátky.

Primer použitý pro myší gamma 1 pantový region je (SEQ ID NO: 22):

5' -GTACATATGCAAGGCTTACAACCACAATC-3'

Primer použitý pro myší gamma 2a pantový region je (SEQ ID NO: 23):

5' -GGACAGGGCTTACTAGTGGGCCCTCTGGGCTC-3'

5 Primer použitý pro myší variabilní region těžkého řetězce je (SEQ ID NO: 24):

5'-AGGT(C nebo G)(C nebo A)A(G nebo A)CT(G nebo T)TCTCGAGTC(T nebo A)GG-3'

Primer použitý pro myší kappa řetězec konstantního regionu je (SEQ ID NO: 25):

5' -CTAACACTCATTCCCTGTTGAAGCTCTTGACAATGGG-3'

10

Primer použitý pro myší variabilní region lehkého řetězce je (SEQ ID NO: 26):

5' -CCAGATGTGAGCTCGTGATGACCCAGACTCCA-3'

PCR fragmenty byly klonovány do plasmidů pGEM7f+ (Promega), které byly potom transformovány do E. coli DHa (Bethesda Research Labs.).

15

B. DNA sekvencování

Těžké a lehké řetězce myších cDNA klonů z části A výše byly potom sekvencovány. Výsledky sekvencování variabilních regionů těchto klonů jsou ukázány v SEQ ID NO: 1 – 6 (Obr. 1 – 6). Každý klon obsahoval aminokyseliny, o kterých je známo, že jsou konzervovány ve variabilních regionech myších těžkých řetězců nebo ve variabilních regionech lehkých řetězců. Aminokyselinové sekvence CDR jsou uvedeny níže.

20

CDR regiony pro těžký řetězec 2B6 jsou SEQ ID NO: 7, 8 a 9. Viz obr. 7. Tyto sekvence jsou kódovány SEQ ID NO: 1. CDR regiony pro lehký řetězec jsou SEQ ID NO: 10, 11 a 12. Viz obr. 7. Tyto sekvence jsou kódovány SEQ ID NO: 2.

25

CDR regiony pro těžký řetězec 2F2 jsou SEQ ID NO: 7, 8 a 9. Viz obr. 7. Tyto sekvence jsou kódovány SEQ ID NO: 3. CDR regiony pro lehký řetězec jsou SEQ ID NO: 10, 11 a 13. Viz obr. 7. Tyto sekvence jsou kódovány SEQ ID NO: 4.

30

CDR regiony pro těžký řetězec 2E3 jsou SEQ ID NO: 7, 8 a 14. Viz obr. 7. Tyto sekvence jsou kódovány SEQ ID NO: 5. CDR regiony pro lehký řetězec jsou SEQ ID NO: 10, 11 a 13. Viz obr. 7. Tyto sekvence jsou kódovány SEQ ID NO: 6.

35

C. Výběr lidských úseků základní struktury

Po klonování 2B6 byly aminokyselinové sekvence variabilních regionů těžkých a lehkých řetězců (obr. 1 a 2) (SEQ ID NO: 15 a 16, v příslušném pořadí) srovnávány se známými sekvencemi myšího imunoglobulinu v KABAT a SWISS-PROT (Nuc. Acids Res., 20: 2019 – 2022 (1992)) databázích proteinových sekvencí kvůli označení aminokyselin k N-terminálním residuům. Dedukované aminokyselinové sekvence variabilního regionu těžkého a lehkého řetězce 2B6 byly potom srovnány s databází proteinové sekvence lidského imunoglobulinu tak, aby se identifikoval lidský pracovní region pro těžký a lehký řetězec, který by co nejtěsněji odpovídal myší sekvenci. Kromě toho, těžký a lehký řetězec byly hodnoceny za použití poziční databáze generované ze strukturálního modelu Fab domén pro zhodnocení potenciálních konfliktů způsobených aminokyselinami, které mohou mít vliv na CDR prezentaci. Konflikty byly vyřešeny během syntesy úseků základní struktury humanizovaného variabilního regionu substitucí korespondujících myších aminokyselin v této lokalizaci.

40

45

Úseky základní struktury těžkého řetězce protilátky získané z lidského myelomového imunoglobulinu (COR) byly použity (E. M. Press a N. M. Hogg, *Biochem. J.*, 117: 641 – 660 (1970)). Aminokyselinová sekvence úseku základní struktury regionu lidského těžkého řetězce byla shledána z přibližně 66 % homologní k pracovnímu regionu 2B6.

Pro vhodné úseky základní struktury variabilního regionu lehkého řetězce byla použita sekvence úseku základní struktury regionu lehkého řetězce Bence–Jonesova proteinu, (LEN) (Schneider et al., Hoppe–Seyler's *Z. Physiol. Chem.*, 356: 507 – 557 (1975)). Lidské úseky základní struktury lehkého řetězce byly přibližně z 82 % homologní k úsekům základní struktury lehkého řetězce myši 2B6, na úrovni aminokyselin.

Vybrané lidské pracovní regiony byly zpětně translatovány za poskytnutí DNA sekvence.

D. Konstrukce genů humanizovaných mAb

Za použití daných CDR těžkého řetězce 2B6 (obr. 7 a SEQ ID NO: 1 – 2) a sekvence úseků základní struktury lidských protilátek byl vyroben syntetický variabilní region těžkého řetězce (SEQ ID NO: 18). Toto bylo provedeno za použití čtyř syntetických oligonukleotidů (SEQ ID NO: 27 a 28) (SEQ ID NO: 29 a 30) které, při spojení, kódovaly aminokyseliny #21 – #106 (KABAT číslování). Oligonukleotidy byly potom ligovány do HpaI–KpnI restričních míst plasmidu založeném na pUC18 obsahujícího sekvence odvozené od jiného humanizovaného těžkého řetězce založeného na COR pracovním regionu (výše). Tento plasmid poskytoval signální sekvenci (SEQ ID NO: 17) a zbývající sekvenci variabilního regionu. Jakékoliv chyby v mapované sekvenci byly opraveny PCR s mutagenními primery nebo přidáním syntetických linkerů do existujících restričních míst.

Signální sekvence humanizovaných variabilních regionů těžkého řetězce byly excisovány z plasmidu založeném na pUC jako EcoRI–ApaI fragment a byly ligovány do expresního vektoru pCD, který obsahoval konstantní region lidského IgG₁. Syntetické nukleotidy a aminokyselinové sekvence variabilního regionu těžkého řetězce jsou poskytnuty na obr. 8 (SEQ ID NO: 18 a 19). Residua úseku základní struktury jsou aminokyseliny 1 – 30, 36 – 49, 66 – 97 a 109 – 119 SEQ ID NO: 19. Aminokyselinové sekvence CDR jsou shodné s CDR myši 2B6. Vzniklý expresní vektor, pCDIL5HZHC1.0, je ukázán na obr. 10.

Za použití daných CDR lehkého řetězce 2B6 (obr. 7 a SEQ ID NO: 10, 11 a 12) a sekvence úseků základní struktury lidské protilátky byl vyroben syntetický variabilní region lehkého řetězce (SEQ ID NO: 20). Čtyři syntetické oligonukleotidy kódující aminokyseliny #27 – #58 (KABAT číslování) (SEQ ID NO: 31 a 32) a aminokyseliny #80 – #109 (SEQ ID NO: 33 a 34) humanizovaného V_L s SacI–KpnI a PstI–HindIII konci v příslušném pořadí byly insertovány do na pUC18 založeném plasmidu obsahujícího sekvence odvozené od jiného úseku základní struktury lehkého řetězce (B17) (Marsh et al., *Nuc. Acids Res.*, 13: 6531 – 6544 (1985)), který vykazuje vysoký stupeň homologie s LEN úsekem základní struktury. Tento plasmid poskytoval zbývající sekvenci variabilního regionu. Jakékoliv chyby v mapované sekvenci a jednotlivé rozdíly v aminokyselinách mezi LEN a B17 pracovními regiony byly opraveny PCR s mutagenními primery nebo přidáním syntetických linkerů do existujících restričních míst.

Variabilní region humanizovaného lehkého řetězce byl izolován z pUC plasmidu jako EcoRV–NarI fragment a byl ligován do expresního vektoru pCN, který obsahoval signální sekvenci (SEQ ID NO: 17) spolu s kappa lidským konstantním regionem. Syntetické nukleotidy a aminokyselinové sekvence variabilního regionu lehkého řetězce jsou poskytnuty na obr. 9 (SEQ ID NO: 20 a 21). Residua lidského úseku základní struktury jsou aminokyseliny 1 – 23, 41 – 55, 64 – 94 a 104 – 113 SEQ ID NO: 21. Aminokyselinové sekvence CDR jsou shodné s CDR myši 2B6. Nicméně, kódující sekvence pro tyto CDR se liší od kódujících sekvencí myši 2B6 tak, aby bylo možné vytvořit místa pro restriční enzym. Jeden vzniklý expresní vektor,

pCNIL5HZLC1.0, je ukázán na obr. 11. Tyto syntetické variabilní sekvence lehkého a/nebo těžkého řetězce jsou využity pro konstrukci humanizované protilátky.

E. Expres humanizované mAB

5

Humanizovaný těžký řetězec, odvozený od IgG₁ izotypu, využívá syntetický variabilní region těžkého řetězce, jak je poskytnut SEQ ID NO: 19. Tento syntetický V_H obsahující CDR těžkého řetězce 2B6 byl projektován a syntetizován, jak je popsáno výše.

10

Humanizovaný lehký řetězec, lidský kappa řetězec, využívá syntetický variabilní region lehkého řetězce, jak je poskytnut SEQ ID NO: 21. Tento syntetický V_L obsahující CDR těžkého řetězce 2B6 byl projektován a syntetizován, jak je popsáno výše. DNA fragmenty kódující humanizované variabilní regiony byly insertovány do na pUC19 založeného expresního plasmidu pro savčí buňky, který využívá signální sekvenci a obsahuje CMV promotory a konstantní regiony lidského těžkého řetězce a lidského lehkého řetězce chiméry produkované v příkladu 5 níže za použití běžných metod (Maniatis et al., citován výše), za vzniku plasmidu pCDIL5HZHC1.0 (těžký řetězec) (SEQ ID NO: 49, viz též obr. 10) a pCNIL5HZLC1.0 (lehký řetězec) (SEQ ID NO: 50, viz též obr. 11). Plasmidy byly kotransfektovány do COS buněk a supernatanty byly testovány po třech a pěti dnech, v příslušném pořadí, na přítomnost lidské protilátky.

20

Výše uvedený příklad popisuje přípravu příkladné upravené protilátky. Obdobné postupy mohou být provedeny pro vývoj jiných upravených protilátek, za použití jiných anti-IL-5 protilátek (např. 2F2, 2E3, 4A6, 5D3, 24G9 atd.) vyvinutých běžnými prostředky.

25

F. Purifikace

Purifikace CHO exprimované chimérické a humanizované 2B6 může být provedena běžnou protein A (nebo G) afinitní chromatografií následovanou iontovou výměnou a molekulární síťovou chromatografií. Obdobný postup může být použit pro purifikaci do více než 95% čistoty pro jiné mAb (např. k respiračně syncyriálnímu viru, interleukinu – 4, antigenům cirkumsporozoitu malarie).

30

G. Další humanizované protilátky a expresní plasmidy

35

Za použití plasmidu pCDIL5HZHC1.0 (SEQ ID NO: 49) byl vyroben expresní plasmid pCDIL5HZHC1.1, který substituuje asparagin za threonin v pozici 73 úseku základní struktury. Toto bylo provedeno ligací syntetického linkeru s EcoRV a XhoI konci (SEQ ID NO: 51 a SEQ ID NO: 52) do identicky tráveného pCDIL5HZHC1.0. Obdobně, expresní plasmid pCDIL5HZHC1.2 substituuje izoleucin za valin v pozici 37 pracovního regionu. Toto bylo provedeno ligací syntetického linkeru s HpaI a XbaI konci (SEQ ID NO: 53 a SEQ ID NO: 54) do identicky tráveného pCDIL5HZHC1.0. Expresní plasmid pCDIL5HZHC1.3 byl také vytvořen ligací syntetického linkeru s HpaI a XbaI konci (SEQ ID NO: 53 a SEQ ID NO: 54) do identicky tráveného pCDIL5HZHC1.0.

40

45

Za použití daného na pUC18 založeného plasmidu popsaného dříve, který obsahuje DNA sekvence čtyř syntetických oligonukleotidů (SEQ ID NO: 31, 32, 33 a 34) byl vyroben humanizovaný variabilní region lehkého řetězce, kde je změněna pozice #15 pracovního regionu z leucinu na alanin. Tento plasmid byl tráven NheI a SacI restrikčními endonukleasami a byl insertován syntetický linker (SEQ ID NO: 55 a 56). EcoRV–NarI fragment byl potom izolován a ligován do identicky tráveného expresního vektoru pCNIL5HZLC1.0 za vytvoření pCNIL5HZLC1.1.

50

Syntetický variabilní region byl vyroben za použití úseků základní struktury těžkého řetězce získaných z imunoglobulinu (NEW) (Saul et al., J. Biol. Chem. 253: 585 – 597 (1978)) a CDR těžkého řetězce 2B6 (obr. 7 a SEQ ID NO: 1 – 2). Aminokyseliny úseku základní struktury, které mohou ovlivňovat CDR prezentaci byly identifikovány a byla provedena substituce, jak je

55

popsáno výše. Byly generovány čtyři přesahující syntetické oligonukleotidy (SEQ ID NO: 57, 58, 59 a 60) které, po tepelném zpracování a extensi, kódují aminokyseliny reprezentující signální sekvenci (SEQ ID NO: 17) a variabilní region těžkého řetězce. Tento syntetický gen byl potom amplifikován za použití PCR primerů (SEQ ID NO: 63 a 64) a ligován jako BstXI–HindIII
 5 restriční fragment do na pUC18 založeného plasmidu obsahujícího sekvence odvozené od jiného humanizovaného těžkého řetězce založeného na COR pracovním regionu. Byla provedena substituce fenylalanin za tyrosin v pracovním regionu v aminokyselinové pozici 91 (Kabat číslování) (ekvivalentní pozici 94 na obrázku 12) inzercí syntetického oligonukleotidového linkeru (SEQ ID NO: 75 a 76) do SacII a KpnI restričních míst. Vzniklý variabilní region těžkého
 10 řetězce je označen jako NEWM humanizovaný těžký řetězec.

Jakékoliv chyby v mapované sekvenci byly opraveny PCR s mutagenními primery nebo přidáním syntetických linkerů do existujících restričních míst. Signální sekvence variabilního regionu humanizovaného těžkého řetězce byla excisována z plasmidu založeném na pUC jako EcoRI–
 15 ApaI fragment a byla ligována do expresního vektoru pCD, který obsahoval konstantní region lidského IgG₁ za vytvoření plasmidu pCDIL5NEWM. Aminokyselinové sekvence CDR jsou shodné s CDR těžkého řetězce myši 2B6.

Syntetický variabilní region byl vyroben za použití úseků základní struktury lehkého řetězce získaných z imunoglobulinu (REI) (Palm et al., Hoppe–Seyler's Z. Physiol. Chem. 356: 167 – 191 (1975)) a CDR lehkého řetězce 2B6 (obr. 7 a SEQ ID NO: 10, 11 a 12). Aminokyseliny úseku základní struktury, které mohou ovlivňovat CDR prezentaci, byly identifikovány a byla provedena substituce, jak je popsáno výše. Byly generovány čtyři přesahující syntetické oligonukleotidy (SEQ ID NO: 65, 66, 67 a 68) které, po tepelném zpracování a extensi, kódují aminokyseliny
 25 reprezentující variabilní region lehkého řetězce (Obr. 13 a SEQ ID NO: 69, 70) označenou jako REI humanizovaný lehký řetězec. Tento syntetický gen byl potom amplifikován za použití PCR primerů (SEQ ID NO: 71 a 72) a ligován jako EcoRI–HindIII restriční fragment do pGEM–7Zf(+) (Promega Corporation, Madison, WI).

Jakékoliv chyby v mapované sekvenci byly opraveny PCR s mutagenními primery nebo přidáním syntetických linkerů do existujících restričních míst. Variabilní region humanizovaného lehkého řetězce byl excisován z na pGEM–7Zf(+) založeném plasmidu jako EcoRV–NarI fragment a byl
 30 ligována do expresního vektoru pCN, který obsahoval signální sekvenci (SEQ ID NO: 17) spolu s kappa lidským konstantním regionem za vytvoření plasmidu pCNIL5HREI. Aminokyselinové sekvence CDR jsou shodné s CDR lehkého řetězce myši 2B6. Nicméně, kódující sekvence pro tyto CDR se liší od kódujících sekvencí myši 2B6 tak, aby bylo možné vytvořit místa pro restriční enzym. Tyto syntetické variabilní sekvence lehkého a/nebo těžkého řetězce jsou využity pro konstrukci humanizované protilátky.

Za použití na pGEM–7Zf(+) založeném plasmidu popsaném výše může být vyroben variabilní region humanizovaného lehkého řetězce, kde je pozice #15 úseku základní struktury změněna z valinu na alanin. Tento plasmid může být tráven NheI a SacI restričními endonukleasami a je
 40 insertován syntetický linker (SEQ ID NO: 73 a 74). Potom může být izolován EcoRV–NarI fragment a může být ligován do shodně tráveného expresního vektoru pCNIL5HZREI za vytvoření plasmidu pCNIL5REI_{V15A}.

Příklad 5 – Konstrukce chimérické protilátky

DNA kódující aminokyseliny #9–#104 (KABAT číslování) variabilního regionu těžkého řetězce myši mAb 2B6 byla izolována jako AvaII–StyI restriční fragment z pGEM–7Zf(+) založeného na PCR klonu cDNA generované z 2B6 hybridomní buněčné linie (viz příklad 4). Sousedící sekvence variabilního regionu těžkého řetězce a signální sekvence (SEQ ID NO: 17) byly poskytnuty kombinováním tohoto fragmentu se čtyřmi malými syntetickými oligomerními linkery (SEQ
 55 ID NO: 35 a 36) (SEQ ID NO: 37 a 38) do na pUC18 založeném plasmidu tráveného BstXI–

HindIII. Konsensus N–terminálních aminokyselin, dedukovaných z těsně příbuzných myších těžkých řetězců, byl stanoven pro prvních osm V_H reziduí, které jsou kódovány SEQ ID NO: 35 a 36. Dedukovaná aminokyselinová sekvence těžkého řetězce byla verifikována sekvencováním prvních 15 N–terminálních aminokyselin těžkého řetězce 2B6.

EcoRI–ApaI fragment obsahující sekvence pro signální a V_H regiony byl izolován a ligován do plasmidu pCD, který již kóduje konstantní region lidského IgG₁.

DNA kódující aminokyseliny #12–#99 (KABAT číslování) variabilního regionu lehkého řetězce myši mAB 2B6 byla izolována jako DdeI–AvaI restriční fragment z pGEM–7Zf(+) založením na PCR klonu cDNA generované z 2B6 hybridomové buněčné linie (viz příklad 4). Sousedící sekvence variabilního regionu lehkého řetězce byly poskytnuty kombinováním tohoto fragmentu se čtyřmi malými syntetickými oligomerními linkery (SEQ ID NO: 39 a 40) (SEQ ID NO: 41 a 42) do na pUC18 založeném plasmidu tráveného EcoRV–HindIII. Konsensus N–terminálních aminokyselin, dedukovaný z těsně příbuzných myších lehkých řetězců, byl stanoven pro prvních osm V_H reziduí, které jsou kódovány SEQ ID NO: 39 a 40. Dedukovaná aminokyselinová sekvence lehkého řetězce byla verifikována sekvencováním prvních 15 N–terminálních aminokyselin lehkého řetězce 2B6. Tento variabilní region byl potom izolován jako AcoRV–NarI fragment a ligován do expresního vektoru pCN, který již obsahuje lidský kappa region a signální sekvenci.

Expresí chimérické protilátky byla provedena kontrastní transfekcí na pCD a pCN založených plasmidů do COS buněk. Supernatanty kultur byly shromážděny o tři a pět dní později a testovány na imunoglobulinovou expresi ELISA následovně. Každý krok kromě posledního je následován promytím PBS. Mikrotitrační plotny byly potaženy přes noc 100 ng/50 μ l/jamku kozí protilátkou specifickou pro Fc region lidské protilátky. Byly přidány supernatanty kultur a inkubovány po 1 hodinu. Potom byla přidána s křenuvou peroxidasou konjugovaná kozí anti–lidská IgG protilátka a byla inkubována po 1 hodinu. Toto bylo následováno přidáním ABTS peroxidasového substrátu (Kirkegaard and Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, MD). Po 1 hodinové inkubaci byla čtena absorbance na čtečce mikroploten (Molecular Devices Corporation, Menlo Park, CA). Byla detekována exprese chimérické protilátky. V obdobné ELISA byl supernatant COS buněk, obsahující chimérickou protilátku, specificky navázán na mikrotitrační jamky potažené lidským IL–5 proteinem. Tento výsledek potvrdil, že byly syntetizovány geny kódující protilátku k IL–5 a že tyto geny byly exprimovány.

Výše uvedený příklad popisuje přípravu příkladné upravené protilátky. Obdobné postupy mohou být provedeny pro vývoj jiných upravených protilátek, za použití jiných anti–IL–5 donorových protilátek (např. 2F2, 2E3, 4A6, 5D3, 24G9 atd.) vyvinutých běžnými prostředky.

Seznam sekvencí

(1) Obecné informace:

(i) Přihlašovatel: Ames, Robert S.
Appelbaum, Edward R.
Chaiken, Irwin M.
Cook, Richard M.
Gross, Mitchell S.
Holmes, Stephen D.
McMillan, Lynette J.
Theisen, Timothy W.

(ii) Název vynálezu: Rekombinantní IL5 antagonisté pro léčbu IL5 zprostředkovaných onemocnění

(iii) Počet sekvencí: 76

(iv) Adresa pro korespondenci

- (A) Adresa: SmithKline Beecham Corp./Corporate
- (B) Ulice: P.O. Box 1539-UW2220
- (C) Město: King of Prussia
- (D) Stát: Pennsylvania
- (E) Země: USA
- (F) ZIP: 19406-0939

(v) Počítačová čtecí forma:

- (A) Typ média: Floppy disk
- (B) Počítač: IBM PC kompatibilní
- (C) Operační systém: PC-DOS/MS-DOS
- (D) Software: PatentIn Release #1.0, verze #1.30

(vi) Údaje o současné přihlášce:

- (A) Číslo přihlášky:
- (B) Datum podání:
- (C) Klasifikace:

(vii) Předchozí data přihlášky:

- (A) Číslo přihlášky: US 08/470110
- (B) Datum podání: 6.6.1995

(viii) Předchozí data přihlášky:

- (A) Číslo přihlášky: US 08/467420
- (B) Datum podání: 6.6.1995

(viii) Předchozí data přihlášky:

- (A) Číslo přihlášky: US 08/363131
- (B) Datum podání: 6.6.1995

(viii) Zástupce/agent informace

- (A) Jméno: Sutton, Jeffrey A.
- (B) Registrační číslo: 34028
- (C) Reference/číslo rejstříku: P50282-2

(ix) Telekomunikační informace:

- (A) Telefon: 610-270-5024
- (B) Fax: 610-270-5090

(2) Informace pro SEQ ID NO: 1:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 334 párů bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

(ix) Vlastnosti:

- (A) Jméno/klíč: misc_charakter
- (B) Umístění: 1...334

(D) Jiné informace: /upozornění= „první báze koresponduje pozici 24 podle Kabat“

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 1:

```

ACCTGGCCTG GTGGCGCCCT CACAGAGCCT GTCCATCACT TGCAGTGTCT CTGGGTTTTC      60
ATTAACCAGC TATAGTGTAC ACTGGGTTCG CCAGCCTCCA GGAAAGGGTC TGGAGTGGCT      120
GGGAGTAATA TGGGCTAGTG GAGGCACAGA TTATAATTCT GCTCTCATGT CCAGACTGAG      180
CATCAGCAAA GACAACTCCA AGAGCCAAGT TTTCTTAAAA CTGAACAGTC TGCAAACTGA      240
TGACACAGCC ATGTACTACT GTGCCAGAGA TCCCCCTTCT TCCTTACTAC GGCTTGACTA      300
CTGGGGCCAA GGCACCACTC TCACAGTCTC CTCA                                     334

```

5

(2) Informace pro SEQ ID NO: 2:

- 10 (i) Charakteristiky sekvence:
- (A) Délka: 315 párů bází
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Řetězec: jednoduchý
 - (D) Topologie: lineární
- 15 (ii) Typ molekuly: DNA (genomová)
- (ix) Vlastnosti:
- (A) Jméno/klíč: misc_charakter
 - (B) Umístění: 1...315
- 20 (D) Jiné informace: /upozornění= „první báze koresponduje pozici 25 podle Kabat“

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 2:

```

TCCTCCCTGA GTGTGTCAGC AGGAGAGAAG GTCAGTATGA GCTGCAAGTC CAGTCAGAGT      60
CTGTTAAACA GTGGAAATCA AAAGAACTAC TTGGCCTGGT ACCAGCAGAA ACCAGGGCAG      120
CCTCCTAAAC TTTTGATCTA CGGGGCATCC ACTAGGGAAT CTGGGGTCCC TGATCGCTTC      180
ACAGGCAGTG GATCTGGAAC CGATTTCACT CTTTCCATCA GCAGTGTGCA GGCTGAAGAC      240
CTGGCAGTTT ATTACTGTCA GAATGTTTCA AGTTTTCAT TCACGTTCCG CTCGGGGACA      300
GAGTTGGAAA TAAAAA                                     315

```

25

(2) Informace pro SEQ ID NO: 3:

- 5 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 334 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární
- 10 (ii) Typ molekuly: DNA (genomová)
- (ix) Vlastnosti:
 (A) Jméno/klíč: misc_charakter
 (B) Umístění: 1...334
 15 (D) Jiné informace: /upozornění= „první báze koresponduje pozici 24 podle Kabat“

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 3:

```

ACCTGGCCTG GTGGCGCCCT CACAGAGCCT GTCCATCACT TGCAGTGTCT CTGGGTTTTC      60
ATTAACCAGT TATAGTGTAC ACTGGGTTTCG CCAGCCTCCA GGAAAGGGTC TGGAGTGGCT      120
GGGAGTAATA TGGGCTAGTG GAGGCACAGA TTATAATTTCG GCTCTCATGT CCAGACTGAG      180
CATCAGCAAA GACAACTCCA AGAGCCAAGT TTTCTTAAAA CTGAACAGTC TGCGAAGTGA      240
TGACACAGCC ATGTACTACT GTGCCAGAGA TCCCCCTTCT TCCTTACTAC GGCTTGACTA      300
CTGGGGCCAA GGCACCACTC TCACAGTCTC CTCA                                     334

```

20

(2) Informace pro SEQ ID NO: 4:

- 25 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 315 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární
- 30 (ii) Typ molekuly: DNA (genomová)
- (ix) Vlastnosti:
 (A) Jméno/klíč: misc_charakter
 (B) Umístění: 1...315
 35 (D) Jiné informace: /upozornění= „první báze koresponduje pozici 25 podle Kabat“

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 4:

```

TCCTCCCTGA GTGTGTCAGC AGGAGAGAAG GTCACATATGA GCTGCAAGTC CAGTCAGAGT      60
CTATTAAACA GTGGAAATCA AAAGAACTAC TTGGCCTGGT ACCAACAGAA ACCAGGGCAG      120
CCTCCTAAAC TTTTGATCTA CGGGGCATCC ACTAGGGAAT CTGGGGTCCC TGATCGCTTC      180
ACAGGCAGTG GATCTGGAAC CGATTTCCT CTTACCATCA GCAGTGTGCA GGCTGAAGAC      240
CTGGCAGTTT ATTACTGTCA GAATGATCAT AGTTTTCAT TCACGTTCCG CTCGGGGACA      300
GAGTTGGAAA TAAAAA                                     315

```

5 (2) Informace pro SEQ ID NO: 5:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 334 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

(ix) Vlastnosti:

- (A) Jméno/klíč: misc_charakter
 (B) Umístění: 1...334
 (D) Jiné informace: /upozornění= „první báze koresponduje pozici 24 podle Kabat“

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 5:

```

ACCTGGCCTG GTGGCGCCCT CACAGAGCCT GTCCATCACT TGCAGTGTCT CTGGGTTTTTC      60
ATTAACCAGC TATAGTGATC ACTGGGTTTCG CCAGCCTCCA GGAAAGGGTC TGGAGTGGCT      120
GGGAGTAATC TGGGCTAGTG GAGGCACAGA TTATAATTCG GCTCTCATGT CCAGACTGAG      180
CATCAGCAAA GACAACTCCA AGAGCCAAGT TTTCTTAAAA CTGAACAGTC TGCAAACTGA      240
TGACGCAGCC ATGTACTACT GTGCCAGAGA TCCCCCTTTT TCCTTACTAC GGCTTGACTT      300
CTGGGGCCAA GGCACCACTC TCACAGTCTC CTCA                                     334

```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 6:

- 5 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 315 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární
- 10 (ii) Typ molekuly: DNA (genomová)
- (ix) Vlastnosti:
 (A) Jméno/klíč: misc_charakter
 (B) Umístění: 1...315
 15 (D) Jiné informace: /upozornění= „první báze koresponduje pozici 25 podle Kabat“

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 6:

TCCTCTCTGA GTGTGTCAGC AGGAGAGAAG GTCACATATGA GCTGCAAGTC CAGTCAGAGT 60

CTGTTAAACA GTGGAAATCA AAAAAACTAC TTGGCCTGGT ACCAGCAGAA ACCAGGGCAG 120

CCTCCTAAAC TTTTGATCTA CGGGGCATCC ACTAGGGAAT CTGGGGTCCC TGATCGCTTC 180

ACAGGCAGTG GATCTGGAAC CGATTTCACCT CTTACCATCA GCAGTGTGCA GGCTGAAGAC 240

CTGGCAGTTT ATTACTGTCA GAATGATCAT AGTTTTCCAT TCACGTTTCGG CTCGGGGACA 300

GAGTTGGAAA TAAAA 315

20

(2) Informace pro SEQ ID NO: 7:

- 25 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 5 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární
- 30 (ii) Typ molekuly: protein
- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 7:
- Ser Tyr Ser Val His**
- 1 5**

(2) Informace pro SEQ ID NO: 8:

- (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 16 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 8:

Val Ile Trp Ala Ser Gly Gly Trp Asp Tyr Asn Ser Ala Leu
 1 5 10
 Met Ser
 15

(2) Informace pro SEQ ID NO: 9:

- (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 11 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 9:

Asp Pro Pro Ser Ser Leu Leu Arg Leu Asp Tyr
 1 5 10

(2) Informace pro SEQ ID NO: 10:

- (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 17 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 10:

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn
 1 5 10
 Tyr Leu Ala
 15

(2) Informace pro SEQ ID NO: 11:

- (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 7 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 11:

Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

(2) Informace pro SEQ ID NO: 12:

- (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 9 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 12:

Gln Asn Val His Ser Phe Pro Phe Thr
 1 5

(2) Informace pro SEQ ID NO: 13:

- (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 9 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 13:

Gln Asn Asp His Ser Phe Pro Phe Thr
 1 5

(2) Informace pro SEQ ID NO: 14:

- (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 11 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina

(C) Řetězec: jednoduchý

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

5

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 14:

Asp Pro Pro Phe Ser Leu Leu Arg Leu Asp Phe
 1 5 10

10

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 15:

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
 20 25 30

Ser Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

Gly Val Ile Trp Ala Ser Gly Gly Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Met
 50 55 60

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

Lys Leu Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Asp Pro Pro Ser Ser Leu Leu Arg Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

(2) Informace pro SEQ ID NO: 16:

15

- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 113 aminokyselin
 - (B) Typ: aminokyselina

(C) Řetězec: jednoduchý

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

5

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 16:

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser
 65 70 75 80

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

Val His Ser Phe Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Glu Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys

10 (2) Informace pro SEQ ID NO: 17:

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 60 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

15

(C) Řetězec: jednoduchý

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

20

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 17:

ATGGTGTTC AGACCCAGGT CTCATTTCT CTGTTGCTCT GGATCTCTGG
 TGCCTACGGG 60

(2) Informace pro SEQ ID NO: 18:

- 5 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 357 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární
- 10 (ii) Typ molekuly: DNA (genomová)
- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 18:

```

CAGGTTACCC TGCCTGAATC CGGTCCGGCA CTAGTTAAAC CGACCCAGAC CCTGACGTTA      60
ACCTGCACCG TCTCCGGTTT CTCCCTGACG AGCTATAGTG TACACTGGGT CCGTCAGCCG      120
CCGGGTAAAG GTCTAGAATG GCTGGGTGTA ATATGGGCTA GTGGAGGCAC AGATTATAAT      180
TCGGCTCTCA TGTCCCGTCT GTCGATATCC AAAGACACCT CCCGTAACCA GGTGTTCTG      240
ACCATGACTA ACATGGACCC GGTGACACC GCTACCTACT ACTGCGCTCG AGATCCCCCT      300
TCTTCCTTAC TACGGCTTGA CTACTGGGGT CGTGGTACCC CAGTTACCGT GAGCTCA      357

```

15

(2) Informace pro SEQ ID NO: 19:

- 20 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 119 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární
- (ii) Typ molekuly: protein
- 25 (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 19:

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

(2) Informace pro SEQ ID NO: 20:

5

- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 339 párů bází
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Řetězec: jednoduchý
 - (D) Topologie: lineární

10

- (ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 20:

GATATCGTGA TGACCCAGTC TCCAGACTCG CTAGCTGTGT CTCGGGGCGA GAGGGCCACC	60
ATCAACTGCA AGAGCTCTCA GAGTCTGTTA AACAGTGGAA ATCAAAAGAA CTACTTGGCC	120
TGGTATCAGC AGAAACCCGG GCAGCCTCCT AAGTTGCTCA TTTACGGGGC GTCGACTAGG	180
GAATCTGGGG TACCTGACCG ATTCACTGGC AGCGGGTCTG GGACAGATTT CACTCTCACC	240
ATCAGCAGCC TGCAGGCTGA AGATGTGGCA GTATACTACT GTCAGAATGT TCATAGTTTT	300
CCATTCACGT TCGGCGGAGG GACCAAGTTG GAGATCAAA	339

(2) Informace pro SEQ ID NO: 21:

5

- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 113 aminokyselin
 - (B) Typ: aminokyselina
 - (C) Řetězec: jednoduchý
 - (D) Topologie: lineární

10

- (ii) Typ molekuly: protein

- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 21:

5

- 10

15

20

- 25

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 23:

GGACAGGGCT TACTAGTGGG CCCTCTGGGC TC

32

5

(2) Informace pro SEQ ID NO: 24:

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 23 párů bází

10

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Řetězec: jednoduchý

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

15

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 24:

AGGTSMARCT KTCTCGAGTC WGG

23

20

(2) Informace pro SEQ ID NO: 25:

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 36 párů bází

25

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Řetězec: jednoduchý

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

30

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 25:

CTAACACTCA TTCCTGTTGA AGCTCTTGAC AATGGG

36

35

(2) Informace pro SEQ ID NO: 26:

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 32 párů bází

40

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Řetězec: jednoduchý

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 26:

CCAGATGTGA GCTCGTGATG ACCCAGACTC CA

32

45

(2) Informace pro SEQ ID NO: 27:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 140 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 27:

```

AACCTGCACC GTCTCCGGTT TCTCCCTGAC GAGCTATAGT GTACACTGGG TCCGTCAGCC      60
GCCGGGTAAA GGTCTAGAAT GGCTGGGTGT AATATGGGCT AGTGGAGGCA CAGATTATAA      120
TTCGGCTCTC ATGTCCCGTC                                                    140

```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 28:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 149 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 28:

```

ATATCGACAG ACGGGACATG AGAGCCGAAT TATAATCTGT GCCTCCACTA GCCCATATTA      60
CACCCAGCCA TTCTAGACCT TTACCCGGCG GCTGACGGAC CCAGTGTACA CTATAGCTCG      120
TCAGGGAGAA ACCGGAGACG GTGCAGGTT                                          149

```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 29:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 139 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 29:

TGTCGATATC CAAAGACACC TCCCGTAACC AGGTTGTTCT GACCATGACT AACATGGACC 60

CGGTTGACAC CGCTACCTAC TACTGCGCTC GAGATCCCCC TTCTTCCTTA CTACGGCTTG 120

ACTACTGGGG TCGTGGTAC 139

(2) Informace pro SEQ ID NO: 30:

5

- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 126 párů bází
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Řetězec: jednoduchý
 - (D) Topologie: lineární

10

- (ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 30:

CACGACCCCA GTAGTCAAGC CGTAGTAAGG AAGAAGGGGG ATCTCGAGCG CAGTAGTAGG 60

TAGCGGTGTC AACCGGGTCC ATGTTAGTCA TGGTCAGAAC AACCTGGTTA CGGGAGGTGT 120

CTTTGG 126

15

(2) Informace pro SEQ ID NO: 31:

20

- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 117 párů bází
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Řetězec: jednoduchý
 - (D) Topologie: lineární

25

- (ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 31:

CTCAGAGTCT GTTAAACAGT GGAAATCAAA AGAACTACTT GGCCTGGTAT CAGCAGAAAC 60

CCGGGCAGCC TCCTAAGTTG CTCATTTACG GGGCGTCGAC TAGGGAATCT GGGGTAC 117

30

(2) Informace pro SEQ ID NO: 32:

35

- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 117 párů bází
 - (B) Typ: nukleová kyselina

- (C) Řetězec: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

5

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 32:

CCCAGATTCC CTAGTCGACG CCCCGTAAAT GAGCAACTTA GGAGGCTGCC CGGGTTTCTG 60

CTGATACCAG GCCAAGTAGT TCTTTTGATT TCCACTGTTT AACAGACTCT GAGAGCT 117

10 (2) Informace pro SEQ ID NO: 33:

- (i) Charakteristiky sekvence:
(A) Délka: 102 párů bází
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Řetězec: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

15

(ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

20

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 33:

GCTGAAGATG TGGCACTATA CTACTGTCAG AATGTTTCATA GTTTTCCATT CACGTTTCGGC 60

GGAGGGACCA AGTTGGAGAT CAAACGTACT GTGGCGGCGC CA 102

(2) Informace pro SEQ ID NO: 34:

25

- (i) Charakteristiky sekvence:
(A) Délka: 111 párů bází
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Řetězec: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

30

(ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 34:

AGCTTGCGCG CGCCACAGTA CGTTTGATCT CCAACTTGGT CCCTCCGCCG AACGTGAATG 60

GAAAACTATG AACATTCTGA CAGTAGTATA CTGCCACATC TTCAGCCTGC A 111

35

(2) Informace pro SEQ ID NO: 35:

40

- (i) Charakteristiky sekvence:
(A) Délka: 82 párů bází
(B) Typ: nukleová kyselina

- (C) Řetězec: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 35:

ATGGTGTTGC AGACCCAGGT CTTCAATTCT CTGTTGCTCT GGATCTCTGG TGCCTACGGG 60

CAGGTTCAAC TGAAAGAGTC AG 82

(2) Informace pro SEQ ID NO: 36:

- (i) Charakteristiky sekvence:
(A) Délka: 89 párů bází
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Řetězec: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 36:

GTCCTGACTC TTTCAGTTGA ACCTGCCCCG AGGCACCAGA GATCCAGAGC AACAGAGAAA 60

TGAAGACCTG GGTCTGCAAC ACCATGTTG 89

(2) Informace pro SEQ ID NO: 37:

- (i) Charakteristiky sekvence:
(A) Délka: 45 párů bází
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Řetězec: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 37:

CAAGGCACCA CTCTCACAGT CTCCTCAGCT AGTACGAAGG GCCCA 45

(2) Informace pro SEQ ID NO: 38:

- (i) Charakteristiky sekvence:
(A) Délka: 43 párů bází
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Řetězec: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 38:

AGCTTGGGCC CTTCGTACTA GCTGAGGAGA CTGTGAGTGG TGC 43

5

(2) Informace pro SEQ ID NO: 39:

(i) Charakteristiky sekvence:

10

(A) Délka: 28 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Řetězec: jednoduchý

(D) Topologie: lineární

15

(ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 39:

ATCGTGATGA CCCAGTCTCC ATCCTCCC 28

20

(2) Informace pro SEQ ID NO: 40:

(i) Charakteristiky sekvence:

25

(A) Délka: 31 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Řetězec: jednoduchý

(D) Topologie: lineární

30

(ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 40:

TCAGGGAGGA TGGAGACTGG GTCATCACGA T 31

35

(2) Informace pro SEQ ID NO: 41:

(i) Charakteristiky sekvence:

40

(A) Délka: 43 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Řetězec: jednoduchý

(D) Topologie: lineární

45

(ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 41:

TCGGGGGACA GAGTTGGAAT TAAAACGTAC TGTGGCGGCG CCA 43

(2) Informace pro SEQ ID NO: 42:

- 5 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 42 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární
- 10 (ii) Typ molekuly: DNA (genomová)
- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 42:

AGCTTGGCGC CGCCACAGTA CGTTTTATTT CCAACTCTGT CC 42

15

(2) Informace pro SEQ ID NO: 43:

- 20 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 26 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární
- (ii) Typ molekuly: DNA (genomová)
- 25 (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 43:

CTAGCCACCA CCACCACCAC CACTAA 26

30 (2) Informace pro SEQ ID NO: 44:

- 35 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 26 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární
- (ii) Typ molekuly: DNA (genomová)
- 40 (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 44:

CTAGTTAGTG GTGGTGGTGG TGGTGG 26

(2) Informace pro SEQ ID NO: 45:

45

- (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 113 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 50 (D) Topologie: lineární
- (ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 45:

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

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

Asp His Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

5

(2) Informace pro SEQ ID NO: 46:

- 10 (i) Charakteristiky sekvence:
(A) Délka: 113 aminokyselin
(B) Typ: aminokyselina
(C) Řetězec: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

- 15 (ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 46:

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

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

Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys

(2) Informace pro SEQ ID NO: 47:

5

- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 9 aminokyselin
 - (B) Typ: aminokyselina
 - (C) Řetězec: jednoduchý
 - (D) Topologie: lineární

10

- (ii) Typ molekuly: protein

- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 47:

Gln Asn Asp His Ser Tyr Pro Phe Thr
 1 5

15

(2) Informace pro SEQ ID NO: 48:

20

- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 9 aminokyselin

- (B) Typ: aminokyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

5 (ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 48:

Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr
1 5

10

(2) Informace pro SEQ ID NO: 49:

- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 6285 párů bází
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Řetězec: dvojitý
 - (D) Topologie: cirkulární

15

(iii) Typ molekuly: DNA (genomová)

20

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 49:

GACGTCGCGG CCGCTCTAGG CCTCCAAAAA AGCCTCCTCA CTACTTCTGG AATAGCTCAG	60
AGGCCGAGGC GGCCTCGGCC TCTGCATAAA TAAAAAAAT TAGTCAGCCA TGCATGGGGC	120
GGAGAATGGG CGGAAGTGGG CGGAGTTAGG GCGGGGATGG GCGGAGTTAG GGGCGGGACT	180
ATGGTTGCTG ACTAATTGAG ATGCATGCTT TGCATACTTC TGCCTGCTGG GGAGCCTGGG	240
GACTTTCCAC ACCTGGTTGC TGACTAATTG AGATGCATGC TTTGCATACT TCTGCCTGCT	300
GGGGAGCCTG GGGACTTTCC ACACCCTAAC TGACACACAT TCCACAGAAT TAATCCCCGG	360
GGATCGATCC GTCGACGTAC GACTAGTTAT TAATAGTAAT CAATTACGGG GTCATTAGTT	420
CATAGCCCAT ATATGGAGTT CCGCGTTACA TAACTTACGG TAAATGGCCC GCCTGGCTGA	480
CCGCCCCAAG ACCCCCCGCC ATTGACGTCA ATAATGACGT ATGTTCCCAT AGTAACGCCA	540
ATAGGGACTT TCCATTGACG TCAATGGGTG GACTATTTAC GTTAAACTGC CCACTTGGCA	600
GTACATCAAG TGTATCATAT GCCAAGTACG CCCCCTATTG ACGTCAATGA CGGTAAATGG	660
CCCGCCTGGC ATTATGCCCA GTACATGACC TTATGGGACT TTCCTACTTG GCAGTACATC	720
TACGTATTAG TCATCGCTAT TACCATGGTG ATGCGGTTTT GGCAGTACAT CAATGGGCGT	780

GGATAGCGGT TTGACTCAGG GGGATTTCCA AGTCTCCACC CCATTGACGT CAATGGGAGT	840
TTGTTTTGGC ACCAAAATCA ACGGGACTTT CCAAAATGTC GTAACAACTC CGCCCCATTG	900
ACGCAAATGG GCGGTAGGCG TGTACGGTGG GAGGTCTATA TAAGCAGAGC TGGGTACGTG	960
AACCGTCAGA TCGCCTGGAG ACGCCATCGA ATTGAGGAC GCCAGCAACA TGGTGTGCA	1020
GACCCAGGTC TTCATTTCTC TGTGCTCTG GATCTCTGGT GCCTACGGGC AGGTTACCTT	1080
GCGTGAATCC GGTCCGGCAC TAGTTAAACC GACCCAGACC CTGACGTTAA CCTGCACCGT	1140
CTCCGGTTTC TCCCTGACGA GCTATAGTGT AACTGGGTC CGTCAGCCGC CGGGTAAAGG	1200
TCTAGAATGG CTGGGTGTAA TATGGGCTAG TGGAGGCACA GATTATAATT CGGCTCTCAT	1260
GTCCCGTCTG TCGATATCCA AAGACACCTC CCGTAACCAG GTTGTCTGA CCATGACTAA	1320
CATGGACCCG GTTGACACCG CTACCTACTA CTGCGCTCGA GATCCCCCTT CTTCCCTTACT	1380
ACGGCTTGAC TACTGGGGTC GTGGTACCCC AGTTACCGTG AGCTCAGCTA GTACCAAGGG	1440
CCCATCGGTC TTCCCCCTGG CACCCTCCTC CAAGAGCACC TCTGGGGGCA CAGCGGCCCT	1500
GGGCTGCCTG GTCAAGGACT ACTTCCCCGA ACCGGTGACG GTGTCGTGGA ACTCAGGCGC	1560
CCTGACCAGC GCGGTGCACA CCTTCCCGGC TGTCTACAG TCCTCAGGAC TCTACTCCCT	1620
CAGCAGCGTG GTGACCGTGC CCTCCAGCAG CTTGGGCACC CAGACCTACA TCTGCAACGT	1680
GAATCACAAG CCCAGCAACA CCAAGGTGGA CAAGAGAGTT GAGCCCCAAT CTTGTGACAA	1740
AACTCACACA TGCCCACCGT GCCCAGCACC TGAACCTCTG GGGGGACCGT CAGTCTTCCT	1800
CTTCCCCCCA AAACCCAAGG ACACCCTCAT GATCTCCCGG ACCCCTGAGG TCACATGCGT	1860
GGTGGTGGAC GTGAGCCACG AAGACCCTGA GGTCAAGTTC AACTGGTACC TGGACGGCGT	1920

GGAGGTGCAT AATGCCAAGA CAAAGCCGCG GGAGGAGCAG TACAACAGCA CGTACCGTGT	1980
GGTCAGCGTC CTCACCGTCC TGCACCAGGA CTGGCTGAAT GGCAAGGAGT ACAAGTGCAA	2040
GGTCTCCAAC AAAGCCCTCC CAGCCCCCAT CGAGAAAACC ATCTCCAAAG CCAAAGGGCA	2100
GCCCCGAGAA CCACAGGTGT ACACCCTGCC CCCATCCCGG GAGGAGATGA CCAAGAACCA	2160
GGTCAGCCTG ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT CTATCCCAGC GACATCGCCG TGGAGTGGGA	2220
GAGCAATGGG CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCACGCCT CCCGTGCTGG ACTCCGACGG	2280
CTCCTTCTTC CTCTATAGCA AGCTCACCCT GGACAAGAGC AGGTGGCAGC AGGGGAACGT	2340
CTTCTCATGC TCCGTGATGC ATGAGGCTCT GCACAACCAC TACACGCAGA AGAGCCTCTC	2400
CCTGTCTCCG GGTAAGTGAG TGTAGTCTAG ATCTACGTAT GATCAGCCTC GACTGTGCCT	2460
TCTAGTTGCC AGCCATCTGT TGTTTGCCCC TCCCCCGTGC CTTCTTGAC CTTGGAAGGT	2520
GCCACTCCCA CTGTCCTTTC CTAATAAAAT GAGGAAATTG CATCGCATTG TCTGAGTAGG	2580
TGTCATTCTA TTCTGGGGGG TGGGGTGGGG CAGGACAGCA AGGGGGAGGA TTGGGAAGAC	2640
AATAGCAGGC ATGCTGGGGA TGCGGTGGGC TCTATGGAAC CAGCTGGGGC TCGACAGCGC	2700
TGGATCTCCC GATCCCCAGC TTGCTTCTC AATTTCTTAT TTGCATAATG AGAAAAAAG	2760
GAAAAATTAAT TTAAACACCA ATTCAGTAGT TGATTGAGCA AATGCGTTGC CAAAAAGGAT	2820
GCTTTAGAGA CAGTGTCTC TGCACAGATA AGGACAAACA TTATTCAGAG GGAGTACCCA	2880
GAGCTGAGAC TCCTAAGCCA GTGAGTGGCA CAGCATCTA GGGAGAAATA TGCTTGTCAT	2940
CACCGAAGCC TGATTCCGTA GAGCCACACC TTGGTAAGGG CCAATCTGCT CACACAGGAT	3000

AGAGAGGGCA GGAGCCAGGG CAGAGCATAT AAGGTGAGGT AGGATCAGTT GCTCCTCACA	3060
TTTGCTTCTG ACATAGTTGT GTTGGGAGCT TGGATAGCTT GGACAGCTCA GGGCTGCGAT	3120
TTCGCGCCAA ACTTGACGGC AATCCTAGCG TGAAGGCTGG TAGGATTTTA TCCCCGCTGC	3180
CATCATGGTT CGACCATTGA ACTGCATCGT CGCCGTGTCC CAAAATATGG GGATTGGCAA	3240
GAACGGAGAC CTACCCTGGC CTCGCTCAG GAACGAGTTC AAGTACTTCC AAAGAATGAC	3300
CACAACCTCT TCAGTGAAG GTAAACAGAA TCTGGTGATT ATGGGTAGGA AAACCTGGTT	3360
CTCCATTCTT GAGAAGAATC GACCTTTAAA GGACAGAATT AATATAGTTC TCAGTAGAGA	3420
ACTCAAAGAA CCACCACGAG GAGCTCATTT TCTTGCCAAA AGTTTGATG ATGCCTTAAG	3480
ACTTATTGAA CAACCGGAAT TGGCAAGTAA AGTAGACATG GTTTGGATAG TCGGAGGCAG	3540
TTCTGTTTAC CAGGAAGCCA TGAATCAACC AGGCCACCTT AGACTCTTTG TGACAAGGAT	3600
CATGCAGGAA TTTGAAAGTG ACACGTTTTT CCCAGAAATT GATTGGGGA AATATAAACT	3660
TCTCCCAGAA TACCCAGGCG TCCTCTCTGA GGTCCAGGAG GAAAAAGGCA TCAAGTATAA	3720
GTTTGAAGTC TACGAGAAGA AAGACTAACA GGAAGATGCT TTCAAGTTCT CTGCTCCCCT	3780
CCTAAAGCTA TGCATTTTTA TAAGACCATG GGACTTTTGC TGGCTTTAGA TCAGCCTCGA	3840
CTGTGCCTTC TAGTTGCCAG CCATCTGTTG TTTGCCCCCT CCCCCTGCCT TCCTTGACCC	3900
TGGAAGGTGC CACTCCCACT GTCCTTTCCT AATAAAATGA GGAAATTGCA TCGCATTGTC	3960
TGAGTAGGTG TCATTCTATT CTGGGGGGTG GGGTGGGGCA GGACAGCAAG GGGGAGGATT	4020
GGGAAGACAA TAGCAGGCAT GCTGGGGATG CGGTGGGCTC TATGGAACCA GCTGGGGCTC	4080
GATCGAGTGT ATGACTGCGG CCGCGATCCC GTCGAGAGCT TGGCGTAATC ATGGTCATAG	4140

CTGTTTCCTG TGTGAAATTG TTATCCGCTC ACAATTCCAC ACAACATACG AGCCGGAAGC	4200
ATAAAGTGTA AAGCCTGGGG TGCCTAATGA GTGAGCTAAC TCACATTAAT TGCCTTGCGC	4260
TCACTGCCCCG CTTTCCAGTC GGGAAACCTG TCGTGCCAGC TGCATTAATG AATCGGCCAA	4320
CGCGCGGGGA GAGGCGGTTT GCGTATTGGG CGCTCTTCCG CTTCCCTCGCT CACTGACTCG	4380
CTGCGCTCGG TCGTTCGGCT GCGGCGAGCG GTATCAGCTC ACTCAAAGGC GGTAATACGG	4440
TTATCCACAG AATCAGGGGA TAACGCAGGA AAGAACATGT GAGCAAAGG CCAGCAAAG	4500
GCCAGGAACC GTAAAAGGC CGCGTTGCTG GCGTTTTTCC ATAGGCTCCG CCCCCCTGAC	4560
GAGCATCACA AAAATCGACG CTCAGTCAG AGGTGGCGAA ACCCGACAGG ACTATAAAGA	4620
TACCAGGCGT TTCCCCCTGG AAGCTCCCTC GTGCGCTCTC CTGTTCCGAC CCTGCCGCTT	4680
ACCGGATACC TGTCCGCCTT TCTCCCTTCG GGAAGCGTGG CGCTTCTCA ATGCTCACGC	4740
TGTAGGTATC TCAGTTCGGT GTAGGTCGTT CGCTCCAAGC TGGGCTGTGT GCACGAACCC	4800
CCCGTTCAGC CCGACCGCTG CGCCTTATCC GGTAACATC GTCTTGAGTC CAACCCGGTA	4860
AGACACGACT TATCGCCACT GGCAGCAGCC ACTGGTAACA GGATTAGCAG AGCGAGGTAT	4920
GTAGGCGGTG CTACAGAGTT CTTGAAGTGG TGGCCTAACT ACGGCTACAC TAGAAGGACA	4980
GTATTTGGTA TCTGCGCTCT GCTGAAGCCA GTTACCTTCG GAAAAAGAGT TGGTAGCTCT	5040
TGATCCGGCA AACAAACCAC CGCTGGTAGC GGTGGTTTTT TTGTTTGCAA GCAGCAGATT	5100
ACGCGCAGAA AAAAAGGATC TCAAGAAGAT CCTTTGATCT TTTCTACGGG GTCTGACGCT	5160
CAGTGGAACG AAAACTCAGC TTAAGGGATT TTGGTCATGA GATTATCAA AAGGATCTTC	5220

ACCTAGATCC TTTTAAATTA AAAATGAAGT TTAAATCAA TCTAAAGTAT ATATGAGTAA	5280
ACTTGGTCTG ACAGTTACCA ATGCTTAATC AGTGAGGCAC CTATCTCAGC GATCTGTCTA	5340
TTTCGTTTCAAT CCATAGTTGC CTGACTCCCC GTCGTGTAGA TAACTACGAT ACGGGAGGGC	5400
TTACCATCTG GCCCCAGTGC TGCAATGATA CCGCGAGACC CACGCTCACC GGCTCCAGAT	5460
TTATCAGCAA TAAACCAGCC AGCCGGAAGG GCCGAGCGCA GAAGTGGTCC TGCAACTTTA	5520
TCCGCCTCCA TCCAGTCTAT TAATTGTTGC CGGGAAGCTA GAGTAAGTAG TTCGCCAGTT	5580
AATAGTTTGC GCAACGTTGT TGCCATTGCT ACAGGCATCG TGGTGTACG CTCGTCTGTTT	5640
GGTATGGCTT CATTGAGCTC CGGTTCCCAA CGATCAAGGC GAGTTACATG ATCCCCCATG	5700
TTGTGCAAAA AAGCGTTAG CTCCTTCGGT CCTCCGATCG TTGTCAGAAG TAAGTTGGCC	5760
GCAGTGTTAT CACTCATGGT TATGGCAGCA CTGCATAATT CTCTTACTGT CATGCCATCC	5820
GTAAGATGCT TTTCTGTGAC TGGTGAGTAC TCAACCAAGT CATTCTGAGA ATAGTGTATG	5880
CGGCGACCGA GTTGCTCTTG CCCGGCGTCA ATACGGGATA ATACCGCGCC ACATAGCAGA	5940
ACTTTAAAAG TGCTCATCAT TGGAAAACGT TCTTCGGGGC GAAAACTCTC AAGGATCTTA	6000
CCGCTGTTGA GATCCAGTTC GATGTAACCC ACTCGTGAC CCAACTGATC TTCAGCATCT	6060
TTTACTTTCA CCAGCGTTTC TGGGTGAGCA AAAACAGGAA GGCAAAATGC CGCAAAAAG	6120
GGAATAAGGG CGACACGGAA ATGTTGAATA CTCATACTCT TCCTTTTTC AATTATTGA	6180
AGCATTTATC AGGGTTATTG TCTCATGAGC GGATACATAT TTGAATGTAT TTAGAAAAAT	6240
AAACAAATAG GGGTCCCGG CACATTTCCC CGAAAAGTGC CACCT	6285

(2) Informace pro SEQ ID NO: 50:

5

- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 5703 párů bází
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Řetězec: dvojitý
 - (D) Topologie: cirkulární

10

(ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 50:

5

GACGTCGCGG CCGCTCTAGG CCTCCAAAAA AGCCTCCTCA CTACTTCTGG AATAGCTCAG	60
AGGCCGAGGC GGCCTCGGCC TCTGCATAAA TAAAAAAAT TAGTCAGCCA TGCATGGGGC	120
GGAGAATGGG CGGAACTGGG CGGAGTTAGG GGCGGGATGG GCGGAGTTAG GGGCGGGACT	180
ATGGTTGCTG ACTAATTGAG ATGCATGCTT TGCATACTTC TGCCTGCTGG GGAGCCTGGG	240
GACTTTCAC ACCTGGTTGC TGACTAATTG AGATGCATGC TTTGCATACT TCTGCCTGCT	300
GGGGAGCCTG GGGACTTTC ACACCCTAAC TGACACACAT TCCACAGAAT TAATCCCCGG	360
GGATCGATCC GTCGACGTAC GACTAGTTAT TAATAGTAAT CAATTACGGG GTCATTAGTT	420
CATAGCCCAT ATATGGAGTT CCGCGTTACA TAACTTACGG TAAATGGCCC GCCTGGCTGA	480
CCGCCCCAAG ACCCCCCGCC ATTGACGTCA ATAATGACGT ATGTTCCCAT AGTAACGCCA	540
ATAGGGACTT TCCATTGACG TCAATGGGTG GACTATTTAC GGTAAACTGC CCACTTGGCA	600
GTACATCAAG TGTATCATAT GCCAAGTACG CCCCCTATTG ACGTCAATGA CGGTAAATGG	660
CCCCGCTGGC ATTATGCCCC GTACATGACC TTATGGGACT TTCCTACTTG GCAGTACATC	720

TACGTATTAG TCATCGCTAT TACCATGGTG ATGCGGTTTT GGCAGTACAT CAATGGGCGT	780
GGATAGCGGT TTGACTCAGG GGGATTTCCT AGTCTCCACC CCATTGACGT CAATGGGAGT	840
TTGTTTTGGC ACCAAAATCA ACGGGACTTT CCAAAATGTC GTAACAACCT CGCCCCATTG	900
ACGCAAATGG GCGGTAGGCG TGTACGGTGG GAGGTCTATA TAAGCAGAGC TGGGTACGTG	960
AACCGTCAGA TCGCCTGGAG ACGCCATCGA ATTCATTGAT AGGATCCAGC AAGATGGTGT	1020
TGCAGACCCA GGTCTTCATT TCTCTGTTGC TCTGGATCTC TGGTGCCTAC GGGGATATCG	1080
TGATGACCCA GTCTCCAGAC TCGCTAGCTG TGTCTCTGGG CGAGAGGGCC ACCATCAACT	1140
GCAAGAGCTC TCAGAGTCTG TTAAACAGTG GAAATCAAAA GAACTACTTG GCCTGGTATC	1200
AGCAGAAACC CGGGCAGCCT CTAAGTTGC TCATTTACGG GGCCTCGACT AGGGAATCTG	1260
GGGTACCTGA CCGATTCACT GGCAGCGGGT CTGGGACAGA TTCTACTCTC ACCATCAGCA	1320
GCCTGCAGGC TGAAGATGTG GCAGTATACT ACTGTCAGAA TGTTCATAGT TTTCCATTCA	1380
CGTTCGGCGG AGGGACCAAG TTGGAGATCA AACGTACTGT GCGGGCGCCA TCTGTCTTCA	1440
TCTTCCCGCC ATCTGATGAG CAGTTGAAAT CTGGAAGTGC CTCTGTTGTG TGCTGCTGA	1500
ATAACTTCTA TCCCAGAGAG GCCAAAGTAC AGTGAAGGT GGATAACGCC CTCCAATCGG	1560
GTAACCTCCA GGAGAGTGTC ACAGAGCAGG ACAGCAAGGA CAGCACCTAC AGCCTCAGCA	1620
GCACCCTGAC GCTGAGCAAA GCAGACTACG AGAAACACAA AGTCTACGCC TGCGAAGTCA	1680
CCCATCAGGG CCTGAGCTCG CCCGTCACAA AGAGCTTCAA CAGGGGAGAG TGTAAATTCT	1740
AGATCCGTTA TCTACGTATG ATCAGCCTCG ACTGTGCCTT CTAGTTGCCA GCCATCTGTT	1800
GTTTGCCCCC CCCCCGTGCC TTCCTTGACC CTGGAAGGTG CCACTCCAC TGTCCTTTCC	1860

TAATAAAATG AGGAAATTGC ATCGCATTGT CTGAGTAGGT GTCATTCTAT TCTGGGGGGT	1920
GGGGTGGGGC AGGACAGCAA GGGGAGGAT TGGGAAGACA ATAGCAGCCA TGCTGGGGAT	1980
GCGGTGGGCT CTATGGAACC AGCTGGGGCT CGACAGCTCG AGCTAGCTTT GCTTCTCAAT	2040
TTCTTATTTG CATAATGAGA AAAAAAGGAA AATTAATTTT AACACCAATT CAGTAGTTGA	2100
TTGAGCAAAT GCGTTGCCAA AAAGGATGCT TTAGAGACAG TGTTCCTGTC ACAGATAAGG	2160
ACAAACATTA TTCAGAGGGA GTACCCAGAG CTGAGACTCC TAAGCCAGTG AGTGGCACAG	2220
CATTCTAGGG AGAAATATGC TTGTCATCAC CGAAGCCTGA TTCCGTAGAG CCACACCTTG	2280
GTAAGGGCCA ATCTGCTCAC ACAGGATAGA GAGGGCAGGA GCCAGGGCAG AGCATATAAG	2340
GTGAGGTAGG ATCAGTTGCT CCTCACATTT GCTTCTGACA TAGTTGTGTT GGGAGCTTGG	2400
ATCGATCCAC CATGGTTGAA CAAGATGGAT TGCACGCAGG TTCTCCGGCC GCTTGGGTGG	2460
AGAGGCTATT CGGCTATGAC TGGGCACAAC AGACAATCGG CTGCTCTGAT GCCGCCGTGT	2520
TCCGGCTGTC AGCGCAGGGG CGCCCGGTTT TTTTGTCAA GACCGACCTG TCCGGTGCCC	2580
TGAATGAACT GCAGGACGAG GCAGCGCGGC TATCGTGGCT GGCCACGACG GCGTTTCCTT	2640
GCGCAGCTGT GCTCGACGTT GTCACTGAAG CGGGAAGGGA CTGGCTGCTA TTGGGCGAAG	2700
TGCCGGGGCA GGATCTCCTG TCATCTCACC TTGCTCCTGC CGAGAAAGTA TCCATCATGG	2760
CTGATGCAAT GCGGCGGCTG CATACGCTTG ATCCGGCTAC CTGCCCATTG GACCACCAAG	2820
CGAAACATCG CATCGAGCGA GCACGTACTC GGATGGAAGC CGGTCTTGTC GATCAGGATG	2880
ATCTGGACGA AGAGCATCAG GGGCTCGCGC CAGCCGAACT GTTCGCCAGG CTCAAGGCGC	2940

GCATGCCCGA CGGCGAGGAT CTCGTCGTGA CCCATGGCGA TGCCTGCTTG CCGAATATCA	3000
TGGTGGAAAA TGGCCGCTTT TCTGCATTCA TCGACTGTGG CCGGCTGGGT GTGGCGGACC	3060
GCTATCAGGA CATAGCGTTG GCTACCCGTG ATATTGCTGA AGAGCTTGGC GCGCAATGGG	3120
CTGACCGCTT CCTCGTGCTT TACGGTATCG CCGCTCCCGA TTCGCAGCGC ATCGCCTTCT	3180
ATCGCCTTCT TGACGAGTTC TTCTGAGCGG GACTCTGGGG TTCGAAATGA CCGACCAAGC	3240
GACGCCCCAAC CTGCCATCAC GAGATTTCTGA TTCCACCGCC GCCTTCTATG AAAGGTTGGG	3300
CTTCGGAATC GTTTTCCGGG ACGCCGGCTG GATGATCCTC CAGCGCGGGG ATCTCATGCT	3360
GGAGTTCTTC GCCCACCCCA ACTTGTTTAT TGCAGCTTAT AATGGTTACA AATAAAGCAA	3420
TAGCATCACA AATTTACAAA ATAAAGCATT TTTTTCAC TG CATTCTAGTT GTGGTTTGTC	3480
CAAACATCAT AATGTATCTT ATCATGTCTG GATCGCGGCC GCGATCCCGT CGAGAGCTTG	3540
GCGTAATCAT GGTATAGCT GTTTCCTGTG TGAAATTGTT ATCCGCTCAC AATTCCACAC	3600
AACATACGAG CCGGAAGCAT AAAGTGTAAG GCCTGGGGTG CCTAATGAGT GAGCTAACTC	3660
ACATTAATTG CGTTGCGCTC ACTGCCCGCT TTCCAGTCGG GAAACCTGTC GTGCCAGCTG	3720
CATTAATGAA TCGGCCAACG CGCGGGGAGA GGCGGTTTGC GTATTGGGCG CTCTTCCGCT	3780
TCCTCGCTCA CTGACTCGCT GCGCTCGGTC GTTCGGCTGC GCGAGCGGT ATCAGCTCAC	3840
TCAAAGGCGG TAATACGGTT ATCCACAGAA TCAGGGGATA ACGCAGGAAA GAACATGTGA	3900
GCAAAAGGCC AGCAAAAGGC CAGGAACCGT AAAAAGGCCG CGTTGCTGGC GTTTTTCAT	3960
AGGCTCCGCC CCCCTGACGA GCATCACAAA AATCGACGCT CAAGTCAGAG GTGGCGAAAC	4020
CCGACAGGAC TATAAAGATA CCAGGCGTTT CCCCCTGGAA GCTCCCTCGT GCGCTCTCCT	4080

GTTCCGACCC TGCCGCTTAC CGGATACCTG TCCGCCTTTC TCCCTTCGGG AAGCGTGGCG	4140
CTTTCTCAAT GCTCACGCTG TAGGTATCTC AGTTCGGTGT AGGTCGTTTCG CTCCAAGCTG	4200
GGCTGTGTGC ACCAACCCCC CGTTCAGCCC GACCGCTGCG CTTATCCGG TAACTATCGT	4260
CTTGAGTCCA ACCCGGTAAG ACACGACTTA TCGCCACTGG CAGCAGCCAC TGGTAACAGG	4320
ATTAGCAGAG CGAGGTATGT AGGCGGTGCT ACAGAGTTCT TGAAGTGGTG GCCTAACTAC	4380
GGCTACACTA GAAGGACAGT ATTTGGTATC TCGCTCTGC TGAAGCCAGT TACCTTCGGA	4440
AAAAGAGTTG GTAGCTCTTG ATCCGGCAAA CAAACCACCG CTGGTAGCGG TGGTTTTTTT	4500
GTTTGCAAGC AGCAGATTAC GCGCAGAAAA AAAGGATCTC AAGAAGATCC TTTGATCTTT	4560
TCTACGGGGT CTGACGCTCA GTGGAACGAA AACTCACGTT AAGGGATTTT GGTCATGAGA	4620
TTATCAAAAA GGATCTTCAC CTAGATCCTT TTAAATTAAA AATGAAGTTT TAAATCAATC	4680
TAAAGTATAT ATGAGTAAAC TTGGTCTGAC AGTTACCAAT GCTTAATCAG TGAGGCACCT	4740
ATCTCAGCGA TCTGTCTATT TCGTTCATCC ATAGTTGCCT GACTCCCCGT CGTGTAGATA	4800
ACTACGATAC GGGAGGGCTT ACCATCTGGC CCCAGTGCTG CAATGATACC GCGAGACCCA	4860
CGCTCACC GG CTCCAGATT ATCAGCAATA AACCAGCCAG CCGGAAGGGC CGAGCGCAGA	4920
AGTGGTCCTG CAACTTTATC CGCCTCCATC CAGTCTATTA ATTGTTGCCG GGAAGCTAGA	4980
GTAAGTAGTT CGCCAGTTAA TAGTTTGCGC AACGTTGTTG CCATTGCTAC AGGCATCGTG	5040
GTGTCACGCT CGTCGTTTGG TATGGCTTCA TTCAGCTCCG GTTCCCAACG ATCAAGGCGA	5100
GTTACATGAT CCCCCATGTT GTGCAAAAAA GCGGTTAGCT CTTTCGGTCC TCCGATCGTT	5160

GTCAGAAGTA AGTTGGCCGC AGTGTTATCA CTCATGGTTA TGGCAGCACT GCATAATTCT 5220

CTTACTGTCA TGCCATCCGT AAGATGCTTT TCTGTGACTG GTGAGTACTC AACCAAGTCA 5280

TTCTGAGAAT AGTGTATGCG GCGACCGAGT TGCTCTTGCC CGGCGTCAAT ACGGGATAAT 5340

ACCGCGCCAC ATAGCAGAAC TTAAAAAGTG CTCATCATTG GAAAACGTTT TTCGGGGCGA 5400

AAACTCTCAA GGATCTTACC GCTGTTGAGA TCCAGTTCGA TGTAACCCAC TCGTGCACCC 5460

AACTGATCTT CAGCATCTTT TACTTTCACC AGCGTTTCTG GGTGAGCAAA AACAGGAAGG 5520

CAAAATGCCG CAAAAAAGGG AATAAGGGCG ACACGGAAAT GTTGAATACT CATACTCTTC 5580

CTTTTTC AAT ATTATTGAAG CATTTATCAG GGTATTGTC TCATGAGCGG ATACATATTT 5640

GAATGTATTT AGAAAAATAA ACAAATAGGG GTTCCGCGCA CATTTCCCCG AAAAGTGCCA 5700

CCT 5703

5 (2) Informace pro SEQ ID NO: 51:

- (i) Charakteristiky sekvence:
- (A) Délka: 81 párů bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- 10 (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární
- (ii) Typ molekuly: DNA (genomová)
- 15 (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 51:

ATCCAAAGAC AACTCCCCGTA ACCAGGTTGT TCTGACCATG ACTAACATGG ACCCGGTTGA 60

CACCGCTACC TACTACTGCG C 81

20 (2) Informace pro SEQ ID NO: 52:

- (i) Charakteristiky sekvence:
- (A) Délka: 85 párů bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- 25 (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 52:

TCGAGCGCAG TAGTAGGTAG CGGTGTCAAC CGGGTCCATG TTAGTCATGG TCAGAACAAC 60

CTGGTTACGG GAGTTGTCTT TGGAT 85

5

(2) Informace pro SEQ ID NO: 53:

- 10 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 73 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

15

(ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 53:

AACCTGCACC GTCTCCGGTT TCTCCCTGAC GAGCTATAGT GTACACTGGA TCCGTCAGCC 60

GCCGGGTAAA GGT 73

20

(2) Informace pro SEQ ID NO: 54:

- 25 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 77 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

30

(ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 54:

CTAGACCTTT ACCCGGCGGC TGACGGATCC AGTGTACACT ATAGCTCGTC AGGGAGAAAC 60

CGGAGACGGT GCAGGTT 77

35

(2) Informace pro SEQ ID NO: 55:

- 40 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 46 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 55:

CTAGCTGTGT CAGCTGGCGA GAGGGCCACC ATCAACTGCA AGAGCT 46

5

(2) Informace pro SEQ ID NO: 56:

10

- (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 38 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

15

(ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 56:

CTTGCA GTTG ATGGTGGCCC TCTCGCCAGC TGACACAG 38

20

(2) Informace pro SEQ ID NO: 57:

25

- (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 140 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

30

(ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 57:

TTCGAGGACG CCAGCAACAT GGTGTTGCAG ACCCAGGTCT TCATTTCTCT GTTGCTCTGG 60

ATCTCTGGTG CCTACGGGCA GGTCCAACCTG CAGGAGAGCG GTCCAGGTCT TGTGAGACCT 120

AGCCAGACCC TGAGCCTGAC 140

35

(2) Informace pro SEQ ID NO: 58:

40

- (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 138 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

45

(ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 58:

```

GTGCCTCCAC TAGCCCATAT TACTCCAAGC CACTCTAGAC CTCGTCCAGG TGGCTGTCTC      60
ACCCAGTGTA CACTATAGCT GGTGAGGGAG AAGCCCGAGA CGGTGCAGGT CAGGCTCAGG      120
GTCTGGCTAG GTCTCACA                                          138

```

5 (2) Informace pro SEQ ID NO: 59:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 143 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

15 (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 59:

```

GGCTTGGAGT AATATGGGCT AGTGGAGGCA CAGATTATAA TTCGGCTCTC ATGTCCAGAC      60
TGAGTATACT GAAAGACAAC AGCAAGAACC AGGTCAGCCT GAGACTCAGC AGCGTGACAG      120
CCGCCGACAC CGCGGTCTAT TTC                                          143

```

20 (2) Informace pro SEQ ID NO: 60:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 136 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

30 (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 60:

```

CCAGTGCCAA GCTTGGGCCC TTGGTGGAGG CGCTCGAGAC GGTGACCGTG GTACCTTGTC      60
CCCAGTAGTC AAGCCGTAGT AAGGAAGAAG GGGGATCTCG AGCACAGAAA TAGACCGCGG      120
TGTCGGCGGC TGTCAC                                          136

```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 61:

- 5 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 357 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: dvojitý
 (D) Topologie: lineární
- 10 (ii) Typ molekuly: DNA (genomová)
- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 61:

```

CAGGTCCAAC TGCAGGAGAG CGGTCCAGGT CTTGTGAGAC CTAGCCAGAC CCTGAGCCTG      60
ACCTGCACCG TCTCGGGCTT CTCCCTCACC AGCTATAGTG TACACTGGGT GAGACAGCCA      120
CCTGGACGAG GTCTAGAGTG GCTTGAGTA ATATGGGCTA GTGGAGGCAC AGATTATAAT      180
TCGGCTCTCA TGTCCAGACT GAGTATACTG AAAGACAACA GCAAGAACCA GGTCAGCCTG      240
AGACTCAGCA GCGTGACAGC CGCCGACACC GCGGTCTATT ACTGTGCTCG GGATCCCCCT      300
TCTTCCTTAC TACGGCTTGA CTACTGGGGA CAAGGTACCA CGGTCACCGT CTCGAGC      357

```

15

(2) Informace pro SEQ ID NO: 62:

- 20 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 119 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární
- 25 (ii) Typ molekuly: protein
- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 62:

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Ala Ser Gly Gly Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Met
 50 55 60

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

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

Arg Asp Pro Pro Ser Ser Leu Leu Arg Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

5 (2) Informace pro SEQ ID NO: 63:

- (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 28 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 10 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární
- (ii) Typ molekuly: DNA (genomová)
- 15 (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 63:

AGGACGCCAG CAACATGGTG TTGCAGAC

28

20 (2) Informace pro SEQ ID NO: 64:

- (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 36 párů bází

- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

5 (ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 64:

TGCCAAGCTT GGGCCCTTGG TGGAGCGCT CGAGAC

36

10

(2) Informace pro SEQ ID NO: 65:

- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 121 párů bází
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Řetězec: jednoduchý
 - (D) Topologie: lineární

15

20 (ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 65:

GACCATGATT ACGAATTCGT AGTCGGATAT CGTGATGACC CAGAGCCCAA GCAGCCTGAG

60

CGCTAGCGTG GGTGACAGAG TGACCATCAC CTGTAAGAGC TCTCAGAGTC TGTAAACAG

120

T

121

25

(2) Informace pro SEQ ID NO: 66:

- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 116 párů bází
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Řetězec: jednoduchý
 - (D) Topologie: lineární

30

35 (ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 66:

AGATTC CCTA GTCGATGCCC CGTAGATCAG CAGCTTTGGA GCCTTACCGG GTTCTGCTG

60

ATACCAGGCC AAGTAGTTCT TTTGATTTC ACTGTTTAAC AGACTCTGAG AGCTCT

116

40

(2) Informace pro SEQ ID NO: 67:

- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 116 párů bází

- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

5 (ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 67:

TCTACGGGGC ATCGACTAGG GAATCTGGGG TACCAGATAG ATTTCAGCGGT AGCGGTAGCG 60

GAACCGACTT CACCTTCACC ATCAGCAGCC TGCAGCCAGA GGACATCGCC ACCTAC 116

10

(2) Informace pro SEQ ID NO: 68:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 117 párů bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

15

(ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

20

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 68:

TCGATGCCAA GCTTGGCGCC GCCACAGTAC GTTTGATCTC CACCTTGGTC CCTTGTCCGA 60

ACGTGAATGG AAAACTATGA ACAATCTGGC AGTAGTAGGT GGCGATGTCC TCTGGCT 117

25 (2) Informace pro SEQ ID NO: 69:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 339 párů bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: dvojitý
- (D) Topologie: lineární

30

(ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

35

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 69:

GATATCGTGA TGACCCAGAG CCCAAGCAGC CTGAGCGCTA GCGTGGGTGA CAGAGTGACC	60
ATCACCTGTA AGAGCTCTCA GAGTCTGTTA AACAGTGGAA ATCAAAAGAA CTACTTGGCC	120
TGGTATCAGC AGAAACCCGG TAAGGCTCCA AAGCTGCTGA TCTACGGGGC ATCGACTAGG	180
GAATCTGGGG TACCAGATAG ATTCAGCGGT AGCGGTAGCG GAACCGACTT CACCTTCACC	240
ATCAGCAGCC TGCAGCCAGA GGACATCGCC ACCTACTACT GCCAGAATGT TCATAGTTTT	300
CCATTCACGT TCGGACAAGG GACCAAGGTG GAGATCAAA	339

(2) Informace pro SEQ ID NO: 70:

5

- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 113 aminokyselin
 - (B) Typ: aminokyselina
 - (C) Řetězec: jednoduchý
 - (D) Topologie: lineární

10

- (ii) Typ molekuly: protein

- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 70:

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 35 40 45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr
 65 70 75 80

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

Val His Ser Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys

(2) Informace pro SEQ ID NO: 71:

5

- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 24 párů bází
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Řetězec: jednoduchý
 - (D) Topologie: lineární

10

- (ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 71:

15

GATTACGAAT TCGTAGTCGG ATAT

24

(2) Informace pro SEQ ID NO: 72:

20

- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 24 párů bází
 - (B) Typ: nukleová kyselina

- (C) Řetězec: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

5

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 72:

TGCCAAGCTT GGCGCCGCCA CAGT

24

10 (2) Informace pro SEQ ID NO: 73:

- (i) Charakteristiky sekvence:
(A) Délka: 39 párů bází
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Řetězec: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

15

(ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

20

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 73:

(2) Informace pro SEQ ID NO: 74:

25

- (i) Charakteristiky sekvence:
(A) Délka: 31 párů bází
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Řetězec: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

30

(ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 74:

CTTACAGGTG ATGGTCACTC GGTCACCCGC A

35

31

(2) Informace pro SEQ ID NO: 75:

40

- (i) Charakteristiky sekvence:
(A) Délka: 66 párů bází
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Řetězec: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

45

(ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 75:

GGTCTATTAC TGTGCTCGGG ATCCCCCTTC TTCCTTACTA CGGCTTGACT ACTGGGGACA 60
AGGTAC 66

50

(2) Informace pro SEQ ID NO: 76:

- (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 64 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární
- (ii) Typ molekuly: DNA (genomová)
- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 76:

CTTGTCCCCA GTAGTCAAGC CGTAGTAAGG AAGAAGGGGG ATCCCGAGCA CAGTAATACA 60
 CCGC 64

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Hlodavčí neutralizační monoklonální protilátka specifická pro lidský interleukin 5 a mající vazebnou afinitu charakterizovanou disociační konstantou rovnou nebo menší než $3,5 \times 10^{-11}$ M, kde aminokyselinové sekvence CDR1, CDR2 a CDR3 těžkého řetězce jsou uvedeny v SEQ ID NO: 7, 8, 9 nebo 7, 8, 14 a aminokyselinové sekvence CDR1, CDR2 a CDR3 lehkého řetězce jsou uvedeny v SEQ ID NO: 10, 11, 12 nebo 10, 11, 13, stejně jako 47 a 48.
2. Monoklonální protilátka podle nároku 1, která je myší monoklonální protilátkou.
3. Monoklonální protilátka podle nároku 1, která je krysí monoklonální protilátkou.
4. Monoklonální protilátka podle nároku 2, která obsahuje lehký řetězec aminokyselinové sekvence SEQ ID NO: 16 a těžký řetězec aminokyselinové sekvence SEQ ID NO: 15.
5. Monoklonální protilátka podle nároku 1 mající identifikující charakteristiky 2B6, vytvořená hybridomem ATCC přístupového čísla HB 11783, 2E3, vytvořená hybridomem ATCC přístupového čísla HB 11782, 2F2, vytvořená hybridomem ATCC přístupového čísla HB 11781 nebo 4A6, vytvořená hybridomem ATCC přístupového čísla HB 11943.
6. Hybridom mající identifikující charakteristiky buněčné linie SK119-2B6.206.75(1), uložený pod ATCC přístupovým číslem HB 11783, SK119-2E3.39.40.2, uložený pod ATCC přístupovým číslem HB 11782, SK119-2F2.37.80.12, uložený pod ATCC přístupovým číslem HB 11781 nebo 4A6(1)G1F7, uložený pod ATCC přístupovým číslem HB 11943.
7. Neutralizační Fab fragment nebo jeho $F(ab')_2$ fragment produkovaný delecí Fc regionu u monoklonální protilátky podle nároku 1.
8. Neutralizační Fab fragment nebo jeho $F(ab')_2$ fragment produkovaný přeskupením řetězců, kde je Fd těžký řetězec monoklonální protilátky podle nároku 1 exprimován s myším lehkým řetězcem ve filamentosní fágové Fab zobrazující knihovně.
9. Neutralizační Fab fragment nebo jeho $F(ab')_2$ fragment produkovaný přeskupením řetězců, kde je lehký řetězec monoklonální protilátky podle nároku 1 exprimován s myším těžkým řetězcem ve filamentosní fágové Fab zobrazující knihovně.

10. Pozměněná protilátka obsahující těžký řetězec a lehký řetězec, kde jsou úseky základní struktury uvedeného těžkého a lehkého řetězce z alespoň jedné vybrané protilátky a aminokyselinové sekvence komplementaritu určujících regionů každého uvedeného řetězce jsou z monoklonální protilátky podle nároku 1.
- 5 11. Pozměněná protilátka podle nároku 10, kde uvedené aminokyselinové sekvence komplementaritu určujících regionů těžkého řetězce jsou:
(a) SEQ ID NO: 7, 8, 9; nebo
(b) SEQ ID NO: 7, 8, 14.
- 10 12. Pozměněná protilátka podle nároku 10, kde uvedené aminokyselinové sekvence komplementaritu určujících regionů lehkého řetězce jsou:
(a) SEQ ID NO: 10, 11, 12; nebo
(b) SEQ ID NO: 10, 11, 13.
- 15 13. Pozměněná protilátka podle nároku 10, kde uvedené úseky základní struktury uvedeného těžkého řetězce obsahují: aminokyseliny 1 – 30, 36 – 49, 66 – 97 a 109 – 119 SEQ ID NO: 19.
- 20 14. Pozměněná protilátka podle nároku 10, kde uvedené úseky základní struktury uvedeného lehkého řetězce obsahují: aminokyseliny 1 – 23, 41 – 55, 63 – 94 a 104 – 113 SEQ ID NO: 21.
- 15 15. Komplementaritu určující region (CDR) těžkého řetězce imunoglobulinu, jehož aminokyselinová sekvence je vybrána ze skupiny skládající se z:
(a) SEQ ID NO: 7,
(b) SEQ ID NO: 8,
(c) SEQ ID NO: 9, a
(d) SEQ ID NO: 14.
- 25 16. Komplementaritu určující region (CDR) lehkého řetězce imunoglobulinu, jehož aminokyselinová sekvence je vybrána ze skupiny skládající se z:
(a) SEQ ID NO: 10,
(b) SEQ ID NO: 11,
(c) SEQ ID NO: 12,
(d) SEQ ID NO: 13,
(e) SEQ ID NO: 47, a
(f) SEQ ID NO: 48.
- 30 17. Molekula nukleové kyseliny kódující komplementaritu určující region (CDR) imunoglobulinu podle nároku 15.
- 40 18. Molekula nukleové kyseliny kódující komplementaritu určující region (CDR) imunoglobulinu podle nároku 16.
- 45 19. Chimérická protilátka obsahující těžký řetězec a lehký řetězec, kde uvedená protilátka je charakterizována disociační konstantou rovnou nebo menší než $3,5 \times 10^{-11}$ M pro lidský interleukin 5, kde jsou konstantní regiony uvedeného lehkého a těžkého řetězce z alespoň jedné vybrané protilátky a aminokyselinové sekvence variabilních regionů každého uvedeného řetězce jsou z monoklonální protilátky podle nároku 1.
- 50 20. Protilátka podle nároku 19, kde jsou konstantní regiony vybrány z lidských imunoglobulinů.

21. Farmaceutická kompozice, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že obsahuje pozměněnou protilátku podle nároku 10 a farmaceuticky akceptovatelný nosič.
22. Použití pozměněné protilátky podle nároku 10, pro výrobu léčiva pro léčbu stavů asociovaných s excesivní produkcí eosinofilů.
23. Použití podle nároku 22, pro výrobu léčiva pro léčbu stavů asociovaných s excesivní produkcí eosinofilů, kde uvedeným stavem je astma.
24. Použití podle nároku 22, pro výrobu léčiva pro léčbu stavů asociovaných s excesivní produkcí eosinofilů, kde uvedeným stavem je alergická rhinitida.
25. Použití podle nároku 22, pro výrobu léčiva pro léčbu stavů asociovaných s excesivní produkcí eosinofilů, kde uvedeným stavem je atopická dermatitida.
26. Izolovaná sekvence nukleové kyseliny, která je vybrána ze skupiny skládající se z:
 (a) sekvence nukleové kyseliny kódující pozměněnou protilátku podle nároku 10;
 (b) sekvence nukleové kyseliny komplementární k (a);
 (c) fragmentu nebo analogu (a) nebo (b), který kóduje protein charakterizovaný specifitou pro lidský interleukin 5;
 kde uvedená sekvence popřípadě obsahuje restrikční místo.
27. Izolovaná sekvence nukleové kyseliny podle nároku 26, kde sekvence kóduje variabilní region humanizovaného těžkého řetězce, který obsahuje sekvenci nukleové kyseliny SEQ ID NO: 18.
28. Izolovaná sekvence nukleové kyseliny podle nároku 26, kde sekvence kóduje variabilní region humanizovaného těžkého řetězce, který obsahuje sekvenci nukleové kyseliny SEQ ID NO: 61.
29. Izolovaná sekvence nukleové kyseliny podle nároku 26, kde sekvence kóduje variabilní region humanizovaného lehkého řetězce, který obsahuje sekvenci nukleové kyseliny SEQ ID NO: 20.
30. Izolovaná sekvence nukleové kyseliny podle nároku 26, kde sekvence kóduje variabilní region humanizovaného lehkého řetězce, který obsahuje sekvenci nukleové kyseliny SEQ ID NO: 69.
31. Rekombinantní plasmid obsahující sekvenci nukleových kyselin podle nároku 26.
32. Hostitelská buňka transfekovaná rekombinantním plasmidem podle nároku 31.
33. Způsob pro produkci pozměněných protilátek podle nároku 1, specifických pro lidský interleukin 5, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že zahrnuje kultivaci buněčné linie transfekované rekombinantním plasmidem podle nároku 31 pod kontrolou vybraných regulačních sekvencí schopných řízení jeho exprese v uvedených buňkách.
34. Hybridom mající identifikující charakteristiky buněčné linie SK119–24G9.8.20.5, uložené pod ATCC přístupovým číslem HB 11780, nebo 5D3(1)F5D6, uložené pod ATCC přístupovým číslem HB 11942.
35. Monoklonální protilátka produkovaná hybridomem podle nároku 34.

Obrázek 1

286 DNA sekvence variabilního regionu těžkého řetězce

1										CCT GGC	30
	Gln	Val	Gln	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	
31	CTG	GTG	GGG	CCC	TCA	CAG	AGC	CTG	TCC	ATC	60
	Leu	Val	Ala	Pro	Ser	Gln	Ser	Leu	Ser	Ile	
61	ACT	TGC	ACT	GTC	TCT	GGG	TTT	TCA	TTA	ACC	90
	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Thr	
91	AGC	TAT	AGT	GTA	CAC	TGG	GTT	CGC	CAG	CCT	120
	Ser	Tyr	Ser	Val	His	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	
121	CCA	GGA	AAG	GGT	CTG	GAG	TGG	CTG	GGA	GTA	150
	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Gly	Val	
151	ATA	TGG	GCT	AGT	GGA	GGC	ACA	GAT	TAT	AAT	180
	Ile	Trp	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Asp	Tyr	Asn	
181	TGG	GCT	CTC	ATG	TCC	AGA	CTG	AGC	ATC	AGC	210
	Ser	Ala	Leu	Met	Ser	Arg	Leu	Ser	Ile	Ser	
211	AAA	GAC	AAC	TCC	AAG	AGC	CAA	GTT	TTC	TTA	240
	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Leu	
241	AAA	CTG	AAC	AGT	CTG	CAA	ACT	GAT	GAC	ACA	270
	Lys	Leu	Asn	Ser	Leu	Gln	Thr	Asp	Asp	Thr	
271	GCC	ATG	TAC	TAC	TGT	GCC	AGA	GAT	CCC	CCT	300
	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Pro	Pro	
301	TCT	TCC	TTA	CTA	CGG	CTT	GAC	TAC	TGG	GGC	330
	Ser	Ser	Leu	Leu	Arg	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	
331	CAA	GGC	ACC	ACT	CTC	ACA	GTC	TCC	TCA		357
	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser		

Obrázek 2

286 DNA sekvence variabilního regionu lehkého řetězce

1									TCC TCC	30
	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser Ser	
31	CTG	AGT	GTG	TCA	GCA	GGA	GAG	AAG	GTC ACT	60
	Leu	Ser	Val	Ser	Ala	Gly	Glu	Lys	Val Thr	
61	ATG	AGC	TGC	AAG	TCC	AGT	CAG	AGT	CTG TTA	90
	Met	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu Leu	
91	AAC	AGT	GGA	AAT	CAA	AAG	AAC	TAC	TTG GCC	120
	Asn	Ser	Gly	Asn	Gln	Lys	Asn	Tyr	Leu Ala	
121	TGG	TAC	CAG	CAG	AAA	CCA	GGG	CAG	CCT CCT	150
	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro Pro	
151	AAA	CTT	TTG	ATC	TAC	GGG	GCA	TCC	ACT AGG	180
	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Thr Arg	
181	GAA	TCT	GGG	GTC	CCT	GAT	CGC	TTC	ACA GGC	210
	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr Gly	
211	AGT	GGA	TCT	GGA	ACC	GAT	TTC	ACT	CTT TCC	240
	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu Ser	
241	ATC	AGC	AGT	GTG	CAG	GCT	GAA	GAC	CTG GCA	270
	Ile	Ser	Ser	Val	Gln	Ala	Glu	Asp	Leu Ala	
271	GTT	TAT	TAC	TGT	CAG	AAT	GTT	CAT	AGT TTT	300
	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Asn	Val	His	Ser Phe	
301	CCA	TTC	ACG	TTC	GGC	TCG	GGG	ACA	GAG TTG	330
	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu Leu	
331	GAA	ATA	AAA							339
	Glu	Ile	Lys							

Obrázek 3

2F21 DNA sekvence variabilního regionu těžkého řetězce

1	CCT GGC CTG GTG GCG CCC TCA CAG AGC CTG	30
	Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu	
31	TCC ATC ACT TGC ACT GTC TCT GGG TTT TCA	60
	Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser	
61	TTA ACC AGT TAT AGT GTA CAC TGG GTT CGC	90
	Leu Thr Ser Tyr Ser Val His Trp Val Arg	
91	CAG CCT CCA GGA AAG GGT CTG GAG TGG CTG	120
	Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu	
121	GGA GTA ATA TGG GCT AGT GGA GGC ACA GAT	150
	Gly Val Ile Trp Ala Ser Gly Gly Thr Asp	
151	TAT AAT TCG GCT CTC ATG TCC AGA CTG AGC	180
	Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser Arg Leu Ser	
181	ATC AGC AAA GAC AAC TCC AAG AGC CAA GTT	210
	Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val	
211	TTC TTA AAA CTG AAC AGT CTG CGA ACT GAT	240
	Phe Leu Lys Leu Asn Ser Leu Arg Thr Asp	
241	GAC ACA GCC ATG TAC TAC TGT GCC AGA GAT	270
	Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp	
271	CCC CCT TCT TCC TTA CTA CGG CTT GAC TAC	300
	Pro Pro Ser Ser Leu Leu Arg Leu Asp Tyr	
301	TGG GGC CAA GGC ACC ACT CTC ACA GTC TCC	330
	Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser	
331	TCA	333
	Ser	

Obrázek 4

2F2 DNA sekvence variabilního regionu lehkého řetězce

1	TCC TCC CTC AGT GTG TCH GCH GGA GAG AAG	30
	Ser Ser Leu Ser Val Ser Ala Gly Glu Lys	
31	GTC ACT ATG AGC TGC AAG TCC AGT CAG AGT	60
	Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser	
61	CTA TTA AAC AGT GGA AAT CAA AAG AAC TAC	90
	Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr	
91	TTG GCC TGG TAC CAA CAG AAA CCA GGG CAG	120
	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln	
121	CCT CCT AAA CTT TTG ATC TAC GGG GCA TCC	150
	Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser	
151	ACT AGG GAA TCT GGG GTC CCT GAT CGC TTC	180
	Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe	
181	ACA GGC AGT GGA TCT GGA ACC GAT TTC ACT	210
	Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr	
211	CTT ACC ATC AGC AGT GTG CAG GCT GAA GAC	240
	Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp	
241	CTG GCA GTT TAT TAC TGT CAG AAT GAT CAT	270
	Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp His	
271	AGT TTT CCA TTC ACG TTC GGC TCG GGG ACA	300
	Ser Phe Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr	
301	GAG TTG GAA ATA AAA	315
	Glu Leu Glu Ile Lys	

Obrázek 5

2E3 DNA sekvence variabilního regionu těžkého řetězce

1	CCT GGC CTG GTG GCG CCC TCA CAG AGC CTG	30
	Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu	
31	TCC ATC ACT TGC ACT GTC TCT GGG TTT TCA	60
	Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser	
61	TTA ACC AGC TAT AGT GTA CAC TGG GTT CGC	90
	Leu Thr Ser Tyr Ser Val His Trp Val Arg	
91	CAG CCT CCA GGA AAG GGT CTG GAG TGG CTG	120
	Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu	
121	GGA GTA ATC TGG GCT AGT GGA GGC ACA GAT	150
	Gly Val Ile Trp Ala Ser Gly Gly Thr Asp	
151	TAT AAT TCG GCT CTC ATG TCC AGA CTG AGC	180
	Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser Arg Leu Ser	
181	ATC AGC AAA GAC AAC TCC AAG AGC CAA GTT	210
	Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val	
211	TTC TTA AAA CTG AAC AGT CTG CAA ACT GAT	240
	Phe Leu Lys Leu Asn Ser Leu Gln Thr Asp	
241	GAC GCA GCC ATG TAC TAC TGT GCC AGA GAT	270
	Asp Ala Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp	
271	CCC CCT TTT TCC TTA CTA CGG CTT GAC TTC	300
	Pro Pro Phe Ser Leu Leu Arg Leu Asp Phe	
301	TGG GGC CAA GGC ACC ACT CTC ACA GTC TCC	330
	Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser	
331	TCA	333
	Ser	

Obrázek 6

2E3 DNA sekvence variabilního regionu lehkého řetězce

1	TCC TCT CTG AGT GTG TCA GCA GGA GAG AAG	30
	Ser Ser Leu Ser Val Ser Ala Gly Glu Lys	
31	GTC ACT ATG AGC TGC AAG TCC AGT CAG AGT	60
	Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser	
61	CTG TTA AAC AGT GGA AAT CAA AAA AAC TAC	90
	Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr	
91	TTG GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGG CAG	120
	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln	
121	CCT CCT AAA CTT TTG ATC TAC GGG GCA TCC	150
	Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser	
151	ACT AGG GAA TCT GGG GTC CCT GAT CGC TTC	180
	Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe	
181	ACA GGC AGT GGA TCT GGA ACC GAT TTC ACT	210
	Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr	
211	CTT ACC ATC AGC AGT GTG CAG GCT GAA GAC	240
	Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp	
241	CTG GCA GTT TAT TAC TGT CAG AAT GAT CAT	270
	Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp His	
271	AGT TTT CCA TTC ACG TTC GGC TCG GGG ACA	300
	Ser Phe Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr	
301	GAG TTG GAA ATA AAA	315
	Glu Leu Glu Ile Lys	

Obrázek 7

2B6 CDRs

Těžký řetězec 1: SYSVII
 Těžký řetězec 2: VIWASGGTDYNSALMS
 Těžký řetězec 3: DPPSSLLRLDY

Lehký řetězec 1: KSSQSLLNSGNQKNYLA
 Lehký řetězec 2: GASTRES
 Lehký řetězec 3: QNVHSFPFT

2F2 CDRs

Těžký řetězec 1: SYSVH
 Těžký řetězec 2: VIWASGGTDYNSALMS
 Těžký řetězec 3: DPPSSLLRLDY

Lehký řetězec 1: KSSQSLLNSGNQKNYLA
 Lehký řetězec 2: GASTRES
 Lehký řetězec 3: QNDHSFPFT

2E3 CDRs

Těžký řetězec 1: SYSVH
 Těžký řetězec 2: VIWASGGTDYNSALMS
 Těžký řetězec 3: DPPFSLLRLDF

Lehký řetězec 1: KSSQSLLNSGNQKNYLA
 Lehký řetězec 2: GASTRES
 Lehký řetězec 3: QNDHSFPFT

Obrázek 8

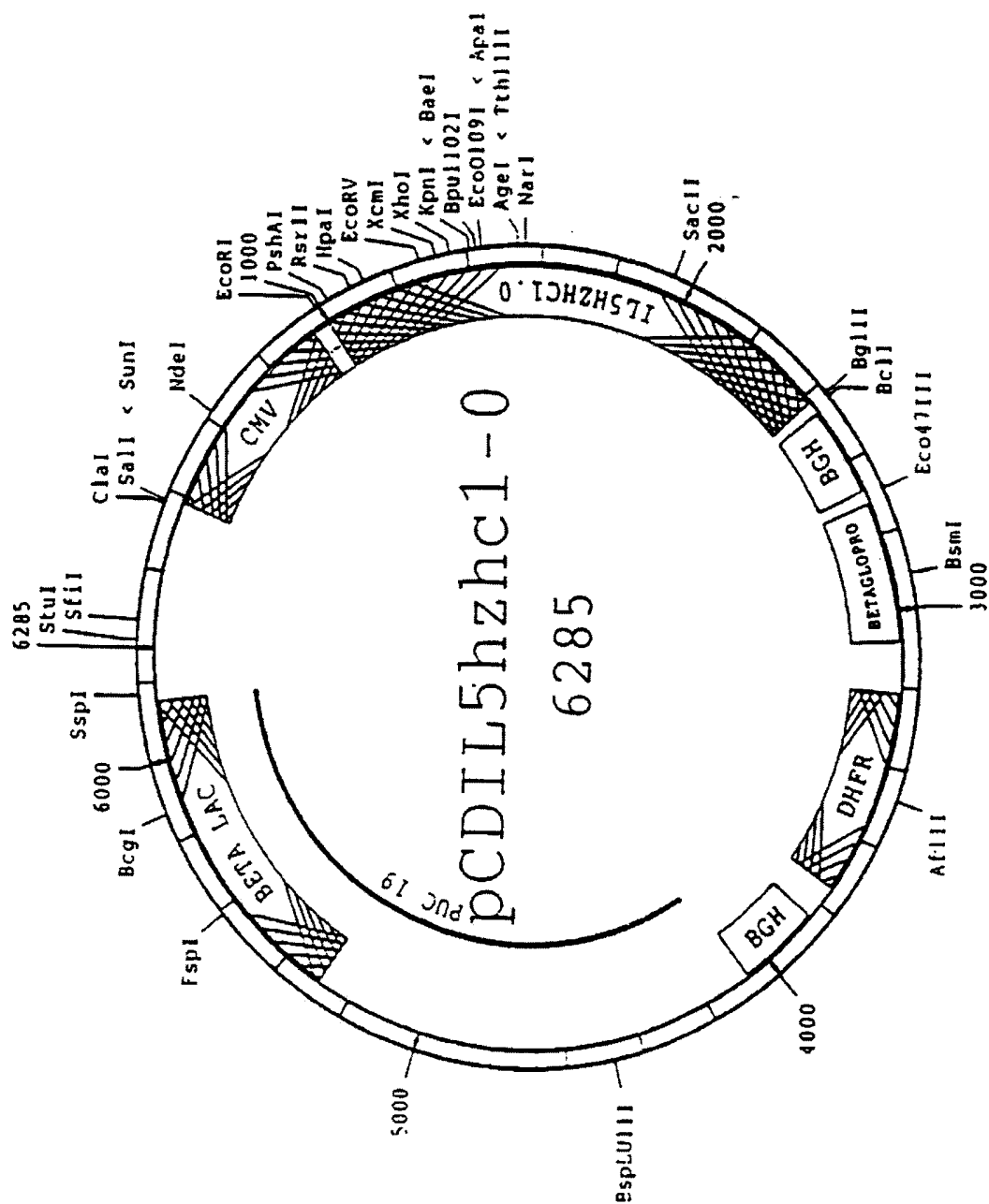
IL5 variabilní region humanizovaného těžkého řetězce

1	CAG GTT ACC CTG CGT GAA TCC GGT CCG GCA	30
	Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala	
31	CTA GTT AAA CCG ACC CAG ACC CTG ACG TTA	60
	Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu	
61	ACC TGC ACC TTC TCC GGT TTC TCC CTG ACG	90
	Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Thr	
91	AGC TAT AGT GTA CAC TGG ATC CGT CAG CCG	120
	Ser Tyr Ser Val His Trp Ile Arg Gln Pro	
121	CCG GGT AAA GGT CTG GAG TGG CTG GGT GTA	150
	Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val	
151	ATA TGG GCT AGT GGA GGC ACA GAT TAT AAT	180
	Ile Trp Ala Ser Gly Gly Thr Asp Tyr Asn	
181	TCG GCT CTC ATG TCC CGT CTG ACG ATA TCC	210
	Ser Ala Leu Met Ser Arg Leu Thr Ile Ser	
211	AAA GAC ACC TCC CGT AAC CAG GTT GTT CTG	240
	Lys Asp Thr Ser Arg Asn Gln Val Val Leu	
241	ACC ATG ACT AAC ATG GAC CCG GTT GAC ACC	270
	Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr	
271	GCT ACC TAC TAC TGC GCT CGA GAT CCC CCT	300
	Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Pro	
301	TCT TCC TTA CTA CGG CTT GAC TAC TGG GGT	330
	Ser Ser Leu Leu Arg Leu Asp Tyr Trp Gly	
331	CGT GGT ACC CCA GTT ACC GTG AGC TCA	357
	Arg Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser	

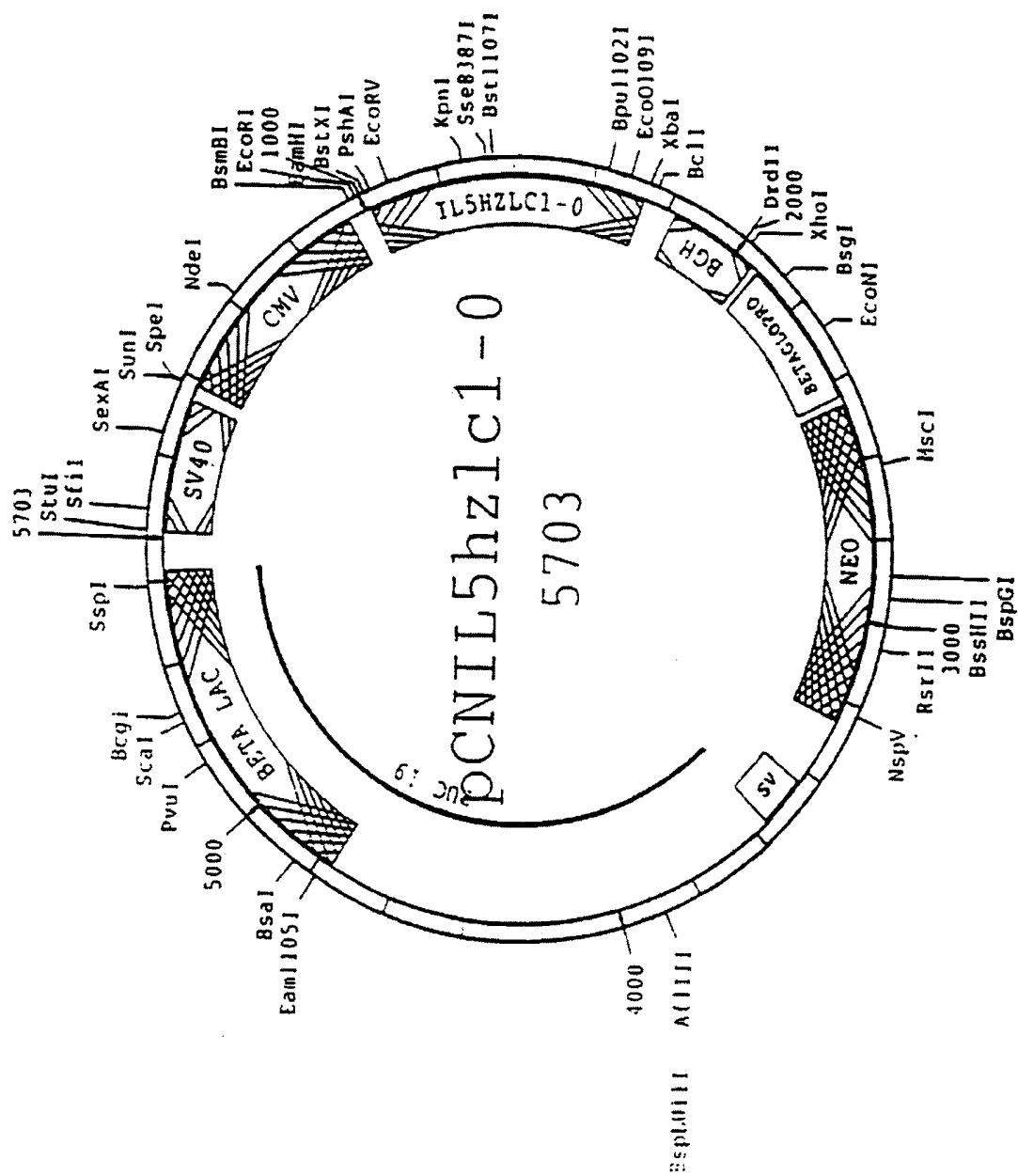
Obrázek 9

Variabilní region humanizovaného lehkého řetězce

1	GAT ATC GTG ATG ACC CAG TCT CCA GAC TCG	30
	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser	
31	CTA GCT GTG TCT CTG GGC GAG AGG GCC ACC	60
	Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr	
61	ATC AAC TGC AAG AGC TCT CAG AGT CTG TTA	90
	Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu	
91	AAC AGT GGA AAT CAA AAG AAC TAC TTG GCC	120
	Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala	
121	TGG TAT CAG CAG AAA CCC GGG CAG CCT CCT	150
	Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro	
151	AAG TTG CTC ATT TAC GGG GCG TCG ACT AGG	180
	Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg	
181	GAA TCT GGG GTA CCT GAC CGA TTC AGT GGC	210
	Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly	
211	AGC GGG TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC	240
	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr	
241	ATC AGC AGC CTG CAG GCT GAA GAT GTG GCA	270
	Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala	
271	GTA TAC TAC TGT CAG AAT GTT CAT AGT TTT	300
	Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Val His Ser Phe	
301	CCA TTC ACG TTC GGC GGA GGG ACC AAG TTG	330
	Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu	
331	GAG ATC AAA	339
	Glu Ile Lys	



Obrázek 10



Obrázek 11

Obrázek 12

IL5 NEWM variabilní region humanizovaného těžkého řetězce

1	CAG GTC CAA CTG CAG GAG AGC GGT CCA GGT	30
	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly	
31	CTT GTG AGA CCT AGC CAG ACC CTG AGC CTG	60
	Leu Val Arg Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu	
61	ACC TGC ACC GTC TCG GGC TTC TCC CTC ACC	90
	Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr	
91	AGC TAT AGT GTA CAC TGG GTG AGA CAG CCA	120
	Ser Tyr Ser Val His Trp Val Arg Gln Pro	
121	CCT GGA CGA GGT CTA GAG TGG CTT GGA GTA	150
	Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val	
151	ATA TGG GCT AGT GGA GGC ACA GAT TAT AAT	180
	Ile Trp Ala Ser Gly Gly Thr Asp Tyr Asn	
181	TCG GCT CTC ATG TCC AGA CTG TCA ATA CTG	210
	Ser Ala Leu Met Ser Arg Leu Ser Ile Leu	
211	AAA GAC AAC AGC AAG AAC CAG GTC AGC CTG	240
	Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu	
241	AGA CTC AGC AGC GTG ACA GCC GCC GAC ACC	270
	Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr	
271	GCG GTC TAT TAC TGT GCT CGG GAT CCC CCT	300
	Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Pro	
301	TCT TCC TTA CTA CGG CTT GAC TAC TGG GGA	330
	Ser Ser Leu Leu Arg Leu Asp Tyr Trp Gly	
331	CAA GGT ACC ACG GTC ACC GTC TCG AGC	357
	Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	

Obrázek 13

IL5 REI variabilní region humanizovaného lehkého řetězce

1	GAT ATC GTG ATG ACC CAG AGC CCA AGC AGC	30
	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser	
31	CTG AGC GCT AGC GTG GGT GAC AGA GTG ACC	60
	Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr	
61	ATC ACC TGT AAG AGC TCT CAG AGT CTG TTA	90
	Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu	
91	AAC AGT GGA AAT CAA AAG AAC TAC TTG GCC	120
	Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala	
121	TGG TAT CAG CAG AAA CCC GGT AAG GCT CCA	150
	Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro	
151	AAG CTG CTG ATC TAC GGG GCA TCG ACT AGG	180
	Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg	
181	GAA TCT GGG GTA CCA GAT AGA TTC AGC GGT	210
	Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly	
211	AGC GGT AGC GGA ACC GAC TTC ACC TTC ACC	240
	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr	
241	ATC AGC AGC CTG CAG CCA GAG GAC ATC GCC	270
	Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala	
271	ACC TAC TAC TGC CAG AAT GTT CAT AGT TTT	300
	Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val His Ser Phe	
301	CCA TTC ACG TTC GGA CAA GGG ACC AAG GTG	330
	Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val	
331	GAG ATC AAA	339
	Glu Ile Lys	

Konec dokumentu