

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

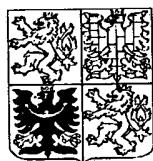
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

858-98

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **20. 03. 98**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **21.03.97**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **97/67938**

(33) Země priority: **JP**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14. 10. 98**
(Věstník č. 10/98)

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 P	21/08
C 07 K	16/00
C 07 K	16/18
C 12 N	15/63
C 12 N	15/85
A 61 K	39/395

(71) Přihlášovatel:

SANKYO COMPANY LIMITED, Tokyo, JP;

(72) Původce:

Serizawa Nobufusa, Tokyo, JP;

Haruyama Hideyuki, Hideyuki, JP;

Takahashi Tohru, Hideyuki, JP;

Nakahara Kaori, Hideyuki, JP;

Yonehara Shin, Kyoto-shi, JP;

(74) Zástupce:

Korejzová Zdeňka JUDr., Břehová 1, Praha
1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob výroby humanizované protilátky,
protilátka, DNA, vektor a hostitelská
buňka**

(57) Anotace:

Způsob výroby humanizované protilátky proti
lidskému Fas, která rozeznává antigen Fas.
Kódové DNA pro tyto protilátky, protilátky
jako takové a farmaceutický prostředek, který
tyto protilátky obsahuje a je určen k léčení
autoimunitních onemocnění, zejména revma-
tických onemocnění nebo k inhibici růstu
buněk. Příslušný vektor a hostitelské buňky
produkující humanizovanou protilátku.

CZ 858-98 A3

Způsob výroby humanizované protilátky, protilátka, DNA, vektor a hostitelská buňka

Oblast techniky

Vynález se týká způsobu výroby humanizované protilátky proti lidskému Fas, která rozeznává antigen Fas. Vynález se rovněž týká kódové DNA pro tyto protilátky, protilátek jako takových a farmaceutického prostředku, který tyto protilátky obsahuje a je určen k léčení autoimunitních onemocnění a revmatických onemocnění nebo k inhibici růstu buněk. Vynález se rovněž týká příslušného vektoru a hostitelských buněk.

Dosavadní stav techniky

Imunoglobulin G, IgG, je tvořen dvěma lehkými polypeptidovými řetězci, řetězci L, z nichž každý má molekulovou hmotnost přibližně 23 000 a dvěma těžkými polypeptidovými řetězci, řetězci H, z nichž každý má molekulovou hmotnost přibližně 50 000. Řetězce H i L jsou tvořeny opakujícími se oblastmi konzervovaných aminokyselin, které jsou tvořeny přibližně 110 zbytky aminokyselin. Tato oblast se obvykle uvádí jako "doména" a tvoří základní trojrozměrnou strukturní jednotku IgG. Řetězce H a L jsou tvořeny čtyřmi nebo dvěma po sobě následujícími doménami.

V případě, že se srovnávají sekvence aminokyselin různých protilátek, je možno pozorovat, že amino-terminální doména řetězce H a L je variabilnější než ostatní domény. Uvádí se proto jako "variabilní" doména, doména V. Doména V řetězců H a L je komplementární povahy, takže mohou vzniknout variabilní aminotermální oblasti molekul IgG. Ostatní domény se spojují k vytvoření konstantních oblastí. Sekvence konstantních oblastí jsou pro jednotlivé čeledi charakteristické. Například konstantní oblast myšího IgG se liší od

odpovídající oblasti lidského IgG a IgG myši je proto lidským imunitním systémem rozpoznáván jako cizorodá bílkovina. Po podání IgG myši člověku dochází k produkci lidských protilátek proti myšímu IgG, které budou dále označovány jako HAMA (Schroff a další, 1985, Cancer Res., 45, 879 až 885). To znamená, že není možno myší protilátku opakovaně podávat člověku. Pro účinné podání je nutno takovou protilátku modifikovat tak, aby nedošlo k indukci HAMA, avšak stále ještě byla zachována specifická protilátky.

Údaje, získané při krystalografické analýze pomocí rtg-záření prokazují, že imunoglobulin obvykle tvoří dlouhou válcovou strukturu, která je tvořena dvěma vrstvami antiparalelních beta-vrstev, z nichž každá obsahuje tři nebo čtyři beta-řetězce. Ve variabilní oblasti se spojují tři smyčky z každé oblasti V řetězce H a L za vzniku místa pro vazbu antigenu. Každá z těchto smyček je zakončena oblastí, určující komplementárnost, CDR. Oblasti CDR jsou v sekvenci aminokyselin nejvariabilnější. Ty části variabilní oblasti, které tvoří součást CDR se označují "rámcové oblasti", oblasti FR, a obvykle hrají svou úlohu při udržování struktury CDR.

V publikaci E. A. Kabat a další, Sequences of proteins of immunological interest, 5. vydání, HIH publikace, č. 91, str. 3242 se srovnávají primární sekvence řady variabilních oblastí řetězců H a L a současně jsou identifikovány putativní CDR nebo rámcové oblasti na základě konzervace sekvencí.

Dále jsou rámcové oblasti klasifikovány do několika podskupin, jimž je společná část sekvence aminokyselin. Jsou také identifikovány odpovídající rámcové oblasti v příslušné sekvenci myši a člověka.

Studie strukturních vlastností molekul IgG vedly k vývoji metod pro přípravu humanizovaných protilátek, nevyvolávajících odpověď typu HAMA, jak bude dále uvedeno.

Počáteční návrhy byly zaměřeny na přípravu chimérní protilátky vazbou variabilní oblasti myší protilátky na konstantní oblast lidského původu podle publikace Morrison S. L. a další, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81, str. 6851 až 6855. Taková chimární protilátka však stále ještě obsahuje řadu zbytků aminokyselin se sekvencí, odlišnou od lidské sekvence a může tedy vyvolat reakci typu HAMA, zvláště při dlouhodobém podávání, jak bylo popsáno v Begent a další, 1990, Br. J. Cancer, 62, str. 487 a následující.

Bylo také navrhováno naroubovat na lidskou protilátku pouze segmenty CDR, tak, aby bylo možno dále snížit poměr sekvencí aminokyselin, které by mohly vyvolat reakci HAMA podle Jones P. T. a další, 1986, Nature, 321, 522 až 525. Obecně však bylo zjištěno, že naroubování segmentů CDR obvykle není dostatečné pro účinnost imunoglobulinu proti danému antigenu.

Na základě krystalografických zjištění s použitím rtg-záření bylo podle publikace Chothia a další, 1987, J. Mol. Biol. 196, 901 až 917 prokázáno, že

- 1) CDR obsahuje oblast, která se účastní vazby antigenu a oblast, která slouží k udržování vlastní struktury CDR. Trojrozměrné struktury CDR mohou být klasifikovány do několika skupin s charakteristickou strukturou (kanonické struktury) a
- 2) skupiny kanonických struktur jsou určovány nejen sekvencemi CDR, nýbrž také povahou aminokyselin ve specifických polohách rámcových oblastí.

V důsledku těchto zjištění bylo navrhováno, aby technika s roubováním oblastí CDR zahrnovala také naroubování některých zbytků aminokyselin z rámcových oblastí do kostry

lidské protilátky, jak je navrhováno ve zveřejněné japonské patentové přihlášce č. 4-502408 (Queen a další).

V souvislosti se svrhu uvedenými postupy se protilátka savce, odlišného od člověka, z níž se získává oblast CDR pro naroubování, označuje jako donorová molekula, kdežto lidská protilátka, na niž se oblast CDR roubuje, je označována jako akceptor.

Při roubování CDR-oblastí by měla být tato oblast co nejvíce konzervována a současně by měla být zachována účinnost molekuly imunoglobulinu. V této souvislosti mohou být určující následující faktory:

- 1) podskupina akceptoru a
- 2) povaha zbytků aminokyselin, které jsou přeneseny z rámcových oblastí donoru.

V publikaci Queen a další, zveřejněná japonská patentová přihláška č. 4-502408 se navrhuje postup pro humanizaci protilátek, který spočívá v tom, že se naroubuje zbytek aminokyseliny z rámcové oblasti donoru společně se sekvencí CDR do molekuly akceptoru za předpokladu, že uvedený zbytek se nachází v bezprostřední blízkosti CDR nebo se aminokyselina v rámcové oblasti akceptoru zřídka nachází v této poloze, kdežto odpovídající aminokyselina donoru se v uvedené poloze akceptoru běžně nachází.

Imunoglobulin M, IgM, je obvykle tvořen deseti řetězci H a deseti řetězci L, přičemž ve středu molekuly je uložen spojovací řetězec J. Myší IgM má konstantní oblasti stejně jako IgG a nemůže tedy být opakovaně podáván člověku. Z tohoto důvodu je rovněž nutno použít roubování CDR v případě, že je zapotřebí použít molekuly IgM k léčebným účelům u člověka.

Přestože je molekula IgM obvykle přítomna jako pentamer s řetězcem J, může být přítomna také jako hexamer bez řetězce J podle publikace Troy a další, J. Biol. Chem., 1992, 267, (25), 18002 až 18007. V hexameru IgM bez řetězce J je zvýšena schopnost vazby komplementu podle publikace Davis a další, Eur. J. Immunol., 1988, 18, 1001 až 1008. Dříve se však předpokládalo, že přítomnost řetězce J je podstatná pro zachování struktury IgM a pro udržení účinnosti molekuly jako imunoglobulinu. Až dosud není prokázáno, že si molekula IgM bez řetězce J udržuje svoji původní účinnost.

Fyziologické uhynutí buněk v živém organismu při normálním životním cyklu se označuje jako apoptosa a odlišuje se od patologického uhynutí buněk, nekrosy podle Kerr a další, 1972, Br. J. Cancer, 26, 239 a následující. Apoptosa je příkladem programovaného uhynutí buněk, takže některé buňky jsou předurčeny předem k uhynutí v průběhu běžných pochodů v organismu, například po splnění předem určené funkce. Při apoptose dochází k morfoligickým změnám, například k zvlnění povrchu buněk, k zahuštění chromatinu v jádrech buněk a k fragmentaci DNA chromosomů.

Apoptosa má důležitou úlohu u buněk, rozpoznávajících autoantigeny v průběhu diferenciacce lymfocytů T a B. Vznik tak zvaných autoimunitních onemocnění obvykle začíná tím, že se objeví autoreaktivní lymfocyty, které jsou důsledkem selhání apoptosy v průběhu diferenciacce lymfocytů, jak bylo popsáno v publikaci Keiichi Nakayama a další, 1995, Mebio 12, 10, 79 až 86.

Fas je molekula buněčné membrány, která se účastní při apoptose imunokompetentních buněk podle svrchu uvedené publikace Itoh N. a další. Proti lidskému antigenu Fas byly vytvořeny myší monoklonální protilátky, jak je popsáno v

Yonehara S. a další, 1989, J. Exp. Med., 169, 1747. Tyto protilátky proti lidskému antigenu Fas mají cytotoxický účinek ve smyslu vyvolání apoptosy u lidských buněk a byly navrhovány k léčení autoimunitních onemocnění, AIDS a nádorů podle zveřejněných japonských patentových přihlášek č. 2-237935 a 5-503281.

Revmatismus, zvláště rheumatoidní arthrititis vzniká s největší pravděpodobností proliferací synoviocytů spolu s různými imunologickými nepravidelnostmi. Proliferace synoviocytů je v typických případech doprovázena infiltrací zánětlivými buňkami a rozrušením kostní tkáně. Rozrušení tkáně v blízkosti nemocného kloubu v případech chronické rheumatoidní arthritidy je zřejmě způsobeno abnormální produkcí cytokinů zánětlivými synoviocyty. Při vyšetření kloubů u nemocných je možno zjistit abnormální proliferaci synoviocytů, hyperplasii synoviálních klků, zmnožení vrstev synoviocytů a podobně, jak bylo popsáno v publikaci Daniel J. McCarty, 1985, Arthritis and allied conditions, A textbook of rheumatology, 10. vyd., Lea and Febiger. Při léčení revmatismu se v současné době převážně užívají protizánětlivé účinné látky, jako steroidy a imunomodulátory. V případě, že by bylo možno dosáhnout inhibice abnormální proliferace synoviocytů, byla by jakákoliv látka s takovým účinkem výhodná při použití k léčbě uvedené choroby.

Synoviocyty neproliferují v průběhu revmatismu neomezeným způsobem, jak bylo popsáno ve svrchu uvedené publikaci Daniel J. McCartyho a bylo prokázáno, že i u nemocných s tímto onemocněním dochází k apoptose synoviocytů. Na membráně těchto buněk dochází k expresi antigenu Fas. V publikacích Nakajima T. a další, 1995, Arthritis Rheum., 38, 485 až 491 a Aono a další, Abstracts of the 38th Meeting of Japan Rheumatism Society (1994), str. 487, a také v materiálech ze sjezdu

Japan Cancer Society, 1994, str. 388 se popisují výsledky pokusů, jimiž bylo zjišťováno, zda by cytotoxické protilátky proti lidskému antigenu Fas mohly vyvolat apoptosu u abnormálně proliferujících synoviocytů u nemocných s revmatismem. Při aplikaci těchto protilátek bylo dosaženo vysokého stupně apoptosy u nemocných s revmatismem, kdežto u normálních synoviocytů nemocných s jiným onemocněním k tomuto vysokému stupni apoptosy nedošlo.

Tyto výsledky prokazují, že protilátka proti lidskému antigenu Fas může selektivně vyvolávat apoptosu nejen u lymfocytů, nýbrž také u abnormálně proliferujících synoviocytů, takže by tato protilátka proti lidskému Fas mohla být potenciálně použita k léčení revmatismu.

Bylo získáno několik myších monoklonálních protilátek proti lidskému antigenu Fas, které byly popsány například v Yonehara S. a další, 1989, J. Exp. Med., 169, 1747 až 1756 a Science, 1989, 245, 301 až 305. Mimoto, jak bylo svrchu popsáno, mohou tyto protilátky vyvolat in vitro apoptosu synoviálních buněk nemocných, trpících revmatismem (strana 487, Abstracts of the 38th Meeting of the Japan Rheumatology Society 1994 a str. 338, Articles of 1994 Annual Meeting of the Japan Oncology Society 1994). Nebyla však popsána příprava humanizované protilátky proti lidskému Fas, typu IgG ani typu IgM. Mimoto nebyla ještě nikdy popsána úspěšná příprava humanizované protilátky proti lidskému antigenu Fas bez řetězce J, avšak se zachovanou schopností vyvolat apoptosu.

K humanizaci myší monoklonální protilátky proti lidskému antigenu Fas je například zapotřebí zvolit sekvence aminokyselin variabilních oblastí, které mají být naroubovány na lidskou protilátku, která je akceptorem. Sekvence aminokyselin by ideálně měla zahrnovat sekvenci CDR a vybrané zbytky aminokyselin sekvence FR.

Při konstrukci humanizované protilátky je možno podskupiny akceptoru vyhledávat a volit jedním ze dvou způsobů:

- 1) užijí se těžký a lehký řetězec z téže známé protilátky lidského původu, nebo se
- 2) užije těžký a lehký řetězec, odvozený od odlišných protilátek lidského původu, které mají vysokou homologii sekvence nebo mají společné části sekvence se sekvencí donoru a současně se udržuje kombinace podskupin v řetězci akceptoru.

Dříve se postupovalo podle druhé možnosti vzhledem k tomu, že existuje jen omezený počet přírodně se vyskytujících kombinací podskupin. Bylo proto považováno za důležité udržovat tyto přírodně se vyskytující kombinace.

Vynález si klade za úkol navrhnout protilátku proti lidskému antigenu Fas pro léčebné použití v lékařství. Vynález si rovněž klade za úkol navrhnout způsob humanizace protilátek, jímž by mohlo být na nejvyšší míru sníženo nebezpečí vzniku odpovědi typu HAMA.

Podstata vynálezu

Nyní bylo neočekávaně zjištěno, že není nezbytné udržovat přírodní kombinace podskupin ani užít řetězce H a L z téže protilátky. Výběr řetězců H a L je možno uskutečnit z banky primárních sekvencí lidských protilátek pouze na základě homologie rámcových oblastí donoru a akceptoru bez ohledu na kombinaci podskupin. Takový postup byl také s úspěchem použit pro přípravu protilátky proti lidskému antigenu Fas.

Podstatu vynálezu tvoří způsob výroby humanizované protilátky obsahující nejméně jeden lehký řetězec a nejméně jeden těžký řetězec, postup spočívá v tom, že se

- a) volí protilátka odlišného než lidského původu s obsahem alespoň jedné oblasti CDR,
- b) zvolí se těžký řetězec lidské protilátky,
- c) zvolí se lehký řetězec lidské protilátky,
- d) alespoň jedna oblast CDR z těžkého řetězce protilátky odlišné od lidského původu se uloží do těžkého řetězce lidské protilátky za vzniku rekombinantního těžkého řetězce a
- e) alespoň jedna oblast CDR z lehkého řetězce protilátky jiného než lidského původu se uloží do lehkého řetězce protilátky lidského původu za vzniku rekombinantního lehkého řetězce,

příčemž lehký a těžký řetězec lidské protilátky se volí pouze na základě homologie sekvence s lehkým a těžkým řetězcem protilátky jiného než lidského původu.

Vynález bude dále osvětlen v souvislosti s přiloženými výkresy.

Přehled obrázků na výkresech

Na obr. 1 je znázorněna konstrukce banky cDNA pro klonování kódové DNA pro podjednotky CH11 s plnou délkou.

Na obr. 2 je znázorněno klonování kódové DNA s plnou délkou pro podjednotky TH11.

Na obr. 3 je znázorněn postup, užívaný pro analýzu sekvence těžkého řetězce.

Na obr. 4 je znázorněn postup, užívaný pro analýzu sekvence lehkého řetězce.

Na obr. 5 je znázorněn první stupeň PCR pro přípravu fragmentů DNA, VL-KY a VL-KF.

Na obr. 6 je znázorněn druhý stupeň PCR pro přípravu fragmentů DNA, VL-KY a VL-KF.

Na obr. 7 je znázorněn třetí stupeň PCR pro přípravu fragmentů DNA, VL-KY a VL-KF.

Na obr. 8 je znázorněna konstrukce plasmidů pHkKY2-58 a pHkKF2-19.

Na obr. 9 je znázorněn první stupeň PCR pro přípravu fragmentu DNA, VL-RY a VL-RF.

Na obr. 10 je znázorněn druhý stupeň PCR pro přípravu fragmentů DNA, VL-RY a VL-RF.

Na obr. 11 je znázorněna konstrukce plasmidů pHkRY2-10 a pHkRF2-52.

Na obr. 12 je znázorněna příprava fragmentů DNA MEC.

Na obr. 13 je znázorněna konstrukce plasmidu pMEC22.

Na obr. 14 je znázorněn první stupeň PCR pro přípravu fragmentu DNA VH1234.

Na obr. 15 je znázorněn druhý stupeň PCR pro přípravu fragmentu DNA VH1234.

Na obr. 16 je znázorněn třetí stupeň PCR pro přípravu fragmentu DNA VH1234.

Na obr. 17 je znázorněna konstrukce plasmidu pMEHC20.

Na obr. 18 je znázorněn první stupeň PCR pro přípravu fragmentů DNA HUMFR5', HUMFR3', MOUFR5' a MOUFR3'.

Na obr. 19 je znázorněn druhý stupeň PCR pro přípravu fragmentů DNA HUMFR2 a MOUFR2.

Na obr. 20 je znázorněna konstrukce plasmidů pHFR3 a pHFR4.

Na obr. 21 je znázorněn první stupeň PCR pro přípravu fragmentů DNA HHC123.

Na obr. 22 je znázorněn druhý stupeň PCR pro přípravu fragmentu DNA HHC123.

Na obr. 23 je znázorněn třetí stupeň PCR pro přípravu fragmentu DNA HHC123.

Na obr. 24 je znázorněna konstrukce plasmidu pMECW5.

Na obr. 25 je znázorněna konstrukce plasmidů pH_C/uH a pH_C/uM.

Na obr. 26 je znázorněn první stupeň PCR pro přípravu fragmentu DNA FASAIC.

Na obr. 27 je znázorněn druhý stupeň PCR pro přípravu fragmentu DNA FASAIC.

Na obr. 28 je znázorněna konstrukce plasmidu pHFas-AIC2.

Na obr. 29 je znázorněno stanovení účinnosti vazby Fas zkouškou ELISA.

Na obr. 30 je znázorněno stanovení účinnosti vazby Fas zkouškou ELISA.

Na obr. 31 je znázorněno stanovení cytotoxické účinnosti na buňkách HPB-ALL.

Podle vynálezu je tedy možno zkonstruovat humanizované protilátky s minimálním rizikem vzniku odpovědi typu HAMA při zachování efektorové funkce protilátky.

Pod pojmem "homologie sekvence" se rozumí homologie sekvence DNA nebo homologie sekvence aminokyselin. Homologie je podobnost mezi dvěma sekvencemi, pojem je v oboru běžně užíván. Výhodné je zachovat homologii sekvence aminokyselin. Homologii sekvence aminokyselin je možno prokázat řadou postupů, které běžně zahrnují vyhledávání sekvencí v počítačových databázích. Tyto postupy jsou v oboru známé a běžně užívané. Výhodné je také stanovit homologii včetně rámcových oblastí.

Pojem "lidského původu" znamená v případě protilátek jakoukoliv protilátku, u níž lze předpokládat, že vyvolá jen malou nebo žádnou odpověď u jednotlivého člověka nebo u skupiny lidí.

Obvykle je výhodné naroubovat všechny oblasti CDR z dané protilátky do akceptorové protilátky tak, aby byly zachovány oblasti pro vazbu epitopu. Může však dojít k tomu, že je žádoucí nebo vhodné naroubovat jen některé oblasti CDR do molekuly donoru. Také tyto postupy spadají do rozsahu vynálezu.

Zvláště výhodné je provedení, při němž jsou všechny oblasti CDR z protilátky, odlišné od lidské protilátky naroubovány do lidské protilátky. Dále je výhodné začlenit některé oblasti rámcových oblastí rovněž do akceptorové protilátky tak, aby bylo možno zachovat trojrozměrnou strukturu rozpoznávacího místa protilátky, odlišné od lidské

protilátky. Taková místa rámcových oblastí obvykle zahrnují jednotlivé zbytky aminokyselin, vybrané pro jejich důležitost podle kritérií, která budou dále uvedena. Výhodné jsou zvláště takové zbytky, které se v lidské protilátce vyskytují vzácně, avšak v příslušné donorové protilátce jsou obvyklé a také takové zbytky, u nichž je vysoká pravděpodobnost přímé interakce s epitopem nebo s rozpoznávacím místem.

Při roubování oblastí CDR do lidských protilátek se obvykle těmito oblastmi nahradí celá oblast CDR v lidské protilátce, zvláště v případě, že obě oblasti mají stejnou délku. Je však také možno v lidské protilátce nahradit jen část oblasti CDR nebo naroubovat pouze část CDR donorové protilátky nebo obě tyto možnosti kombinovat. Je také možné, že jedna oblast CDR bude větší, za této situace je vždy výhodné zachovat neporušené rámcové oblasti lidské protilátky.

Je také zřejmé, že CDR z protilátky jiného než lidského původu by měla nahradit odpovídající oblast CDR v lidské protilátce. Je však také možno, že akceptorem může být kostra lidského lehkého nebo těžkého řetězce, z níž již byla oblast CDR odstraněna. V tomto případě je možno CDR z donorové protilátky uložit do lidského řetězce v poloze, odkud byla odstraněna původní oblast CDR.

Lehké a těžké řetězce lidského původu nemusí být nezbytně řetězce z téže lidské protilátky a dokonce ani z téže skupiny protilátek. Důležité je, aby sekvence zvolené akceptorové molekuly byla co nejbližší sekvenci donorové protilátky. Toto opatření je důležité proto, aby výsledná protilátka měla rozpoznávací místo, blízké původnímu místu donorové protilátky tak, aby docházelo k co nejlepší vazbě. Vynález tedy zahrnuje možnost použití řetězců, které si nebudou zcela blízké, avšak u nichž je možno očekávat, že výsledná rekombinantní protilátka bude mít požadované vlastnosti.

V případě, že je v průběhu přihlášky uvedena protilátka, je samozřejmé, že obdobné úvahy platí také pro příslušné kódové sekvence nukleových kyselin.

Při selekci pouze na bazi homologie sekvence bez dalších omezení je možno, aby donor a akceptor měly alespoň 70 % aminokyselin v části FR společných. Při zachování tohoto přístupu je možné snížit počet aminokyselin donoru, které je nutno naroubovat a tím snížit nebezpečí vzniku odpovědi typu HAMA.

Úloha zbytků aminokyselin, které se v molekule donoru vyskytují vzácně, nemůže být prozatím zcela definována vzhledem k tomu, že předpověď trojrozměrné struktury molekuly protilátky na základě její primární sekvence má omezenou přesnost. Tento postup se v současné době označuje jako modelování molekuly. Známé postupy, například uvedené ve svrchu zmíněné publikaci Queen a další, neuvádějí, zda má být v této poloze zvolen zbytek aminokyseliny donoru nebo akceptoru. Selektace molekuly akceptoru na bazi homologie sekvence může podstatně snížit potřebu takové selektace.

Pod pojmem "rekombinantní" se rozumí jakákoliv sloučenina, která byla získána genetickým inženýrstvím, to znamená modifikací jiné látky nebo exprese odlišným způsobem nebo v odlišném systému.

Povaha protilátky není v průběhu způsobu podle vynálezu kritická. Může být použita jakákoliv protilátka, může například jít o IgG, IgM, IgA nebo IgE, protilátka se může volit z určité skupiny, například v závislosti na předpokládaném způsobu podání. Jak již bylo uvedeno, může se variabilní oblast těžkého řetězce odvodit z jednoho podtypu lidské protilátky a variabilní oblast lehkého řetězce může být odvozena

z jiného podtypu protilátky. Mimoto je možno kombinovat těžký a lehký řetězec z podskupin, které se přirozeně nevyskytují.

Podle vynálezu se připravuje protilátka s účinností proti antigenu Fas, je však zřejmé, že takovou protilátku je možno zásadně připravit proti jakémukoliv antigenu. Zvláště výhodná je molekula IgM s účinností proti Fas. Bylo také prokázáno, že v případě, že se užije konstrukce typu IgM bez řetězce J, který vytváří pentamerní strukturu protilátky s pěti páry těžkého a lehkého řetězce, pak je možno zvýšit apoptotickou účinnost molekuly ve srovnání s molekulou, která řetězec J obsahuje.

Pojmy "lehký řetězec" a "těžký řetězec" jsou v oboru známé. V průběhu přihlášky se tyto pojmy nemusí týkat vždy řetězce s celou délkou, jediným požadavkem je, aby si rekombinantní protilátka podle vynálezu zachovala účinnost proti antigenu, s výhodou proti antigenu Fas.

Je výhodné, aby sekvence aminokyselin, odvozená od donorové protilátky, odlišné od lidské protilátky dovolovala zkříženou reakci protilátky s antigenem, z tohoto důvodu je obsažena oblast CDR nebo oblast, která této oblasti odpovídá. Je zřejmé, že se sekvencí lidské protilátky může být spojena jedna oblast nebo větší počet oblastí CDR. Ve výhodném provedení obsahuje každý těžký a lehký řetězec tři oblasti CDR, odvozené od téže donorové protilátky.

Donorová oblast nebo oblasti mohou být odvozeny z jakéhokoli zdroje, z něž je možno protilátky získat. Nejběžnější je myš, je však možno také užít krysy a králíky. Ve výhodném provedení běží o oblasti CDR, odvozené z myší protilátky CH11, která reaguje s lidským antigenem Fas.

V dalším výhodném provedení tvoří části řetězce aminokyselin, odvozené od lidské protilátky v podstatě rámcové oblasti FR protilátky. Mimoto může být přítomna konstantní oblast protilátky nebo její část.

Rámcová oblast FR je přítomna ve variabilní oblasti podjednotky řetězce H nebo L v molekule imunoglobulinu. Například FRH_1 označuje rámcovou oblast, uloženou nejdále N-terminálně ve variabilní oblasti podjednotky řetězce H a FRL_4 označuje čtvrtou rámcovou oblast od N-terminálního konce variabilní oblasti podjednotky řetězce L. Obdobně $CDRH_1$ označuje oblast CDR, uloženou nejdále N-terminálně ve variabilní oblasti podjednotky řetězce H a $CDRL_3$ znamená oblast CDR, uloženou jako třetí od N-terminálního konce variabilní oblasti podjednotky řetězce L. V jakémkoliv lehkém nebo těžkém řetězci jsou oblasti CDR obklopeny oblastmi FR.

Protilátky proti vynálezu nemají u člověka v podstatě vyšší imunogenitu než lidské protilátky. Tohoto výsledku je dosaženo tím, že není přítomna ta část cizorodé protilátky, která odpovídá heterologní konstantní oblasti. To znamená, že protilátka podle vynálezu může obsahovat část variabilní oblasti myší monoklonální protilátky, například CH11, avšak konstantní oblast byla odstraněna. Ve výhodném provedení je možno počet aminokyseliny z cizorodé protilátky ještě dále snížit tak, aby bylo možno zcela vyloučit imunogenitu a současně zachovat požadovanou účinnost protilátky. Toho je možno dosáhnout výběrem lidských protilátek na bazi homologie sekvence, jak bylo popsáno svrchu.

Mimoto bylo prokázáno, že je možno uskutečnit ještě další selekci tak, aby byly identifikovány aminokyseliny rámcové oblasti donoru, které jsou důležité pro udržení struktury a funkce oblastí CDR donorové molekuly.

Jakmile byla vybrána pro daný řetězec lidská akceptorová molekula, je nutno vybrat zbytky aminokyselin z rámcové oblasti donoru, které mají být naroubovány, selekce se provádí následujícím způsobem:

Srovnávají se sekvence aminokyselin donoru a akceptoru. V případě, že se zbytky aminokyselin v některé poloze rámcových oblastí liší, je nutno rozhodnout, který zbytek bude zvolen. Takový zbytek by neměl porušit trojrozměrnou strukturu oblasti CDN donoru nebo by měl mít pouze malý vliv.

Ve zveřejněné japonské patentové přihlášce č. 4-502408 (Queen a další) se navrhuje postup pro rozhodování, zda má být naroubován určitý zbytek aminokyseliny z rámcové oblasti FR donoru spolu s oblastí CDR. Podle tohoto postupu se zbytek aminokyseliny z oblasti FR naroubuje do akceptoru spolu s oblastí CDR v případě, že tento zbytek splní nejméně jedno z následujících kritérií:

- 1) aminokyselina lidské rámcové oblasti akceptoru je v této poloze vzácná, kdežto odpovídající aminokyselina donoru je v této poloze akceptoru běžně uložena,
- 2) aminokyselina je uložena v bezprostřední blízkosti některé z oblastí CDR nebo
- 3) aminokyselina obsahuje v postranním řetězci atom, který se nachází přibližně 3×10^{-10} m od oblasti CDR podle trojrozměrného modelu imunoglobulinu a je potenciálně schopen interakce s antigenem nebo CDR humanizované protilátky.

Zbytek, který vyhovuje podmínce 2), často vyhovuje také podmínce 3). Z tohoto důvodu je možno podmínku 2) vynechat a vzít v úvahu pouze ostatní dvě podmínky. Podle vynálezu je tedy možno zařadit zbytek aminokyseliny z oblasti FR donoru

spolu s oblastí CDR v případě, že zbytek splňuje alespoň jedno z následujících kritérií:

- a) aminokyselina se v rámcové oblasti lidského akceptoru v uvedené poloze vyskytuje vzácně, kdežto odpovídající aminokyselina donoru se v této poloze akceptoru běžně vyskytuje,
- b) aminokyselina obsahuje v podstranním řetězci atom, který se nachází přibližně 3×10^{-10} m od oblasti CDR podle trojrozměrného modelu imunoglobulinu a je potenciálně schopen interakce s antigenem nebo s oblastí CDR humanizované protilátky,
- c) aminokyselina se nachází v poloze, která je jednou z určujících poloh pro strukturu kanonické oblasti CDR,
- d) aminokyselina je v poloze, která je ve styku s lehkým a těžkým řetězcem tam, kde mezi těmito řetězci dochází ke vzájemnému styku.

Pokud jde o podmínku a), je aminokyselina "běžná" v případě, že se v uvedené poloze nachází nejméně v 90 % protilátek téže podskupiny, jak je popsáno ve svrchu uvedené publikaci Kabat a další. Aminokyselina se vzácně vyskytuje v případě, že je možno ji v uvedené poloze nalézt u méně než 10 % protilátek téže podskupiny.

Pokud jde o podmínku c), je uvedenou polohu zbytku možno jednoznačně stanovit na základě informací, uvedených ve svrchu zmíněné publikaci Chothia a další.

Pokud jde o podmínky b) a d), je zapotřebí předem provést modelování molekuly variabilních oblastí protilátky. K tomu účelu je možno použít jakýkoliv běžně dodávaný software pro modelování molekul, výhodné je použití softwaru AbM (Oxford Molecular Limited, Inc.).

Předpovědi, provedené pomocí modelování molekul mají omezenou přesnost. Z tohoto důvodu byla struktura, získaná tímto způsobem ještě srovnávána s krystalografickými hodnotami, získanými pomocí rtg-záření z variabilních oblastí různých protilátek.

Při použití strukturního modelu, získaného modelováním pomocí softwaru AbM se předpokládá, že dva atomy jsou spolu ve styku prostřednictvím van der Waalsových sil v případě, že vzdálenost mezi těmito dvěma atomy je menší než součet jejich van der Waalsových poloměrů + $0,5 \times 10^{-10}$ m. Je možno předpokládat přítomnost vazby vodíku v případě, že vzdálenost mezi polárními atomy, například mezi dusíkem amidové skupiny a kyslíkem karbonylové skupiny v hlavním a vedlejším řetězci je kratší než $2,9 \times 10^{-10}$ m, to znamená průměrnou délku vazby vodíku + $0,5 \times 10^{-10}$ m. Mimoto v případě, že vzdálenost mezi dvěma atomy s opačným nábojem je kratší než $2,85 + 0,5 \times 10^{-10}$ m, je možno předpokládat tvorbu iontového páru.

Polohy aminokyselin rámcové oblasti, které jsou často ve styku s oblastí CDR, byly identifikovány na základě krystalografických údajů variabilních oblastí různých protilátek na bazi rtg-záření. Tyto polohy byly stanoveny bez ohledu na podskupiny protilátek. V případě lehkých řetězců jde o polohy 1, 2, 3, 4, 5, 23, 35, 36, 46, 48, 49, 58, 69, 71 a 88 a v případě těžkých řetězců běží o polohy 2, 4, 27, 28, 29, 30, 36, 38, 46, 47, 48, 49, 66, 67, 69, 71, 73, 78, 92, 93, 94 a 103. Číslování aminokyselin bylo provedeno podle svrchu uvedené publikace Kabat a další. Toto číslování bude i dále používáno. V případě využití modelování molekul bylo prokázáno, že aminokyseliny ve svrchu uvedených polohách jsou ve styku se zbytky v oblasti CDR ve dvou třetinách variabilních oblastí zkoumaných protilátek.

Svrchu uvedené informace byly použity k formulaci podmínky b). V případě, že poloha aminokyseliny v oblasti FR odpovídá podle modelu molekuly styku s oblastí CDR a současně se pokusně prokáže krystalograficky, že je podle analýzy rtg-zářením skutečně ve styku s oblastí CDR, pak její naroubování do donoru je výhodné. V případě ostatních možností se podmínka b) nebere do úvahy.

Obdobně, pokud jde o podmínku d), je možno na základě krystalografie pomocí rtg-záření z variabilních oblastí řady protilátek prokázat, že zbytky aminokyselin v polohách 36, 38, 43, 44, 46, 49, 87 a 98 v lehkých řetězcích a v polohách 37, 39, 45, 47, 91, 103 a 104 těžkých řetězců jsou často uloženy v místě styku lehkého a těžkého řetězce. V případě, že poloha těchto aminokyselin v lehkém a těžkém řetězci rovněž odpovídá molekulovému modelu, pak se dává naroubování tohoto zbytku aminokyseliny přednost. Jinak se podmínka d) nebere do úvahy.

Součástí podstaty vynálezu tvoří také DNA a RNA pro svrchu uvedené protilátky, zejména DNA. Součástí podstaty vynálezu tvoří i kódová DNA a RNA pro těžké a lehké řetězce protilátek.

Je zřejmé, že DNA může mít jakoukoliv vhodnou formu pro uložení do vektoru, s výhodou do vektoru pro expresi. ~~Může být také spojena s jakoukoliv jinou vhodnou sekvencí,~~ například s vedoucí sekvencí nebo se sekvencí pro expresi kódované bílkoviny ve formě složené bílkoviny.

Součástí podstaty vynálezu tvoří také hostitelská buňka, transformovaná takovým vektorem a systém pro expresi bílkoviny podle vynálezu, tvořený hostitelskou buňkou, transformovanou nejméně jedním vektorem pro expresi, v němž je

uložena svrchu uvedená DNA. Bílkoviny podle vynálezu je pak možno získat pěstováním transformovaných buněk při použití obvyklých postupů.

Dále budou popsána některá výhodná provedení způsobu podle vynálezu.

V jednom z těchto provedení je možno připravit genetiky pozměněný imunoglobulin M, IgM s vysokou účinností při vyvolávání apoptosy, bez řetězce J, imunoglobulin je tvořen lehkým řetězcem se sekvencí aminokyselin SEQ ID No. 78, lehkým řetězcem aminokyselin SEQ ID No. 80, lehkým řetězcem aminokyselin SEQ ID No. 82 nebo lehkým řetězcem aminokyselin SEQ ID No. 84 a jedním těžkým řetězcem aminokyselin SEQ ID No. 86 nebo těžkým řetězcem aminokyselin SEQ ID No. 88.

Je zřejmé, že imunoglobulin obsahuje nebo může obsahovat čtyři výhodné lehké řetězce a dva výhodné těžké řetězce. Přitom může být každý z lehkých řetězců kombinován s kterýmkoliv těžkým řetězcem. Jsou tedy možné následující výhodné kombinace:

Lehký řetězec SEQ ID No. 78 a těžký řetězec SEQ ID No. 86.

Lehký řetězec SEQ ID No. 78 a těžký řetězec SEQ ID No. 88.

Lehký řetězec SEQ ID No. 80 a těžký řetězec SEQ ID No. 86.

Lehký řetězec SEQ ID No. 80 a těžký řetězec SEQ ID No. 88.

Lehký řetězec SEQ ID No. 82 a těžký řetězec SEQ ID No. 86.

Lehký řetězec SEQ ID No. 82 a těžký řetězec SEQ ID No. 88.

Lehký řetězec SEQ ID No. 84 a těžký řetězec SEQ ID No. 86.

Lehký řetězec SEQ ID No. 84 a těžký řetězec SEQ ID No. 88.

Součástí podstaty vynálezu tvoří také kódová DNA pro svrchu uvedených osm bílkovin. Tyto sekvence budou dále uvedeny jako kódové sekvence SEQ ID Nos. 77, 79, 81, 83, 85 a 87 pro sekvence bílkovin SEQ ID Nos. 78, 80, 82, 84, 86 a 88. Výhodná je také DNA, která hybridizuje s takovou DNA, s výhodou při teplotě 60 až 70 °C v 6 x SSC.

Dále je výhodný také rekombinantní vektor, který obsahuje kteroukoliv ze svrchu uvedených DNA. Zvláště jde o rekombinantní vektory pHKKY2-58, pHKKF2-19, pHKRY2-10, pHKRF2-52, pH_uH5-1 a pH_uM1-1. Součástí podstaty vynálezu tvoří také buňky, transformované těmito vektory, zvláště jde o E. coli kmen pHKKY2-58, FERM BP-5861, E. coli kmen pHKKF2-19, FERM BP-5860, E. coli kmen pHKRY2-10, FERM BP-5859, E. coli kmen pHKRF2-52, FERM BP-5862, E. coli kmen pH_uH5-1, FERM BP-5863 a E. coli kmen pH_uM1-1, FERM BP-5864.

Výhodný postup pro výrobu imunoglobulinu podle vynálezu tedy spočívá v tom, že se:

- pěstuje buňka, transformovaná svrchu uvedeným vektorem DNA za podmínek, při nichž může dojít k expresi kódové DNA pro řetězec H nebo řetězec L imunoglobulinu, obsažené ve vektoru a
- imunoglobulin se z kultury izoluje.

Uvedeným způsobem byly úspěšně klonovány kódové geny pro řetězce H a L myší monoklonální protilátky IgM proti lidskému Fas z banky cDNA, připravené z buněk hybridomu, produkujícího protilátky. Byly analyzovány nukleotidové sekvence v plné délce. Pak byly v každém řetězci identifikovány polohy v oblastech CDR. Byly vybrány sekvence aminokyselin, obsahující tyto oblasti CDR a mimoto několik zbytků aminokyselin z rámcových oblastí. Tyto sekvence byly naroubovány do řetězců H a L lidského imunoglobulinu IgM k získání úplných

řetězců H a L pro humanizovanou protilátku proti lidskému antigenu Fas.

Kódová DNA pro humanizované řetězce H a L byla klonována při použití vektorů pro expresi. Při současné transfekci živočišných buněk vektorem pro expresi řetězce H a vektorem pro expresi řetězce L bylo možno získat bílkovinu, vyvolávající apoptosu s funkcí protilátky proti lidskému Fas.

DNA podle vynálezu je možno získat tak, že se nejprve připraví poly(A)⁺RNA z buněk myšího hybridomu, produkujících monoklonální protilátku proti lidskému Fas, například CH11. Tato poly(A)⁺RNA se pak převede na cDNA při použití reverzní transkriptázy a kódová cDNA pro řetězce H a L protilátky se pak čistí. V publikaci Yonehara a další, 1989, J. Exp. Med., 169, 1747 a následující se popisuje příprava monoklonální protilátky proti lidskému Fas, označené CH11, fúzí buněk myšího myelomu s myšími lymfocyty po imunizaci myší buněčnou linií lidských diploidních fibroblastů FS-7, u nichž dochází k expresi Fas. Protilátky CH11 z uvedeného hybridomu se běžně dodávají (Igaku-seibutsugaku Kenkyujo K. K.).

Poly(A)⁺RNA je možno získat tak, že se nejprve připraví celá RNA a pak se z ní čistí poly(A)⁺RNA například při použití sloupce pro afinitní chromatografii s náplní oligo(dT) celulosy, oligo(dT) latexových kuliček a podobně, nebo je možno poly(A)⁺RNA čistit přímo z materiálu s obsahem rozrušených buněk při použití týchž postupů. Celkovou RNA je možno připravit například v ultraodstředivce při použití hustotního gradientu sacharosy v alkalickém prostředí podle publikace Dougherty W. G. a Hiebert E., 1980, Virology, 101, 466 až 474, postupem s použitím guanidinthiokyanátu a fenolu nebo guanidinthiokyanátu a trifluorcesia nebo při použití fenolu a SDS. Při výhodném postupu se užívá guanidinthiokyanátu a chloridu cesného podle Chirgwin J. M. a další, 1979, Biochemistry 18, 5294 až 5299.

Pak je možno cDNA s jednoduchým řetězcem (ss), získanou použitím reverzní transkriptázy, jak je svrchu uvedeno, převést na cDNA s dvojitým řetězcem (ds). Vhodnými postupy pro přípravu ds cDNA jsou například postupy s použitím Sl-nukleázy podle Efstratiadis A. a další, 1976, Cell, 7, 279 až 288 a Gubler-Hoffmanův postup podle Gubler U. a Hoffman B. J., 1983, Gene, 25, 263 až 269. Velmi výhodný je také způsob podle publikace Okayama H. a Berg P., 1982, Mol. Cell. Biol., 2, 161 až 170.

Svrchu získanou ds cDNA je pak možno uložit do vektoru pro klonování a výsledný rekombinantní vektor je možno použít k transformaci vhodného mikroorganismu, například E. coli. Transformanty je možno podrobit selekci pomocí standardních postupů, například na základě uložení odolnosti proti tetracyklinu nebo ampicilinu do rekombinantního vektoru. V případě použití E. coli je možno transformaci uskutečnit podle publikace Hanahan D., 1983, J. Mol. Biol., 166, 557 až 580. Rekombinantní vektor je také možno uložit do kompetentních buněk, připravených současným vystavením buněk působení chloridu vápenatého a chloridu hořečnatého nebo chloridu rubidia. V případě, že je jako vektor použit plasmid, je vysoce žádoucí, aby tento plasmid obsahoval gen pro odolnost proti určité látce, stejně jako svrchu, k usnadnění selekce. Přestože jsou prozatím uváděny pouze plasmidy, je zřejmé, že je možno použít i jiné prostředky pro klonování, například fágy lambda.

Dále budou uvedeny některé postupy pro selekci transformantů, obsahujících požadovanou DNA.

1) Použití syntetického oligonukleotidu jako sondy

V případě, že je známa celá sekvence aminokyselin požadované bílkoviny nebo její část, je možno zkonstruovat krátkou sekvenci, která je rovněž reprezentativní pro poža-

dovanou bílkovinu a při použití této sekvence je pak možno zkonstruovat oligonukleotidovou sondu. Tato sonda obsahuje kódovou sekvenci pro řetězec aminokyselin, avšak vzhledem k degeneraci genetického kódu je možno připravit velké množství takových sond. Za obvyklých podmínek se tedy volí sekvence aminokyselin, pro niž může být kódovou sekvencí omezený počet oligonukleotidů. Počet oligonukleotidů, které je zapotřebí zkonstruovat, je možno dále snížit náhradou inosinu v těch případech, kdy je možno použít některou ze čtyř obvyklých bazí. Sonda se pak značí vhodným způsobem, například při použití ^{32}P , ^{35}S nebo biotinu a pak se hybridizuje s denaturovanou, transformovanou DNA z transformantu, imobilizovaného na nitrocelulosovém filtru. Pozitivní kmeny je možno identifikovat na základě značení v sondě.

2) Použití PCR

V případě, že byl analyzován celý řetězec aminokyselin požadované bílkoviny nebo jeho část, je možno syntetizovat oligonukleotidové primery ve směru a proti směru exprese, odpovídající určitým částem sekvence aminokyselin. Tyto primery je pak možno použít k uskutečnění PCR podle publikace Saiki R. K. a další, 1988, Science, 239, 487 až 491 k amplifikaci požadovaného kódového fragmentu DNA pro podjednotku myší monoklonální protilátky proti lidskému antigenu Fas. DNA, použitá jako matrice může být cDNA, připravená pomocí reverzní transkriptázy při použití mRNA, získané z hybridomu, produkujícího protilátku proti lidskému Fas, například hybridomu, u nějž dochází k expresi CH11. Takto syntetizované fragmenty DNA je možno přímo integrovat do plasmidu jako vektoru, například při užití běžně dodávané soupravy, nebo je možno ji označit například ^{32}P , ^{35}S nebo biotinem a pak použít jako sondu pro hybridizaci kolonií nebo plaků k získání požadovaného klonu.

Monoklonální protilátka CH11 je imunoglobulin M, jde o komplex, který obsahuje pět podjednotek, z nichž každá je tvořena řetězcem H a řetězcem L, mimoto obsahuje protilátka jeden řetězec J. Aby bylo možno analyzovat sekvenci aminokyselin v podjednotkách, je zapotřebí podjednotky oddělit jakýmkoliv vhodným způsobem, například elektroforézou, chromatografií na sloupci nebo jiným běžným postupem. Po oddělení podjednotek je pak možno analyzovat jejich sekvenci, například při použití zařízení pro automatickou analýzu sekvence bílkovin (např. PPSQ-10, Shimadzu) tak, aby bylo možno určit sekvenci aminokyselin alespoň na N-konci každé podjednotky. Na základě získaných poznatků je pak možno zkonstruovat oligonukleotidové primery.

Izolaci kódové DNA pro každou podjednotku monoklonální protilátky proti lidskému Fas z příslušných transformantů, získaných svrchu uvedeným způsobem, je možno uskutečnit známými postupy, například podle publikace Maniatis T. a další, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1982. Je například možno vyjmout z DNA plasmidu kódovou oblast v DNA pro požadovanou podjednotku po oddělení frakce, odpovídající vektorové DNA z transformantu, obsahující požadovaný plasmid.

Kmen *E. coli* DH5alfa byl transformován při použití plasmidů, obsahujících kódovou DNA pro těžký a lehký řetězec CH11, připravenou svrchu uvedeným způsobem a výsledné dva transformanty byly označeny *E. coli* pCR3-H123 a *E. coli* pCR3-L103 a uloženy za podmínek Budapeštské úmluvy do sbírky mikroorganismů Kogyo Gijutsuin Seimei-Kogaku Kogyo Gijutsu Kenkyujo (HIBH) 28. února 1996 pod přírůstkovými čísly FERM BP-5427 a FERM BP-5428. Kmen *E. coli* DH5alfa s obsahem uvedených plasmidů je možno pěstovat stejným způsobem jako kmen, který tyto plasmidy neobsahuje. Všechny kmeny je možno podro-

bit selekci na základě jejich odolnosti k ampicilinu. DNA podle vynálezu může být získána při použití uvedených kmenů. To je možno uskutečnit pěstováním těchto kmenů a izolací příslušných plasmidů nebo při použití PCR s využitím plasmidů jako matric.

Analýzu sekvence DNA je možno uskutečnit různými známými postupy, například při použití chemické modifikace podle publikace Maxam A. M a Gilbert W., 1980, Methods in Enzymology, 65, 499 až 276 nebo při využití fágu M13 podle publikace Messing J. a Vieira J., 1982, Gene, 19, 269 až 276. V posledních letech je pro analýzu sekvence DNA často používán ještě další postup, při němž se místo obvyklého radioizotopu používá fluorogenní barvivo. Celý postup je upraven tak, aby při něm bylo možno využít počítač včetně odečtení nukleotidové sekvence po elektroforéze. Vhodným komplexním zařízením k provádění tohoto postupu je například robot Perkin-Elmer Sequence robot "CATALYST 800" a model 373A pro analýzu sekvence DNA (Perkin-Elmer). Při použití této techniky je možno analyzovat nukleotidovou sekvenci DNA bezpečně a současně velmi účinně.

Na základě údajů, získaných tímto způsobem pro nukleotidové sekvence a tím i pro N-terminální sekvence aminokyselin v řetězci H a L protilátky CH11 je pak možno stanovit úplnou sekvenci aminokyselin této protilátky.

Oblasti CDR, FR a konstantní oblast řetězce H a L protilátky CH11 byly identifikovány srovnáním sekvence aminokyselin v řetězci H a L a známé sekvence aminokyselin imunoglobulinu podle svrchu uvedené publikace Kabat a další.

Kódová DNA pro variabilní oblasti řetězce H a L humanizované protilátky proti lidskému Fas podle vynálezu může být připravena celou řadou postupů.

Při jednom z těchto postupů je možno syntetizovat polynukleotidové fragmenty o délce 60 až 70 nukleotidů, které představují část nukleotidové sekvence požadované DNA. Při syntéze se postupuje tak, aby zakončení fragmentů pozitivních řetězců se střídalo se zakončením fragmentů negativních řetězců. Výsledné polynukleotidové fragmenty je možno vzájemně spojovat a vázat pomocí DNA-ligázy. Tímto způsobem je možno připravit kódové fragmenty DNA pro variabilní oblasti řetězce H a L humanizované protilátky proti antigenu Fas.

Je také možno postupovat tak, že se kódová DNA pro celou variabilní oblast akceptoru izoluje z lidských lymfocytů. K uložení restričních míst do kódových oblastí CDR donoru je možno použít cílenou tvorbu mutace. Oblasti CDR je pak možno z akceptoru vyjmout působením příslušného restričního enzymu. Kódová DNA pro CDR donoru pak může být syntetizována a uložena do molekuly akceptoru při použití DNA-ligázy.

Je výhodné připravit kódovou DNA pro variabilní oblast řetězce H a L požadované humanizované protilátky proti lidskému Fas pomocí PCR a překrývajících se prodloužených konců podle publikace Horton a další, 1989, Gene, 77, 61 až 68.

Uvedený postup při využití PCR dovoluje spojit dva fragmenty DNA, z nichž každý je kódovou sekvencí pro požadovanou sekvenci aminokyselin. Jako příklad je možno uvést dva fragmenty, označené A a B. Syntetizuje se negativní primer C o 20 až 40 nukleotidech, který se připojí na 5'-oblast fragmentu A a pozitivní primer D o 20 až 40 nukleotidech, který se naváže na 3'-oblast fragmentu B. Pak je zapotřebí použít ještě dva primery. První z nich je chimérní negativní primer E, obsahující 20 až 30 nukleotidů z 3'-oblasti fragmentu A, spojených s 20 až 30 nukleotidy z 5'-oblasti fragmentu B. Druhým z těchto primerů je pozitivní primer F, který je komplementární k negativnímu primeru.

Reakci PCR je možno provést při použití primerů C a F v kombinaci s matricí DNA, obsahující fragment A. Tímto způsobem je možno připravit DNA, tvořenou 20 až 30 nukleotidy 5'-oblasti fragmentu B, navázanými na 3'-oblast fragmentu A. Vytvořený fragment byl označen G.

Obdobným způsobem je možno uskutečnit PCR při použití primerů D a E v kombinaci s matricí DNA, obsahující fragment B. Tímto způsobem je možno připravit DNA, tvořenou 20 až 30 nukleotidy 3'-oblasti fragmentu A, spojenými s 5'-oblastí fragmentu B. Tento fragment byl označen H.

Fragmenty G a H obsahují komplementární sekvence 40 až 60 nukleotidů ve 3'-oblasti fragmentu G a 40 až 60 nukleotidů v 5'-oblasti fragmentu H. Je možno uskutečnit PCR reakci při použití směsi fragmentů G a H jako matrice. V prvním denaturačním stupni vzniká DNA s jednoduchým řetězcem. V následujícím spojovacím stupni dochází k návratu většiny DNA do originální formy. Část DNA však vytvoří heterologní DNA duplex vzhledem k navázání fragmentů G a H do oblasti, v níž se řetězce překrývají. Při následující extenzi se přecházející jednoduché části řetězce upravují za vzniku chimerární DNA, která představuje vazbu fragmentů A a B. Tento fragment DNA byl pak označen jako fragment I, který může být amplifikován při použití primeru C a primeru D.

V jednom z provedení způsobu podle vynálezu mohou fragmenty A a B představovat kódovou DNA oblasti CDR řetězce H a L myší humanizované monoklonální protilátky proti lidskému Fas, kódovou DNA pro oblasti FR lidského imunoglobulinu IgM nebo kódovou DNA pro sekreční signál pro lidský imunoglobulin IgM.

Kodon nebo kodony, odpovídající jednotlivým požadovaným aminokyselinám jsou známy. Při konstrukci sekvence DNA,

při jejímž použití má být připravena bílkovina, je možno zvolit jakýkoliv vhodný kodon. Kodon je možno zvolit například na základě kodonů, vyskytujících se v hostiteli. Částečné modifikace nukleotidové sekvence je možno provést běžnými postupy pro cílenou tvorbu mutací při použití syntetických oligonukleotidových primerů s kódovými řetězci pro požadované modifikace podle publikace Mark D. F. a další, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 81, 5662 až 5666. Při použití vybraných primerů pro zavedení specifické bodové mutace nebo mutací je možno připravit kódovou DNA pro variabilní oblasti řetězců H a L jakékoliv požadované humanizované protilátky proti lidskému Fas.

Integrace takto získané DNA podle vynálezu do vektoru pro expresi dovoluje transformaci prokaryotických nebo eukaryotických hostitelských buněk. Tyto vektory pro expresi typicky obsahují vhodné promotory, replikační místa a sekvence, účastníci se exprese genů a umožňují tak expresi DNA v hostitelské buňce.

Čtyři kmeny transformantů, obsahující plasmidy s kódovými oblastmi pro variabilní oblasti řetězců L humanizované protilátky proti lidskému Fas byly uloženy do sbírky mikroorganismů Kogyo Gijutsuin Feimei-Kogaku Kogyo Gijutsu Kenkyujo, 11. března 1997 podle Budapeštské úmluvy. Jde o kmeny E. coli pHkKY2-58, E. coli pHkKF2-19, E. coli pHkRY2-10 a E. coli pHkRF2-52, uložené pod přírůstkovými čísly FERM BP-5861, BP-5860, BP-5859 a BP-5862.

Dva transformované kmeny, obsahující plasmidy s kódovou sekvencí pro variabilní oblasti řetězců H humanizované protilátky proti lidskému Fas byly uloženy do svrhu uvedené sbírky rovněž 11. března 1997, šlo o kmeny E. coli pH_uH5-1, a E. coli pH_uM1-1, tyto kmeny byly označeny přírůstkovými čísly FERM BP-5863 a BP 5864.

DNA podle vynálezu je možno připravit při použití uvedených uložených kmenů. Je možno postupovat například tak, že se kmeny pěstují a pak se z nich izolují plasmidy, nebo se provádí PCR při použití těchto plasmidů jako matric.

Vhodným prokaryotickým hostitelem je například *Escherichia coli* a *Bacillus subtilis*. K dosažení exprese požadovaného genu v tomto buněčném materiálu je možno hostitelské buňky transformovat plasmidem jako vektorem, obsahujícím replikon, odvozený od čeledi, kompatibilní s hostitelem a typicky obsahujícím počátek replikace a sekvenci promotoru, například *lac UV5*. Tyto vektory s výhodou obsahují také sekvenci, která přenáší na transformované buňky fenotyp pro příští selekci těchto buněk.

Vhodným kmenem *E. coli* je kmen JM109, odvozený od *E. coli* K12. Vhodné vektory jsou například plasmidy ze skupiny pBR322 a pUC. Vhodnými promotory jsou promotor pro laktozu, *lac* a promotor pro kryptofan laktozu *trc*. Je zřejmé, že vynález nemůže být omezen na použití jen některých hostitelských buněk, vektorů, promotorů a podobně a že je možno použít při provádění tohoto obecného postupu jakýkoliv vhodný systém podle potřeby.

Výhodným kmenem *Bacillus subtilis* je kmen 207-25 a výhodným vektorem je pTUB228 podle publikace Ohmura K. a další, 1984, J. Biochem., 85, 87 až 93. Vhodným promotorem je řídicí sekvence genu *Bacillus subtilis* pro alfa-amylázu. V případě potřeby je možno kódovou sekvenci DNA pro signální peptid sekvence pro alfa-amylázu navázat na DNA podle vynálezu k usnadnění extracelulární sekrece.

Vhodným eukaryotickým hostitelem mohou být buňky obratlovců, kvasinky a podobně. Z buněk obratlovců je možno uvést například opičí buněčnou linii COS podle publikace

Gluzman Y., 1981, Cell, 23, 175 až 182. Vhodnými kvasinkami jsou například *Saccharomyces cerevisiae* a *Schizosaccharomyces pombe*.

Obecným požadavkem na vhodný vektor pro expresi pro buněčný materiál obratlovců je přítomnost promotoru, obvykle proti směru exprese genu, k jehož expresi má dojít, přítomnost místa pro štěpení RNA, přítomnost polyadenylačního místa a sekvence pro ukončení transkripce a podobně. Mimoto může vektor ještě obsahovat podle potřeby počátek replikace. Vhodným plasmidem je například pSV2dhfr, obsahující časný promotor SV40 podle publikace Subramani S. a další, 1981, Mol. Cell. Biol., 1, 854 až 884.

Vhodným eukaryotickým mikroorganismem jsou kvasinky, například *S. cerevisiae*, vhodným vektorem pro kvasinky je například pAH301, pAH82 a YEp51. Vhodné vektory mohou obsahovat promotor genu pro alkoholdehydrogenázu podle publikace Bennetzen J. L. a Hall B. D., 1982, J. Biol. Chem., 257, 3018 až 3025, nebo promotor pro karboxypeptidázu Y, GAL10 podle publikace Ichikawa K. a další, 1993, Biosci. Biotech. Biochem., 57, 1686 až 1690. V případě potřeby může být na DNA, k jejíž expresi má dojít, navázána kódová sekvence DNA pro signální peptid karboxypeptidázy Y k usnadnění extracelulární exprese.

V případě buněk COS je vhodným vektorem vektor, obsahující počátek replikace, například SV40, umožňující autonomní růst, dále vektor obsahuje promotor transkripce, signál pro ukončení transkripce a místo sestřihu RNA. Vektor pro expresi může být použit k transformaci buněk jakýmkoliv vhodným způsobem, například při použití DEAE-dextranu podle publikace Luthman H. a Magnusson G., 1983, Nucleic Acids Res.,

11, 1295 až 1308, dále je možno použít postup se společným srážením fosforečnanu vápenatého a DNA podle publikace Graham F. L. a van der Eb A. J., 1973, Virology, 52, 456 až 457 a postup s otevřením pórů pomocí elektrického pulsu podle publikace Neumann E. a další, 1982, EMBO J., 1, 841 až 845. Ve výhodném provedení je možno uskutečnit současnou transakci buněk COS dvěma vektory pro expresi, z nichž jeden obsahuje kódovou DNA pro bílkovinu variabilní oblasti řetězce H protilátky CH11 a druhý kódovou DNA bílkoviny variabilní oblasti řetězce L protilátky CH11, k expresi těchto vektorů dochází současně za vzniku humanizované rekombinantní protilátky proti lidskému antigenu Fas.

Transformanty podle vynálezu je možno pěstovat běžnými metodami. Požadované bílkoviny zůstávají uvnitř buňky nebo jsou vylučovány mimo vnitřní prostor buněk. K pěstování je možno užít běžná živná prostředí, která se volí podle typu hostitele. Výhodným prostředím pro buňky COS je například živné prostředí RPMI-1640 a Eaglovo minimální základní prostředí v Dulbeccově modifikaci, které může být ještě doplněno fetálním telecím sérem FBS. Pěstování může probíhat při jakékoliv teplotě, při níž nedochází k významnému snížení schopnosti buněk syntetizovat bílkoviny, jde obvykle o teplotní rozmezí 32 až 42 °C, nejvýhodnější je teplota 37 °C, zvláště pro buňky savců. V případě potřeby je možno pěstování uskutečnit v atmosféře, která obsahuje 1 až 10 % objemových oxidu uhličitého.

Bílkovinu, k jejíž expresi došlo v transformantech podle vynálezu je možno izolovat a čistit různými známými postupy v závislosti na tom, zda k expresi došlo pouze intracelulárně nebo zda je bílkovina vylučována do živného prostředí, současně je nutno vzít do úvahy fyzikální a chemické vlastnosti bílkoviny. Vhodnými specifickými postupy pro oddělení bílkovin jsou běžně užívána srážecí činidla pro bílkoviny,

různé chromatografické postupy, jako ultrafiltrace, chromatografie při použití molekulového síta, jako filtrace na gelu, adsorpční chromatografie, chromatografie na iontoměničích, afinitní chromatografie a vysokotlaká kapalinová chromatografie HPLC, dále dialýza a různé kombinace těchto postupů.

Při použití svrchu uvedených způsobů je možno snadno připravit požadovanou bílkovinu ve vysokém výtěžku a s vysokou čistotou. I když humanizovaným protilátkám proti lidskému Fas chybí řetězec J, mají tyto protilátky cytotoxickou účinnost, srovnatelnou s účinností protilátky CH11 nebo účinnost ještě vyšší.

Specifická účinnost vazby bílkovin podle vynálezu na antigen Fas může být stanovena například metodou ELISA. Tento postup spočívá v tom, že se zkoumaný antigen imobilizuje na povrch vyhloubení plotny s 96 vyhloubeními a pak se do vyhloubení přidá zkoumaný vzorek. Po promytí se povrch vyhloubení vystaví působení protilátky, značené enzymem, která specificky rozpoznává řetězec H (u řetězce) lidského IgM. Pak se vyhloubení opět omyjí a prokazuje se jakékoliv značení, které ve vyhloubeních zbývá. Kódová cDNA pro lidský antigen Fas je známá látka a její uložení do živočišných buněk za účelem exprese je rovněž známo z publikace Itoh N. a další, 1991, Ceel., 66, 233 až 243. Antigen pro použití při svrchu uvedeném postupu ELISA může být získán ze supernatantu kultury buněk, transformovaných vektorem pro expresi s obsahem kódového genu pro složenou bílkovinu, obsahující extracelulární oblast lidského antigenu Fas a extracelulární oblast myšího receptoru pro interleukin 3, jak je ve zmíněné publikaci uvedeno.

Schopnost bílkovin podle vynálezu vyvolat apoptosu je možno stanovit například tak, že se pěstuje například buněčná linie lidských lymfocytů HPB-ALL (Morikawa S. a další,

1978, Int. J. Cancer, 21, 166 až 170) nebo Jurkat (American Type Culture č. TIB-152) v prostředí, které zkoumaný vzorek již obsahuje nebo se k němu přidává. Pak se stanoví doba přežití zkouškou MTT podle publikace Green L. M. a další, 1984, J. Immunological Methods, 70, 257 až 268.

Při použití DNA podle vynálezu je možno připravit fragment Fv, který je tvořen pouze variabilními oblastmi řetězců H a L, nebo také fragment Fv s jednoduchým řetězcem, v němž jsou řetězce H a L spolu spojeny při použití ohebného peptidu "scFv", podle publikace Huston J. S. a další, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. , USA, 85, 5879.

Vynález se týká také farmaceutických prostředků, které je možno použít k léčení svrchu uvedených stavů a onemocnění. Farmaceutický prostředek bude typicky obsahovat účinné množství bílkoviny podle vynálezu spolu s farmaceutickým nosičem. Tyto prostředky mohou být podávány jakýmkoliv vhodným způsobem, například parenterálně, nitrožilně, podkožně nebo místně. Zvláště v případech, kde onemocnění je omezeno na určitou část organismu, je výhodné bílkovinu podávat co nejbližší k takovému místu. Například ve velkých kloubech může být při revmatismu pociťována značná bolestivost a je tedy vhodné prostředek podávat přímo na takové místo. Při systemickém podávání bílkovin podle vynálezu je zvláště vhodné podávání ve formě bezpyrogenního vodného roztoku, vhodného pro parenterální podávání. Takový roztok musí vyhovovat pokud jde o pH, osmotický tlak, stálost a podobně. Mimoto mohou uvedené prostředky obsahovat ještě další složky, například látky, zpomalující růst buněk a podobně.

Dávky bílkovin podle vynálezu pro použití při jednotlivých specifických onemocněních mohou být určeny v závislosti na různých faktorech, například na celkovém stavu nemocného, jeho hmotnosti, pohlaví a způsobu stravování, na závažnosti

příznaků, době a způsobu podávání a na dalších faktorech. Konkrétní dávku musí vždy určit ošetřující lékař. Obecně je možno uvést, že se dávka bude pohybovat v rozmezí 1 až 1000 mikrogramů bílkoviny na kg hmotnosti.

Humanizované protilátky proti lidskému Fas podle vynálezu jsou schopné se vázat na lidský antigen Fas a současně vyvolávají ve vysokém stupni opoptozu. Jsou proto vhodné pro použití jako antirevmatické látky. Do těchto látek jsou zahrnuty také geneticky modifikované humanizované imunoglobuliny pro snížení potenciální toxicity prostředků.

Praktické provedení vynálezu bude nyní podrobněji osvětleno následujícími příklady, které jsou uvedeny pro ilustraci a uvádějí specifická provedení vynálezu, nejsou však určeny k omezení rozsahu vynálezu.

Jakékoliv postupy, prostředky, roztoky a podobně, které nejsou v příkladové části specificky uvedeny, je možno najít ve svrchu uvedené publikaci Molecular cloning - A laboratory Handbook. Pokud není výslovně uvedeno jinak, jsou všechny roztoky připraveny při použití sterilní deionizované vody.

Příklady provedení vynálezu

Referenční příklad 1

Klonování kódové DNA pro variabilní oblast myší monoklonální protilátky CH11 proti lidskému antigenu Fas

(1-1) Příprava poly(A)⁺RNA

Celková RNA byla připravena z hybridomu, produkujícího CH11, získaného podle publikace Yonehara a další, 1989, J. Exp. Med., 169, 1747 a následující způsobem podle publikace Chirgwin J. M. a další, 1979, Biochemistry, 18, 5294 a následující. Postup byl prováděn tak, že hybridom, produkující CH11 (Yonehara S. a další, 1994, International Immunology 6, 1849 až 1856) byl pěstován v prostředí ASF104 (Ajinomoto) s obsahem 10 % objemových fetálního telecího séra (Gibco). Přibližně $6,7 \times 10^8$ buněk bylo odděleno odstředěním a supernatant byl odložen. Výsledná usazenina buněk pak byla přímo smísená se 60 ml 4M roztoku guanidinthiokyanátu (Fluka). Buňky výsledné suspenze pak byly rozrušeny tak, že suspenze byla třikrát nasáta do stříkačky, opatřené jehlou č. 21. Takto získaný rozrušený materiál pak byl navrstven na 3 ml 5,7 M chloridu cesného v 0,1 M roztoku EDTA o pH 7,5 ve zkumavce pro ultraodstředivku (13PA:Hitachi Koki) a pak byl materiál odstředěn v rotoru Hitachi RPS-40T ve zkumavce 13PA při 150 000 g a teplotě 20 °C celkem 18 hodin k vysrážení RNA. Vysrážená RNA byla rozpuštěna ve vodě, roztok byl extrahován směsí chloroformu a 1-butanolu v objemovém poměru 4 : 1 a pak byla RNA znovu vysrážena 100% ethanolem.

Pak byla z výsledné RNA, připravené svrchu uvedeným způsobem čištěna poly(A)⁺RNA běžným postupem podle publikace Sambrook J. a další, 1989, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2. vydání, Cold Spring Harbor Lab., 7.26 až 7.28.

Postup byl prováděn tak, že polystyrenový sloupec pro jedno použití s průměrem 0,7 cm byl naplněn 100 mg oligo dT celulosy (Pharmacia, typ 7). Sloupec byl uveden do rovnovážného stavu s pufrem, obsahujícím 20 mM tris-HCl o pH 7,6, 0,5 M chloridu sodného, 1 mM EDTA a 0,1 % dodecylsulfátu sodného SDS. Celková RNA v množství přibližně 1,2 mg pak byla rozpuštěna v celkovém objemu 400 mikrolitrů vody zahřátím na 65 °C na 5 minut a pak bylo k roztoku přidáno 400 mikrolitrů svrchu uvedeného pufru, avšak s dvojnásobnou koncentrací. Výsledná směs byla zchlazena na teplotu místnosti a pak nanášena do sloupce. Frakce byly odebírány, zahřáty na dalších 5 minut na 65 °C a pak byly nanášeny zpět do sloupce.

Pak byl sloupec promyt 10 ml svrchu uvedeného pufru a pak 5 ml téhož pufru s obsahem 0,1 M chloridu sodného k odstranění neadsorbovaného materiálu a také nespecificky adsorbovaného materiálu. Pak bylo do sloupce nanášeno 5 ml elučního pufru, obsahujícího 10 mM tris-HCl o pH 7,5, 1 mM EDTA a 0,05 % SDS k eluci specificky adsorbovaného materiálu. Výsledný eluát byl zachycen ve frakcích po 200 mikrolitrech. Třetí a čtvrtá frakce s celkovým objemem 400 mikrolitrů byly spojeny a smíseny s 40 mikrolitry 3M octanu sodného o pH 4,0 a 1 ml 100% ethanolu. Výsledná směs byla uložena přes noc při teplotě -20 °C. Následujícího dne byla směs odstředěna v odstředivce při 10 000 g a teplotě 4 °C celkem 10 minut. Usazenina pak byla použita jako vzorek poly(A)⁺RNA a byla uložena při teplotě -80 °C až do použití.

(1-2) Klonování kódové DNA z variabilních oblastí

Fragmenty cDNA s kódovou sekvencí pro variabilní oblasti řetězce H a L myší protilátky CH11 proti antigenu Fas byly klonovány metodou RT-PCR, která zahrnuje použití reversní transkriptázy RT pro reversní transkripci při PCR-reakci.

Kombinace těchto postupů umožnila specifickou amplifikaci požadované sekvence ze vzorku poly(A)⁺RNA, získané z hybridomu, produkujícího protilátku CH11, jak bylo popsáno svrchu v odstavci 1-1.

Ze sestavy Ig-Prime Set (Novagen) byly pro provedení reakce RT-PCR užity dvě skupiny primerů. MuIgV_H5'-B a MuIgMV_H3'-1 byly užity pro amplifikaci oblasti řetězce H, kdežto MuIgkV_L5' a MuIgMV_L3'-1 byly použity pro amplifikaci oblasti řetězce L. Reakce RT-PCR byla provedena při použití skupiny primerů pro řetězec H i skupiny primerů pro řetězec L.

a) Reakce s reverzní transkriptázou

44 mikrolitrů reakčního roztoku s reverzní transkriptázou bylo připraveno smísením 10 mM tris-HCl o pH 8,3, 50 mM chloridu draselného, 0,1 mM dATP, 0,1 mM dGTP, 0,1 mM dCTP, 0,1 mM dTTP, 1,5 mM chloridu hořečnatého, 2,5 pmol primeru 3'-konce pro řetězec H nebo L, 50 ng poly(A)⁺RNA, připravené podle odstavce 1-1 a 20 jednotek reverzní transkriptázy (Biochemical Kogyo Co., Ltd.) z viru myši leukemie Moloney, MMLV a výsledná směs byla inkubována 1 hodinu při 42 °C.

b) Amplifikace pomocí PCR

Roztok s obsahem reverzní transkriptázy, připravený ve stupni a), byl smíšen s 25 pmol 5'-primeru řetězce H nebo L a s pěti jednotkami Taq DNA-polymerázy (byl použit enzym ampliTaQ, Perkin Elmer, Japonsko), do celkového objemu 100 mikrolitrů byl vzorek doplněn reakčním pufrem z dodané soupravy (pufry a roztoky enzymů jsou vždy použity z dodávané soupravy podle návodu výrobce, není-li uvedeno jinak). Výsledná reakční směs se zahřívá 2 minuty na teplotu 94 °C a pak se opakují cykly vždy 1 minuta při 94 °C, 1 minuta

při 50 °C a 2 minuty při 72 °C. Tyto cykly se opakují celkem 30x. Pak se roztok udržuje ještě 10 minut na 72 °C. K řízení reakční teploty při všech reakcích PLR se užije automatický systém pro amplifikaci genu pomocí PCR, č. 9600 (Perkin Elmer, Japonsko).

c) Zkouška na přítomnost produktu PCR

Podíl reakční směsi po ukončení PCR ve stupni b) se analyzuje elektroforézou na 1,5% agarosovém gelu (FMC Bio-products). Produkt každé z reakcí PCR pro řetězec H a L se získá jako pás o přibližně 430 bp. Velikost pásu se stanoví srovnáním s označením pro molekulovou hmotnost, které se nechá probíhat v tomtéž gelu.

d) Klonování produktu PCR

Každý z produktů PCR, získaných ve stupni b) se uloží do odděleného vektoru typu plasmidu při použití soupravy TA pro klonování (Invitrogen). Postupuje se tak, že se 50 ng vektoru pCRII a čtyři jednotky T4 DNA ligázy (obě složky ze soupravy) přidají k reakčnímu pufru pro ligázu, který obsahuje 6 mM tris-HCl o pH 7,5, 6 mM chloridu hořečnatého, 5 mM chloridu sodného, 7 mM beta-merkapt ethanolu, 0,1 mM ATP, 2 mM dithiothreitolu DTT, 1 mM spermidinu a 0,1 mg/ml sérového albuminu skotu. Reakční pufr pro ligázu obsahuje také podíl reakční směsi po provedení PCR, volený tak, aby obsahoval přibližně 10 ng požadovaného produktu PCR po stanovení elektroforézou na gelu ve stupni c). Výsledná směs se pak inkubuje 15 hodin při teplotě 14 °C.

Pak se 2 mikrolitry takto připravené směsi smísí s 50 mikrolitry E. coli, kmene TOP10F', který je přiložen k soupravě a který byl předem zpracován tak, aby byl kompetentní

přidáním 2 mikrolitrů 0,5 M beta-merkapttoethanolu. Výsledná transformační směs se uloží na 30 minut do ledu, pak se zahřeje na 30 sekund na 42 °C, načež se opět uloží do ledu na další 2 minuty. Po této době se směs přidá k 500 mikrolitrům prostředí SOC, které obsahuje 2 g tryptonu, 0,5 % extraktu z kvasnic a 0,05 g chloridu sodného na 100 ml a mimo to 2,5 mM chloridu draselného, 1 mM chloridu hořečnatého a 20 mM glukosy a výsledný materiál se pěstuje 1 hodinu při teplotě 37 °C na rotační třepačce při 110 ot/min. Výsledná kultura se pak nanese na plotny, obsahující agar s L-bujonem (1 g tryptonu, 0,5 g extraktu z kvasnic, 0,5 g chloridu sodného, 0,1 g glukosy a 0,6 g agaru Bacto (Difco) na 100 ml a mimoto 100 mikrogramů/ml ampicilinu a plotny se pak pěstují přes noc při teplotě 37 °C bez třepání.

Kolonie, odolné proti ampicilinu, získané tímto způsobem se podrobí selekci a pak se oddělí od živného prostředí pomocí platinové kličky. Buňky z vybraných kolonií se odděleně pěstují v 5 ml L-bujonu s obsahem 100 mikrogramů/ml ampicilinu přes noc při 37 °C. Pak se kultury odstředí k usazení buněk a z buněk se připraví plasmidová DNA rozrušením buněk v alkalickém prostředí podle svrchu uvedené publikace Sambrook a další. Byl získán plasmid pro každou sestavu primerů H a L, příslušné plasmidy byly označeny pVH4 (plasmid, obsahující fragment, amplifikovaný při použití primerů pro řetězec H) a pVL8 (plasmid, obsahující fragment, amplifikovaný při použití primerů pro řetězec L).

Referenční příklad 2

Analýza sekvence aminokyselin a sekvence nukleotidů pro variabilní oblasti CH11

(2-1) Analýza N-terminální sekvence aminokyselin variabilních oblastí řetězce H a řetězce L CH11

a) Příprava CH11

Hybridom, produkující CH11, popsáný v příkladu 1, byl pěstován až do hustoty buněk 2×10^8 v prostředí ASF 104 (Ajinomoto) s obsahem 10 % objemových séra skotu (Gibco) a materiál se pak pěstuje v 50 ml prostředí ASF 104, prostého séra 5 dnů při teplotě 37°C . Po této době se kultura odstředí 15 minut při 4°C a při 15 000 g při použití rotoru č. 4 (Tommy Seiko) a supernatant se oddělí. Ze supernatantu se získá CH11 při použití dodané sestavy pro čištění protilátky, E-Z-Sep (Pharmacia Biotech).

b) Část čištěné CH11, odpovídající 100 mikrolitrům supernatantu ze stupně a) se přidá k 10 mikrolitrům 100 mM tris-HCl pufru o pH 6,8 s obsahem 10 % objemových beta-merkapt ethanolu a 4 g SDS na 100 ml. Výsledná směs se denaturuje tak, že se zahřeje na 5 minut na teplotu 95°C . Denaturovaný vzorek se pak podrobí elektroforéze na 12% polyakrylamidovém gelu. Po elektroforéze se gel uloží do pufru pro přenos s obsahem 25 mM kyseliny borité a tris o pH 9,5 s 10 % objemovými methanolem a pak se protřepává 15 minut při teplotě místnosti. Pásky pro bílkovinu se z gelu přenesou na membránu z polyvinyliden-difluoridu, PVDF (Nippon Millipore Ltd.) při použití příslušného přístroje k provedení blotu (Iwaki Glass Co. Ltd.) při konstantním proudu 0,2 A při 4°C v průběhu 1 hodiny. Po této době se membrána PVDF barví při použití roztoku modři Coomassie Brilliant s koncentrací 0,1 % hmotnostní a pak se odbarví 100% methanolem. Je možno pozorovat pouze dvě hlavní skvrny pro bílkovinu, odpovídající řetězci H a řetězci L. Tyto skvrny se vyříznou a gel s jejich obsahem se usuší při teplotě místnosti.

c) Sekvence aminokyselin bílkovin, přenesených na membránu PVDF ve stupni b) se analyzuje v plynné fázi při použití automatického analyzátoru PPSQ-10 (Shimadzu Corporation) při použití Edmanovy metody podle publikace Edman P. a další, 1967, Eur. J. Biochem., 1, str. 80 a následující. Takto byla analyzována N-terminální sekvence aminokyselin variabilní oblasti řetězce H v CH11 a také N-terminální sekvence aminokyselin řetězce L. Tyto sekvence jsou znázorněny jako sekvence SEQ OD NOs 13 a 14 v seznamu sekvencí.

(2-2) Analýza nukleotidové sekvence DNA

Úplná sekvence nukleotidů kódové cDNA pro variabilní oblasti řetězců H a L CH11 byla analyzována uložením do plasmidů pVH4 a pVL8 a analýzou uložených částí.

Vektor pCRII má promotorovou sekvenci SP6 a promotorovou sekvenci T7, každou na jedné straně uložené cDNA, takže je možno analyzovat sekvenci uložených částí pVH4 a pVL8 při použití zkonstruovaných oligonukleotidových primerů, které těmto sekvencím odpovídají (Perkin Elmer, Japonsko). Vzorky pro analýzu byly připraveny při použití těchto primerů a příslušné sestavy pro analýzu (Perkin Elmer, Japonsko). Jako matrice byla použita plasmidová DNA z plasmidů pVH4 nebo pVL8. Sekvence každé uložené cDNA byla analyzována při použití analyzátoru DNA model 373 (Perkin Elmer, Japonsko). Nukleotidová sekvence cDNA variabilní oblasti řetězce H je znázorněna jako SEQ ID č. 15, nukleotidová sekvence cDNA variabilní oblasti řetězce L je znázorněna jako SEQ ID č. 16.

Sekvence N-terminálních aminokyselin řetězce H CH11, představovaná aminokyselinami 1 až 15 sekvence SEQ ID č. 13 zcela odpovídá sekvenci aminokyselin, pro niž jsou kódovým řetězcem nukleotidy 32 až 76 sekvence SEQ ID č. 15. Je tedy možno uzavřít, že plasmid pVH4 obsahuje kódovou sekvenci pro variabilní oblast řetězce H CH11.

Sekvence N-terminálních aminokyselin řetězce L protilátky CH11, představovaná aminokyselinami 1 až 21 sekvence SEQ ID č. 14 zcela odpovídá sekvenci aminokyselin, pro niž jsou kódovým řetězcem nukleotidy 29 až 91 sekvence SEQ ID č. 16. Je tedy možno odvodit, že plasmid pVL8 obsahuje kódovou DNA pro variabilní oblast řetězce L protilátky CH11.

Referenční příklad 3

Klonování kódové DNA pro úplné řetězce H, L a J protilátky CH11

(3-1) Příprava banky cDNA

Banka cDNA byla připravena způsobem podle publikace Okayama H. a další, 1987, Methods in Enzymology, 154, 3-28. Postupuje se tak, že se 5 mikrogramů poly(A)⁺RNA, připravená podle příkladu 1-1(a) z hybridomu, produkujícího CH11 přidá ke 30 mikrolitrům reakční směsi, tvořené 50 mM tris-HCl o pH 8,3, 6 mM chloridu hořečnatého, 40 mM chloridu draselného, 2 mM dATP, 2 mM dGTP, 2 mM dCTP, 2 mM dTTP, 2 mikrogramy primeru vektoru, 3'-oligo(dT)-prodloužení, pcDV-1 (Pharmacia) s obsahem 25 jednotek reverzní transkriptázy (Seikagaku Kogyo, Co., Ltd.) odvozené od viru ptačí myeloblastosy, AMV. Výsledná směs se inkubuje 30 minut při teplotě 37 °C.

Po této době se přidá k reakční směsi ekvivalentní objem směsi fenolu a chloroformu v objemovém poměru 1 : 1 a reakční směs se důkladně promíchá. Výsledná směs se odstředí 5 minut při 10 000 g a vodná vrstva se oddělí (tento postup je označován jako extrakce fenol-chloroformem). K výsledné vodné vrstvě se přidá 35 mikrolitrů 4M octanu amonného a 140 mikrolitrů 100% ethanolu, výsledná směs se na 15 minut zchladí na -70 °C, načež se odstředí 15 minut

při 4 °C a při 10 000 g. Usazenina se pak promyje 75% roztokem ethanolu (% objemová) a pak se vysuší za sníženého tlaku.

Vysušená sraženina se pak rozpustí ve 13 mikrolitrech destilované vody, pak se přidá 5,6 mikrolitrů směsi pro reakci s terminální transferázou, která obsahuje 140 mM kakydylátu sodného, 30 mM tris-HCl o pH 6,8, 1 mM chloridu kobaltnatého, 0,5 mM DTT, 0,3 mikrogramů polyadenylové kyseliny polyA (Pharmacia) a 0,2 mM dCTP a výsledná reakční směs se inkubuje 5 minut při teplotě 37 °C. Pak se přidá 21 jednotek terminální deoxynukleotidyltransferázy (Pharmacia) podle návodu výrobce a reakce se nechá probíhat 5 minut. Pak se reakční směs podrobí extrakci fenol-chloroformem. K oddělené vodné vrstvě se pak přidá 20 mikrolitrů 4M octanu amonného a 80 mikrolitrů 100% ethanolu, směs se chladí 15 minut na teplotu -70 °C a pak se 15 minut odstředí při teplotě 4 °C a při 10 000 g. Usazenina se promyje roztokem ethanolu s koncentrací 75 % objemových a pak se suší za sníženého tlaku.

Sraženina DNA, získaná tímto způsobem rozpustí ve 30 mikrolitrech reakční směsi, která obsahuje 10 mM tris-HCl o pH 7,5, 60 mM chloridu sodného, 7 mM chloridu hořečnatého, přidá se 30 jednotek restrikčního enzymu HindIII. Obecně je možno uvést, že při použití restrikčního enzymu nemusí jít o žádný specifický pufr, je možno užít ten pufr, který je dodáván spolu s enzymem. V případě, že se DNA štěpí dvěma enzymy, provádí se toto štěpení postupně. Po prvním štěpení se DNA vysráží, znovu uvede do suspenze a pak se štěpí druhým enzymem. Srážení a znovuvvedení do suspenze je známý postup, popsáný ve svrchu uvedené publikaci Sambrook a další. Všechny restrikční enzymy a pufrы, použité v příkladové části, byly dodány Takara Schuzo.

DNA se štěpí přes noc při 37 °C v roztoku pro štěpení. Pak se reakční směs podrobí extrakci fenol-chloroformem. K oddělené vodné vrstvě se pak přidá 35 mikrolitrů 4M octanu amonného a 140 mikrolitrů 100% ethanolu a směs se 15 minut ochladí na -70 °C. Pak se směs odstředí 15 minut při 4 °C a při 10 000 g k usazení DNA, výsledná usazenina se promyje ethanolem s koncentrací 75 % objemových a pak se suší za sníženého tlaku. Takto připravená vysrážená DNA se užije při následujícím postupu jako vzorek cDNA.

Paralelně se rozštěpí plasmidová DNA z vektoru pCDL-SRalfa296 (Takebe Y. a další, 1989, Jikken Igaku, Experimental Medicine, 7, str. 95 až 99) působením restriktivního enzymu PstI. Produkt tohoto štěpení se zpracovává působením dGTP a terminální deoxynukleotidyltransferázy (Pharmacia) k navázání oligo dG na 3'-konec následujícím způsobem.

DNA plasmidu pCDL-SRakfa296 (100 mikrogramů v 50 mikrolitrech) se přidá k 10 mikrolitrům 10x pufru pro působení terminální deoxynukleotidyltransferázy, 1x pufr obsahuje 1,4 M kakodylátu sodného, 0,3 M tris-HCl o pH 7,6, 10 mikrolitrů 1 mM DTT, 20 mikrolitrů 0,1 mM ³H-dGTP (Dupont) a 10 mikrolitrů terminální tranferázy (210 mezinárodních jednotek, Pharmacia). Směs se inkubuje 40 minut při teplotě 37 °C a pak se smísí se stejným objemem pufru TE, nasyceného fenolem. Po určité době stání se vodná vrstva oddělí a podrobí extrakci fenol-chloroformem. Po ukončení extrakce fenolem i fenol-chloroformem se DNA vysráží při použití 100% ethanolu a pak se znovu uvede do suspenze v 50 mikrolitrech pufru TE.

Celé množství vysrážené DNA se štěpí restriktivním enzymem HindIII a produkty štěpení se dělí elektroforézou na 1,8% agarosovém gelu. Z gelu se vyřízne pás o 800 bp a materiál se z gelu extrahuje při použití sestavy GENE CLEAN (Fukunoshi) podle návodu výrobce. Výsledná DNA se rozpustí

ve 100 mikrolitrech pufru TE a přidá se 100 mikrolitrů 100% ethanolu. Výsledná koncentrace DNA je 0,09 mikrogramů/mikrolitr.

Výsledným produktem je spojovník-DNA, v němž je oligo (dG) navázán na promotor SRalfa, jak je znázorněno na obr. 1, který je schematickým znázorněním konstrukce banky cDNA pro klonování kódové DNA pro celou délku každé podjednotky protilátky CH11. Na obr. 2 je pak znázorněn diagram, z něž je zřejmý postup pro klonování a amplifikaci kódové DNA pro celou délku každé podjednotky protilátky CH11.

Vysrážený a usušený vzorek cDNA, připravený svrhu uvedeným způsobem se rozpustí v 10 mikrolitrech pufru TE, který obsahuje 10 mM tris-HCl o pH 7,5 a 1 mM EDTA. Pak se 1 mikrolitr výsledného roztoku přidá k reakčnímu pufru, obsahujícímu 10 mM tris-HCl o pH 7,5, 1 mM EDTA, 100 mM chloridu sodného a mimoto 0,08 pmol svrhu připraveného spojovníku-DNA. Výsledná směs se 5 minut zahřívá na 65 °C a pak se inkubuje 30 minut při teplotě 42 °C. Po této době se přidá 10 mikrolitrů 10x pufru pro ligázu, který obsahuje 10 mM ATP, 660 mM tris-HCl o pH 7,5, 66 mM chloridu hořečnatého, 10 mM DTT, mimoto se přidá ještě 76 mikrolitrů destilované vody a 1 mikrolitr 10 mM beta-nikotinamidadenindinukleotidu, NAD (Boehringer Mannheim) a výsledná směs se chladí v ledu 10 minut. Pak se přidá 8,4 mg DNA ligázy z E. coli (Pharmacia) a výsledná směs se inkubuje přes noc při teplotě 12 °C.

Po této inkubaci se k reakční směsi přidají 2 mikrolitry roztoku nukleotidů (2 mM dATP, 2 mM dCTP, 2 mM dGTP, 2 mM dTTP), 0,5 mikrolitrů 10 mM NAD, 42 mikrogramů DNA ligázy E. coli (Pharmacia), 4,1 jednotek DNA polymerázy I (Pharmacia) a 5,5 jednotek ribonukleázy H (Pharmacia). Výsledná směs se 1 hodinu inkubuje při teplotě 12 °C a pak

další 1 hodinu při teplotě 22 °C. Banka cDNA, připravená tímto způsobem se pak uloží až do použití při -20 °C.

(3-2) Klonování s použitím PCR

a) Příprava primeru

V případě řetězce H se sekvence aminokyselin variabilní oblasti řetězce H protilátky CH11, popsaná v příkladu 2, srovnává s databází sekvenční aminokyselin protilátky, připravenou podle publikace Kabat E. a další, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Vol. II, US Department of Health and Human Services. Bylo prokázáno, že řetězec H (u řetězce) protilátky CH11 patří do podskupiny 2A. Z tohoto důvodu byl oligonukleotidový primer zkonstruován tak, aby byl schopen hybridizace s částí 5'-nepřenášené oblasti kódové DNA pro myší řetězec H podskupiny 2a. Zvolený oligonukleotidový primer měl následující sekvenci SEQ ID č. 17, 5'-CTAAGGGAATTCGCTCTC CTCAGACACT GAA-3' (H5-1).

Byl také zkonstruován oligonukleotidový primer, schopný hybridizace s částí 3'-nepřenášené oblasti řetězce H protilátky CH11. Konstrukce tohoto oligonukleotidu byla založena na nukleotidové sekvenci kódové DNA pro konstantní oblast kódové DNA myšího imunoglobulinu M, popsané v publikaci Goldberg I. G. a dalším 1981, Gene, 15, 33 až 42, byla zvolena následující sekvence, SEQ ID č. 18 5'-TTTACTCTA GAGACCC-AAG GCCTGCCTGGTTGA-3' (H3-1).

V případě řetězce L se sekvence aminokyselin variabilní oblasti řetězce L protilátky CH11, popsaná v příkladu 2, srovnává s databází pro sekvenci aminokyselin protilátky podle svrchu uvedené publikace Kabat a další. Bylo prokázáno, že řetězec L protilátky CH11 náleží do podskupiny k2. Z tohoto důvodu byl zkonstruován oligonukleotidový primer, schopný

hybridizace s částí 5'-terminální nepřenášené oblasti kódové DNA pro myší řetězec L podskupiny k2. Byl vybrán oligonukleotidový primer s následující sekvencí SEQ ID č. 19: 5'-AAATAGAAT TCCAGTCTCC TCAGGCTGTC TCC-3' (L5-1).

Byl také připraven oligonukleotidový primer, schopný hybridizace s částí 3'-nepřenášené oblasti. Tento nukleotid byl svou konstrukcí založen na nukleotidové sekvenci kódové DNA pro konstantní oblast řetězce myšího imunoglobulinu k, registrovaného pod názvem MUSIGB1L1 (přírůstkové číslo D14630). Byla zvolena sekvence oligonukleotidu SEQ ID č. 20: 5'-ATGATCTCTA GAGTGGTGGC ATCTCAGGAC CT-3' (L3-1).

V případě řetězce J není přítomna variabilní oblast a kódová DNA pro řetězec J i sekvence aminokyselin řetězce J jsou známy z publikace Cann G. M. a další, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6656 až 6660. Na základě známých údajů byly syntetizovány oligonukleotidové primery, schopné hybridizace s částí nepřenášených oblastí 5' a 3' kódové DNA pro řetězec J. Byly zvoleny oligonukleotidy s řetězcem SEQ ID č. 21: 5'-TTGCGGAATT CCTCACCTGT CCTGGGGTTA TT-3' (J5-1) a SEQ ID č. 22: 5'-ATTGCCTCTA GAGCCTCTAA GGACAACGAC CT-3' (J3-1) ze seznamu sekvencí.

Uvedené oligonukleotidové primery byly syntetizovány při použití syntetizátoru 380 B (Perkin Elmer, Japonsko) pro automatickou syntézu DNA fosfoamiditovou metodou podle publikace Matrucci M. D. a Caruthers M. H., 1981, J. Am. Chem. Soc., 103, 3185 až 3191. Po ukončení syntézy byl každý primer odštěpen od nosiče a zbaven ochranných skupin a pak byl lyofilizován. Výsledný produkt byl rozpuštěn v destilované vodě a pak byl až do použití uložen při -20 °C.

b) Amplifikace cílového genu pomocí PCR

Byl připraven reakční roztok k provedení PCR, obsahující 10 mM tris-HCl o pH 8,3, 50 mM chloridu draselného, 1,5 mM chloridu hořečnatého, 2,5 mM dATP, 2,5 mM dGTP, 2,5 mM dCTP, 2,4 mM dTTP a mimoto 0,1 mikrolitru banky cDNA, popsané v příkladu 3-1, jedna jednotka Taq DNA polymerázy (Perkin Elmer, Japonsko) a 15 pmol oligonukleotidového primeru, připraveného v příkladu 3-2a, užije se celkem 100 mikrolitrů reakčního roztoku pro PCR, směs se zahřívá 2 minuty na 94 °C a pak se směs podrobí cyklu vždy 1 minuta při 94 °C, pak 1 minuta při 55 °C a 2 minuty při 72 °C. Tento cyklus se opakuje 30x. Po posledním cyklu se roztok udržuje ještě 10 minut na teplotě 72 °C.

Dále jsou uvedeny kombinace primerů, které byly užity při uvedených reakcích:

- H5-1 a H3-1 pro řetězec H,
- L5-1 a L3-1 pro řetězec L a
- J5-1 a J3-1 pro řetězec J.

c) Analýza produktu PCR

Po uskutečnění PCR ve stupni b) byl podíl reakční směsi analyzován elektroforézou na 0,8% agarosovém gelu v případě řetězce H. Pro řetězce L a J byl použit 1,5% agarosový gel (agarosa byla získána od FMC Bioproducts). Produkt reakce PCR byl uložen v pásu o přibližně 1900 bp v případě řetězce H, 800 bp v případě řetězce L a 650 bp v případě řetězce J. Rozměry jednotlivých pásů byly určeny při použití značení pro molekulovou hmotnost na tomtéž gelu.

d) Klonování produktu PCR

Každý z produktů PCR, získaný v odstavci b) byl uložen do vektoru typu plasmidu při použití sestavy TA pro klonování eukaryotů (Invitrogen). Postup byl prováděn tak, že bylo přidáno 60 ng vektoru pCR3 ze sestavy spolu se 4 jednotkami T4 DNA ligázy do pufru pro ligázu, obsahujícího 6 mM tris-HCl o pH 7,5, 6 mM chloridu hořečnatého, 5 mM chloridu sodného, 7 mM beta-merkapt ethanolu, 0,1 mM ATP, 2 mM DTT, 1 mM spermidinu a 0,1 mg/ml sérového albuminu skotu, mimoto směs obsahovala podíl reakční směsi po provedení PCR. Objem podílu reakční směsi po PCR byl zvolen tak, aby obsahoval přibližně 10 ng požadovaného produktu PCR po stanovení elektroforézou na gelu. Výsledná směs byla inkubována 15 hodin při teplotě 14 °C.

Podíl 2 mikrolitry směsi po reakci s ligázou byl smísen s 50 mikrolitry buněk *E. coli*, kmen TOP10F' ze sestavy, materiál byl předem zpracován tak, aby byl kompetentní přidáním 2 mikrolitrů 0,5 M beta-merkapt ethanolu. Výsledná směs byla uložena do ledu na 30 minut, pak byla zahřáta na 30 sekund na 42 °C, znovu uložena na 2 minuty do ledu a pak bylo ke směsi přidáno 500 mikrolitrů svrchu popsaného prostředí SOC a výsledná směs byla pěstována při teplotě 37 °C po dobu 1 hodiny na rotační třepačce se 110 ot/min. Živné prostředí pak bylo naneseno na agarové plotny s L-bujonem, obsahující 100 mikrogramů/ml ampicilinu a kultury byly pěstovány přes noc při teplotě 37 °C. Kolonie, které byly odolné proti ampicilinu, byly přenasy platinovou kličkou do 5 ml L-bujonu s obsahem 100 mikrogramů/ml ampicilinu a byly pěstovány přes noc při 37 °C. Pak byly kultury odstředěny k usazení buněk, které pak byly použity pro přípravu DNA plasmidu rozrušením v alkalickém prostředí podle svrchu uvedené publikace Sambrook a další.

Tři z výsledných plasmidů byly označeny pCR3-H123 (plasmid s obsahem kódové cDNA pro řetězec H), pCR3-L103 (plasmid, obsahující kódovou cDNA pro řetězec L) a pCR3-J1123 (plasmid, obsahující kódovou cDNA pro řetězec J). Kompetentní buňky *E. coli*, kmen DH5alfa (Gibco), byly transformovány vždy jedním ze svrchu uvedených plasmidů a výsledné transformanty byly uloženy podle budapeštské úmluvy do veřejné sbírky kultur Research Institute of Life Science and Technology of the Agency of Industrial Science and Technology dne 28. února 1996 pod čísly FERM BP-5427, FERM BP-5428 a FERM BP-5429. Z těchto kmenů je možno snadno připravit kódovou DNA pro řetězce H, L a J protilátky CH11.

Referenční příklad 4

Určení úplné nukleotidové sekvence kódové cDNA pro řetězce L, H a J protilátky CH11

(4-1) Stanovení nukleotidové sekvence DNA

Řetězec myšího imunoglobulinu M je tvořen N-terminální variabilní oblastí, obsahující přibližně 110 zbytků a konstantní oblastí, obsahující přibližně 470 zbytků, navazující na variabilní oblast. Řetězec k myšího imunoglobulinu je tvořen N-terminální variabilní oblastí, obsahující přibližně 110 zbytků a konstantní oblastí, obsahující 107 zbytků a navazující na variabilní oblast. Bylo předpokládáno, že úplná nukleotidová sekvence kódové cDNA pro řetězec H a L protilátky CH11 bude tvořena kódovými nukleotidovými sekvencemi pro známé konstantní oblasti, vázanými na kódové nukleotidové sekvence pro variabilní oblasti těchto řetězců, jak bylo uvedeno v příkladu 2 a ve svrchu uvedené publikaci Kabat E.A. a další.

Bylo předpokládáno, že kódová nukleotidová sekvence pro řetězec J protilátky CH11 je totožná se známou sekvencí pro tento řetězec.

Na základě předpokládaných nukleotidových sekvencí byly syntetizovány oligonukleotidové primery v délce 20 nukleotidů, odpovídající sekvencím řetězců H, L a J, oddělené kódovými intervaly s délkou 60 až 200 bp. Tyto primery pak byly použity pro analýzu sekvence.

Syntetizované oligonukleotidové primery měly následující sekvence:

Pro řetězec H:

5'-TGGGGCCTCA GTGAAGATAT -3' (SHF-2; SEQ ID č. 23
5'-CAATGGTGGT ACTGGCTACA -3' (SHF-3; SEQ ID č. 24
5'-TGACATCTGA GGACTCTGCA -3' (SHF-4; SEQ ID č. 25
5'-TCCTCAGAGA GTCAGTCCTT -3' (SHF-6; SEQ ID č. 26
5'-TCCTTCACCT GGAACCTACCA -3' (SHF-7; SEQ ID č. 27
5'-TCCCAAGAGC ATCCTTGAAG -3' (SHF-8; SEQ ID č. 28
5'-AGATCTGCAT GTGCCCATTG -3' (SHF-9; SEQ ID č. 29
5'-TCTAAACTCA TCTGCGAGGC -3' (SHF-10; SEQ ID č. 30
5'-GGTGACCATC GAGAACAAAG -3' (SHF-11; SEQ ID č. 31
5'-AGGGGTCTCA CCTTCTTGAA -3' (SHF-12; SEQ ID č. 32
5'-TCCTTTGCCG ACATCTTCCT -3' (SHF-13; SEQ ID č. 33
5'-GTGTGTACTG TGAATCACAG -3' (SHF-15; SEQ ID č. 34
5'-AACTGAACCT GAGGGAGTCA -3' (SHF-16; SEQ ID č. 35
5'-AACTCTTGCC CCAAGAGAAG -3' (SHF-17; SEQ ID č. 36
5'-ATCCTGACTG TGACAGAGGA -3' (SHF-18; SEQ ID č. 37
5'-ACAAGTCCAC TGGTAAACCC -3' (SHF-19; SEQ ID č. 38

5'-AGGATATCTT CACTGAGGCC -3' (SHR-1; SEQ ID č. 39
5'-ATCCACTCAA GGCTCTTTCC -3' (SHR-2; SEQ ID č. 40
5'-ACTGCAGAGT CCTCAGATGT -3' (SHR-3; SEQ ID č. 41
5'-AGACGGTGAC TGAGGTTCTT -3' (SHR-4; SEQ ID č. 42
5'-CAGGTGAAGG AAATGGTGCT -3' (SHR-5; SEQ ID č. 43
5'-ATGCTCTTGG GAGACAGCAA -3' (SHR-6; SEQ ID č. 44
5'-CTCTGTTTTT GCCTCCGTAG -3' (SHR-7; SEQ ID č. 45
5'-TGGCCTCGCA GATGAGTTTA -3' (SHR-8; SEQ ID č. 46
5'-CCTTTGTTCT CGATGGTCAC -3' (SHR-9; SEQ ID č. 47
5'-TGTGGAGGAC ACGTTCTTCA -3' (SHR-10; SEQ ID č. 48
5'-ACTTTGAGAA GCCCAGGAGA -3' (SHR-12; SEQ ID č. 49
5'-AGATCCCTGT GAGTCACAGT -3' (SHR-13; SEQ ID č. 50
5'-AGCAGGTGGA TGTTTGTGCA -3' (SHR-14; SEQ ID č. 51
5'-TGAAGCCACT GCACACTGAT -3' (SHR-15; SEQ ID č. 52
5'-AGTTCCATTC CTCCTCTGTC -3' (SHR-16; SEQ ID č. 53
5'-TGTGTCAGAC ATGATCAGGG -3' (SHR-18; SEQ ID č. 54

Pro řetězec L:

5'-TGAAGTTGCC TGTTAGGCTG -3' (SLF-1; SEQ ID č. 55
5'-CTTGAGATC AAGCCTCCAT -3' (SLF-2; SEQ ID č. 56
5'-GCTGAGGATC TGGGAGTTTA -3' (SLF-3; SEQ ID č. 57
5'-GATGCTGCAC CAACTGTATC -3' (SLF-4; SEQ ID č. 58
5'-CGACAAAATG GCGTCCTGAA -3' (SLF-5; SEQ ID č. 59
5'-ACGTTGACCA AGGACGAGTA -3' (SLF-6; SEQ ID č. 60
5'-ATCTGCAAGA GATGGAGGCT -3' (SLR-2; SEQ ID č. 61
5'-ACCCCAGAAA ATCGGTTGGA -3' (SLR-3; SEQ ID č. 62
5'-CCGGAGGAAC ATGTGTA CTT -3' (SLR-4; SEQ ID č. 63
5'-TCGTTCATAC TCGTCCTTGG -3' (SLR-6; SEQ ID č. 64
5'-CATCTCAGGA CCTTTGTCTC -3' (SLR-7; SEQ ID č. 65

Pro řetězec J:

5'-CACCTGTCCT GGGGTTATTT -3' (SJF-1; SEQ ID č. 66
 5'-AGACAAGATG AAGACCCACC -3' (SJF-2; SEQ ID č. 67
 5'-AAGCGACCAT TCTTGCTGAC -3' (SJF-3; SEQ ID č. 68
 5'-ATATCTCTGA TCCCACCTCC -3' (SJF-8; SEQ ID č. 69
 5'-GAAATGCGAT CCTGTGGAAG -3' (SJF-5; SEQ ID č. 70
 5'-CTATAACCACT ATGGTCCCAC -3' (SJF-6; SEQ ID č. 71
 5'-AGAAGCAGGT GGGTCTTCAT -3' (SJR-2; SEQ ID č. 72
 5'-TAGAGGTAAC TCGGGTACAC -3' (SJR-3; SEQ ID č. 73
 5'-AAGTTCCTTC TCAGTGGGGA -3' (SJR-8; SEQ ID č. 74
 5'-GGTGGCAGTA ACAACCTGAT -3' (SJR-5; SEQ ID č. 75
 5'-CATGATACCT AAGTGGGACC -3' (SJR-6; SEQ ID č. 76

Každý z oligonukleotidových primerů byl syntetizován fosfoamiditovou metodou při použití automatického syntetizátoru DNA model 380B (Perkin Elmer, Japonsko). Vzorky pro analýzu sekvence řetězce H byly připraveny při použití DNA z plasmidu pCR3-H123. Vzorky pro analýzu sekvence řetězce L byly připraveny při použití DNA z plasmidu pCR3-L103. Vzorky pro analýzu sekvence pro řetězec J byly připraveny při použití DNA z plasmidu pCR3-J1123. PCR-reakce byla prováděna při použití dodávané sestavy Prism Ready Reaction Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer, Japonsko) následujícím způsobem:

~~1,5 mikrogramů plasmidu pCR3-H123 a 4,8 pmol primeru~~
 SHF-2 se smísí na výsledný objem 16 mikrolitrů v destilované vodě. Podíl 9,5 mikrolitrů směsi plasmidu a primeru se smísí s 10,5 mikrolitrů předběžné směsi s obsahem Taq DNA polymerázy podle návodu výrobce sestavy. Výsledná směs se vloží do automatického reaktoru Catalyst (Perkin Elmer, Japonsko). Byl použit reakční cyklus 30 sekund 95 °C, 15 sekund 50 °C a 4 minuty 60 °C, celkem 25x.

Po ukončení reakčních cyklů se přidá 8 mikrolitrů sterilizované vody a DNA ve výsledné směsi se dvakrát extrahuje fenol-chloroformem. Oddělená vodná vrstva se smísí s 15 mikrolitry 2M octanu sodného a 300 mikrolitry 100% ethanolu a pak se směs odstředí k usazení sraženiny. Sraženina se promyje ethanolem o koncentraci 70 % objemových a pak se suší za sníženého tlaku, načež se rozpustí ve 3 mikrolitrech roztoku pro vzorek s obsahem 4 mikrolitrů 0,25 M EDTA, 100 mikrolitrů formamidu a 15 mikrolitrů sterilizované vody.

Analýza sekvence byla provedena na automatickém zařízení Model 373A (Perkin Elmer, Japonsko) pro 32 primerů pro řetězec H, 11 primerů pro řetězec L a 11 primerů pro řetězec J.

Údaje o sekvenci pro každý primer byly spojeny a integrovány tak, aby bylo možno určit úplnou nukleotidovou sekvenci řetězců H, L a J protilátky CH11. Uložená sekvence cDNA v plasmidu je znázorněna sekvencemi SEQ ID č. 7, 9 a 11. Sekvence aminokyselin, odpovídající těmto nukleotidovým sekvencím jsou uvedeny jako SEQ ID č. 8, 10 a 12.

(4-2) Primární struktura řetězce H protilátky CH11

Bylo prokázáno, že nukleotidová sekvence variabilní oblasti řetězce H, znázorněná jako nukleotidy 32 až 379 v SEQ ID č. 15 je totožná s nukleotidovou sekvencí 58 až 405 v SEQ ID č. 7.

Sekvence aminokyselin 117 až 571 ze SEQ ID č. 8 je totožná se sekvencí aminokyselin konstantní oblasti řetězce H, odvozenou od myšího IgM při srovnání s databází sekvencí aminokyselin protilátek podle svrchu uvedené publikace Kabat E. A. a další.

Bylo uzavřeno, že sekvence aminokyselin -19 až -1 v SEQ ID č. 8 je signální sekvencí řetězce H z CH11.

Sekvence nukleotidů 406 až 1770 v SEQ ID č. 7 je totožná s konstantní oblastí řetězce H myšího IgM.

Na základě těchto výsledků bylo možno zkonstruovat celkovou sekvenci nukleotidů a také úplnou sekvenci aminokyselin.

(4-3) Primární struktura řetězce L protilátky CH11

Bylo prokázáno, že nukleotizová sekvence pro variabilní oblast řetězce L, nukleotidy 29 až 364 v SEQ ID č. 16 je totožná se sekvencí nukleotidů 58 až 393 v SEQ ID č. 9.

Bylo rovněž prokázáno, že sekvence aminokyselin 113 až 219 v SEQ ID č. 10 je totožná se sekvencí aminokyselin konstantní oblasti řetězce kL myši při srovnávání s Kabatovou databází sekvencí aminokyselin v protilátkách.

Bylo uzavřeno, že sekvence aminokyselin -19 až -1 v SEQ ID č. 10 je signální sekvencí řetězce L.

Bylo rovněž prokázáno, že sekvence nukleotidů 394 až 714 v SEQ ID č. 9 je zcela totožná se sekvencí nukleotidů pro konstantní oblast řetězce kL myši.

Na základě těchto výsledků bylo možno zkonstruovat úplnou sekvenci nukleotidů a také úplnou sekvenci aminokyselin pro řetězec L.

(4-4) Primární struktura řetězce J protilátky CH11

Sekvence aminokyselin 1 až 137 v SEQ ID č. 12 byla srovnávána s databází sekvence aminokyselin v protilátkách a bylo prokázáno, že je totožná se známým řetězcem J myši.

Nukleotidová sekvence 67 až 477 v SEQ ID č. 11 je totožná s nukleotidovou sekvencí známého řetězce J myši.

Sekvence aminokyselin -22 až -1 v SEQ ID č. 12 je signální sekvencí řetězce J protilátky CH11.

Na základě těchto výsledků bylo možno zkonstruovat úplnou sekvenci nukleotidů a také úplnou sekvenci aminokyselin pro řetězec J.

(4-5) Stanovení oblastí pro určení komplementarity, CDR

Poloha a sekvence aminokyselin každé CDR ve variabilních oblastech řetězců H a L protilátky CH11, stanovené svrchu uvedeným způsobem byly identifikovány srovnáním se svrchu uvedenou Kabatovou databází pro sekvence aminokyselin v protilátkách. Tato databáze prokazuje, že délka sekvence aminokyselin v rámcové oblasti variabilní oblasti je u různých protilátek v podstatě stálá za předpokladu, že běží o protilátky téhož podtypu a za předpokladu, že sekvence aminokyselin mají některé společné vlastnosti. Avšak oblasti CDR, uložené mezi rámcovými oblastmi mají sekvence, které jsou pro každou protilátku specifické.

Pro srovnání je možno uvést, že sekvence aminokyselin variabilní oblasti řetězce H protilátky CH11 a sekvence CDR řetězce H protilátky CH11 myšího podtypu μ_2 jsou reprezentovány aminokyselinami č. 31 až 35 v SEQ ID č. 8 (CDRH₁,

odpovídá SEQ ID č. 1), 50 až 66 v SEQ ID č. 8 (CDRH₂, odpovídá SEQ ID č. 2) a 99 až 105 v SEQ ID č. 8 (CDRH₃, odpovídá SEQ ID č. 3).

V případě srovnávání sekvence aminokyselin variabilní oblasti řetězce L protilátky CH11 se sekvencí myšího podtypu k2 bylo prokázáno, že CDR řetězce L je representována aminokyselinami 24 až 39 v SEQ ID č. 10 (CDRL₁, odpovídá SEQ ID č. 4), 55 až 61 v SEQ ID č. 10 (CDRL₂, odpovídá SEQ ID č. 5) a 94 až 102 v SEQ ID č. 10 (CDRL₃, odpovídá SEQ ID č. 6).

Příklad 1

Modelování molekul variabilní oblasti protilátky CH11

Modelování molekul v různých variabilních oblastech protilátky CH11 bylo prováděno postupem na základě homologie podle publikace Andrew a další, 1991, Methods in Anzymology, 203, str. 121 až 153.

Primární sekvence variabilních oblastí lidských imunoglobulinů, pro něž bylo pomocí rtg-paprsků stanovena krystalická struktura jsou registrovány ve sbírce Protein Data Bank (dále uváděna jako PDB, Chemistry Department, Building 555, Brookhaven National Laboratory, P. O. Box 5000, Upton, NY 11973-5000, USA). Sekvence, obsažené v této sbírce byly srovnávány se sekvencemi rámcových oblastí protilátky CH11. Bylo prokázáno, že dva lidské imunoglobuliny, 1NBV a 1IGI mají nejvyšší stupeň homologie s řetězcem L a H protilátky CH11.

Model trojrozměrné struktury rámcových oblastí protilátky CH11 byl zkonstruován na bázi známé struktury těchto lidských rámcových oblastí. Model je označován jako "model rámcových oblastí".

Oblasti CDR protilátky CH11 byly klasifikovány při použití metody podle publikace Chothia a další, J. Mol. Biol., 1987, 196, 901 až 917. Při použití tohoto postupu byla CDRL₁ klasifikována do kanonické skupiny 4, CDRL₂ do kanonické skupiny 1, CDRL₃ do kanonické skupiny 1 a CDRH₁ do kanonické skupiny 1. CDRH₂ a CDRH₃ neodpovídaly žádné definované kanonické skupině. Smyčky v CDRL₁, CDRL₂, CDRL₃ a CDRH₁ odpovídaly uvedeným kanonickým skupinám a byly integrovány do modelu rámcových oblastí.

Identifikace CDRH₂ a CDRH₃ byla provedena tak, že nejprve byly v PDB identifikovány sekvence s nejvyšší homologií s těmito skupinami CDR. Pak bylo stanoveno, do jaké míry odpovídají oblasti CDRH₂ a CDRH₃ těmito sekvencím s nejvyšší homologií. Pak byla vypočítána energetická náročnost a byly zkonstruovány nejpravděpodobnější smyčky CDR, které pak byly integrovány do modelu rámcových oblastí. Pak byly znovu provedeny energetické výpočty tak, aby bylo možno vyřadit jakýkoliv energeticky nepříznivý vliv mezi atomy a bylo možno získat molekulový model protilátky CH11. Svrchu uvedený postup byl prováděn při použití softwaru AbM pro modelování molekul (Oxford Molecular Limited, Inc.).

Přesnost struktury molekulárního modelu, získaného tímto způsobem byla vyhodnocena při použití softwaru PROCHECK podle publikace Laskowski R. A. J., 1993, Appl. Cryst., 26, 283 až 291. Stupeň expozice povrchu byl pro každý zbytek vypočítán způsobem podle publikace Lee B. a Richards F. M., J. Mol. Biol., 1971, 55, 379 až 400, takže bylo možno stanovit stupeň kontaktu mezi atomy.

Příklad 2

Selekce akceptorů

Sekvence řetězců H a L protilátky CH11 byla srovnávána s analogickou sekvencí odpovídajících podskupin lidských protilátek. Bylo prokázáno, že řetězec L protilátky CH11 je z 83 % totožný s řetězcem lidské podskupiny kappa II a řetězec H protilátky CH11 je ze 74 % totožný s řetězcem lidské podskupiny I. Lidské protilátky RPMI6410'CL (podskupina kII) a 21.28'CL (podskupina I) byly vybrány jako akceptorové molekuly pro řetězce L a H na bazi homologie sekvence.

Příklad 3

Selekce zbytků protilátky CH11 jako donoru pro naroubování do akceptoru.

Jednotlivé polohy sekvence aminokyselin v řetězcích H a L protilátky CH11 byly srovnávány s polohami molekuly akceptoru při použití softwaru Cameleon (Oxford Molecular Limited, Inc.). Humanizované sekvence byly zkonstruovány podle svrhu uvedených kritérií a) a d). Byly zkonstruovány čtyři sekvence pro lehký řetězec a dvě sekvence těžkého řetězce, které vytvořily základ pro přípravu humanizovaných protilátek proti lidskému Fas. Tyto sekvence aminokyselin a odpovídající kódové nukleotidové sekvence pro tyto bílkoviny budou nyní dále uvedeny.

Řetězce L (k řetězce)

polypeptid VL-KY, SEQ ID č. 78 a odpovídající kódová sekvence DNA, SEQ ID č. 77,

polypeptid VL-KF, SEQ ID č. 80 a odpovídající kódová sekvence DNA, SEQ ID č. 79,

polypeptid VL-RA, SEQ ID č. 82 a odpovídající kódová sekvence DNA, SEQ ID č. 81 a

polypeptid VL-RF, SEQ ID č. 74 a odpovídající kódová sekvence DNA, SEQ ID č. 83.

Řetězce H (u řetězce)

polypeptid H_uH, SEQ ID č. 86 a odpovídající kódová sekvence DNA, SEQ ID č. 85 a

polypeptid H_uM, SEQ ID č. 88 a odpovídající kódová sekvence DNA, SEQ ID č. 87.

Příklad 4

Klonování a analýza úplného kódového řetězce DNA pro úplné lidské řetězce H a L (s podskupinami I a II ve variabilních oblastech)

1) Příprava primerů

a) Řetězec H

Sekvence aminokyselin variabilní oblasti řetězce H myší monoklonální protilátky CH11, SEQ ID č. 89 byla srovnávána s databází sekvencí aminokyselin pro protilátky podle svrhu uvedené publikace Kabat E. A. a další, tak, aby bylo možno identifikovat jakékoliv homologní sekvence. Bylo prokázáno, že sekvence aminokyselin rámcových oblastí variabilní oblasti řetězce H protilátky CH11 je homologní s řetězcem H lidské protilátky podskupiny I. Byl tedy syntetizován oligonukleotidový primer

HVHI5-1, SEQ ID č. 90,

tento primer hybridizuje s částí 5'-nepřenášené oblasti kódové DNA pro řetězec H lidského imunoglobulinu podskupiny I v databázi.

Kódová nukleotidová sekvence DNA pro konstantní oblasti řetězce H lidského imunoglobulinu byla popsána v publikaci Dorai a Gillies, 1989, Nucleic Acids Res., 17, 6412. Na základě těchto poznatků byl syntetizován oligonukleotidový primer

HC_u3-1, SEQ ID č. 91,

tento primer hybridizuje s částí nukleotidové sekvence 3'-nepřenášené oblasti.

b) Řetězec L

Sekvence aminokyselin variabilní oblasti řetězce L myší monoklonální protilátky CH11, SEQ ID č. 92 byla srovnávána se sekvencí aminokyselin pro protilátky v databázi podle svrchu uvedené publikace Kabat a další, aby bylo možno identifikovat jakékoliv homologní sekvence. Bylo prokázáno, že sekvence aminokyselin rámcové oblasti variabilní oblasti řetězce L protilátky CH11 je homologní s řetězcem L lidské protilátky podskupiny II. Byl tedy zkonstruován oligonukleotidový primer

HVK II5-4, SEQ ID č. 93

tento primer hybridizuje s částí 5'-nepřenášené oblasti kódové DNA pro řetězec lidského imunoglobulinu L podskupiny II v databázi.

Kódový nukleotidový řetězec DNA pro konstantní oblast řetězce L lidského imunoglobulinu byl popsán v publikaci

Hieter P. A. a další, 1980, Cell, 22, str. 197 a následující. Na základě těchto znalostí byl zkonstruován oligonukleotidový primer

HKCL3-3, SEQ ID č. 94,

tento primer hybridizuje s částí 3'-nepřenášené oblasti DNA.

Všechny svrchu uvedené oligonukleotidové primery byly syntetizovány fosfoamidotovou metodou podle publikace Mattrucci M. D. a Caruthers M. H., 1981, J. Am. Chem. Soc., 103, str. 3185 a následující při použití zařízení pro automatickou syntézu DNA Model 380B (Perkin Elmer, Japonsko). Po ukončení přípravy byl každý primer oddělen od nosiče, zbaven ochranných skupin a pak lyofilizován. Primery byly rozpuštěny ve 100 mikrolitrech destilované vody a pak uloženy při teplotě -20°C až do použití.

2) Amplifikace cílového genu při použití PCR

Řetězec H

Kódový fragment DNA pro řetězec H lidského IgM byl amplifikován a izolován při použití PCR. Jako výchozí zdroj DNA byla použita banka cDNA lidských lymfocytů.

Dále uvedený reakční roztok byl nejprve zahříván 2 minuty na 94°C . Pak byl vzorek zahříván při použití cyklu 1 minuta při 94°C , 1 minuta při 55°C a 2 minuty při 72°C . Tento cyklus byl 30x opakován. Pak byl reakční roztok inkubován 10 minut při teplotě 72°C .

Složení reakčního roztoku:

Banka cDNA lidských lymfocytů (Life Technologies), 25 ng,

oligonukleotidový primer HVHI5-1, 50 pmol,
oligonukleotidový primer CH_u3-1, 50 pmol,
směs 25 mM dNTP, 10 mikrolitrů,
100 mM tris-HCl pufru o pH 8,5, 10 mikrolitrů,
1 M chlorid draselný, 5 mikrolitrů,
25 mM chloridu hořečnatého, 10 mikrolitrů,
Taq DNA polymeráza (Perkin Elmer, Japonsko), 1 jednotka.

Celkový objem byl upraven na konečný objem 100 mikrolitrů přidáním redestilované vody. Směs 25 mM dNTP je směs deoxynukleotidtrifosfátu, která obsahuje deoxyadenosintrifosfát dATP, deoxycytosintrifosfát dCTP, deoxyguanosintrifosfát dGTP a deoxythymidintrifosfát dTTP, každá z těchto látek je přítomna v koncentraci 25 mM.

Řetězec L

Kódový fragment DNA pro řetězec L lidského IgM byl amplifikován a izolován při použití PCR. Jako výchozí zdroj cDNA byla použita banka lidských lymfocytů.

Reakční roztok byl nejprve zahřát na 2 minuty na 94 °C. Pak byl vzorek zahříván při použití cyklu 1 minuta při 94 °C, 1 minuta při 55 °C a 2 minuty při 72 °C. Tento cyklus byl 30x opakován. Pak byl reakční roztok inkubován 10 minut při teplotě 72 °C.

Složení reakčního roztoku:

banka cDNA lidských lymfocytů (Life Technologies), 25 ng,
oligonukleotidový primer HVKII5-4, 50 pmol,
oligonukleotidový primer HKCL3-3, 50 pmol,
směs 25 mM dNTP, 10 mikrolitrů,

100 mM tris-HCl pufr o pH 8,5, 10 mikrolitrů,
1 M chlorid draselný, 5 mikrolitrů,
25 mM chlorid hořečnatý, 10 mikrolitrů,
Taq DNA polymeráza (Perkin Elmer, Japonsko), 1 jednotka.

Celkový objem reakčního roztoku byl upraven na konečný objem 100 mikrolitrů přidáním redestilované vody.

3) Zkouška na přítomnost produktů PCR

Po PCR amplifikaci se produkty každé reakce analyzují elektroforézou na agarozovém gelu. Podíly každého reakčního roztoku, popsaného v odstavci 2) svrchu, odpovídající 200 ng DNA se podrobí elektroforéze na 0,8% agarozovém gelu. Rozměr produktu PCR se stanoví podle pohyblivosti pásů molekulového značení, toto značení probíhá současně s postupem vzorku. Bylo prokázáno, že fragment řetězce H lidského imunoglobulinu má velikost přibližně 2000 párů bazí, bp, řetězec L lidského imunoglobulinu má velikost přibližně 800 bp.

4) Klonování produktů PCR

Každý z produktů PCR, získaných v odstavci 3) se naváže na vektor typu plasmidu při použití klonovací sestavy TA pro eukaryotické organismy (Invitrogen).

Postupuje se tak, že se 60 ng plasmidu pCR3 ze sestavy a 4 jednotky T4 DNA ligázy přidají k pufru pro reakci s ligázou, který obsahuje 6 mM tris-HCl o pH 7,5, 6 mM chloridu hořečnatého, 5 mM chloridu sodného, 7 mM beta-merkapt ethanolu, 0,1 mM ATP, 2 mM DTT, 1 mM spermidinu a 0,1 mg/ml sérového albuminu skotu, mimoto se k reakčnímu pufru přidá ještě podíl

reakční směsi po provedení PCR. Objem tohoto podílu se volí tak, aby obsahoval 10 ng požadovaného produktu PCR. Výsledná směs se inkubuje 15 hodin při teplotě 14 °C.

Podíl 2 mikrolitry reakční směsi s ligázou se smísí s 50 mikrolitry buněk *E. coli*, kmen TOP 10F' ze sestavy, tento kmen byl předem učiněn kompetentním přidáním 2 mikrolitrů 0,5 M beta-merkapt ethanolu. Výsledná směs se udržuje 30 minut v ledu. Pak se přidá 500 mikrolitrů prostředí SOC ze sestavy a výsledná směs se inkubuje za protřepávání 1 hodinu při teplotě 37 °C. Pak se živné prostředí nanese spolu s buňčným materiálem na agarové plotny s L-bujonem, obsahující 1 g bacto tryptonu (Difco), 0,5 g extraktu z kvasnic (Difco), 0,1 g glukosy, 0,5 g chloridu sodného, 1,2 g bacto-agaru (Difco) na 100 ml a mimoto 100 mikrogramů/ml ampicilinu a pak se kultury inkubují přes noc při teplotě 37 °C.

Kolonie, odolné proti působení ampicilinu, které na živném prostředí vyrostou, se oddělí pomocí platinové klíčky a jednotlivě se pak pěstují v 5 ml kapalného L-bujonu, obsahujícího 1 g bacto tryptonu (Difco), 0,5 g extraktu z kvasnic (Difco) a 0,5 g NaCl na 100 ml a mimoto 100 mikrogramů/ml ampicilinu za protřepávání přes noc při teplotě 37 °C. Kultury se pak odstředí k oddělení buněk, z nichž se připraví plasmidová DNA rozrušením buněk v alkalickém prostředí podle svrchu uvedené publikace Sambrook J. a další.

Pak se 1 mikrogram DNA plasmidu, připravené tímto způsobem rozštěpí působením restrikčního enzymu EcoRI při použití pufru dodávaného spolu s enzymem. Všechny štěpné reakce jsou prováděny v pufru, který se dodává spolu s příslušným enzymem (Takara Shuzo). V případě dvojího štěpení se užije pufr, kompatibilní s oběma restrikčními enzymy. Produkty štěpení se oddělí elektroforézou na 0,8% agarosovém gelu.

Byly identifikovány plasmidy, obsahující uloženou DNA o velikosti přibližně 2000 bp a 800 bp, což odpovídá lidským řetězcům H a L imunoglobulinu, velikost fragmentů byla zjištěna srovnáváním se značením pro molekulovou hmotnost na tomtéž gelu. Plasmidy s obsahem těchto fragmentů byly odděleny.

Šlo zvláště o následující dva plasmidy:

plasmid pHH1-5, obsahující kódový fragment DNA pro řetězec H lidského imunoglobulinu. Tento plasmid obsahuje uloženou kódovou cDNA pro řetězec H lidského imunoglobulinu s variabilní oblastí podskupiny I,

plasmid pHL15-27, obsahující kódový fragment DNA pro řetězec L lidského imunoglobulinu. Tento plasmid obsahuje uloženou kódovou cDNA pro řetězec L lidského imunoglobulinu s variabilní oblastí podskupiny II.

- 5) Ověření klonované úplné nukleotidové sekvence kódové cDNA pro řetězce H a L lidského imunoglobulinu

Řetězec H lidského imunoglobulinu je tvořen N-terminální variabilní oblastí s obsahem přibližně 110 zbytků a sousední konstantní oblastí, obsahující přibližně 510 zbytků. Řetězec L lidského imunoglobulinu je tvořen N-terminální variabilní oblastí s obsahem přibližně 110 zbytků a navazující konstantní oblastí, obsahující přibližně 107 zbytků.

Z těchto důvodů bylo předpokládáno, že nukleotidová sekvence kódové cDNA pro řetězec H lidského imunoglobulinu, klonovaná podle odstavce 4) svrchu, bude tvořena variabilní oblastí a konstantní oblastí. Bylo předpokládáno, že variabilní oblast bude vysoce homologní s variabilní oblastí řetězce H lidského imunoglobulinu, podskupiny I; šlo například o klon 21/28'CL podle svrchu uvedené publikace Kabat E. A. a další. Kódová nukleotidová sekvence pro konstantní oblast řetězce H lidského imunoglobulinu je známa z téhož zdroje.

Bylo předpokládáno, že sekvence nukleotidů kódové cDNA pro řetězec L lidského imunoglobulinu, klonovaná svrchu v odstavci 4) bude tvořena variabilní oblastí a konstantní oblastí. Variabilní oblast by přitom měla být vysoce homologní s variabilní oblastí řetězce L lidského imunoglobulinu, podskupiny II, například klonu RPMI1640'CL podle svrchu uvedené publikace Kabat E. A. a další. Kódová nukleotidová sekvence pro konstantní oblast řetězce L lidského imunoglobulinu je známa z téhož zdroje.

Byly syntetizovány oligonukleotidové primery s délkou 20 nukleotidů pro analýzu sekvence. Tyto primery byly zkonstruovány na základě známých, dobře konzervovaných sekvencí v rámcových oblastech variabilních oblastí a na bazi známých nukleotidových sekvencí v konstantních oblastech. Primery odpovídaly sekvencím, odděleným úseky s obsahem 100 až 200 bp a byly použity spolu s primery HVHI5-1, HC_u3-1, HVKII5-4 a HKCL3-1, již použitými při provádění PCR, jak je uvedeno svrchu v odstavci 2).

Sekvence oligonukleotidových primerů, syntetizovaných pro analýzu sekvence řetězce H jsou následující:

SHHF-1; (SEQ ID No. 95);

SHHF-2; (SEQ ID No. 96);

SHHF-3; (SEQ ID No. 97);

SHHF-4; (SEQ ID No. 98);

SHHF-5; (SEQ ID No. 99);

SHHF-6; (SEQ ID No. 100);

SHHF-7; (SEQ ID No. 101);

SHHF-8; (SEQ ID No. 102);

SHHF-9; (SEQ ID No. 103);

SHHF-10; (SEQ ID No. 104);

SHHF-11; (SEQ ID No. 105);
SHHF-13; (SEQ ID No. 106);
SHHF-14; (SEQ ID No. 107);
SHHF-15; (SEQ ID No. 108);
SHHR-1; (SEQ ID No. 109);
SHHR-2; (SEQ ID No. 110);
SHHR-3; (SEQ ID No. 111);
SHHR-4; (SEQ ID No. 112);
SHHR-5; (SEQ ID No. 113);
SHHR-6; (SEQ ID No. 114);
SHHR-7; (SEQ ID No. 115);
SHHR-8; (SEQ ID No. 116);
SHHR-9; (SEQ ID No. 117);
SHHR-10; (SEQ ID No. 118);
SHHR-11; (SEQ ID No. 119);
SHHR-12; (SEQ ID No. 120);
SHHR-13; (SEQ ID No. 121);
SHHR-14; (SEQ ID No. 122); a
SHHR-15; (SEQ ID No. 123).

Na obr. 3 je znázorněna poloha, na kterou jsou vázány odpovídající primery.

Sekvence oligonukleotidových primerů, syntetizovaných pro analýzu řetězce L jsou následující:

SHKF-1; (SEQ ID No. 124);
SHKF-2; (SEQ ID No. 125);
SHKF-4; (SEQ ID No. 126);
SHKF-5; (SEQ ID No. 127);
SHKF-6; (SEQ ID No. 128);
SHKF-11; (SEQ ID No. 129);

SHKF-12; (SEQ ID No. 130);

SHKR-1; (SEQ ID No. 131);

SHKR-2; (SEQ ID No. 132);

SHKR-3; (SEQ ID No. 133);

SHKR-4; (SEQ ID No. 134);

SHKR-6; (SEQ ID No. 135); a

SHKR-13; (SEQ ID No. 136).

Na obr. 4 je znázorněna poloha, v níž jsou vázány odpovídající primery.

Vzorky pro analýzu sekvence se připraví při použití svrhu uvedených primerů a sestavy Prism Ready Reaction Terminator Cycle Sequencing kit (Perkin Elmer, Japonsko). Jako matrice se užije DNA z plasmidů pHH1-5 nebo pHL15-27, jak je popsáno svrhu v odstavci 4).

Postupuje se tak, že se 1,5 mikrogramů čištěné DNA plasmidu smísí se 4,8 pmol příslušného primeru, objem se doplní na 16 mikrolitrů destilovanou vodou, tento roztok se dále označuje jako směs plasmidové DNA a primer. Podíl 9,5 mikrolitrů této směsi pro každý z primerů se přidá k 10,5 mikrolitrům předběžného roztoku, dodávaného spolu se sestavou a obsahujícího Taq DNA polymerázu. Výsledný reakční roztok se uloží do automatického reaktoru Catalyst (perkin Elmer, Japonsko). Pak se použije reakční cyklus 30 sekund při 95 °C, 15 sekund při 50 °C a 4 minuty při 60 °C, tento cyklus se 25x opakuje.

Po ukončení reakčních cyklů se k výslednému roztoku přidá 80 mikrolitrů destilované vody a z výsledné směsi se dvakrát extrahuje DNA fenol-chloroformovou metodou podle svrhu uvedené publikace Sambrook a další. Oddělená vodná vrstva se smísí s 15 mikrolitry 2M octanu sodného a 300 mikrolitrů 100% ethanolu, načež se směs odstředí k oddělení sraženiny

DNA. Tato sraženina se pak promyje ethanolem s koncentrací 70 % objemových a suší za sníženého tlaku, načež se rozpustí ve 3 mikrolitrech roztoku pro vzorek, který obsahuje 4 mikrolitry 0,25 M EDTA, 100 mikrolitrů formamidu a 16 mikrolitrů destilované vody.

Analýza sekvence DNA byla provedena na automatickém analyzátoru Model 373A (Perkin Elmer, Japonsko). Analýza byla uskutečněna na 30 vzorcích řetězce H lidského imunoglobulinu a na 17 vzorcích řetězce L lidského imunoglobulinu.

Analýza zísakných údajů ověřila, že plasmid pHH1-5 obsahuje uloženou kódovou DNA pro řetězec H lidského imunoglobulinu s variabilní oblastí podskupiny I. Na druhé straně bylo prokázáno, že plasmid pHL15-27 obsahuje uloženou kódovou DNA pro řetězec L lidského imunoglobulinu s variabilní oblastí podskupiny II.

Nukleotidová sekvence DNA, uložená do plasmidu pHH1-5 a do plasmidu pHL15-27 je uvedena jako SEQ ID č. 137 a 138.

Příklad 5

Konstrukce vektorů pro expresi humanizovaných verzí řetězce L protilátky CH11

1) Příprava primerů

Při použití PCR byly syntetizovány následující fragmenty DNA:

DNA (SEQ ID č. 77) je kódová sekvence pro polypeptidový řetězec VL-KY (SEQ ID č. 78),

DNA (SEQ ID č. 79) je kódová sekvence pro polypeptidový řetězec VL-KF (SEQ ID č. 80),

DNA (SEQ ID č. 81) je kódová sekvence pro polypeptidový řetězec VL-RY (SEQ ID č. 82),

DNA (SEQ ID č. 83) je kódová sekvence pro polypeptidový řetězec VL-RF (SEQ ID č. 84).

Při použití PCR bylo syntetizováno následujících 14 primerů:

VL1P; (SEQ ID No. 139);

VL1N; (SEQ ID No. 140);

VL2P; (SEQ ID No. 141);

VL2N; (SEQ ID No. 142);

VL3TYRP; (SEQ ID No. 143);

VL3TYRN; (SEQ ID No. 144);

VL3PHEP; (SEQ ID No. 145);

VL3PHEN; (SEQ ID No. 146);

VL4P; (SEQ ID No. 147);

VL4N; (SEQ ID No. 148);

VL5P; (SEQ ID No. 149);

VL50RP; (SEQ ID No. 150);

VL50RN; (SEQ ID No. 151); nebo

VLTERM; (SEQ ID No. 152).

2) Konstrukce plasmidu pHkKY2-58 a plasmidu pHkKF2-19

a) První stupeň PCR

První stupeň PCR je znázorněn na obr. 5.

VL1

Byl připraven fragment DNA s kódovou sekvencí pro sekreci signální sekvence, oblasti FRL_1 a aminotermiální části (dále uváděné jako N-konec) oblasti $CDRL_1$. Tento fragment bude dále uváděn jako fragment VL1 DNA. PCR byla prováděna za následujících podmínek:

Složení reakčního roztoku:

plasmid pHL15-27 DNA, 1 mikrogram,
oligonukleotidový primer VL5P, 80 pmol,
oligonukleotidový primer VL1N, 80 pmol,
25 mM směs dNTP, 20 mikrolitrů,
10x pufr Pfu, 20 mikrolitrů,
Pfu DNA polymeráza (Stratagene), 10 jednotek.

Byla přidána redestilovaná voda do konečného objemu 200 mikrolitrů. 10x Pfu pufr byl dodáván spolu s Pfu polymerázou.

Nejprve byl reakční roztok zahřát na 2 minuty na 94°C . Pak byl vzorek zahříván v cyklech 1 minuta při 94°C , 1 minuta při 55°C a 2 minuty při 72°C . Tento cyklus byl 30x opakován. Pak byl reakční roztok inkubován 10 minut při teplotě 72°C .

VL2

Byl připraven fragment DNA s kódovou sekvencí pro karboxyterminální část (dále bude uváděna jako C-konec) oblasti FRL_1 , oblasti $CDRL_1$ a N-konec oblasti FRL_2 . Tento fragment bude dále uváděn jako fragment VL2 DNA. PCR byla prováděna za následujících podmínek:

Složení reakčního roztoku:

plasmid pCR3-L103 DNA, 1 mikrogram,
oligonukleotidový primer CL1P, 80 pmol,
oligonukleotidový primer VL2N, 80 pmol,
25 mM směs dNTP, 20 mikrolitrů,
10x Pfu pufr, 20 mikrolitrů,
Pfu DNA polymeráza (Stratagene), 10 jednotek.

Nejprve byl reakční roztok zahřát na 2 minuty na 94 °C. Pak byl vzorek zahříván v cyklech 1 minuta při 94 °C, 1 minuta při 55 °C a 2 minuty při 72 °C. Tento cyklus byl 30x opakován. Pak byl reakční roztok inkubován 10 minut při teplotě 72 °C.

VL3Y

Byl připraven kódový fragment DNA pro oblast CDRL₂, oblast FRL₃ (v níž byl zbytek aminokyseliny v poloze 87 nahrazen zbytkem tyrosinu) a oblast CDRL₃. V tomto i v dalších příkladech jsou aminokyseliny číslovány podle svrhu uvedené publikace Kabat a další. Fragment bude dále uváděn jako fragment VL3Y-DNA. Reakce PCR byla prováděna za následujících podmínek:

Složení reakčního roztoku:

plasmid pHL15-27 DNA, 1 mikrogram,
oligonukleotidový primer VL2P, 80 pmol,
oligonukleotidový primer VL3TYRN, 80 pmol,
25 mM směs dNTP, 20 mikrolitrů,
10x Pfu pufr, 20 mikrolitrů,
Pfu DNA polymeráza (Stratagene), 10 jednotek.

Nejprve byl reakční roztok zahřát na 2 minuty na 94 °C. Pak byl vzorek zahříván v cyklech 1 minuta při 94 °C, 1 minuta při 55 °C a 2 minuty při 72 °C. Tento cyklus byl 30x opakován. Pak byl reakční roztok inkubován 10 minut při teplotě 72 °C.

VL3F

Byl připraven kódový fragment DNA pro oblast CDRL₂, oblast FRL₃ (v níž byl zbytek aminokyseliny v poloze 87 nahrazen zbytkem fenylalaninu) a oblast CDRL₃. Tento fragment bude dále uváděn jako fragment VL3F DNA. PCR byla prováděna za následujících podmínek:

Složení reakčního roztoku:

plasmid pHL15-27 DNA, 1 mikrogram,
oligonukleotidový primer VL2P, 80 pmol,
oligonukleotidový primer VL3PHEN, 80 pmol,
25 mM směs dNTP, 20 mikrolitrů,
10x Pfu pufr, 20 mikrolitrů,
Pfu DNA polymeráza (Stratagene), 10 jednotek.

Nejprve byl reakční roztok zahřát na 2 minuty na 94 °C. Pak byl vzorek zahříván v cyklech 1 minuta při 94 °C, 1 minuta při 55 °C a 2 minuty při 72 °C. Tento cyklus byl 30x opakován. Pak byl reakční roztok inkubován 10 minut při teplotě 72 °C.

VL4

Byl připraven kódový fragment DNA pro oblast CDRL₃, oblast FRL₄ a oblast Ck (část konstantní oblasti). Tento

fragment bude dále uváděn jako fragment VL4 DNA. Reakce PCR byla prováděna za následujících podmínek:

Složení reakčního roztoku:

plasmid pHL15-27 DNA, 1 mikrogram,
oligonukleotidový primer VL4P, 80 pmol,
oligonukleotidový primer VLTERM, 80 pmol,
25 mM směs dNTP, 20 mikrolitrů,
10x Pfu pufr, 20 mikrolitrů,
Pfu DNA polymeráza (Stratagene), 10 jednotek.

Nejprve byl reakční roztok zahřát na 2 minuty na 94 °C. Pak byl vzorek zahříván v cyklech 1 minuta při 94 °C, 1 minuta při 55 °C a 2 minuty při 72 °C. Tento cyklus byl 30x opakován. Pak byl reakční roztok inkubován 10 minut při teplotě 72 °C.

Fragmenty VL1, VL2, VL3Y, VL3F a VL4 DNA, amplifikované svrchu uvedeným způsobem pomocí PCR byly extrahovány fenolem. Pak se DNA vysráží při použití 100% ethanolu. Vzorek DNA s hmotností přibližně 20 až 30 mikrogramů se pak podrobí elektroforéze na 5% polyakrylamidovém gelu. Gel se barví roztokem ethidiumbromidu 1 mikrogram/1 ml tak, že fragmenty DNA jsou viditelné v UV světle. Fragmenty DNA, prokázané tímto způsobem se z gelu vyříznou žiletkou, pak se provádí elektroeluce akrylamidového gelu v přístroji Centriruter (Amicon), opatřeném zařízením Centricon 10 (Amicon). Po eluci se DNA zahustí odstředěním 1 hodinu při přibližně 7500 g, načež se vysráží ethanolem. Výsledná DNA se vždy rozpustí v 50 mikrolitrech destilované vody.

b) Druhý stupeň PCR

Druhý stupeň PCR je znázorněn na obr. 6.

VL1-2

Pomocí PCR byla připravena složená bílkovina, obsahující svrchu uvedené fragmenty VL1 DNA a VL2 DNA. Výsledný fragment byl označen jako fragment VL1-2 DNA. PCR byla prováděna za následujících podmínek:

Složení reakčního roztoku:

Roztok VL1 DNA z prvního stupně PCR, 10 mikrolitrů,
roztok VL2 DNA z prvního stupně PCR, 10 mikrolitrů,
oligonukleotidový primer VL5P, 80 pmol,
oligonukleotidový primer VL2N, 80 pmol,
25 mM směs dNTP, 20 mikrolitrů,
10x Pfu pufr, 20 mikrolitrů,
Pfu DNA polymeráza (Stratagene), 10 jednotek.

Nejprve byl reakční roztok zahřát na 2 minuty na 94 °C. Pak byl vzorek zahříván v cyklech 1 minuta při 94 °C, 1 minuta při 55 °C a 2 minuty při 72 °C. Tento cyklus byl 30x opakován. Pak byl reakční roztok inkubován 10 minut při teplotě 72 °C.

VL3Y-4

Pomocí PCR byla připravena složená bílkovina, obsahující svrchu uvedené fragmenty VL3Y DNA a VL4 DNA. Vzniklý fragment byl označen jako fragment VL3Y-4 DNA. PCR byla prováděna za následujících podmínek:

Složení reakčního roztoku:

Roztok VL3Y DNA z prvního stupně PCR, 10 mikrolitrů,
roztok VL4 DNA z prvního stupně PCR, 10 mikrolitrů,
oligonukleotidový primer VL2P, 80 pmol,
oligonukleotidový primer VLTERM, 80 pmol,
25 mM směs dNTP, 20 mikrolitrů,
10x pfu pufr, 20 mikrolitrů,
Pfu DNA polymeráza (Stratagene), 10 jednotek.

Nejprve byl reakční roztok zahřát na 2 minuty na 94 °C. Pak byl vzorek zahříván v cyklech 1 minuta při 94 °C, 1 minuta při 55 °C a 2 minuty při 72 °C. Tento cyklus byl 30x opakován. Pak byl reakční roztok inkubován 10 minut při teplotě 72 °C.

VL3F-4

Pomocí PCR byla připravena složená bílkovina, obsahující svrchu uvedené fragmenty VL3F DNA a VL4 DNA. Výsledný fragment byl označen jako fragment VL3F-4 DNA. PCR byla prováděna za následujících podmínek:

Složení reakční směsi:

roztok VL3F DNA z prvního stupně PCR, 10 mikrolitrů,
roztok VL4 DNA z prvního stupně PCR, 10 mikrolitrů,
oligonukleotidový primer VL2P, 80 pmol,
oligonukleotidový primer VLTERM, 80 pmol,
25 mM směs dNTP, 20 mikrolitrů,
10x Pfu pufr, 20 mikrolitrů,
Pfu DNA polymeráza (Stratagene), 10 jednotek.

Nejprve byl reakční roztok zahřát na 2 minuty na 94 °C. Pak byl vzorek zahříván v cyklech 1 minuta při 94 °C, 1 minuta při 55 °C a 2 minuty při 72 °C. Tento cyklus byl 30x opakován. Pak byl reakční roztok inkubován 10 minut při teplotě 72 °C.

Fragmenty VL1-2, VL3Y-4, a VL3F-4 DNA, amplifikované svrhu uvedeným způsobem pomocí PCR byly extrahovány fenolem. Pak byla DNA vysrážena 100% ethanolem. Přibližně 20 až 30 mikrogramů této DNA pak bylo podrobeno elektroforéze na 5% polyakrylamidovém gelu. Gel byl zbarven ethidiumbromidem 1 mikrogram/1 ml, takže fragmenty DNA byly viditelné v UV-světle. Tímto způsobem zjištěné fragmenty DNA pak byly z gelu vyříznuty žiletkou a podrobeny elektroeluci z akrylamidového gelu při použití přístroje Centriruter (Amicon), opatřeného zařízením Centricon 10 (Amicon). DNA pak byla zahuštěna odstředěním 1 hodinu při přibližně 7500 g, načež byla vysrážena ethanolem. Výsledná DNA byla vždy rozpuštěna v 50 mikrolitrech destilované vody.

c) Třetí stupeň PCR

Třetí stupeň PCR je znázorněn na obr. 7.

VL-KY

Pomocí PCR byla připravena složená bílkovina, obsahující fragmenty VL1-2 DNA a VL3Y-4 DNA. Získaný fragment byl označen jako fragment VL-KY. PCR byla prováděna za následujících podmínek:

Složení reakčního roztoku:

roztok VL1-2 DNA z druhého stupně PCR, 10 mikrolitrů,
roztok VL3Y-4 DNA z druhého stupně PCR, 10 mikrolitrů,
oligonukleotidový primer VL5P, 80 pmol,
oligonukleotidový primer VLTERM, 80 pmol,
25 mM směs dNTP, 20 mikrolitrů,
10x Pfu pufr, 20 mikrolitrů,
Pfu DNA polymeráza (Stratagene), 10 jednotek.

Nejprve byl reakční roztok zahřát na 2 minuty na 94 °C. Pak byl vzorek zahříván v cyklech 1 minuta při 94 °C, 1 minuta při 55 °C a 2 minuty při 72 °C. Tento cyklus byl 30x opakován. Pak byl reakční roztok inkubován 10 minut při teplotě 72 °C.

VL-KF

Pomocí PCR byla připravena složená bílkovina, obsahující fragment VL1-2 DNA a VL3F-4 DNA. Výsledný fragment byl označen jako fragment VL-KF DNA. PCR byla prováděna za následujících podmínek:

Složení reakčního roztoku:

roztok VL1-2 DNA z druhého stupně PCR, 10 mikrolitrů,
roztok VL3F-4 DNA z druhého stupně PCR, 10 mikrolitrů,
oligonukleotidový primer VL5P, 80 pmol,
oligonukleotidový primer VLTERM, 80 pmol,
25 mM směs dNTP, 20 mikrolitrů,
10x Pfu pufr, 20 mikrolitrů,
Pfu DNA polymeráza (Stratagene), 10 jednotek.

Nejprve byl reakční roztok zahřát na 2 minuty na 94 °C. Pak byl vzorek zahříván v cyklech 1 minuta při 94 °C, 1 minuta při 55 °C a 2 minuty při 72 °C. Tento cyklus byl 30x opakován. Pak byl reakční roztok inkubován 10 minut při teplotě 72 °C.

Fragmenty VL-KY a VL-KF DNA, předem amplifikované svrchu uvedeným způsobem pomocí PCR byly extrahovány fenolem. Pak byla DNA vysrážena 100% ethanolem. Přibližně 20 až 30 mikrogramů této DNA pak bylo podrobeno elektroforéze na 5% polyakrylamidovém gelu. Gel byl zbarven ethidiumbromidem 1 mikrogram/1 ml, takže fragmenty DNA byly viditelné v UV-světle. Tímto způsobem zjištěné fragmenty DNA pak byly z gelu vyříznuty žiletkou a podrobeny elektroeluci z akrylamidového gelu při použití přístroje Centríruter (Amicon).

Konstrukce plasmidu s uloženými fragmenty VL-KY nebo VL-KF DNA je znázorněno na obr. 8.

DNA VL-KY a VL-KF, získaná tímto způsobem, byla dále čištěna extrakcí fenolem a pak byla vysrážena ethanolem. Podíl přibližně 1 mikrogram této DNA byl pak rozštěpen při použití 10 jednotek restričních enzymů Xho1 a Xba1 při teplotě 37 °C při použití kompatibilního pufru, dodávaného spolu s enzymy.

Podíl 1 mikrogram plasmidu pME18S DNA (Hara T. a Miyajima A., 1992, EMBO J., 11, 1875) byl rovněž rozštěpen restričními enzymy Xho1 a Xba1. Výsledná DNA byla zpracovávána působením alkalické fosfatázy z telecího střeva, CIP (Takara Shuzo) k odstranění všech 5'-fosfátových skupin. Podíl 100 ng defosforylované DNA plasmidu pME18S byla navázán na 0,5 mikrogramů každého fragmentu VL-KY a VL-KF, rozštěpeného Xba1 a Xho1. Vazba pak byla zskutečněna při použití se stavy pro vazbu (Takara Shuzo) a produkt

vazby pak byl použit k transformaci E. coli kmene DH5alfa (Gibco-BRL) pomocí otevření pórů elektrickými pulzy.

Postupuje se tak, že se 50 mikrolitrů kompetentních buněk nechá roztát a smísí se s 5 mikrolitry směsi pro vazbu. Směs se přenesse do kyvety pro otevření pórů elektrickými pulzy (BioRad). Byl užit jeden pulz o 25 μ F, 1,8 kV a 200 ohm. Po uskutečnění pulzu byl buněčný materiál znovu uveden do suspenze v 1 ml prostředí SOC. Buněčná suspenze byla přenesena do sterilní zkumavky a inkubována 1 hodinu při teplotě 37 °C. Výsledný buněčný materiál byl nanesen na plotny LB s obsahem 50 mikrogramů ampicilinu.

Byla provedena analýza plasmidové DNA v koloniích transformantů pomocí restrikčních enzymů tak, aby byly identifikovány ty plasmidy, které obsahovaly požadovanou DNA. Po pěstování transformovaných buněk přes noc byla plasmidová DNA připravena způsobem podle příkladu 4, stupeň 4. DNA byla rozštěpena restrikčními enzymy XhoI a XbaI, tak, aby bylo možno potvrdit klonování fragmentu se správnou velikostí.

Všechny vazné reakce, transformace a analýzy transformantů budou dále prováděny svrchu uvedeným způsobem, není-li výslovně uvedeno jinak.

Byl identifikován plasmid pHkKY2-58 s obsahem fragmentu VL-KY DNA a plasmid pHkKF2-19, obsahující fragment VL-KF DNA. V obou případech byly uvedené fragmenty uloženy po směru exprese za promotorem SRalfa v plasmidu mME18S ve správné orientaci pro expresi imunoglobulinu jako výsledného bílkovinného produktu.

3) Konstrukce plasmidu pHkRA2-10 a pHkRF2-52

Při použití DNA z plasmidů pHkKY2-58 a pHkKF2-19 jako matric, byly zkonstruovány dva další vektory pro expresi.

a) První stupeň PCR

První stupeň PCR je znázorněn na obr. 9.

VLR5'

Byl připraven kódový fragment DNA pro sekreci signální sekvence, oblast FRL₁, oblast CDRL₁ a oblast FRL₂ (v níž byl užít v poloze 45 zbytek lysinu místo zbytku argininu). Tento fragment bude dále uváděn jako fragment VLR5' DNA. PCR byla prováděna za následujících podmínek:

Složení reakčního roztoku:

plasmid pHkKY2-58 DNA, 1 mikrogram,
oligonukleotidový primer VLP5, 80 pmol,
oligonukleotidový primer VLNR, 80 pmol,
25 mM směs dNTP, 20 mikrolitrů,
10x Pfu pufr, 20 mikrolitrů,
Pfu DNA polymeráza (Stratagene), 10 jednotek.

Nejprve byl reakční roztok zahřát na 2 minuty na 94 °C. Pak byl vzorek zahříván v cyklech 1 minuta při 94 °C, 1 minuta při 55 °C a 2 minuty při 72 °C. Tento cyklus byl 30x opakován. Pak byl reakční roztok inkubován 10 minut při teplotě 72 °C.

VLR3'Y

Byl připraven kódový fragment DNA pro oblast FRL₂ (v níž byl užít v poloze 45 zbytek lysinu místo zbytku argininu), oblast CDRL₂, oblast FRL₃ (se zbytkem tyrosinu v poloze 87), oblast FRL₄ a oblast Ck. Tento fragment bude dále uváděn jako fragment VLR3'Y DNA. PCR byla prováděna za následujících podmínek:

Složení reakčního roztoku:

plasmid pHkKY2-58 DNA, 1 mikrogram,
oligonukleotidový primer VLRP, 80 pmol,
oligonukleotidový primer VLTERM, 80 pmol,
25 mM směs dNTP, 20 mikrolitrů,
10x Pfu pufr, 20 mikrolitrů,
Pfu DNA polymeráza (Stratagene), 10 jednotek.

Nejprve byl reakční roztok zahřát na 2 minuty na 94 °C. Pak byl vzorek zahříván v cyklech 1 minuta při 94 °C, 1 minuta při 55 °C a 2 minuty při 72 °C. Tento cyklus byl 30x opakován. Pak byl reakční roztok inkubován 10 minut při teplotě 72 °C.

VLR3'F

Byl připraven kódový fragment pro oblast FRL₂ (se zbytkem lysinu v poloze 45 místo zbytku argininu), oblast CDRL₂, oblast FRL₃ (obsahující v poloze 87 zbytek fenylalaninu), oblast CDRL₃, oblast FRL₄ a oblast Ck. Tento fragment bude označován jako fragment VLR3'F DNA. PCR byla prováděna za následujících podmínek:

Složení reakčního roztoku:

plasmid pHkKF2-19 DNA, 1 mikrogram,
oligonukleotidový primer VLRP, 80 pmol,
oligonukleotidový primer VLTERM, 80 pmol,
25 mM směs dNTP, 20 mikrolitrů,
10x Pfu pufr, 20 mikrolitrů,
Pfu DNA polymeráza (Stratagene), 10 jednotek.

Nejprve byl reakční roztok zahřát na 2 minuty na 94 °C. Pak byl vzorek zahříván v cyklech 1 minuta při 94 °C, 1 minuta při 55 °C a 2 minuty při 72 °C. Tento cyklus byl 30x opakován. Pak byl reakční roztok inkubován 10 minut při teplotě 72 °C.

Fragmenty VLR5', VLR3'Y a VLR3'F DNA, amplifikované svrchu uvedeným způsobem pomocí PCR byly extrahovány fenolem. Pak byla DNA vysrážena 100% ethanolem. Přibližně 20 až 30 mikrogramů této DNA pak bylo podrobeno elektroforéze na 5% polyakrylamidovém gelu. Gel byl zbarven ethidiumbromidem 1 mikrogram/1 ml, takže fragmenty DNA byly viditelné v UV-světle. Tímto způsobem zjištěné fragmenty DNA pak byly z gelu vyříznuty žiletkou a podrobeny elektroeluci z akrylamidového gelu při použití přístroje Centriruter (Amicon), opatřeného zařízením Centricon 10 (Amicon). DNA pak byla zahuštěna odstředěním 1 hodinu při přibližně 7500 g, načež byla vysrážena ethanolem. Výsledná DNA byla vždy rozpuštěna v 50 mikrolitrech destilované vody.

b) Druhý stupeň PCR

Druhý stupeň PCR je znázorněn na obr. 10.

VL-RY

Spojení fragmentů DNA VLR5' a VLR3'Y (dále bude výsledný fragment označován jako fragment DNA VLR-Y) bylo uskutečněno pomocí PCR za následujících podmínek:

Složení reakčního roztoku:

Roztok VLR5' DNA, připravený v prvním stupni PCR, 10 mikrolitrů,
roztok VLR3'Y DNA, připravený v prvním stupni PCR, 10 μ l,
oligonukleotidový primer VL5P, 80 pmol,

oligonukleotidový primer VL TERM, 80 pmol,
25 mM směs dNTP, 20 mikrolitrů,
10x Pfu pufr, 20 mikrolitrů,
Pfu DNA polymeráza (Stratagene), 10 jednotek.

Nejprve byl reakční roztok zahřát na 2 minuty na 94 °C. Pak byl vzorek zahříván v cyklech 1 minuta při 94 °C, 1 minuta při 55 °C a 2 minuty při 72 °C. Tento cyklus byl 30x opakován. Pak byl reakční roztok inkubován 10 minut při teplotě 72 °C.

VL-RF

Složený fragment z fragmentů DNA VLR5' a VLR3'F (dále bude tento fragment označován jako fragment DNA VL-RF) byl připraven pomocí PCR za následujících podmínek:

Složení reakčního roztoku:

roztok VLR5' DNA z prvního stupně PCR, 10 mikrolitrů,
roztok VLR3'F DNA z prvního stupně PCR, 10 mikrolitrů,
oligonukleotidový primer VL5P, 80 pmol,
oligonukleotidový primer VL TERM, 80 pmol,
25 mM směs dNTP, 20 mikrolitrů,
10x Pfu pufr, 20 mikrolitrů,
Pfu DNA polymeráza (Stratagene), 10 jednotek.

Nejprve byl reakční roztok zahřát na 2 minuty na 94 °C. Pak byl vzorek zahříván v cyklech 1 minuta při 94 °C, 1 minuta při 55 °C a 2 minuty při 72 °C. Tento cyklus byl 30x opakován. Pak byl reakční roztok inkubován 10 minut při teplotě 72 °C.

Fragmenty VL-RY a VL-RF DNA, které byly amplifikovány svrchu uvedeným způsobem pomocí PCR byly extrahovány fenolem. Pak byla DNA vysrážena 100% ethanolem. Přibližně 20 až 30 mikrogramů této DNA pak bylo podrobeno elektroforéze na 5% polyakrylamidovém gelu. Gel byl zbarven ethidiumbromidem 1 mikrogram/1 ml, takže fragmenty DNA byly viditelné v UV-světle. Tímto způsobem zjištěné fragmenty DNA pak byly z gelu vyříznuty žiletkou a podrobeny elektroeluci z akrylamidového gelu při použití přístroje Centriruter (Amicon), opatřeného zařízením Centricon 10 (Amicon). DNA pak byla zahuštěna odstředěním 1 hodinu při přibližně 7500 g, načež byla vysrážena ethanolem. Výsledná DNA byla vždy rozpuštěna v 50 mikrolitrech destilované vody.

Konstrukce plasmidu s obsahem fragmentu VL-RY nebo VL-RF DNA je znázorněna na obr. 11.

DNA s obsahem VL-RY nebo VL-RF, připravená tímto způsobem byla dále čištěna extrakcí fenolem a pak srážením ethanolu. Pak byl 1 mikrogram DNA rozštěpen pomocí restrikčních enzymů XhoI a XbaI.

Podíl 1 mikrogram DNA plasmidu pME18S (Hara T. a Miyajima A., svrchu) byl rovněž rozštěpen restrikčními enzymy XhoI a XbaI. Výsledná DNA byla zpracována působením CIP. Podíl 200 ng defosforylované DNA plasmidu pME18S byl navázán na 0,5 mikrogramů fragmentů VL-RY a VL-RF po rozštěpení enzymy XbaI a XhoI. Vazba byla uskutečněna při použití běžně dodávané sestavy (Takara Syuzo), produkt vazby byl použit k transformaci E. coli, kmene DH5alfa.

Byla uskutečněna analýza sekvence DNA plasmidu, obsaženého v koloniích transformantů při použití restričních enzymů tak, aby bylo možno identifikovat plasmidy, obsahující hledanou uloženou část DNA. Byl identifikován plasmid pHkRY2-10, obsahující fragment VL-RY a plasmid pHkRF2-52, obsahující fragment VL-RF. Fragmenty byly v obou případech uloženy po směru exprese od promotoru SRalfa v pME18S ve správné orientaci pro expresi výsledného imunoglobulinu.

4) Ověření nukleotidových sekvencí

Byla provedena analýza sekvence úseku DNA, uložených v plasmidech pHkKY2-58, pHkKF2-19, pHkRY2-10 a pHkRF2-52. Při tomto postupu byly použity svrchu popsané primery SHKF-4, SHKF-5, SHKF-6, SHKF-12, SHKR-13, SHKF-11, SHKF-2 a SHKR-3. Mimoto byly syntetizovány tři nové primery.

PMEF2, (SEQ ID No. 153),

SHKF-14, (SEQ ID No. 154) a

PMEF2, (SEQ ID No. 155).

Analýza sekvence DNA byla prováděna tvorbou dideoxy-nukleotidů na konci řetězce podle publikace Sanger F. S. a další, 1977, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 74:5463. Před analýzou byla izolována z hostitelských buněk matrice DNA plasmidu rozrušením v alkalickém prostředí s obsahem SDS podle svrchu uvedené publikace Sambrook J. a další, a pak byla DNA čištěna odstředěním při použití chloridu cesného podle téže publikace.

Postup byl prováděn tak, že 1 mikrogram čištěné DNA plasmidu byl rozpuštěn v 16 mikrolitrech redestilované vody. Roztok byl smísen se 2 mikrolitry 2 mM EDTA a 2 mikrolitry 2N hydroxidu sodného a pak byl inkubován 5 minut při teplotě

místnosti. Pak byly k roztoku přidány 4 mikrolitry 10 M roztoku octanu amonného a 100 mikrolitrů 100% ethanolu, směs byla promíchána a uložena na 10 minut do suchého ledu. Pak byla DNA z roztoku oddělena odstředěním 5 minut při 15 000 ot/min. Vzniklá usazenina byla promyta ethanolem s koncentrací 80 % objemových a usušena za sníženého tlaku. Usušená DNA byla rozpuštěna v 7 mikrolitrech redestilované vody a užita jako matrice při analýze sekvence.

Analýza nukleotidové sekvence byla uskutečněna při použití sestavy 7-DEaza-Sequenase, verze 2,0 pro dCTP (Amersham). Postup byl prováděn tak, že 7 mikrolitrů roztoku plasmidu bylo přidáno k 1 pmol primeru a 1 mikrolitru reakčního pufru (dodaného v sestavě). Směs byla inkubována 2 minuty při teplotě 65 °C. DNA plasmidu byla navázána na primer v průběhu postupného chlazení směsi na teplotu místnosti. DNA byla značena při použití /alfa³²P/dCTP (Amersham) podle návodu, přiloženého k sestavě. Produkt této reakce byl pak analyzován pomocí elektroforézy na 5% polyakrylamidovém gelu, obsahujícím 8 M močoviny v pufru TBE (100 mM Tris, 100 mM kyseliny borité a 1 mM EDTA při pH 8,3). Gel byl vysušen a sekvence DNA byla identifikována autoradiograficky.

Sekvence DNA, uložená v plasmidu pHkKY2-58 je znázorněna jako SEQ ID No. 77. Tato nukleotidová sekvence obsahuje otevřený čtecí rámec, který je kódovou sekvencí pro polypeptid, jehož sekvence je definována jako SEQ ID No. 78.

Sekvence DNA, uložená v plasmidu pHkKF2-19 je znázorněna jako SEQ ID No. 79. Tato nukleotidová sekvence obsahuje otevřený čtecí rámec, který je kódovou sekvencí pro polypeptid, jehož sekvence je definována jako SEQ ID No. 80.

Sekvence DNA, uložená v plasmidu pHkRY2-10 je znázorněna jako SEQ ID No. 81. Tato nukleotidová sekvence obsahuje otevřený čtecí rámec, který je kódovou sekvencí pro polypeptid, jehož sekvence je definována jako SEQ ID No. 82.

Sekvence DNA uložená v plasmidu pHkRF2-52 je znázorněna jako SEQ ID No. 83. Tato nukleotidová sekvence obsahuje otevřený čtecí rámec, který je kódovou sekvencí pro polypeptid, jehož sekvence je definována jako SEQ ID No. 84.

Příklad 6

Konstrukce vektoru pro expresi humanizovaných variant řetězce H protilátky CH11

1) Příprava primerů

Pomocí PCR byly syntetizovány následující fragmenty DNA:

DNA (SEQ ID No. 85) je kódová sekvence pro polypeptidový řetězec (SEQ ID No. 86) řetězce H_uH, jde o řetězec H humanizované protilátky CH11 proti lidskému Fas.

DNA (SEQ ID No. 87) je kódová sekvence pro polypeptidový řetězec (SEQ ID No. 88) řetězce H_uM řetězce H humanizované protilátky CH11 proti lidskému Fas.

K provádění metody PCR bylo syntetizováno 24 primerů, které jsou dále uvedeny:

(VHIP; (SEQ ID No. 156);

(VHSP; (SEQ ID No. 157);

VHSN; (SEQ ID No. 158);

VH2P; (SEQ ID No. 159);
VH2N; (SEQ ID No. 160);
VH3P; (SEQ ID No. 161);
VH3N; (SEQ ID No. 162);
VH4P; (SEQ ID No. 163);
VH4N; (SEQ ID No. 164);
VHAPAPX; (SEQ ID No. 165);
VHAPAN; (SEQ ID No. 166);
VHTERM; (SEQ ID No. 167);
HUMFR2P; (SEQ ID No. 168);
HUMFR2N; (SEQ ID No. 169);
MOUFR2P; (SEQ ID No. 170);
MOUFR2; (SEQ ID No. 171);
GTOSP; (SEQ ID No. 172);
GTOSN; (SEQ ID No. 173);
TCVVAP; (SEQ ID No. 174);
TCVVN1; (SEQ ID No. 175);
ME18P; (SEQ ID No. 176); a
VH06; (SEQ ID No. 178).

2.) Konstrukce plasmidu pMRC22

Pro humanizovaný řetězec CH11 byl ve víceúrovňovém postupu zkonstruován vektor pro expresi. Nejprve byl vytvořen vektor, obsahující C-konec konstantní oblasti řetězce H lidského IgM.

MEC

Byl připraven kódový fragment DNA pro C-konec sekvence aminokyselin řetězce H lidského IgM. Tento fragment bude dále označován jako fragment MEC DNA. Jeho konstrukce je znázor-

něna na obr. 12. PCR byla prováděna za následujících podmínek:

Složení reakčního roztoku:

DNA plasmidu pHH1-5, 1 mikrogram,
oligonukleotidový primer VHAPAPX, 80 pmol,
oligonukleotidový primer VHTERM, 80 pmol,
směs dNTP, 20 mikrolitrů,
10x Pfu pufr, 20 mikrolitrů,
Pfu DNA polymeráza (Stratagene), 10 jednotek.

Nejprve byl reakční roztok zahřát na 2 minuty na 94 °C. Pak byl vzorek zahříván v cyklech 1 minuta při 94 °C, 1 minuta při 55 °C a 2 minuty při 72 °C. Tento cyklus byl 30x opakován. Pak byl reakční roztok inkubován 10 minut při teplotě 72 °C.

Fragment MEC DNA, který byl takto amplifikován svrchu uvedeným způsobem pomocí PCR byly extrahovány fenolem. Pak byla DNA vysrážena 100% ethanolem. Přibližně 20 až 30 mikrogramů této DNA pak bylo podrobeno elektroforéze na 5% polyakrylamidovém gelu. Gel byl zbarven ethidiumbromidem 1 mikrogram/1 ml, takže fragmenty DNA byly viditelné v UV-světle. Tímto způsobem zjištěné fragmenty DNA pak byly z gelu vyříznuty žiletkou a podrobeny elektroeluci z akrylamidového gelu při použití přístroje Centriruter (Amicon), opatřeného zařízením Centricon 10 (Amicon). DNA pak byla zahuštěna odstředěním 1 hodinu při přibližně 7500 g, načež byla vysrážena ethanolem. Výsledná DNA byla vždy rozpuštěna v 50 mikrolitrech destilované vody.

Konstrukce plasmidu s uloženým fragmentem MEC DNA je znázorněna na obr. 13.

MEC DNA byla dále čištěna extrakcí fenolem s následným srážením ethanolem. Pak byl 1 mikrogram DNA rozštěpen restrikčními enzymy XhoI a XbaI.

Podíl 1 mikrogram DNA plasmidu pME18S (Hara T. a Miyajima A., svrchu), byl rovněž rozštěpen restrikčními enzymy XhoI a XbaI. Výsledná DNA byla zpracována působením CIP. Podíl 100 ng defosforylované DNA plasmidu pME18S byl navázán na 0,5 mikrogramů fragmentu MEC po jeho rozštěpení enzymy XbaI a XhoI. Vazba byla provedena pomocí dodávané sestavy (Takara Shuzo) a získaný produkt byl použit k transformaci *E. coli* kmene JM109 (Takara Shuzo).

DNA plasmidu, obsaženého v koloniích transformantů byla analyzována pomocí restrikčních enzymů tak, aby bylo možno identifikovat plasmidy, obsahující požadovanou DNA. Byl získán plasmid pMEC22, v němž je fragment MEC DNA uložen po směru exprese od promotoru SRalfa v plasmidu pMR18S ve správné orientaci pro expresi požadovaného imunoglobulinu.

3) Konstrukce plasmidu pMEHC20

a) První stupeň PCR

Provedení prvního stupně PCR je znázorněno na obr. 14.

HSEC

Byl připraven fragment DNA s kódovou sekvencí pro signální řetězec pro sekreci a pro N-konec oblasti FRH₁. Tento fragment bude dále uváděn jako HSEC DNA. K provedení PCR byly užity následující reakční podmínky:

Složení reakčního roztoku:

DNA plasmidu pCR3-H123, 1 mikrogram,
oligonukleotidový primer VHSN, 80 pmol,
oligonukleotidový primer VH1P, 80 pmol,
25 mM směsi dNTP, 20 mikrolitrů,
10x Pfu pufr, 20 mikrolitrů,
Pfu DNA polymeráza (Stratagene), 10 jednotek.

Nejprve byl reakční roztok zahřát na 2 minuty na 94 °C. Pak byl vzorek zahříván v cyklech 1 minuta při 94 °C, 1 minuta při 55 °C a 2 minuty při 72 °C. Tento cyklus byl 30x opakován. Pak byl reakční roztok inkubován 10 minut při teplotě 72 °C.

VH1

Byl připraven fragment DNA s kódovou sekvencí pro oblast FRH₁ a N-konec oblasti CDRH₁. Tento fragment bude dále uváděn jako fragment CH1 DNA. Při PCR byly použity následující reakční podmínky.

Složení reakčního roztoku:

DNA plasmidu pHH1-5, 1 mikrogram,
oligonukleotidový primer VHSP, 80 pmol,
oligonukleotidový primer VH2N, 80 pmol,
25 mM směsi dNTP, 20 mikrolitrů,
10x Pfu pufr, 20 mikrolitrů,
Pfu DNA polymeráza (Stratagene), 10 jednotek.

Nejprve byl reakční roztok zahřát na 2 minuty na 94 °C. Pak byl vzorek zahříván v cyklech 1 minuta při 94 °C, 1 minuta při 55 °C a 2 minuty při 72 °C. Tento cyklus byl 30x opakován. Pak byl reakční roztok inkubován 10 minut při teplotě 72 °C.

VH2

Byl připraven fragment DNA s kódovou sekvencí pro oblast CDRH₁, C-konec oblasti FRH₂ a N-konec oblasti CDRH₂. Tento fragment bude dále uváděn jako fragment VH2 DNA. PCR byla prováděna za následujících podmínek:

Složení reakčního roztoku:

DNA plasmidu pCR3-H123, 1 mikrogram,
oligonukleotidový primer VH2P, 80 pmol,
oligonukleotidový primer VH3N, 80 pmol,
25 mM směs dNTP, 20 mikrolitrů,
10x Pfu pufr, 20 mikrolitrů,
Pfu DNA polymeráza (Stratagene), 10 jednotek.

Nejprve byl reakční roztok zahřát na 2 minuty na 94 °C. Pak byl vzorek zahříván v cyklech 1 minuta při 94 °C, 1 minuta při 55 °C a 2 minuty při 72 °C. Tento cyklus byl 30x opakován. Pak byl reakční roztok inkubován 10 minut při teplotě 72 °C.

VH3

Byl připraven fragment DNA s kódovou sekvencí pro N-konec oblasti CDRH₂, oblast FRH₃ a oblast CDRH₃. Tento

fragment bude dále uváděn jako fragment VH3 DNA. PCR byla prováděna za následujících podmínek:

Složení reakčního roztoku:

DNA plasmidu pHH1-5, 1 mikrogram,
oligonukleotidový primer VH3P, 80 pmol,
oligonukleotidový primer VH4N, 80 pmol,
25 mM směs dNTP, 20 mikrolitrů,
10x Pfu pufr, 20 mikrolitrů,
Pfu DNA polymeráza (Stratagene), 10 jednotek.

Nejprve byl reakční roztok zahřát na 2 minuty na 94 °C. Pak byl vzorek zahříván v cyklech 1 minuta při 94 °C, 1 minuta při 55 °C a 2 minuty při 72 °C. Tento cyklus byl 30x opakován. Pak byl reakční roztok inkubován 10 minut při teplotě 72 °C.

VH4

Byl připraven fragment DNA s kódovou sekvencí pro oblast CDR-3, oblast FR-4 a N-konec konstantní oblasti řetězce H. Tento fragment bude dále uváděn jako fragment VH4 DNA. PCR byla prováděna za následujících podmínek:

Složení reakčního roztoku:

DNA plasmidu pHH1-5, 1 mikrogram,
oligonukleotidový primer VH4P, 80 pmol,
oligonukleotidový primer VHAPAN, 80 pmol,
25 mM směs dNTP, 20 mikrolitrů,
10x Pfu pufr, 20 mikrolitrů,
Pfu DNA polymeráza (Stratagene), 10 jednotek.

Nejprve byl reakční roztok zahřát na 2 minuty na 94 °C. Pak byl vzorek zahříván v cyklech 1 minuta při 94 °C, 1 minuta při 55 °C a 2 minuty při 72 °C. Tento cyklus byl 30x opakován. Pak byl reakční roztok inkubován 10 minut při teplotě 72 °C.

Fragmenty HSEC, VH1, VH2, VH3 a VH4 DNA, amplifikované svrchu uvedeným způsobem pomocí PCR byly extrahovány fenolem. Pak se DNA vysráží při použití 100% ethanolu. Vzorek DNA s hmotností přibližně 20 až 30 mikrogramů se pak podrobí elektroforéze na 5% polyakrylamidovém gelu. Gel se barví roztokem ethidiumbromidu 1 mikrogram/1 ml tak, že fragmenty DNA jsou viditelné v UV světle. Fragmenty DNA, prokázané tímto způsobem se z gelu vyříznou žiletkou, pak se provádí elektroeluce akrylamidového gelu v přístroji Centriruter (Amicon), opatřeném zařízením Centricon 10 (Amicon). Po eluci se DNA zahustí odstředěním 1 hodinu při přibližně 7500 g, načež se vysráží ethanolem. Výsledná DNA se vždy rozpustí v 50 mikrolitrech destilované vody.

b) Druhý stupeň PCR

Provádění druhého stupně PCR je znázorněno na obr. 15.

VHS12

Produkt s obsahem fragmentů HSEC, VH1 a VH2 DNA byl připraven s použitím PCR. Výsledný fragment bude dále označován jako fragment VHS12 DNA. PCR byla prováděna za následujících podmínek:

Složení reakčního roztoku:

roztok HSEC DNA z prvního stupně PCR, 10 mikrolitrů,

roztok VH1 DNA z prvního stupně PCR, 10 mikrolitrů,
roztok VH2 DNA z prvního stupně PCR, 10 mikrolitrů,
oligonukleotidový primer VH1P, 80 pmol,
oligonukleotidový primer VH3N, 80 pmol,
25 mM směs dNTP, 20 mikrolitrů,
10x Pfu pufr, 20 mikrolitrů,
Pfu DNA polymeráza (Stratagene), 10 jednotek.

Nejprve byl reakční roztok zahřát na 2 minuty na 94 °C. Pak byl vzorek zahříván v cyklech 1 minuta při 94 °C, 1 minuta při 55 °C a 2 minuty při 72 °C. Tento cyklus byl 30x opakován. Pak byl reakční roztok inkubován 10 minut při teplotě 72 °C.

VH34

Produkt s obsahem fragmentu VH3 DNA a fragmentu VH4 DNA byl připraven s použitím PCR. Tento fragment bude dále uváděn jako VH34 DNA. PCR byla prováděna za následujících podmínek:

Složení reakčního roztoku:

roztok VH3 DNA z prvního stupně PCR, 10 mikrolitrů,
roztok VH4 DNA z prvního stupně PCR, 10 mikrolitrů,
oligonukleotidový primer VH3P, 80 pmol,
oligonukleotidový primer VHAPAN, 80 pmol,
25 mM směs dNTP, 20 mikrolitrů,
10x Pfu pufr, 20 mikrolitrů,
Pfu DNA polymeráza (Stratagene), 10 jednotek.

Nejprve byl reakční roztok zahřát na 2 minuty na 94 °C. Pak byl vzorek zahříván v cyklech 1 minuta při 94 °C, 1 minuta při 55 °C a 2 minuty při 72 °C. Tento cyklus byl 30x opakován. Pak byl reakční roztok inkubován 10 minut při teplotě 72 °C.

Výsledné fragmenty VHS12 DNA a VH34 DNA, amplifikované svrchu uvedeným způsobem pomocí PCR byly extrahovány fenolem. Pak se DNA vysráží při použití 100% ethanolu. Vzorek DNA s hmotností přibližně 20 až 30 mikrogramů se pak podrobí elektroforéze na 5% polyakrylamidovém gelu. Gel se barví roztokem ethidiumbromidu 1 mikrogram/1 ml tak, že fragmenty DNA jsou viditelné v UV světle. Fragmenty DNA, prokázané tímto způsobem se z gelu vyříznou žiletkou, pak se provádí elektroeluce akrylamidového gelu v přístroji Centriruter (Amicon), opatřeném zařízením Centricon 10 (Amicon). Po eluci se DNA zahustí odstředěním 1 hodinu při přibližně 7500 g, načež se vysráží ethanolem. Výsledná DNA se vždy rozpustí v 50 mikrolitrech destilované vody.

c) Třetí stupeň PCR

Provedení třetího stupně PCR je znázorněno na obr. 16.

VHS1234

Produkt s obsahem fragmentu VHS12 DNA a VH34 DNA byl připraven s použitím PCR. Tento fragment bude dále uváděn jako VHS1234 DNA. PCR byla prováděna za následujících podmínek:

Složení reakčního roztoku:

roztok VHS12 DNA z druhého stupně PCR, 10 mikrolitrů,
roztok VH34 DNA z druhého stupně PCR, 10 mikrolitrů,

oligonukleotidový primer VH1P, 80 pmol,
oligonukleotidový primer VHAPAN, 80 pmol,
25 mM směs dNTP, 20 mikrolitrů,
10x Pfu pufr, 20 mikrolitrů,
Pfu DNA polymeráza, (Stratagene), 10 jednotek.

Nejprve byl reakční roztok zahřát na 2 minuty na 94 °C. Pak byl vzorek zahříván v cyklech 1 minuta při 94 °C, 1 minuta při 55 °C a 2 minuty při 72 °C. Tento cyklus byl 30x opakován. Pak byl reakční roztok inkubován 10 minut při teplotě 72 °C.

Výsledný fragment VHS1234 DNA, který byl amplifikován svrchu uvedeným způsobem při použití PCR, byl extrahován fenolem. Pak se DNA vysráží při použití 100% ethanolu. Vzorek DNA s hmotností přibližně 20 až 30 mikrogramů se pak podrobí elektroforéze na 5% polyakrylamidovém gelu. Gel se barví roztokem ethidiumbromidu 1 mikrogram/1 ml tak, že fragmenty DNA jsou viditelné v UV světle. Fragmenty DNA, prokázané tímto způsobem se z gelu vyřiznou žiletkou, pak se provádí elektroeluce akrylamidového gelu v přístroji Centriruter (Amicon), opatřeném zařízením Centricon 10 (Amicon). Po eluci se DNA zahustí odstředěním 1 hodinu při přibližně 7500 g, načež se vysráží ethanolem. Výsledná DNA se vždy rozpustí v 50 mikrolitrech destilované vody.

Konstrukce plasmidu s uloženým fragmentem VHS1234 DNA je znázorněna na obr. 17.

Fragment VHS1234 DNA, získaný uvedeným způsobem byl dále čištěn extrakcí fenolem a pak vysrážením ethanolem. Pak byla DNA rozštěpena restričními enzymy XhoI a ApaI.

Podíl 1 mikrogram DNA plasmidu pMEC22 byl rovněž rozštěpen restrikčními enzymy XhoI a ApaI defosforylován pomocí CIP. Podíl 100 ng defosforylované DNA plasmidu pMEC22 byl navázán na 0,5 mikrogramů fragmentu VHS1234 DNA po jeho rozštěpení enzymy XhoI a ApaI. Vazba byla provedena při použití běžně dodávané sestavy (Takara Shuzo) a produkt vazby byl použit k transformaci *E. coli* kmene JM109 (Takara Shuzo).

Analýza DNA plasmidu z transformovaných kolonií pomocí restrikčních enzymů byla provedena k identifikaci plasmidů s obsahem požadovaného fragmentu DNA. Byl získán plasmid pMEHC20 s obsahem fragmentu DNA VHS1234. Tento fragment byl uložen po směru exprese od promotoru SRalfa v plasmidu pMHC22 ve správné orientaci pro expresi výsledného imunoglobulinu.

4) Kontrukce plasmidu pHFR3 a plasmidu pHFR4

a) První stupeň PCR

Provedení prvního stupně PCR je znázorněno na obr. 18.

HUMFR5'

Byl připraven fragment DNA s kódovou sekvencí pro signální sekvencí pro sekreci, oblast FRH₁, oblast CDRH₁ a oblast FRH₂ (v níž byly zbytky aminokyselin v polohách 38 až 44 nahrazeny zbytky argininu, glutaminu, alaninu, prolinu, glycinu, glutaminu a glycinu). Tento fragment bude dále uváděn jako fragment HUMFR5' DNA. PCR byla prováděna za následujících podmínek:

Složení reakčního roztoku:

DNA plasmidu pMRHC20, 1 mikrogram;

oligonukleotidový primer VH1P, 80 pmol,
oligonukleotidový primer HUMFR2N, 80 pmol,
25 mM dNTP směsi, 20 mikrolitrů,
10x Pfu pufr, 20 mikrolitrů,
Pfu DNA polymeráza (Stratagene), 10 jednotek.

Nejprve byl reakční roztok zahřát na 2 minuty na 94 °C. Pak byl vzorek zahříván v cyklech 1 minuta při 94 °C, 1 minuta při 55 °C a 2 minuty při 72 °C. Tento cyklus byl 30x opakován. Pak byl reakční roztok inkubován 10 minut při teplotě 72 °C.

HUMFR3'

Byl připraven fragment DNA s kódovou sekvencí pro oblast FRH₂ (v níž byly zbytky aminokyselin v polohách 38 až 44 nahrazeny argininem, glutaminem, alaninem, prolinem, glycinem, glutaminem a glycinem), oblast CDRH₂, oblast FRH₃, oblast CDRH₃, oblast FRH₄ a N-konec konstantní oblasti řetězce H. Tento fragment bude dále uváděn jako fragment HUMFR3' DNA. PCR byla prováděna za následujících podmínek:

Složení reakčního roztoku:

DNA plasmidu pMEHC20, 1 mikrogram,
oligonukleotidový primer VHO6, 80 pmol,
oligonukleotidový primer HUMFR2P, 80 pmol,
25 mM směs dNTP, 20 mikrolitrů,
10x Pfu pufr, 20 mikrolitrů,
Pfu DNA polymeráza (Stratagene), 10 jednotek.

Nejprve byl reakční roztok zahřát na 2 minuty na 94 °C. Pak byl vzorek zahříván v cyklech 1 minuta při 94 °C, 1 minuta při 55 °C a 2 minuty při 72 °C. Tento cyklus byl 30x opakován. Pak byl reakční roztok inkubován 10 minut při teplotě 72 °C.

MOUFR5'

Byl připraven fragment DNA s kódovou sekvencí pro signální sekvenci pro sekreci, oblast FRH₁, oblast CDRH₁ a oblast FRH₂ (v níž byly zbytky aminokyselin v polohách 38 až 44 nahrazeny lysinem, glutaminem, alaninem, histidinem, glycinem, lysinem a serinem). Tento fragment bude dále uváděn jako fragment MOUFR5'DNA. PCR byla prováděna za následujících podmínek:

Složení reakčního roztoku:

DNA plasmidu pMEHC20, 1 mikrogram,
oligonukleotidový primer VH1P, 80 pmol,
oligonukleotidový primer MOUFR2N, 80 pmol,
25 mM směs dNTP, 20 mikrolitrů,
10x Pfu pufr, 20 mikrolitrů,
Pfu DNA polymeráza (Stratagene), 10 jednotek.

Nejprve byl reakční roztok zahřát na 2 minuty na 94 °C. Pak byl vzorek zahříván v cyklech 1 minuta při 94 °C, 1 minuta při 55 °C a 2 minuty při 72 °C. Tento cyklus byl 30x opakován. Pak byl reakční roztok inkubován 10 minut při teplotě 72 °C.

MOUFR3'

Byl připraven fragment DNA s kódovou sekvencí pro oblast FRH₂ (v níž byly zbytky aminokyseliny v polohách 38 až 44 nahrazeny lysinem, glutaminem, alaninem, histidinem, glycinem, lysinem a serinem), oblast CDRH₂, oblast FRH₃, oblast CDRH₃, oblast FRH₄ a N-konec konstantní oblasti řetězce H. Tento fragment bude dále uváděn jako fragment MOUFR3' DNA. PCR byla prováděna za následujících podmínek:

Složení reakčního roztoku:

DNA plasmidu pMEHC20, 1 mikrogram,
oligonukleotidový primer VH06, 80 pmol,
oligonukleotidový primer MOUFR2P, 80 pmol,
25 mM směs dNTP, 20 mikrolitrů,
10x Pfu pufr, 20 mikrolitrů,
Pfu DNA polymeráza (Stratagene), 10 jednotek.

Nejprve byl reakční roztok zahřát na 2 minuty na 94 °C. Pak byl vzorek zahříván v cyklech 1 minuta při 94 °C, 1 minuta při 55 °C a 2 minuty při 72 °C. Tento cyklus byl 30x opakován. Pak byl reakční roztok inkubován 10 minut při teplotě 72 °C.

HUMFR5', HUMFR3', MOUFR5' a MOUFR3' DNA, amplifikované svrchu uvedeným způsobem pomocí PCR byly extrahovány fenolem. Pak se DNA vysráží při použití 100% ethanolu. Vzorek DNA s hmotností přibližně 20 až 30 mikrogramů se pak podrobí elektroforéze na 5% polyakrylamidovém gelu. Gel se barví roztokem ethidiumbromidu 1 mikrogram/1 ml tak, že fragmenty DNA jsou viditelné v UV světle. Fragmenty DNA, prokázané tímto způsobem se z gelu vyříznou žiletkou, pak se provádí elektroeluce akrylamidového gelu v přístroji Centriruter

(Amicon), opatřeném zařízením Centricon 10 (Amicon). Po eluci se DNA zahustí odstředěním 1 hodinu při přibližně 7500 g, načež se vysráží ethanolem. Výsledná DNA se vždy rozpustí v 50 mikrolitrech destilované vody.

b) Druhý stupeň PCR

Druhý stupeň PCR je znázorněn na obr. 19.

HUMFR2

Produkt s obsahem fragmentů HUMFR5' a HUMFR3' DNA byl připraven při použití PCR. Tento fragment bude dále uváděn jako HUMFR2 DNA. PCR Byla prováděna za následujících podmínek:

Složení reakčního roztoku:

roztok HUMFR5' DNA z prvního stupně PCR, 10 mikrolitrů,
roztok HUMFR3' DNA z prvního stupně PCR, 10 mikrolitrů,
oligonukleotidový primer VH1P, 80 pmol,
oligonukleotidový primer VH06, 80 pmol,
25 mM směs dNTP, 20 mikrolitrů,
10x Pfu pufr, 20 mikrolitrů,
Pfu DNA polymeráza (Stratagene), 10 jednotek.

Nejprve byl reakční roztok zahřát na 2 minuty na 94 °C. Pak byl vzorek zahříván v cyklech 1 minuta při 94 °C, 1 minuta při 55 °C a 2 minuty při 72 °C. Tento cyklus byl 30x opakován. Pak byl reakční roztok inkubován 10 minut při teplotě 72 °C.

MOUFR2

Produkt s obsahem fragmentů MOUFR5' a MOUFR3' DNA byl připraven pomocí PCR. Tento produkt bude dále označován jako fragment MOUFR2 DNA. PCR byla prováděna za následujících podmínek:

Složení reakčního roztoku:

roztok MOUFR5' DNA z prvního stupně PCR, 10 mikrolitrů,
roztok MOUFR3' DNA z prvního stupně PCR, 10 mikrolitrů,
oligonukleotidový primer VH1P, 80 pmol,
oligonukleotidový primer VHO6, 80 pmol,
25 mM směs dNTP, 20 mikrolitrů,
Pfu DNA polymeráza (Stratagene), 10 jednotek.

Nejprve byl reakční roztok zahřát na 2 minuty na 94 °C. Pak byl vzorek zahříván v cyklech 1 minuta při 94 °C, 1 minuta při 55 °C a 2 minuty při 72 °C. Tento cyklus byl 30x opakován. Pak byl reakční roztok inkubován 10 minut při teplotě 72 °C.

Fragmenty HUMFR2 DNA a MOUFR2 DNA, amplifikované svrchu uvedeným způsobem pomocí PCR byly extrahovány fenolem. Pak se DNA vysráží při použití 100% ethanolu. Vzorek DNA s hmotností přibližně 20 až 30 mikrogramů se pak podrobí elektroforéze na 5% polyakrylamidovém gelu. Gel se barví roztokem ethidiumbromidu 1 mikrogram/1 ml tak, že fragmenty DNA jsou viditelné v UV světle. Fragmenty DNA, prokázané tímto způsobem se z gelu vyříznou žiletkou, pak se provádí elektroeluce akrylamidového gelu v přístroji Centriruter (Amicon), opatřeném zařízením Centricon 10 (Amicon). Po eluci se DNA zahustí odstředěním 1 hodinu při přibližně 7500 g, načež se vysráží ethanolem. Výsledná DNA se vždy rozpustí v 50 mikrolitrech destilované vody.

Konstrukce plasmidu s uloženým fragmentem HUMFR2 DNA a MOUFR2 DNA je znázorněna na obr. 20.

Fragmenty HUMFR2 a MOUFR2 DNA, získané tímto způsobem, byly dále čištěny extrakcí fenolem a pak vysrážením ethanolem. Pak byla DNA rozštěpena při použití restrikčních enzymů XhoI a BglII.

Podíl 1 mikrogram DNA plasmidu pMEHC20 byl rovněž rozštěpen restrikčními enzymy XhoI a BglII a pak byl defosforylován pomocí CIP. Podíl 100 ng defosforylované DNA plasmidu pMEHC20 byl navázán vždy na 0,5 mikrogramů fragmentu HUMFR2 nebo MOUFR2 po jejich rozštěpení Xho I a BglII. Vazba byla uskutečněna při použití běžně dodávané sestavy (Takara Shuzo) a produkt vazby byl použit k transformaci E. coli kmene JM109 (Takara Shuzo).

Byla provedena analýza sekvence DNA plasmidu z transformovaných kolonií pomocí restrikčních enzymů k identifikaci plasmidů s obsahem požadovaného fragmentu. Byl získán plasmid pHFR3, obsahující fragment HUMFR2 DNA a plasmid pHFR4, obsahující fragment MOUFR2 DNA.

5) Konstrukce plasmidu pMECW5

Plasmid pMECW5 byl zkonstruován pomocí PCR při použití DNA z plasmidu pMEC22 jako matrice pro PCR.

Provádění PCR je znázorněno na obr. 21.

a) První stupeň PCR

HHCl

Byl připraven fragment DNA, odpovídající 5'-terminální oblasti uloženého fragmentu DNA v plasmidu pMEC22. Tento

fragment bude dále označován jako HHC1 DNA. PCR byla prováděna za následujících podmínek:

Složení reakčního roztoku:

DNA plasmidu pMEC22, 1 mikrogram,
oligonukleotidový primer ME18P, 80 pmol,
oligonukleotidový primer GTOSN, 80 pmol,
25 mM směs dNTP, 20 mikrolitrů,
10x Pfu pufr, 20 mikrolitrů,
Pfu DNA polymeráza (Stratagene), 10 jednotek.

Nejprve byl reakční roztok zahřát na 2 minuty na 94 °C. Pak byl vzorek zahříván v cyklech 1 minuta při 94 °C, 1 minuta při 55 °C a 2 minuty při 72 °C. Tento cyklus byl 30x opakován. Pak byl reakční roztok inkubován 10 minut při teplotě 72 °C.

HHC2

Byl připraven fragment DNA, odpovídající vnitřní oblasti DNA, uložené do plasmidu pMEC22. Tento fragment bude dále uváděn jako fragment HHC2 DNA. PCR byla prováděna za následujících podmínek:

Složení reakčního roztoku:

DNA plasmidu pMEC22, 1 mikrogram,
oligonukleotidový primer GTOSP, 80 pmol,
oligonukleotidový primer TCVVN1, 80 pmol,
25 mM směs dNTP, 20 mikrolitrů,
10x Pfu pufr, 20 mikrolitrů,
Pfu DNA polymeráza (Stratagene), 10 jednotek.

Nejprve byl reakční roztok zahřát na 2 minuty na 94 °C. Pak byl vzorek zahříván v cyklech 1 minuta při 94 °C, 1 minuta při 55 °C a 2 minuty při 72 °C. Tento cyklus byl 30x opakován. Pak byl reakční roztok inkubován 10 minut při teplotě 72 °C.

HHC3

Byl připraven fragment DNA, odpovídající 3'-terminální oblasti DNA, uložené do plasmidu pMEC22. Tento fragment bude dále označován jako fragment HHC3 DNA. PCR byla prováděna za následujících podmínek:

Složení reakčního roztoku:

DNA plasmidu pMEC22, 1 mikrogram,
oligonukleotidový primer TCVVAP, 80 pmol,
oligonukleotidový primer VHTERM, 80 pmol,
25 mM směs dNTP, 20 mikrolitrů,
10x Pfu pufr, 20 mikrolitrů,
Pfu DNA polymeráza (Stratagene), 10 jednotek.

Nejprve byl reakční roztok zahřát na 2 minuty na 94 °C. Pak byl vzorek zahříván v cyklech 1 minuta při 94 °C, 1 minuta při 55 °C a 2 minuty při 72 °C. Tento cyklus byl 30x opakován. Pak byl reakční roztok inkubován 10 minut při teplotě 72 °C.

Fragmenty HHC1, HHC2 a HHC3 DNA, amplifikované svrchu uvedeným způsobem pomocí PCR byly extrahovány fenolem. Pak se DNA vysráží při použití 100% ethanolu. Vzorek DNA s hmotností přibližně 20 až 30 mikrogramů se pak podrobí elektroforéze na 5% polyakrylamidovém gelu. Gel se barví roztokem ethidiumbromidu 1 mikrogram/1 ml tak, že fragmenty DNA jsou viditelné v UV světle. Fragmenty DNA, prokázané

tímto způsobem se z gelu vyříznou žiletkou, pak se provádí elektroeluce akrylamidového gelu v přístroji Centriruter (Amicon), opatřeném zařízením Centricon 10 (Amicon). Po eluci se DNA zahustí odstředěním 1 hodinu při přibližně 7500 g, načež se vysráží ethanolem. Výsledná DNA se vždy rozpustí v 50 mikrolitrech destilované vody.

b) Druhý stupeň PCR

Provedení druhého stupně PCR je znázorněno na obr. 22.

HHCl-2

Byl připraven produkt, obsahující fragment HHCl DNA a fragment HHC2 DNA. Tento fragment, připravený pomocí PCR bude dále uváděn jako fragment HHCl-2 DNA. PCR byla prováděna za následujících podmínek:

Složení reakčního roztoku:

roztok HHCl DNA z prvního stupně PCR, 10 mikrolitrů,

roztok HHC2 DNA z prvního stupně PCR, 10 mikrolitrů,

oligonukleotidový primer ME18P, 80 pmol,

oligonukleotidový primer TCVVN, 80 pmol,

25 mM směs dNTP, 20 mikrolitrů,

10x Pfu pufr, 20 mikrolitrů,

Pfu DNA polymeráza (Stratagene), 10 jednotek.

Nejprve byl reakční roztok zahřát na 2 minuty na 94 °C. Pak byl vzorek zahříván v cyklech 1 minuta při 94 °C, 1 minuta při 55 °C a 2 minuty při 72 °C. Tento cyklus byl 30x opakován. Pak byl reakční roztok inkubován 10 minut při teplotě 72 °C.

Získaný fragment HHCl-2 se extrahuje fenolem. Pak se DNA vysráží při použití ethanolu. Získá se 20 až 30 mikrogramů DNA, které se podrobí elektroforéze na 5% polyakrylamidovém gelu. Po ukončení elektroforézy se pak gel barví roztokem ethidiumbromidu 1 mikrogram/1 ml tak, že fragmenty DNA jsou viditelné v UV světle. Fragmenty DNA, prokázané tímto způsobem se z gelu vyříznou žiletkou, pak se provádí elektroeluce akrylamidového gelu v přístroji Centriruter (Amicon), opatřeném zařízením Centricon 10 (Amicon). Po eluci se DNA zahustí odstředěním 1 hodinu při přibližně 7500 g, načež se vysráží ethanolem. Výsledná DNA se vždy rozpustí v 50 mikrolitrech destilované vody.

c) Třetí stupeň PCR

Provedení třetího stupně PCR je znázorněno na obr. 23.

HHCl23

Produkt s obsahem fragmentů DNA HHCl-2 a HHC3 se připraví při použití PCR. Výsledný fragment bude dále uváděn jako fragment DNA HHCl23. PCR byla prováděna za následujících podmínek:

Složení reakčního roztoku:

~~roztok HHC3 DNA z prvního stupně PCR, 10 mikrolitrů,~~
roztok HHCl-2 DNA z druhého stupně PCR, 10 mikrolitrů,
oligonukleotidový primer MR18P, 80 pmol,
oligonukleotidový primer VHTERM, 80 pmol,
25 mM směs dNTP, 20 mikrolitrů,
10x Pfu pufr, 20 mikrolitrů,
Pfu DNA polymeráza (Stratagene), 10 jednotek.

Nejprve byl reakční roztok zahřát na 2 minuty na 94 °C. Pak byl vzorek zahříván v cyklech 1 minuta při 94 °C, 1 minuta při 55 °C a 2 minuty při 72 °C. Tento cyklus byl 30x opakován. Pak byl reakční roztok inkubován 10 minut při teplotě 72 °C.

Získaný fragment HHC123 se extrahuje fenolem. Pak se DNA vysráží při použití ethanolu. Získá se 20 až 30 mikrogramů DNA, které se podrobí elektroforéze na 5% polyakrylamidovém gelu. Po ukončení elektroforézy se pak gel barví roztokem ethidiumbromidu 1 mikrogram/1 ml tak, že fragmenty DNA jsou viditelné v UV světle. Fragmenty DNA, prokázané tímto způsobem se z gelu vyříznou žiletkou, pak se provádí elektroeluce akrylamidového gelu v přístroji Centriruter (Amicon), opatřeném zařízením Centricon 10 (Amicon). Po eluci se DNA zahustí odstředěním 1 hodinu při přibližně 7500 g, načež se vysráží ethanolem. Výsledná DNA se vždy rozpustí v 50 mikrolitrech destilované vody.

Konstrukce plasmidu s uloženým fragmentem DNA HHC123 je znázorněna na obr. 24.

Fragment DNA HHC123, získaný tímto způsobem, byl dále čištěn extrakcí fenolem s následným srážením ethanolem. Pak byla DNA rozštěpena restričními enzymy XhoI a XbaI.

Podíl 1 mikrogram DNA plasmidu pME18S (Hara T. a Miyajima A., svrchu) byl rovněž rozštěpen restričními enzymy XhoI a XbaI a pak byl defosforylován s použitím CIP. Podíl 100 ng defosforylované DNA plasmidu pME18S byl pak navázán na 0,5 mikrogramů DNA HHC123 po rozštěpení enzymy XhoI a XbaI. Vazba byla uskutečněna při použití běžně dodávané sestavy (Takara Shuzo) a výsledná DNA byla použita k transformaci E. coli kmene JM109 (Takara Shuzo).

Byla provedena analýza DNA plasmidu, obsaženého v koloniích transformantů působením restričních enzymů tak, aby bylo možno identifikovat plasmidy, obsahující požadovaný uložený úsek DNA. Byl identifikován plasmid pMRCW5, obsahující fragment DNA HHC123.

- 6) Konstrukce plasmidů pro expresi p_H/uH5-1 a p_H/uM1-1 s kódovými sekvencemi pro humanizovaný řetězec H protilátky CH11

Výsledné plasmidy pro expresi, p_H/uH5-1 a p_H/uM1-1, byly zkonstruovány spojením DNA z plasmidu pHFR3, z plasmidu pHFR4 a z plasmidu pMRCW5. Konstrukce výsledných plasmidů je znázorněna na obr. 25.

Fragment DNA HFR3 byl připraven následujícím způsobem. Podíl 30 mikrogramů DNA plasmidu pHFR3 byl rozštěpen současně restričními enzymy a ApaI a XhoI. Produkty štěpení byly děleny elektroforézou na 5% polyakrylamidovém gelu. Gel byl barven ethidiumbromidem s obsahem 1 mikrogram/ml, takže fragmenty DNA bylo možno pozorovat v UV světle. Fragmenty DNA, zjištěné tímto způsobem měly rozměr přibližně 950 bp. Tyto fragmenty byly z gelu vyříznuty žiletkou a izolovány elektroelucí při použití přístroje Centriruter (Amicon), opatřeného zařízením Centricon 10 (Amicon).

~~Fragment DNA HFR4 byl připraven následujícím způsobem.~~
Podíl 30 mikrogramů DNA plasmidu pHFR4 byl rozštěpen současně restričními enzymy a ApaI a XhoI. Produkty štěpení byly děleny elektroforézou na 5% polyakrylamidovém gelu. Gel byl barven ethidiumbromidem s obsahem 1 mikrogram/ml, takže fragmenty DNA bylo možno pozorovat v UV světle. Fragmenty DNA, zjištěné tímto způsobem měly rozměr přibližně 950 bp. Tyto fragmenty byly z gelu vyříznuty žiletkou a izolovány elektroelucí při použití přístroje Centriruter (Amicon), opatřeného zařízením Centricon 10 (Amicon).

Podíl 1 mikrogram DNA plasmidu pMECW5 se rozštěpí restrikčními enzymy XhoI a ApaI a pak se deformoryluje při použití CIP. Podíl 100 ng defosforylované DNA plasmidu pMECW5 se naváže na 0,5 mikrogramů každého ze svrchu připravených fragmentů DNA HFR3 a HFR4. Vazba se provádí při použití běžně dodávané sestavy (Takara Shuzo) a produkt reakce se použije k transformaci E. coli kmene DH5alfa.

Provádí se analýza sekvence DNA plasmidu, obsaženého v koloniích transformantů pomocí restrikčních enzymů k identifikaci plasmidů, obsahujících uložené fragmenty DNA. Byl identifikován plasmid pH_{uH5-1}, obsahující fragment DNA HFR3 a plasmid pH_{uM1-1}, obsahující fragment DNA HFR4.

7) Ověření nukleotidových sekvencí

Byly analyzovány sekvence úseků DNA, uložených v plasmidech pH_{uH5-1} a pH_{uM1-1}. K analýze sekvencí byly použity primery ME18P (SEQ ID No. 176) a VH06 (SEQ ID No.178), popsané svrchu a mimoto osm dalších primerů:

ME18RV; (SEQ ID No. 177);

VH05; (SEQ ID No. 179);

VH07; (SEQ ID No. 180);

VH08; (SEQ ID No. 181);

VH01; (SEQ ID No. 182);

VH02; (SEQ ID No. 183);

VH03; (SEQ ID No. 184); a

VH04; (SEQ ID No. 185).

Analýza sekvence DNA byla provedena při použití didioxynukleotidových koncových skupin (Sanger F. S. a další, svrchu). Před analýzou sekvence byla DNA plasmidu jako matrice

z hostitelských buněk jejich rozrušením v alkalickém prostředí s obsahem SDS (Sambrook J. a další, svrchu) a DNA pak byla čištěna při použití chloridu cesného podle téže publikace.

Analýza sekvence potvrdila, že sekvence DNA, uložená v plasmidu pH_uH5-1 je kódovou sekvencí pro polypeptid, definovaný jako SEQ ID No. 86. Sekvence DNA, uložené do plasmidu je kódovou sekvencí pro polypeptid, definovaný jako SEQ ID No. 88.

Příklad 7

Expres genů s kódovými sekvencemi pro podjednotky humanizované protilátky CH11 v buňkách COS-7

Humanizovaná DNA pro řetězec H a humanizovaná DNA pro řetězec L, zkonstruované svrchu uvedeným způsobem, byly uloženy do buněčné linie COS-7, odvozené od opičích ledvin, k dosažení exprese. Plasmidy pro expresi humanizovaného řetězce H a humanizovaného řetězce L byly použity k transfekci buněk COS-7 otevřením pórů působením elektrického proudu při použití zařízení pro transfekci ECM600M (BTX).

Buňky COS-7 (ATCC č. CRL-1651) byly pěstovány v běžné lahvi s plochou 225 cm² (Sumitomo Bakelite). Buňky byly pěstovány téměř až do vytvoření souvislé vrstvy v Eaglově základním prostředí v Dulbeccově modifikaci, toto prostředí je uváděno jako DMEM (Nissui Seiyaku) s obsahem 10 % fetálního séra skotu (CSL). Prostředí se pak odstraní a buněčný materiál se zpracovává přidáním 3 ml roztoku trypsinu s EDTA (Sigma Chemicals Co.) na 3 minuty při 37 °C. Pak byl buněčný materiál oddělen odstředěním 2 minuty při 800 ot/min a dvakrát promyt fosfátovým pufrem s obsahem 0,02 % hmotnostní chloridu draselného, 0,02 % hmotností dihydrogenfosforečnanu

draselného, 0,8 % hmotnostních chloridu sodného a 1,15 % hmotnostních hydrogenfosforečnanu sodného, tento pufr bude dále označován jako pufr PBS(-), (Nissui Seiyaku). Promyté buňky COS-7 byly upraveny puforem PBS(-) za vzniku buněčné suspenze, obsahující 4×10^6 buněk/ml.

Paralelně byla připravena DNA plasmidu z plasmidů pro expresi řetězce H a řetězce L při použití běžně dodávané sestavy pro přípravu a čištění DNA Maxiprep (Promega). Podíl 40 mikrogramů DNA z plasmidu pro expresi těžkého řetězce i plasmidu pro expresi lehkého řetězce byl promíchán v téže zkumavce a pak byl materiál vysrážen 100% ethanolem. Kombinace DNA pro lehký a těžký řetězec jsou dále uvedeny. Pak byla DNA znovu uvedena do suspenze ve 40 mikrolitrech pufru PBS(-). Výsledných 40 mikrolitrů směsi plasmidů bylo pak uvedeno do styku s 500 mikrolitry suspenze buněk COS-7 s hustotou 2×10^6 buněk/ml, tak jak byla svrchu připravena.

Směs byla přenesena do kyvety pro otevření pórů působením elektrického proudu s elektrodami v odstupu 4 mm (BioRad) a kyveta pak byla uložena do příslušného zařízení. Při otevření pórů bylo použito pulzů o 150 V, 900 μ F. Po otevření pórů byla směs buněk a DNA znovu uvedena do suspenze ve 20 ml prostředí DMEM s obsahem 10 % fetálního séra skotu a pak přenesena do lahve s plochou 75 cm² pro pěstování kultur (Sumitomo Bakelit). Buněčný materiál byl inkubován 24 hodiny při teplotě 37 °C v přítomnosti 7,5 % oxidu uhličitého. Supernatant kultury byl odstraněn a buněčný materiál byl promyt prostředím DMEM, prostým séra. Podíl 20 ml čerstvého prostředí DMEM, prostého séra byl pak přidán k buněčnému materiálu a buňky byly pěstovány 24 hodin při 37 °C v prostředí s obsahem 7,5 % oxidu uhličitého. Pak byl oddělen supernatant.

Buňky COS-7 byly podrobeny transfekci následujícími plasmidy nebo kombinacemi plasmidů při použití svrchu uvedeného postupu. V každém z těchto případů byl pak izolován supernatant.

- (A): pME18S
- (B): pH μ M1-1 a pH κ KY2-58
- (C): pH μ M1-1 a pH κ KF2-19
- (D): pH μ M1-1 a pH κ RY2-10
- (E): pH μ M1-1 a pH κ RF2-52
- (F): pH μ H5-1 a pH κ KY2-58
- (G): pH μ H5-1 a pH κ KF2-19
- (H): pH μ H5-1 a pH κ RY2-10
- (I): pH μ H5-1 a pH κ RF2-52

Zkušební příklad 1

Detekce humanizovaných protilátek proti lidskému Fas

Humanizované protilátky proti lidskému Fas, získané způsobem podle vynálezu byly identifikovány metodou Western blot. Tento postup zahrnuje oddělení bílkovin na SDS-polyakrylamidovém gelu elektroforézou, dále uváděnou jako SDS-PAGE s následným přenosem na nitrocelulosovou membránu. Přenesenou bílkovinu je pak možno identifikovat zkříženou reakcí s protilátkami.

1) Dělení pomocí SDS-PAGE

Podíl 1 ml supernatantu kultury, získaného v příkladu 7, byl dialyzován proti 5 litrům čištěné vody při použití dialyzační trubice, oddělující látky od molekulové hmotnosti

12000 až 14000. Dialýza se provádí 15 hodin při teplotě 4 °C. Výsledný roztok se zahustí ve vakuu při použití koncentračního zařízení CC-101 (Tomy Seiko). Pak se přidá podíl 10 mikrolitrů pufru pro vzorek, který obsahuje 2 % hmotnostní SDS pro elektroforézu (BioRad), 5 % objemových beta-merkaptóethanolu (Sigma Chemicals Co.), 10 % objemových glycerolu a 0,1 % hmotnostní bromfenolové modři, načež se směs na 5 minut zahřeje na 100 °C. Takto připravený vzorek pro elektroforézu se nanese na gel pro SDS-PAGE, gradient 4 až 20 % (Iwaki Glass) a elektroforéza se provádí 1 hodinu při teplotě místnosti a při stálé intenzitě proudu 20 mA.

2) Přenos a imobilizace bílkovin

Po ukončení elektroforézy se bílkoviny přenesou z gelu na nitrocelulózovou membránu Transblot Transfer Membrane (BioRad) při použití polosuchého postupu podle Towbin H. a další, 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 4350. Bylo užito následující zařízení a podmínky:

pufr pro přenos:	20 mM tris, 150 mM glycinu, 10 % objemových metnaolu,
přístroj pro blot:	Iwaki Glass, TF03-050,
podmínky postupu:	4 °C, konstantní proud 0,2 A, 1 h.

~~SDS-PAGE a Western blot byly provedeny vždy ve dvojím opakování za týchž podmínek, takže byly získány dvě totožné nitrocelulózové membrány. Jedna z membrán byla analyzována k detekci řetězce H a druhá k detekci řetězce L.~~

3) Detekce protilátek

Po provedení přenosu byly nitroceluloseové membrány ponořeny do vodného roztoku, obsahujícího 20 mM tris-HCl pufru o pH 7,5 s 500 mM chloridu sodného (pufr TBS) a s 3 % hmotnostními želatiny (Nippon BioRad). Roztok s membránami byl opatrně protřepáván 1 hodinu při teplotě místnosti, tento postup se obvykle uvádí jako "blokování".

Detekce řetězců H humanizovaných protilátek byla prováděna při použití protilátky proti lidskému řetězci IgM H, značené peroxidázou, šlo o kozí protilátku proti lidskému IgM, konjugovanou s peroxidázou, specifický fragment Fc5_u (AffiniPure, Jackson Immuno-research Laboratory). Po blokování byly nitroceluloseové membrány vyjmuty z blokovacího roztoku a 4 hodiny protřepávány v 10 ml pufru TBS s obsahem 1 % hmotnostní želatiny, pufr rovněž obsahoval 5 mikrolitrů značené protilátky proti lidskému IgM H. Pak byly nitroceluloseové membrány vyjmuty a ponořeny do 20 ml roztoku TBS s obsahem 2 % objemových Tween 20 (BioRad) a v tomto roztoku promyty opatrným protřepáváním 20 minut při teplotě místnosti. Toto promytí bylo ještě jednou opakováno a pak byly nitroceluloseové membrány osušeny pomocí svého papíru.

Zkřížená reaktivita mezi protilátkou a bílkovinou na membráně byla prokazována pomocí účinnosti peroxidázy, konjugované s protilátkou.

Zbývající účinnost peroxidázy na membráně byla prokazována pomocí systému ECL Western blot (Amersham). Substrát v tomto systému vysílá světlo v průběhu chemické reakce v důsledku katalytického působení peroxidázy. Toto světlo je možno prokázat při použití kamery ECL Mini Camera (Amersham) s filmem typ 667 (Polaroid). Bílkoviny, zbývající v gelu byly

barveny stříbrem podle Oakley a další, 1980, Anal. Biochem., 105, str. 361 a následující. Získané fotografie byly srovnávány s gelem, barveným stříbrem k identifikaci pásů bílkoviny, specificky vázaných na protilátku.

Detekce řetězce L humanizovaných protilátek byla prováděna při použití protilátky proti lidskému řetězci IgM L, značené peroxidázou, "Peroxidase-Labeled Monoclonal Antibody to Human Kappa Light Chain HP6156" (Kilkeguard and Perry Laboratory). Po blokování byly nitrocelulosové membrány vyjmuty z blokovacího roztoku a protřepávány v 10 ml pufru, tvořeného TBS roztokem s obsahem 1 % hmotnostní želatiny a s obsahem 10 mikrolitrů značené protilátky proti lidskému řetězci IgM L, při teplotě místnosti celkem 4 hodiny. Pak byly nitrocelulosové membrány vyjmuty, ponořeny do 20 ml roztoku TBS s obsahem 0,05 % objemových Tween 20 a promyty opatrným protřepáváním 20 minut při teplotě místnosti. Toto promytí bylo ještě jednou opakováno. Pak byly nitrocelulosové membrány vysušeny savým papírem.

Stejně jako v případě humanizovaného řetězce H byly jakékoliv bílkoviny, reagující s protilátkou prokazovány pomocí systému ECL Western blot (Amersham). Zkřížená reakce byla provázena vývojem světla, zachyceným na fotografickém filmu. Získané obrázky byly srovnávány s gelem, barveným stříbrem tak, aby bylo možno identifikovat pásy pro bílkovinu, specificky vázanou na protilátku.

Při použití protilátky, specifické pro lidský řetězec H bylo možno prokázat pás s molekulovou hmotností přibližně 78 000 ve vzorcích B, C, D, E, F, G, H a I z příkladu 7. Tyto vzorky všechny pocházely z buněk COS-7 po jejich transfekci plasmidem pH_uM1-1 nebo pH_uH5-1.

Použití protilátky, specifické pro lidský řetězec L vedlo k detekci pásu s molekulovou hmotností přibližně 25 000 ve vzorcích B, C, D, E, F, G, H a I z příkladu 7. Všechny tyto vzorky pocházely z buněk COS-7 po jejich transfekci plasmidem pHkKY2-58, plasmidem pHkKF2-19, plasmidem pHkRY2-10 nebo plasmidem pHkRF2-52.

Zkušební příklad 2

Stanovení účinnosti vazby protilátek proti Fas na antigen Fas

Schopnost humanizovaných protilátek proti Fas podle vý-
nálezu vázat se na antigen Fas byla stanovena metodou ELISA.
Tento postup zahrnuje přípravu rozpustné složené bílkoviny,
obsahující lidský Fas s následnou detekcí vazby protilátky na
tuto rozpustnou bílkovinu.

- 1) Exprese složené bílkoviny s rozpustným lidským
antigenem Fas

Aby bylo možno získat rozpustný lidský antigen Fas,
byl zkonstruován vektor pro expresi složené bílkoviny, tvo-
řený extracelulární doménou lidského antigenu Fas a extra-
celulární doménou myšího receptoru pro interleukin-3. Tato
bílkovina bude dále uváděna jako složená bílkovina s obsahem
lidského Fas.

DNA s kódovou sekvencí pro složenou bílkovinu s obsahem
lidského Fas byla připravena pomocí PCR tímto způsobem:

a) Matrice DNA

DNA ze dvou plasmidů byla užita při PCR k získání bíl-
koviny s obsahem lidského Fas. Prvním plasmidem byl plasmid

pME18S-mFas-AIC (Nishimura Y., a další, 1995, J. Immunol., 154, 4395) s kódovou sekvencí pro složenou bílkovinu, obsahující extracelulární doménu myšího antigenu Fas (Watanabe-Fukunaga R. a další, 1992, J. Immunol., 148, 1274 a následující) a extracelulární doménu myšího receptoru pro interleukin-3 (Gorman D. a další, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 87, 5459 a následující, Hara T. a Miyajima A., 1992, EMBO J. 11, 1875). Druhý plasmid, pCEV4 obsahuje kódovou cDNA pro lidský antigen Fas (Itoh N. a další, 1991, Cell, 66, 233).

b) Příprava primerů

K provádění PCR byly připraveny čtyři nukleotidové primery s následujícími sekvencemi:

N1, (SEQ. ID No. 186),
C3N, (SEQ. ID No. 187),
N3N, (SEQ. ID No. 188) a
CTN2, (SEQ. ID No. 189).

c) První stupeň PCR

Provedení prvního stupně PCR je znázorněno na obr. 26.

HFAS

Byl připraven fragment DNA s kódovou sekvencí pro extracelulární doménu lidského antigenu Fas. Tento fragment bude dále označován jako fragment DNA HFAS. PCR byla prováděna při použití sestavy LA PCR (Takara Shuzo) za následujících podmínek:

složení reakčního roztoku:

DNA plasmidu pCEV4, 20 ng,

oligonukleotidový primer N1, 0,5 mikrogramů,
oligonukleotidový primer C3N, 0,5 mikrogramů,
směs dNTP. 25 mikrolitrů,
10x La PCR pufr, 25 mikrolitrů,
LA Taq polymeráza (Takara Shuzo), 12,5 jednotek.

Konečný objem roztoku byl doplněn redestilovanou vodou na 250 mikrolitrů. Směs dNTP, 10 x LA PCR pufr a LA Taq polymeráza se dodávají jako součást sestavy.

Nejprve byl reakční roztok zahřát na 2 minuty na 94 °C. Pak byl vzorek zahříván v cyklech 1 minuta při 94 °C, 1 minuta při 55 °C a 2 minuty při 72 °C. Tento cyklus byl 30x opakován. Pak byl reakční roztok inkubován 10 minut při teplotě 72 °C.

MAIC

Byl připraven fragment DNA s kódovou sekvencí pro extracelulární doménu myšního receptoru pro interleukin-3. Tento fragment bude dále uváděn jako fragment DNA MAIC. PCR byla prováděna při použití sestavy LA PCR (Takara Shuzo) za následujících podmínek:

Složení reakčního roztoku:

DNA plasmidu pMR18S-mFas-AIC, 20 ng,
oligonukleotidový primer N3N, 0,5 mikrogramů,
oligonukleotidový primer CTN2, 0,5 mikrogramů,
směs dNTP, 25 mikrolitrů,
10 x LA PCR pufr, 25 mikrolitrů,
LA Taq polymeráza (Takara Shuzo), 12,5 jednotek.

Konečný objem roztoku byl doplněn na 250 mikrolitrů redestilovanou vodou. Směs dNTP, 10 x La PCR pufr a LA Taq polymeráza jsou dodávány jako součást sestavy.

Nejprve byl reakční roztok zahřát na 2 minuty na 94 °C. Pak byl vzorek zahříván v cyklech 1 minuta při 94 °C, 1 minuta při 55 °C a 2 minuty při 72 °C. Tento cyklus byl 30x opakován. Pak byl reakční roztok inkubován 10 minut při teplotě 72 °C.

Fragmenty HFAS DNA a MAIC DNA, takto amplifikované svrhu uvedeným způsobem pomocí PCR byly extrahovány fenolem. Pak se DNA vysráží při použití 100% ethanolu. Vzorek DNA s hmotností přibližně 20 až 30 mikrogramů se pak podrobí elektroforéze na 5% polyakrylamidovém gelu. Gel se barví roztokem ethidiumbromidu 1 mikrogram/1 ml tak, že fragmenty DNA jsou viditelné v UV světle. Fragmenty DNA, prokázané tímto způsobem se z gelu vyříznou žiletkou, pak se provádí elektroeluce akrylamidového gelu v přístroji Centriruter (Amicon), opatřeném zařízením Centricon 10 (Amicon). Po eluci se DNA zahustí odstředěním 1 hodinu při přibližně 7500 g, načež se vysráží ethanolem. Výsledná DNA se vždy rozpustí v 50 mikrolitrech destilované vody.

d) Druhý stupeň PCR

Provedení druhého stupně PCR je znázorněno na obr. 27.

FASAIC

Byl připraven fragment DNA s kódovou sekvencí pro složenou bílkovinu s obsahem lidského Fas. Tento fragment bude dále uváděn jako fragment FASAIC. PCR byla prováděna při použití sestavy LA PCR (Takara Shuzo)) za těchto podmínek:

Složení reakčního roztoku:

roztok HFAS DNA z prvního stupně PCR, 20 mikrolitrů,
roztok MAIC DNA z prvního stupně PCR, 20 mikrolitrů,
oligonukleotidový primer N1, 0,5 mikrogramů,
oligonukleotidový primer CTN2, 0,5 mikrogramů,
směs dNTP, 25 mikrolitrů,
10x LA PCR pufr, 25 mikrolitrů,
LA Taq polymeráza (Takara Shuzo), 12,5 jednotek.

Konečný objem roztoku byl doplněn na 250 mikrolitrů redestilovanou vodou. Směs dNTP, 10 x LA PCR pufr a LA Taq polymeráza tvoří součást sestavy.

Nejprve byl reakční roztok zahřát na 2 minuty na 94 °C. Pak byl vzorek zahříván v cyklech 1 minuta při 94 °C, 1 minuta při 55 °C a 2 minuty při 72 °C. Tento cyklus byl 30x opakován. Pak byl reakční roztok inkubován 10 minut při teplotě 72 °C.

Takto získaný fragment FASAIC DNA, amplifikovaný svrchu uvedeným způsobem pomocí PCR byl extrahován fenolem. Pak byla DNA vysrážena 100% ethanolem. Přibližně 20 až 30 mikrogramů této DNA pak bylo podrobeno elektroforéze na 5% polyakrylamidovém gelu. Gel byl zbarven ethidiumbromidem 1 mikrogram/1 ml, takže fragmenty DNA byly viditelné v UV-světle. Tímto způsobem zjištěné fragmenty DNA pak byly z gelu vyříznuty žiletkou a podrobeny elektroeluci z akrylamidového gelu při použití přístroje Centriruter (Amicon), opatřeného zařízením Centricon 10 (Amicon). DNA pak byla zahuštěna odstředěním 1 hodinu při přibližně 7500 g, načež byla vysrážena ethanolem. Výsledná DNA byla vždy rozpuštěna v 50 mikrolitrech destilované vody.

Konstrukce plasmidu s uloženým fragmentem DNA FASAIC je znázorněna na obr. 28.

Fragment DNA FASAIC, získaný tímto způsobem, byl dále čištěn extrakcí fenolem a pak vysrážením ethanolem. Pak byla DNA rozštěpena restrikčními enzymy EcoRI a XbaI.

Podíl 2 mikrogramy DNA plasmidu pME18S-mFas-AIC byl rozštěpen restrikčními enzymy EcoRI a XbaI. Produkty štěpení byly děleny elektroforézou na 0,8% agarosovém gelu. Gel byl barven ethidiumbromidem 1 mikrogram/ml tak, že fragmenty DNA bylo možno pozorovat v UV světle. Pás DNA s velikostí přibližně 3000 bp byl vyříznut žiletkou k izolaci DNA.

Část svrchu získané rozštěpené DNA plasmidu pME18S-mFas-AIC byl navázán na část fragmentu DNA FASAIC po jeho rozštěpení enzymy EcoRI a XbaI. Vazba byla uskutečněna při použití sestavy pro vazbu a produkt vazby byl užit k transformaci *E. coli* kmene DH5alfa.

Analýza sekvence DNA plasmidu, obsaženého v koloniích transformantů byla prováděna pomocí restrikčních enzymů k identifikaci plasmidů, obsahujících uložený požadovaný fragment. Byl identifikován plasmid pHFas-AIC2, obsahující fragment DNA FASAIC s kódovou sekvencí pro složenou bílkovinu s obsahem lidského Fas, uložený po směru exprese od promotoru SRalfa ve správné orientaci pro expresi výsledného imunoglobulinu.

e) Exprese v buňkách COS-7

Svrchu získaný plasmid pro expresi složené bílkoviny s obsahem lidského Fas byl použit k transfekci buněk COS-7 při otevření pórů elektrickým proudem za použití přístroje k provádění transfekce ECM600 M (BTX).

Buňky COS-7, ATCC č. CRL-1651, byly pěstovány v lahvi s plochou 225 cm^2 (Sumitomo Bakelite). Buněčný materiál byl pěstován téměř do vytvoření spojitě vrstvy v prostředí DMEM s obsahem 10 % fetálního séra skotu (CSL). Prostředí bylo odstraněno a buňky COS-7 byly zpracovány 3 minuty přidáním 3 ml roztoku trypsinu s EDTA (Sigma Chemical Co.) při teplotě 37°C . Oddělené buňky byly odstředěny 2 minuty při 800 otáčkách za minutu a pak 2x promyty pufrem PBS(-), (Nissui Seiyaku). Promytý buněčný materiál byl upraven na hustotu 4×10^6 buněk/ml pufrem PBS(-) za vzniku suspenze buněk COS-7.

Paralelně bylo připraveno 100 mikrogramů DNA plasmidu phFas-AIC2 při použití sestavy pro přípravu plasmidů Maxi-prep (Promega). DNA byla vysrážena 100% ethanolem a pak uvedena do suspenze ve 100 mikrolitrech pufru PBS(-). Roztok 100 mikrolitrů plasmidu byl smísen s 500 mikrolitry suspenze buněk COS-7, připravené svrchu uvedeným způsobem (2×10^6 buněk). Směs byla přenesena do kyvety pro otevření pórů působením elektrického proudu s elektrodami, vzdálenými od sebe 4 mm (BioRad) a pak byla kyveta uložena do příslušného přístroje. Otevřením pórů byla pak uložena DNA plasmidu do buněk COS-7 při použití pulsu o 150 V, 900 μF .

Po ukončení tohoto postupu se směs buněk a DNA uvede znovu do suspenze ve 20 ml prostředí DMEM s obsahem 10 % fetálního séra skotu a pak se přenese do lahve s plochou 75 cm^2 (Sumitomo Bakelite) pro pěstování kultur. Buněčný materiál se inkubuje 24 hodin při teplotě 37°C v přítomnosti 7,5 % oxidu uhličitého. Pak se supernatant odstraní a buňky se promyjí prostředím DMEM, prostým séra. Přidá se 20 ml čerstvého prostředí DMEM, prostého séra a buňky se pěstují 24 hodin při 37°C v přítomnosti 7,5 % oxidu uhličitého. Pak se supernatant oddělí.

2) Zkouška na schopnost vazby antigenu Fas metodou ELISA

Schopnost humanizovaných protilátek vázat antigen Fas byla zkoumána metodou ELISA následujícím způsobem:

Supernatant buněk COS-7, připravený ve stupni 1 byl smísen s 50 mM pufrům s uhličitánem a hydrogenuhličitánem o pH 9,5 v poměru 1 : 5. Podíl 50 mikrolitrů směsi byl přidán do každého vyhloubení ploten EIA s 96 vyhloubeními (3690, plocha dna 0,16 cm², Coster) a plotny byly inkubovány přes noc při 4 °C k adsorpci složené bílkoviny s obsahem lidského Fas na povrch vyhloubení. Po adsorpci bylo každé vyhloubení promyto pufrům PBS(-) s obsahem 0,05 % Tween 20 (čistota EIA, BioRad, dále bude uváděn jako PBS-T).

Pufr pro blokování (Pierce, Inc.) byl připraven v PBS a do každého vyhloubení bylo přidáno 50 mikrolitrů tohoto pufru. Pak byly plotny inkubovány při teplotě místnosti 2 hodiny k dokončení blokování. Pak byla vyhloubení opět promyta při použití PBS-T.

Vzorek 50 mikrolitrů zředěného supernatantu každé kultury z příkladu 7 byl pak přidán do každého vyhloubení a plotny byly inkubovány 2 hodiny při teplotě 37 °C. Pak byla vyhloubení promyta PBS-T. Pak byl do každého vyhloubení přidán podíl 50 mikrolitrů monoklonální kozí protilátky proti lidskému IgM, značené peroxidázou (Jackson Immuno.research Laboratory) po zředění v poměru 1 : 10 000 v PBS. Pak byly plotny inkubovány 2 hodiny při teplotě 37 °C. Po promytí PBS-T bylo do každého vyhloubení přidáno 50 mikrolitrů roz- toku substrátu (Peroxidase Substrate Set - ABTS, BioRad) k zahájení kolorimetrického stanovení.

Schopnost humanizovaných protilátek, obsažených v supernatantech kultur vázat se na složenou bílkovinu s obsahem lidského antigenu Fas byla vyhodnocena tak, že byla odečtena absorbance pro každé vyhloubení při 405 nm a při 492 nm pomocí odečítacího zařízení pro plotny Model 3550 UV (BioRad). Poměr absorbance při 405 nm a při 492 nm dovoluje vypočítat vazbu na IgM.

Výsledek této zkoušky prokazuje, že humanizované protilátky, přítomné ve vzorcích B, C, D, E, F, G, H a I z příkladu 7 jsou schopny se vázat na složenou bílkovinu s obsahem lidského antigenu Fas, jak je také znázorněno na obr. 29 a 30.

Zkušební příklad 3

Zkouška na vyvolání apoptosy

Supernatanty kultur, připravených podle příkladu 7 svrchu, byly inkubovány s buněčnou linií HPB-ALL lidských lymfocytů ke stanovení cytotoxické účinnosti humanizovaných protilátek, obsažených v těchto supernatantech.

Buňky HPB-ALL byly pěstovány v prostředí RPMI 1640 (Nissui Seiyaku) s obsahem 20 mM HEPES, 50 mikromol beta-merkaptoethanolu, 0,33 % hydrogenuhlíčitanu sodného (Sigma) a 10 % fetálního séra skotu (CSL), prostředí bude dále uváděno jako prostředí RPMI při teplotě 37 °C v atmosféře s 5 % oxidu uhličitého. Buněčný materiál byl v logaritmické fázi růstu oddělen odstředěním 3 minuty při 800 ot/min. Usazenina buněk byla znovu uvedeny do suspenze v prostředí RPMI do hustoty 6×10^5 buněk/ml za vzniku suspenze buněk HBP-ALL.

Každý ze supernatantů kultur, připravených podle příkladu 7 a také myší protilátka CH11 proti lidskému Fas byly zředěny na následující koncentrace: 250, 100, 25, 10, 2,5, 1, 0,25 a 0,1 ng/ml. Podíl 50 mikrolitrů každého ředění byl smísen s 50 mikrolitry suspenze buněk HBP-ALL (odpovídá 3×10^4 buněk/50 mikrolitrů) v každém vyhloubení plotny s 96 vyhloubeními. Plotna pak byla inkubována 2 hodiny při teplotě 37°C v atmosféře s obsahem 5 % oxidu uhličitého. Pak byla měřena absorbance při 450 nm a 750 nm při použití odečítacího přístroje pro plotny Model 3550-UV (BioRad). Koncentrace pro každý vzorek byla měřena densitometrickou analýzou vzorků, připravených metodou Western blot podle zkušebního příkladu 1.

Přežívání buněk HPB-ALL v procentech je možno vypočítat při použití následujícího vzorce:

$$\text{přežívání v \%} = (A-C)/(B-C) \times 100,$$

kde

- A znamená počet buněk, zbývajících po inkubaci CH11 nebo humanizované protilátky s buňkami HBP-ALL,
- B znamená počet buněk, zbývajících po pěstování buněk HBP-ALL bez CH11 nebo humanizovaných protilátek,
- C znamená živné prostředí RPMI bez buněk HBP-ALL (inkubace 20 hodin, stejně jako v případě A a B).

Výsledky těchto pokusů jsou graficky znázorněny na obr. 31. Hodnota ED_{50} , která je indexem pro cytotoxickou účinnost, byla vypočítána ve všech případech. ED_{50} znamená koncentraci IgM, při níž přežívá 50 % buněk.

Výsledky svrchu uvedených zkoušek jsou shrnuty v následující tabulce:

vzorek	ED ₅₀ (ng/ml)
B	1,1
C	1,0
D	1,7
E	1,5
G	2,4
I	3,4
CH11	10,7

Z výsledků, uvedených v tabulce je zřejmé, že rekombinantní molekuly IgM proti Fas, které neobsahují řetězec J, mají 3x až 10x vyšší cytotoxickou účinnost než protilátka CH11, která řetězec J obsahuje.

03.07.99

VÝPIS SEKVENCÍ

(1) OBECNÉ INFORMACE:

(i) ŽADATEL:

- (A) JMÉNO: Sankyo Company, Limited
- (B) ULICE: 5-1, Nihonbashi Honcho 3-chome, Chuo-ku
- (C) MĚSTO: Tokyo
- (E) ZEMĚ: Japonsko
- (F) PSČ (ZIP): 103-8426
- (G) TELEFON: 81-3-5255-7111

(ii) NÁZEV VYNÁLEZU: Humanizované protilátky proti lidskému Fas

(iii) POČET SEKVENCÍ: 189

(iv) POČÍTAČOVÁ FORMA:

- (A) TYP MÉDIA: Floppy disk
- (B) POČÍTAČ IBM PC kompatibilní
- (C) OPERAČNÍ SYSTÉM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPO)

(vi) ÚDAJE O PŘEDCHOZÍCH PŘIHLÁŠKÁCH:

- (A) ČÍSLO PŘIHLÁŠKY: JP Hei 9-67938
- (B) DATUM PODÁNÍ: 21. března 1997

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 1:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 5 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(v) TYP FRAGMENTU: vnitřní

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 1:

Asp Tyr Asn Met His
1 5

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 2:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 17 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(v) TYP FRAGMENTU: vnitřní

03.07.98

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 2:

Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15
Ser

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 3:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 7 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(v) TYP FRAGMENTU: vnitřní

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 3:

Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 4:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 16 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(v) TYP FRAGMENTU: vnitřní

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 4:

Arg Ser Ser Lys Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 5:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 7 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

03.07.98

(v) TYP FRAGMENTU: vnitřní

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 5:

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 6:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 9 aminokyselin
 - (B) TYP: aminokyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(v) TYP FRAGMENTU: vnitřní

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 6:

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Ala
1 5

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 7:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 1773 párů bazí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: dvojitý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA až mRNA

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

- (A) ORGANISMUS: Mus musculus
- (G) TYP BUŇKY: hybridom
- (H) BUNĚČNÁ LINIE: CH11

(ix) ZNAK:

- (A) JMÉNO/KLÍČ: CDS
- (B) UMÍSTĚNÍ: 1..1770

(ix) ZNAK:

- (A) JMÉNO/KLÍČ: mat_peptid
- (B) UMÍSTĚNÍ: 58..1770

(ix) ZNAK:

- (A) JMÉNO/KLÍČ: sig_peptid
- (B) UMÍSTĚNÍ: 1..57

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 7:

ATG GGA TGG AGC TGG ATC TTT CTC TTC CTC CTG TCA GGA ACT GCA GGC	48
Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly	
-19 -15 -10 -5	
GTC CAC TCT GAG GTC CAG CTT CAG CAG TCA GGA CCT GAG CTG GTG AAA	96
Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys	
1 5 10	
CCT GGG GCC TCA GTG AAG ATA TCC TGC AAG GCT TCT GGA TAC ACA TTC	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	
15 20 25	
ACT GAC TAC AAC ATG CAC TGG GTG AAG CAG AGC CAT GGA AAG AGC CTT	192
Thr Asp Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu	
30 35 40 45	
GAG TGG ATT GGA TAT ATT TAT CCT TAC AAT GGT GGT ACT GGC TAC AAC	240
Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn	
50 55 60	
CAG AAG TTC AAG AGC AAG GCC ACA TTG ACT GTT GAC AAT TCC TCC AGC	288
Gln Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Asn Ser Ser Ser	
65 70 75	
ACA GCC TAC ATG GAG CTC CGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCA GTC	336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val	
80 85 90	
TAT TAC TGT GCA AGA AGT TAC TAT GCT ATG GAC TAC TGG GGT CAA GGA	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly	
95 100 105	
ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA GAG AGT CAG TCC TTC CCA AAT GTC TTC	432
Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Glu Ser Gln Ser Phe Pro Asn Val Phe	
110 115 120 125	
CCC CTC GTC TCC TGC GAG AGC CCC CTG TCT GAT AAG AAT CTG GTG GCC	480
Pro Leu Val Ser Cys Glu Ser Pro Leu Ser Asp Lys Asn Leu Val Ala	
130 135 140	
ATG GGC TGC CTA GCC CGG GAC TTC CTG CCC AGC ACC ATT TCC TTC ACC	528
Met Gly Cys Leu Ala Arg Asp Phe Leu Pro Ser Thr Ile Ser Phe Thr	
145 150 155	
TGG AAC TAC CAG AAC AAC ACT GAA GTC ATC CAG GGT ATC AGA ACC TTC	576
Trp Asn Tyr Gln Asn Asn Thr Glu Val Ile Gln Gly Ile Arg Thr Phe	
160 165 170	
CCA ACA CTG AGG ACA GGG GGC AAG TAC CTA GCC ACC TCG CAG GTG TTG	624
Pro Thr Leu Arg Thr Gly Gly Lys Tyr Leu Ala Thr Ser Gln Val Leu	
175 180 185	
CTG TCT CCC AAG AGC ATC CTT GAA GGT TCA GAT GAA TAC CTG GTA TGC	672
Leu Ser Pro Lys Ser Ile Leu Glu Gly Ser Asp Glu Tyr Leu Val Cys	
190 195 200 205	
AAA ATC CAC TAC GGA GGC AAA AAC AGA GAT CTG CAT GTG CCC ATT CCA	720

03.07.98

Lys	Ile	His	Tyr	Gly	Gly	Lys	Asn	Arg	Asp	Leu	His	Val	Pro	Ile	Pro	
				210					215					220		
GCT	GTC	GCA	GAG	ATG	AAC	CCC	AAT	GTA	AAT	GTG	TTC	GTC	CCA	CCA	CGG	768
Ala	Val	Ala	Glu	Met	Asn	Pro	Asn	Val	Asn	Val	Phe	Val	Pro	Pro	Arg	
			225					230					235			
GAT	GGC	TTC	TCT	GGC	CCT	GCA	CCA	CGC	AAG	TCT	AAA	CTC	ATC	TGC	GAG	816
Asp	Gly	Phe	Ser	Gly	Pro	Ala	Pro	Arg	Lys	Ser	Lys	Leu	Ile	Cys	Glu	
			240					245				250				
GCC	ACG	AAC	TTC	ACT	CCA	AAA	CCG	ATC	ACA	GTA	TCC	TGG	CTA	AAG	GAT	864
Ala	Thr	Asn	Phe	Thr	Pro	Lys	Pro	Ile	Thr	Val	Ser	Trp	Leu	Lys	Asp	
			255					260				265				
GGG	AAG	CTC	GTG	GAA	TCT	GGC	TTC	ACC	ACA	GAT	CCG	GTG	ACC	ATC	GAG	912
Gly	Lys	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Phe	Thr	Thr	Asp	Pro	Val	Thr	Ile	Glu	
						275				280					285	
AAC	AAA	GGA	TCC	ACA	CCC	CAA	ACC	TAC	AAG	GTC	ATA	AGC	ACA	CTT	ACC	960
Asn	Lys	Gly	Ser	Thr	Pro	Gln	Thr	Tyr	Lys	Val	Ile	Ser	Thr	Leu	Thr	
						290				295					300	
ATC	TCT	GAA	ATC	GAC	TGG	CTG	AAC	CTG	AAT	GTG	TAC	ACC	TGC	CGT	GTG	1008
Ile	Ser	Glu	Ile	Asp	Trp	Leu	Asn	Leu	Asn	Val	Tyr	Thr	Cys	Arg	Val	
				305						310				315		
GAT	CAC	AGG	GGT	CTC	ACC	TTC	TTG	AAG	AAC	GTG	TCC	TCC	ACA	TGT	GCT	1056
Asp	His	Arg	Gly	Leu	Thr	Phe	Leu	Lys	Asn	Val	Ser	Ser	Thr	Cys	Ala	
								325					330			
GCC	AGT	CCC	TCC	ACA	GAC	ATC	CTA	ACC	TTC	ACC	ATC	CCC	CCC	TCC	TTT	1104
Ala	Ser	Pro	Ser	Thr	Asp	Ile	Leu	Thr	Phe	Thr	Ile	Pro	Pro	Ser	Phe	
								340				345				
GCC	GAC	ATC	TTC	CTC	AGC	AAG	TCC	GCT	AAC	CTG	ACC	TGT	CTG	GTC	TCA	1152
Ala	Asp	Ile	Phe	Leu	Ser	Lys	Ser	Ala	Asn	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Ser	
						355				360					365	
AAC	CTG	GCA	ACC	TAT	GAA	ACC	CTG	AAT	ATC	TCC	TGG	GCT	TCT	CAA	AGT	1200
Asn	Leu	Ala	Thr	Tyr	Glu	Thr	Leu	Asn	Ile	Ser	Trp	Ala	Ser	Gln	Ser	
						370				375					380	
GGT	GAA	CCA	CTG	GAA	ACC	AAA	ATT	AAA	ATC	ATG	GAA	AGC	CAT	CCC	AAT	1248
Gly	Glu	Pro	Leu	Glu	Thr	Lys	Ile	Lys	Ile	Met	Glu	Ser	His	Pro	Asn	
						385				390					395	
GGC	ACC	TTC	AGT	GCT	AAG	GGT	GTG	GCT	AGT	GTT	TGT	GTG	GAA	GAC	TGG	1296
Gly	Thr	Phe	Ser	Ala	Lys	Gly	Val	Ala	Ser	Val	Cys	Val	Glu	Asp	Trp	
						400							410			
AAT	AAC	AGG	AAG	GAA	TTT	GTG	TGT	ACT	GTG	ACT	CAC	AGG	GAT	CTG	CCT	1344
Asn	Asn	Arg	Lys	Glu	Phe	Val	Cys	Thr	Val	Thr	His	Arg	Asp	Leu	Pro	
								420					425			
TCA	CCA	CAG	AAG	AAA	TTC	ATC	TCA	AAA	CCC	AAT	GAG	GTG	CAC	AAA	CAT	1392
Ser	Pro	Gln	Lys	Lys	Phe	Ile	Ser	Lys	Pro	Asn	Glu	Val	His	Lys	His	
						435					440				445	

03.07.99

CCA CCT GCT GTG TAC CTG CTG CCA CCA GCT CGT GAG CAA CTG AAC CTG	1440
Pro Pro Ala Val Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu	
450 455 460	
AGG GAG TCA GCC ACA GTC ACC TGC TTG GTG AAG GGC TTC TCT CCT GCA	1488
Arg Glu Ser Ala Thr Val Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Ser Pro Ala	
465 470 475	
GAC ATC AGT GTG CAG TGG CTT CAG AGA GGG CAA CTC TTG CCC CAA GAG	1536
Asp Ile Ser Val Gln Trp Leu Gln Arg Gly Gln Leu Leu Pro Gln Glu	
480 485 490	
AAG TAT GTG ACC AGT GCC CCG ATG CCA GAG CCT GGG GCC CCA GGC TTC	1584
Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro Gly Ala Pro Gly Phe	
495 500 505	
TAC TTT ACC CAC AGC ATC CTG ACT GTG ACA GAG GAG GAA TGG AAC TCC	1632
Tyr Phe Thr His Ser Ile Leu Thr Val Thr Glu Glu Glu Trp Asn Ser	
510 515 520 525	
GGA GAG ACC TAT ACC TGT GTT GTA GGC CAC GAG GCC CTG CCA CAC CTG	1680
Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Gly His Glu Ala Leu Pro His Leu	
530 535 540	
GTG ACC GAG AGG ACC GTG GAC AAG TCC ACT GGT AAA CCC ACA CTG TAC	1728
Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly Lys Pro Thr Leu Tyr	
545 550 555	
AAT GTC TCC CTG ATC ATG TCT GAC ACA GGC GGC ACC TGC TAT	1770
Asn Val Ser Leu Ile Met Ser Asp Thr Gly Gly Thr Cys Tyr	
560 565 570	
TGA	1773

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 8:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 590 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 8:

Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly	
-19 -15 -10 -5	
Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys	
1 5 10	
Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	
15 20 25	
Thr Asp Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu	
30 35 40 45	
Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn	

03.07.98

	50		55		60
Gln Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Asn Ser Ser Ser	65		70		75
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val	80		85		90
Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly	95		100		105
Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Glu Ser Gln Ser Phe Pro Asn Val Phe	110		115		120
Pro Leu Val Ser Cys Glu Ser Pro Leu Ser Asp Lys Asn Leu Val Ala	130		135		140
Met Gly Cys Leu Ala Arg Asp Phe Leu Pro Ser Thr Ile Ser Phe Thr	145		150		155
Trp Asn Tyr Gln Asn Asn Thr Glu Val Ile Gln Gly Ile Arg Thr Phe	160		165		170
Pro Thr Leu Arg Thr Gly Gly Lys Tyr Leu Ala Thr Ser Gln Val Leu	175		180		185
Leu Ser Pro Lys Ser Ile Leu Glu Gly Ser Asp Glu Tyr Leu Val Cys	190		195		200
Lys Ile His Tyr Gly Gly Lys Asn Arg Asp Leu His Val Pro Ile Pro	210		215		220
Ala Val Ala Glu Met Asn Pro Asn Val Asn Val Phe Val Pro Pro Arg	225		230		235
Asp Gly Phe Ser Gly Pro Ala Pro Arg Lys Ser Lys Leu Ile Cys Glu	240		245		250
Ala Thr Asn Phe Thr Pro Lys Pro Ile Thr Val Ser Trp Leu Lys Asp	255		260		265
Gly Lys Leu Val Glu Ser Gly Phe Thr Thr Asp Pro Val Thr Ile Glu	270		275		280
Asn Lys Gly Ser Thr Pro Gln Thr Tyr Lys Val Ile Ser Thr Leu Thr	290		295		300
Ile Ser Glu Ile Asp Trp Leu Asn Leu Asn Val Tyr Thr Cys Arg Val	305		310		315
Asp His Arg Gly Leu Thr Phe Leu Lys Asn Val Ser Ser Thr Cys Ala	320		325		330
Ala Ser Pro Ser Thr Asp Ile Leu Thr Phe Thr Ile Pro Pro Ser Phe	335		340		345
Ala Asp Ile Phe Leu Ser Lys Ser Ala Asn Leu Thr Cys Leu Val Ser	350		355		360
Asn Leu Ala Thr Tyr Glu Thr Leu Asn Ile Ser Trp Ala Ser Gln Ser					

00.07.98

370	375	380
Gly Glu Pro Leu Glu Thr Lys Ile Lys Ile Met Glu Ser His Pro Asn		
385	390	395
Gly Thr Phe Ser Ala Lys Gly Val Ala Ser Val Cys Val Glu Asp Trp		
400	405	410
Asn Asn Arg Lys Glu Phe Val Cys Thr Val Thr His Arg Asp Leu Pro		
415	420	425
Ser Pro Gln Lys Lys Phe Ile Ser Lys Pro Asn Glu Val His Lys His		
430	435	440 445
Pro Pro Ala Val Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu		
450	455	460
Arg Glu Ser Ala Thr Val Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Ser Pro Ala		
465	470	475
Asp Ile Ser Val Gln Trp Leu Gln Arg Gly Gln Leu Leu Pro Gln Glu		
480	485	490
Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro Gly Ala Pro Gly Phe		
495	500	505
Tyr Phe Thr His Ser Ile Leu Thr Val Thr Glu Glu Glu Trp Asn Ser		
510	515	520 525
Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Gly His Glu Ala Leu Pro His Leu		
530	535	540
Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly Lys Pro Thr Leu Tyr		
545	550	555
Asn Val Ser Leu Ile Met Ser Asp Thr Gly Gly Thr Cys Tyr		
560	565	570

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 9:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKvence:

- (A) DÉLKA: 717 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: dvojitý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA až mRNA

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

- (A) ORGANISMUS: Mus musculus
- (G) TYP BUŇKY: hybridom
- (H) BUNĚČNÁ LINIE: CH11

(ix) ZNAK:

- (A) JMÉNO/KLÍČ: CDS
- (B) UMÍSTĚNÍ: 1..714

(ix) ZNAK:

03.07.98

(A) JMÉNO/KLÍČ: mat_peptid

(B) UMÍSTĚNÍ:58..714

(ix) ZNAK:

(A) JMÉNO/KLÍČ: sig_peptid

(B) UMÍSTĚNÍ:1..57

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 9:

ATG AAG TTG CCT GTT AGG CTG TTG GTG CTG ATG TTC TGG ATT CCT GCT	48
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala	
-19 -15 -10 -5	
TCC AGC AGT GAT GTT GTG ATG ACC CAA AGT CCA CTC TCC CTG CCT GTC	96
Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val	
1 5 10	
AGT CTT GGA GAT CAA GCC TCC ATC TCT TGC AGA TCT AGT AAG AGC CTT	144
Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu	
15 20 25	
GTA CAC AGT AAT GGA AAC ACC TAT TTA CAT TGG TAC CTG CAG AAG CCA	192
Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro	
30 35 40 45	
GGC CAG TCT CCA AAG CTC CTG ATC TAC AAA GTT TCC AAC CGA TTT TCT	240
Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser	
50 55 60	
GGG GTC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGG ACA GAT TTC ACA	288
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr	
65 70 75	
CTC AAG ATC AGC AGA GTG GAG GCT GAG GAT CTG GGA GTT TAT TTC TGC	336
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys	
80 85 90	
TCT CAA AGT ACA CAT GTT CCT CCG GCG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG	384
Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu	
95 100 105	
GAA ATC AAA CGG GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA TCC ATC TTC CCA CCA	432
Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro	
110 115 120 125	
TCC AGT GAG CAG TTA ACA TCT GGA GGT GCC TCA GTC GTG TGC TTC TTG	480
Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu	
130 135 140	
AAC AAC TTC TAC CCC AAA GAC ATC AAT GTC AAG TGG AAG ATT GAT GGC	528
Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly	
145 150 155	
AGT GAA CGA CAA AAT GGC GTC CTG AAC AGT TGG ACT GAT CAG GAC AGC	576
Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser	
160 165 170	

00.07.99

AAA GAC AGC ACC TAC AGC ATG AGC AGC ACC CTC ACG TTG ACC AAG GAC	624
Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp	
175 180 185	
GAG TAT GAA CGA CAT AAC AGC TAT ACC TGT GAG GCC ACT CAC AAG ACA	672
Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr	
190 195 200 205	
TCA ACT TCA CCC ATT GTC AAG AGC TTC AAC AGG AAT GAG TGT	714
Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys	
210 215	
TAG	717

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 10:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 238 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 10:

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala	
-19 -15 -10 -5	
Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val	
1 5 10	
Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu	
15 20 25	
Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro	
30 35 40 45	
Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser	
50 55 60	
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr	
65 70 75	
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys	
80 85 90	
Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu	
95 100 105	
Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro	
110 115 120 125	
Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu	
130 135 140	
Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly	
145 150 155	
Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser	

03.07.98

160	165	170
Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp		
175	180	185
Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr		
190	195	200
Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys		
210	215	

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 11:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKQUENCE:

- (A) DÉLKA: 480 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: dvojitý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA až mRNA

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

- (A) ORGANISMUS: Mus musculus
- (G) TYP BUNĚKY: hybridom
- (H) BUNĚČNÁ LINIE: CH11

(ix) ZNAK:

- (A) JMÉNO/KLÍČ: CDS
- (B) UMÍSTĚNÍ: 1..477

(ix) ZNAK:

- (A) JMÉNO/KLÍČ: mat_peptid
- (B) UMÍSTĚNÍ: 67..477

(ix) ZNAK:

- (A) JMÉNO/KLÍČ: sig_peptid
- (B) UMÍSTĚNÍ: 1..66

(xi) POPIS SEKQUENCE: SEQ ID NO: 11:

ATG AAG ACC CAC CTG CTT CTC TGG GGA GTC CTC GCC ATT TTT GTT AAG	48
Met Lys Thr His Leu Leu Leu Trp Gly Val Leu Ala Ile Phe Val Lys	
-22 -20 -15 -10	
GCT GTC CTT GTA ACA GGT GAC GAC GAA GCG ACC ATT CTT GCT GAC AAC	96
Ala Val Leu Val Thr Gly Asp Asp Glu Ala Thr Ile Leu Ala Asp Asn	
-5 1 5 10	
AAA TGC ATG TGT ACC CGA GTT ACC TCT AGG ATC ATC CCT TCC ACC GAG	144
Lys Cys Met Cys Thr Arg Val Thr Ser Arg Ile Ile Pro Ser Thr Glu	
15 20 25	
GAT CCT AAT GAG GAC ATT GTG GAG AGA AAT ATC CGA ATT GTT GTC CCT	192
Asp Pro Asn Glu Asp Ile Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Val Val Pro	
30 35 40	
TTG AAC AAC AGG GAG AAT ATC TCT GAT CCC ACC TCC CCA CTG AGA AGG	240

03.07.98

Leu Asn Asn Arg Glu Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Arg	
45 50 55	
AAC TTT GTA TAC CAT TTG TCA GAC GTC TGT AAG AAA TGC GAT CCT GTG	288
Asn Phe Val Tyr His Leu Ser Asp Val Cys Lys Lys Cys Asp Pro Val	
60 65 70	
GAA GTG GAG CTG GAA GAT CAG GTT GTT ACT GCC ACC CAG AGC AAC ATC	336
Glu Val Glu Leu Glu Asp Gln Val Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Ile	
75 80 85 90	
TGC AAT GAG GAC GAT GGT GTT CCT GAG ACC TGC TAC ATG TAT GAC AGA	384
Cys Asn Glu Asp Asp Gly Val Pro Glu Thr Cys Tyr Met Tyr Asp Arg	
95 100 105	
AAC AAG TGC TAT ACC ACT ATG GTC CCA CTT AGG TAT CAT GGT GAG ACC	432
Asn Lys Cys Tyr Thr Thr Met Val Pro Leu Arg Tyr His Gly Glu Thr	
110 115 120	
AAA ATG GTG CAA GCA GCC TTG ACC CCC GAT TCT TGC TAC CCT GAC	477
Lys Met Val Gln Ala Ala Leu Thr Pro Asp Ser Cys Tyr Pro Asp	
125 130 135	
TAG	480

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 12:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKQUENCE:

(A) DÉLKA: 159 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKQUENCE: SEQ ID NO: 12:

Met Lys Thr His Leu Leu Leu Trp Gly Val Leu Ala Ile Phe Val Lys	
-22 -20 -15 -10	
Ala Val Leu Val Thr Gly Asp Asp Glu Ala Thr Ile Leu Ala Asp Asn	
-5 1 5 10	
Lys Cys Met Cys Thr Arg Val Thr Ser Arg Ile Ile Pro Ser Thr Glu	
15 20 25	
Asp Pro Asn Glu Asp Ile Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Val Val Pro	
30 35 40	
Leu Asn Asn Arg Glu Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Arg	
45 50 55	
Asn Phe Val Tyr His Leu Ser Asp Val Cys Lys Lys Cys Asp Pro Val	
60 65 70	
Glu Val Glu Leu Glu Asp Gln Val Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Ile	
75 80 85 90	
Cys Asn Glu Asp Asp Gly Val Pro Glu Thr Cys Tyr Met Tyr Asp Arg	
95 100 105	

03.07.98

Asn Lys Cys Tyr Thr Thr Met Val Pro Leu Arg Tyr His Gly Glu Thr
110 115 120

Lys Met Val Gln Ala Ala Leu Thr Pro Asp Ser Cys Tyr Pro Asp
125 130 135

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 13:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 15 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(v) TYP FRAGMENTU: N-koncový

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 13:

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

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 14:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 21 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(v) TYP FRAGMENTU: N-koncový

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 14:

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

Asp Gln Ala Ser Ile
20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 15:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 391 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: dvojitý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA až mRNA

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 15:

[illegible]

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 16:

03.07.98

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 (A) DÉLKA: 388 párů bazí
 (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) TYP ŘETĚZCE: dvojitý
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA až mRNA

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:
 (A) ORGANISMUS: Mus musculus
 (G) TYP BUŇKY: hybridom
 (H) BUNĚČNÁ LINIE: CH11

(ix) ZNAK:
 (A) JMÉNO/KLÍČ: CDS
 (B) UMÍSTĚNÍ: 2..388

(ix) ZNAK:
 (A) JMÉNO/KLÍČ: mat_peptid
 (B) UMÍSTĚNÍ: 29..388

(ix) ZNAK:
 (A) JMÉNO/KLÍČ: sig_peptid
 (B) UMÍSTĚNÍ: 2..28

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 16:

G ATG TTC TGG ATT CCT GCT TCC AGC AGT GAT GTT GTG ATG ACC CAA	46
Met Phe Trp Ile Pro Ala Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln	
-9 -5 1 5	
AGT CCA CTC TCC CTG CCT GTC AGT CTT GGA GAT CAA GCC TCC ATC TCT	94
Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser	
10 15 20	
TGC AGA TCT AGT AAG AGC CTT GTA CAC AGT AAT GGA AAC ACC TAT TTA	142
Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu	
25 30 35	
CAT TGG TAC CTG CAG AAG CCA GGC CAG TCT CCA AAG CTC CTG ATC TAC	190
His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr	
40 45 50	
AAA GTT TCC AAC CGA TTT TCT GGG GTC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT	238
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser	
55 60 65 70	
GGA TCA GGG ACA GAT TTC ACA CTC AAG ATC AGC AGA GTG GAG GCT GAG	286
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu	
75 80 85	
GAT CTG GGA GTT TAT TTC TGC TCT CAA AGT ACA CAT GTT CCT CCG GCG	334
Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Ala	
90 95 100	
TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA CGG GCT GAT GCT GCA CCA	382
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro	

03.07.93

105

110

115

ACT GTA
Thr Val
120

388

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 17:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 33 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

- (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 17:

CTAAGGGAAT TCCGCCTCTC CTCAGACACT GAA

33

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 18:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 34 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

- (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 18:

TTTTACTCTA=GAGACCCAAG=GCCTGCCTGG TTGA

34

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 19:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 33 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

- (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

03.07.98

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 19:

AAATAGGAAT TCCAGTCTCC TCAGGCTGTC TCC

33

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 20:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 32 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 20:

ATGATCTCTA GAGTGGTGGC ATCTCAGGAC CT

32

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 21:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 32 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 21:

TTGCGGAATT CCTCACCTGT CCTGGGGTTA TT

32

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 22:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 32 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

03.07.98

- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
(A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 22:

ATTGCCTCTA GAGCCTCTAA GGACAACGAG CT

32

- (2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 23:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bazí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
(A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 23:

TGGGGCCTCA GTGAAGATAT

20

- (2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 24:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bazí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
(A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 24:

CAATGGTGGT ACTGGCTACA

20

- (2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 25:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bazí
 - (B) TYP: nukleová kyselina

03.07.98

- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

- (xi) POPIS SEKvence: SEQ ID NO: 25:

TGACATCTGA GGA CTCTGCA

20

- (2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 26:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKvence:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bazí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

- (xi) POPIS SEKvence: SEQ ID NO: 26:

TCCTCAGAGA GTCAGTCCTT

20

- (2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 27:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKvence:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bazí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

- (xi) POPIS SEKvence: SEQ ID NO: 27:

TCCTTCACCT GGA ACTACCA

20

- (2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 28:

03.07.98

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 28:

TCCCAAGAGC ATCCTTGAAG

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 29:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 29:

AGATCTGCAT GTGCCCATTC

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 30:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 30:

TCTAAACTCA TCTGCGAGGC

20

03.07.98

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 31:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 31:

GGTGACCATC GAGAACAAAG

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 32:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 32:

AGGGGTCTCA CCTTCTTGAA

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 33:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 33:

03.07.98

TCCTTTGCCG ACATCTTCCT

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 34:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bazí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 34:

GTGTGTACTG TGACTCACAG

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 35:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bazí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 35:

AACTGAACCT GAGGGAGTCA

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 36:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bazí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

03.07.98

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 36:

AACTCTTGCC CCAAGAGAAG

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 37:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 20 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 37:

ATCCTGACTG TGACAGAGGA

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 38:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 20 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 38:

ACAAGTCCAC TGGTAAACCC

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 39:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 20 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

03.07.93

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 39:

AGGATATCTT CACTGAGGCC

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 40:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bazí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 40:

ATCCACTCAA GGCTCTTTCC

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 41:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bazí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 41:

ACTGCAGAGT CCTCAGATGT

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 42:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bazí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

03.07.98

- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 42:

AGACGGTGAC TGAGGTTCTT

20

- (2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 43:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 43:

CAGGTGAAGG AAATGGTGCT

20

- (2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 44:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 44:

ATGCTCTTGG GAGACAGCAA

20

- (2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 45:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina

03.07.98

- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 45:

CTCTGTTTTT GCCTCCGTAG

20

- (2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 46:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bazí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 46:

TGGCCTCGCA GATGAGTTTA

20

- (2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 47:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bazí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 47:

CCTTTGTTCT CGATGGTCAC

20

- (2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 48:

03.07.98

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 48:

TGTGGAGGAC ACGTTCTTCA

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 49:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 49:

ACTTTGAGAA GCCCAGGAGA

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 50:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 50:

AGATCCCTGT GAGTCACAGT

20

03.07.98

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 51:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKvence:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKvence: SEQ ID NO: 51:

AGCAGGTGGA TGT TTGTGCA

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 52:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKvence:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKvence: SEQ ID NO: 52:

TGAAGCCACT GCACACTGAT

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 53:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKvence:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKvence: SEQ ID NO: 53:

03.07.98

AGTTCCATTC CTCCTCTGTC

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 54:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 20 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

- (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 54:

TGTGTCAGAC ATGATCAGGG

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 55:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 20 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

- (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 55:

TGAAGTTGCC TGTTAGGCTG

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 56:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 20 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

- (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

03.07.98

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 56:

CTTGGAGATC AAGCCTCCAT

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 57:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 20 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 57:

GCTGAGGATC TGGGAGTTTA

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 58:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 20 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 58:

GATGCTGCAC CAACTGTATC

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 59:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 20 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

03.07.98

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKvence: SEQ ID NO: 59:

CGACAAAATG GCGTCCTGAA

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 60:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKvence:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKvence: SEQ ID NO: 60:

ACGTTGACCA AGGACGAGTA

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 61:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKvence:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKvence: SEQ ID NO: 61:

ATCTGCAAGA GATGGAGGCT

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 62:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKvence:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

03.07.98

- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
- (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 62:

ACCCCAGAAA ATCGGTTGGA

20

- (2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 63:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
- (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 63:

CCGGAGGAAC ATGTGTACTT

20

- (2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 64:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
- (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 64:

TCGTCATAC TCGTCCTTGG

20

- (2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 65:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina

03.07.98

- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

- (xi) POPIS SEKvence: SEQ ID NO: 65:

CATCTCAGGA CCTTTGTCTC

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 66:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKvence:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

- (xi) POPIS SEKvence: SEQ ID NO: 66:

CACCTGTCCT GGGGTTATTT

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 67:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKvence:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

- (xi) POPIS SEKvence: SEQ ID NO: 67:

AGACAAGATG AAGACCCACC

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 68:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 68:

AAGCGACCAT TCTTGCTGAC

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 69:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 69:

ATATCTCTGA TCCCACCTCC

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 70:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 70:

GAAATGCGAT CCTGTGGAAG

20

03.07.98

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 71:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 71:

CTATACCACT ATGGTCCCAC

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 72:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 72:

AGAAGCAGGT GGGTCTTCAT

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 73:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 73:

03.07.98

TAGAGGTAAC TCGGGTACAC

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 74:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 74:

AAGTTCCTTC TCAGTGGGGA

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 75:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 75:

GGTGGCAGTA ACAACCTGAT

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 76:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 76:

CATGATACCT AAGTGGGACC

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 77:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 720 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: dvojitý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA až mRNA

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(ix) ZNAK:

- (A) JMÉNO/KLÍČ: CDS
- (B) UMÍSTĚNÍ: 1..717

(ix) ZNAK:

- (A) JMÉNO/KLÍČ: mat_peptid
- (B) UMÍSTĚNÍ: 61..717

(ix) ZNAK:

- (A) JMÉNO/KLÍČ: sig_peptid
- (B) UMÍSTĚNÍ: 1..60

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 77:

ATG AGG CTC CCT GCT CAG CTC CTG GGG CTG CTA ATG CTC TGG GTC CCA	48
Met Arg Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Pro	
-20 -15 -10 -5	
GGA TCC AGT GGG GAT GTT GTG ATG ACT CAG TCT CCA CTC TCC CTG CCC	96
Gly Ser Ser Gly Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro	
1 5 10	
GTC ACC CTT GGA CAG CCG GCC TCC ATC TCC TGC AGA TCT AGT AAG AGC	144
Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser	
15 20 25	
CTT GTA CAC AGT AAT GGA AAC ACC TAT TTA CAT TGG TAC CTG CAG AAG	192
Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys	
30 35 40	
CCA GGC CAG TCT CCA AAG CTC CTG ATC TAC AAA GTT TCC AAC CGA TTT	240
Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe	
45 50 55 60	
TCT GGG GTC CCA GAC AGA TTC AGC GGC AGT GGG TCA GGC ACT GAT TTC	288
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe	
65 70 75	
ACA CTG AAA ATC AGC AGG GTG GAG GCT GAG GAT GTT GGG GTT TAT TAC	336
Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr	

80	85	90	
TGC TCT CAA AGT ACA CAT GTT CCT CCG GCG TTC GGC CAA GGG ACC AAG			384
Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys			
95	100	105	
GTG GAA ATC AAA CGT ACT GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG			432
Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro			
110	115	120	
CCA TCT GAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG			480
Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu			
125	130	135	140
CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAA GTG GAT			528
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp			
145	150	155	
AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC CAG GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC			576
Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp			
160	165	170	
AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG CTG AGC AAA			624
Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys			
175	180	185	
GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG			672
Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln			
190	195	200	
GGC CTG AGC TCG CCC GTC ACA AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT			717
Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
205	210	215	
TAG			720

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 78:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 239 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 77:

Met Arg Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Pro			
-20	-15	-10	-5
Gly Ser Ser Gly Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro			
1	5	10	
Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser			
15	20	25	
Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys			
30	35	40	

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

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 79:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 720 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: dvojitý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA až mRNA

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(ix) ZNAK:

- (A) JMÉNO/KLÍČ: CDS
- (B) UMÍSTĚNÍ: 1..717

(ix) ZNAK:

- (A) JMÉNO/KLÍČ: mat_peptid
- (B) UMÍSTĚNÍ: 61..717

(ix) ZNAK:

- (A) JMÉNO/KLÍČ: sig_peptid
- (B) UMÍSTĚNÍ: 1..60

03.07.98

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 79:

ATG AGG CTC CCT GCT CAG CTC CTG GGG CTG CTA ATG CTC TGG GTC CCA	48
Met Arg Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Pro	
-20 -15 -10 -5	
GGA TCC AGT GGG GAT GTT GTG ATG ACT CAG TCT CCA CTC TCC CTG CCC	96
Gly Ser Ser Gly Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro	
1 5 10	
GTC ACC CTT GGA CAG CCG GCC TCC ATC TCC TGC AGA TCT AGT AAG AGC	144
Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser	
15 20 25	
CTT GTA CAC AGT AAT GGA AAC ACC TAT TTA CAT TGG TAC CTG CAG AAG	192
Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys	
30 35 40	
CCA GGC CAG TCT CCA AAG CTC CTG ATC TAC AAA GTT TCC AAC CGA TTT	240
Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe	
45 50 55 60	
TCT GGG GTC CCA GAC AGA TTC AGC GGC AGT GGG TCA GGC ACT GAT TTC	288
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe	
65 70 75	
ACA CTG AAA ATC AGC AGG GTG GAG GCT GAG GAT GTT GGG GTT TAT TTC	336
Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe	
80 85 90	
TGC TCT CAA AGT ACA CAT GTT CCT CCG GCG TTC GGC CAA GGG ACC AAG	384
Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys	
95 100 105	
GTG GAA ATC AAA CGT ACT GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG	432
Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro	
110 115 120	
CCA TCT GAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG	480
Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu	
125 130 135 140	
CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAA GTG GAT	528
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp	
145 150 155	
AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC CAG GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC	576
Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp	
160 165 170	
AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG CTG AGC AAA	624
Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys	
175 180 185	
GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG	672
Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln	
190 195 200	
GGC CTG AGC TCG CCC GTC ACA AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT	717
Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys	

205

210

215

TAG

720

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 80:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 239 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 80:

Met Arg Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Pro
 -20 -15 -10 -5

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

Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser
 15 20 25

Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys
 30 35 40

Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
 45 50 55 60

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

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe
 80 85 90

Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys
 95 100 105

Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 110 115 120

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 125 130 135 140

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 145 150 155

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 160 165 170

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 175 180 185

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 190 195 200

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 205 210 215

03.07.98

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 81:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 720 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: dvojitý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA až mRNA

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(ix) ZNAK:

- (A) JMÉNO/KLÍČ: CDS
- (B) UMÍSTĚNÍ:1..717

(ix) ZNAK:

- (A) JMÉNO/KLÍČ: mat_peptid
- (B) UMÍSTĚNÍ:61..717

(ix) ZNAK:

- (A) JMÉNO/KLÍČ: sig_peptid
- (B) UMÍSTĚNÍ:1..60

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 81:

ATG AGG CTC CCT GCT CAG CTC CTG GGG CTG CTA ATG CTC TGG GTC CCA	48
Met Arg Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Pro	
-20 -15 -10 -5	
GGA TCC AGT GGG GAT GTT GTG ATG ACT CAG TCT CCA CTC TCC CTG CCC	96
Gly Ser Ser Gly Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro	
1 5 10	
GTC ACC CTT GGA CAG CCG GCC TCC ATC TCC TGC AGA TCT AGT AAG AGC	144
Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser	
15 20 25	
CTT GTA CAC AGT AAT GGA AAC ACC TAT TTA CAT TGG TAC CTG CAG AAG	192
Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys	
30 35 40	
CCA GGC CAG TCT CCA AGG CTC CTG ATC TAC AAA GTT TCC AAC CGA TTT	240
Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe	
45 50 55 60	
TCT GGG GTC CCA GAC AGA TTC AGC GGC AGT GGG TCA GGC ACT GAT TTC	288
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe	
65 70 75	
ACA CTG AAA ATC AGC AGG GTG GAG GCT GAG GAT GTT GGG GTT TAT TAC	336
Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr	
80 85 90	
TGC TCT CAA AGT ACA CAT GTT CCT CCG GCG TTC GGC CAA GGG ACC AAG	384
Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys	

03.07.98

- 175 -

95	100	105	
GTG GAA ATC AAA CGT ACT	GTG GCT GCA CCA TCT	GTC TTC ATC TTC CCG	432
Val Glu Ile Lys Arg Thr	Val Ala Ala Pro Ser	Val Phe Ile Phe Pro	
110	115	120	
CCA TCT GAT GAG CAG TTG	AAA TCT GGA ACT GCC	TCT GTT GTG TGC CTG	480
Pro Ser Asp Glu Gln Leu	Lys Ser Gly Thr Ala	Ser Val Val Cys Leu	
125	130	135 140	
CTG AAT AAC TTC TAT CCC	AGA GAG GCC AAA GTA	CAG TGG AAA GTG GAT	528
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro	Arg Glu Ala Lys Val	Gln Trp Lys Val Asp	
145	150	155	
AAC GCC CTC CAA TCG GGT	AAC TCC CAG GAG AGT	GTC ACA GAG CAG GAC	576
Asn Ala Leu Gln Ser Gly	Asn Ser Gln Glu Ser	Val Thr Glu Gln Asp	
160	165	170	
AGC AAG GAC AGC ACC TAC	AGC CTC AGC AGC ACC	CTG ACG CTG AGC AAA	624
Ser Lys Asp Ser Thr Tyr	Ser Leu Ser Ser Thr	Leu Thr Leu Ser Lys	
175	180	185	
GCA GAC TAC GAG AAA CAC	AAA GTC TAC GCC TGC	GAA GTC ACC CAT CAG	672
Ala Asp Tyr Glu Lys His	Lys Val Tyr Ala Cys	Glu Val Thr His Gln	
190	195	200	
GGC CTG AGC TCG CCC GTC	ACA AAG AGC TTC AAC	AGG GGA GAG TGT	717
Gly Leu Ser Ser Pro Val	Thr Lys Ser Phe Asn	Arg Gly Glu Cys	
205	210	215	
TAG			720

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 82:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 239 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 82:

Met Arg Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Pro	
-20 -15 -10 -5	
Gly Ser Ser Gly Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro	
1 5 10	
Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser	
15 20 25	
Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys	
30 35 40	
Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe	
45 50 55 60	
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe	

Thr	Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	65	70	75
			80					85					90					
Cys	Ser	Gln	Ser	Thr	His	Val	Pro	Pro	Ala	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys			
		95					100					105						
Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro			
	110					115					120							
Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu			
	125				130					135				140				
Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp			
			145						150					155				
Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp			
		160						165					170					
Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys			
		175					180					185						
Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln			
	190					195					200							
Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys				
	205				210					215								

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 83:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 720 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: dvojitý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA až mRNA

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(ix) ZNAK:

- (A) JMÉNO/KLÍČ: CDS
- (B) UMÍSTĚNÍ: 1..717

(ix) ZNAK:

- (A) JMÉNO/KLÍČ: mat_peptid
- (B) UMÍSTĚNÍ: 61..717

(ix) ZNAK:

- (A) JMÉNO/KLÍČ: sig_peptid
- (B) UMÍSTĚNÍ: 1..60

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 83:

ATG	AGG	CTC	CCT	GCT	CAG	CTC	CTG	GGG	CTG	CTA	ATG	CTC	TGG	GTC	CCA
Met	Arg	Leu	Pro	Ala	Gln	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Met	Leu	Trp	Val	Pro
-20					-15				-10					-5	

GGA TCC AGT GGG GAT GTT GTG ATG ACT CAG TCT CCA CTC TCC CTG CCC	96
Gly Ser Ser Gly Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro	
1 5 10	
GTC ACC CTT GGA CAG CCG GCC TCC ATC TCC TGC AGA TCT AGT AAG AGC	144
Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser	
15 20 25	
CTT GTA CAC AGT AAT GGA AAC ACC TAT TTA CAT TGG TAC CTG CAG AAG	192
Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys	
30 35 40	
CCA GGC CAG TCT CCA AGG CTC CTG ATC TAC AAA GTT TCC AAC CGA TTT	240
Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe	
45 50 55 60	
TCT GGG GTC CCA GAC AGA TTC AGC GGC AGT GGG TCA GGC ACT GAT TTC	288
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe	
65 70 75	
ACA CTG AAA ATC AGC AGG GTG GAG GCT GAG GAT GTT GGG GTT TAT TTC	336
Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe	
80 85 90	
TGC TCT CAA AGT ACA CAT GTT CCT CCG GCG TTC GGC CAA GGG ACC AAG	384
Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys	
95 100 105	
GTG GAA ATC AAA CGT ACT GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG	432
Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro	
110 115 120	
CCA TCT GAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG	480
Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu	
125 130 135 140	
CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT	528
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp	
145 150 155	
AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC CAG GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC	576
Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp	
160 165 170	
AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG CTG AGC AAA	624
Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys	
175 180 185	
GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG	672
Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln	
190 195 200	
GGC CTG AGC TCG CCC GTC ACA AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT	717
Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys	
205 210 215	
TAG	720

03.07.98

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 84:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 239 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 84:

```

Met Arg Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Pro
-20                               -15                     -10             -5

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

Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser
      15                               20                               25

Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys
    30                               35                               40

Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
  45                               50                               55             60

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

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe
      80                               85                               90

Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys
    95                               100                              105

Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
  110                               115                              120

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
125                               130                              135             140

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
      145                               150                              155

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
      160                               165                              170

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
      175                               180                              185

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
      190                               195                              200

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
205                               210                              215

```

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 85:

03.07.93

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 (A) DÉLKA: 1768 párů bazí
 (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) TYP ŘETĚZCE: dvojitý
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA až mRNA

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(ix) ZNAK:

- (A) JMÉNO/KLÍČ: CDS
 (B) UMÍSTĚNÍ: 1..1764

(ix) ZNAK:

- (A) JMÉNO/KLÍČ: mat_peptid
 (B) UMÍSTĚNÍ: 58..1764

(ix) ZNAK:

- (A) JMÉNO/KLÍČ: sig_peptid
 (B) UMÍSTĚNÍ: 1..57

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 85:

ATG GGA TGG AGC TGG ATC TTT CTC TTC CTC CTG TCA GGA ACT GCA GGC	48
Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly	
-19 -15 -10 -5	
GTC CAC TCT GAG GTG CAG CTT GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG	96
Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	
1 5 10	
CCT GGG GCC TCA GTG AAG GTT TCC TGC AAG GCT TCT GGA TAC ACC TTC	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	
15 20 25	
ACT GAC TAT AAT ATG CAT TGG GTG CGC CAG GCC CCC GGA CAA GGA CTC	192
Thr Asp Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
GAA TGG ATG GGA TAT ATT TAT CCT TAC AAT GGT GGT ACT GGC TAC AAC	240
Glu Trp Met Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn	
50 55 60	
CAG AAG TTC AAG AGC AAG GCC ACA TTG ACT GTT GAC AAT TCC GCG AGC	288
Gln Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Asn Ser Ala Ser	
65 70 75	
ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAA GAC ACG GCT GTG	336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val	
80 85 90	
TAT TAC TGT GCG AGA AGT TAC TAT GCT ATG GAC TAC TGG GGC CAG GGA	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly	
95 100 105	
ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA GGG AGT GCA TCC GCC CCA ACC CTT TTC	432
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe	
110 115 120 125	

CCC CTC GTC TCC TGT GAG AAT TCC CCG TCG GAT ACG AGC AGC GTG GCC	480
Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala	
130 135 140	
GTT GGC TGC CTC GCA CAG GAC TTC CTT CCC GAC TCC ATC ACT TTC TCC	528
Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Phe Ser	
145 150 155	
TGG AAA TAC AAG AAC AAC TCT GAC ATC AGC AGT ACC CGG GGC TTC CCA	576
Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro	
160 165 170	
TCA GTC CTG AGA GGG GGC AAG TAC GCA GCC ACC TCA CAG GTG CTG CTG	624
Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu	
175 180 185	
CCT TCC AAG GAC GTC ATG CAG GGC ACA GAC GAA CAC GTG GTG TGC AAA	672
Pro Ser Lys Asp Val Met Gln Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys	
190 195 200 205	
GTC CAG CAC CCC AAC GGC AAC AAA GAA AAG AAC GTG CCT CTT CCA GTG	720
Val Gln His Pro Asn Gly Asn Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro Val	
210 215 220	
ATT GCC GAG CTG CCT CCC AAA GTG AGC GTC TTC GTC CCA CCC CGC GAC	768
Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp	
225 230 235	
GGC TTC TTC GGC AAC CCC CGC AAG TCC AAG CTC ATC TGC CAG GCC ACG	816
Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr	
240 245 250	
GGT TTC AGT CCC CGG CAG ATT CAG GTG TCC TGG CTG CGC GAG GGG AAG	864
Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys	
255 260 265	
CAG GTG GGG TCT GGC GTC ACC ACG GAC CAG GTG CAG GCT GAG GCC AAA	912
Gln Val Gly Ser Gly Val Thr Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys	
270 275 280 285	
GAG TCT GGG CCC ACG ACC TAC AAG GTG ACC AGC ACA CTG ACC ATC AAA	960
Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys	
290 295 300	
GAG AGC GAC TGG CTC AGC CAG AGC ATG TTC ACC TGC CGC GTG GAT CAC	1008
Glu Ser Asp Trp Leu Ser Gln Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp His	
305 310 315	
AGG GGC CTG ACC TTC CAG CAG AAT GCG TCC TCC ATG TGT GTC CCC GAT	1056
Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro Asp	
320 325 330	
CAA GAC ACA GCC ATC CGG GTC TTC GCC ATC CCC CCA TCC TTT GCC AGC	1104
Gln Asp Thr Ala Ile Arg Val Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser	
335 340 345	
ATC TTC CTC ACC AAG TCC ACC AAG TTG ACC TGC CTG GTC ACA GAC CTG	1152
Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu	

03.07.98

350	ACC ACC TAT GAC AGC GTG ACC ATC TCC TGG ACC CGC CAG AAT GGC GAA	1200
	Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu	
	370 375 380	
	GCT GTG AAA ACC CAC ACC AAC ATC TCC GAG AGC CAC CCC AAT GCC ACT	1248
	Ala Val Lys Thr His Thr Asn Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr	
	385 390 395	
	TTC AGC GCC GTG GGT GAG GCC AGC ATC TGC GAG GAT GAC TGG AAT TCC	1296
	Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser	
	400 405 410	
	GGG GAG AGG TTC ACG TGC ACC GTG ACC CAC ACA GAC CTG CCC TCG CCA	1344
	Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro	
	415 420 425	
	CTG AAG CAG ACC ATC TCC CGG CCC AAG GGG GTG GCC CTG CAC AGG CCC	1392
	Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro	
	430 435 440 445	
	GAT GTC TAC TTG CTG CCA CCA GCC CGG GAG CAG CTG AAC CTG CGG GAG	1440
	Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu	
	450 455 460	
	TCG GCC ACC ATC ACG TGC CTG GTG ACG GGC TTC TCT CCC GCG GAC GTC	1488
	Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val	
	465 470 475	
	TTC GTG CAG TGG ATG CAG AGG GGG CAG CCC TTG TCC CCG GAG AAG TAT	1536
	Phe Val Gln Trp Met Gln Arg Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr	
	480 485 490	
	GTG ACC AGC GCC CCA ATG CCT GAG CCC CAG GCC CCA GGC CGG TAC TTC	1584
	Val Thr Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe	
	495 500 505	
	GCC CAC AGC ATC CTG ACC GTG TCC GAA GAG GAA TGG AAC ACG GGG GAG	1632
	Ala His Ser Ile Leu Thr Val Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu	
	510 515 520 525	
	ACC TAC ATC TGC GTG GTG GCC CAT GAG GCC CTG CCC AAC AGG GTC ACC	1680
	Thr Tyr Ile Cys Val Val Ala His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr	
	530 535 540	
	GAG AGG ACC GTG GAC AAG TCC ACC GGT AAA CCC ACC CTG TAC AAC GTG	1728
	Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val	
	545 550 555	
	TCC CTG GTC ATG TCC GAC ACA GCT GGC ACC TGC TAC TGA	1767
	Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys Tyr	
	560 565	

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 86:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKQUENCE:

03.07.98

- (A) DÉLKA: 588 aminokyselin
(B) TYP: aminokyselina
(D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: protein
(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 86:

```

Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
-19          -15          -10          -5

Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
      1              5              10

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
    15              20              25

Thr Asp Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
    30              35              40              45

Glu Trp Met Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn
      50              55              60

Gln Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Asn Ser Ala Ser
      65              70              75

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
    80              85              90

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
    95              100             105

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe
   110              115              120              125

Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala
      130              135              140

Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Phe Ser
   145              150              155

Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro
   160              165              170

Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu
   175              180              185

Pro Ser Lys Asp Val Met Gln Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys
   190              195              200              205

Val Gln His Pro Asn Gly Asn Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro Val
      210              215              220

Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp
      225              230              235

Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr
      240              245              250

Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys
      255              260              265

```

00.07.98

Gln Val Gly Ser Gly Val Thr Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys
270 275 280 285

Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys
290 295 300

Glu Ser Asp Trp Leu Ser Gln Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp His
305 310 315

Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro Asp
320 325 330

Gln Asp Thr Ala Ile Arg Val Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser
335 340 345

Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu
350 355 360 365

Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu
370 375 380

Ala Val Lys Thr His Thr Asn Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr
385 390 395

Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser
400 405 410

Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro
415 420 425

Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro
430 435 440 445

Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu
450 455 460

Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val
465 470 475

Phe Val Gln Trp Met Gln Arg Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr
480 485 490

Val Thr Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe
495 500 505

Ala His Ser Ile Leu Thr Val Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu
510 515 520 525

Thr Tyr Ile Cys Val Val Ala His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr
530 535 540

Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val
545 550 555

Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys Tyr
560 565

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 87:

03.07.98

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 (A) DÉLKA: 1768 párů bází
 (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) TYP ŘETĚZCE: dvojitý
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA až mRNA

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(ix) ZNAK:

(A) JMÉNO/KLÍČ: CDS

(B) UMÍSTĚNÍ: 1..1764

(ix) ZNAK:

(A) JMÉNO/KLÍČ: mat_peptid

(B) UMÍSTĚNÍ: 58..1764

(ix) ZNAK:

(A) JMÉNO/KLÍČ: sig_peptid

(B) UMÍSTĚNÍ: 1..57

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 87:

ATG GGA TGG AGC TGG ATC TTT CTC TTC CTC CTG TCA GGA ACT GCA GGC	48
Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly	
-19 -15 -10 -5	
GTC CAC TCT GAG GTG CAG CTT GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG	96
Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	
1 5 10	
CCT GGG GCC TCA GTG AAG GTT TCC TGC AAG GCT TCT GGA TAC ACC TTC	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	
15 20 25	
ACT GAC TAT AAT ATG CAT TGG GTG AAG CAG GCC CAT GGA AAG AGC CTC	192
Thr Asp Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Ala His Gly Lys Ser Leu	
30 35 40 45	
GAA TGG ATG GGA TAT ATT TAT CCT TAC AAT GGT GGT ACT GGC TAC AAC	240
Glu Trp Met Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn	
50 55 60	
CAG AAG TTC AAG AGC AAG GCC ACA TTG ACT GTT GAC AAT TCC GCG AGC	288
Gln Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Asn Ser Ala Ser	
65 70 75	
ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAA GAC ACG GCT GTG	336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val	
80 85 90	
TAT TAC TGT GCG AGA AGT TAC TAT GCT ATG GAC TAC TGG GGC CAG GGA	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly	
95 100 105	
ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA GGG AGT GCA TCC GCC CCA ACC CTT TTC	432
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe	

03.07.98

110	115	120	125	
CCC CTC GTC TCC TGT GAG AAT TCC CCG TCG GAT ACG AGC AGC GTG GCC				480
Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala				
	130	135	140	
GTT GGC TGC CTC GCA CAG GAC TTC CTT CCC GAC TCC ATC ACT TTC TCC				528
Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Phe Ser				
	145	150	155	
TGG AAA TAC AAG AAC AAC TCT GAC ATC AGC AGT ACC CGG GGC TTC CCA				576
Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro				
	160	165	170	
TCA GTC CTG AGA GGG GGC AAG TAC GCA GCC ACC TCA CAG GTG CTG CTG				624
Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu				
	175	180	185	
CCT TCC AAG GAC GTC ATG CAG GGC ACA GAC GAA CAC GTG GTG TGC AAA				672
Pro Ser Lys Asp Val Met Gln Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys				
	190	195	200	205
GTC CAG CAC CCC AAC GGC AAC AAA GAA AAG AAC GTG CCT CTT CCA GTG				720
Val Gln His Pro Asn Gly Asn Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro Val				
	210	215	220	
ATT GCC GAG CTG CCT CCC AAA GTG AGC GTC TTC GTC CCA CCC CGC GAC				768
Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp				
	225	230	235	
GGC TTC TTC GGC AAC CCC CGC AAG TCC AAG CTC ATC TGC CAG GCC ACG				816
Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr				
	240	245	250	
GGT TTC AGT CCC CGG CAG ATT CAG GTG TCC TGG CTG CGC GAG GGG AAG				864
Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys				
	255	260	265	
CAG GTG GGG TCT GGC GTC ACC ACG GAC CAG GTG CAG GCT GAG GCC AAA				912
Gln Val Gly Ser Gly Val Thr Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys				
	270	275	280	285
GAG TCT GGG CCC ACG ACC TAC AAG GTG ACC AGC ACA CTG ACC ATC AAA				960
Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys				
	290	295	300	
GAG AGC GAC TGG CTC AGC CAG AGC ATG TTC ACC TGC CGC GTG GAT CAC				1008
Glu Ser Asp Trp Leu Ser Gln Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp His				
	305	310	315	
AGG GGC CTG ACC TTC CAG CAG AAT GCG TCC TCC ATG TGT GTC CCC GAT				1056
Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro Asp				
	320	325	330	
CAA GAC ACA GCC ATC CGG GTC TTC GCC ATC CCC CCA TCC TTT GCC AGC				1104
Gln Asp Thr Ala Ile Arg Val Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser				
	335	340	345	

03.07.98

ATC TTC CTC ACC AAG TCC ACC AAG TTG ACC TGC CTG GTC ACA GAC CTG Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu 350 355 360 365	1152
ACC ACC TAT GAC AGC GTG ACC ATC TCC TGG ACC CGC CAG AAT GGC GAA Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu 370 375 380	1200
GCT GTG AAA ACC CAC ACC AAC ATC TCC GAG AGC CAC CCC AAT GCC ACT Ala Val Lys Thr His Thr Asn Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr 385 390 395	1248
TTC AGC GCC GTG GGT GAG GCC AGC ATC TGC GAG GAT GAC TGG AAT TCC Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser 400 405 410	1296
GGG GAG AGG TTC ACG TGC ACC GTG ACC CAC ACA GAC CTG CCC TCG CCA Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro 415 420 425	1344
CTG AAG CAG ACC ATC TCC CGG CCC AAG GGG GTG GCC CTG CAC AGG CCC Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro 430 435 440 445	1392
GAT GTC TAC TTG CTG CCA CCA GCC CGG GAG CAG CTG AAC CTG CGG GAG Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu 450 455 460	1440
TCG GCC ACC ATC ACG TGC CTG GTG ACG GGC TTC TCT CCC GCG GAC GTC Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val 465 470 475	1488
TTC GTG CAG TGG ATG CAG AGG GGG CAG CCC TTG TCC CCG GAG AAG TAT Phe Val Gln Trp Met Gln Arg Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr 480 485 490	1536
GTG ACC AGC GCC CCA ATG CCT GAG CCC CAG GCC CCA GGC CGG TAC TTC Val Thr Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe 495 500 505	1584
GCC CAC AGC ATC CTG ACC GTG TCC GAA GAG GAA TGG AAC ACG GGG GAG Ala His Ser Ile Leu Thr Val Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu 510 515 520 525	1632
ACC TAC ATC TGC GTG GTG GCC CAT GAG GCC CTG CCC AAC AGG GTC ACC Thr Tyr Ile Cys Val Val Ala His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr 530 535 540	1680
GAG AGG ACC GTG GAC AAG TCC ACC GGT AAA CCC ACC CTG TAC AAC GTG Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val 545 550 555	1728
TCC CTG GTC ATG TCC GAC ACA GCT GGC ACC TGC TAC TGAT Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys Tyr 560 565	1768

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 88:

03.07.93

(i) CHARAKTERISTIKA SEKQUENCE:

- (A) DÉLKA: 588 aminokyselin
(B) TYP: aminokyselina
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKQUENCE: SEQ ID NO: 88:

```

Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
-19          -15          -10          -5

Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
      1              5              10

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
  15          20          25

Thr Asp Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Ala His Gly Lys Ser Leu
  30          35          40          45

Glu Trp Met Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn
      50          55          60

Gln Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Asn Ser Ala Ser
      65          70          75

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
      80          85          90

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
  95          100          105

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe
110          115          120          125

Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala
      130          135          140

Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Phe Ser
  145          150          155

Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro
  160          165          170

Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu
  175          180          185

Pro Ser Lys Asp Val Met Gln Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys
190          195          200          205

Val Gln His Pro Asn Gly Asn Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro Val
      210          215          220

Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp
  225          230          235

Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr
  240          245          250

```

03.07.98

Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys
255 260 265

Gln Val Gly Ser Gly Val Thr Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys
270 275 280 285

Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys
290 295 300

Glu Ser Asp Trp Leu Ser Gln Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp His
305 310 315

Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro Asp
320 325 330

Gln Asp Thr Ala Ile Arg Val Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser
335 340 345

Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu
350 355 360 365

Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu
370 375 380

Ala Val Lys Thr His Thr Asn Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr
385 390 395

Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser
400 405 410

Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro
415 420 425

Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro
430 435 440 445

Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu
450 455 460

Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val
465 470 475

Phe Val Gln Trp Met Gln Arg Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr
480 485 490

Val Thr Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe
495 500 505

Ala His Ser Ile Leu Thr Val Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu
510 515 520 525

Thr Tyr Ile Cys Val Val Ala His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr
530 535 540

Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val
545 550 555

Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys Tyr
560 565

03.07.98

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 89:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 116 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 89:

```

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

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 90:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 34 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

- (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 90:

GGGAATTCAT GGACTGGACC TGGAGGWTCC TYTT

34

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 91:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 32 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
- (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 91:

CCTCTAGAGG TTAGTTTGCA TGCACACACA GA

32

- (2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 92:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 112 aminokyselin
 - (B) TYP: aminokyselina
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: protein
- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 92:

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

- (2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 93:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 34 párů bazí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
- (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 93:

GCGAATTCTG CCTTGACTGA TCAGAGTTTC CTCA

34

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 94:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 32 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 94:

GCTCTAGATG AGGTGAAAGA TGAGCTGGAG GA

32

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 95:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 95:

CCTCGTCTCC TGTGAGAATT

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 96:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

03.07.98

- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
(A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 96:

ACTCTGACAT CAGCAGTACC

20

- (2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 97:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bazí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
(A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 97:

ACGAACACGT GGTGTGCAAA

20

- (2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 98:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bazí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
(A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 98:

AAGTCCAAGC TCATCTGCCA

20

- (2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 99:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bazí

03.07.98

- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 99:

TACAAGGTGA CCAGCACACT

20

- (2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 100:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 100:

AATGCGTCCT CCATGTGTGT

20

- (2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 101:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 101:

AGACCTGACC ACCTATGACA

20

- (2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 102:

03.07.99

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 102:

TCTGCGAGGA TGACTGGAAT

20

- (2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 103:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 103:

ATGTCTACTT GCTGCCACCA

20

- (2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 104:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 104:

TTGTCCCCGG AGAAGTATGT

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 105:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bazí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 105:

GTGTCCGAAG AGGAATGGAA

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 106:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bazí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 106:

CTCAGTGAAG GTTTCCTGCA

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 107:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bazí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

03.07.98

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 107:

AAAGGCTTGA GTGGATGGGA

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 108:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 20 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 108:

TGAGCAGCCT GAGATCTGAA

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 109:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 20 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 109:

GGTACTGCTG ATGTCAGAGT

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 110:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 20 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

03.07.98

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 110:

AATCACTGGA AGAGGCACGT

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 111:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 111:

TGGCAGATGA GCTTGGA

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 112:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 112:

AGCCAGTCGC TCTCTTGAT

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 113:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

03.07.98

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 113:

AGGAAGATGC TGGCAAAGGA

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 114:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 114:

TGGTGTGGGT TTTCACAGCT

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 115:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 115:

TTCCAGTCAT CCTCGCAGAT

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 116:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

03.07.98

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
(A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne
(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 116:

TGGTGGCAGC AAGTAGACAT

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 117:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 20 párů bazí
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
(A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne
(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 117:

ACATACTTCT CCGGGGACAA

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 118:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 20 párů bazí
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
(A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne
(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 118:

GTGTTCCATT CCTCTTCGGA

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 119:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 20 párů bazí

03.07.98

- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
- (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 119:

TTTACCGGTG GACTTGTCCA

20

- (2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 120:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bazí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
- (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 120:

TATCCAGAAG CCTTGCAGGA

20

- (2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 121:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bazí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
- (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 121:

TGTGTCCCTG GTAATGGTGA

20

- (2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 122:

03.07.93

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bazí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 122:

CTCGCACAGT AATACCACGC

20

- (2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 123:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bazí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 123:

TATCCGACGG GGAATTCTCA

20

- (2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 124:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bazí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 124:

TGTCTTCATC TTCCCGCCAT

20

03.07.98

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 125:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 125:

ACGCTGAGCA AAGCAGACTA

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 126:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 126:

TCCAGTGGGG ATGTTGTGAT

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 127:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

03.07.98

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 127:

AGTGGGTCAG GCACTGATTT

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 128:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 20 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 128:

TCTCCTGCAG GTCTAGTCAA

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 129:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 20 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 129:

GGGTAACTCC CAGGAGAGTG

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 130:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 20 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 130:

AGGGACCAAG GTGGAAATCA

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 131:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 20 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 131:

TACTTTGGCC TCTCTGTGAT

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 132:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 20 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 132:

ACTTCGCAGG CGTAGACTTT

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 133:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 20 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKvence: SEQ ID NO: 133:

TCTCCCCTGT TGAAGCTCTT

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 134:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKvence:

- (A) DÉLKA: 20 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKvence: SEQ ID NO: 134:

TTAAAGCCAA GGAGGAGGAG

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 135:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKvence:

- (A) DÉLKA: 20 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKvence: SEQ ID NO: 135:

CTCCACCCTG CTGATTTTCA

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 136:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKvence:

- (A) DÉLKA: 20 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
(A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne
(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 136:

TGCAGCCACA GTACGTTTGA

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 137:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 1869 párů bází
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) TYP ŘETĚZCE: dvojitý
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA až mRNA

(iii) HYPOTETICKÁ: ne
(iv) KÓDUJÍCÍ: ne
(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:
(A) ORGANISMUS: Homo sapiens

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 137:

ATGGACTGGA CCTGGAGGAT CCTCTTTTGT GTGGCAGCAG CCACAGGTGC CCACTCCCAG	60
GTCCAACCTG TGCAGTCTGG GGCTGAGGTG AAGAAGCCTG GGCCTCAGT GAAGGTTTCC	120
TGCAAGGCTT CTGGATACAC CTTCACTACC TATGCTATGC ATTGGGTGCG CCAGGCCCCC	180
GGACAAAGGC TTGAGTGGAT GGGATGGATC AACGCTGGCA ATGGTAACAC AAAATATTCA	240
CAGAAAGTCC AGGGCAGAGT CACCATTACC AGGGACACAT CCGCGAGCAC AGCCTACATG	300
GAGCTGAGCA GCCTGAGATC TGAAGACACG GCTGTGTATT ACTGTGCGAG AGGCGAGGAG	360
ATGGGAGCTA CTTCAGGTCC CGGGCGGTAC TACTTTGACT ACTGGGGCCA GGGAACCCTG	420
GTCACCGTCT CCTCAGGGAG TGCATCCGCC CCAACCCTTT TCCCCCTCGT CTCCTGTGAG	480
AATCCCCCGT CGGATACGAG CAGCGTGGCC GTTGGCTGCC TCGCACAGGA CTTCTTCCC	540
GACTCCATCA CTTTCTCCTG GAAATACAAG AACAACTCTG ACATCAGCAG CACCCGGGGC	600
TTCCCATCAG TCCTGAGAGG GGGCAAGTAC GCAGCCACCT CACAGGTGCT GCTGCCTTCC	660
AAGGACGTCA TGCAGGGCAC AGACGAACAC GTGGTGTGCA AAGTCCAGCA CCCCACGGC	720
AACAAAGAAA AGAACGTGCC TCTTCCAGTG ATTGCTGAGC TGCCTCCCA AGTGAGCGTC	780
TTCGTCCCAC CCCGCGACGG CTTCTTCGGC AACCCCCGCA AGTCCAAGCT CATCTGCCAG	840

GCCACGGGTT TCAGTCCCCG GCAGATTCAG GTGTCCTGGC TGCGCGAGGG GAAGCAGGTG 900
 GGGTCTGGCG TCACCACGGA CCAGGTGCAG GCTGAGGCCA AAGAGTCTGG GCCACGACC 960
 TACAAGGTGA CCAGCACACT GACCATCAAA GAGAGCGACT GGCTCAGCCA GAGCATGTTC 1020
 ACCTGCCGCG TGGATCACAG GGGCCTGACC TTCCAGCAGA ATGCGTCCTC CATGTGTGTC 1080
 CCCGATCAAG ACACAGCCAT CCGGGTCTTC GCCATCCCCC CATCCTTTGC CAGCATCTTC 1140
 CTCACCAAGT CCACCAAGTT GACCTGCCTG GTCACAGACC TGACCACCTA TGACAGCGTG 1200
 ACCATCTCCT GGACCCGCCA GAATGGCGAA GCTGTGAAAA CCCACACCAA CATCTCCGAG 1260
 AGCCACCCCA ATGCCACTTT CAGCGCCGTG GGTGAGGCCA GCATCTGCGA GGATGACTGG 1320
 AATTCCGGGG AGAGGTTTAC GTGCACCGTG ACCCAGACAG ACCTGCCCTC GCCACTGAAG 1380
 CAGACCATCT CCCGGCCCCA GGGGGTGGCC CTGCACAGGC CCGATGTCTA CTTGCTGCCA 1440
 CCAGCCCGGG AGCAGCTGAA CCTGCGGGAG TCGGCCACCA TCACGTGCCT GGTGACGGGC 1500
 TTCTCTCCCG CGGACGTCTT CGTGCACTGG ATGCAGAGGG GGCAGCCCTT GTCCCCGGAG 1560
 AAGTATGTGA CCAGCGCCCC AATGCCTGAG CCCAGGCCC CAGGCCGGTA CTTGCCCCAC 1620
 AGCATCCTGA CCGTGTCCGA AGAGGAATGG AACACGGGGG AGACCTACAT CTGCGTGGTG 1680
 GCCCATGAGG CCCTGCCCAA CAGGGTCACC GAGAGGACCG TGGACAAGTC CACCGGTAAA 1740
 CCCACCCTGT ACAACGTGTC CCTGGTCATG TCCGACACAG CTGGCACCTG CTACTGACCC 1800
 TGCTGGCCTG CCCACAGGCT CGGGGCGGCT GGCCGCTCTG TGTGTGCATG CAAACTAACC 1860
 CGTGTCAAC 1869

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 138:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 891 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: dvojitý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA až mRNA

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

- (A) ORGANISMUS: Homo sapiens

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 138:

TGCCTTGACT GATCAGGACT CCTCAGTTCA CCTTCTCACA ATGAGGCTCC CTGCTCAGCT 60
 CCTGGGGCTG CTAATGCTCT GGGTCCCAGG ATCCAGTGGG GATGTTGTGA TGA CTGCTCAGTC 120
 TCCACTCTCC CTGCCCCTCA TCCCTGGACA GCCGGCCTCC ATCTCCTGCA GCTCTAGTCA 180

AGGCCTCGTA TTCAGTGATG GAAACACCTA CGTGAATTGG TTTCATCAGA GGCCAGGCCA 240
ACCTCCAAGG CGCCTAATTT ATGAGGTTTC TCACCGGGAC TCTGGGGTCC CAGACAGATT 300
CAGCGGCAGT GGGTCAGGCA CTGATTTCAC ACTGAAAATC AGCAGGGTGG AGGCTGAGGA 360
TGTTGGGGTT TATTACTGCA TGCAAGGTAC ACAGTGGCCG TGGACGTTCC GCCAAGGGAC 420
GAAGGTGGAA ACCAAACGAA CTGTGGCTGC ACCATCTGTC TTCATCTTCC CGCCATCTGA 480
TGAGCAGTTG AAATCTGGAA CTGCCTCTGT TGTGTGCCTG CTGAATAACT TCTATCCCAG 540
AGAGGCCAAA GTACAGTGGA AAGTGGATAA CGCCCTCCAA TCGGGTAACT CCCAGGAGAG 600
TGTCACAGAG CAGGACAGCA AGGACAGCAC CTACAGCCTC AGCAGCACCC TGACGCTGAG 660
CAAAGCAGAC TACGAGAAAC ACAAACTCTA CGCCTGCGAA GTCACCCATC AGGGCCTGAG 720
CTCGCCCGTC ACAAGAGCT TCAACAGGGG AGAGTGTTAG AGGGAGAAGT GCCCCACCT 780
GCTCCTCAGT TCCAGCCTGA CCCCCTCCCA TCCTTTGGCC TCTGACCCTT TTTCCACAGG 840
GGACCTACCC CTATTGCGGT CCTCCAGCTC ATCTTTCACC TCATCTAGAG C 891

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 139:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKvence:
 - (A) DÉLKA: 40 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKvence: SEQ ID NO: 139:

AGCCGGCCTC CATCTCCTGC AGATCTAGTA AGAGCCTTGT 40

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 140:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKvence:
 - (A) DÉLKA: 40 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 140:

ACAAGGCTCT TACTAGATCT GCAGGAGATG GAGGCCGGCT

40

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 141:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 40 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 141:

AAGTTTCCAA CCGATTTTCT GGGGTCCCAG ACAGATTCAG

40

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 142:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 40 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 142:

CTGAATCTGT CTGGGACCCC AGAAAATCGG TTGGAACTT

40

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 143:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 50 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 143:

GGCTGAGGAT GTTGGGGTTT ATTACTGCTC TCAAAGTACA CATGTCCTC

50

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 144:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 50 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 144:

GAGGAACATG TGTACTTTGA GAGCAGTAAT AAACCCCAAC ATCCTCAGCC

50

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 145:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 50 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 145:

GGCTGAGGAT GTTGGGGTTT ATTTCTGCTC TCAAAGTACA CATGTCCTC

50

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 146:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 50 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

03.07.98

- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
- (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 146:

GAGGAACATG TGTACTTTGA GAGCAGAAAT AAACCCCAAC ATCCTCAGCC

50

- (2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 147:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 52 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
- (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 147:

CTCAAAGTAC ACATGTTCTT CCGGCGTTTCG GCCAAGGGAC CAAGGTGGAA AT

52

- (2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 148:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 52 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
- (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 148:

ATTTCACCT TGGTCCCTTG GCCGAACGCC GGAGGAACAT GTGTACTTTG AG

52

- (2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 149:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 40 párů bází

03.07.98

- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
- (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 149:

GGGCTCGAGT GCCTTGACTG ATCAGGACTC CTCAGTTCAC

40

- (2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 150:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 31 párů bazí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
- (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 150:

GGCCAGTCTC CAAGGCTCCT GATCTACAAA G

31

- (2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 151:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 31 párů bazí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
- (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 151:

CTTTGTAGAT CAGGAGCCTT GGAGACTGGC C

31

- (2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 152:

03.07.98

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 31 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

- (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 152:

CCCTCTAGAC TAACACTCTC CCCTGTTGAA G

31

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 153:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 20 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

- (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 153:

CTGCTCTAAA AGCTGCGGAA

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 154:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 20 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

- (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 154:

TAGATCTGCA GGAGARGGAG

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 155:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 155:

TATGTTTCAG GTTCAGGGGG

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 156:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 40 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 156:

GGGCTCGAGC TAAGGGAATT CCGCCTCTCC TCAGACACTG

40

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 157:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 40 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

03.07.98

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 157:

GAACTGCAGG CGTCCACTCT GAGGTGCAGC TTGTGCAGTC

40

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 158:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 40 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 158:

GACTGCACAA GCTGCACCTC AGAGTGGACG CCTGCAGTTC

40

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 159:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 50 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 159:

AATATGCATA AATTCGAATG GATGGGATAT ATTTATCCTT ACAATGGTGG

50

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 160:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 50 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 160:

CATCCATTG AATTATGCA TATTATAGTC AGTGAAGGTG TATCCAGAAG

50

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 161:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 40 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 161:

CCACATTGAC TGTTGACAAT TCCGCGAGCA CAGCCTACAT

40

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 162:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 40 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 162:

ATGTAGGCTG TGCTCGCGGA ATTGTCAACA GTCAATGTGG

40

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 163:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 40 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 163:

GAAGTTACTA TGCTATGGAC TACTGGGGCC AGGGAACCCT

40

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 164:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 40 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 164:

TAGTCCATAG CATAGTAACT TCTCGCACAG TAATACACAG

40

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 165:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 39 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 165:

GGGCTCGAGG CCAAAGAGTC TGGGCCCCAG ACCTACAAG

39

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 166:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 30 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

03.07.98

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
(A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne
(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 166:

CTTGTAGGTC GTGGGCCCCAG ACTCTTTGGC

30

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 167:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 31 párů bazí
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
(A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne
(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 167:

GGGTCTAGAT CAGTAGCAGG TGCCAGCTGT G

31

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 168:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 60 párů bazí
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
(A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne
(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 168:

TATGCATTGG GTGCGCCAGG CCCCCGGACA AGGACTCGAA TGGATGGGAT ATATTTATCC

60

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 169:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 60 párů bazí

03.07.98

- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 169:

CGAGTCCTTG TCCGGGGGCC TGGCGCACCC AATGCATATT ATAGTCAGTG AAGGTGTATC

60

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 170:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 60 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 170:

TATGCATTGG GTGAAGCAGG CCCATGGAAA GAGCCTCGAA TGGATGGGAT ATATTTATCC

60

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 171:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 60 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 171:

CGAGGCTCTT TCCATGGGCC TGCTTCACCC AATGCATATT ATAGTCAGTG AAGGTGTATC

60

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 172:

03.07.98

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 30 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

- (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 172:

GAGCGACTGG CTCAGCCAGA GCATGTTAC

30

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 173:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 30 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

- (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 173:

GTGAACATGC TCTGGCTGAG CCACTCGCTC

30

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 174:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 36 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

- (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 174:

ACCTACATCT GCGTGGTGGC CCATGAGGCC CTGCCC

36

03.07.98

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 175:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 50 párů bazí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 175:

GGCCTCATGG GCCACCACGC AGATGTAGGT CTCCCCCGTG TTCCATTCCT

50

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 176:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 26 párů bazí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 176:

GCTTTATTG TAACCATTAT AAGCTG

26

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 177:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 30 párů bazí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 177:

CTAGATCAGT AGCAGGTGCC AGCTGTGTCG

30

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 178:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 24 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 178:

CATAGTAACT TCTCGCACAG TAAT

24

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 179:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 23 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 179:

GATACACCTT CACTGACTAT AAT

23

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 180:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 20 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

03.07.98

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 180:

□@"z-ń

CGTCGGATAC GAGCAGCGTG

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 181:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 19 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 181:

CACCCCGCGA CGGCTTCTT

19

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 182:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 20 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 182:

GGATCACAGG GGCCTGACCT

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 183:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 20 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

03.07.98

(A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 183:

CTGTGAAAAC CCACACCAAC

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 184:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 20 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 184:

GCTGAACCTG CGGGAGTCGG

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 185:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 20 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 185:

GTGGCCCATG AGGCCCTGCC

20

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 186:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 37 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
(A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 186:

GGGGAATTCC AGTACGGAGT TGGGGAAGAA GCTCTTT

37

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 187:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 35 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
(A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 187:

GTTTCTTCTG CCTCTGTCAC CAAGTTAGAT CTGGA

35

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 188:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 35 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
(A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) KÓDUJÍCÍ: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 188:

TCCAGATCTA ACTTGGTGAC AGAGGCAGAA GAAAC

35

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 189:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

03.07.98

- (A) DÉLKA: 28 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = "synthetic DNA"

- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) KÓDUJÍCÍ: ne

- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 189:

CCCTCTAGAC GGGTCACGTG GGCATCAC

28

Zastupuje:

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob výroby humanizované protilátky a jejích derivátů, obsahujících nejméně jeden lehký řetězec a jeden těžký řetězec, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se

- a) volí protilátka odlišného než lidského původu s obsahem alespoň jedné oblasti CDR,
- b) zvolí se těžký řetězec lidské protilátky,
- c) zvolí se lehký řetězec lidské protilátky,
- d) alespoň jedna oblast CDR z těžkého řetězce protilátky odlišné od lidského původu se uloží do těžkého řetězce lidské protilátky za vzniku rekombinantního těžkého řetězce a
- e) alespoň jedna oblast CDR z lehkého řetězce protilátky jiného než lidského původu se uloží do lehkého řetězce protilátky lidského původu za vzniku rekombinantního lehkého řetězce,

přičemž lehký a těžký řetězec lidské protilátky se volí pouze na základě homologie sekvence s lehkým a těžkým řetězcem protilátky jiného než lidského původu.

2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se z řetězce lidské protilátky odstraní oblasti CDR před uložením alespoň jedné oblasti CDR nebo jejího fragmentu z řetězce protilátky jiného než lidského původu.

3. Způsob podle nároku 1 nebo 2, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se lehký a těžký řetězec lidské protilátky vybírají na základě homologie sekvence aminokyselin.

4. Způsob podle některého z nároků 1 až 3, v y z n a -
č u j í c í s e t í m , že se homologie sekvencí stanoví
pouze s ohledem na rámcové oblasti.

5. Způsob podle některého z nároků 1 až 4, v y -
z n a č u j í c í s e t í m , že se řetězce lidské pro-
tilátky vybírají na základě totožnosti alespoň 70 % amino-
kyselin v rámcových oblastech ve srovnání s řetězcem proti-
látky jiného než lidského původu.

6. Způsob podle některého z nároků 1 až 5, v y z n a -
č u j í c í s e t í m , že se do příslušného řetězce lidské
protilátky uloží celá oblast CDR z každého řetězce protilátky
jiného než lidského původu.

7. Způsob podle některého z nároků 1 až 6, v y z n a -
č u j í c í s e t í m , že se jako protilátka jiného než
lidského původu užije myší protilátka CH11.

8. Způsob podle některého z nároků 1 až 7, v y z n a -
č u j í c í s e t í m , že se jako lehký řetězec lidského
původu užije lehký řetězec lidské protilátky RPMI6410'CL.

9. Způsob podle některého z nároků 1 až 8, v y -
z n a č u j í c í s e t í m , že se jako těžký řetězec
užije těžký řetězec lidské protilátky 21.28'CL.

10. Způsob podle některého z nároků 1 až 9, v y -
z n a č u j í c í s e t í m , že oblasti aminokyselin,
odvozené od lidské protilátky jsou tvořeny alespoň větši-
nou rámcových oblastí této protilátky.

11. Způsob podle nároku 11, v y z n a č u j í c í
s e t í m , že oblasti aminokyselin, odvozené od lidské
protilátky dále obsahují konstantní oblast nebo její část.

12. Způsob podle některého nároku 1 až 11, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se do lidské protilátky uloží CDR jiného než lidského původu spolu s nejméně jedním významným zbytkem aminokyseliny nejméně jedné rámcové oblasti CDR jiného než lidského původu.

13. Způsob podle nároku 12, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se nejméně jeden významný zbytek aminokyselin zařazuje do rámcové oblasti jiného než lidského původu spolu s CDR v případě, že zbytek splňuje nejméně jedno z následujících kritérií:

- a) aminokyselina se v rámcové oblasti lidského akceptoru v uvedené poloze vyskytuje vzácně, kdežto odpovídající aminokyselina donoru se v této poloze akceptoru běžně vyskytuje,
- b) ve trojrozměrném modelu imunoglobulinu obsahuje aminokyselina v postranním řetězci atom, schopný vytvořit vazbu s antigenem nebo s oblastí CDR humanizované protilátky podle jednoho z kritérií i) a ii)
 - i) podstranní řetězec je polární a je v menší vzdálenosti než $2,9 \times 10^{-10}$ m od druhého polárního atomu nebo
 - ii) atom postranního řetězce nese náboj a je ve vzdálenosti méně než $3,35 \times 10^{-10}$ m od atomu s opačným nábojem,
- c) aminokyselina je v poloze, která je jednou z určujících poloh pro strukturu kanonické oblasti CDR a
- d) aminokyselina je v poloze, která je ve styku s povrchem těžkého a lehkého řetězce.

14. Způsob podle nároku 13, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se polohy aminokyselin podle kritérií b) a d) stanoví pomocí modelování molekul.

15. Způsob podle nároku 14, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se polohy aminokyselin dále stanoví srovnáním s krystalografickými údaji pro další protilátky.

16. Způsob podle nároku 15, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se aminokyselina z rámcové oblasti použije v případě, že její použitelnost je potvrzena modelováním molekul i krystalografickými údaji v rtg-záření.

17. Protilátka, získaná způsobem podle některého z nároků 1 až 16.

18. Protilátka podle nároku 17 s účinností proti Fas.

19. Protilátka podle nároku 18, typu molekuly IgM s účinností proti Fas.

20. Protilátka podle některého z nároků 17 až 19, typu IgM bez řetězce J.

21. Protilátka podle některého z nároků 17 až 20, v níž lehký řetězec má sekvenci aminokyselin, definovanou SEQ ID No. 78 a těžký řetězec má sekvenci aminokyselin, definovanou SEQ ID No. 86.

22. Protilátka podle některého z nároků 17 až 20, v níž lehký řetězec má sekvenci aminokyselin, definovanou SEQ ID No. 78 a těžký řetězec má sekvenci aminokyselin, definovanou SEQ ID No. 88.

23. Protilátka podle některého z nároků 17 až 20, v níž lehký řetězec má sekvenci aminokyselin, definovanou

SEQ ID No. 80 a těžký řetězec má sekvenci aminokyselin definovanou SEQ ID No. 86.

24. Protilátka podle některého z nároků 17 až 20, v níž lehký řetězec má sekvenci aminokyselin, definovanou SEQ ID No. 80, a těžký řetězec má sekvenci aminokyselin definovanou SEQ ID No. 88.

25. Protilátka podle některého z nároků 17 až 20, v níž lehký řetězec má sekvenci aminokyselin, definovanou SEQ ID No. 82 a těžký řetězec má sekvenci aminokyselin, definovanou SEQ ID No. 86.

26. Protilátka podle některého z nároků 17 až 20, v níž lehký řetězec má sekvenci aminokyselin, definovanou SEQ ID No. 82 a těžký řetězec má sekvenci aminokyselin, definovanou SEQ ID No. 88.

27. Protilátka podle některého z nároků 17 až 20, v níž lehký řetězec má sekvenci aminokyselin, definovanou SEQ ID No. 84 a těžký řetězec má sekvenci aminokyselin, definovanou SEQ ID No. 86.

28. Protilátka podle některého z nároků 17 až 20, v níž lehký řetězec má sekvenci aminokyselin, definovanou SEQ ID No. 84 a těžký řetězec má sekvenci aminokyselin, definovanou SEQ ID No. 88.

29. Kódová RNA pro protilátku podle některého z nároků 17 až 28.

30. Kódová DNA pro protilátku podle některého z nároků 17 až 28.

31. DNA, hybridizující s DNA z nároku 30, s výhodou při 60 až 70 °C a v 6 x SSC.

32. Vektor, obsahující DNA podle nároku 30 nebo 31.

33. Vektor podle nároku 32, který je vektorem pro expresi.

34. Vektor, zvolený z rekombinantních vektorů DNA ze skupiny pHkKY2-58, pHkKF2-19, pHkRY2-10, pHkRF2-52, pH_μH5-1 a pH_μM1-1.

35. Hostitelská buňka, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je transformována vektorem pro expresi podle některého z nároků 32 až 34.

36. *E. coli* pHkKY2-58 (FERM BP-5861).

37. *E. coli* pHkKF2-19 (FERM BP-5860).

38. *E. coli* pHkRY2-10 (FERM BP-5859).

39. *E. coli* pHkRF2-52 (FERM BP-5862).

40. *E. coli* pH_μH5-1 (FERM BP-5863).

41. *E. coli* pH_μM1-1 (FERM BP-5864).

42. Způsob výroby imunoglobulinového produktu, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se pěstuje buňka podle některého z nároků 32 až 34 za podmínek, při nichž

03.07.98

- 233 -

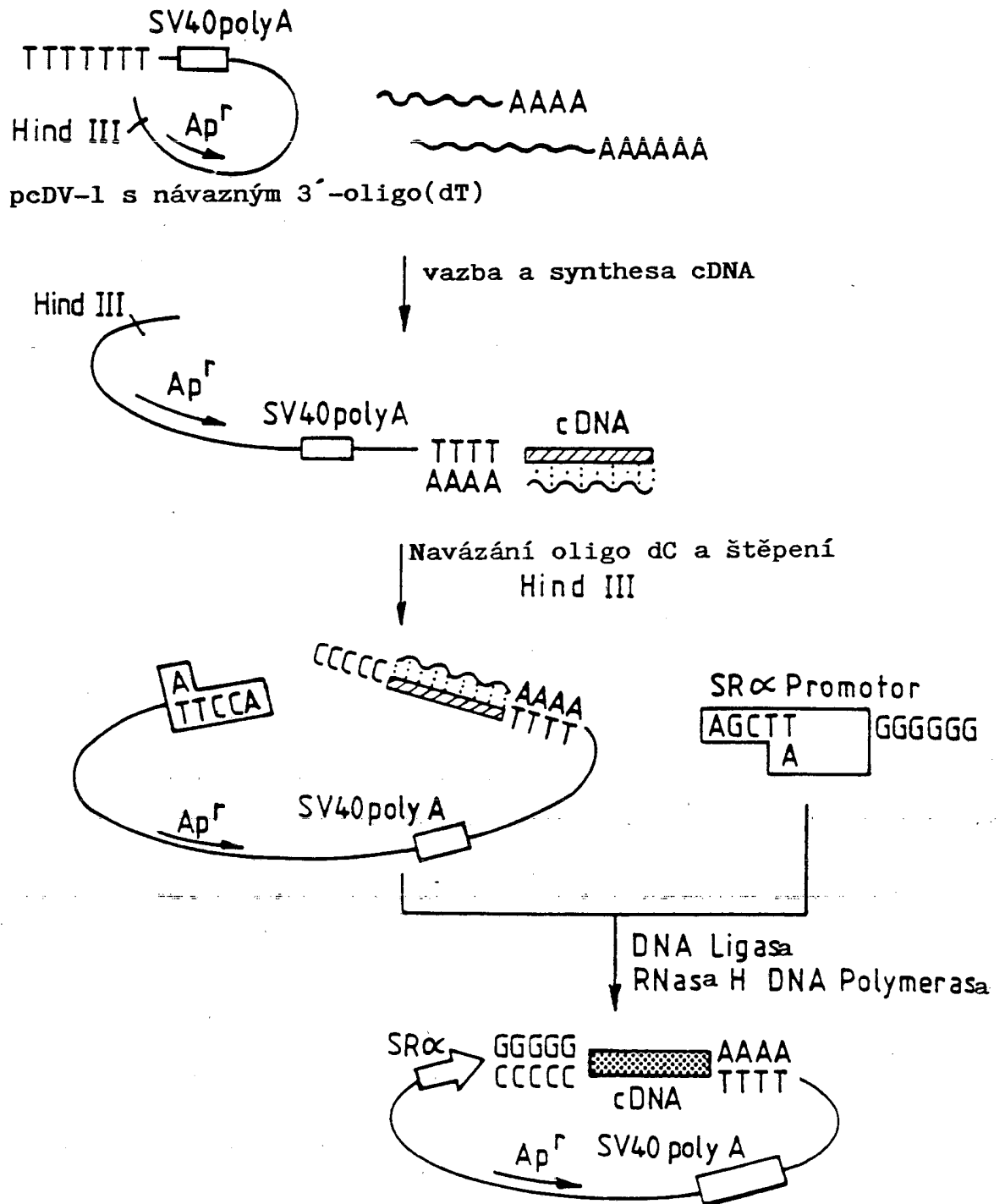
může dojít k expresi kódové DNA pro řetězec H nebo řetězec L imunoglobulinu, uložené ve vektoru, načež se imunoglobulin z kultury izoluje.

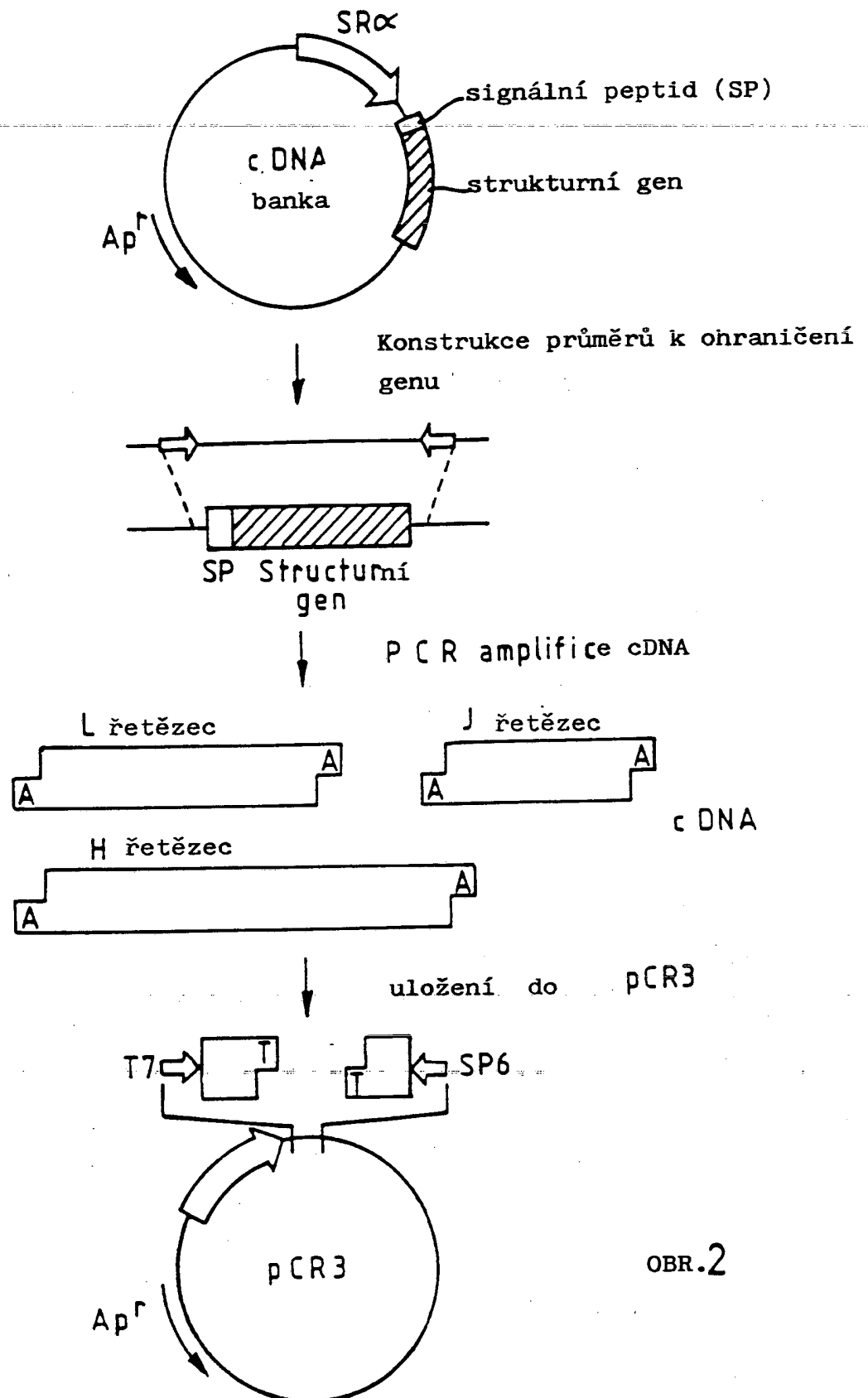
43. Použití protilátky podle některého z nároků 17 až 28 pro výrobu farmaceutického prostředku pro léčení autoimunitních onemocnění.

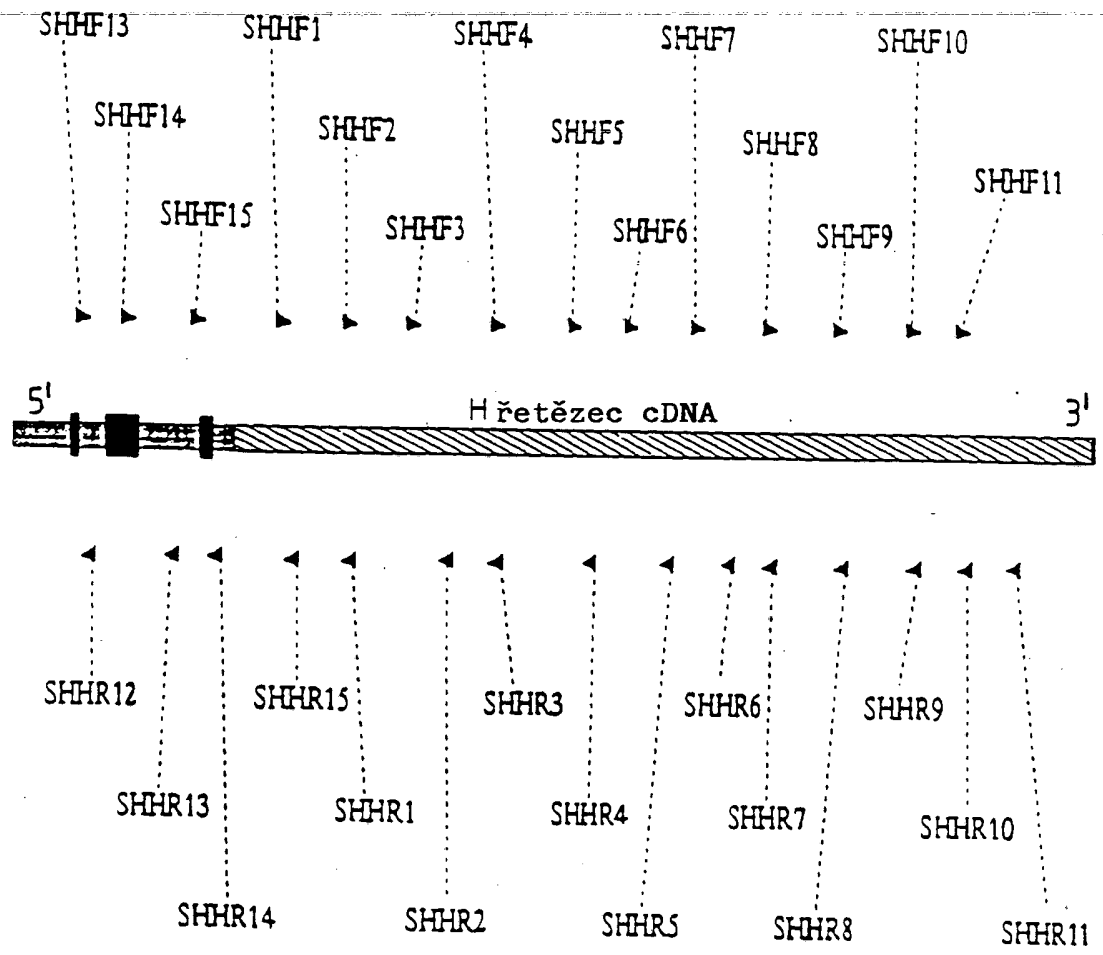
44. Použití podle nároku 43, při němž je autoimunitním onemocněním revmatismus.

Zastupuje:

OBR. 1

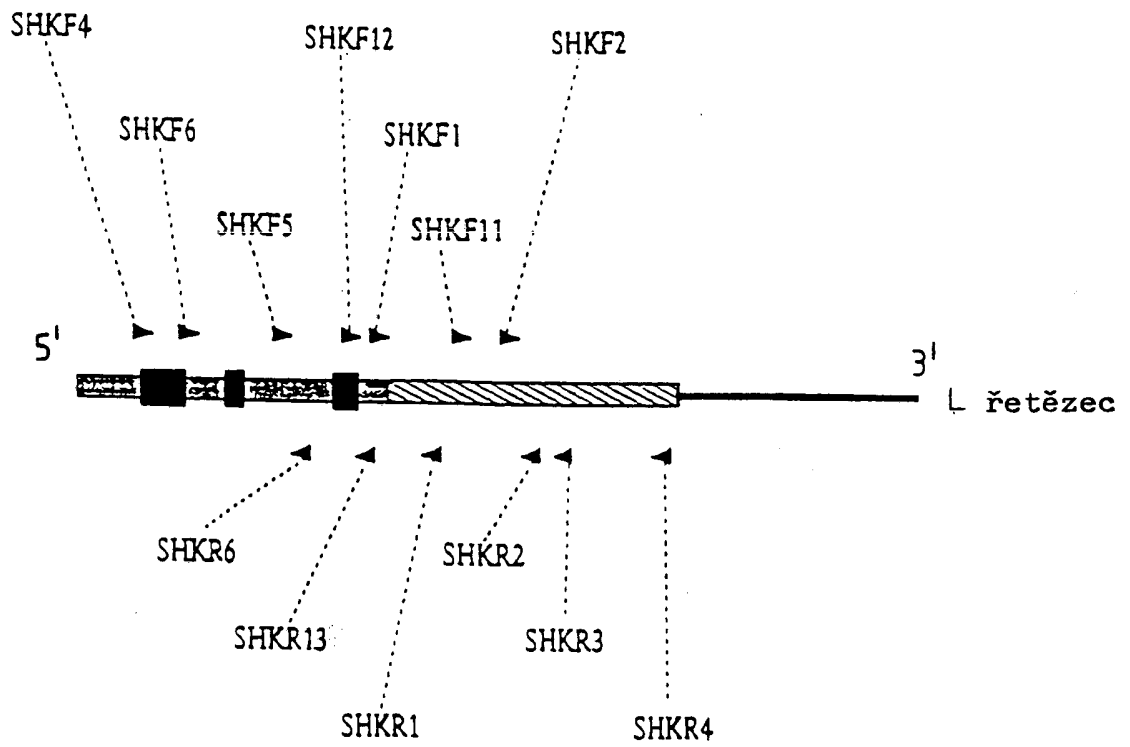




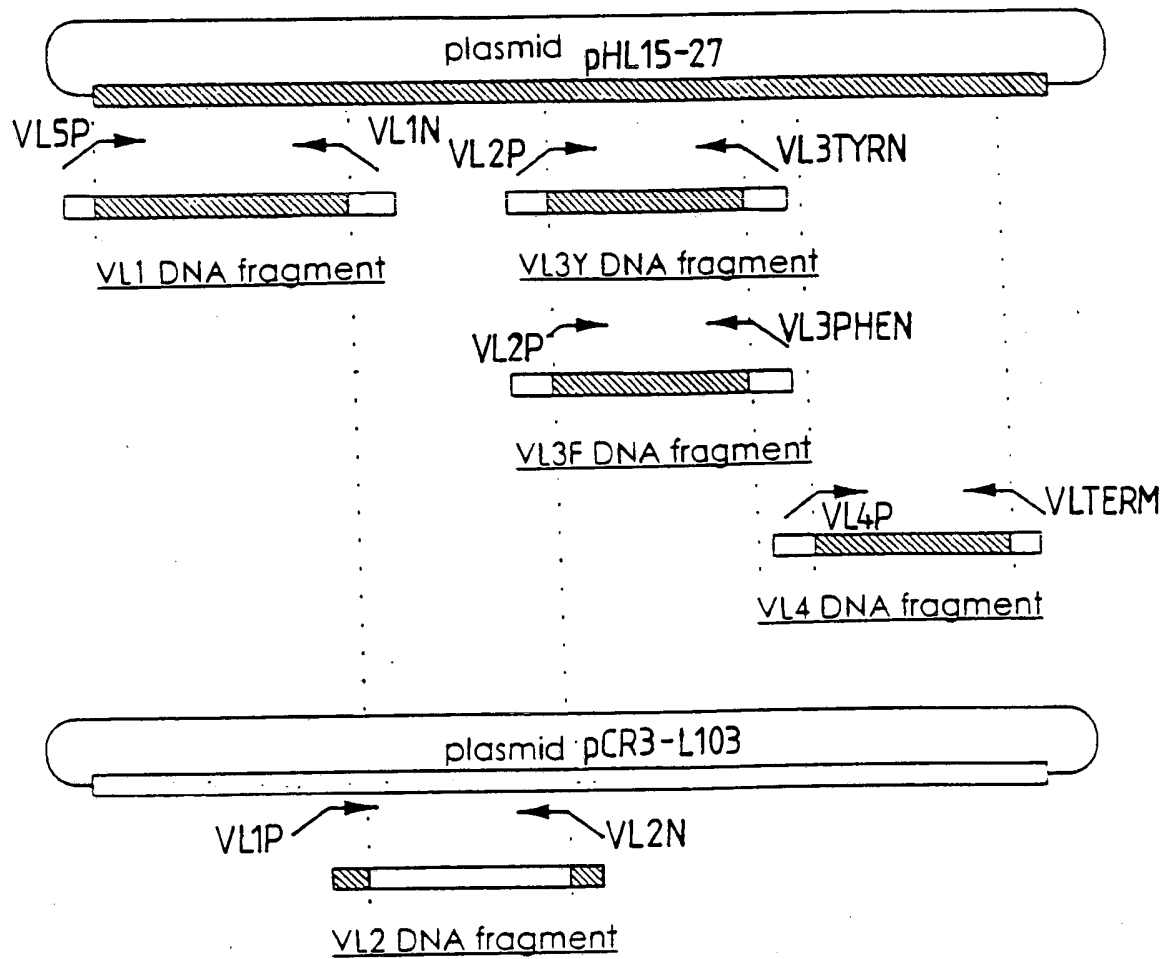


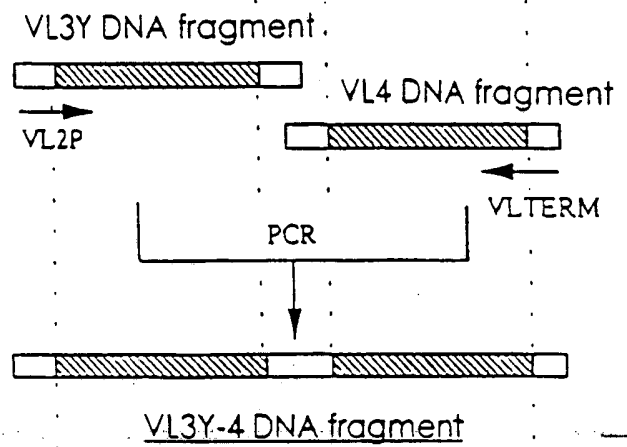
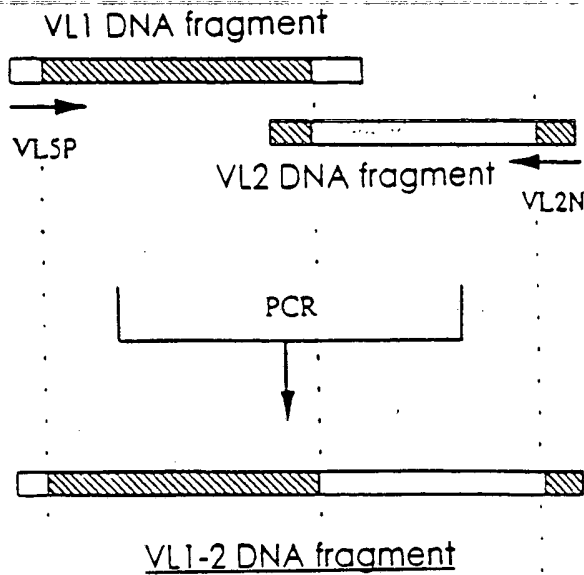
◀ : označuje místo vazby primeru
a směr analýzy sekvence

OBR. 3

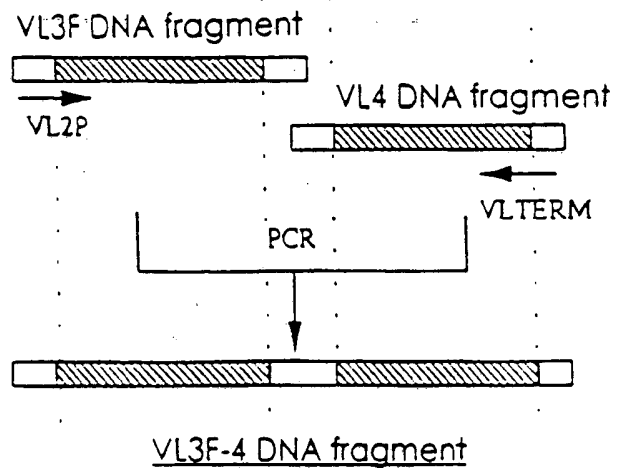


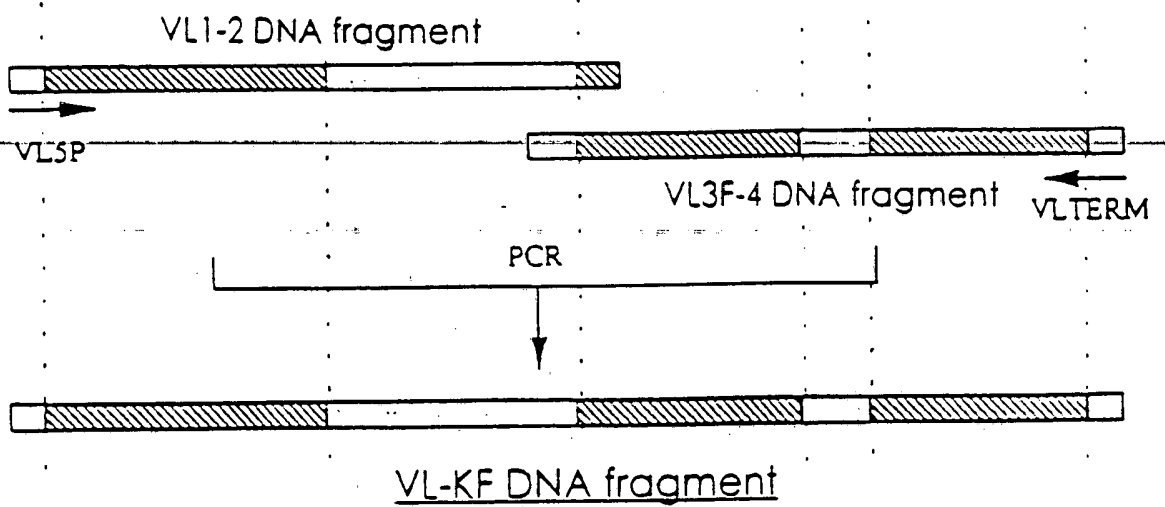
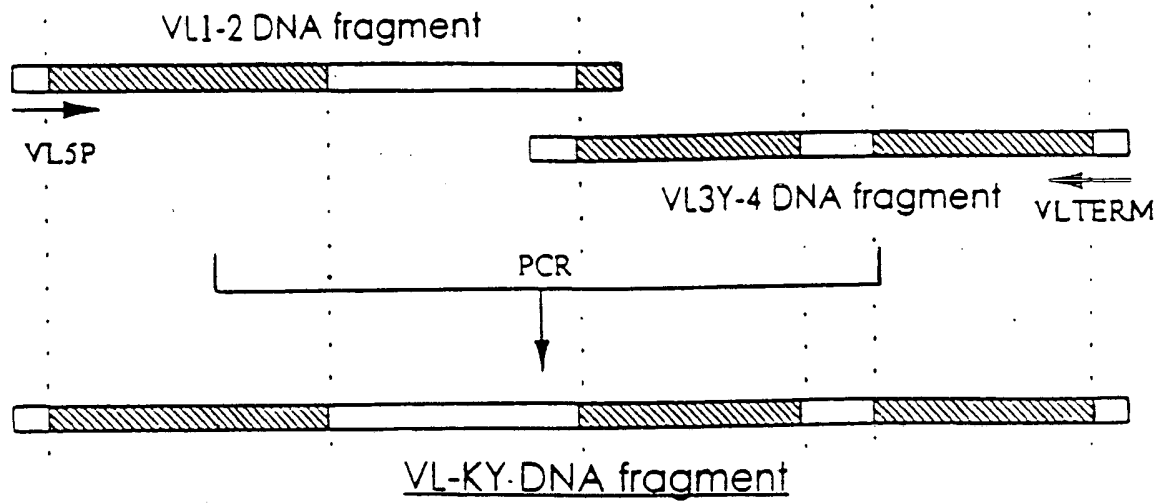
◀ : označuje místo vazby primeru
a směr analýzy sekvence

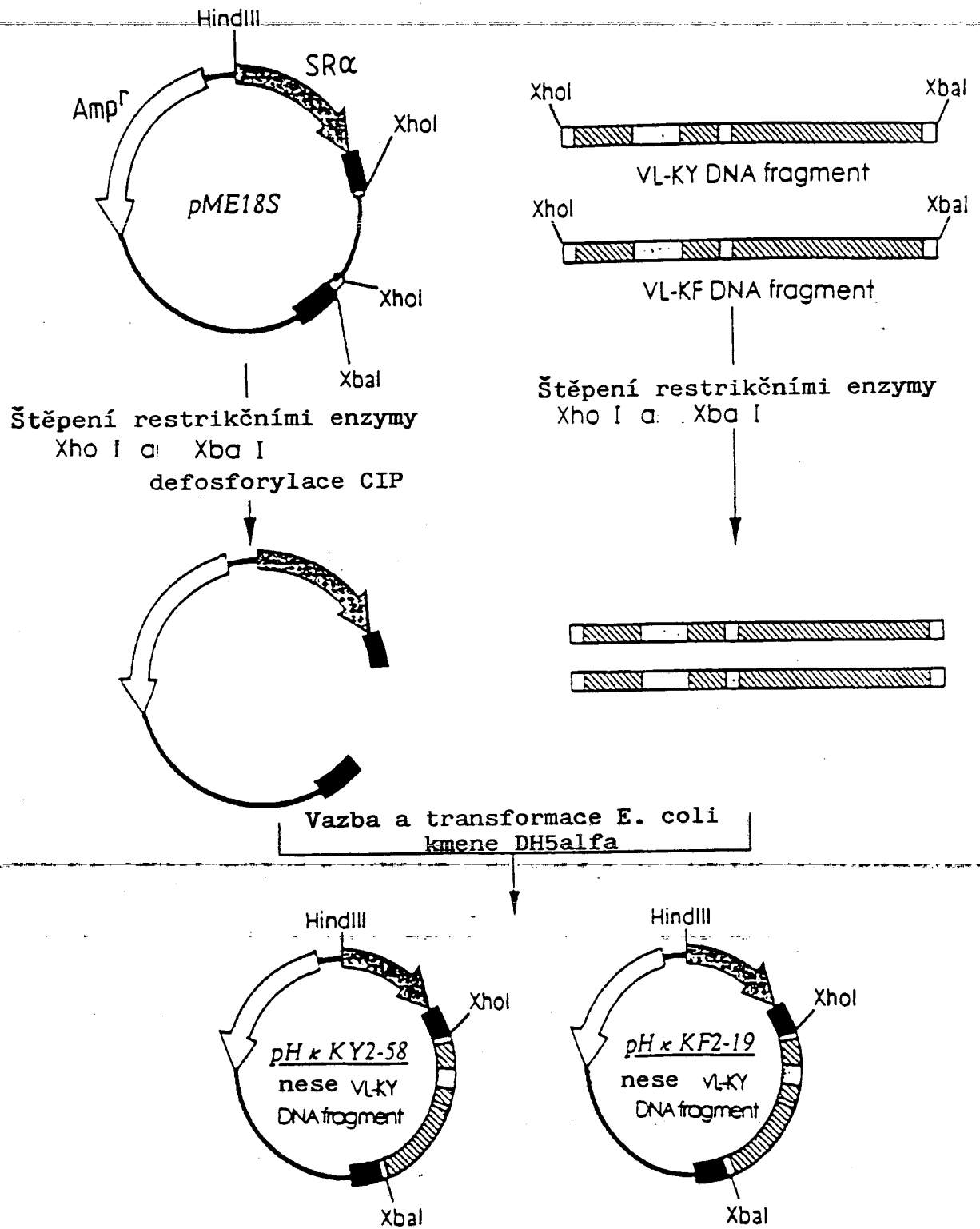




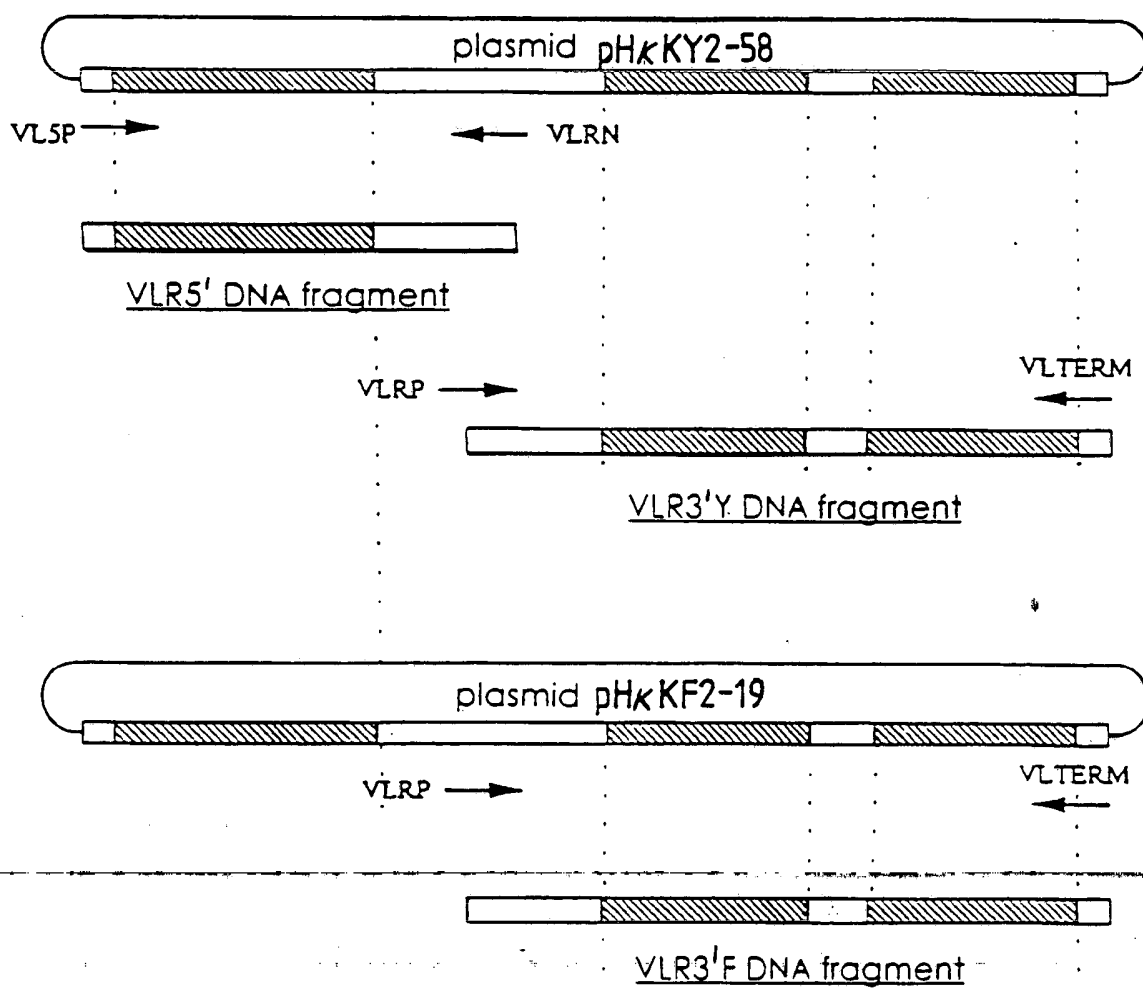
OBR. 6

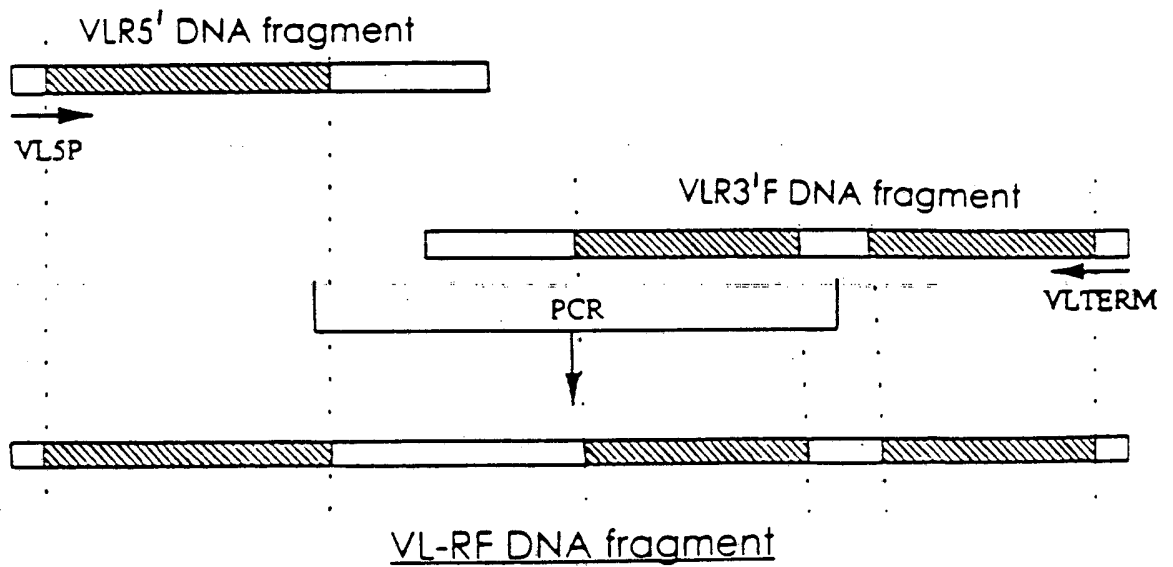
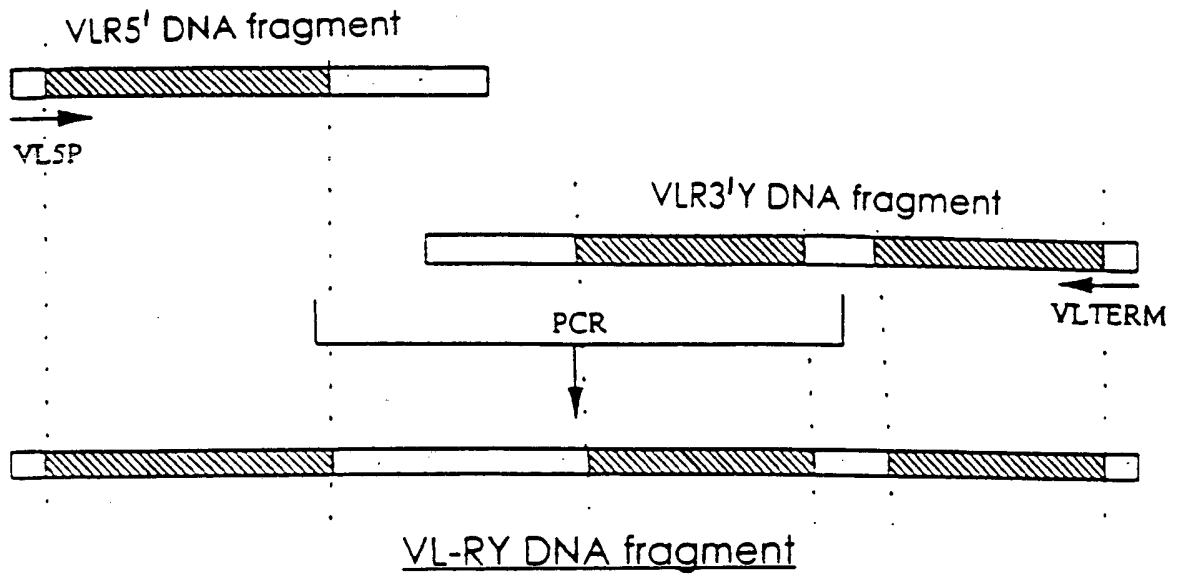


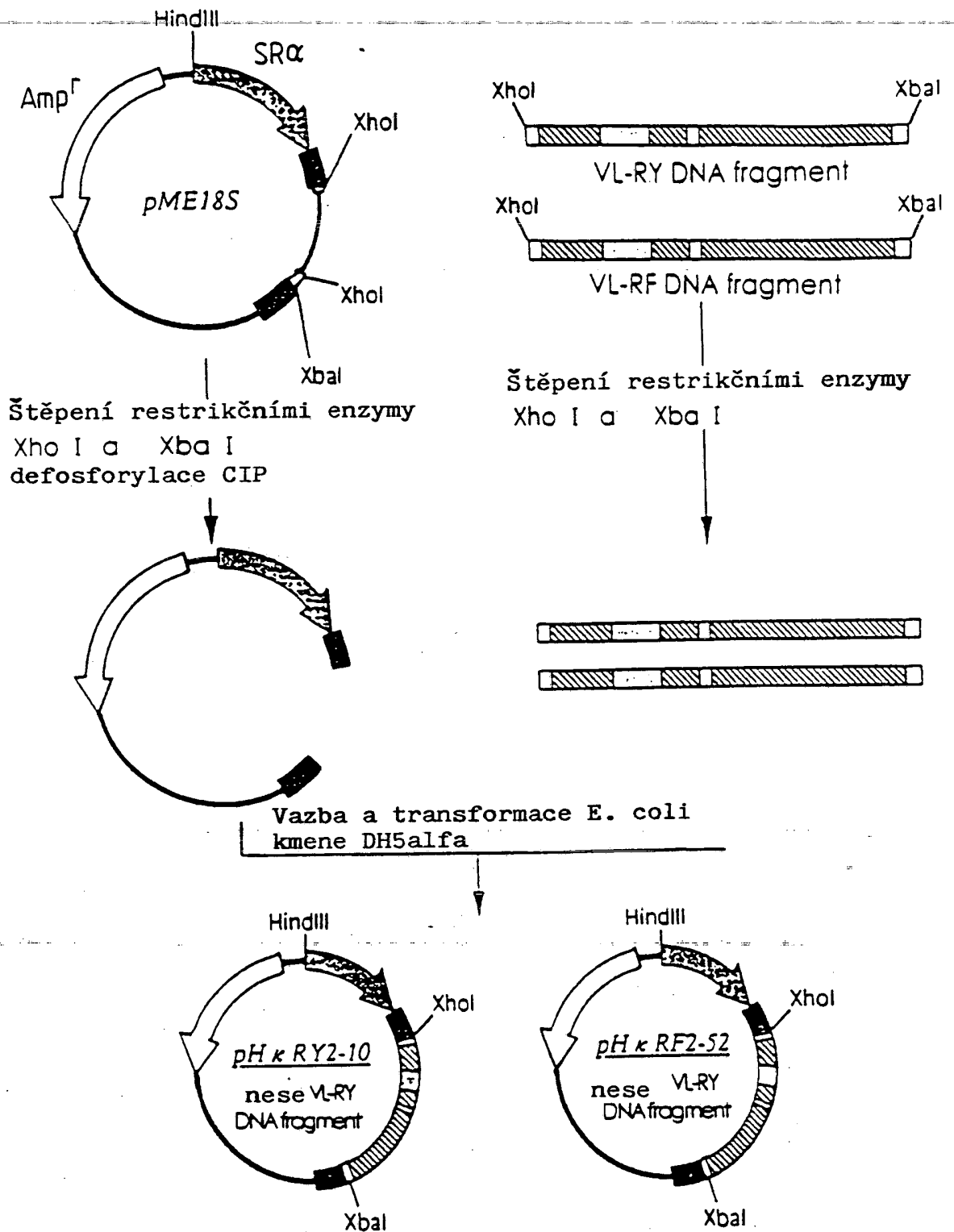




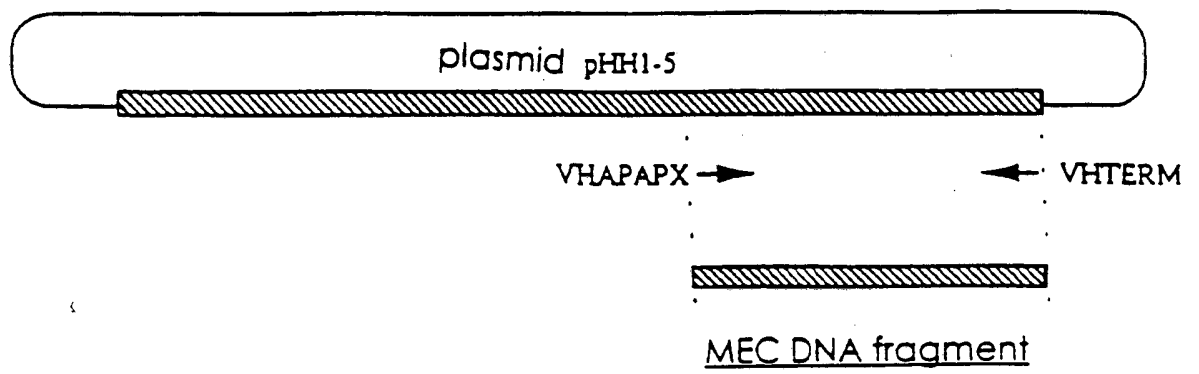
PV 858-98
03.07.98



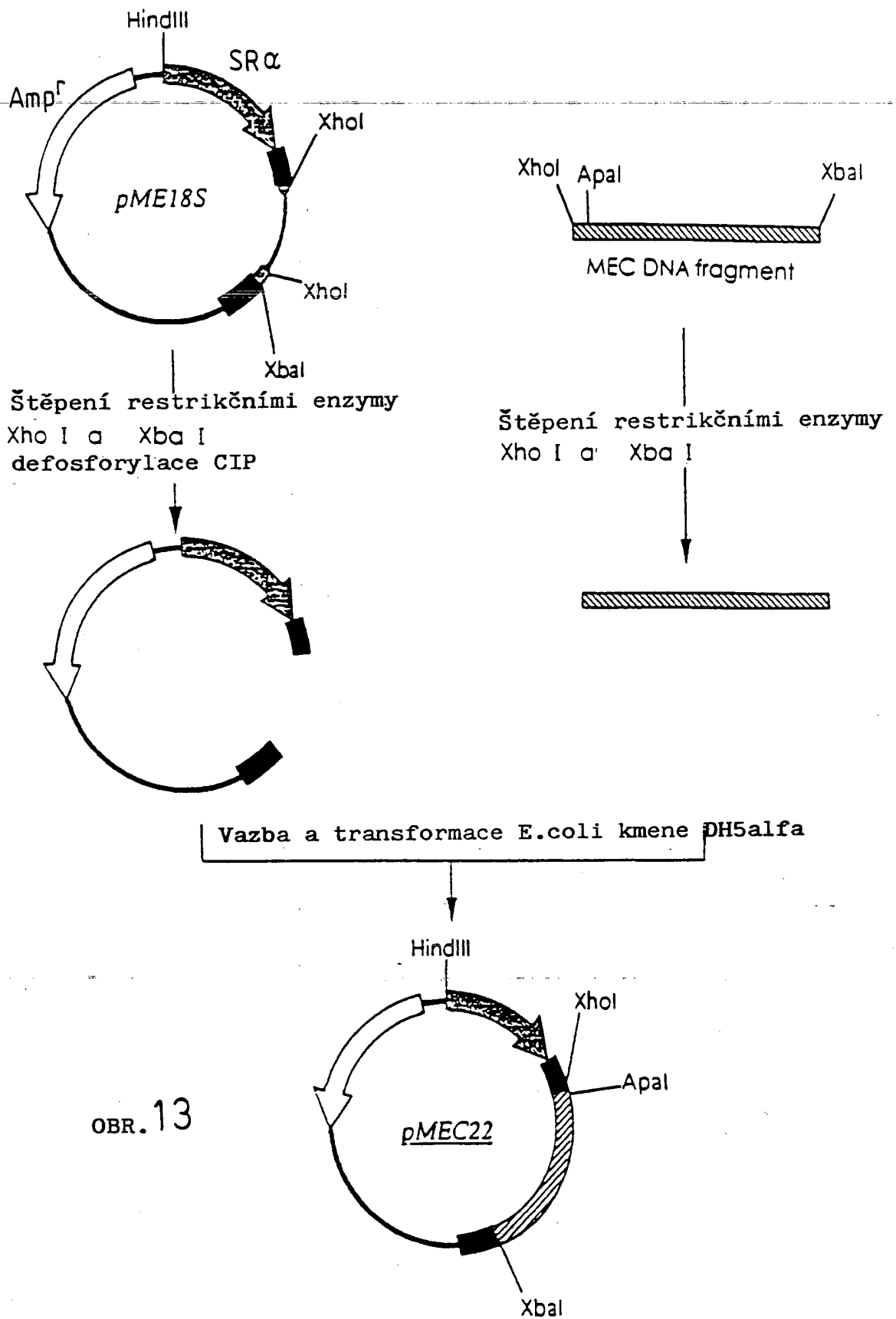




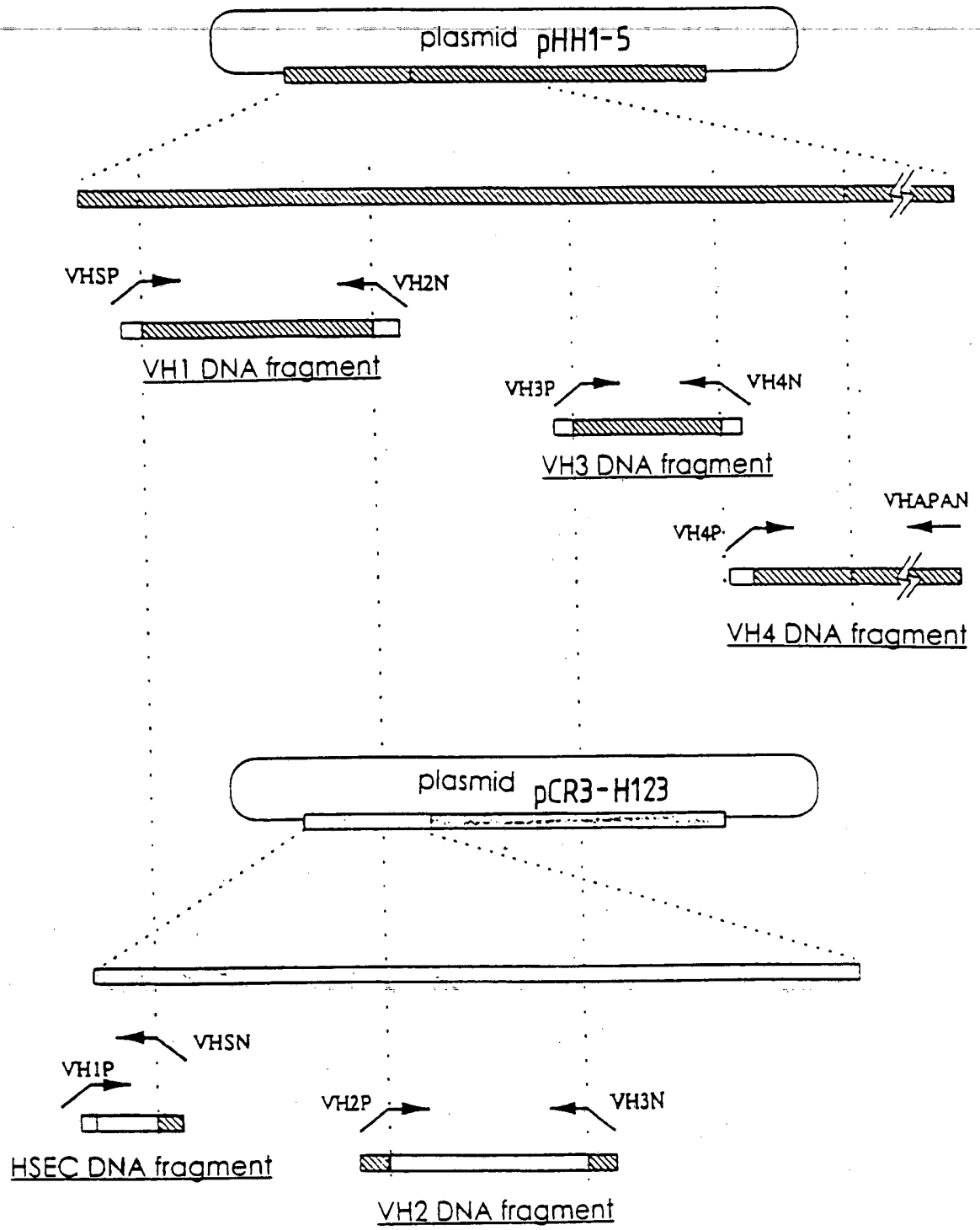
PV 858-98
03.07.98

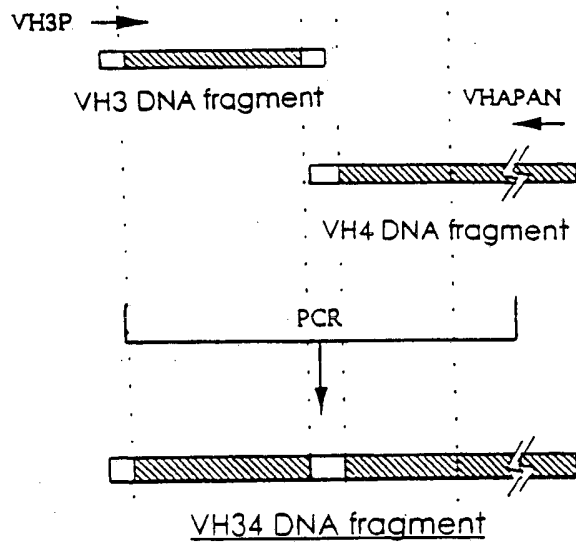
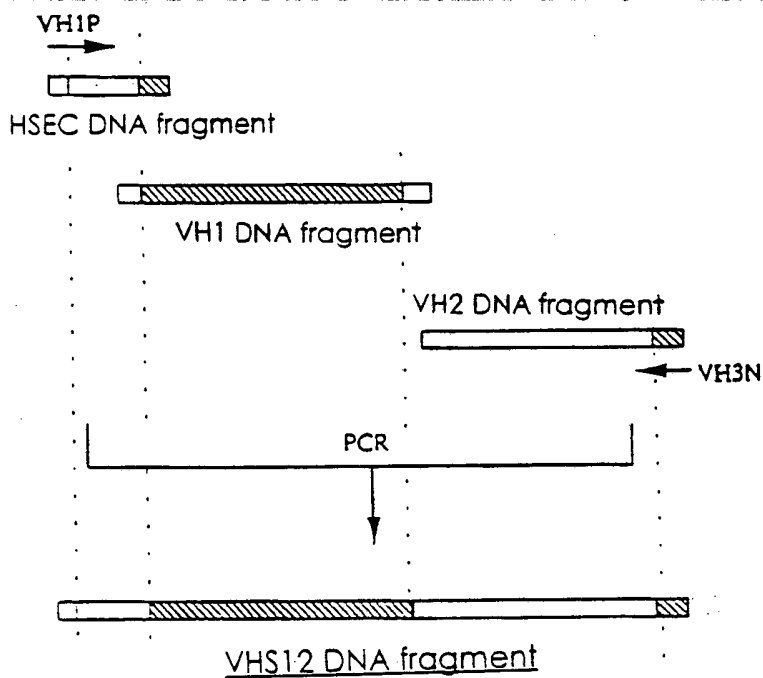


OBR. 12

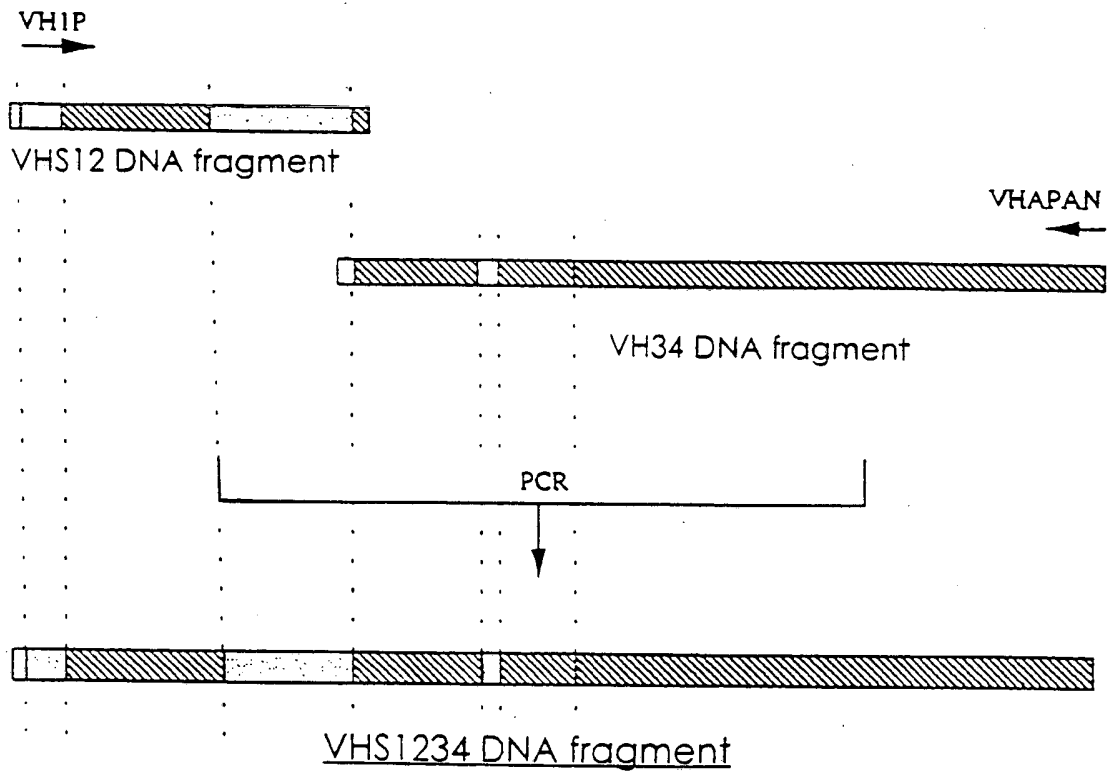


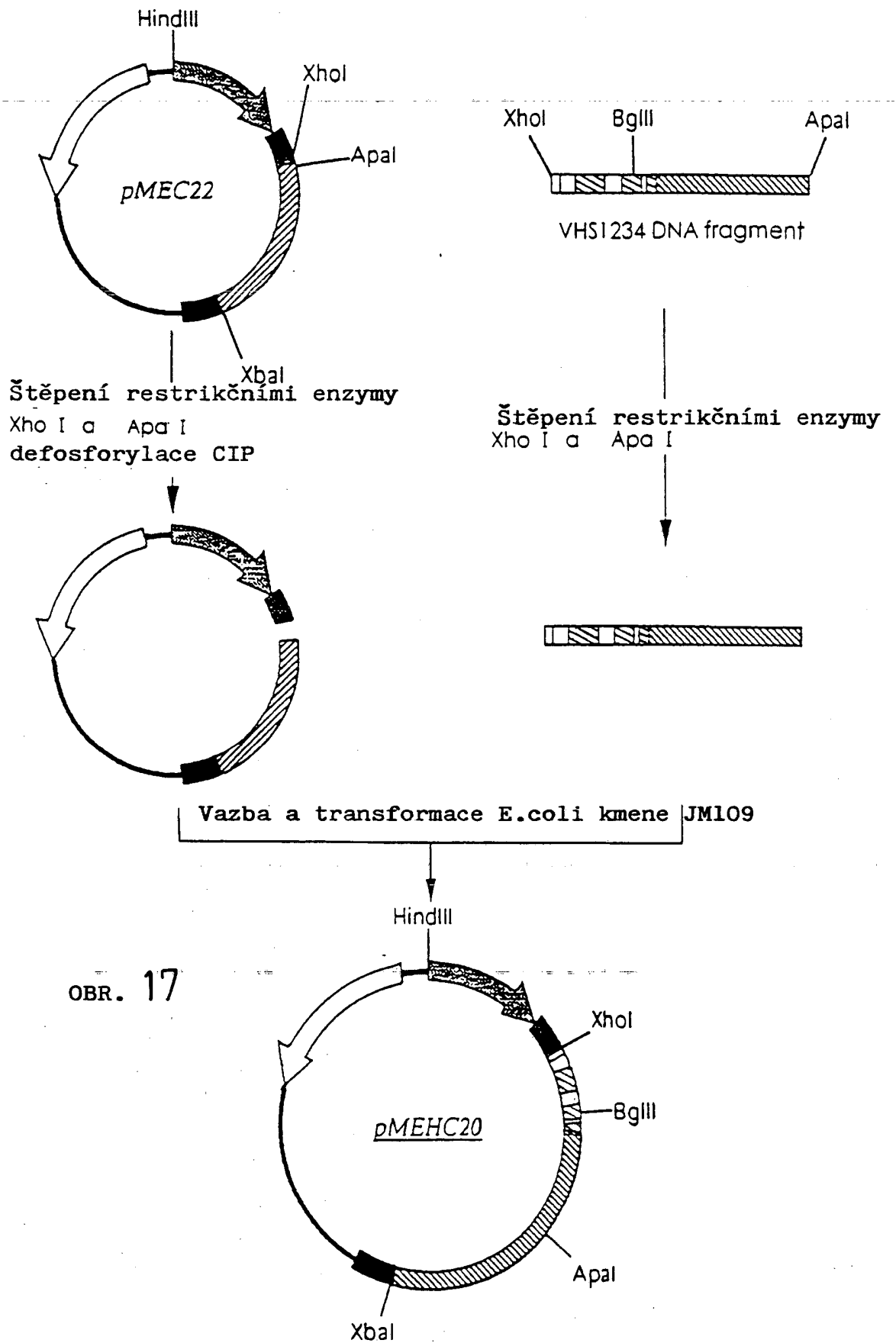
PV 858-98
03.07.98





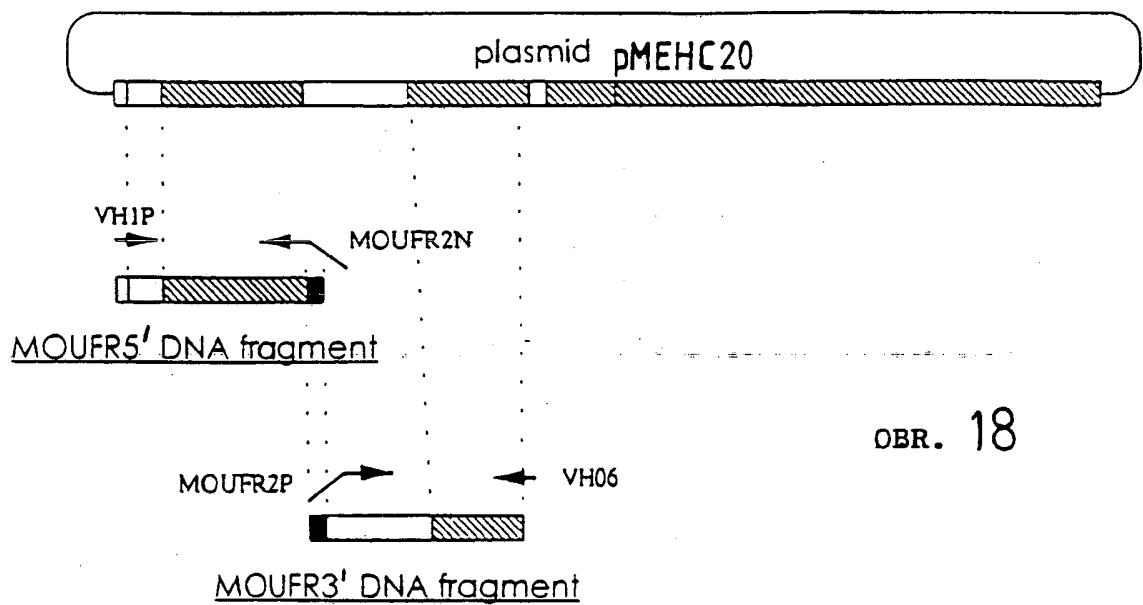
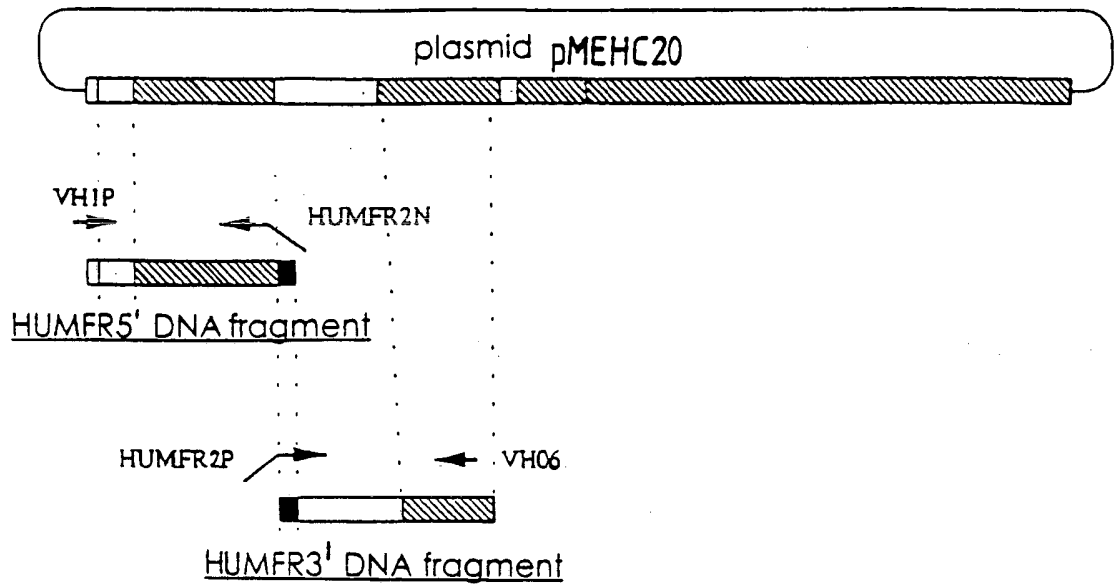
OBR. 15



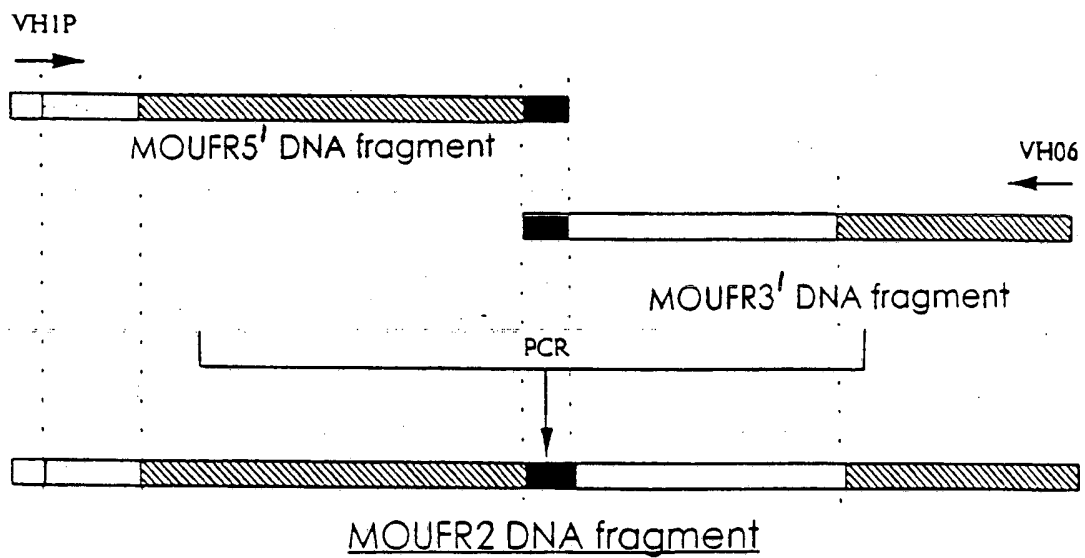
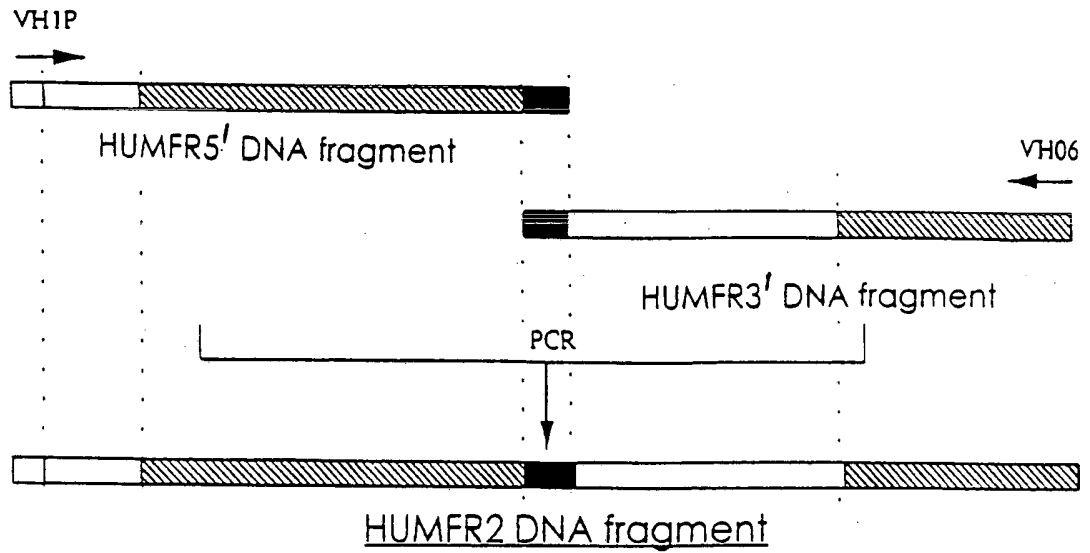


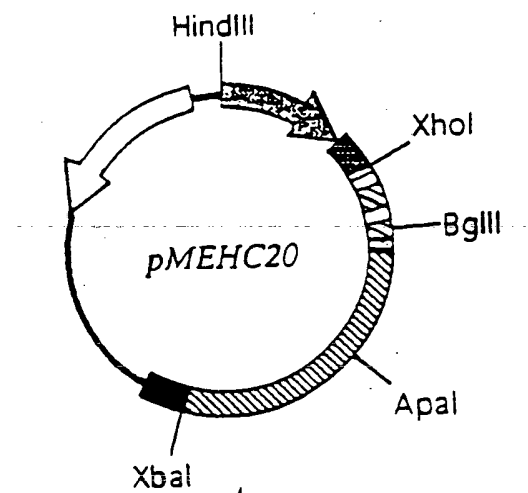
OBR. 17

PV 878-98
03.07.98

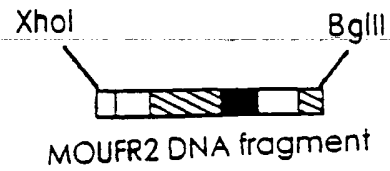
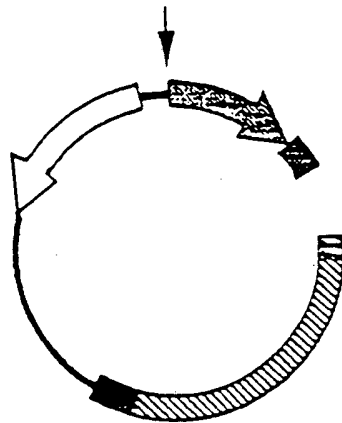


OBR. 18

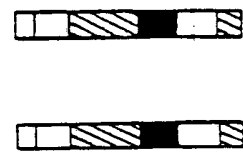




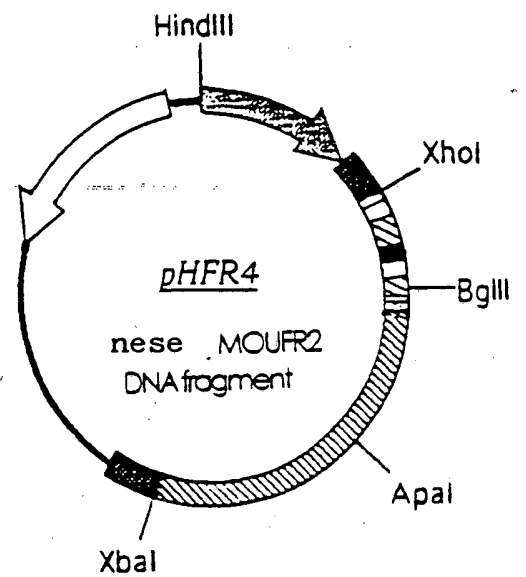
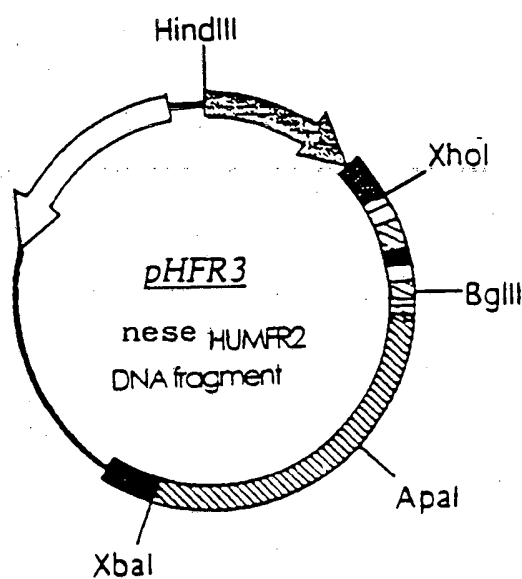
Štěpení restrikčními enzymy
Xho I a Bgl II
fosforylace CIP



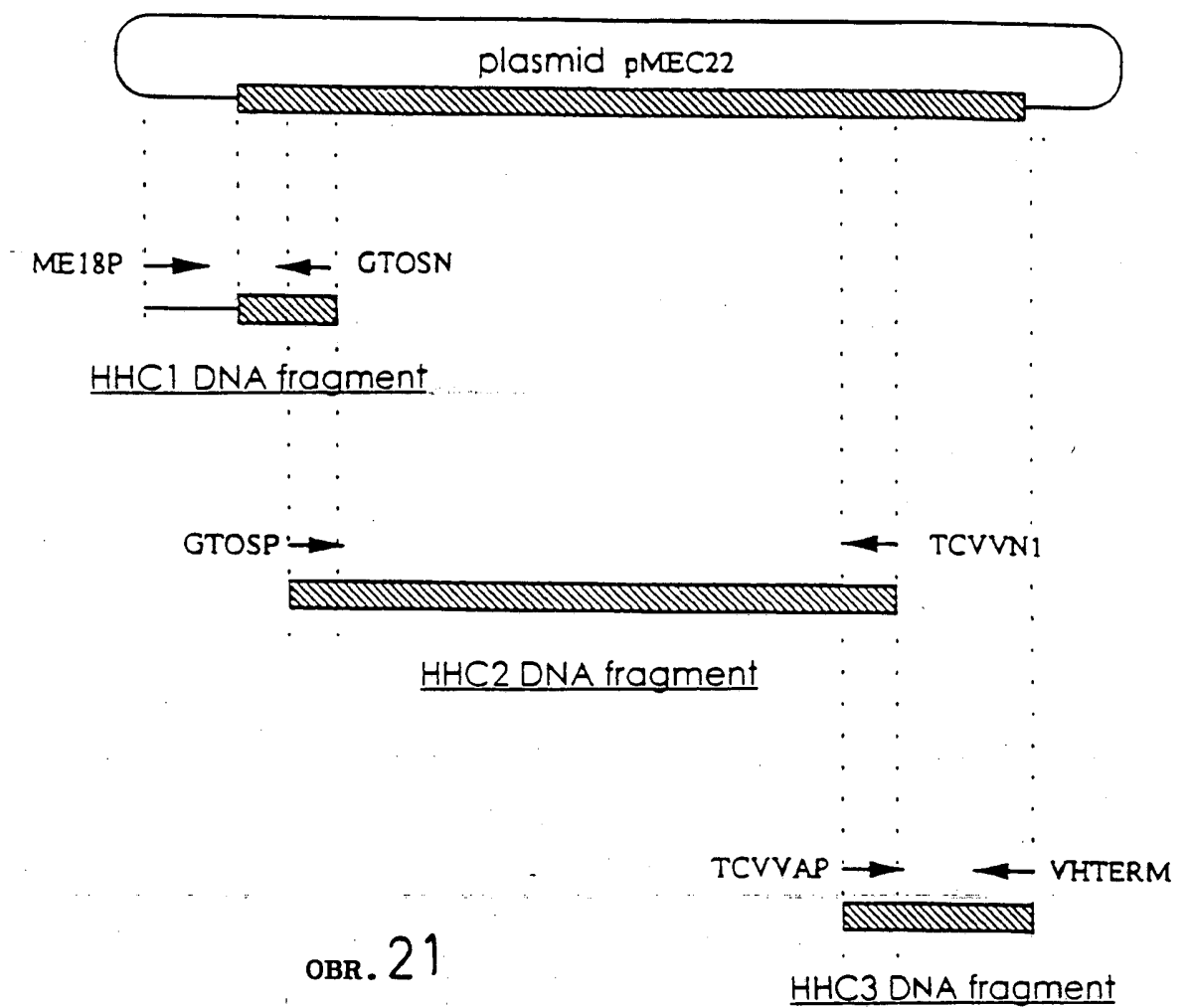
Štěpení restrikčními enzymy
Xho I a Bgl II



Vazba a transformace E.coli kmene JM109

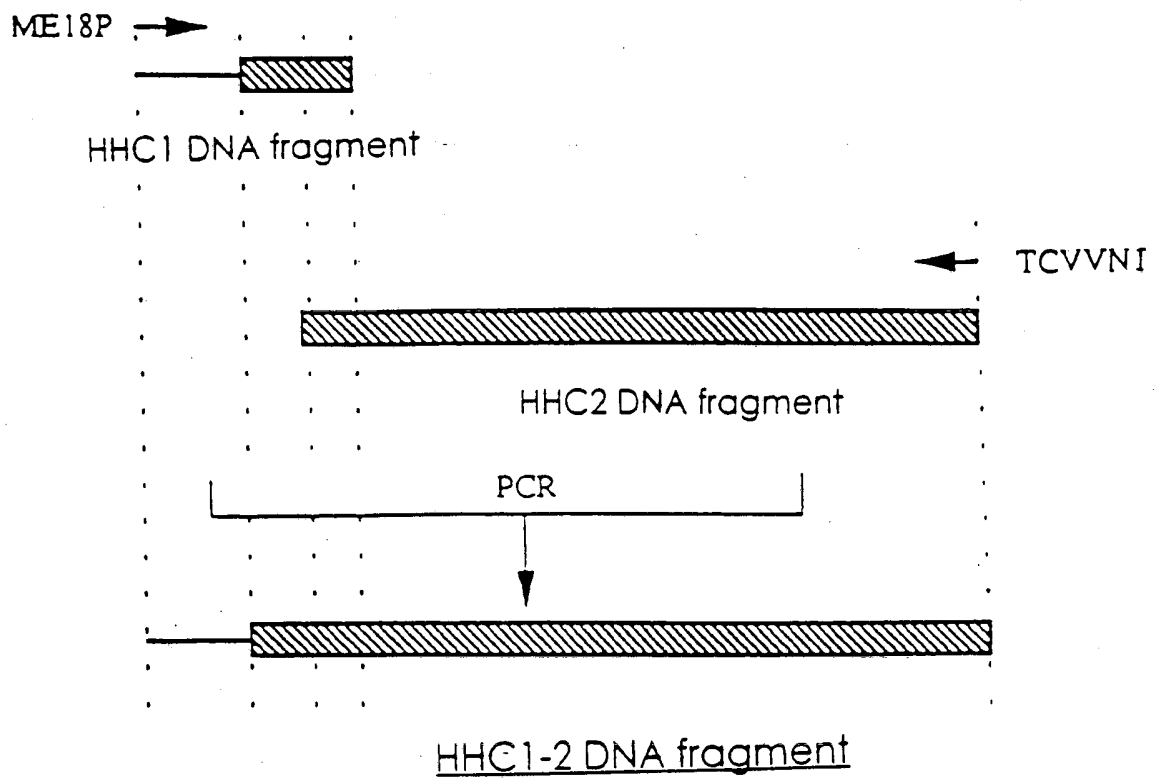


PV 858-98
03.07.98



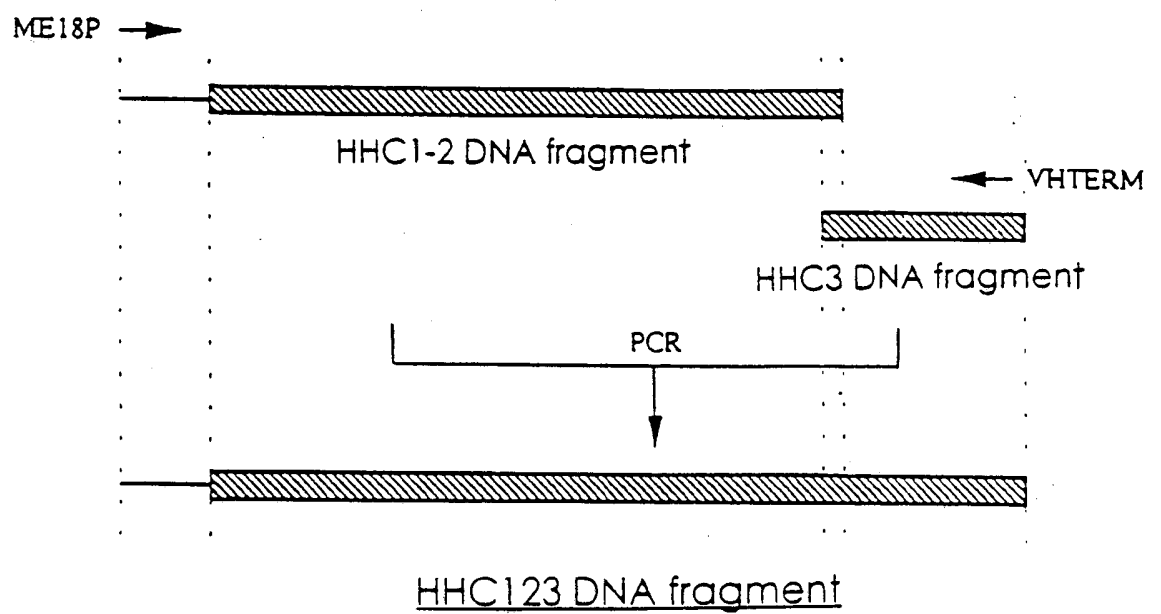
OBR. 21

PV 858-98
03.07.98

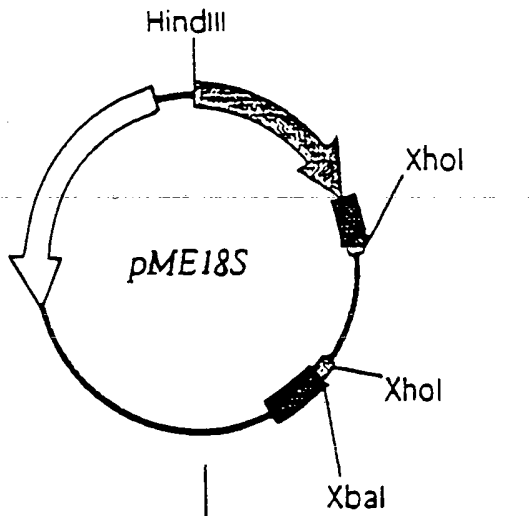


OBR. 22

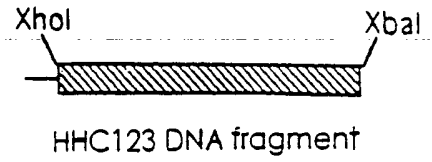
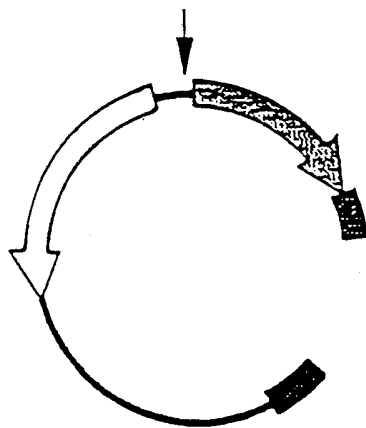
PV 858-98
03.07.98



OBR. 23



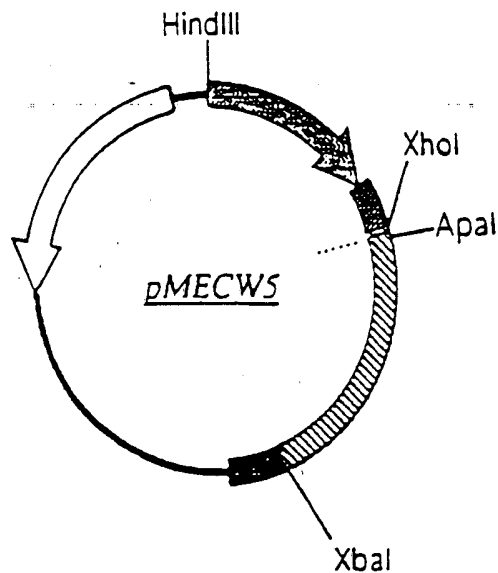
Štěpení restrikčními enzymy
Xho I a Xba I
fosforylace CIP



Štěpení restrikčními enzymy
Xho I a Xba I

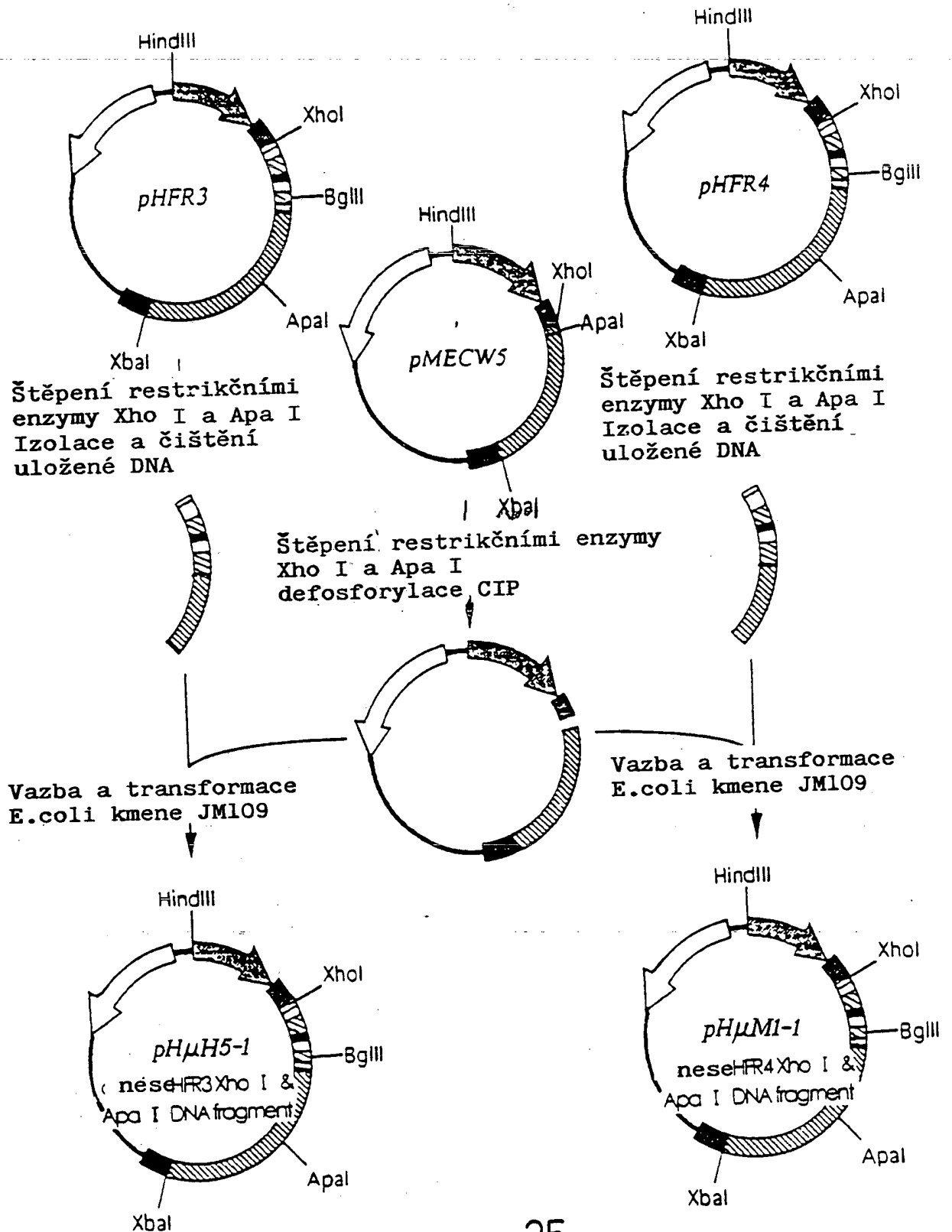


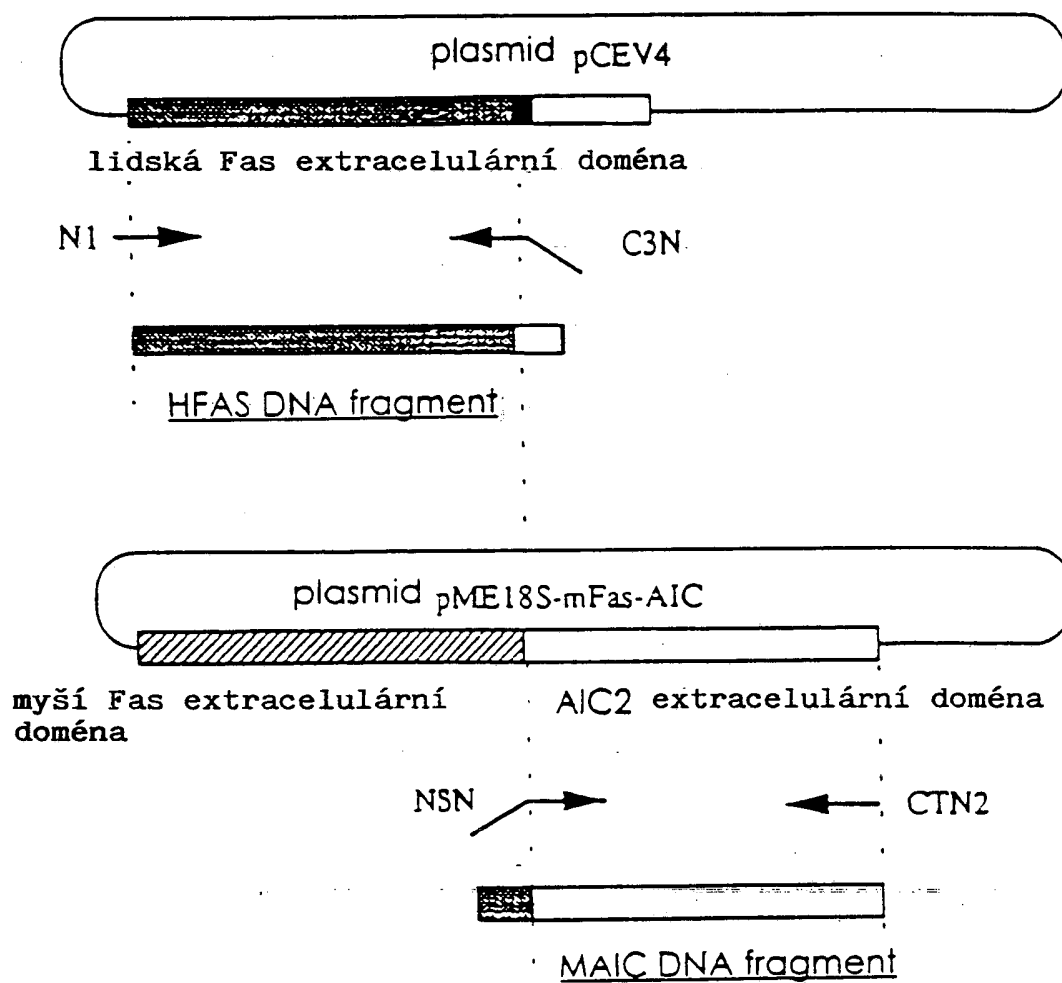
Vazba a transformace E.coli kmene JM109

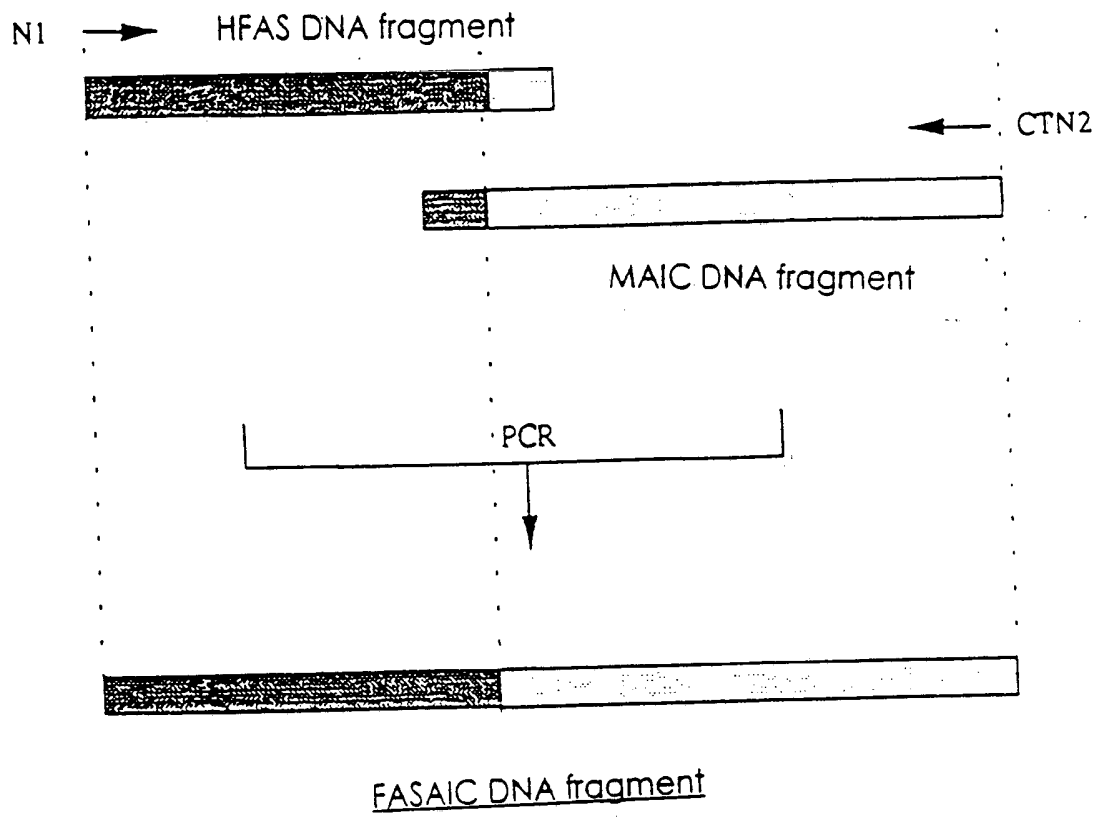


OBR. 24

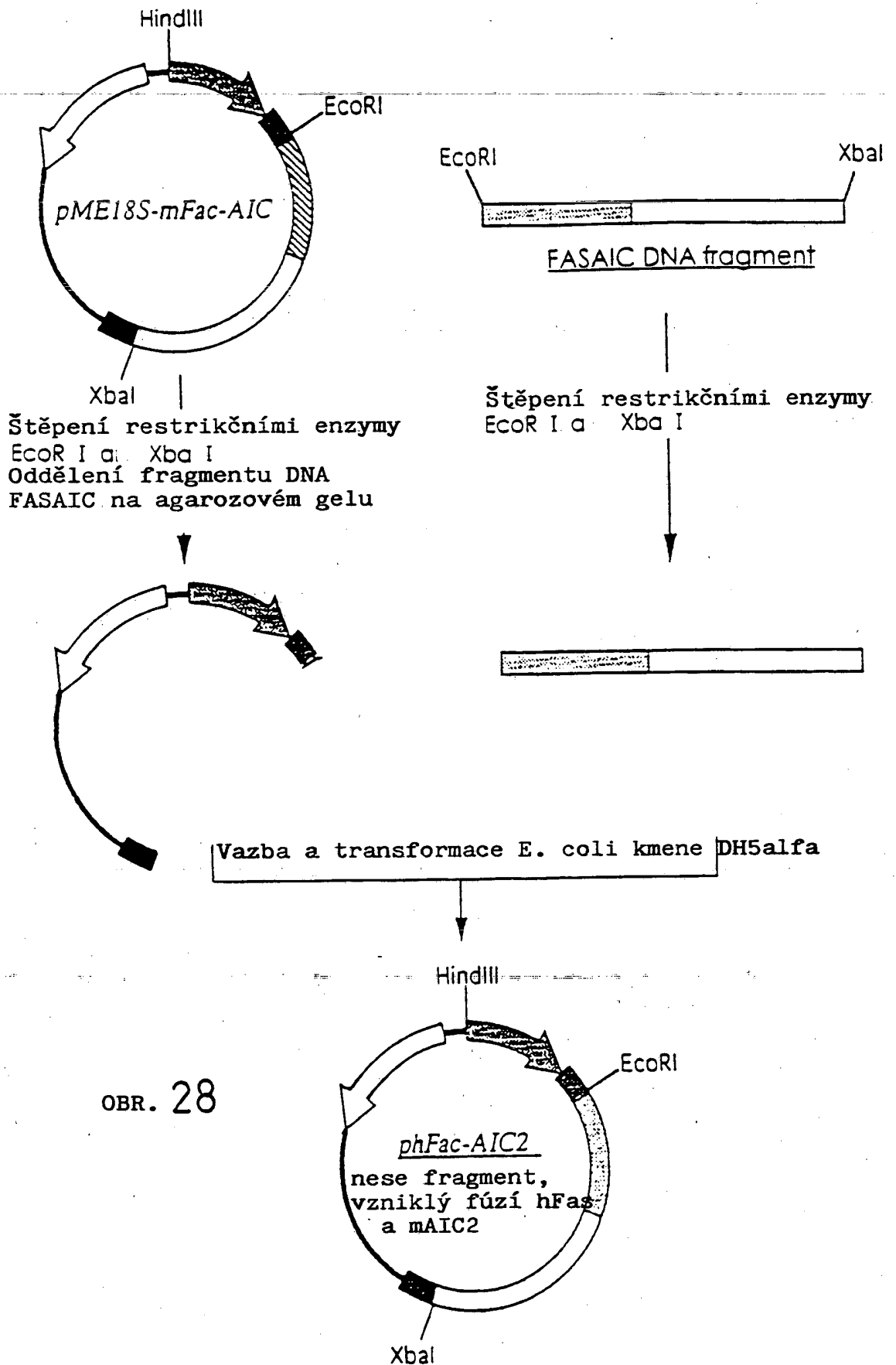
PV 858-98
03.07.98



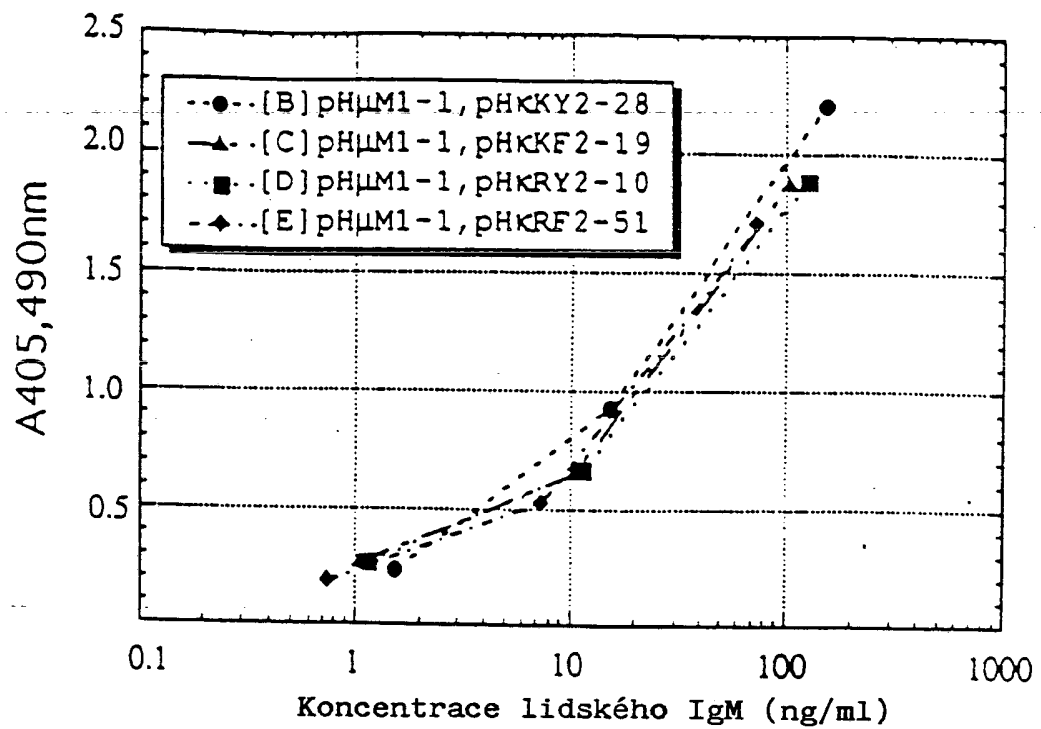




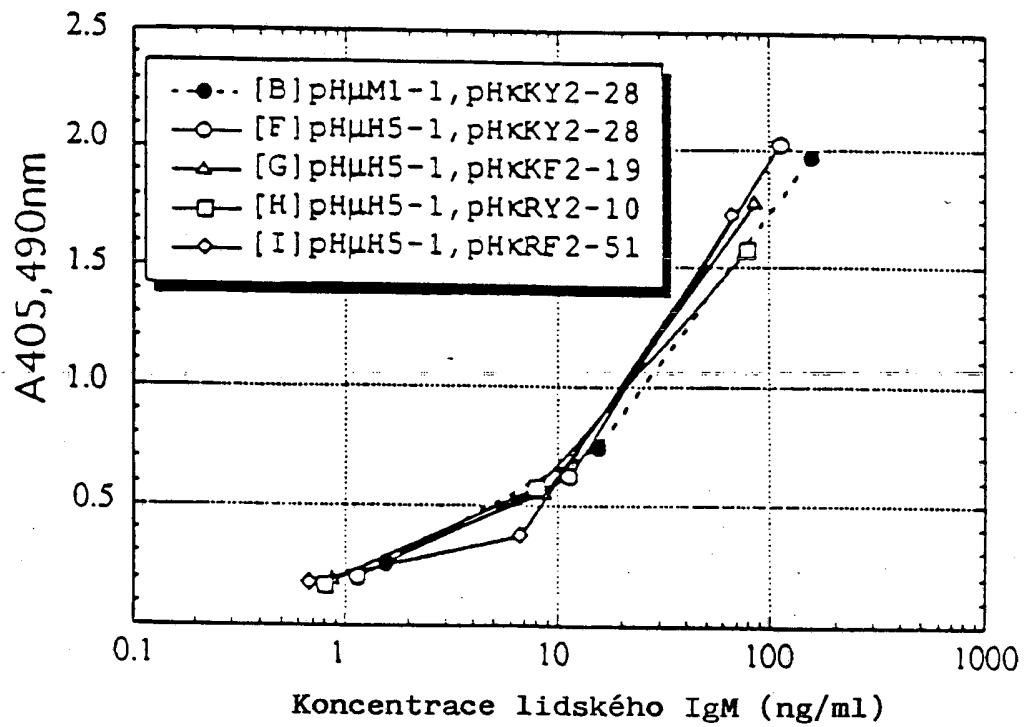
PV 858-98
03.07.98



OBR. 28

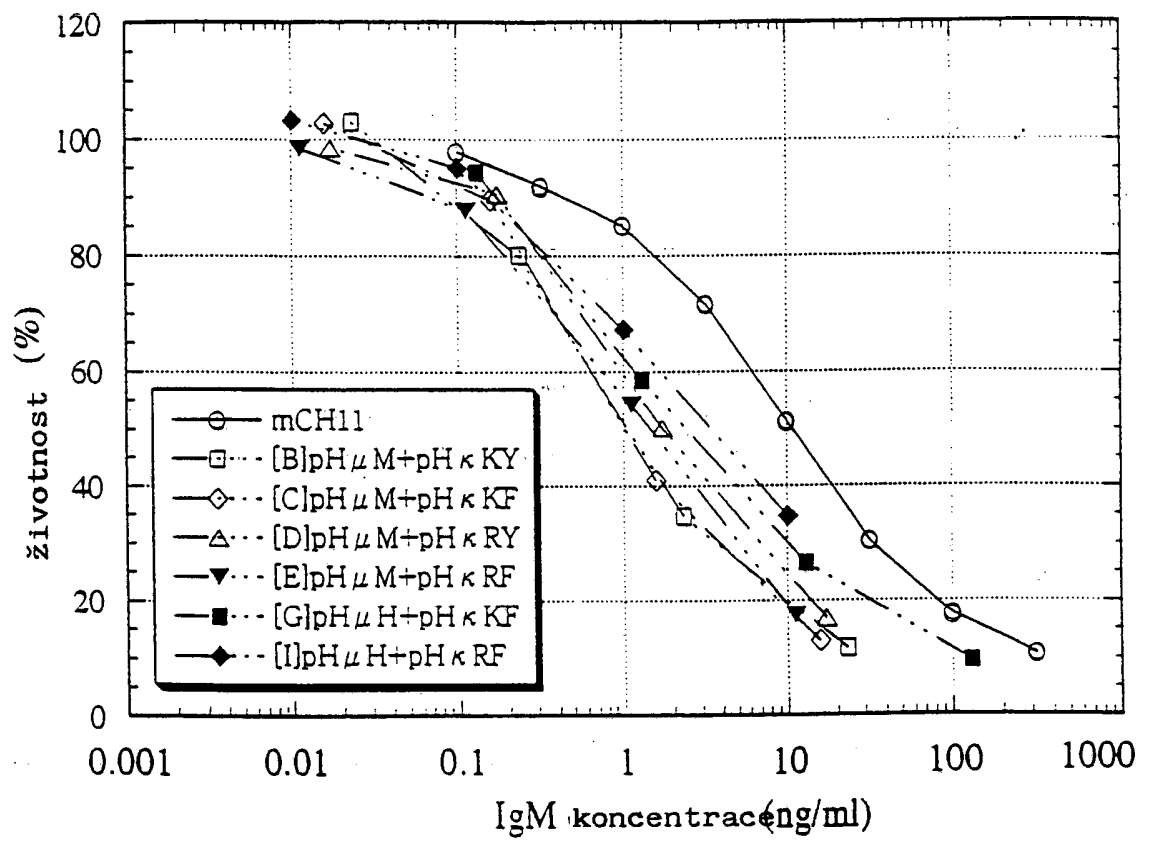


OBR. 29



OBR. 30

PV858-98
03.07.98



OBR. 31