



H U 0 0 0 2 2 1 8 1 8 B 1

(19) Országkód

HU**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG****MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL****SZABADALMI
LEÍRÁS**

(21) A bejelentés ügyszáma: P 01 00794
(22) A bejelentés napja: 1998. 04. 14.
(30) Elsőbbségi adatok:
97106109.8 1997. 04. 14. EP
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/EP 98/02180
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 98/46645

(40) A közzététel napja: 2001. 06. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 2003. 01. 28.

(11) Lajstromszám:

221 818 B1(51) Int. Cl.⁷**C 07 K 16/00**

(72) Feltalálók:

Kufer, Peter, Moosburg (DE)
Raum, Tobias, München (DE)

(73) Szabadalmaz:

Micromet AG, Planegg (DE)

(74) Képviselő:

dr. Svingor Ádám, DANUBIA Szabadalmi és
Védjegy Iroda Kft., Budapest

(54)

**Új eljárás humán antigén elleni receptorok előállítására,
és azok alkalmazása****KIVONAT**

A találmány tárgyát eljárás képezi olyan, humán antigén elleni receptor előállítására, amely emberben kismértékben immunogén vagy egyáltalán nem immunogén, amely eljárás szerint funkcionálisan újrendezett VH- és VL-immunglobulin-láncok kombinációját szelektálják, amelyben legalább a VH-lánc lényegében naiv, érett, humán B-limfocitákból vagy lényegében anergiás humán B-sejtekből, a VL-lánc pedig természetben előforduló humán B-sejt-repertoárból származik. A találmány tárgyát képezik továbbá a találmány szerinti eljárással előállítandó humán antigének elleni receptorok, amelyek emberben kismértékben immuno-

gének vagy egyáltalán nem immunogének. Ezek előnyösen ellenanyagok vagy azok fragmentumai, vagy az ellenanyag VH/VL láncait tartalmazó immunkonjugátumok. Előnyösen a találmány tárgyát képezik tumorantigének, előnyösen a 17-1A jelzésű humán tumorantigén ellen irányuló receptorok. Végül, a találmány tárgyát képezik a találmány szerinti eljárás kivitelezésére alkalmas reagenskészletek, és a receptorokat tartalmazó gyógyászati készítmények.

A találmány szerinti megoldás alkalmazható emberi szervezetben expresszálandó antigénekkal szembeni ellenanyag-terápia során.

A találmány tárgyát eljárás képezi olyan, humán antigén elleni receptor előállítására, amely emberben kismértékben immunogén vagy egyáltalán nem immunogén, amely eljárás szerint funkcionálisan újrendeződött VH- és VL-immunglobulin-láncok kombinációját szelektáljuk, amely kombinációban legalább a VH-lánc naiv, („unprimed”) érett, humán B-limfocitákból, a VL-lánc pedig természetben előforduló humán B-sejt-repertoárból származik; és amely láncok rekombinációs vektorról és humán antigénhez való kötődés érdekében egy *in vitro* prezentáló rendszer alkalmazásával expresszálódnak, ahol a szelekciós lépés végrehajtása előtt vagy a VH-láncot vagy a VL-láncot szelektálják az antigénre való kötésre nézve, egy helyettesítő V-lánccal együtt.

A találmány tárgyát képezik továbbá humán antigén elleni receptorok, amelyek emberben kismértékben immunogének vagy egyáltalán nem immunogének, és amelyek a találmány szerinti eljárással állíthatók elő. A találmány szerinti receptorok 17-1A jelzésű, natív humán tumorantigén, más néven EpCAM, EGP-40 vagy GA733-2 antigén ellen irányulnak.

Az emlős immunrendszer, például a humán immunrendszer kiszűri a saját antigének elleni specifikus immunkompetens sejteket és molekulákat. Ebben a vonatkozásban, az immunrendszer szabályozásában bekövetkező rendellenesség autoimmun betegségek, például reumatoid arthritis kifejlődéséhez vezethet. Általában igen kedvező tehát, hogy az immunrendszer a megfigyelése alatt tartja az autoreaktív antitesteket és T-sejteket. Előfordulnak azonban olyan esetek, amikor előnyös lenne, ha emlősben, elsősorban az emberi szervezetben expresszálódó antigénekkel szembeni autoreaktív ellenanyagok állnának rendelkezésünkre. Ilyen antigének például a tumorok jelenlétével kapcsolatos (tumorasszociált) antigének. Például, a humán 17-1A vagy EpCAM antigénről – egy egyszerű epitelsejteken vagy azokból származó malignus tumorsejteken expresszálódó sejtfelszíni glikoproteinekről – kimutatták, hogy az ígéretes célpontja karcinómák monoklonális ellenanyag-terápiájának, különösen olyan betegek esetében, akiknél tumorsejtek disszeminációjának (szóródásának) következtében minimális elváltozás maradt vissza, amely visszamaradó sejtek később szolid áttétek keletkezéséhez vezethetnek, és ily módon ronthatják a beteg gyógyulási vagy életkilátásait. Olyan, colorectalis (vastagbelet és végbélet érintő) karcinómában szenvedő betegek esetében, akiknél az elsődleges tumor sebészi úton történő eltávolítását követően igen csekély elváltozás maradt vissza, a humán 17-1A antigénre specifikus egéreredetű monoklonális ellenanyag négy hónapon át, öt adagban szisztémásan adagolva 30%-kal csökkentette az 5 éves mortalitást a kezelt betegekhez képest; a kezelés során mindegyik beteg az első tumorműtétét követő 4 hónapban 5 alkalommal összesen 900 mg ellenanyagot kapott [Riethmüller: Lancet 343, 1177 (1994)]. Az ellenanyag-kezelés során azonban a betegeknél erős ellenanyagválasz lépett fel az egéreredetű immunglobulinokkal szemben. Ilyen, humán eredetű egér elleni ellenanyagok („human anti-

mouse antibodies”); HAMA) jelenléte nagymértékben korlátozza az ellenanyag-terápia folyamatos alkalmazását, és a kezelés előrehaladtával egyre nagyobb mértékben rontja annak hatékonyságát. Ezenfelül, korábbi ellenanyag-kezeléssel vagy egér-immunglobulinnal egyéb úton történt találkozással kiváltott HAMA-k jelenléte erősen gátolhatja a későbbi ellenanyag-kezelések sikerét.

A fenti problémák áthidalására előnyös lenne, ha minimális immunogenitású terápiás ellenanyagok állnának rendelkezésünkre. Ezt elérhetjük például úgy, hogy aminosavszekvenciájukat tekintve teljesen humán terápiás ellenanyagokat vagy ellenanyag-származékokat állítunk elő, és a humán ellenanyag-idiotípus immunogén sajátosságát úgy minimalizáljuk, hogy humán Ig variábilis régiókat alkalmazunk, amelyeket a humán immunrendszer várhatóan tolerál.

Humán antigénekkel szemben irányuló humán ellenanyagok előállítása azonban két jelentős problémát vet fel:

(1) a hibridómatechnológia vagy más, folyamatos szaporodású sejtek létrehozásán alapuló technológiák kevésbé bizonyultak hatékonyak humán ellenanyag-termelő sejtvonalak előállítására, mint az egér-hibridómatechnológia;

(2) az autoreaktív ellenanyagokat a természetes ellenanyag-repertoár viszonylag hatékonyan eltávolítja, a „sajáttolerancia” jelenségét eredményező mechanizmuson keresztül.

Humán ellenanyagok általánosságban sokkal könnyebben hozzáférhetők azóta, hogy humán ellenanyagokat termelő transzgenikus egereket sikerült létrehozni [Brüggemann: Immunol. Today 17, 391 (1996)], valamint azóta, hogy kombinatorikus ellenanyagkönyvtárak és fágprezentációs technológia állnak rendelkezésünkre, amelyek lehetővé teszik, hogy immunglobulin (Ig) nehéz- és könnyűláncok variábilis régióit (VH és VL) *in vitro* kombináltassuk egymással, és a kombinációkat a megfelelő antigénkötő specifitásra *in vitro* szelektáljuk [Winter: Annu. Rev. Immunol. 12, 433 (1994)]. A fágprezentációs eljárás alkalmazásával könnyen izolálhatók ritka események, például 10⁷–10⁹ különböző VL/VH vagy VH/VL párból egy specifikus kötődést eredményező kombinációk, azaz kötődési egységek („binding entity”); ez különösen igaz akkor, ha a variábilis régiók repertoárját specifikus kötődési egységekre nézve feldúsítjuk úgy, hogy a repertoár klónozását immunizált gazdából származó B-limfocitákból kiindulva végezzük.

Specifikus kötődési egységek gyakorisága azonban természetesen előforduló ellenanyag-repertoárokban gyakran lényegesen csökkent. Ez különösen érvényes saját antigéneket kötő ellenanyagosztyályokra. A fágprezentációs eljárás alkalmazásakor, saját antigénekkel szemben toleráns gazdából származó VL- és VH-régiók véletlenszerű kombinációjával nyert, szokásos méretű (10⁷–10⁹ független klónt tartalmazó) kombinatorikus ellenanyagkönyvtár legtöbbször nem elegendő autoreaktív ellenanyagok sikeres *in vitro* szelekciójához.

A fenti probléma áthidalására irányuló egyik stratégia szerint, nagyon nagy méretű kombinatorikus ellen-

anyagkönyvtárakat alkalmazunk, hogy a génkönyvtár méretével ellensúlyozzuk az autoreaktív ellenanyagok előfordulásának kis gyakoriságát a természetes repertoárookban. Több mint 10^9 független klónt tartalmazó kombinatorikus ellenanyagkönyvtárakat azonban nehéz létrehozni, mivel a transzformációs eljárások hatékonysága, amelyekkel plazmid-DNS-ek *E. coli* sejtekbe juttathatók, korlátozott.

A természetes ellenanyag-repertoároknak megfigyelhető, a sajáttolerancia mechanizmusa által közvetített egyensúly-eltolódás ahhoz vezet, hogy az ilyen repertoároknak az autoreaktív ellenanyagok kisebb gyakorisággal képviseltetik magukat. Ez jelentősen csökkenti saját antigéneket specifikusan felismerő ellenanyagok izolálásának esélyét. Ennek elkerülése érdekében olyan megközelítési módokat dolgoztak ki, amelyek félszintetikus vagy teljesen szintetikus VH- és/vagy VL-lánc-repertoárok előállításán alapulnak. Például, átrendeződésektől mentes humán V-génszegmensek csaknem teljes repertoárját klónozták genomi DNS alapján, és azokat *in vitro*, variábilis régió funkcionális génjeivel rekombináltatták, az *in vivo* végbemenő V-J- vagy V-D-J-rekombinációhoz hasonlóan [Hooeboom: J. Mol. Biol. 227, 381 (1992); Nissim: EMBO J. 13, 692 (1994); Griffiths: EMBO J. 13, 3245 (1994)]. Általánosságban, a teljesen szintetikus és félszintetikus eljárásokban úgy járnak el, hogy az elsősorban a V-D/D-J kapcsolódásnál és a D-szegmensben megfigyelhető sokféleséget (diverzitást), amely nagyrészt felelőssé tehető a nehézlánc CDR3-régió rendkívüli hosszáért és szekvenciavariabilitásáért, valamint a V-J-kapcsolódásnál megfigyelhető, a könnyűlánc CDR3-régió szekvenciavariabilitásához hozzájáruló diverzitást degenerált oligonukleotidok alkalmazásával előállított véletlenszerű szekvenciák közbeiktatásával utánozzák [Hooeboom: lásd fent (1994); Nissim: lásd fent; Griffiths: lásd fent; Barbas: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89, 4457 (1992)].

Fennáll azonban a veszély, hogy az ilyen, humán V-génszekvenciák alapján előállított félszintetikus vagy teljesen szintetikus repertoárokból humán antigénhez történő kötődés alapján szelektált VL/VH vagy VH/VL párok immunogén epitópokat képeznek, amelyek nem kívánt immunválaszt válthatnak ki emberben [Hooeboom: TIBTECH 15, 62 (1997)]; különösen a teljesen randomizált szekvenciarepertoárokból származó CDR3-régiók hajlamosak potenciálisan immunogén epitópok kialakítására, mivel ezeknek sosem kellett a humán immunrendszer ellenőrzését elkerülniük úgy, hogy az ne ismerje fel azokat idegen antigénekként, és ez ahhoz vezet, hogy az ilyen régiókat tartalmazó ellenanyagokat az immunrendszer eliminálja. Ugyanez érvényes a humán ellenanyagokat expresszáló transzgenikus egerekből származó humán ellenanyagokra is, mivel ezek az immunoglobulin-molekulák úgy lettek szelektálva, hogy azokat az egérimmunrendszer tolerálja, de nem voltak kitéve a humán immunrendszer szelektáló hatásának.

A WO 97/00271 számú nemzetközi közzétételi irat tumorantigének ellen magas affinitást mutató emberi antitesteket tár fel, különösen c-erbB-2-höz specifiku-

san kötődő antitesteket. Az antitestek a leírás szerint használhatók önmagukban vagy alkalmazhatók c-erbB-2-t túlexpresszáló sejteket célzó vagy ilyen sejtekhez effektormolekulákat eljuttató kiméra molekulák összetevőiként.

Egy további szabadalmi bejelentésben (WO 93/11236) eljárásokat tárunk fel saját elleni antitestek és antitestfragmensek előállítására. A saját elleni antitestfragmenseket a kiválasztott emlősből származó saját antigénhez való kötődésre szelektálták.

Az előttünk álló műszaki probléma tehát az volt, hogy olyan eljárást dolgozzunk ki, amely lehetővé teszi emberben alacsony immunogenitását, vagy emberben immunogenitást egyáltalán nem mutató receptorok előállítását, és amely alkalmazható antigének célzott elérésére az emberi szervezetben. A fenti technológiai probléma megoldását a találmánynak csatolt igénypontokban megfogalmazott megvalósítási módjaival értük el.

A találmány tárgyát képezi tehát eljárás humán antigén elleni receptor előállítására, amely emberben kis mértékben immunogén vagy egyáltalán nem immunogén, amely eljárás szerint az 1. igénypontban meghatározott lépéseket hajtjuk végre, nevezetesen (b) funkcionálisan újrendeződött VH- és VL-immunglobulinláncok kombinációját szelektáljuk, amely kombinációban legalább a VH-lánc naív, érett, humán B-limfocitákból, a VL-lánc pedig természetben előforduló humán B-sejt-repertoárból származik, és a láncok rekombináns vektorról expresszálódnak, és (c) humán antigénhez való kötődés megvalósítására *in vitro* prezentáló rendszert („display system”) alkalmazunk, és ahol a (b) szelekciós lépés végrehajtása előtt (a) lépésben vagy a VH-láncot vagy a VL-láncot szelektáljuk az antigénre való kötődésre, egy nem humán, célantigén-specifikus ellenanyag V-láncával együttesen. A találmány szerinti eljárás különösen előnyösen alkalmazható olyan receptorok előállítására, amelyek antigének célzott elérésére alkalmazhatók emberben anélkül, hogy maguk akár a legkisebb mértékben is, vagy jelentősebb mértékben immunogének lennének. Ilyen receptorok előnyösen alkalmazhatók különböző betegségek, például tumorok vagy autoimmun betegségek kezelésére; transzplantációt követően „graft” kilökődésének megelőzésére; fertőző betegségekben sejtreceptorok célzott elérésére; valamint allergiás, gyulladásos, endokrin és degeneratív betegségek kezelésére, a fenti patológiás folyamatok létrejöttében szerepet játszó kulcsmolekulák célzott elérésével.

A találmány szerinti receptorok VH/VL immunglobulinláncai természetesen tovább vizsgálhatók azok nukleinsavszekvenciáira vagy aminosavszekvenciáira vonatkozólag, a technika állása szerint jól ismert eljárásokkal [lásd például Sambrook: „Molecular Cloning, A Laboratory Manual”, 2. kiadás, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989)]. Miután a nukleinsavszekvenciát vagy aminosavszekvenciát meghatároztuk, a találmány szerinti receptorok más eljárásokkal is előállíthatók, például szintetikus vagy félszintetikus eljárásokkal, miáltal szintetikus vagy félszintetikus receptorokat kapunk; vagy előállíthatók humán im-

munoglobulin-receptorokat expresszázó transzgenikus egerekben; az ilyen, a fentiekben már ismertetett jellemzőkkel bíró, szintetikus vagy félszintetikus eljárásokkal vagy transzgenikus egerekben előállított receptorok ugyancsak a találmány tárgyát képezik.

Miután a receptor a humán antigénhez kötődött, az tovább tisztítható. Például, az antigénspecifitást nem mutató, nem kötődött receptorok mosással eltávolíthatók. A kötődött receptorok a humán antigénekről elválhatnak és tovább tisztíthatók, míg a kívánt receptor expresszióját, kötését és szelekcióját magában foglaló további lépések sorozatára lehet szükség ahhoz, hogy a kívánt receptort és/vagy a megfelelő rekombináns vektort tiszta, izolált formában megkapjuk.

A találmány szerinti eljárás Ig variábilis régiók humán immunrendszer általi előzetes szelekcióján alapul. A receptorok humán kombinatorikus ellenanyagkönyvtárakból *in vitro* szelektált repertoárból származnak, amelyeket kizárólag vagy főként, a naiv érett, humán B-limfociták által expresszált, természetes előforduló ellenanyag-repertoár alapján állítunk elő.

Az Ig variábilis domének származhatnak azonban más forrásokból is, amelyek ilyen, előszelektált B-sejt-populációkat képviselnek.

A VH- vagy VL-láncok forrásául szolgáló B-sejtek eredetére vonatkozó elmélet tudományos hátterét a következőkben ismertetjük:

IgD- és IgM-ellenanyagokat membrán-antigénreceptorokként expresszázó érett, naiv B-limfociták – másodlagos limfoid szervek közötti és azok fele vezető útjuk során – az elsődleges tüszőkbe (follikulusokba) jutnak, hacsak nem találkoznak klonális deléciót okozó multivalens saját antigénekkal vagy szolubilis monovalens saját antigénekkal, ami viszont azzal a következménnyel jár, hogy ezek a sejtek anergiásak és rövid élettartamúak lesznek az elsődleges tüszőkből történő kirekesztődésük miatt.

Kizárólag IgM-ellenanyagokat expresszázó éretlen B-sejtek saját antigénnel történő érintkezése a csontvelőben klonális delécióhoz vagy anergiához vezet, az antigén valenciájától függően. Anergias B-sejtek, bár felszíni IgD-t expresszálnak, nem képesek az antigén jelentérére megfelelő válaszreakciót adni ezeken a receptorokon keresztül; az elsődleges tüszőkbe történő belépés és T-sejtek segítségével ezen sejtek féléletideje rövid, csupán néhány nap.

Ezzel szemben, saját antigénnel nem találkozott érett, naiv B-limfociták féléletideje, amelyek bejutnak az elsődleges tüszőkbe, hosszú, akár több hét. A saját-tolerancia jelenségének kialakulását magyarázó fenti mechanizmus ellenére, a hosszú élettartamú érett, naiv B-limfociták ezen populációja még mindig tartalmaz potenciálisan autoreaktív B-sejteket, amelyek azonban a T-sejtes tolerancia következtében kevésbé valószínű, hogy specifikus segítő T-sejteket találnak, ami megakadályozza, hogy azok proliferálódjanak és ellenanyagokat szekretáljanak. Úgy tűnik, hogy a B-sejtek válaszképtelenségét számos, kis mennyiségben jelen lévő saját antigénre a fenti mechanizmus magyarázza, a tolerancia tehát a segítő („helper”) T-sejteket érinti és nem

elsősorban a B-sejteket. A találmány szerinti megoldással összhangban, ezeket a hosszú élettartamú, válaszképtelen, potenciálisan autoreaktív, érett, naiv B-sejteket azonosítottuk a természetben előforduló humán ellenanyag-repertoár legígéretesebb forrásaként, és alkalmaztuk olyan kombinatorikus ellenanyagkönyvtárak előállítására, amelyek különösen alkalmasak humán antigénekkal szemben irányuló humán ellenanyagok szelekciójára, például a fágprezentációs eljárás alkalmazásával.

A találmány szerinti megoldással összhangban alkalmazott, nagymértékben szelektált ellenanyag-repertoár főként hosszú *in vivo* élettartamú B-sejtekből származott, amelyek ekként hosszabb ideig ki voltak téve a humán immunrendszerrel történő érintkezésnek, és amelyeknél így várhatóan jelentősen csökkent azon ellenanyag-molekulák előfordulási aránya, amelyek – elsősorban a hipervariábilis CDR3-régiókban – a humán immunrendszerre nézve immunogén epitópokat hordoznak. Ilyen ellenanyag-repertoárból szelektált humán ellenanyagok várhatóan kevésbé immunogének emberben, mint félszintetikus vagy teljes egészében szintetikus humán ellenanyagkönyvtárakból szelektált humán ellenanyagok.

Azok az érett, naiv B-sejtek, amelyek idegen antigénnel találkozáskor aktiválódtak, nem expresszálnak többé IgD-t, klonális proliferációba kezdenek, és szolubilis immunoglobulinokat szekretáló plazmasejteké differenciálódnak; az ellenanyagválasz korai szakaszában főként IgM-ellenanyagok, míg később elsősorban IgG- és IgA-izotípusok vannak jelen; az IgE-ellenanyagok viszonylag kis, de biológiailag el nem hanyagolható mértékben járulnak hozzá az ellenanyagválaszhoz.

Az IgM-, IgG-, IgA- vagy IgE-ellenanyagokat expresszázó IgD-negatív érett antigénelkötelezett B-limfocitákkal ellentétben, az IgD-pozitív érett, naiv B-sejtek még nem mentek át klonális proliferáción, kombinatorikus IgD-génkönyvtárakban tehát nem képviseltetik magukat nagy arányban olyan ellenanyag-specifitások, amelyeknek – a rendszerint idegen antigének által kiváltott – immunválasz létrejöttében aktuálisan szerepe van, abban a korábbiakban szerepe volt; ezáltal nem csökkentik a repertoár sokféleségét, és nem foglalják el a génkönyvtár egy részét feleslegesen saját antigénhez várhatóan nem kötődő ellenanyagjelöltek. Ez nyilvánvalóan eltér a technika állása szerint eddig alkalmazott megoldásoktól, amelyek humán IgM kombinatorikus ellenanyagkönyvtárak alkalmazását javasolták humán antigénekkal szemben irányuló humán ellenanyagok, természetben előforduló humán ellenanyag-repertoárokból történő *in vitro* szelekciójára [Hooeboom: lásd fent (1977)].

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, antigénreceptorként immunoglobulint vagy immunoglobulin-fragmentumot alkalmazunk.

Az immunoglobulin fragmentuma lehet bármely, a technika állása szerint ismert fragmentum, például Fab- vagy F(ab)₂-fragmentum.

A találmány egy különösen előnyös megvalósítási módja szerint, immunoglobulin-fragmentumként Fv-fragmentumot alkalmazunk.

A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint, legalább a VH-, és adott esetben, a VL-immunglobulin-lánc is humán IgD-repertoárból származik.

Arra a következtetésre jutottunk, hogy ez a receptor, és alacsony immunogenitásra szelektálódott, előnyösen alkalmazható ellenanyag-repertoár leginkább humán IgD-ellenanyagkönyvtárban van képviselve. Az IgD membránantigén-receptorként expresszálódik felszíni IgM-ellenanyagokkal együtt érett, naiv B-limfocitákon, amelyek – miközben másodlagos limfoid szervekbe kerülnek, vagy egyik ilyen szervből a másikba kerülnek át – elsődleges nyiroktüszőkbe jutnak, hacsak nem találkoznak klonális delécióját eredményező multivalens saját antigénekkal vagy szolubilis monovalens saját antigénekkal, ami viszont azzal a következménnyel jár, hogy ezek a sejtek anergiásak és rövid élettartamúak lesznek az elsődleges tüszőkből történő kirekesztődésük miatt. A humán IgD-könyvtárakban, az érett, naiv B-limfociták ellenanyag-repertoárján felül csupán azon rövid életű B-sejtek ellenanyag-repertoárja van képviselve, amelyek szolubilis monovalens saját antigénekkal történt találkozásuk következtében anergiássá váltak, de csupán kis valószínűséggel járulnak hozzá multivalens saját antigénekhez hasonló humán sejt felszíni molekulákhoz kötődő specifikus kötőhelyek létrehozásához. Ez utóbbi antigének inkább klonális deléciót eredményeznek, mint B-sejtes anergiát.

A találmány szerinti eljárás egy további előnyös megvalósítási módja szerint, *in vitro* megjelenítő rendszerként fágprezentációs rendszert alkalmazunk.

A fágprezentációs rendszert a korábbiakban általában specifikus célpontokhoz kötődő peptidek és proteinek szelektálására alkalmazták. Az így összegyűlt tapasztalatok alapján, az immunglobulin VH- és VL-láncok viszonylag egyszerűen klónozhatók olyan vektorokba, amelyek fágprezentációs rendszerek létrehozására is alkalmas molekulákat tartalmaznak. Ilyen molekulák és vektorok a technika állása szerint jól ismertek [Winter: lásd fent; Barbas: METHODS: A Companion to Methods in Enzymology, 2, 119–124. (1991)], és szükségtelennek tartjuk azok részletesebb magyarázatába bocsátkozni.

A találmány szerinti eljárás egy további előnyös megvalósítási módja szerint, az átrendeződött láncok kombinációit egy vagy több különböző génkönyvtárról expresszáltatjuk.

Az utóbbi megközelítési mód alkalmazása különösen akkor előnyös, ha specifikus célpontokhoz kötődő VH- vagy VH-lánc rendelkezésünkre áll, és olyan megfelelő második V-láncot kívánunk szelektálni, amely helyreállítja a kötőfunkciót vagy javítja azt.

A találmány szerinti eljárás egy még további előnyös megvalósítási módja szerint, a humán antigén, amellyel szemben receptort állítunk elő, tumorantigén.

Amennyiben a humán antigén tumorantigén, az előnyösen a tumor felszínén expresszálódó antigén. Ebben az esetben előnyösen a VH- és VL-láncokat valamilyen toxinhoz kötjük. Az összekapcsolás történhet nukleinsavszinten, géntechnológiai eljárással; vagy proteinszinten, például kémiai úton történő összekapcsolással.

A találmány egy különösen előnyös megvalósítási módja szerint, a tumorantigén 17–1A antigén.

A találmány egy további különösen előnyös megvalósítási módja szerint, a VH-lánc a 7. ábrán (lásd 1–381. nukleotidok) vagy 8. ábrán (lásd 1–339. nukleotidok) bemutatott szekvenciát tartalmaz; és /vagy a VL-lánc a 6. ábrán (lásd 1–321. nukleotidok) vagy 9. ábrán (lásd 1–321. nukleotidok) bemutatott szekvenciát tartalmaz. A fenti specifikus VH- és VL-régiókat tartalmazó receptorok, amelyekben a VL-régió mindkét VH-régióval kombinálódhat, az első olyan humán ellenanyagok, amelyek specifikusak a humán 17–1A antigénre.

A találmány szerinti eljárás egy további előnyös megvalósítási módja szerint a szelekciós lépésben:

(i) az antigénreceptort expresszáló, azt megjelenítő (prezentáló) hordozót a következők valamelyikéhez kötjük:

- (a) immobilizált célantigénhez vagy annak fragmentumaihoz;
- (b) a célantigént vagy annak fragmentumait expresszáló, adott esetben jelölt sejtekhez; vagy
- (c) szolubilis, előnyösen jelölt célantigénhez vagy annak fragmentumaihoz;

(ii) a nem specifikus módon kötődött prezentáló hordozókat mosással eltávolítjuk (a és b), majd a specifikus módon kötődött prezentáló hordozókat nem specifikus módon (például alacsony pH-jú pufferrel) vagy specifikus módon (például célantigén-specifikus ellenanyaggal) eluáljuk; vagy

(iii) a célantigénnel kötődött, a receptort prezentáló hordozót a célantigént tartalmazó oldatból vagy a célantigént expresszáló sejtek szuszpenziójából *kényszerdúsítjuk* („positive enrichment”) (b és c), például jelölt célantigénhez vagy a célantigént expresszáló jelölt sejtekhez kötődő mágneses gyöngyök alkalmazásával; ily módon antigénreceptorokat tartalmazó prezentáló hordozókat izolálunk, amelyeket adott esetben replikációval megsokszorozhatunk, és további *in vitro* szelekciós lépéseknek vethetünk alá.

A két lépésből álló, az 1. igénypontban meghatározott eljárást végezhetjük eltérő fajtából származó, célantigén-specifikus templátellenanyag, például a humán célantigénnel szemben irányuló egér monoklonális ellenanyag alkalmazásával. Először, a humán VL- vagy VH-repertoárt egyetlen, az egér templátellenanyagból származó kisegítő VH- vagy VL-lánccal kombináltatjuk; például filamentózus fág felszínén prezentáltatjuk, és *in vitro* antigénkötődésre szelektáljuk. A fenti módon, a teljes génkönyvtár rendelkezésünkre áll a humán VL- vagy VH-repertoár számára, és olyan humán VL- vagy VH-láncok izolálhatók, amelyek várhatóan képesek a humán célantigénhez történő specifikus kötődés létrehozásában közreműködni. A második lépésben, a templátellenanyag kisegítő variábilis régióját a megfelelő humán variábilis régió repertoárral helyettesítjük, majd egy második *in vitro* szelekciót végzünk; ebben az esetben is, a teljes génkönyvtár kizárólagosan rendelkezésre áll egyetlen VH- vagy VL-régió repertoár számára; a két lépésből álló eljárással tehát sokkal nagyobb számú VL- és VH-régió jelöltet szűrhetünk an-

tigénköti aktivitásra korlátozott méretű génkönyvtár alkalmazása mellett, mint amennyit egy egylépéses eljárással szűrhetnénk.

A fenti, humán IgD kombinatorikus ellenanyag-könyvtárak fágprezentációs rendszer alkalmazásával történő szűrésén alapuló, két lépésből álló szelekciós eljárást sikeresen alkalmaztuk a humán 17-1A antigénhez specifikusan kötődő humán ellenanyagok variábilis régióját kódoló DNS-szekvenciák klónozására. Először, az M79 egér monoklonális ellenanyag [Göttlinger: Int. J. Cancer 38, 47 (1986)] Fd-nehézlánc-szegmensét (VH+CH1), amely specifikus módon kötődik a humán 17-1A antigénhez, humán kappa- és lambda-könnyűlánc repertoárokkal kombináltattuk. A kapott génkönyvtárakat filamentózus fágon prezentáltattuk (jelenítettük meg), és *in vitro*, immobilizált rekombináns humán 17-1A antigénen kikötéssel és mosással végzett dúsítással („panning” eljárással) szelektáltuk. Mindegyik dúsítási kört követően szolubilis Fab-fragmentumokat expresszáztattunk több klónból, és azokat ELISA-eljárással antigénkötődésre teszteltük. Szekvenciaanalízis szerint, a dúsítási eljárás során feldúsult valamennyi erős kötődési egység ugyanazt a humán kappa-könnyűláncot tartalmazta. Ezt a humán könnyűláncot, amelyet a továbbiakban K8-láncnak nevezünk, humán IgD-nehézlánc-génkönyvtárral kombináltattuk, ezt ismét filamentózus fágon prezentáltattuk, és *in vitro*, immobilizált rekombináns humán 17-1A antigénen, dúsítási eljárással szelektáltuk. Mindegyik dúsítási lépést követően szolubilis Fab-fragmentumokat expresszáztattunk több klónból, és azokat ugyancsak ELISA-eljárással teszteltük antigénkötődésre nézve. A dúsítási eljárás során feldúsult kötődési egységek szekvenciaanalízise két különböző nehézlánc variábilis régióra derített fényt, amelyeket D4.5- és D7.2-régióknak neveztünk, és amelyek a K8-könnyűláncsal kombinálódva egymástól különböző, a humán 17-1A antigénre specifikus humán antigénköti helyeket alakítanak ki. A humán könnyű- és nehézlánc repertoárokat több, humán donoroktól származó vérből és csontvelőmintákból izolált teljes RNS-készítményből klónoztuk kappa- vagy lambda-könnyűláncra specifikus, valamint IgD-nehézláncra specifikus RT-PCR-eljárás alkalmazásával. Mivel az IgD-nehézláncokkal *in vivo* kombinálódott könnyűlánc-repertoárt nem tudjuk szelektív módon amplifikálni – hacsak nem tisztítunk IgD-pozitív B-sejteket RNS-készítmény előállítására –, a könnyűlánc-génkönyvtárak nem korlátozódtak érett, naív, vagy anergiás B-limfociták ellenanyag-repertoárjára. A nehézlánc antigénfelismerésben betöltött domináns szerepét tekintve azonban nem vonhatók kétségbe az IgD-repertoár alkalmazásának előnyei saját antigének ellen irányuló humán ellenanyagok szelektálására. További, és lényegesebb szempont, hogy mivel az ilyen könnyűláncok ki vannak téve a humán immunrendszer szelekciós hatásának, mégis garantált, hogy azok alacsony immunogenitást mutatnak emberben.

A találmány szerinti eljárás egy még további előnyös megvalósítási módja szerint, a kisegítő lánc egér VH- vagy VL-lánc.

A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint, a megfelelő kombinációt a következők szerint eljárva szelektáljuk:

(a) egy és ugyanazon VH-láncot számos különböző VL-láncsal kombinálódva tesztelünk a humán antigénhez történő kötődésre; vagy

(b) egy és ugyanazon VL-láncot számos különböző VH-láncsal kombinálódva tesztelünk a humán antigénhez történő kötődésre.

A fenti megoldás előnyösen alkalmazható akkor is, ha a VL- vagy VH-láncról tudjuk, hogy az specifikus kölcsönhatásba lép a humán célmolekulával. Ezután, megfelelő második láncot szelektálunk a célmolekulához történő – előnyösen javított – kötődés alapján.

A találmány szerinti eljárás egy további előnyös megvalósítási módja szerint, a szelekciót követően izoláljuk a humán VH- és VL-láncokat vagy azoknak megfelelő nukleinsavszekvenciákat, és azokat ugyanazon vagy más VH- és VL-láncokkal fuzionáltatjuk, vagy immunoglobulin nehézlánc-konstansrégiókkal (CH) vagy könnyűlánc-konstansrégiókkal (CL) vagy azok részeivel vagy más biológiailag aktív molekulával, például peptidokkal, proteinnel, nukleinsavakkal, kisméretű szerves vegyületekkel, hormonokkal, neurotranszmitterekkel (idegi átvivőanyagokkal), peptido-mimetikumokkal, PNA-kal fuzionáltatjuk [Milner: Nature Medicine 1, 879 (1995); Hupp: Cell 83, 237 (1995); Gibbs és Oliff: Cell 79, 193 (1994)]. A másik funkcionális molekulát hozzákapcsolhatjuk a VH- és VL-láncokhoz úgy, hogy azok közt fizikai kapcsolat jöjjön létre, például kémiai eljárásokkal; vagy azok fuzionálthatók a technika állása szerint ismert rekombináns DNS-technológiákkal.

A találmány fenti megvalósítási módja különösen akkor alkalmazható előnyösen, ha a humán szervezetben kívánt antigéneket megcélzó specifikus gyógyszereket kívánunk kifejleszteni. Például, ha tumorantigéneket kívánunk célzottan elérni, a VH- és VL-láncokat nukleinsavszekvencia vagy aminosavszerint toxinegységgel fuzionálthatjuk, miáltal immunotoxint kapunk; vagy sejtreceptor extracelluláris részével; vagy szolubilis citokinnel vagy azok részeivel fuzionálthatjuk, miáltal a tumor elleni immunitást fokozó konstrukciókat nyerünk; vagy ellenanyag Fv-fragmentumával fuzionálthatjuk, miáltal bispecifikus ellenanyag-származékhoz jutunk.

A találmány szerinti eljárás egy még további előnyös megvalósítási módja szerint, a konstansrégiók láncai humán IgG1- vagy IgG3-ellenanyagból származnak.

Előnyösen, humán IgG1- vagy IgG3-ellenanyag alosztályokból származó konstansrégióláncokat alkalmazunk akkor, ha a célantigént expresszáló sejteket el kívánjuk pusztítani a humán szervezetben. A technika állása szerint jól ismert, hogy ezek az IgG-alosztályok hatékony közvetítők az ellenanyagfüggő sejtközvetített citotoxikus reakciónak („Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity”; ADCC), és hozzájárulnak a fenti alosztályok által felismert és megkötött sejtek elpusztításához.

A találmány szerinti eljárás egy további előnyös megvalósítási módja szerint, a VH- és/vagy VL-láncokat előnyösen alacsony molekulatömegű, nem protein-

természetű gyógyászati anyagokkal, például radioizotópokkal, vagy kemoterápiás célra alkalmazott vegyületekkel kapcsoljuk össze; miáltal a fenti gyógyszerek sokkal specifikusabb *in vivo* célba juttatását érjük el.

A találmány szerinti eljárás egy további előnyös megvalósítási módja szerint, a VH- vagy VL-láncokat lényegében naiv, érett, humán B-limfocitákból nyert mRNS alapján, RT-PCR-amplifikációs technológiával nyert nukleinsavszekvenciákról expresszáltatjuk.

A VH- vagy VL-láncokat előnyösen RT-PCR-eljárással amplifikáljuk, miután azoknak megfelelő kiindulási anyagot azonosítottunk és izoláltunk. Előnyösen a humán csontvelőből, vagy előnyösebben, humán vérből származó, maggal rendelkező sejtekből izolált mRNS-t alkalmazunk VH- vagy VL-láncok RT-PCR-eljárással történő amplifikálására, mivel emberben ez a két szövettípus képezi azt a legegyszerűbben hozzáférhető forrást, ahonnan B-sejtek izolálhatók. Az RNS-izolálást megelőzően előnyösen érett, naiv B-limfocitákat izolálunk a fenti szövettípusok maggal rendelkező sejtjeiből, például mágneses gyöngyök alkalmazásával vagy áramlásos citometriás technológián alapuló sejtszétválogással. Ezzel biztosítjuk, hogy az RT-PCR-technológiával amplifikált VH- és VL-láncok a megfelelő B-sejt-populációból származzanak. Más eljárás szerint, amennyiben a fenti szövettípusokból származó, maggal rendelkező sejtek teljes frakciójából nyert mRNS-t alkalmazunk VH- vagy VL-láncok RT-PCR-technológiával történő amplifikálására, a VH-régiót előnyösen humán IgD-nehézlánc Fd-fragmentum (VH-CH1) felének megfelelő fragmentumként amplifikáljuk IgD-specifikus 3'-végi PCR láncindító alkalmazásával, például az 1. táblázatban felsorolt láncindítók bármelyikének alkalmazásával, amelyek kizárólag a humán IgD-nehézláncnak megfelelő PCR-termékek keletkezését eredményezik, amiről viszont tudjuk, hogy csak érett, naiv humán B-limfocitákban és anergiás humán B-sejtekben expresszálódik.

A találmány szerinti eljárás megvalósításakor, az emberi szervezetben kismértékben immunogén vagy egyáltalán nem immunogén, humán antigén elleni receptort állítunk elő. A receptor funkcionálisan átrendeződött VH- és VL-láncok kombinációját tartalmazza, amely láncok előnyösen, naiv, érett, humán B-limfocitákból származnak, és előállíthatók a találmány szerinti eljárással, a fenti ismertetettek szerint.

A találmány szerinti eljárással előállítható ellenanyagok alkalmazásának előnyeit a fentiekben már vázoltuk. Hangsúlyozzuk, hogy ilyen, humán antigénnel szemben irányuló és humán eredetű, emberi szervezetben kismértékben immunogén vagy egyáltalán nem immunogén ellenanyagokat a technika állása szerint még nem izoláltak. A találmány szerinti ellenanyagok tehát ellenanyagok kifejlesztésének teljesen új útját nyitják meg, amely ellenanyagok az orvostudomány és gyógyszerészet különböző területein alkalmazhatók.

A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint, a receptor ellenanyag vagy annak fragmentuma.

A találmány szerinti eljárás egy további előnyös megvalósítási módja szerint, az a receptor humán tu-

morantigénre, legelőnyösebben a humán 17-1A antigénre specifikus.

A találmány tárgyát képezi továbbá receptor, amelyben a VH-lánc a 7. ábrán (lásd 1-381. nukleotidok) vagy 8. ábrán (lásd 1-339. nukleotidok) bemutatott szekvenciát tartalmaz; és/vagy a VL-lánc a 6. ábrán (lásd 1-321. nukleotidok) vagy 9. ábrán (lásd 1-321. nukleotidok) bemutatott szekvenciát tartalmaz.

Az említetteken felül, a leírásban adott kitanítás alapján előállítható egy reagenskészlet, amely funkcionálisan átrendeződött VH- és VL-immunglobulin-láncok kombinációját tartalmazza, amelyben a VH- és VL-láncok legalább egyike naiv, érett, humán B-limfocitákból, és amely láncok *in vitro* prezentáló rendszer részét képező rekombináns vektorokról expresszáltathatók.

A reagenskészletet előnyösen a találmány szerinti megoldás kivitelezésére, ezáltal a kívánt specifikus receptorok izolálására alkalmazzuk.

Előnyösen, a reagenskészletben *in vitro* megjelenítő rendszerként fágprezentációs rendszert alkalmazunk.

A találmány tárgyát képezi továbbá ellenanyag, amely humán szekvenciákból származik, és a natív humán 17-1A antigénre specifikus.

A találmány szerinti eljárás alkalmazásával elsőként fejlesztettünk ki olyan humán ellenanyagot, amely specifikus a natív humán 17-1A antigénre. Amint azt a korábbiakban már hangsúlyoztuk, ez nem volt csekély vállalkozás, mivel humán tumorasszociált antigénnel szemben irányuló humán ellenanyagok rendszerint az immunrendszer saját tolerancia-jelenségét közvetítő mechanizmusainak vannak alávetve, ami *in vivo* az auto-reaktív ellenanyagokat expresszáló B-limfociták eliminációját eredményezi. Az ismert tumorasszociált antigének közül, a 17-1A antigén – epiteliális eredetű tumorokon történő expresszáldásán felül – más tumorantigénnél sokkal elterjedtebben expresszálódik normális epiteliális szövetek széles skáláján, mint más tumorantigének. A korábbi kísérletek natív, humán 17-1A antigénre specifikus, alacsony immunogenitású antitestek előállítására vagy egéredetű variábilis régiókat továbbra is hordozó egér/humán kiméra antitestek előállítására korlátozódtak [LoBuglio és munkatársai, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 4220-4224 (1989)] vagy kudarcot vallottak, mivel olyan humán antitesteket nyertek, amelyek kizárólag a rekombináns 17-1A antigén mesterséges epitópjaival reagáltak [Hoess és munkatársai, Proc. Am. Ass. Cancer Res., 38, 30 (1997), de Kruijff és munkatársai, J. Mol. Biol., 248, 97-105 (1995)]. Ezért, a 17-1A antigént inkább pánepiteliális antigénnek (minden epiteliális sejtben előforduló antigénnek) tekintjük, mint tumorantigénnek, amelynek azt első leírásakor vélték. Ezzel szemben, más, epiteliális tumorokon előforduló úgynevezett tumorantigének, például az erb-B2 (Her 2/neu), Muc-1- (PEM) vagy a Thomson-Friedreich-antigén, rendszerint sokkal korlátozottabb mértékben expresszálódnak normális epiteliális szöveteken. Ennek megfelelően azt vártuk, hogy a saját tolerancia mechanizmusa révén, a 17-1A-reaktív ellenanyagokat expresszáló B-limfocitákra ható negatív szelekciós nyomás-

nak – még alacsony affinitású ellenanyagok esetében is – kivételesen erősen kell érvényesülnie, mivel az antigén előfordulásának általános volta miatt csaknem lehetetlen, hogy az ilyen B-sejtek tartósan elkerüljék a 17–1A antigénnel történő találkozást. Meglepő volt tehát, amikor azt találtuk, hogy 17–1A-specifikus ellenanyagok, vagy legalábbis a megfelelő nehézláncok humán B-sejtek, például érett, naiv B-limfociták ellenanyag-repertoárjából izolálhatók. Ezekről a B-sejtekről ismert, hogy azok féléletideje *in vivo* hosszú, és azoknak már sikerült elkerülniük az eliminálódást érésüket megelőzően, ennek ellenére, hogy a 17–1A antigén még érésük helyén is jelen van; a 17–1A antigén esetében anergia nem jön létre, mivel ezt a típusú B-sejt-toleranciát csak szolubilis saját antigének váltják ki. Csak azok a hosszú életű B-sejtek, amelyeknek potenciális 17–1A-reaktivitásuk ellenére sikerült életben maradniuk, képviselik humán immunoglobulin variábilis régiók azon repertoárját, amelynek alkalmazásával olyan humán ellenanyagok és ellenanyag-származékok állíthatók elő, amelyeket szisztémás úton, emberi szervezetbe történő ismételt adagolást követően a humán immunrendszer várhatóan jól tolerál, mivel azokat az immunrendszer ellenőrző funkciója immunogén szekvenciákra már szűrte, és azokból az immunogén szekvenciákat már eltávolította. Ugyancsak a találmány tárgyát képezik tehát natív 17–1A antigénre specifikus humán ellenanyagok, amelyek alkalmasak ismételt *in vivo* adagolásra, függetlenül attól, hogy milyen eljárással lettek előállítva, mivel az említett magas *in vivo* kompatibilitással jellemzett humán ellenanyag-szekvenciák nagyon valószínű, hogy jelen vannak egészséges emberek B-sejt-repertoárjában is; azok előállíthatók például a találmány szerinti eljárással. Összefoglalva, elsőként fejlesztettünk ki olyan humán ellenanyagot, amely előnyösen alkalmazható a 17–1A antigént hordozó tumorsejtek kimutatására és/vagy elpusztítására.

A találmány szerinti ellenanyag előnyösen kismértékben immunogén vagy egyáltalán nem immunogén emberben. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, az ellenanyagot a fent ismertetett eljárással állítjuk elő. A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány szerinti ellenanyag a 17–1A antigén extracelluláris doménjának egy epitópját ismeri fel; előnyösen, a 8., 11., 13., 14., 59., 60., 77. vagy 79. számú peptidek legalább egyikének megfelelő aminosavszekvenciát tartalmazó epitópot ismer fel. Előnyösen, a találmány szerinti ellenanyag VH-lánc legalább egy, a 7. ábrán (lásd 1–381. nukleotidok) vagy 8. ábrán (lásd 1–339. nukleotidok) bemutatott szekvenciák szerinti CDR-t tartalmaz, és/vagy a VL-lánc legalább egy, a 6. ábrán (lásd 1–321. nukleotidok) vagy 9. ábrán (lásd 1–321. nukleotidok) bemutatott szekvenciák szerinti CDR-t tartalmaz. Különösen előnyösen olyan ellenanyagot állítunk elő, amelyben a VH-lánc a 7. ábrán (lásd 1–381. nukleotidok) vagy 8. ábrán (lásd 1–339. nukleotidok) bemutatott szekvenciát tartalmaz, és/vagy a VL-lánc a 6. ábrán (lásd 1–321. nukleotidok) vagy 9. ábrán (lásd 1–321. nukleotidok) bemutatott szekvenciát tartalmaz.

Arra a következtetésre jutottunk, hogy ez a receptor és alacsony immunogenitásra szelektált előnyös ellenanyag-repertoár legjobban humán IgD-ellenanyag-könyvtáron jeleníthető meg. Az IgD membrán-antigén-receptorként expresszálódik felszíni IgM-ellenanyagokkal együtt érett, naiv B-limfocitákon, amelyek – másodlagos limfoid szervekbe, vagy egyik ilyen szervből a másikba történő vándorlásuk során – elsődleges tüszőkbe jutnak be, hacsak nem találkoznak multivalens saját antigénnel, ami azok klonális delécióját eredményezi; vagy szolubilis monovalens saját antigénnel, ami viszont azzal a következménnyel jár, hogy ezek a sejtek anergiásak és rövid élettartamúak lesznek az elsődleges tüszőkből történő kirekesztődésük miatt. A humán IgD-génkönyvtárakban, az érett, naiv B-limfociták ellenanyag-repertoárján felül csupán azon rövid életű B-sejtek ellenanyag-repertoárja van képviseltetve, amelyek szolubilis monovalens saját antigénnel történt találkozásuk következtében anergiássá váltak, de kis valószínűséggel hordoznak multivalens saját antigénekhez hasonló humán sejtfelszíni molekulákhoz történő specifikus kötődést közvetítő kötőhelyeket, amely utóbbi antigének inkább klonális deléciót eredményeznek, mint B-sejtes anergiát.

A már említetteken felül, a találmány tárgyát képezi gyógyászati készítmény, amely a találmány szerinti receptorok legalább egyikét tartalmazza egymagában vagy kombinációban – adott esetben –, gyógyszerileg elfogadható hordozóanyaggal vagy kötőanyaggal együtt. Gyógyászati lag elfogadható hordozóanyagok a technika állása szerint jól ismertek, ilyenek például a következők: foszfátpufferes fiziológiás sóoldatok, víz, emulziók, például olaj/víz emulziók, különböző típusú nedvesítőanyagok, steril oldatok stb. Ilyen hordozóanyagokat tartalmazó készítmények jól ismert eljárásokkal formulázhatók. Ezek a gyógyászati készítmények megfelelő dózisban adagolhatók az egyénnek. A megfelelő készítményt különböző úton adhatjuk be, például intravénásan, intraperitoneálisan, bőr alá, izomba, lokálisan vagy a bőrből.

Így a találmány szerinti receptorok vagy a receptorok részeinek alkalmazhatók gyógyászati készítmény előállítására, amely alkalmas tumor, előnyösen epiteliális eredetű tumor kezelésére, kialakulásának megelőzésére és/vagy növekedésének lassítására valamely egyedben.

Az alábbiakban röviden ismertetjük a leíráshoz csatolt ábrákat.

Az 1. ábrán a pComb3H-plazmid klónozási régióját ábrázoltuk, a fontosabb restrikciós helyekkel együtt. Az ábrán a következő rövidítéseket alkalmaztuk: P: promotor; VL: variábilis könnyűláncdomén; CL: konstans könnyűláncdomén; VH: variábilis nehézláncdomén; CH1: konstans nehézláncdomén 1; L1/2: prokarióta vezetőszekvenciák. A pCOMB3H-vektorban gén-III-régió filamentózus fágok, például a VSCM13-fág gén-III génjének megfelelő terméket kódol.

A 2. ábrán a pComb3H-plazmid, és a teljesen expresszáldott M13-fág vázlatos térképe látható. A pComb3H-plazmid térképén ábrázoltuk az ompA-vezetőszekvencia (L), könnyűlánc, pelB-vezetőszekvencia (L), nehézlánc és gén-III-régiókat. A teljesen expresszáldott M13-fág fenotípusosan meghatározott Fab-ellenanyag-fragmentumot jelenít meg felszínén, amely könnyűláncot és nehézlánc Fd-szegmenst (VH+CH1) tartalmaz a gén-III-termék fertőzést nem közvetítő részével kapcsolatosan, és a megfelelő genotípust a prezentált Fab-fragmentum nehéz- és könnyűláncát kódoló egyszálú DNS-ként foglalja magában. A fertőző gén-III-proteint a VCSM13 segítő fág (*helper phage*) szolgáltatja.

A 3. ábrán szolubilis Fab-fragmentumok ELISA-vizsgálatának eredményét szemléltettük szolubilis Fab-fragmentumokat tartalmazó periplazmatikus készítményeket vizsgáltunk, amelyben a fragmentumok mindegyike kiméra M79-ellenanyag Fd-szegmensét és egyetlen humán kappa-láncot tartalmazott klónonként. ELISA-lemezeket egy éjszakán át szolubilis 17-1A antigénnel inkubáltunk. A kötődött Fab-ellenanyag-fragmentumokat peroxidázzal konjugált poliklonális, humán immunglobulinnal szemben irányuló ellenanyaggal mutattuk ki. Végül, az ELISA-reakciót ABTS-szubsztrátoldat hozzáadásával hívtuk elő [ABTS=2,2 azino-bisz(3-etil-benzotiazolin-6-szulfonsav)], és a szubsztrát átalakulását 405 nm hullámhosszon mértük (y tengely). A klónokat az x tengely mentén jelöltük, az első szám azt jelöli, hogy a klón hányadik dúsítási lépésből származik, a második pedig a klón azonosító száma. Az 1.5-9 klónok kiméra Fd-szegmenst tartalmaznak egy véletlenszerűen kiválasztott kappa-lánccal kombinálódva, és negatív kontrollként szolgáltak.

A 4. ábrán szolubilis Fab-fragmentumok ELISA-vizsgálatának eredményeit ábrázoltuk. Szolubilis Fab-fragmentumokat tartalmazó periplazmatikus készítményeket vizsgáltunk, amelyben fragmentumok mindegyike a k8-könnyűláncot és egyetlen humán Ig-delta-lánc Fd-fragmentumot tartalmazott. ELISA-lemezeket egy éjszakán át szolubilis 17-1A antigénnel inkubáltunk. A kötődött Fab-ellenanyag-fragmentumokat biotinezett poliklonális, humán

kappa-könnyűláncokkal szemben irányuló ellenanyag, majd peroxidázkonjugált streptavidin hozzáadásával mutattuk ki. Végül, az ELISA-reakciót ABTS-szubsztrátoldat hozzáadásával hívtuk elő [ABTS=2,2 azino-bisz(3-etil-benzotiazolin-6-szulfonsav)], és a szubsztrát átalakulását 405 nm hullámhosszon mértük (y tengely). A klónokat az x tengely mentén jelöltük, az első szám azt jelöli, hogy a klón hányadik dúsítási lépésből származik, a második pedig a klón azonosító száma. Az 1.2-6 klónok k8-könnyűláncot tartalmaztak egy véletlenszerűen kiválasztott Ig-delta-nehézlánc Fd-szegmensevel kombinálódva, és negatív kontrollként szolgáltak.

Az 5. ábrán szolubilis Fab-fragmentumok ELISA-vizsgálatának eredményeit ábrázoltuk. Szolubilis Fab-fragmentumokat tartalmazó periplazmatikus készítményeket vizsgáltunk, amelyben a fragmentumok mindegyike a D4.5 Fd-szegmenst és egyetlen humán kappa-láncot tartalmazott klónonként. ELISA-lemezeket egy éjszakán át szolubilis 17-1A antigénnel inkubáltunk. A kötődött Fab-ellenanyag-fragmentumokat biotinezett poliklonális, humán kappa-könnyűláncokkal szemben irányuló ellenanyag, majd peroxidázkonjugált streptavidin hozzáadásával mutattuk ki. Végül, az ELISA-reakciót ABTS-szubsztrátoldat hozzáadásával hívtuk elő [ABTS=2,2 azino-bisz(3-etil-benzotiazolin-6-szulfonsav)], és a szubsztrát átalakulását 405 nm hullámhosszon mértük (y tengely). A klónokat az x tengely mentén jelöltük, az első szám azt jelöli, hogy a klón hányadik dúsítási lépésből származik, a második pedig a klón azonosító száma; S betűvel azokat a klónokat jelöltük, amelyeket az első szelekciós kört megelőzően vizsgáltunk. Az S.1-3 klónok k8-könnyűláncot tartalmaztak egy véletlenszerűen kiválasztott Ig-delta-nehézlánc Fd-szegmensevel kombinálódva, és negatív kontrollként szolgáltak.

A 6. ábrán

a humán kappa-8 könnyűlánc variábilis régiójának DNS- és proteinszekvenciáját mutatjuk be. A számok a nukleotidpozíciókat (nt) jelölik; az aminosavakat azok egybetűs kódjaival adtuk meg. A CDR1-régiót a 70-102., a CDR2-régiót a 148-168., a CDR3-régiót pedig a 265-294. nukleotidpozícióknak megfelelő szegmens képviseli.

- A 7. ábrán humán D4.5 nehézlánc variábilis régió DNS-szekvenciáját mutatjuk be. A számok a nukleotidpozíciókat (nt) jelölik; az aminosavakat azok egybetűs kódjaival adtuk meg. A CDR1-régiót a 91–105., a CDR2-régiót a 148–198., a CDR3-régiót pedig a 292–351. nukleotidpozícióknak megfelelő szegmens képviseli. A nehézlánc variábilis régió és az Ig-delta konstansrégió CH1-doménja közti határt a 382. és 383. nukleotidok képviselik, a delta-konstansrégió proteinszekvenciája a 384. nukleotidnál kezdődik. 5 10
- A 8. ábrán humán D7.2 nehézlánc variábilis régió DNS-szekvenciáját mutatjuk be. A számok a nukleotidpozíciókat (nt) jelölik; az aminosavakat azok egybetűs kódjaival adtuk meg. A CDR1-t a 91–105. nukleotidoknak, a CDR2-régiót a 148–198., a CDR3-régiót pedig a 292–309. nukleotidpozícióknak megfelelő régió képviseli. A nehézlánc variábilis régió és az Ig-delta konstansrégió CH1-doménja közti határt a 340. és 341. nukleotidok képviselik, a delta-konstansrégió proteinszekvenciája a 343. nukleotidnál kezdődik. 15 20 25
- A 9. ábrán a humán kappa-5.1 könnyűlánc variábilis régió DNS- és proteinszekvenciáját mutatjuk be. A számok a nukleotidpozíciókat (nt) jelölik; az aminosavakat azok egybetűs kódjaival adtuk meg. A CDR1-régiót a 70–102., a CDR2-régiót a 148–168., a CDR3-régiót pedig a 265–294. nukleotidpozícióknak megfelelő szegmens képviseli. 30 35
- A 10. ábrán Fab-ellenanyag-fragmentumok és M79 kontroll ellenanyag áramlásos citometriás analízisének eredményét ábrázoltuk; a vizsgálatot 17–1A-pozitív Kato-sejteken végeztük, k8–D4.5-Fab-fragmentumot tartalmazó periplazmatikus készítmény kötőaktivitásának tesztelésére. Kato-sejteket: I) semleges periplazmatikus készítménnyel; II) 10 µg/ml kiméra (bivalens!) M79-ellenanyaggal; III) k8–D4.5 periplazmatikus extraktummal; és IV) k8–D4.5 periplazmatikus extraktum 1:10 hígításával inkubáltuk. A relatív sejtszámokat az Y tengely, a relatív fluoreszcenciaintenzitást az X tengely mentén vettük fel. 40 45 50 55
- A 11. ábrán Fab-ellenanyag-fragmentumok és teljes ellenanyagok áramlásos citometriás analízisének eredményeit ábrázoltuk; a vizsgálatot 17–1A-pozitív Kato-sejteken, valamint 17–1A-transz- 60
- fektált és nem transzfektált CHO-sejteken végeztük, a k8–D4.5, k5.1–D4.5 vagy egy semleges k–D4.5 Fab-fragmentumot tartalmazó periplazmatikus készítmények („periplasma preparations”, pp) kötőaktivitásának tesztelésére. Kato-sejteket inkubáltunk: I) semleges periplazmatikus extraktummal (szagztatott vonal) vagy k5.1–D4.5-pp készítménnyel (folyamatos vonal); vagy II) 20 µg/ml, M79-ellenanyaggal (folyamatos vonal) vagy a megfelelő egér IgG2a-izotípuskontrollal (szagztatott vonal). 17–1A-transzfektált CHO-sejteket inkubáltunk III) semleges periplazmatikus készítménnyel (szagztatott vonal) vagy k5.1–D4.5-pp készítménnyel (folyamatos vonal); IV) semleges periplazmatikus készítménnyel (szagztatott vonal) vagy k8–D4.5-pp készítménnyel (folyamatos vonal); vagy V) 20 µg/ml M79-ellenanyaggal (folyamatos vonal) vagy a megfelelő egér IgG2a-izotípuskontrollal (szagztatott vonal). A III., IV. és V. ábrarészleteken ábrázolt kísérletekben a vizsgálat tárgyát képező periplazmatikus készítményekkel (k5.1–D4.5 Fab-pp és k8–D4.5 Fab-pp), valamint az M79 egér ellenanyaggal történő inkubálást és a fragmentumok, illetve ellenanyagok kimutatását nem transzformált CHO-sejtek alkalmazásával is elvégeztük (pontozott vonalak). A relatív sejtszámokat az Y tengely, a relatív fluoreszcenciaintenzitást az X tengely mentén vettük fel.
- A 12. ábrán a pEF–ADA-vektor klónozórégióját ábrázoltuk, a fontosabb restrikciós helyek feltüntetésével. Az ábrán a következő rövidítéseket alkalmaztuk: P: promoter; VL: variábilis könnyűláncdomén; CL: konstans könnyűláncdomén; Leuc: eukarióta vezetőszekvencia.
- A 13. ábrán a pEFDHFR-vektor klónozórégióját ábrázoltuk, a fontosabb restrikciós helyek feltüntetésével. Az ábrán a következő rövidítéseket alkalmaztuk: P: promoter; VH: variábilis nehézláncdomén; CH1/2/3: 1., 2. és 3. konstans nehézláncdomén; Leuc: eukarióta vezetőszekvencia.
- A 14. ábrán a H79 humán ellenanyag-készítmények SDS–PAGE-analízisének eredményét mutatjuk be. Az egyes ellenanyag-készítmények mintegy 10 µg mennyiségét futtattuk 12,5%-os denaturáló poliakrilamid-gélen redukál-

- ló és nem redukáló körülmények mellett, majd a géleket Coomassie-blue festékkel megfestettük.
1. sáv: molekulatömeg-marker (MW [kDa]; az egyes csíkok molekulatömegét a gél bal oldalán tüntettük fel); 5
 2. sáv: H79 humán IgG1-változat (nem redukáló);
 3. sáv: H79 humán IgG1-változat redukáló körülmények mellett; 10
 4. sáv: H79 egér IgG1-változat (nem redukáló);
 5. sáv: H79 egér IgG1-változat redukáló körülmények mellett.
- A 15. ábrán a H79 és HD70 humán ellenanyag-készítmények SDS-PAGE-analízisének eredményét mutatjuk be. Tíz (10) µg H79- és 3,5 µg HD70-ellenanyagot futtattunk 12,5%-os denaturáló poliakrilamid-gélen nem redukáló (1. gél) és redukáló (2. gél) körülmények mellett, majd a géleket Coomassie-blue festékkel megfestettük.
1. gél:
 1. sáv: molekulatömeg-marker (MW [kDa], az egyes csíkok molekulatömegét a gél bal oldalán tüntettük fel); 25
 2. sáv: H79 humán IgG1-változat (nem redukáló);
 3. sáv: HD70 humán IgG1-változat (nem redukáló); 30
 2. gél:
 4. sáv: molekulatömeg-marker (MW [kDa], az egyes csíkok molekulatömegét a gél bal oldalán tüntettük fel); 35
 5. sáv: H79 humán IgG1-változat redukáló körülmények mellett;
 6. sáv: HD70 humán IgG1-változat redukáló körülmények mellett.
- A 16. ábrán 17-1A-pozitív Kato-sejtek áramlásos citometriás analízisének eredményeit szemléltetjük; a vizsgálatot tisztított H79 humán IgG1 és tisztított H79 egér IgG1 kötőaktivitásának tesztelésére végeztük. Kato-sejteket IgG1-izotípuskontrollal (10 µg/ml humán IgG1 és egér IgG1), pozitív kontrollokkal (10 µg/ml M79-ellenanyaggal és kiméra M74-ellenanyaggal) (azaz két 17-1A-specifikus ellenanyaggal); és H79 humán IgG1-ellenanyaggal vagy H79 egér IgG1-ellenanyaggal (10 µg/ml és 1 µg/ml) inkubáltunk. A relatív sejtszámokat az Y tengely, a relatív fluoreszcenciaintenzitást az X tengely mentén vettük fel.
- A 17. ábrán ellenanyagok (20-20 µg/ml) áramlásos citometriás analízisének eredményeit szemléltetjük; a vizsgálatot 17-1A-pozitív Kato-sejteken, 17-1A-transzfe-

tált és nem transzfektált CHO-sejteken végeztük, a tisztított H79 humán IgG1, H79 egér IgG1, HD70, D7.2, M79, Panorex és izotípuskontroll (humán IgG1, egér IgG1 és IgG2a) ellenanyagok kötőaktivitásának tesztelésére. I: H79 humán IgG1 (folyamatos vonal) és humán IgG1-izotípuskontroll (szaggatott vonal) Kato-sejteken tesztelve; II: H79 egér IgG1 (folyamatos vonal) és egér IgG1-izotípuskontroll (szaggatott vonal) Kato-sejteken tesztelve; III: HD70 (folyamatos vonal) és humán IgG1-izotípuskontroll (szaggatott vonal) Kato-sejteken tesztelve; IV: D7.2 (folyamatos vonal) és humán IgG1-izotípuskontroll (szaggatott vonal) Kato-sejteken tesztelve; V: M79-ellenanyag (folyamatos vonal) és egér IgG2a-izotípuskontroll (szaggatott vonal) Kato-sejteken tesztelve; VI: Panorex (folyamatos vonal) és egér IgG2a-izotípuskontroll (szaggatott vonal) Kato-sejteken tesztelve; VII: H79 humán IgG1 (folyamatos vonal) és humán IgG1-izotípuskontroll (szaggatott vonal) 17-1A-transzfektált CHO-sejteken tesztelve; VIII: H79 egér IgG1 (folyamatos vonal) és egér IgG1-izotípuskontroll (szaggatott vonal) 17-1A-transzfektált CHO-sejteken tesztelve; IX: HD70 (folyamatos vonal) és humán IgG1-izotípuskontroll (szaggatott vonal) 17-1A-transzfektált CHO-sejteken tesztelve; X: D7.2 (folyamatos vonal) és humán IgG1-izotípuskontroll (szaggatott vonal) 17-1A-transzfektált CHO-sejteken tesztelve; XI: M79 (folyamatos vonal) és egér IgG2a-izotípuskontroll (szaggatott vonal) 17-1A-transzfektált CHO-sejteken tesztelve; XII: Panorex (folyamatos vonal) és egér IgG2a-izotípuskontroll (szaggatott vonal) 17-1A-transzfektált CHO-sejteken tesztelve. A VII-XII. ábrarészleteken olyan kísérletek eredményeit is ábrázoltuk, amelyekben a vizsgálat tárgyát képező ellenanyagokat nem transzformált CHO-sejtekkel inkubáltuk, és azt követően mutattuk ki (pontosított vonal).

A 18. ábrán ⁵¹Cr-felszabadulás mérésen alapuló, ellenanyagfüggő sejtközvetített citotoxicitási vizsgálat eredményeit mutatjuk be. A ⁵¹Cr-felszabadulás meghatározásán alapuló vizsgálathoz nem stimulált, humán perifériás véreredetű mononukleáris sejteket (PBMC-eket; 5 × 10⁵ sejtet) inkubáltunk – effektor-sejtekként – jelölt célsejtekkel (2 órán át ⁵¹Cr-mal jelölt Kato-sejtekkel) kü-

- lőnböző ellenanyag-koncentrációk jelenlétében, 4 vagy 20 órán át, 37 °C-on. Megfelelő nem kötő izotípusokat (h-IgG=humán IgG1, m-IgG2a=egér IgG2a) alkalmaztunk negatív kontrollként (H79=H79huIgG1). A specifikus lízis mértékét a következő képlet szerint számítottuk: (adott ellenanyag alkalmazásával végzett kísérletben mért cpm)–(spontán felszabadulás eredményezte cpm)/(maximális felszabaduláskor mérhető cpm)–(spontán felszabadulás eredményezte cpm) (cpm=count per minute, percenkénti beütésszám).
- A 19. ábrán M79-ellenanyaggal (pozitív kontroll) megfestett egészséges humán vastagbéliszövet fénymikroszkópos képének fényképe látható. Normális nyálkahártyaszövetből készített 5 nm vastag kriometszeteket az M79 egér ellenanyaggal (IgG2a) inkubáltunk (az ellenanyagot 10 µg/ml koncentrációban alkalmazva) pozitív kontrollként. A kötődött egér ellenanyag kimutatását peroxidázzal konjugált poliklonális, egér immunglobulinnal szemben irányuló ellenanyag hozzáadásával, és karbazollal történő festéssel végeztük (barna). A hátteret hemalaunnal festettük (kék). A fekete-fehér ábrákon a barna színnek a sötétszürke (de nem fekete), a kéknek a közepesen világosszürke felel meg, amely elüt az egészen világosszürke, egybemosódó háttértől.
- A 20. ábrán H79 jelzésű egér IgG1-ellenanyaggal megfestett egészséges humán vastagbéliszövet fénymikroszkópos képének fényképe látható. Normális nyálkahártyaszövetből készített 5 nm vastag kriometszeteket a H79-ellenanyag egér IgG-változatával inkubáltuk (az ellenanyagot 10 µg/ml koncentrációban alkalmazva). A kötődött egér IgG1-ellenanyagok kimutatását peroxidázzal konjugált poliklonális, egér immunglobulinnal szemben irányuló ellenanyag hozzáadásával, és karbazollal történő festéssel végeztük (barna). A hátteret hemalaunnal festettük (kék).
- A 21. ábrán M79 (pozitív kontroll) ellenanyaggal megfestett humán vastagbél-karcinóma fénymikroszkópos képének fényképe látható. Vastagbél-karcinómából készített 5 nm vastag kriometszeteket pozitív kontrollként M79 egér ellenanyaggal (IgG2a) inkubáltunk (az ellenanyagot 10 µg/ml koncentrációban alkalmazva). A kötődött egér ellenanyagok kimutatását peroxidázzal konjugált poliklonális, egér immunglobulinnal szemben irányuló ellenanyag hozzáadásával, és karbazollal történő festéssel végeztük (barna). A hátteret hemalaunnal festettük meg (kék).
- A 22. ábrán H79 egér IgG1-ellenanyaggal megfestett vastagbél-karcinóma fénymikroszkópos képének fényképe látható. Vastagbél-karcinómából készített 5 nm vastag kriometszeteket a H79-ellenanyag egér IgG1-változatával inkubáltuk (az ellenanyagot 10 µg/ml koncentrációban alkalmazva). A kötődött egér IgG1-ellenanyagok kimutatását peroxidázzal konjugált poliklonális, egér immunglobulinnal szemben irányuló ellenanyag hozzáadásával, és karbazollal történő festéssel végeztük (barna). A hátteret hemalaunnal festettük meg (kék).
- A 23. ábrán egér IgG2a-izotípuskontrollal megfestett egészséges humán vastagbéliszövet fénymikroszkópos képének fényképe látható. Normális nyálkahártyaszövetből készített 5 nm vastag kriometszeteket negatív kontrollként semleges egér IgG2a-ellenanyaggal inkubáltunk (az ellenanyagot 10 µg/ml koncentrációban alkalmazva). A kötődött egér IgG1-ellenanyagok kimutatását peroxidázzal konjugált poliklonális, egér immunglobulinnal szemben irányuló ellenanyag hozzáadásával, és karbazollal történő festéssel végeztük (barna). A hátteret hemalaunnal festettük (kék).
- A 24. ábrán IgG1-izotípuskontrollal megfestett egészséges humán vastagbéliszövet fénymikroszkópos képének fényképe látható. Normális nyálkahártyaszövetből készített 5 nm vastag kriometszeteket negatív kontrollként semleges egér IgG1-ellenanyaggal inkubáltunk (az ellenanyagot 10 µg/ml koncentrációban alkalmazva). A kötődött egér IgG1-ellenanyagok kimutatását peroxidázzal konjugált poliklonális, egér immunglobulinnal szemben irányuló ellenanyag hozzáadásával, és karbazollal történő festéssel végeztük (barna). A hátteret hemalaunnal festettük meg (kék).
- A 25. ábrán egér IgG2a-izotípuskontrollal megfestett humán vastagbélkarcinóma-szövet fénymikroszkópos képének fényképe látható. Normális nyálkahártyaszövetből készített 5 nm vastag kriometszeteket negatív kontrollként semleges,

- egéreredetű IgG2a-ellenanyaggal inkubáltunk (az ellenanyagot 10 µg/ml koncentrációban alkalmazva). A kötődött egéreredetű ellenanyagok kimutatását peroxidázzal konjugált poliklonális, egér immunglobulinnal szemben irányuló ellenanyag hozzáadásával, és karbazollal történő festéssel végeztük (barna). A háttérret hemalaunnaal festettük (kék).
- A 26. ábrán IgG1-izotípuskontrollal megfestett humán vastagbélkarcinóma-szövet fénymikroszkópos képének fényképe látható. Normális nyálkahártyaszövetből készített 5 nm vastag kriometszeteket negatív kontrollként semleges, egéreredetű IgG1-ellenanyaggal inkubáltunk (az ellenanyagot 10 µg/ml koncentrációban alkalmazva). A kötődött egéreredetű ellenanyagok kimutatását peroxidázzal konjugált poliklonális, egér immunglobulinnal szemben irányuló ellenanyag hozzáadásával, és karbazollal történő festéssel végeztük (barna). A háttérret hemalaunnaal festettük meg (kék).
- A 27. ábrán a humán 17-1A antigénre specifikus M79 egér ellenanyag és ugyancsak az említett antigénre specifikus H79 humán ellenanyag epitópanalízisének eredményeit mutatjuk be. Ellenanyagokat négyzetes elrendezésben membránra felvitt peptidekkel, közelebbről 119, egyenként 13 tagú, egymáshoz képest két aminosavval eltölt, összességükben a humán 17-1A antigén teljes extracelluláris aminosavszekvenciáját átfedő polipeptiddel inkubáltunk. A peptideket C-terminális végükön, kovalens módon *Pep Spots* membránhoz (Jerini Biotoools, Berlin) kötöttük úgy, hogy azok különálló foltokat képezzenek. A kötődött egér M79-ellenanyagokat direkt eljárással mutattuk ki a *Pep Spots* membránon úgy, hogy a membránt tormaperoxidázzal (*horse radish peroxidase*, HPR) konjugált, egér immunglobulin elleni ellenanyaggal érintkeztettük, majd a kötődött ellenanyagokat kemolumineszcens eljárással mutattuk ki. Az egyes foltok esetében megfigyelhető, csak a másodlagos ellenanyag reaktivitásának köszönhető jeleket a *Pep Spots* membrán kontrollfestésével tettük láthatóvá. Az elsősorban a 87. peptid esetében megfigyelhető háttérfestődést figyelmen kívül hagyva, a 38. és 95. peptidfoltok az M79 egér ellenanyaghoz specifikus módon kötődő foltokat képviseltek.

Mivel a HRP-konjugált, humán immunglobulin elleni másodlagos ellenanyag néhány peptidfolt esetében jelentős mértékű keresztreaktivitást mutatott, a kötődött H79 és HD70 humán ellenanyagok tesztelésére azokat a *Pep Spots* membránról elektrotranszfereljárással blottnembránra vittük át, majd a fent említett humán immunglobulin elleni másodlagos ellenanyaggal és kemolumineszcenciával mutattuk ki. A H79 jelzésű humán ellenanyag specifikus kötődését elsősorban a 8., 11., 13., 14., 59-60., 77. és 79. foltok esetében észleltük; a HD70-ellenanyag esetében azonban kötődés nem volt kimutatható.

A találmány szerinti megoldást az alábbiakban konkrét megvalósítási példákon keresztül kívánjuk szemléltetni.

1. példa

A kombinatorikus ellenanyagkönyvtárak előállítás és fágprezentáció

Humán immunglobulin- (Ig-) könnyűlánc könyvtárát és Ig-nehézlánc Fd-DNS-fragmentum könyvtárát RT-PCR-eljárással állítottunk elő kappa-, lamda- és Fd-delta-specifikus láncindító oligonukleotidkombinációk alkalmazásával, négy humán donortól származó, perifériás véreredetű limfocitákból („*peripheral blood lymphocytes*”, PBL) és tíz humán donor csontvelőmintáiból izolált teljes RNS alapján, Chomczynski eljárása szerint [Analytical Biochemistry 162, 156 (1987)]. cDNS-t ismert eljárások szerint szintetizáltunk [Sambrook: Cold Spring Harbor Laboratory Press, második kiadás (1989)].

A következő, a nehézláncfragmentumok esetében 5'-végi XhoI és 3'-végi SpeI, a könnyűláncok esetében 5'-végi SacI és 3'-végi XbaI felismerőhelyeket eredményező láncindító oligonukleotidkombinációkat választottuk.

A delta-Fd cDNS-fragmentumok PCR-amplifikációjához öt különböző 5'-VH-család-specifikus láncindítót kombináltunk egy 3'-CH1-delta láncindítóval; a kappa (K) könnyűlánc-fragmentumok PCR-amplifikációjához öt különböző 5'-VK-család-specifikus láncindítót kombináltunk egy 3'-CK láncindítóval, és a lamda (L) könnyűlánc-fragmentumok PCR-amplifikációjához nyolc különböző 5'-VL-család-specifikus láncindítót kombináltunk egy 3'-CL láncindítóval.

Az Fab-DNS-fragmentumok amplifikációjára alkalmazott láncindító oligonukleotidkombinációkat az alábbi, 1. táblázatban mutatjuk be (5'-3' irányban).

Az amplifikációs reakciót a következő PCR-program szerint végeztük:

Negyven 40 cikluson át, denaturáció 94 °C-on 15 másodpercig; láncindító hibridizáltatás 52 °C-on 50 másodpercig; és láncnövelés 72 °C-on 90 másodpercig; majd egy utolsó láncnövelés 72 °C-on, 10 percig.

1. táblázat

A PCR-reakcióban az alábbi láncindító
oligonukleotidkombinációkat alkalmaztuk

Nehézlánc Fd-fragmentum:

5'-végi láncindító oligonukleotidok:

VH1,3,5,7: AGGTGCAGCTGCTCGAGTCTGG;

VH2: CAG(AG) TCACCTTGCTCGAGTCTGG;

VH4: CAGGTGCAGCTGCTCGAGTCGGG;

VH4B: CAGGTGCAGCTACTCGAGTGCGG;

VH6: CAGGTACAGCTGCTCGAGTCAGG.

3'-végi láncindító oligonukleotid:

CD1: TGCCTTACTAGTCTCTGGCCAGCGGAA-GAT.

Kappa-lánc-fragmentum:

5'-végi láncindító oligonukleotidok:

VK1: GAGCCGCACGAGCCCGAGCTCCAGATG-ACCCAGTCTCC;

VK3: GAGCCGCACGAGCCCGAGCTCG-TG(AT)TGAC(AG)CAGTCTCC;

VK2/4: GAGCCGCACGAGCCCGAGCTCGTGAT-GAC(CT)CAGTCTCC;

VK5: GAGCCGCACGAGCCCGAGCTCACACTCA-CGAGTCTCC;

VK6: GAGCCGCACGAGCCCGAGCTCGTGCTGA-CTCAGTCTCC.

3'-végi láncindító oligonukleotid:

CK1D: GCGCCGTCTAGAATTAACACTCTC-CCCTGTTGAAGCTCTTTGTGACGGGCGAAC TCAG;

Lambda-lánc-fragmentum:

5'-végi láncindító oligonukleotidok:

VL1: AATTTTGAAGTCACTCAGCCCCAC;

VL2: TCTGCCGAGCTCCAGCCTGCCTCCGTG;

VL3: TCTGTGGAGCTCCAGCCGCCCTCAGTG;

VL4: TCTGAAGAGTCCAGGACCTGTTGTG-TCTGTG;

VL5: CAGTCTGAGCTCACGCAGCCGCCC;

VL6: CAGACTGAGTCACTCAGGAGCCC;

VL7: CAGGTTGAGTCACTCAACCGCCC;

VL8: CAGGCTGAGTCACTCAGCCGTCTTCC.

3'-végi láncindító oligonukleotid:

CL2: CGCCGTCTAGAATTATGAACATTCTG-TAGG.

450 ng kappa-könnyűlánc-fragmentumot ligáltunk (SacI- és XbaI-emésztést követően) 1400 ng pComb3H-fagemiddel (amelyet előzőleg SacI- és XbaI-enzimekkel emésztettünk; nagy DNS-fragmentum), amely utóbbi pComb3-fagemidből [Barbas: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 88, 7978 (1991)] származott, amelyben a nehézláncpozíciót már a 17-1A-protein extracelluláris része ellen irányuló M79 jelzésű kiméra egér ellenanyag Fd-fragmentuma (humán IgG1 CH1-régiót tartalmazó fragmentum) foglalta el (a pComb3H klónozó helyeit lásd az 1. ábrán).

A fentiek szerint kapott kombinatorikus ellenanyag DNS-könyvtárát elektroporációs eljárással (2,5 kV, 0,2 cm réstávolságú kivető; 25 FD, 200 Ohm; Biorad gene-pulser) 300 µl, elektrokompetens *E. coli* XL1-Blue-szuspenzió sejtjeibe juttattuk; a fenti módon eljárva 4×10^7 független klónt tartalmazó génkönyvtárát

nyertünk. Egyórás expresszálatást követően pozitív transzformánsokat szelektáltunk a pComb-vektor által kódolt karbenicillinrezisztencia alapján. A fenti adaptációt követően, ezeket a klónokat 1×10^{12} VCSM13 segítő fágreszecskevel fertőztük, miáltal olyan filamentózus M13-fágok termelődését és szekretálódását értük el, amelyek mindegyike egyetlen humán könnyűláncot és a kiméra M79-ellenanyag Fd-szegmensét magában foglaló egyszálú pComb3H-DNS-t tartalmazott, és amelyek a megfelelő Fab-fragmentumokat a fágfelszínen jelenítették meg (prezentálták) III. fágurokprotein fertőzést nem közvetítő részével transzlációsan fuzionáltatva (fágprezentáció); (lásd 2. ábra).

Ezt, a klónozott Fab-repertoárt hordozó fággen-könyvtárát a tenyészet felülúszójából PEG8000/NaCl-precipitációval és centrifugálással kinyertük, 1% BSA-t tartalmazó TBS-pufferben szuszpendáltuk, és 96 lyukú ELISA-lemezekben immobilizált rekombináns s17-1A antigénnel inkubáltuk. s17-1A antigént a szakirodalomban ismertettek szerint állítottunk elő [Mack: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 92, 7021 (1995)]. A célantigénhez specifikus módon nem kötődött Fab-fágokat 0,5% Tween tartalmazó TBS-pufferrel, tizet elérő számú mosási lépés alkalmazásával távolítottuk el. A kötődő Fab-fágokat HCl-Glicin-pufferrel (pH=2,2) eluáltuk, majd az eluátum 2 mol/l Tris-pufferrel (pH=12) történő neutralizálását követően, azzal új, még nem fertőzött *E. coli* XL1-Blue-tenyészetet fertőztünk. Antigénkötő Fab-fragmentumokat kódoló pComb-fagemidkópiákkal sikeresen transzdukált sejteket karbenicillinrezisztencia alapján szelektáltunk, VCSM13 segítő faggal fertőztünk, majd megkezdtük az ellenanyag-prezentátás és *in vitro* szelekció második szakaszát.

Miután az antigénkötő Fab-fágok termeltetését és szelekcióját ötször megismételtük, a szelektált Fab-repertoárt tartalmazó plazmid-DNS-eket izoláltuk.

Szolubilis Fab-proteineket úgy nyertünk, hogy a gén-III DNS-fragmentumot a plazmidokból kivágtuk, ezáltal az Fd-nehézlánc-szegmens és a gén-III-protein közti transzlációs fúziót megszüntettük. Miután a plazmid-DNS-eket újból ligáltuk, ezzel a plazmid-DNS készlettel 100 µl, hősokk-kezeléssel kompetenssé tett *E. coli* XL1-Blue-tenyészetet transzformáltunk, és a sejteket karbenicillinnel (Carb) kiegészített LB-agarlemezre oltottuk ki. Különálló telepeket oltottunk át 10-10 ml, 20 mmol/l $MgCl_2$ -ot tartalmazó LB-Carbtápközegbe, és hat óra elteltével Fab-expressziót indukáltunk 1 mmol/l izopropil-β-D-tiogalaktozid (IPTG) hozzáadásával. Az *in vitro* szelekciót és a szolubilis Fab-fragmentumok expresszálatását Burton eljárása szerint végeztük [Proc. Nat. Acad. Sci. USA 88, 10 134 (1991)]. A sejteket 20 óra múlva összegyűjtöttük; periplazmatikus extraktumot készítettünk úgy, hogy a készítmény fagyasztását (etanol/szárazjég ágyon) és olvasztását (37 °C-on) négyszer ismételtük, majd azt ELISA-eljárással teszteltük s17-1A antigénhez kötődő Fab-fragmentumok jelenlétére. Huszonhét klónból 23 mutatott kötőaktivitást. Szekvenálást követően, a legerősebb jelet adó két klónról (lásd 3. ábra) megállapí-

tottuk, hogy azok azonos kappa-láncokat tartalmaznak, és ezt a láncot k8-láncnak neveztük; (lásd 6. ábra).

Ezután, ezt a humán k8-kappa-láncot alkalmaztuk a humán Ig-delta-nehézlánc-készlet kötőpartnereként; 2250 ng humán delta-nehézlánc Fd-DNS-fragmentumot ligáltunk (XhoI- és SpeI-emésztést követően) 7000 ng, a könnyűláncpozícióban a k8-DNS-fragmentumot tartalmazó pComb3H-fagemidvektorral (amelyet előzőleg XhoI- és SpeI-enzimekkel emésztettünk; nagy DNS-fragmentum).

A k8-könnyűláncal történő kombináltatást követően, a 17-1A antigénhez specifikus módon kötődő nehézlánc variábilis régiók klónozására legelőnyösebbnek tűnt a humán delta-lánc-repertoár alkalmazása. Delta-láncok csak érett, naiv, valamint saját antigénre specifikus anergiás B-sejtekben termelődnek, amelyek még nem mentek át proliferáción, vagy egyáltalán nem fognak proliferálni; ezért, azok nehézlánc-repertoárjának diverzitása nagyobb fokú, mint más immunglobulin-izotípusok repertoárjái, és azokban az egyes specifikusok száma kisebb, mint egyéb immunglobulin-izotípusok repertoárjában.

A pComb-vektorba klónozott k8-delta-Fd-fragmentum könyvtárát öt részletben, elektroporációs eljárással (2,5 kV, 0,2 cm réstávolságú kivető; 25 FD, 200 Ohm), összesen 1500 µl térfogatú *E. coli* XL1-Blue-tenyészet sejtjeibe juttattuk, miáltal $1,1 \times 10^9$ független klónt kaptunk.

A fenti kombinatorikus ellenanyagkönyvtár *in vitro* szelekcióját a humán könnyűlánc-repertoár esetében ismertettek szerint végeztük. Négyeszeri dúsítást követően, szolubilis Fab-fragmentumokat állítottunk elő nyolc klónból.

A periplazmatikus készítményeket ELISA-eljárással teszteltük. A klónok egyikénél erős antigénkötő aktivitást tapasztaltunk (lásd 4. ábra). Ezt a klónt D4.5-klónnak neveztük, és az Fd-delta-fragmentumnak megfelelő DNS-t reverz delta-CH1-specifikus láncindító oligonukleotid alkalmazásával szekvenáltuk (lásd 7. ábra).

További dúsításokat követően, még egy s17-1A-kötő Fab-fragmentumot izoláltunk; az ennek megfelelő klón jelenlétét először a hetedik dúsítási lépésnél észleltük, és az az ELISA-tesztben lényegesen gyengébb jelet eredményezett, mint a D4.5-klón (lásd 4. ábra). Ezt a klónt D7.2-klónnak neveztük, és annak DNS-szekvenciáját ismét csak a delta-specifikus láncindító alkalmazásával határoztuk meg (lásd 8. ábra).

További könnyűláncpartnerek izolálására, amelyek a D4.5-klón delta-nehézlánc Fd-fragmentumával kombinálódva 17-1A-specifikus Fab-fragmentumokat eredményeznek, olyan kísérletet végeztünk („reshuffling experiment”), amelynek során újabb, véletlenszerű kombinációkat hoztunk létre.

Négyszázötven (450) ng humán kappa-könnyűlánc-fragmentumot és 450 ng humán lambda-könnyűlánc-fragmentumot (mindkettőt SacI- és XbaI-enzimekkel történő emésztést követően) 1400 ng olyan pComb3H-fagemiddel ligáltunk (szintén SacI- és XbaI-enzimekkel történő emésztést követően; nagy DNS-fragmen-

tum), amelyben a nehézláncpozíciót már a D4.5-Fd-fragmentum foglalta el.

Az ily módon kapott kombinatorikus ellenanyagkönyvtárakat (kappa és lambda) elektroporációs eljárással (2,5 kV, 0,2 cm réstávolságú kivető; 25 FD, 200 Ohm; Biorad gene-pulser) 300 µl térfogatú elektrokomponeks *Escherichia coli* XL1-Blue-tenyészet sejtjeibe (az XL1-Blue-sejtek beszerezhetők a Stratagene cégtől) juttattuk; a fenti módon eljárva a kappa-könyvtár esetében $0,5 \times 10^7$, a lambda-könyvtár esetében pedig $1,4 \times 10^7$ független klónt tartalmazó génkönyvtárat nyertünk. Miután egy órát hagytunk a fenotípus kifejeződésére, pozitív transzformánsokat szelektáltunk a pComb-vektor által kódolt karbenicillinrezisztencia alapján. A fenti adaptációt követően, ezeket a klónokat 1×10^{12} VCSM13 segítő fágészecskével fertőztük, miáltal olyan filamentózus M13-fágok termelődését és szekretálódását értük el, amelyek mindegyike egyetlen humán könnyűláncot és a D4.5-klón nehézlánc Fd-szegmensét magában foglaló egyszálú pComb3H-DNS-t tartalmazott, és amelyek a megfelelő Fab-fragmentumokat a fágfelszínen jelenítették meg (prezentálták) III. fágburokprotein-fertőzést nem közvetítő részével transzlációsan fuzionálva.

A klónozott Fab-repertoárokat (kappa és lambda) hordozó fággenkönyvtárakat PEG8000/NaCl-precipitációval és centrifugálással a tenyészetek felülúszójából kinyertük, 1% BSA-t tartalmazó TBS-pufferben szuszpendáltuk, és 96 lyukú ELISA-lemezekben immobilizált rekombináns s17-1A antigénnel inkubáltuk. A célantigénhez specifikus módon nem kötődött Fab-fágokat 0,5% Tween-detergenst tartalmazó TBS-pufferrel, tízet elérő számú mosási lépés alkalmazásával távolítottuk el. Mindkét génkönyvtárból (kappa és lambda) származó kötődő fágokat HCl-Glicin-pufferrel (pH=2,2) eluáltuk, majd az eluátum 2 mol/l Tris-pufferrel (pH=12) történő neutralizálását követően, azzal új, még nem fertőzött *E. coli* XL1-Blue-tenyészetet fertőztünk. Antigénkötő Fab-fragmentumokat kódoló pComb-fagemid-kópiákkal sikeresen transzdukált sejteket karbenicillinrezisztencia alapján szelektáltunk, VCSM13 segítő faggal fertőztünk, majd megkezdjük az ellenanyag-prezentálás és *in vitro* szelekció második szakaszát.

Miután az antigénkötő Fab-fágok termeltetését és szelekcióját magában foglaló eljárást ötször ismételtük, az egyes dúsítási lépéseket követően a szelektált Fab-repertoárt tartalmazó plazmid-DNS-eket izoláltunk.

Szolubilis Fab-proteineket úgy nyertünk, hogy a gén-III DNS-fragmentumot a plazmidokból kivágtuk, ezáltal az Fd-nehézlánc-szegmens és a gén-III-protein közti transzlációs fűzést megszüntettük. Miután a plazmid-DNS-eket újból ligáltuk, ezzel a plazmid-DNS készlettel 100 µl, hősokk-kezeléssel kompetenssé tett *E. coli* XL1-Blue-tenyészetet transzformáltunk, és a sejteket karbenicillinnel (Carb) kiegészített LB-agarlemezre oltottuk ki. Különálló telepeket oltottunk át 10-10 ml, 20 mmol/l $MgCl_2$ -ot tartalmazó LB-Carb-tápközegbe, és hat óra elteltével Fab-expressziót indukáltunk 1 mmol/l izopropil-β-D-tiogalaktozid (IPTG)

hozzáadásával. A sejteket 20 óra múlva összegyűjtöttük; a készítmény ismételt fagyasztásával és olvasztásával periplazmatikus extraktumot készítettünk, majd azt ELISA-eljárással teszteltük s17-1A antigénhez kötődő Fab-fragmentumok jelenlétére.

Összesen, 45 kappa- és 45 lambda-génkönyvtár-eredetű – elsősorban az ötödik, de kisebb mértékben más dúsítási lépésekből is származó – klónt teszteltünk a 17-1A antigénhez történő kötődésre. Csak egyetlen, az ötödik dúsítási lépést követően észlelt klón – a k5.1-klón (kappa-génkönyvtárból származó klón) – esetében tapasztaltunk kötőaktivitást (lásd 5. ábra). A k5.1-klón kappa-V-régiójának DNS-szekvenciáját meghatároztuk (lásd 9. ábra).

2. példa

Bakteriális expresszió *E. coli* XL1-Blue-sejtekben

Amint azt az 1. példában említettük, egy könnyűláncot és egy nehézlánc Fd-szegmenst tartalmazó pComb3H-vektorral transzformált *E. coli* XL1-Blue-sejtek a gén-III-fragmentum kihasítását és IPTG-reagenssel történő indukciót követően megfelelő mennyiségű szolubilis Fab-fragmentumot termelnek. A nehézlánc Fd-fragmentum és a könnyűlánc a periplazmatikus térbe jut, ahol azok funkcionális Fab-fragmentumokká épülnek össze.

Ahhoz, hogy megfelelőbb periplazmatikus készítményeket kapjunk, a sejteket 20 mmol/l $MgCl_2$ -dal kiegészített SB-tápközegben tenyésztettük, és ülepitést követően PBS-ben szuszpendáltuk. Miután azokat $-70^\circ C$ -on négyszer fagyasztottuk, és a fagyasztásokat követően $37^\circ C$ -on olvasztottuk, a baktériumok külső membránját hősokk-kezeléssel roncsoltuk, ezáltal a szolubilis periplazmatikus proteinek, köztük az Fab-fragmentumok felülülszóba történő kiszabadulását idéztük elő. Miután az ép sejteket és sejtörmelékeket centrifugálással eltávolítottuk, az Fab-ellenanyag-fragmentumokat tartalmazó felülülszót összegyűjtöttük, és azt további vizsgálatokban alkalmaztuk.

Először, a k8-D4.5-Fab- és k5.1-D4.5-Fab-fragmentumokat tartalmazó periplazmatikus készítményeket immobilizált s17-1A antigénhez történő kötődésre teszteltük; mindkét készítmény esetében erős kötődést tapasztaltunk (lásd 1. példa).

Immobilizált s17-1A antigénhez kötődött k8-D4.5-Fab- és k5.1-D4.5-Fab-fragmentumok kimutatását poliklonális, biotinezett, humán kappa-könnyűláncsal szemben irányuló ellenanyag (1 $\mu g/ml$, PBS-ben) alkalmazásával, majd tormaperoxidáz-konjugált Avidine (1 $\mu g/ml$, PBS-ben) hozzáadásával végeztük. A jelet 2,2 azino-bisz(3-etil-benzotiazolin-6-szulfonsav) reagenst és Na-perborátot tartalmazó szubsztrátoldatot hozzáadásával hívtuk elő, és a szubsztrát átalakulását 405 nm hullámhosszon mértük.

A két 17-1A-pozitív humán Fab-fragmentum (k8-D4.5-Fab és k5.1-D4.5-Fab) kötődését Kato-sejtekhez (egy 17-1A antigént expresszáló gyomorkarcinóma-sejtvonalhoz), 17-1A-transzfektált CHO-sejtekhez (CHO/17-1A) és nem transzfektált CHO-sejtekhez szintén a periplazmatikus készítmények alkalmazá-

sával teszteltük. Transzfektált CHO-sejtvonalakat úgy állítottunk elő, hogy a 17-1A antigén, más néven GA733-2 [Szala: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 87, 3542 (1990)] teljes aminosavszekvenciáját kódoló DNS-fragmentumot a pEF-DHFR eukarióta expressziós vektorba [Mack: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 92, 7021 (1995)] szubklónoztuk, ismert eljárások szerint [Sambrook: „Molecular Cloning, A Laboratory Manual”, 2. kiadás, Cold Spring Harbour, NY (1989)]. A kapott plazmidot NdeI-enzimmal linearizáltuk, és DHFR-deficiens CHO-sejtekbe transzfektáltuk, ahol azok stabil módon expresszázódtak. A transzmembrán 17-1A antigén expresszióját lépcsőzetes génamplifikációval fokoztuk, amelyet növekvő koncentrációjú DHFR-inhibitor, 15 *Methotrexat* (MTX) hozzáadásával váltottunk ki úgy, hogy a kísérlet végén 500 mol/l DHFR-koncentrációt, a megelőző lépésekben pedig 20 mol/l, és 100 mol/l DHFR-koncentrációkat alkalmaztunk [Kaufmann: Methods Enzymol. 185, 537 (1990)].

Kétszázezer (200 000) sejtet (Kato-, CHO/17-1A- vagy CHO-sejtet) inkubáltunk a kötő vagy nem kötő Fab-fragmentumokat tartalmazó periplazmatikus készítmények egyikével, majd biotinezett, poliklonális, humán kappa-könnyűláncsal szemben irányuló ellenanyag (20 $\mu g/ml$, PBS-ben) és FITC-konjugált *Streptavidine* jelenlétében. Jelölt sejteket áramlásos citometriával analizáltunk.

A k8-D4.5-Fab- és k5.1-D4.5-Fab-fragmentumokat tartalmazó periplazmatikus készítmények jól kivethető jeleket eredményeztek a nem kötő (semleges) periplazmatikus készítményekhez (negatív kontrollkhoz) képest, de nem észleltünk festődést a nem transzfektált CHO-sejteken, ami arra utal, hogy a fragmentumok 17-1A antigénre specifikusak. Az M79 jelzésű anti-17-1A ellenanyagot [Göttlinger: Int. J. Cancer 38, 47 (1986)] alkalmaztuk pozitív kontrollként a 17-1A antigént expresszáló sejtek pozitivitásának igazolására, és egy egéredetű IgG2a-ellenanyagot alkalmaztunk izotípuskontrollként (lásd 10. és 11. ábrák).

3. példa

Eukarióta expresszió CHO-sejtekben

Baktériumok általában nem képesek teljes funkcionális immunglobulinok termelésére, bár funkcionális Fab-fragmentumokat expresszálnak.

Ahhoz, hogy teljes funkcionális immunglobulinokat állíthassunk elő, emlőssejteket kellett alkalmaznunk, ezért, a k8-könnyűláncot és a D4.5-klón nehézlánc variábilis doménját emlős expressziós vektorokba szubklónoztuk.

a) Könnyűláncok (k8 és k5.1): Megfelelő terminális restriktációs helyeket úgy hoztunk létre, hogy a k8 és k5.1 jelzésű DNS-fragmentumokat PCR-eljárással módosított formában amplifikáltuk, miáltal olyan kappa-fragmentumokat kaptunk, amelyek 5'-végükön Bsu361-helyet, 3'-végükön SallI- és NotI-helyeket tartalmaztak. Ezeket a fragmentumokat Bsu361- és NotI-enzimekkel emésztett BSPOLL-plazmidba szubklónoztuk, ezáltal a fragmentumhoz emlőseredetű vezetőszekvenciát adtunk hozzá; és a kapott fragmentumokat szek-

venáltuk, hogy a PCR-eljárással esetleg létrehozott mutációk előfordulását kivédjük.

EcoRI- és SalI-enzimek alkalmazásával a k8- és k5.1-fragmentumokat a BSPOLL-plazmidból kivágtuk, és a pEF-ADA eukarióta expressziós vektorba (lásd 12. ábra) szubklónoztuk, amely utóbbit a pEF-DHFR expressziós vektorból [Mack: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 92, 7021 (1995)] származtattunk úgy, hogy abban az egér dihidrofolát-reduktáz (DHFR) enzimet kódoló cDNS-t egér adenzin-dezamináz (ADA) enzimet kódoló cDNS-sel helyettesítettük.

Mindegyik könnyűlánc (k8 és k5.1) esetében 10⁷ CHO-sejtet transzfektáltunk 100 µg linearizált plazmid-DNS-sel, majd a sejteket az expressziós vektor által kódolt adenzin-dezamináz (ADA) aktivitásra szelektáló körülmények mellett tenyésztettük. Túlélő ADA-pozitív sejteket tenyésztettünk, hogy azokat újból transzfektáljuk, ezúttal a D4.5- vagy D7.2-klón-eredetű variabilis domént hordozó nehézláncokat kódoló DNS-sel.

b) Nehézlánc D4.5 variabilis domén: a D4.5-klón-eredetű delta-Fd-fragmentumból a variabilis régiót PCR-eljárással módosított formában amplifikáltuk, miáltal olyan fragmentumokat kaptunk, amelyek mindkét végükön Bsu361 restrikciós felismerőhelyet hordoztak. A kapott V-D4.5 DNS-fragmentumokat a fenti restrikciós helyek alkalmazásával a pEF-DHFR eukarióta expressziós vektorba szubklónoztuk, amely már eukarióta vezetőszekvenciát és humán IgG1-nehézlánc konstansrégiót kódoló DNS-fragmentumot tartalmazott (lásd 13. ábra). A fenti módon eljárva, a D4.5 nehézlánc variabilis régiót a vezetőszekvencia és a nehézlánc-konstansrégió közé inszertáltuk. A variabilis régiót szekvenáltuk, és a teljes klónt H79V-D4.5 hu IgG1-klónnak neveztük.

A későbbi szövetfestési kísérletekhez, a humán IgG1-nehézlánc konstansrégiót az egér IgG1-nehézlánc konstansrégióval helyettesítettük, XbaI-klónozó hely alkalmazásával. Az így kapott plazmidot H79V-D4.5 M IgG1-plazmidnak neveztük.

A D4.5-nehézlánc humán és egér IgG1-változatával 10⁷, a k8-könnyűláncot már expresszáló CHO-sejtet transzfektáltunk. Ezenfelül, a humán IgG1-változattal a k5.1-könnyűláncot expresszáló CHO-sejteket is transzfektáltunk. A nehézlánc-transzfekeciós kísérletekhez 100-100 µg linearizált plazmid-DNS-t alkalmaztunk.

A D7.2-klón-eredetű nehézlánc Fd-fragmentum variabilis régióját pEF-DHFR-vektorba is szubklónoztuk, miáltal a VD4.5-fragmentumok esetében ismertettekhez hasonló módon, humán IgG1-nehézláncot expresszáló plazmidot kaptunk. Ezzel az expressziós plazmiddal a k8-könnyűláncot már expresszáló CHO-sejteket transzfektáltunk, a H79V-D4.5 hu IgG1-plazmiddal kapcsolatban már leírtak szerint.

A transzfektált sejteket ADA- és DHFR-aktivitásra szelektáltuk, a szakirodalomban ismertettek szerint eljárva [Kaufman: Methods in Enzymol. 185, 537 (1990)].

A kapott sejt vonalakat H79-huIgG1-(VD4.5huIgG1-k8), H79-MIgG1-(VD4.5MIgG1-k8), D7.2-(VD7.2huIgG1-k8) és HD70-(VD4.5huIgG1-k5.1) vonalaknak neveztük.

Négy különböző, a négy anti-17-1A ellenanyag egyikét termelő, háromnapos, 30 ml térfogatú egyrétegű sejtenyészet (H79-huIgG1, H79-MIgG1 D7.2 és HD70) felülúszóját ELISA-eljárással teszteltük immobilizált s17-1A antigénhez történő kötődésre. A D7.2-tenyésztől eltérően, amely gyenge ELISA-jelet adott, a három másik ellenanyag erős jelet eredményezett, amely az M79 egér ellenanyag kötőaffinitásának megfelelő nagyságrendbe esett.

Ellenanyagok nagy mennyiségben történő előállítását görgő palackokban végeztük, 500 ml tápközeg alkalmazásával.

A H79-huIgG1-, D7.2- és HD70-ellenanyagokat protein-A affinitásos oszlopon tisztítottuk. A H79-MIgG1-ellenanyagot antiegeér-IgG affinitásos kromatográfiával tisztítottuk.

A rekombináns ellenanyagok tisztaságát SDS-PAGE-eljárással ellenőriztük, és azok molekulasúlyát a fenti eljárással határoztuk meg, redukáló és nem-körülmények mellett (14. és 15. ábrák).

A proteintisztítást és SDS-PAGE-eljárást ismert módszerek szerint végeztük.

4. példa

A H79- és HD70-ellenanyagok funkcionális analízise

IV.1. Tesztelés immobilizált antigénen

Humán és egéreredetű IgG1-változatot expresszáló transzfektánsok 30 ml térfogatú egyrétegű sejtenyészetének felülúszóját, valamint a megfelelő tisztított ellenanyagokat ELISA-eljárással teszteltük immobilizált s17-1A antigénhez történő kötődésre, és az eredményeket egér M79 anti-17-1A ellenanyagok vizsgálatának eredményeivel hasonlítottuk össze.

A kimutatást a 2. példában ismertetettek szerint végeztük.

A H79-ellenanyagok (huIgG1- és MIgG1-változatok) és a HD70-ellenanyag igen hasonló kötőaffinitást mutatott, amely az M79 egér ellenanyag kötőaffinitásának megfelelő nagyságrendbe esett.

IV.2. Affinitásmeghatározások

Felszíni plazmonrezonancia-méréseket végeztünk BIACORE2000-készülék alkalmazásával (Biacore AB, Freiburg, Németország). Rekombináns szolubilis 17-1A antigén immobilizálását az egyes áramlási kamrákban, és a kölcsönhatás analízisét automatikus módon, BIACORE2000-készülékben végeztük. Az antigént kovalens módon CM5-szenzorchiphez kötöttük az elsődleges aminocsoportokon keresztül. Miután a karboxilezett dextrán-mátrixot oly módon aktiváltuk, hogy mind a négy áramlási kamrán keresztül egyetlen alkalommal 80 µl, 0,1 mol/l N-hidroxi-szukcinimid/ 0,4 mol/l N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid (NHS/EDC) összetételű oldatot áramoltattunk át, a készülékbe s17-1A antigént injektáltunk [60 µg/ml, 10 mmol/l nátrium-acetát-pufferben (pH=4,7)], miközben az 1., 2., 3. és 4. áramlási kamrákat egymást után az áramlás útjába iktattuk. A 17-1A antigén eltérő érintkezési ideje az aktivált felszínnel körülbelül 2500 rezonanciaegységet (RU) eredményezett (RU9 az 1. áramlási kamrában; 14 000 RU a 2. áramlási

kamrában; 780 RU a 3. áramlási kamrában; és 290 RU a 4. áramlási kamrában). A feleslegben lévő aktivált észtereket úgy blokkoltuk, hogy 85 μ l, 1 mol/l etanol-amint (pH=5) injektáltunk mind a négy áramlási kamrán keresztül. A kötődésvizsgálati kísérleteket 25 °C-on végeztük, az alábbi összetételű pufferben: 10 mmol/l HEPES; 150 mmol/l NaCl; 3 mmol/l EDTA; és 0,005% P20-surfactant (felületaktív anyag) (pH=7,4). Az ellenanyagok kötődési kinetikáját immobilizált rekombináns 17-1A antigén vonatkozásában oly módon határoztuk meg, hogy 0,5–2 μ mol/l koncentrációjú ellenanyagmintákat injektáltunk a kamrába. Az egyes futtatások közt a szenzorchipet az alábbi összetételű pufferrel regeneráltuk: 100 mmol/l glicin; 500 mmol/l NaCl; 0,005% Tween (pH=3). Az asszociációs- és disszociációssebesség-konstantákat (Kon és Koff) a Biacore AB cégtől származó BIA-értékelő programmal elemeztük, Karlsson által leírtak szerint [J. Immunol. Meth. 145, 229 (1991)].

Az affinitásmeghatározást két kísérletsorozatban végeztük (1. sorozat: M79, H79; D7.2, Panorex; 2. sorozat: Panorex; HD70); az egér Panorexet belső referenciaként a 2. sorozatba is beiktattuk.

A D7.2 K_D -értéke a kimutathatóság szintje, azaz 10^{-4} mol/l alatt maradt, ezért azt a 2. táblázatban nem tüntettük fel.

2. táblázat

Az alábbi táblázatban humán és a megfelelő egér 17-1A ellenanyagok K_D -, K_{on} - és K_{off} -értékeit foglaltuk össze

Ellenanyag	K_{on} [$M^{-1}s^{-1}$]	K_{off} [s^{-1}]	K_D [M]
1. sorozat:			
egér M79	$6,0 \times 10^4$	$4,5 \times 10^{-2}$	$7,5 \times 10^{-7}$
humán H79	$2,1 \times 10^4$	$7,2 \times 10^{-3}$	$3,4 \times 10^{-7}$
egér Panorex	$1,1 \times 10^5$	$2,2 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-7}$
2. sorozat:			
humán HD70	$0,9 \times 10^5$	$3,5 \times 10^{-2}$	$3,9 \times 10^{-7}$
egér Panorex	$1,0 \times 10^5$	$2,7 \times 10^{-2}$	$2,7 \times 10^{-7}$

IV.3. 17-1A antigént expresszáló eukarióta sejtek áramlásos citometriás analízise

H79 (humán és egér IgG1-változatok), HD70 (humán IgG1) és D7.2 (humán IgG1) tisztított ellenanyag-készítményeket FACS-analízissel teszteltünk 17-1A antigént expresszáló Kato-sejteken, 17-1A antigént kódoló DNS-sel transzfektált CHO-sejteken és nem transzfektált CHO-sejteken. 2×10^5 sejtet inkubáltunk tisztított H79-huIgG1, H79-MIgG1, HD70, D7.2, M79, Panorex, M74ch (azaz, az M74) jelzésű egéregedetű anti-17-1A ellenanyag humán CHIgG1-humán Ckappa változata; Göttinger: Int. J. Cancer 38, (1986)] ellenanyagokkal (minden esetben 20 μ g/ml ellenanyaggal). A sejtekhez kötődött ellenanyagokat FITC-jelölt, egér vagy humán IgG elleni ellenanyagok (20 μ g/ml) alkalmazásával mutattuk ki. Az inkubációt 45–60 percig végeztük, jégen.

A H79 humán IgG1, H79 egér IgG1 és HD70 ellenanyagok egyértelműen kötődtek a 17-1A-pozitív sejtekhez, csakúgy, mint az M79- és Panorex-ellenanyagok. A D7.2-ellenanyag esetében gyenge, de szignifikáns kötődést tapasztaltunk. Az ellenanyagok egyike sem kötődött nem transzfektált CHO-sejtekhez, és az IgG-kontrollok alkalmazásával negatív eredményt kaptunk Kato-sejteken, CHO/17-1A-sejteken és nem transzfektált CHO-sejteken (lásd 16. és 17. ábrák).

IV.4. Ellenanyagfüggő sejtközvetített citotoxicitás meghatározása (51 Cr-felszabadulás alapján)

A 51 Cr-felszabadulás meghatározásán alapuló vizsgálathoz humán perifériás véreredetű mononukleáris sejteket (PBMC-eket) izoláltunk egészséges donorok véréből készített friss álhártyás bőrszövetéből („buffy coat”). A PBMC-eket Ficoll sűrűséggradiens-centrifugálással, majd $100 \times g$ mellett végzett centrifugálással izoláltuk. Száz (100) μ l, 10% FCS-sel kiegészített RPMI-1640-tápközegben szuszpendált, nem stimulált PBMC-eket (5×10^5 sejtet) adtunk lapos fenekű mikrotitráló lemez lyukaihoz, és a lemezeket egy éjszakán át 37 °C-on inkubáltuk. Célsejteket 2 órán át 51 Cr-mal jelöltünk. Jelölt célsejteket (100 μ l) és különböző koncentrációjú ellenanyagmintákat (50 μ l) adtunk a PBMC-khez, és azokat 18 órán át, 37 °C-on inkubáltuk. Megfelelő nem kötő izotípusokat alkalmaztunk negatív kontrollként. A specifikus lízist a következő képlet szerint számítottuk: (adott ellenanyag alkalmazásával végzett kísérletben mért cpm)–(spontán felszabadulás eredményezte cpm)/(maximális felszabaduláskor mérhető cpm)–(spontán felszabadulás eredményezte cpm) (cpm=count per minute, percenkénti beütésszám).

A fentiek szerint végzett 51 Cr-felszabadulási vizsgálatban, a H79 és HD70 jelzésű humán anti-17-1A ellenanyagok nagymértékben képesnek bizonyultak citotoxicitási reakció közvetítésére 17-1A-pozitív KATO gyomorkarcinóma-sejtvonalon. Az M79 jelzésű és Panorex elnevezésű egéregedetű anti-17-1A ellenanyagok lényegesen kisebb mértékben bizonyultak képesnek sejtpusztulás előidézésére (18. ábra).

IV.5. Teszt humán szöveteken

Vastagbél-karcinómából és normális vastagbél-szövetből készített 5 nm vastag kriometszeteket inkubáltunk a H79-ellenanyag egér IgG-változatával (az ellenanyagot 10 μ g/ml koncentrációban alkalmazva). Ebben a kísérletben a H79-ellenanyag egér IgG1-változatát alkalmaztuk, hogy a humán szövetben jelen lévő humán immunglobulinok okozta nem specifikus festődést kivédjük. A kötődött H79-MIgG1-ellenanyagok kimutathatóságát peroxidázzal konjugált, poliklonális, egér immunglobulinnal szemben irányuló ellenanyag hozzáadásával és karbazollal történő festéssel végeztük (barna). A hátteret hemalaunnal festettük.

Eredményeink értékelését fénymikroszkópos vizsgálattal végeztük.

A H79-MIgG1, valamint M79 jelzésű egér monoklonális ellenanyag (pozitív kontroll) erős festődést eredményezett normális vastagbélnyálkahártya-sejteken (M79: lásd 19. ábra; H79-MIgG1: lásd 20. ábra), és gyengébb festődést vastagbélkarcinóma-sejteken (M79:

lásd 21. ábra; H79–MIgG1: lásd 22. ábra). Ezzel szemben, izotópkontrollok alkalmazásával nem észleltünk festődést sem vastagbélnyálkahártya-, sem vastagbélkarcinóma-szöveteken (M79: lásd 23. ábra; H79–MIgG1: lásd 24. és 26. ábrák).

5. példa

H79- és HD70-ellenanyagok epitópanalízise

A H79 és HD70 jelzésű humán ellenanyagok által, és a templátként szolgáló M79 jelzésű egér ellenanyag által felismert 17–1A-epitópok összehasonlítására a 17–1A

antigén extracelluláris részének aminosavszekvenciája alapján 13 tagú (13mer) peptideket szintetizáltunk különálló foltokként *Pep Spots* membránon. Ezek a peptidek összességükben a 17–1A antigén teljes extracelluláris aminosavszekvenciáját fedték [lásd Szala: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 87, 3542 (1990)]; a szomszédos peptidek 11 aminosav tekintetében átfedő aminosavakat tartalmaztak, az 1. peptid első aminosava megegyezett a 17–1A antigén N-terminális aminosavával, a 119. peptid utolsó aminosava pedig megegyezett a 17–1A antigén extracelluláris részének C-terminális aminosavával (3. táblázat).

3. táblázat

Az epitópanalízishez a következő peptideket szintetizáltuk (a számok az egyes peptidfoltok pozícióját jelölik)

1. TATFAAAQEECVC	2. TFAAAQEECVCEN
3. AAAQEECVCENYK	4. AQEECVENYKLA
5. EECVCENYKLAVN	6. CVCENYKLAVNCF
7. CENYKLAVNCFVN	8. NYKLAVNCFVNNN
9. KLAVNCFVNNNRQ	10. AVNCFVNNNRQCQ
11. NCFVNNNRQCQCT	12. FVNNNRQCQCTSV
13. NNNRQCQCTSVGA	14. NRQCQCTSVGAQN
15. QCQCTSVGAQNTV	16. QCTSVGAQNTVIC
17. TSVGAQNTVICS	18. VGAQNTVICSCLA
19. AQNTVICSCLA	20. NTVICSCLA
21. VICSCLA	22. CSCLA
23. CLA	24. ACLA
25. CL	26. L
27. CL	28. A
29. CL	30. G
31. CL	32. R
33. CL	34. P
35. CL	36. E
37. CL	38. D
39. CL	40. E
41. CL	42. F
43. CL	44. K
45. CL	46. Q
47. CL	48. C
49. CL	50. N
51. CL	52. T
53. CL	54. A
55. CL	56. G
57. CL	58. V
59. CL	60. R
61. CL	62. T
63. CL	64. Y
65. CL	66. W
67. CL	68. I
69. CL	70. E
71. CL	72. L
73. CL	74. K
75. CL	76. H
77. CL	78. K
79. CL	80. A
81. CL	82. R
83. CL	84. E
85. CL	86. K
87. CL	88. P
89. CL	90. Y
	91. D
	92. S
	93. I
	94. L
	95. V
	96. I
	97. T
	98. D
	99. L
	100. V

3. táblázat (folytatás)

91. QNSSQKTQNDVDI	92. SSQKTQNDVDIAD
93. QKTQNDVDIADVA	94. TQNDVDIADVAYY
95. NDVDIADVAYYFE	96. VDIADVAYYFEKD
97. IADVAYYFEKDVK	98. DVAYYFEKDVKG
99. AYYFEKDVKGESL	100. YFEKDVKGESLFH
101. EKDVKGESLFHSH	102. DVKGESLFHSHKMDL
103. KGESLFHSHKMDL	104. ESFLHSHKMDLTV
105. LFHSHKMDLTVNG	106. HSHKMDLTVNGEQ
107. KKMDLTVNGEQDL	108. MDLTVNGEQDLDL
109. LTVNGEQDLDPG	110. VNGEQDLDPGQT
111. GEQLDLDPGQTLI	112. QDLDPGQTLIYY
113. DLDPGQTLIYYVD	114. DPGQTLIYYVDEK
115. GQTLIYYVDEKAP	116. TLIYYVDEKAPEF
117. IYYVDEKAPEFSM	118. YVDEKAPEFSMQG
119. DEKAPEFSMQGLK	

A szintetizált peptideket hordozó *Pep Spots* membránt tíz percig metanolban ráztuk, majd háromszor tíz-tíz percig TBS-pufferrel (pH=8) mostuk. Ezután, a membránt egy órán át kazeinalapú, 0,05 g/ml szacharózt tartalmazó blokkolóoldatban blokkoltuk, majd 0,05% Tween-20-detergenst tartalmazó TBS-pufferben (TBS-T) egyszer mostuk. Az egyes anti-17-1A ellenanyagokat három órán át, szobahőmérsékleten blokkolóoldatban (1 µg/ml ellenanyag) inkubáltuk a membránnal. Miután a membránt háromszor tíz-tíz percig TBS-T-pufferben mostuk, azt két órán át, szobahőmérsékleten, a tormaperoxidáz- (HRP-) konjugált másodlagos ellenanyaggal (1 µg/ml antieger/antihumán ellenanyag, blokkolóoldatban) inkubáltuk. Ezt követően, a membránt TBS-t-pufferben háromszor mostuk. A kötődött ellenanyagokat az M79-ellenanyag esetében közvetlenül *Pep Spots* membránon mutattuk ki, a kemilumineszcens reagenskészletet gyártó cég (Boehringer) utasításai szerint. Az előhívott filmet a 27. ábrán mutatjuk be. Miután a blottot TBS-T-pufferrel háromszor (10-10 percig) mostuk, azt 50 mmol/l Tris-HCl (pH=6,7); 100 mmol/l 2-merkaptotanol; és 2 vegyes% SDS összetételű oldatban 30 tormaperoxidáz- (HRP-) konjugált másodlagos ellenanyaggal (1 µg/ml antieger/antihumán ellenanyag, blokkolóoldatban) inkubáltuk. Ezt követően, a membránt TBS-t-pufferben háromszor mostuk. A kötődött ellenanyagokat az M79-ellenanyag esetében közvetlenül *Pep Spots* membránon mutattuk ki, a kemilumineszcens reagenskészletet gyártó cég (Boehringer) utasításai szerint. Az előhívott filmet a 27. ábrán mutatjuk be. Miután a blottot TBS-T-pufferrel háromszor (10-10 percig) mostuk, azt 50 mmol/l Tris-HCl (pH=6,7); 100 mmol/l 2-merkaptotanol; és 2 vegyes% SDS összetételű oldatban 30 percig, 50 °C-on regeneráltuk, majd azt újból fel-

használtuk a következő ellenanyag epitóptérképezésére.

Mivel a humán immunglobulin elleni másodlagos ellenanyag alkalmazásakor jelentős mértékű nem specifikus kötődést észleltünk a membránon található polipeptidfoltoknak megfelelően, a kötődött HD70- és H79-ellenanyagok tesztelésére azokat a *Pep Spots* membránról frakcionált elektrotranszfereljárással egy második blottmembránra vittük át, majd a humán immunglobulin elleni másodlagos ellenanyaggal kimutatást végeztünk Rüdiger eljárása szerint [EMBO 16, 1501 (1997)]. A másodlagos ellenanyaggal történő inkubálást és az ellenanyag-kimutatást a blottokon a fent leírtak szerint végeztük. Az előhívott filmeket a 27. ábrán mutatjuk be.

Amint az az ábrán (27. ábrán) látható, a peptidalapú epitóptérképezés eredményei arra utalnak, hogy az M79 jelzésű egéregedetű templátellenanyag által felismert epitóp, amelyet elsősorban a 38. és 95. peptidfoltok képviselnek, jelentős mértékben különbözik a H79 jelzésű humán ellenanyag által felismert epitóptól, amelyet főként a 8., 11., 13., 14., 59-60., 77. és 79. peptidfoltok képviselnek. Mivel a HD70 jelzésű humán ellenanyag esetében kötődés egyáltalán nem volt kimutatható, arra következtethetünk, hogy az általa felismert epitóp szintén eltér az M79 jelzésű egér ellenanyag által felismert epitóptól, továbbá arra, hogy a H79 és HD70 humán ellenanyagok nem ugyanazt az epitópot ismerik fel.

Annak magyarázata, hogy a HD70 jelzésű humán ellenanyag esetében kötődésre utaló jelet nem észleltünk, lehet az, hogy az konformációs, folyamatos vagy megszakított epitópot ismer fel; vagy részben, vagy teljes egészében szénhidrátból felépülő epitópot ismer fel; egyik említett esetben sem várható, hogy ilyen epitópoknak megfelelő rövid peptideket sikerül előállítani.

SZEKVENCIALISTA

AZ 1. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 22 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLOGIÁJA: lineáris MOLEKULATÍPUS: egyéb nukleinsav LEÍRÁS: /desc=„láncindító” AZ 1. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA: AGGTGCAGCT GCTCGAGTCT GG A 2. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI: A SZEKVENCIA JELLEMZŐI: HOSSZA: 24 bázispár TÍPUSA: nukleinsav HÁNY SZÁLÚ: egy TOPOLOGIÁJA: lineáris MOLEKULATÍPUS: egyéb nukleinsav LEÍRÁS: /desc=„láncindító” A 2. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA: CAGAGTCACC TTGCTCGAGT CTGG A 3. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI: A SZEKVENCIA JELLEMZŐI: HOSSZA: 23 bázispár TÍPUSA: nukleinsav HÁNY SZÁLÚ: egy TOPOLOGIÁJA: lineáris MOLEKULATÍPUS: egyéb nukleinsav LEÍRÁS: /desc=„láncindító” A 3. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA: CAGGTGCAGC TGCTCGAGTC GGG A 4. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI: A SZEKVENCIA JELLEMZŐI: HOSSZA: 23 bázispár TÍPUSA: nukleinsav HÁNY SZÁLÚ: egy TOPOLOGIÁJA: lineáris MOLEKULATÍPUS: egyéb nukleinsav LEÍRÁS: /desc=„láncindító” A 4. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA: CAGGTGCAGC TACTCGAGTG GGG AZ 5. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI: A SZEKVENCIA JELLEMZŐI: HOSSZA: 23 bázispár TÍPUSA: nukleinsav HÁNY SZÁLÚ: egy TOPOLOGIÁJA: lineáris MOLEKULATÍPUS: egyéb nukleinsav LEÍRÁS: /desc=„láncindító” AZ 5. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA: CAGGTACAGC TGCTCGAGTC AGG A 6. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI: A SZEKVENCIA JELLEMZŐI: HOSSZA: 30 bázispár TÍPUSA: nukleinsav HÁNY SZÁLÚ: egy TOPOLOGIÁJA: lineáris MOLEKULATÍPUS: egyéb nukleinsav LEÍRÁS: /desc=„láncindító” A 6. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA: TGCCTTACTA GTCTCTGGCC AGCGGAAGAT A 7. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI: A SZEKVENCIA JELLEMZŐI: HOSSZA: 38 bázispár TÍPUSA: nukleinsav HÁNY SZÁLÚ: egy	22 24 23 23 23 30
---	---

TOPOLOGIÁJA: lineáris MOLEKULATÍPUS: egyéb nukleinsav LEÍRÁS: /desc=„láncindító” A 7. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA: GAGCCGCACG AGCCCGAGCT CCAGATGACC CAGTCTCC A 8. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI: A SZEKVENCIA JELLEMZŐI: HOSSZA: 40 bázispár TÍPUSA: nukleinsav HÁNY SZÁLÚ: egy TOPOLOGIÁJA: lineáris MOLEKULATÍPUS: egyéb nukleinsav LEÍRÁS: /desc=„láncindító” A 8. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA: GAGCCGCACG AGCCCGAGCT CGTGATTGAC AGCAGTCTCC A 9. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI: A SZEKVENCIA JELLEMZŐI: HOSSZA: 39 bázispár TÍPUSA: nukleinsav HÁNY SZÁLÚ: egy TOPOLOGIÁJA: lineáris MOLEKULATÍPUS: egyéb nukleinsav LEÍRÁS: /desc=„láncindító” A 9. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA: GAGCCGCACG AGCCCGAGCT CGTGATGACC TCAGTCTCC A 10. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI: A SZEKVENCIA JELLEMZŐI: HOSSZA: 38 bázispár TÍPUSA: nukleinsav HÁNY SZÁLÚ: egy TOPOLOGIÁJA: lineáris MOLEKULATÍPUS: egyéb nukleinsav LEÍRÁS: /desc=„láncindító” A 10. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA: GAGCCGCACG AGCCCGAGCT CACACTCACG CAGTCTCC A 11. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI: A SZEKVENCIA JELLEMZŐI: HOSSZA: 38 bázispár TÍPUSA: nukleinsav HÁNY SZÁLÚ: egy TOPOLOGIÁJA: lineáris MOLEKULATÍPUS: egyéb nukleinsav LEÍRÁS: /desc=„láncindító” A 11. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA: GAGCCGCACG AGCCCGAGCT CGTGCTGACT CAGTCTCC A 12. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI: A SZEKVENCIA JELLEMZŐI: HOSSZA: 58 bázispár TÍPUSA: nukleinsav HÁNY SZÁLÚ: egy TOPOLOGIÁJA: lineáris MOLEKULATÍPUS: egyéb nukleinsav LEÍRÁS: /desc=„láncindító” A 12. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA: GCGCCGTCTA GAATTAACAC TCTCCCCTGT TGAAGCTCTT TGTGACGGGC GAACTCAG A 13. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI: A SZEKVENCIA JELLEMZŐI: HOSSZA: 24 bázispár TÍPUSA: nukleinsav HÁNY SZÁLÚ: egy	38 40 39 38 38 58
---	---

TOPOLOGIÁJA: lineáris MOLEKULATÍPUS: egyéb nukleinsav LEÍRÁS: /desc=„láncindító” A 13. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA: AATTTTGAGC TCACTCAGCC CCAC A 14. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI: A SZEKVENCIA JELLEMZŐI: HOSSZA: 27 bázispár TÍPUSA: nukleinsav HÁNY SZÁLÚ: egy TOPOLOGIÁJA: lineáris MOLEKULATÍPUS: egyéb nukleinsav LEÍRÁS: /desc=„láncindító” A 14. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA: TCTGCCGAGC TCCAGCCTGC CTCCGTG A 15. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI: A SZEKVENCIA JELLEMZŐI: HOSSZA: 27 bázispár TÍPUSA: nukleinsav HÁNY SZÁLÚ: egy TOPOLOGIÁJA: lineáris MOLEKULATÍPUS: egyéb nukleinsav LEÍRÁS: /desc=„láncindító” A 15. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA: TCTGTGGAGC TCCAGCCGCC CTCAGTG A 16. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI: A SZEKVENCIA JELLEMZŐI: HOSSZA: 33 bázispár TÍPUSA: nukleinsav HÁNY SZÁLÚ: egy TOPOLOGIÁJA: lineáris MOLEKULATÍPUS: egyéb nukleinsav LEÍRÁS: /desc=„láncindító” A 16. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA: TCTGAAGAGC TCCAGGACCC TGTTGTGTCT GTG A 17. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI: A SZEKVENCIA JELLEMZŐI: HOSSZA: 24 bázispár TÍPUSA: nukleinsav HÁNY SZÁLÚ: egy TOPOLOGIÁJA: lineáris MOLEKULATÍPUS: egyéb nukleinsav LEÍRÁS: /desc=„láncindító” A 17. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA: CAGTCTGAGC TCACGCAGCC GCCC A 18. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI: A SZEKVENCIA JELLEMZŐI: HOSSZA: 24 bázispár TÍPUSA: nukleinsav HÁNY SZÁLÚ: egy TOPOLOGIÁJA: lineáris MOLEKULATÍPUS: egyéb nukleinsav LEÍRÁS: /desc=„láncindító” A 18. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA: CAGACTGAGC TCACTCAGGA GCCC A 19. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI: A SZEKVENCIA JELLEMZŐI: HOSSZA: 24 bázispár TÍPUSA: nukleinsav HÁNY SZÁLÚ: egy	24 27 27 33 24 24
---	---

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: egyéb nukleinsav

LEÍRÁS: /desc=„láncindító”

A 19. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CAGGTTGAGC TCACTCAACC GCCC

24

A 20. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 27 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: egyéb nukleinsav

LEÍRÁS: /desc=„láncindító”

A 20. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CAGGCTGAGC TCACTCAGCC GTCTTCC

27

A 21. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 30 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: egyéb nukleinsav

LEÍRÁS: /desc=„láncindító”

A 21. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CGCCGTCTAG AATTATGAAC ATTCTGTAGG

30

A 22. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 22. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Thr Ala Thr Phe Ala Ala Ala Gln Glu Cys Val Cys
1 5 10

A 23. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 23. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Thr Phe Ala Ala Ala Gln Glu Glu Cys Val Cys Glu Asn
1 5 10

A 24. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 24. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Ala Ala Ala Gln Glu Glu Cys Val Cys Glu Asn Tyr Lys
1 5 10

A 25. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 25. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Ala	Gln	Glu	Glu	Cys	Val	Cys	Glu	Asn	Tyr	Lys	Leu	Ala
1				5							10	

A 26. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 26. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Glu	Glu	Cys	Val	Cys	Glu	Asn	Tyr	Lys	Leu	Ala	Val	Asn
1				5							10	

A 27. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 27. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Cys	Val	Cys	Glu	Asn	Tyr	Lys	Leu	Ala	Val	Asn	Cys	Phe
1				5							10	

A 28. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 28. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Cys	Glu	Asn	Tyr	Lys	Leu	Ala	Val	Asn	Cys	Phe	Val	Asn
1				5							10	

A 29. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 29. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Asn	Tyr	Lys	Leu	Ala	Val	Asn	Cys	Phe	Val	Asn	Asn	Asn
1					5						10	

A 30. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 30. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Lys Leu Ala Val Asn Cys Phe Val Asn Asn Asn Arg Gln
1 5 10

A 31. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 31. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Ala Val Asn Cys Phe Val Asn Asn Asn Arg Gln Cys Gln
1 5 10

A 32. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 32. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Asn Cys Phe Val Asn Asn Asn Arg Gln Cys Gln Cys Thr
1 5 10

A 33. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 33. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Phe Val Asn Asn Asn Arg Gln Cys Gln Cys Thr Ser Val
1 5 10

A 34. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 34. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Asn Asn Asn Arg Gln Cys Gln Cys Thr Ser Val Gly Ala
1 5 10

A 35. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 35. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Asn Arg Gln Cys Gln Cys Thr Ser Val Gly Ala Gln Asn
1 5 10

A 36. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 36. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Gln	Cys	Gln	Cys	Thr	Ser	Val	Gly	Ala	Gln	Asn	Thr	Val
1				5							10	

A 37. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 37. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Gln	Cys	Thr	Ser	Val	Gly	Ala	Gln	Asn	Thr	Val	Ile	Cys
1				5						10		

A 38. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 38. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Thr	Ser	Val	Gly	Ala	Gln	Asn	Thr	Val	Ile	Cys	Ser	Lys
1				5						10		

A 39. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 39. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Val	Gly	Ala	Gln	Asn	Thr	Val	Ile	Cys	Ser	Lys	Leu	Ala
1				5						10		

A 40. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 40. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Ala	Gln	Asn	Thr	Val	Ile	Cys	Ser	Lys	Leu	Ala	Ala	Lys
1				5						10		

A 41. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 41. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Asn Thr Val Ile Cys Ser Lys Leu Ala Ala Lys Cys Leu
1 5 10

A 42. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 42. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Val Ile Cys Ser Lys Leu Ala Ala Lys Cys Leu Val Met
1 5 10

A 43. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 43. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Cys Ser Lys Leu Ala Ala Lys Cys Leu Val Met Lys Ala
1 5 10

A 44. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 44. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Lys Leu Ala Ala Lys Cys Leu Val Met Lys Ala Glu Met
1 5 10

A 45. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 45. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Ala Ala Lys Cys Leu Val Met Lys Ala Glu Met Asn Gly
1 5 10

A 46. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 46. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Lys Cys Leu Val Met Lys Ala Glu Met Asn Gly Ser Lys
1 5 10

A 47. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 47. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Leu Val Met Lys Ala Glu Met Asn Gly Ser Lys Leu Gly
 1 5 10

A 48. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 48. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Met Lys Ala Glu Met Asn Gly Ser Lys Leu Gly Arg Arg
 1 5 10

A 49. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 49. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Ala Glu Met Asn Gly Ser Lys Leu Gly Arg Arg Ala Lys
 1 5 10

AZ 50. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

AZ 50. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Met Asn Gly Ser Lys Leu Gly Arg Arg Ala Lys Pro Glu
 1 5 10

AZ 51. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

AZ 51. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Gly Ser Lys Leu Gly Arg Arg Ala Lys Pro Glu Gly Ala
 1 5 10

AZ 52. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

AZ 52. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Lys Leu Gly Arg Arg Ala Lys Pro Glu Gly Ala Leu Gln
1 5 10

AZ 53. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

AZ 53. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Gly Arg Arg Ala Lys Pro Glu Gly Ala Leu Gln Asn Asn
1 5 10

AZ 54. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

AZ 54. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Arg Ala Lys Pro Glu Gly Ala Leu Gln Asn Asn Asp Gly
1 5 10

AZ 55. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

AZ 55. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Lys Pro Glu Gly Ala Leu Gln Asn Asn Asp Gly Leu Tyr
1 5 10

AZ 56. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

AZ 56. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Glu Gly Ala Leu Gln Asn Asn Asp Gly Leu Tyr Asp Pro
1 5 10

AZ 57. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

AZ 57. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Ala Leu Gln Asn Asn Asp Gly Leu Tyr Asp Pro Asp Cys
1 5 10

AZ 58. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

AZ 58. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Gln	Asn	Asn	Asp	Gly	Leu	Tyr	Asp	Pro	Asp	Cys	Asp	Glu
1				5						10		

AZ 59. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

AZ 59. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Asn	Asp	Gly	Leu	Tyr	Asp	Pro	Asp	Cys	Asp	Glu	Ser	Gly
1				5						10		

A 60. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 60. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Gly	Leu	Tyr	Asp	Pro	Asp	Cys	Asp	Glu	Ser	Gly	Leu	Phe
1				5						10		

A 61. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 61. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Tyr	Asp	Pro	Asp	Cys	Asp	Glu	Ser	Gly	Leu	Phe	Lys	Ala
1				5						10		

A 62. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 62. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Pro	Asp	Cys	Asp	Glu	Ser	Gly	Leu	Phe	Lys	Ala	Lys	Gln
1				5						10		

A 63. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 63. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Cys Asp Glu Ser Gly Leu Phe Lys Ala Lys Gln Cys Asn
1 5 10

A 64. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 64. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Glu Ser Gly Leu Phe Lys Ala Lys Gln Cys Asn Gly Thr
1 5 10

A 65. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 65. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Gly Leu Phe Lys Ala Lys Gln Cys Asn Gly Thr Ser Thr
1 5 10

A 66. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 66. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Phe Lys Ala Lys Gln Cys Asn Gly Thr Ser Thr Cys Trp
1 5 10

A 67. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 67. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Ala Lys Gln Cys Asn Gly Thr Ser Thr Cys Trp Cys Val
1 5 10

A 68. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 68. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Gln Cys Asn Gly Thr Ser Thr Cys Trp Cys Val Asn Thr
1 5 10

A 69. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 69. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Asn	Gly	Thr	Ser	Thr	Cys	Trp	Cys	Val	Asn	Thr	Ala	Gly
1				5					10			

A 70. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 70. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Thr	Ser	Thr	Cys	Trp	Cys	Val	Asn	Thr	Ala	Gly	Val	Arg
1				5					10			

A 71. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 71. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Thr	Cys	Trp	Cys	Val	Asn	Thr	Ala	Gly	Val	Arg	Arg	Thr
1				5					10			

A 72. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 72. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Trp	Cys	Val	Asn	Thr	Ala	Gly	Val	Arg	Arg	Thr	Asp	Lys
1				5					10			

A 73. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 73. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Val	Asn	Thr	Ala	Gly	Val	Arg	Arg	Thr	Asp	Lys	Asp	Thr
1				5					10			

A 74. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 74. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Thr Ala Gly Val Arg Arg Thr Asp Lys Asp Thr Glu Ile
1 5 10

A 75. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 75. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Gly Val Arg Arg Thr Asp Lys Asp Thr Glu Ile Thr Cys
1 5 10

A 76. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 76. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Arg Arg Thr Asp Lys Asp Thr Glu Ile Thr Cys Ser Glu
1 5 10

A 77. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 77. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Thr Asp Lys Asp Thr Glu Ile Thr Cys Ser Glu Arg Val
1 5 10

A 78. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 78. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Lys Asp Thr Glu Ile Thr Cys Ser Glu Arg Val Arg Thr
1 5 10

A 79. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 79. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Thr Glu Ile Thr Cys Ser Glu Arg Val Arg Thr Tyr Trp
1 5 10

A 80. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 80. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Ile	Thr	Cys	Ser	Glu	Arg	Val	Arg	Thr	Tyr	Trp	Ile	Ile
1				5					10			

A 81. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 81. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Cys	Ser	Glu	Arg	Val	Arg	Thr	Tyr	Trp	Ile	Ile	Ile	Glu
1				5					10			

A 82. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 82. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Glu	Arg	Val	Arg	Thr	Tyr	Trp	Ile	Ile	Ile	Glu	Leu	Lys
1				5					10			

A 83. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 83. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Val	Arg	Thr	Tyr	Trp	Ile	Ile	Ile	Glu	Leu	Lys	His	Lys
1				5					10			

A 84. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 84. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Thr	Tyr	Trp	Ile	Ile	Ile	Glu	Leu	Lys	His	Lys	Ala	Arg
1				5					10			

A 85. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 85. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Trp Ile Ile Ile Glu Leu Lys His Lys Ala Arg Glu Lys
1 5 10

A 86. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 86. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Ile Ile Glu Leu Lys His Lys Ala Arg Glu Lys Pro Tyr
1 5 10

A 87. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 87. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Glu Leu Lys His Lys Ala Arg Glu Lys Pro Tyr Asp Ser
1 5 10

A 88. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 88. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Lys His Lys Ala Arg Glu Lys Pro Tyr Asp Ser Lys Ser
1 5 10

A 89. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 89. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Lys Ala Arg Glu Lys Pro Tyr Asp Ser Lys Ser Leu Arg
1 5 10

A 90. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 90. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Arg Glu Lys Pro Tyr Asp Ser Lys Ser Leu Arg Thr Ala
1 5 10

A 91. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 91. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Lys Pro Tyr Asp Ser Lys Ser Leu Arg Thr Ala Leu Gln
 1 5 10

A 92. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 92. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Tyr Asp Ser Lys Ser Leu Arg Thr Ala Leu Gln Lys Glu
 1 5 10

A 93. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 93. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Ser Lys Ser Leu Arg Thr Ala Leu Gln Lys Glu Ile Thr
 1 5 10

A 94. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 94. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Ser Leu Arg Thr Ala Leu Gln Lys Glu Ile Thr Thr Arg
 1 5 10

A 95. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 95. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Arg Thr Ala Leu Gln Lys Glu Ile Thr Thr Arg Tyr Gln
 1 5 10

A 96. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 96. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Ala Leu Gln Lys Glu Ile Thr Thr Arg Tyr Gln Leu Asp
1 5 10

A 97. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 97. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Gln Lys Glu Ile Thr Thr Arg Tyr Gln Leu Asp Pro Lys
1 5 10

A 98. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 98. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Glu Ile Thr Thr Arg Tyr Gln Leu Asp Pro Lys Phe Ile
1 5 10

A 99. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 99. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

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

A 100. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 100. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

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

A 101. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 101. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Gln Leu Asp Pro Lys Phe Ile Thr Ser Ile Leu Tyr Glu
1 5 10

A 102. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 102. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Asp	Pro	Lys	Phe	Ile	Thr	Ser	Ile	Leu	Tyr	Glu	Asn	Asn
1				5					10			

A 103. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 103. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Lys	Phe	Ile	Thr	Ser	Ile	Leu	Tyr	Glu	Asn	Asn	Val	Ile
1				5					10			

A 104. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 104. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Ile	Thr	Ser	Ile	Leu	Tyr	Glu	Asn	Asn	Val	Ile	Thr	Ile
1				5					10			

A 105. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 105. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Ser	Ile	Leu	Tyr	Glu	Asn	Asn	Val	Ile	Thr	Ile	Asp	Leu
1				5					10			

A 106. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 106. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Leu	Tyr	Glu	Asn	Asn	Val	Ile	Thr	Ile	Asp	Leu	Val	Gln
1				5					10			

A 107. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 107. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Glu Asn Asn Val Ile Thr Ile Asp Leu Val Gln Asn Ser
1 5 10

A 108. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 108. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Asn Val Ile Thr Ile Asp Leu Val Gln Asn Ser Ser Gln
1 5 10

A 109. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 109. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Ile Thr Ile Asp Leu Val Gln Asn Ser Ser Gln Lys Thr
1 5 10

A 110. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 110. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Ile Asp Leu Val Gln Asn Ser Ser Gln Lys Thr Gln Asn
1 5 10

A 111. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 111. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Leu Val Gln Asn Ser Ser Gln Lys Thr Gln Asn Asp Val
1 5 10

A 112. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 112. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Gln Asn Ser Ser Gln Lys Thr Gln Asn Asp Val Asp Ile
1 5 10

A 113. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 113. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Ser Ser Gln Lys Thr Gln Asn Asp Val Asp Ile Ala Asp
 1 5 10

A 114. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 114. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Gln Lys Thr Gln Asn Asp Val Asp Ile Ala Asp Val Ala
 1 5 10

A 115. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 115. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Thr Gln Asn Asp Val Asp Ile Ala Asp Val Ala Tyr Tyr
 1 5 10

A 116. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 116. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Asn Asp Val Asp Ile Ala Asp Val Ala Tyr Tyr Phe Glu
 1 5 10

A 117. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 117. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Val Asp Ile Ala Asp Val Ala Tyr Tyr Phe Glu Lys Asp
 1 5 10

A 118. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 118. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Ile Ala Asp Val Ala Tyr Tyr Phe Glu Lys Asp Val Lys
1 5 10

A 119. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 119. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Asp Val Ala Tyr Tyr Phe Glu Lys Asp Val Lys Gly Glu
1 5 10

A 120. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 120. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Ala Tyr Tyr Phe Glu Lys Asp Val Lys Gly Glu Ser Leu
1 5 10

A 121. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 121. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Tyr Phe Glu Lys Asp Val Lys Gly Glu Ser Leu Phe His
1 5 10

A 122. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 122. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Glu Lys Asp Val Lys Gly Glu Ser Leu Phe His Ser Lys
1 5 10

A 123. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 123. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Asp Val Lys Gly Glu Ser Leu Phe His Ser Lys Lys Met
1 5 10

A 124. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 124. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Lys Gly Glu Ser Leu Phe His Ser Lys Lys Met Asp Leu
 1 5 10

A 125. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 125. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Glu Ser Leu Phe His Ser Lys Lys Met Asp Leu Thr Val
 1 5 10

A 126. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 126. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Leu Phe His Ser Lys Lys Met Asp Leu Thr Val Asn Gly
 1 5 10

A 127. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 127. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

His Ser Lys Lys Met Asp Leu Thr Val Asn Gly Glu Gln
 1 5 10

A 128. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 128. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Lys Lys Met Asp Leu Thr Val Asn Gly Glu Gln Leu Asp
 1 5 10

A 129. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 129. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Met Asp Leu Thr Val Asn Gly Glu Gln Leu Asp Leu Asp
1 5 10

A 130. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 130. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Leu Thr Val Asn Gly Glu Gln Leu Asp Leu Asp Pro Gly
1 5 10

A 131. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 131. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Val Asn Gly Glu Gln Leu Asp Leu Asp Pro Gly Gln Thr
1 5 10

A 132. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 132. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Gly Glu Gln Leu Asp Leu Asp Pro Gly Gln Thr Leu Ile
1 5 10

A 133. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 133. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Gln Leu Asp Leu Asp Pro Gly Gln Thr Leu Ile Tyr Tyr
1 5 10

A 134. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 134. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Asp Leu Asp Pro Gly Gln Thr Leu Ile Tyr Tyr Val Asp
1 5 10

A 135. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLOGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 135. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Asp Pro Gly Gln Thr Leu Ile Tyr Tyr Val Asp Glu Lys
 1 5 10

A 136. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLOGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 136. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Gly Gln Thr Leu Ile Tyr Tyr Val Asp Glu Lys Ala Pro
 1 5 10

A 137. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLOGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 137. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Thr Leu Ile Tyr Tyr Val Asp Glu Lys Ala Pro Glu Phe
 1 5 10

A 138. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLOGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 138. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Ile Tyr Tyr Val Asp Glu Lys Ala Pro Glu Phe Ser Met
 1 5 10

A 139. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLOGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 139. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Tyr Val Asp Glu Lys Ala Pro Glu Phe Ser Met Gln Gly
 1 5 10

A 140. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 13 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 140. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Asp Glu Lys Ala Pro Glu Phe Ser Met Gln Gly Leu Lys
1 5 10

A 141. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 321 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: kettős

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

SAJÁTSÁG:

NÉV/MEGJELÖLÉS: cdss

ELHELYEZKEDÉS: 1...321

A 141. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GAG CTC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCT TCT GTG GGA 48
Glu Leu Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGT CGG ACA AGT CAG AGC ATT AGC AGC TAT 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

TTA AAT TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGA CAG CCT CCT AAG CTG CTC ATT 144
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

TAC TGG GCA TCT ACC CGG GAA TCC GGG GTC CCT GAC CGA TTC AGT GGC 192
Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

AGC GGG TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT CTA CAA CCT 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

GAA GAT TCT GCA ACT TAC TAC TGT CAG CAG AGT TAC GAC ATC CCG TAC 288
Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Asp Ile Pro Tyr
85 90 95

ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA 321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

A 142. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 107 aminosav

TÍPUSA: aminosav

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: fehérje

A 142. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Asp Ile Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

A 143. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 414 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: kettős

TOPOLOGIÁJA: lineáris

SAJÁTSÁG:

NÉV/MEGJELÖLÉS: cds

ELHELYEZKEDÉS: 1...414

A 143. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GAG GTG CAG CTG CTC GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG	48
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg	
110 115 120	
TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT	96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	
125 130 135	
GGC ATG CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG	144
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
140 145 150 155	
GCA GTT ATA TCA TAT GAT GGA AGT AAT AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG	192
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
160 165 170	
AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT	240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
175 180 185	
CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCT GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT	288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
190 195 200	
GCG AAA GAT ATG GGG TGG GGC AGT GGC TGG AGA CCC TAC TAC TAC TAC	336
Ala Lys Asp Met Gly Trp Gly Ser Gly Trp Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr	
205 210 215	
GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GCA	384
Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala	
220 225 230 235	
CCC ACC AAG GCT CCG GAT GTG TTC CCT CTA	414
Pro Thr Lys Ala Pro Asp Val Phe Pro Leu	
240 245	

A 144. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 138 aminosav

TÍPUSA: aminosav

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: fehérje

A 144. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Asp Met Gly Trp Gly Ser Gly Trp Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr
 100 105 110

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

Pro Thr Lys Ala Pro Asp Val Phe Pro Leu
 130 135

A 145. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 372 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: kettős

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

SAJÁTSÁG:

NÉV/MEGJELÖLÉS: cds

ELHELYEZKEDÉS: 1...372

A 145. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GAG GTG CAG CTG CTC GAG TCT GGG GGA GTC GTG GTA CAG CCT GGG GGG 48
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Val Val Val Gln Pro Gly Gly
 140 145 150

TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT GAT GAT TAT 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 155 160 165 170

GCC ATG CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG 144
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 175 180 185

GCA GTT ATA TCA TAT GAT GGA AGT AAT AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG 192
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 190 195 200

AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 205 210 215

CTG	CAA	ATG	AAC	AGC	CTG	AGA	GCT	GAG	GAC	ACG	GCT	GTG	TAT	TAC	TGT	288
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
220						225					230					

GCG	AAA	AAG	GAA	GGC	TAC	TGG	GGC	CAG	GGA	ACC	CTG	GTC	ACC	GTC	TCC	336
Ala	Lys	Lys	Glu	Gly	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	
235					240					245					250	

TCA	GCA	CCC	ACC	AAG	GCT	CCG	GAT	GTG	TTC	CCT	CTA					
Ser	Ala	Pro	Thr	Lys	Ala	Pro	Asp	Val	Phe	Pro	Leu					
				255					260							

A 146. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 124 aminosav

TÍPUSA: aminosav

TOPOLOGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: fehérje

A 146. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

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

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

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

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

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

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

Ala	Lys	Lys	Glu	Gly	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	
			100					105						110		

Ser	Ala	Pro	Thr	Lys	Ala	Pro	Asp	Val	Phe	Pro	Leu					
				115			120									

A 147. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 321 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: kettős

TOPOLOGIÁJA: lineáris

SAJÁTSÁG:

NÉV/MEGJELÖLÉS: cds

ELHELYEZKEDEÉS: 1...321

A 147. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GAG	CTC	CAG	ATG	ACC	CAG	TCT	CCA	TCC	TCC	CTG	TCT	GCA	TCT	GTA	GGA	48
Glu	Leu	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	
125					130					135					140	

GAC	AGA	GTC	ACC	ATC	ACT	TGC	CGG	GCA	AGT	CAG	AGC	ATT	AGC	AGC	TAT	96
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Ser	Tyr	
				145					150					155		

TTA AAT TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGA CAG CCT CCT AAG CTG CTC ATT	144
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile	
160 165 170	
TAC TGG GCA TCT ACC CGG GAA TCC GGG GTC CCT GAC CGA TTC AGC GGC	192
Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly	
175 180 185	
AGT GAA TCT GGG ACA AAT TAC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT	240
Ser Glu Ser Gly Thr Asn Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	
190 195 200	
GAA GAT TTT GCT ACT TAC TTT TGT CAA CAG TCT GAC AGT TTG CCG ATC	288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asp Ser Leu Pro Ile	
205 210 215 220	
ACC TTC GGC CAA GGG ACA CGA CTG GAC ATT CAA	321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Asp Ile Gln	
225 230	

A 148. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 107 aminosav

TÍPUSA: aminosav

TOPOLOGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: fehérje

A 148. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

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

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás humán antigén elleni receptor előállítására, *azzal jellemezve*, hogy (b) funkcionálisan átrendezett VH- és VL-immunglobulin-láncok kombinációját szelektáljuk, amely kombinációban legalább a VH-lánc naiv, érett, humán B-limfocitákból, a VL-lánc pedig természetben előforduló humán B-sejt-repertoárból származik, és a láncok rekombináns vektorról expresszálódnak, és (c) humán antigénhez való kötődés megvalósítására *in vitro* prezentáló rendszert alkalmazunk, és ahol

50 a (b) szelekciós lépés végrehajtása előtt (a) lépésben vagy a VH-láncot vagy a VL-láncot szelektáljuk az antigénre való kötődésre, egy nem humán, célantigén-specifikus ellenanyag V-láncával együttesen.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy receptorként immunglobulint vagy immunglobulin-fragmentumot, célszerűen Fv-fragmentumot alkalmazunk.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy legalább a VH-, adott esetben pedig a VL-immunglobulin-láncoként is humán IgD-repertoár-

ból származó VH- és VL-láncok kombinációját szelektáljuk.

4. Az 1–3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy *in vitro* prezentáló rendszerként fágprezentációs rendszert alkalmazunk.

5. Az 1–4. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a láncok kombinációjaként egy vagy több különböző génkönyvtárból expresszálatott, átrendeződött láncok kombinációját szelektáljuk.

6. Az 1–5. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy humán antigénként tumorantigén, előnyösebben a humán 17–1A antigén elleni receptort állítunk elő.

7. A 6. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy VH-láncként a 7. ábrán megadott 1–381. nukleotidok vagy a 8. ábrán megadott 1–339. nukleotidok formájában bemutatott szekvenciát; és/vagy VL-láncként a 6. ábrán megadott 1–321. nukleotidok vagy a 9. ábrán megadott 1–321. nukleotidok formájában bemutatott szekvenciát tartalmazó láncok kombinációját szelektáljuk.

8. Az 1–7. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a (b) szelekciós lépést az alábbi lépések végrehajtásával végezzük:

(i) az antigénreceptort expresszáló, azt prezentáló hordozót a felsoroltak bármelyikéhez kötjük:

(a) immobilizált célantigénhez vagy annak fragmentumaihoz;

(b) a célantigént vagy annak fragmentumait expresszáló, adott esetben jelölt sejtekhez; vagy

(c) szolubilis, előnyösen jelölt célantigénhez vagy annak fragmentumaihoz;

(ii) a nem specifikus módon kötődött prezentáló hordozókat mosással eltávolítjuk (a és b), majd a specifikus módon kötődött prezentáló hordozókat eluáljuk; vagy

(iii) a célantigénhez kötődött prezentáló hordozót a célantigént tartalmazó oldatból vagy a célantigént expresszáló sejtek szuszpenziójából kényszerdúsítjuk (b és c);

az ily módon izolált, a megfelelő antigénreceptorokat tartalmazó prezentáló hordozókat adott esetben replikációval megsokszorozzuk, és további *in vitro* szelekciós ciklusoknak vetjük alá az (i)-től (iii)-ig terjedő lépések szerint.

9. Az 1–8. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy nem humán célantigén-specifikus ellenanyag láncaként egéreredetű VH- vagy VL-lánccal kombinálva szelektálunk az antigénhez történő kötődésre.

10. Az 1–9. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a megfelelő kombinációt a következő lépéseket is végrehajtva szelektáljuk:

(a) egy és ugyanazon VH-láncot számos különböző VL-lánccal kombinálva tesztelünk humán antigénhez történő kötődésre; vagy

(b) egy és ugyanazon VL-láncot számos különböző VH-lánccal kombinálva tesztelünk humán antigénhez történő kötődésre.

11. Az 1–10. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy szelekciót követően a humán VH- és VL-láncokat vagy az azoknak megfelelő nukleinsavakat kinyerjük, és a láncokat ugyanazon vagy más VH- és VL-láncokkal, immunglobulin nehéz-lánc-konstansrégiókkal (CH) vagy könnyűlánc-konstansrégiókkal (CL) vagy ezek részeivel, vagy nem immunglobulin láncokkal fuzionáltatjuk; vagy a nukleinsavszekvenciákat rendre a fentiek bármelyikét kódoló nukleinsavszekvenciával fuzionáltatjuk.

12. A 11. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a konstansrégióláncokként emberi IgG1-ből vagy IgG3-ból származó konstansrégióval vagy azt kódoló nukleinsavval valósítjuk meg a fúziót.

13. Az 1–12. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy szelekció után, a humán VH- és VL-láncokat kinyerjük és fizikailag nem fehérje jellegű gyógyhatású anyaghoz és/vagy más, biológiailag aktív molekulához kapcsoljuk.

14. Az 1–13. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a VH- vagy a VL-láncokat olyan nukleinsavszekvenciákról expresszálatjuk, amelyek naív, érett, humán B-limfocitákból származó mRNS RT-PCR-amplifikálásának eredményei.

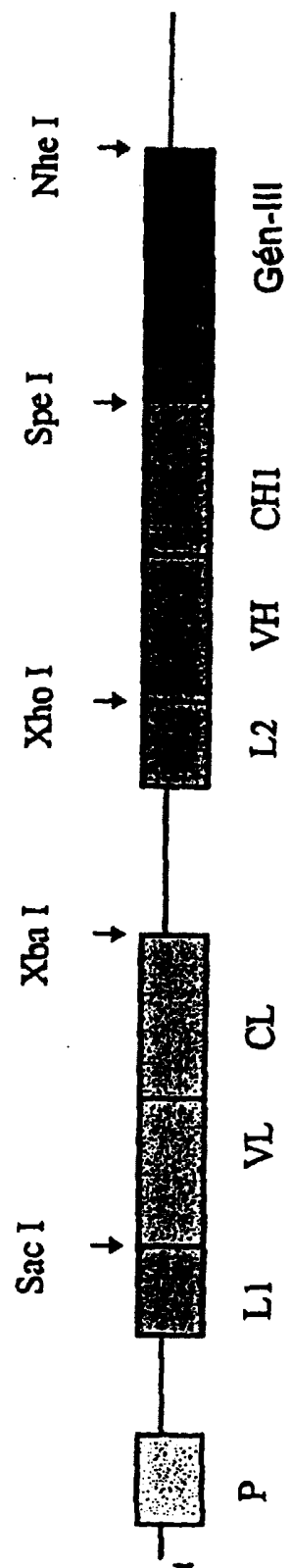
15. Humán ellenanyag, amely natív, humán 17–1A antigénre specifikus.

16. A 15. igénypont szerinti ellenanyag, amely az 1–14. igénypontok bármelyike szerinti eljárással állítható elő.

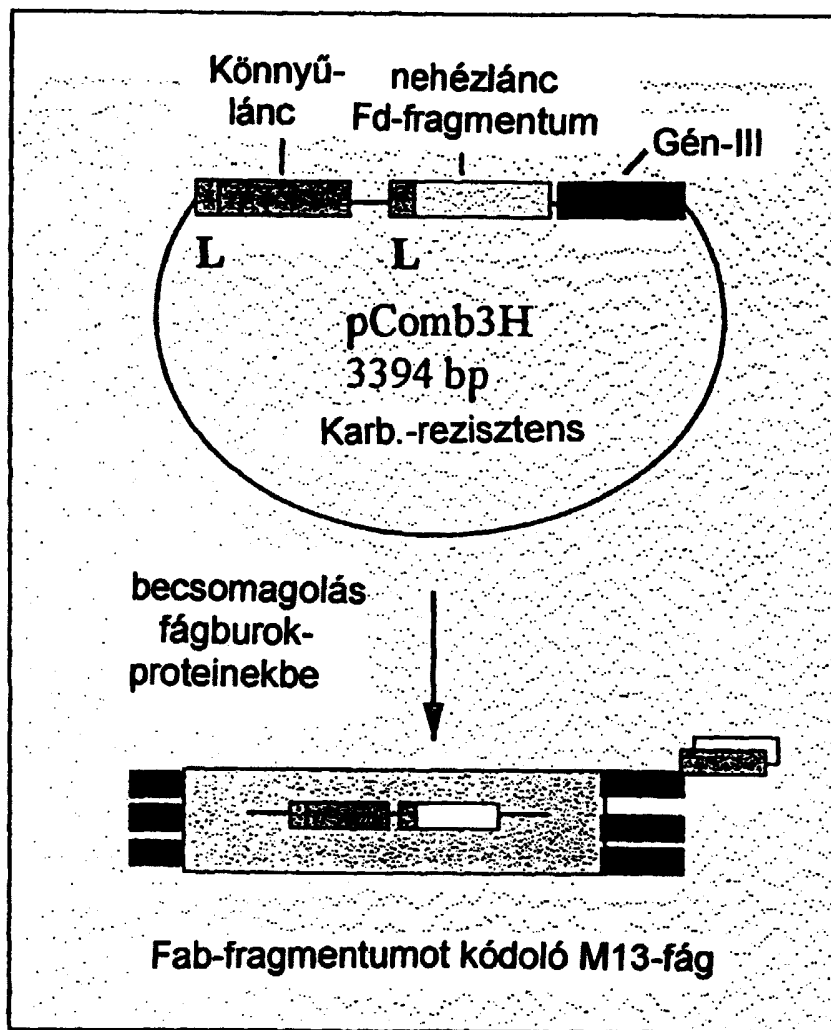
17. A 15. vagy 16. igénypontok bármelyike szerinti ellenanyag, amely a 17–1A antigén extracelluláris doménje egyik epitópján ismeri fel és előnyösen legalább egy aminosavszekvenciát tartalmaz az alábbi peptidek szekvenciái közül: 8., 11., 13., 14., 59., 60., 77. és 79. szekvencia.

18. A 15–17. igénypontok bármelyike szerinti ellenanyag, amelynek VH-lánca legalább egy, a 7. ábrán megadott 1–381. nukleotidok vagy a 8. ábrán megadott 1–339. nukleotidok formájában bemutatott szekvenciák szerinti CDR-t tartalmaz; és/vagy amelynek VL-lánca legalább egy, a 6. ábrán megadott 1–321. nukleotidok vagy a 9. ábrán megadott 1–321. nukleotidok formájában bemutatott szekvenciák szerinti CDR-t tartalmaz.

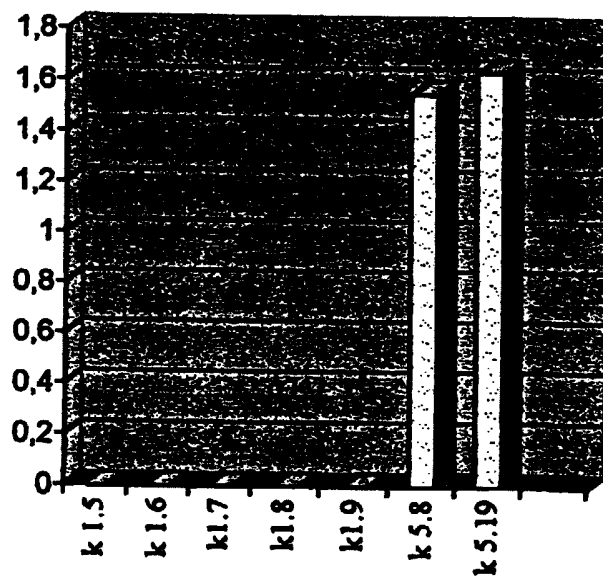
19. Gyógyászati készítmény, amely 15–18. igénypontok bármelyike szerinti ellenanyagot és adott esetben gyógyászatilag elfogadható hordozót tartalmaz.



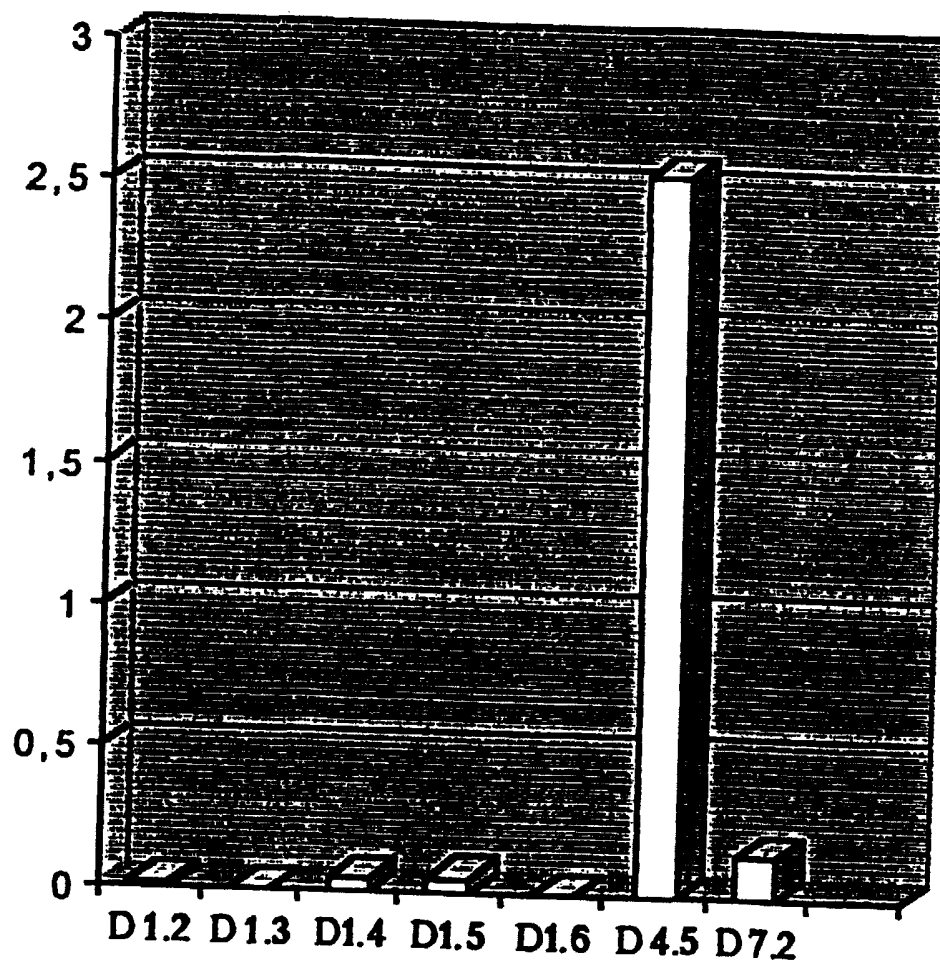
1. ábra



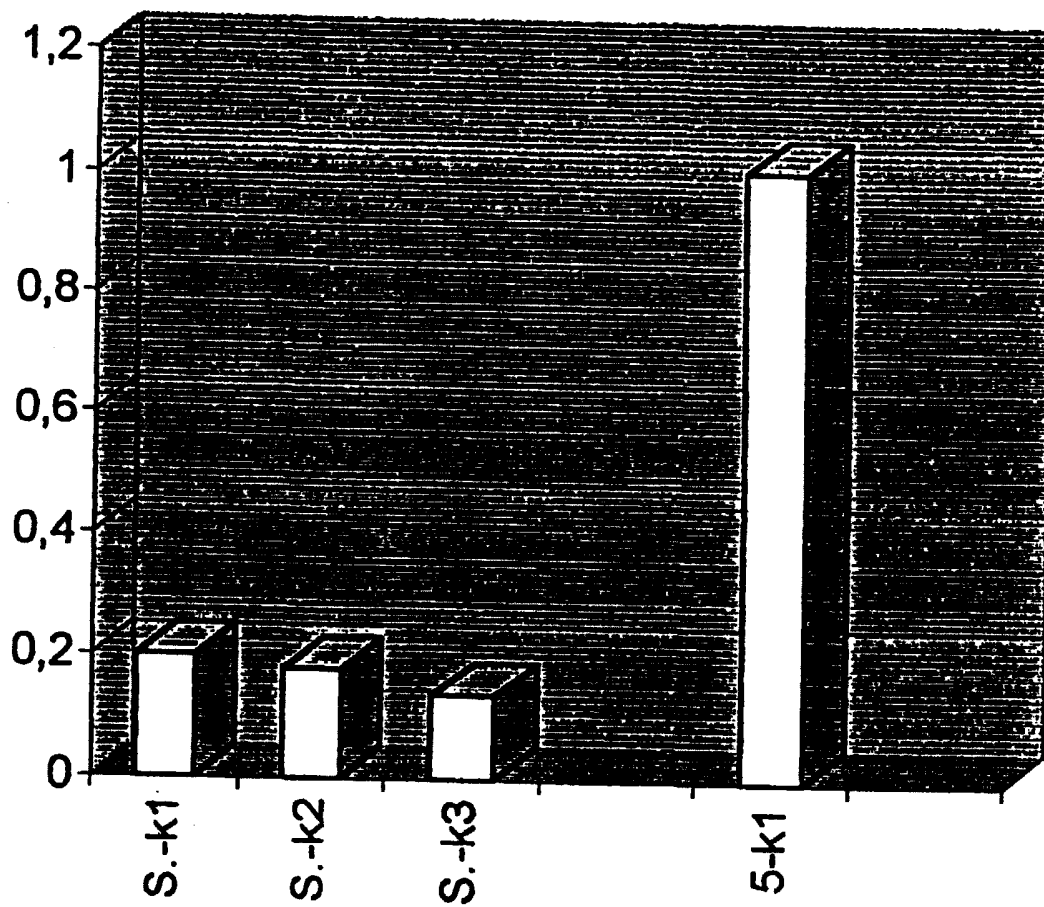
2. ábra



3. ábra



4. ábra



5. ábra

File Name : D4.5-k8-VL

5'			9		18		27		36		45		54					
	GAG	CTC	CAG	ATG	ACC	CAG	TCT	CCA	TCC	TCC	CTG	TCT	GCT	TCT	GTG	GGA	GAC	AGA
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	E	L	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R
			63		72		81		90		99		108					
	GTC	ACC	ATC	ACT	TGT	CGG	ACA	AGT	CAG	AGC	ATT	AGC	AGC	TAT	TTA	AAT	TGG	TAT
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	V	T	I	T	C	R	T	S	Q	S	I	S	S	Y	L	N	W	Y
			117		126		135		144		153		162					
	CAG	CAG	AAA	CCA	GGA	CAG	CCT	CCT	AAG	CTG	CTC	ATT	TAC	TGG	GCA	TCT	ACC	CGG
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Q	Q	K	P	G	Q	P	P	K	L	L	I	Y	W	A	S	T	R
			171		180		189		198		207		216					
	GAA	TCC	GGG	GTC	CCT	GAC	CGA	TTC	AGT	GGC	AGC	GGG	TCT	GGG	ACA	GAT	TTC	ACT
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	E	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T
			225		234		243		252		261		270					
	CTC	ACC	ATC	AGC	AGT	CTA	CAA	CCT	GAA	GAT	TCT	GCA	ACT	TAC	TAC	TGT	CAG	CAG
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	S	A	T	Y	Y	C	Q	Q
			279		288		297		306		315							
	AGT	TAC	GAC	ATC	CCG	TAC	ACT	TTT	GGC	CAG	GGG	ACC	AAG	CTG	GAG	ATC	AAA	3'
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	S	Y	D	I	P	Y	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K	

6. ábra

D4.5:

File Name : D4.5-k8-VH

5'	GAG	GTG	CAG	CTG	CTC	GAG	TCT	GGG	GGA	GGC	GTG	GTC	CAG	CCT	GGG	AGG	TCC	CTG	54
	E	V	Q	L	L	E	S	G	G	G	V	V	Q	P	G	R	S	L	
	AGA	CTC	TCC	TGT	GCA	GCC	TCT	GGA	TTC	ACC	TTC	AGT	AGC	TAT	GGC	ATG	CAC	TGG	108
	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	G	M	H	W	
	GTC	CGC	CAG	GCT	CCA	GGC	AAG	GGG	CTG	GAG	TGG	GTG	GCA	GTT	ATA	TCA	TAT	GAT	162
	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	V	I	S	Y	D	
	GGA	AGT	AAT	AAA	TAC	TAT	GCA	GAC	TCC	GTG	AAG	GGC	CGA	TTC	ACC	ATC	TCC	AGA	216
	G	S	N	K	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	
	GAC	AAT	TCC	AAG	AAC	ACG	CTG	TAT	CTG	CAA	ATG	AAC	AGC	CTG	AGA	GCT	GAG	GAC	270
	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	
	ACG	GCT	GTG	TAT	TAC	TGT	GCG	AAA	GAT	ATG	GGG	TGG	GGC	AGT	GGC	TGG	AGA	CCC	324
	T	A	V	Y	Y	C	A	K	D	M	G	W	G	S	G	W	R	P	
	TAC	TAC	TAC	TAC	GGT	ATG	GAC	GTC	TGG	GGC	CAA	GGG	ACC	ACG	GTC	ACC	GTC	TCC	378
	Y	Y	Y	Y	G	M	D	V	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	
	TCA	GCA	CCC	ACC	AAG	GCT	CCG	GAT	GTG	TTC	CCT	CTA	3'						
	S	A	P	T	K	A	P	D	V	F	P	L							

7. ábra

File Name : D7.2-k8-VH

5'			9		18		27		36		45		54					
	GAG	GTG	CAG	CTG	CTC	GAG	TCT	GGG	GGA	GTC	GTG	GTA	CAG	CCT	GGG	GGG	TCC	CTG
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	E	V	Q	L	L	E	S	G	G	V	V	V	Q	P	G	G	S	L
			63		72		81		90		99		108					
	AGA	CTC	TCC	TGT	GCA	GCC	TCT	GGA	TTC	ACC	TTT	GAT	GAT	TAT	GCC	ATG	CAC	TGG
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	D	D	Y	A	M	H	W
			117		126		135		144		153		162					
	GTC	CGC	CAG	GCT	CCA	GGC	AAG	GGG	CTG	GAG	TGG	GTG	GCA	GTT	ATA	TCA	TAT	GAT
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	V	I	S	Y	D
			171		180		189		198		207		216					
	GGA	AGT	AAT	AAA	TAC	TAT	GCA	GAC	TCC	GTG	AAG	GGC	CGA	TTC	ACC	ATC	TCC	AGA
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	G	S	N	K	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R
			225		234		243		252		261		270					
	GAC	AAT	TCC	AAG	AAC	ACG	CTG	TAT	CTG	CAA	ATG	AAC	AGC	CTG	AGA	GCT	GAG	GAC
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D
			279		288		297		306		315		324					
	ACG	GCT	GTG	TAT	TAC	TGT	GCG	AAA	AAG	GAA	GGC	TAC	TGG	GGC	CAG	GGA	ACC	CTG
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	T	A	V	Y	Y	C	A	K	K	E	G	Y	W	G	Q	G	T	L
			333		342		351		360		369							
	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA	GCA	CCC	ACC	AAG	GCT	CCG	GAT	GTG	TTC	CCT	CTA	3'	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
	V	T	V	S	S	A	P	T	K	A	P	D	V	F	P	L		

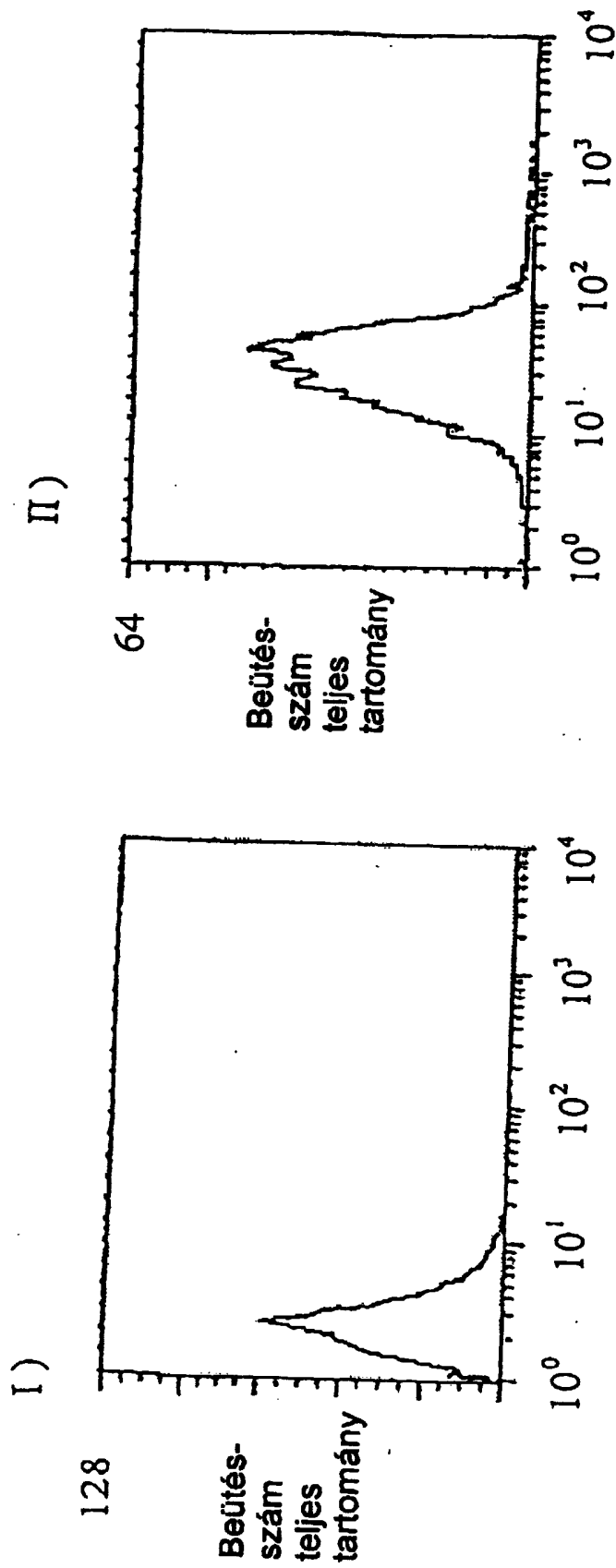
8. ábra

k5.1

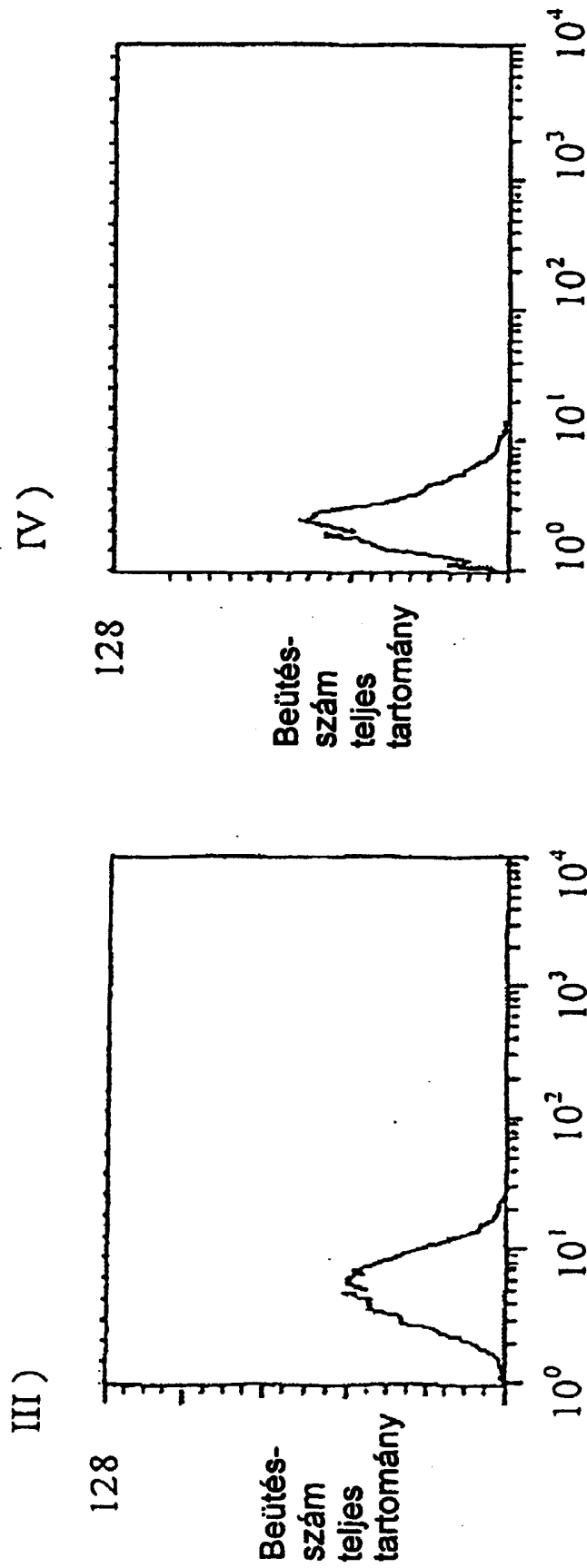
File Name : kappa5.1/11.97

		9		18		27		36		45		54						
5'	GAG	CTC	CAG	ATG	ACC	CAG	TCT	CCA	TCC	TCC	CTG	TCT	GCA	TCT	GTA	GGA	GAC	AGA
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	E	L	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R
			63			72			81			90			99			108
	GTC	ACC	ATC	ACT	TGC	CGG	GCA	AGT	CAG	AGC	ATT	AGC	AGC	TAT	TTA	AAT	TGG	TAT
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	S	I	S	S	Y	L	N	W	Y
			117			126			135			144			153			162
	CAG	CAG	AAA	CCA	GGA	CAG	CCT	CCT	AAG	CTG	CTC	ATT	TAC	TGG	GCA	TCT	ACC	CGG
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Q	Q	K	P	G	Q	P	P	K	L	L	I	Y	W	A	S	T	R
			171			180			189			198			207			216
	GAA	TCC	GGG	GTC	CCT	GAC	CGA	TTC	AGC	GGC	AGT	GAA	TCT	GGG	ACA	AAT	TAC	ACT
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	E	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	E	S	G	T	N	Y	T
			225			234			243			252			261			270
	CTC	ACC	ATC	AGC	AGC	CTG	CAG	CCT	GAA	GAT	TTT	GCT	ACT	TAC	TTT	TGT	CAA	CAG
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	F	C	Q	Q
			279			288			297			306			315			324
	TCT	GAC	AGT	TTG	CCG	ATC	ACC	TTC	GGC	CAA	GGG	ACA	CGA	CTG	GAC	ATT	CAA	3'
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	S	D	S	L	P	I	T	F	G	Q	G	T	R	L	D	I	Q	

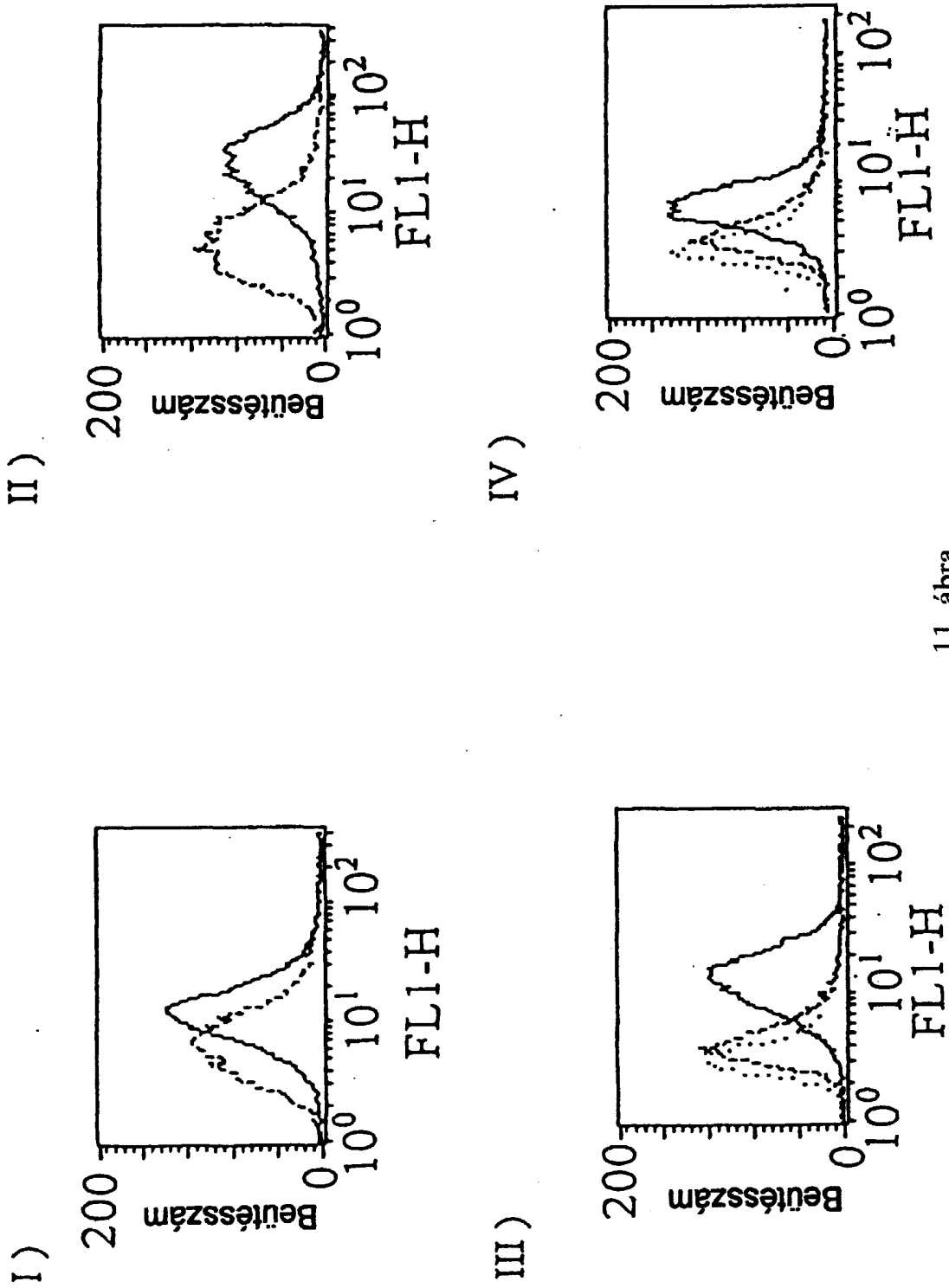
9. ábra



10. ábra

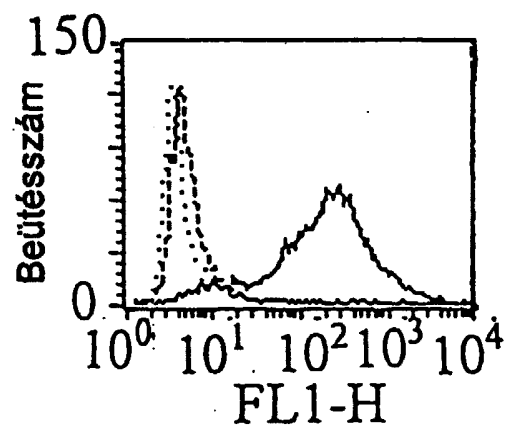


10. ábra folytatása

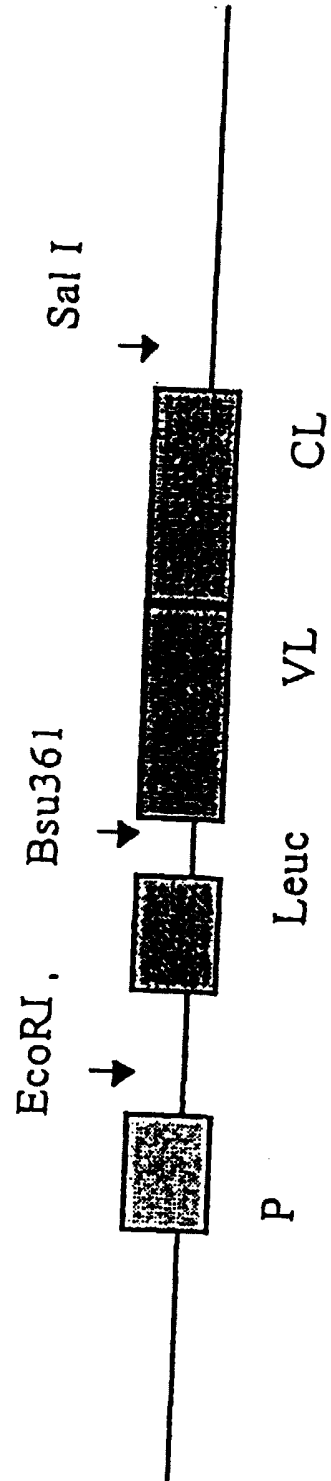


11. ábra

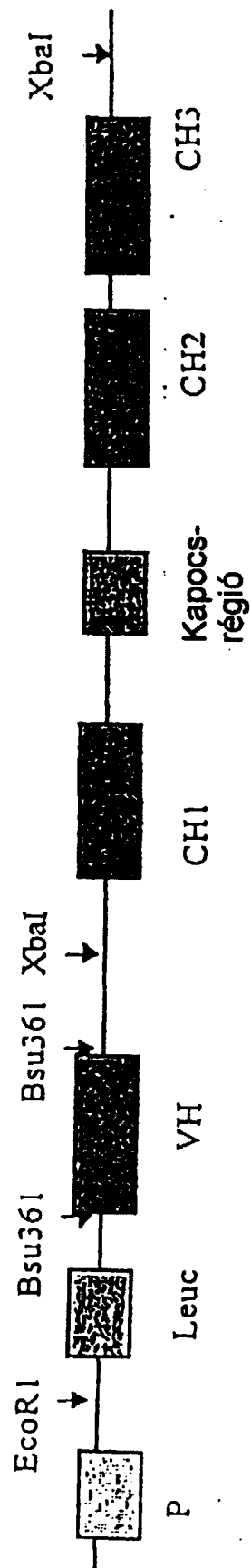
V)



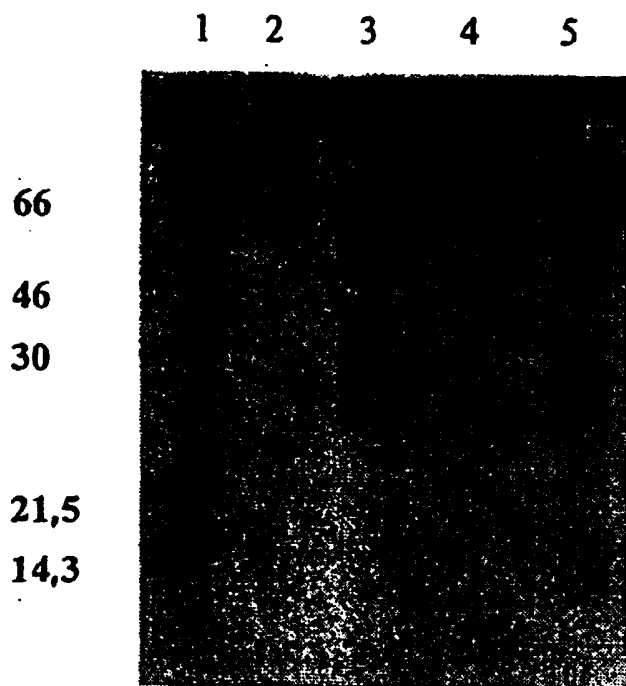
11. ábra folytatása



12. ábra

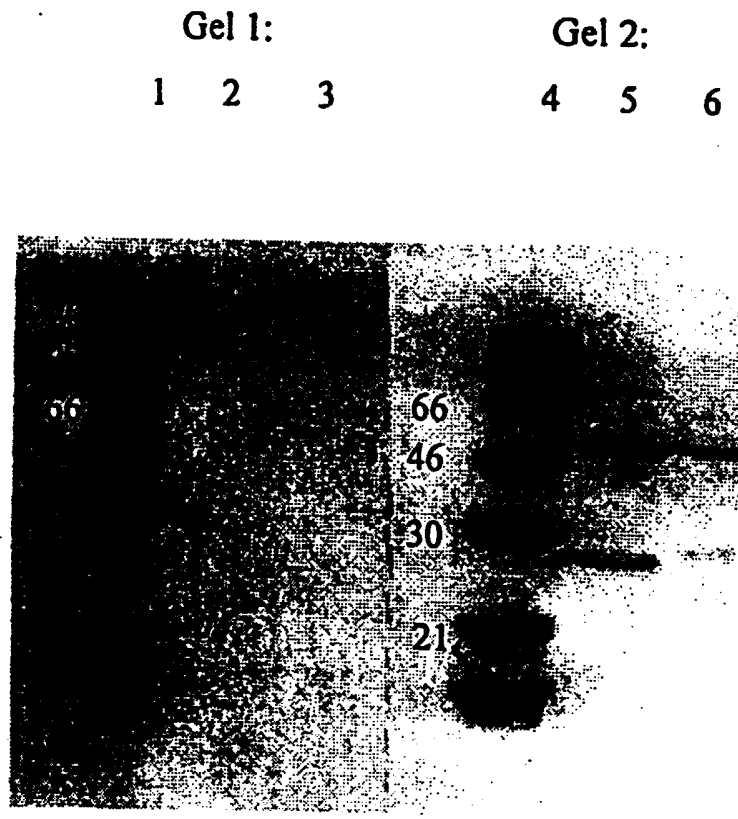


13. ábra



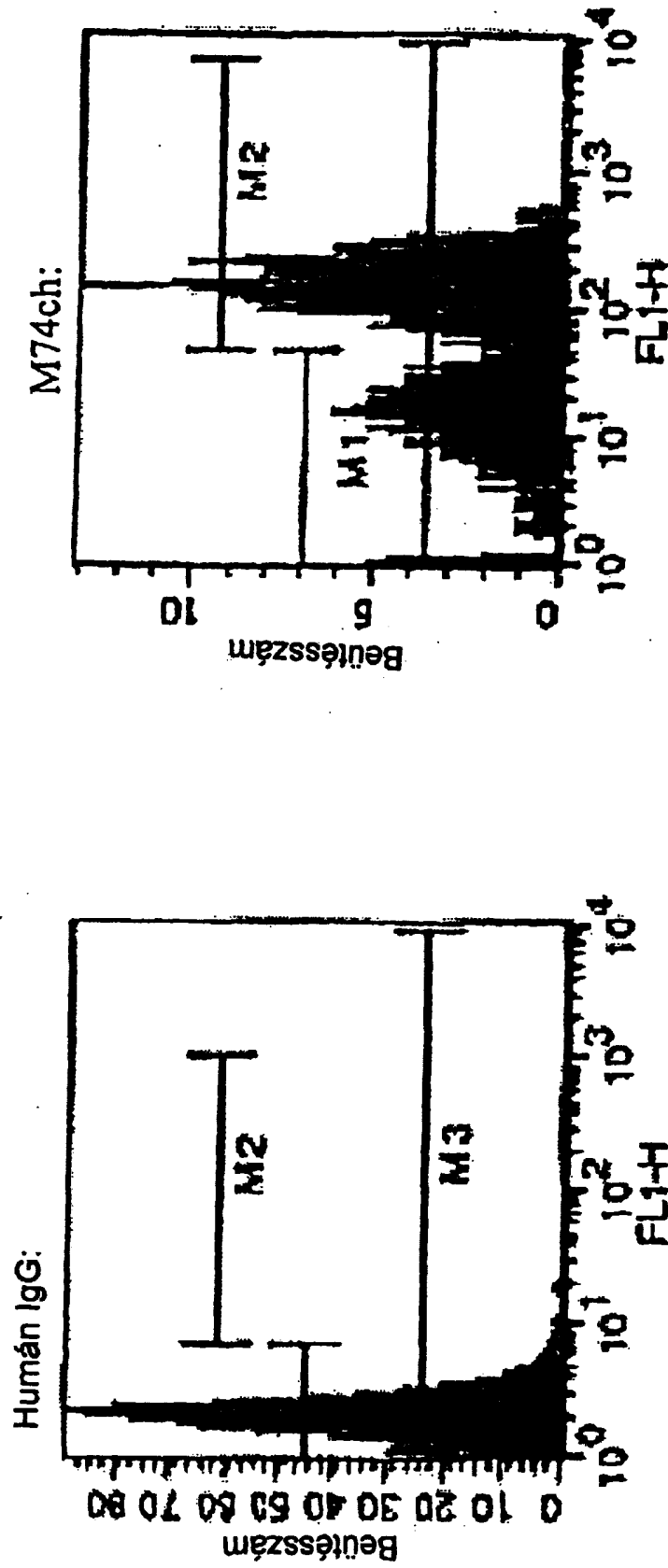
1. sáv: Marker (az egyes csíkoknak megfelelő molekulatömeget [kDa] a gél bal szélén jelöltük)
2. sáv: H79 humán IgG1 (nem-redukáló)
3. sáv: H79 humán IgG1 redukáló körülmények mellett
4. sáv: H79 egér IgG1 (nem-redukáló)
5. sáv: H79 egér IgG1-redukáló körülmények mellett

14. ábra

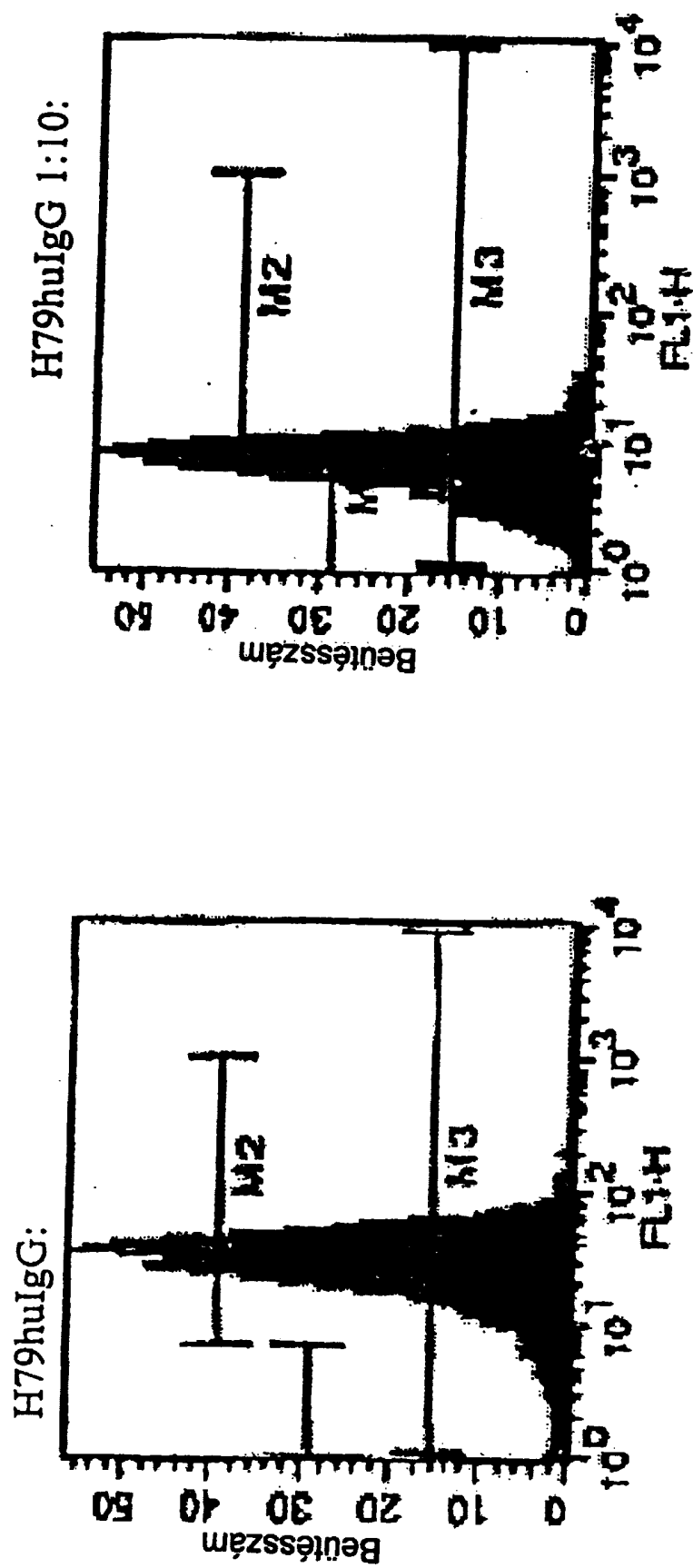


1. gél: 1. sáv: Marker (MW (az egyes csíkoknak megfelelő molekulatömeget [kDa] a gél bal szélén jelöltük)
2. sáv: H79 humán IgG1 (nem-redukáló)
3. sáv: HD70 humán IgG1 (nem-redukáló)
2. gél: 4. sáv: Marker (MW (az egyes csíkoknak megfelelő molekulatömeget [kDa] a gél bal szélén jelöltük)
5. sáv: H79 humán IgG1-redukáló körülmények mellett
6. sáv: HD70 humán IgG1 redukáló körülmények mellett

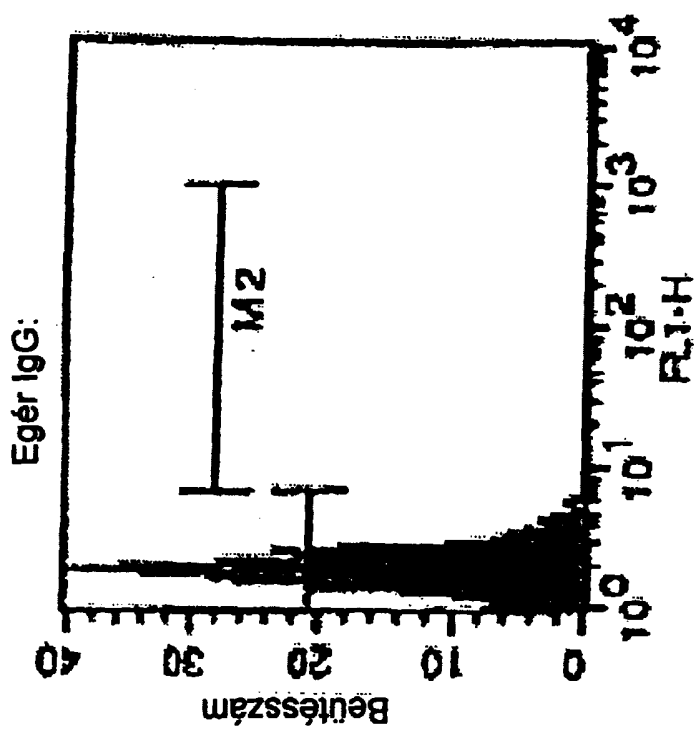
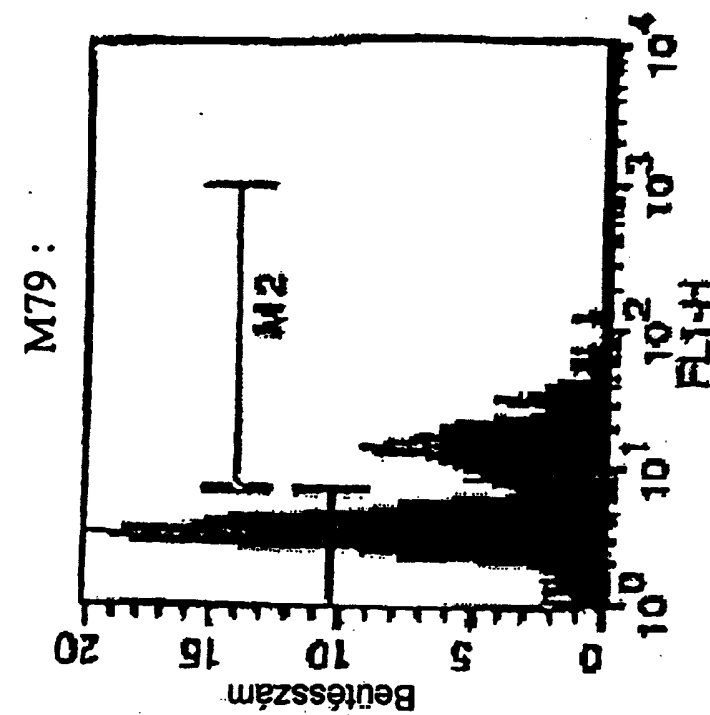
15. ábra



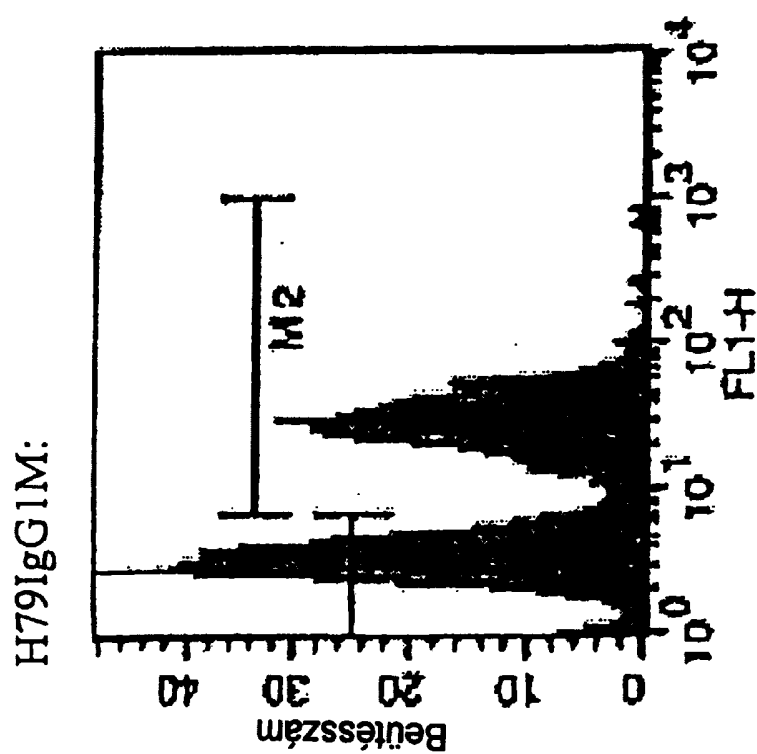
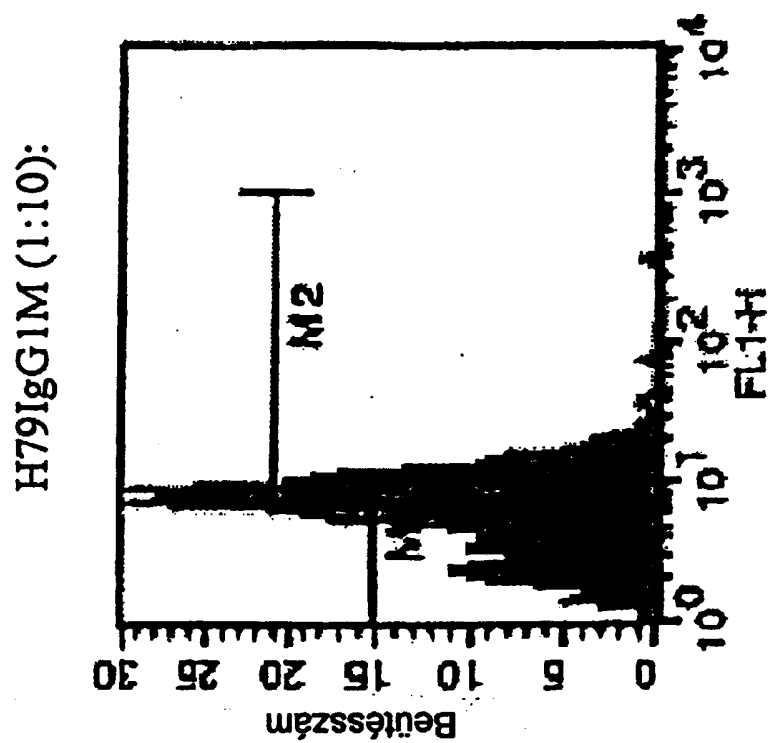
16. ábra



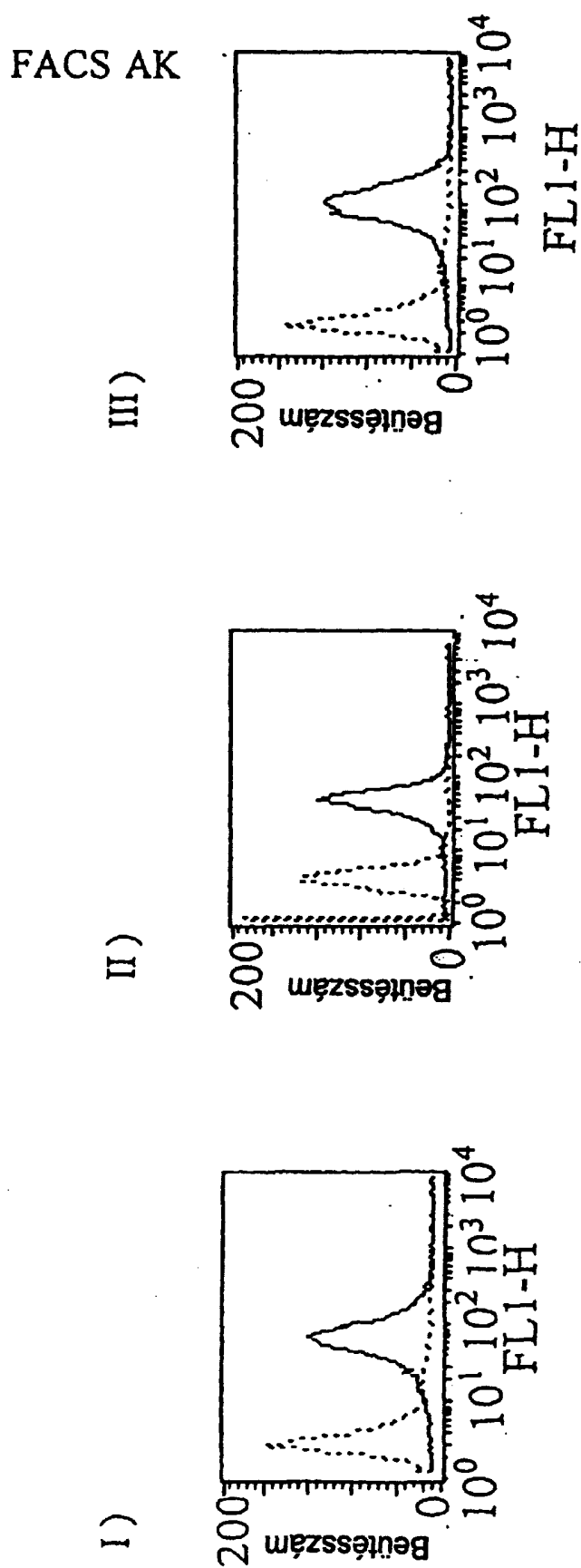
16. ábra folytatása



16. ábra folytatása

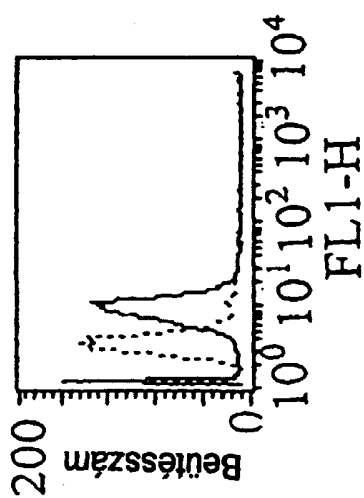


16. ábra folytatása

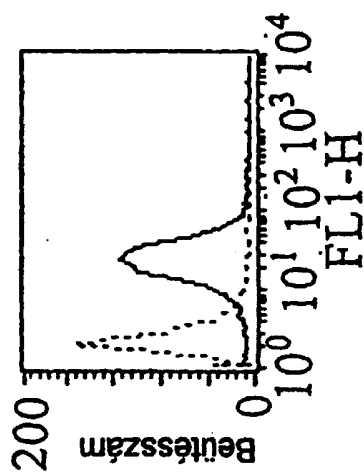


17. ábra

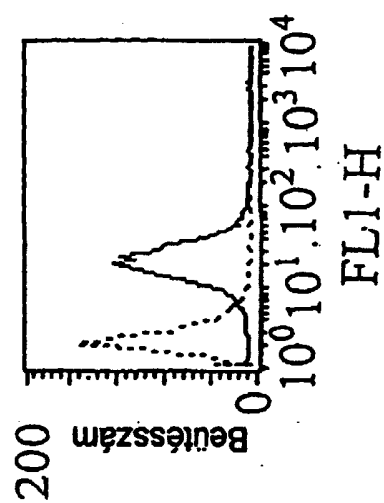
IV)



V)

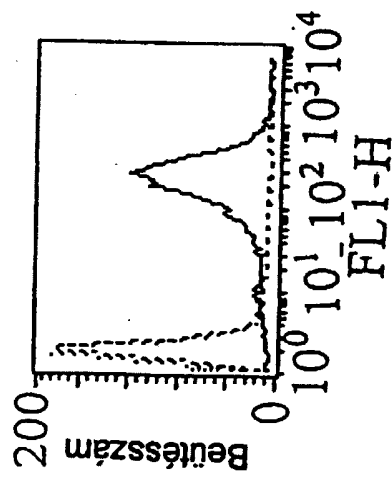


VI)

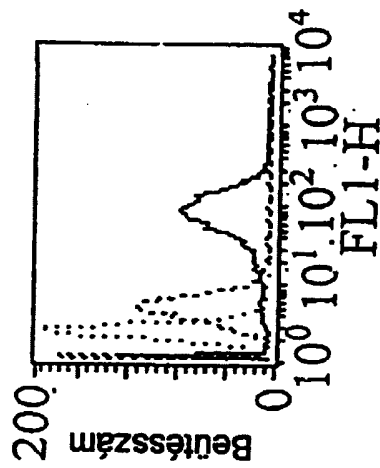


17. ábra folytatása

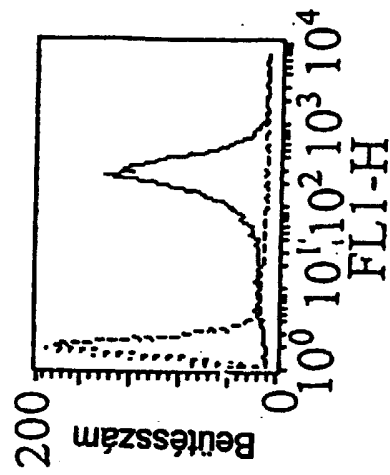
VII)



VIII)

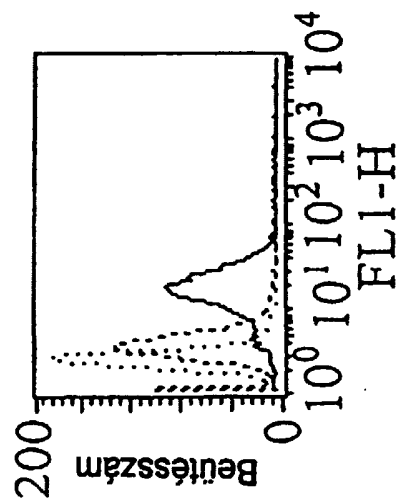


IX)

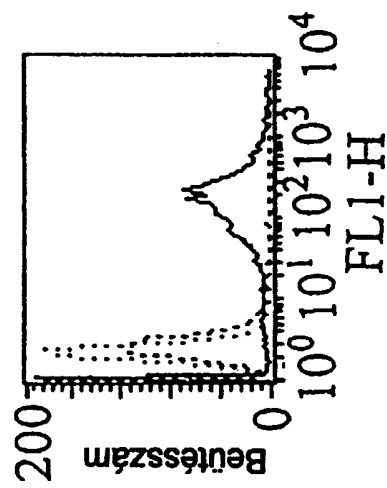


17. ábra folytatása

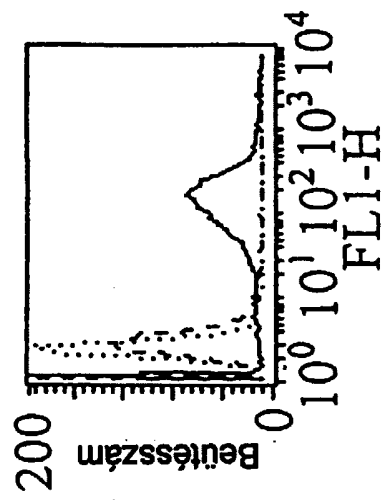
X)



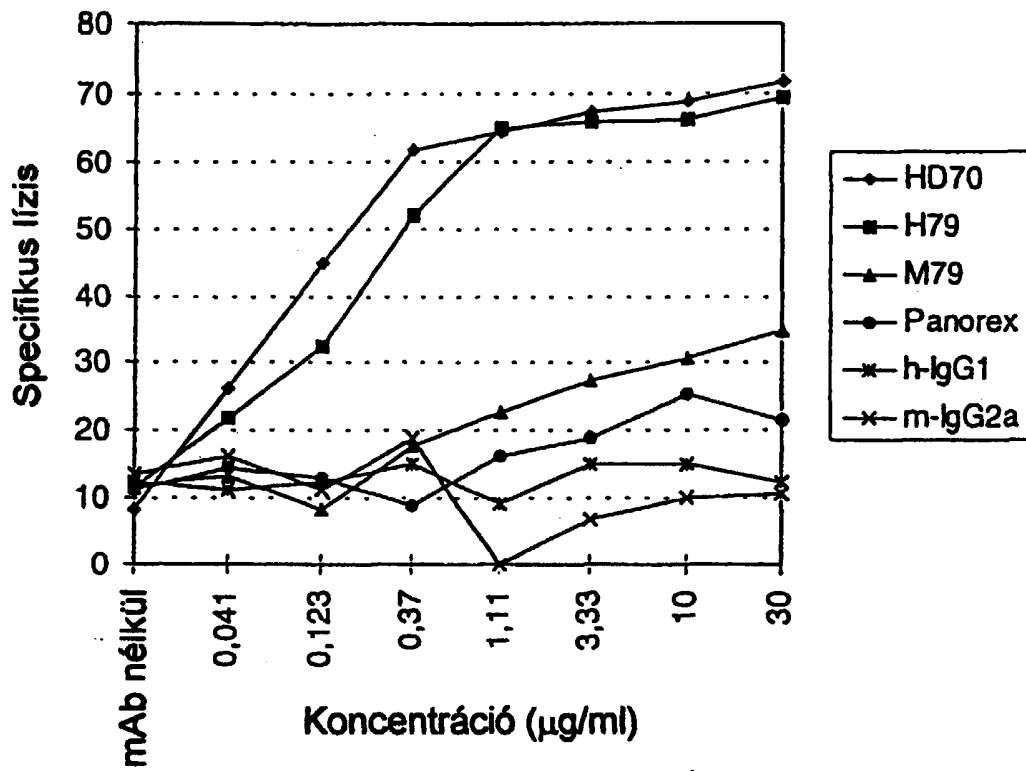
XI)



XII)



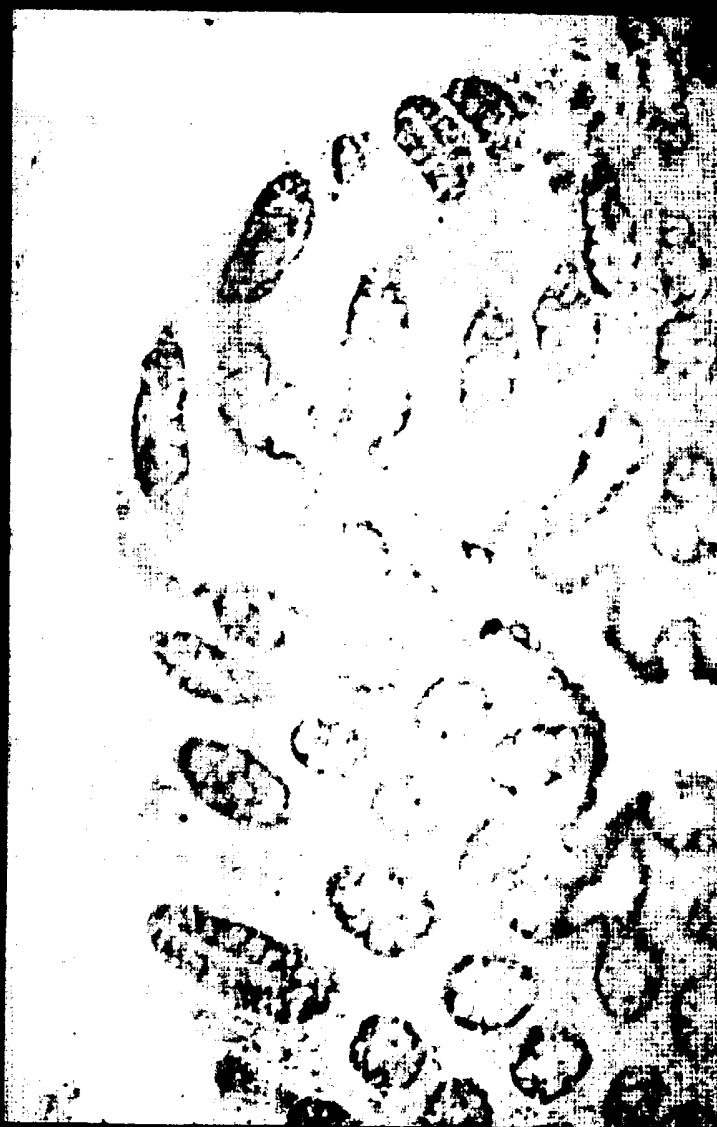
17. ábra folytatása



18. ábra



19. ábra



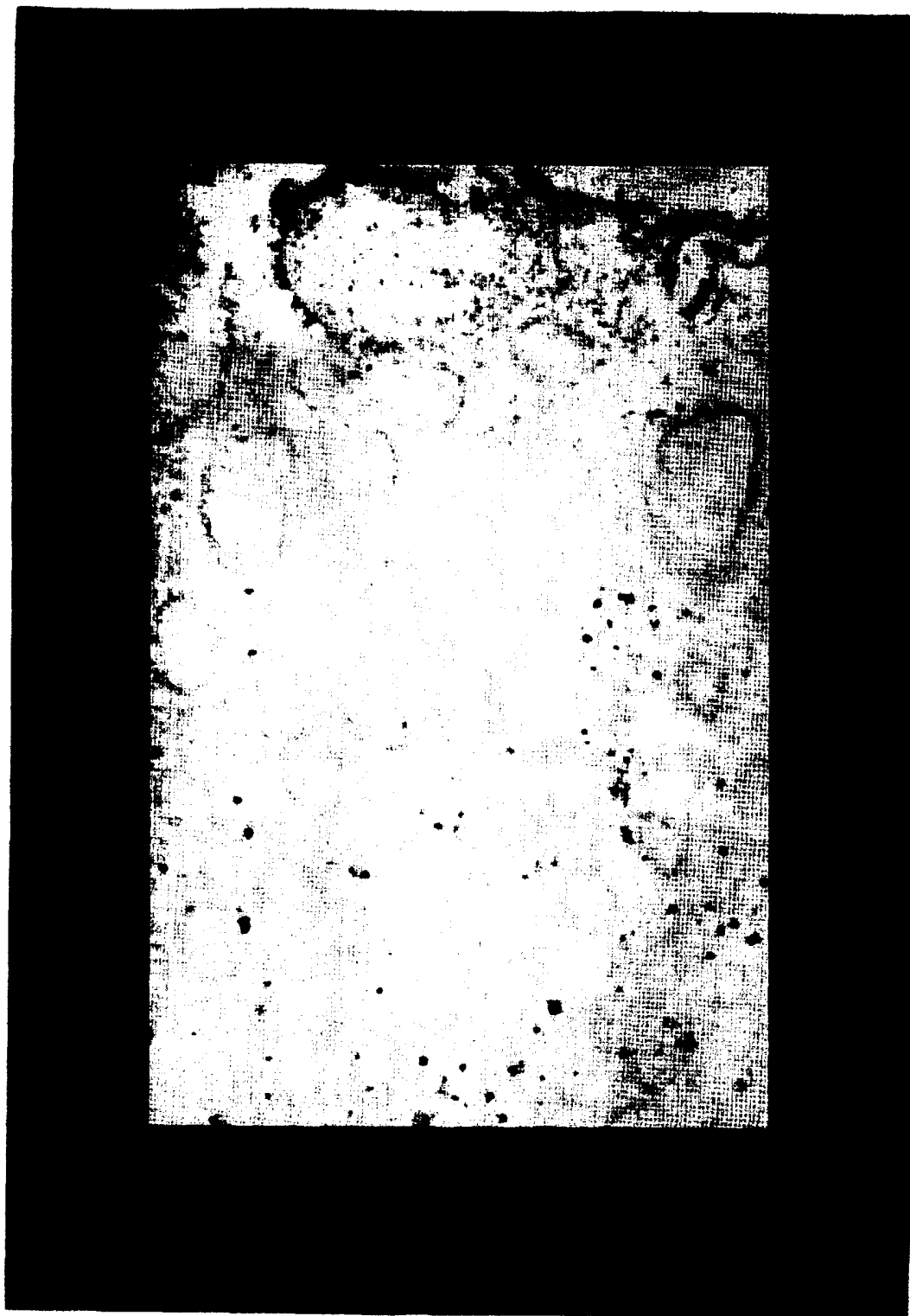
20. ábra



21. ábra



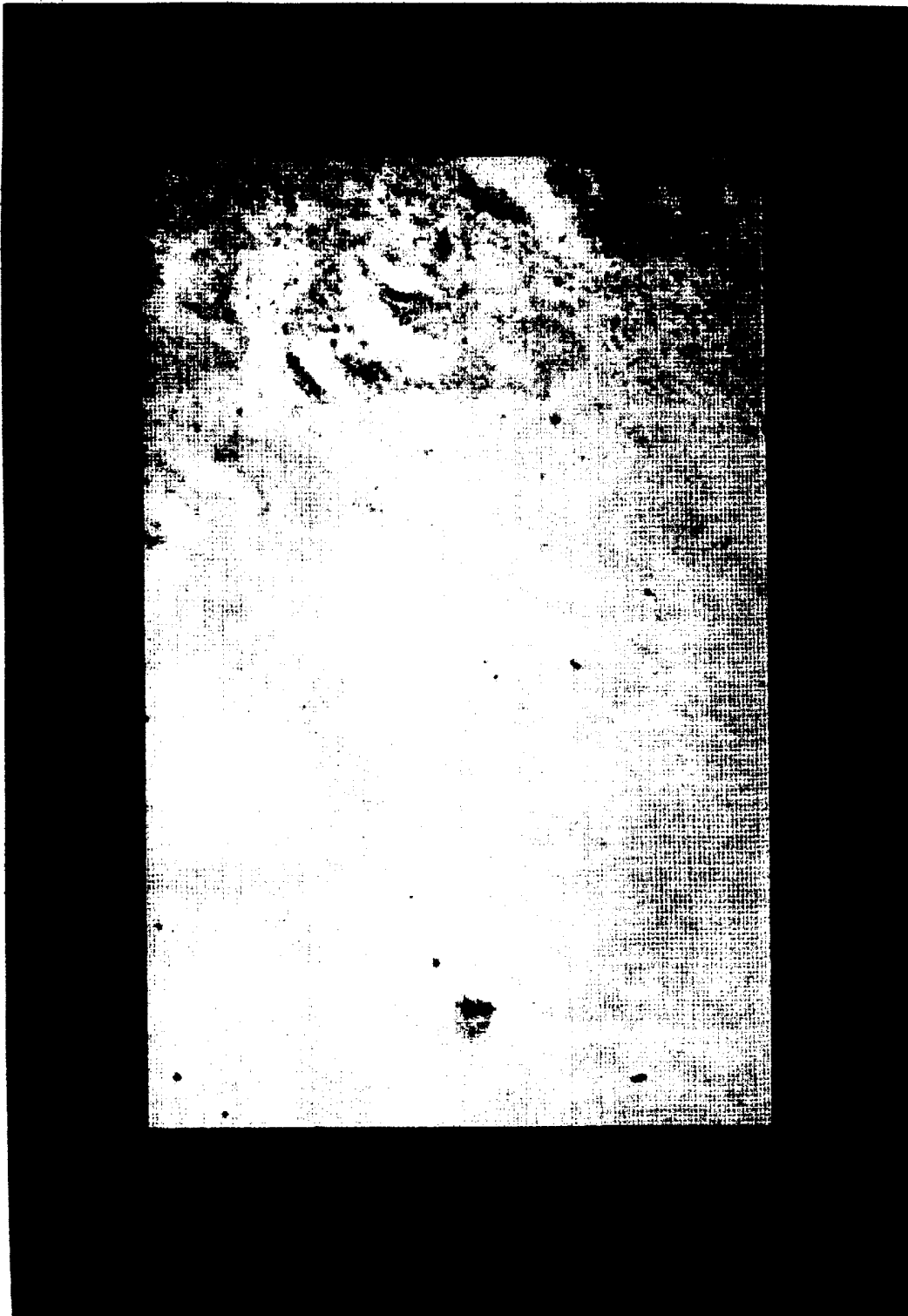
22. ábra



23. ábra



24. ábra

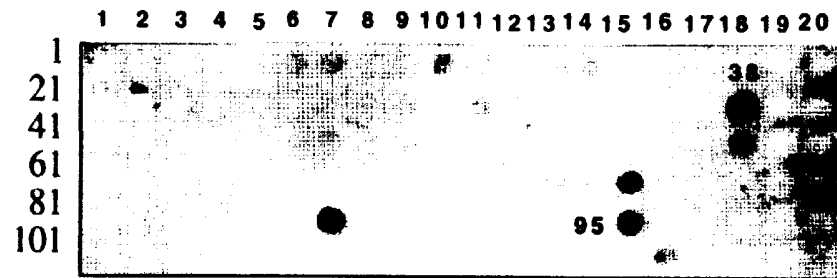


25. ábra

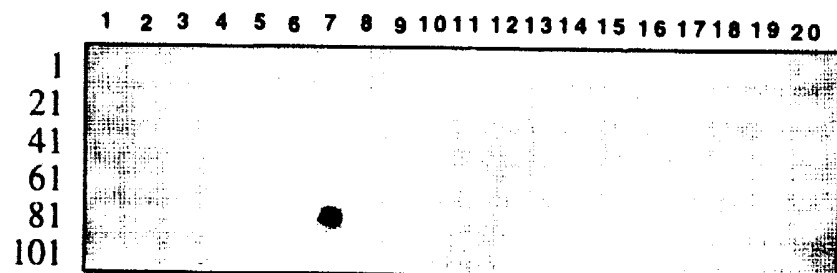


26. ábra

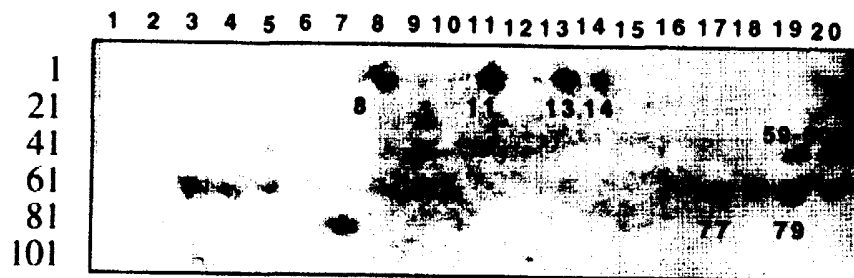
M79:



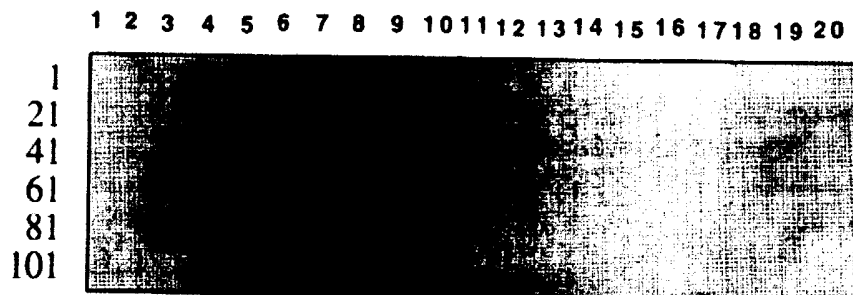
HRP-konjugált, egér immunglobulin elleni másodlagos ellenanyag:



H79:



HD70:



27. ábra