

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

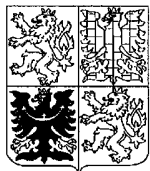
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

1999 - 3965

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **05.05.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **10.05.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/9709421**

(33) Země priority: **GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16.02.2000**
(Věstník č. 2/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/GB98/01294**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO98/51787**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 15/00

A 61 P 35/00

(71) Přihlašovatel:

ZENECA LIMITED, London, GB;

(72) Původce:

Emery Stephen Charles, Macclesfield, GB;

Blakey David Charles, Macclesfield, GB;

(74) Zástupce:

Traplová Jarmila JUDr., Přístavní 24,

Praha 7, 170 00;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Genový konstrukt, který kóduje část
zaměřující buňku a enzym aktivující proléčivo,
pro použití jako léčivo**

(57) Anotace:

Genový konstrukt, který kóduje část zaměřující buňku a heterologní enzym aktivizující proléčivo pro použití jako léčivo u savce, přičemž genový konstrukt je schopen exprimovat část zaměřující buňku a heterologní enzym jako konjugát uvnitř cílové buňky v savčím hostiteli a je řízen tak, že po expresi opustí buňku a selektivně se lokalizuje na antigen na buněčném povrchu, který je rozpoznáván částí zaměřující buňku.

Genový konstrukt, který kóduje část zaměřující buňku a enzym aktivující ~~předlék~~ ^{proléčivo}, pro použití jako léčivo

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká genem řízené enzymové předlékové terapie (GDEPT), která využívá tvorbu protilátek *in situ*, aby byla zvýšena selektivita léčby, zvláště při použití k léčení rakoviny.

Dosavadní stav techniky

K dosud známým léčebným postupům užívajícím předlék ("prodrug"), které jsou založeny na genové terapii, patří virem řízená enzymová předléková terapie (VDEPT) a genem řízená enzymová předléková terapie (GDEPT), přičemž druhá metoda zahrnuje jak VDEPT tak i jiné než virové systémy přenosu genů. Metoda VDEPT zahrnuje zamíření nádorových buněk virovým vektorem, který nese gen kódující enzym, který je schopen aktivovat předlék. Virový vektor vstoupí do nádorové buňky a z genu je uvnitř buňky exprimován enzym. V metodě GDEPT se pro přenos genu kódujícího enzym užívají alternativní přístupy jako jsou mikroinjekce, přenos liposomy, příjem DNA zprostředkovaný receptory, ale také přenos pomocí virů.

Jak při VDEPT tak i GDEPT může být gen pro enzym transkripčně regulován sekvencemi DNA, které jsou schopny selektivní aktivace v savcích buňkách, např. specificky v nádorových buňkách (EP 415 731, Welcome, Huber et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8039-8043, 1991). I přes

určitý stupeň selektivity se genová exprese může objevit i v jiných buňkách než jenom cílových buňkách, což je jasně nežádoucí, pokud se tento postup užívá k aktivaci předléku na silně účinné cytotoxické agens. Kromě toho tyto regulační sekvence obecně vedou ke snížení exprese enzymu ve srovnání s virovými promotory a tudíž ke snížené schopnosti konvertovat předlék v cílové tkáni.

Expresce a lokalizace enzymu aktivujícího předlék uvnitř buňky je nevýhodná. Návrh předléku je tím značně omezen, neboť předlék musí být schopen průchodu buněčnou membránou, přitom nesmí být toxický, dokud není konvertován na lék aktivujícím enzymem uvnitř buňky. U většiny předléků se užívá hydrofilních skupin k tomu, aby se zabránilo vstupu do buňky a tím snížila cytotoxicita. Aktivace předléku aktivujícím enzymem vede ke vzniku méně hydrofilního léku, který vstupuje do buňky a projevuje protirakovinný účinek. Ale tento přístup nelze využít, pokud je aktivující enzym exprimován uvnitř buňky. Další nevýhodou je, že cílové buňky, které postrádají intracelulární aktivující enzym, budou jen těžko terapií zasaženy, neboť nejsou schopny generovat aktivní lék. Aby bylo možné dosáhnout žádoucí aktivity působící na sousední buňky ("bystander" nebo "neighbouring cell kill" aktivita), aktivní lék musí být schopen difundovat z buňky obsahující aktivující enzym, aby vnikl i do cílové buňky, která postrádá expresi aktivujícího enzymu. Mnoho aktivních léků, když jsou produkovány uvnitř buňky, není schopno úniku z buňky, aby bylo dosaženo výše zmíněného účinku na sousední buňky.

Modifikace GDEPT pokročily tak, že překonaly některé z výše popsanych problémů. Tak za prvé byly popsány vektory, které exprimují aktivující enzym na povrchu cílových buněk (WO 96/03515), neboť k aktivujícímu enzymu byl připojen signální peptid a transmembránová doména. Tento přístup,

pokud by byl životaschopný, odstraní problém, že aktivující enzym je uvnitř buňky, ale stále je třeba spoléhat na transkripční regulační sekvence schopné selektivní exprese v cílových buňkách, aby byla exprese omezena pouze na cílové buňky. Ale jak bylo již zmíněno výše, užití takových sekvencí má nevýhody. Za druhé, byly popsány vektory, které vedou k tomu, že enzym je secernován z cílových buněk (WO 96/16179). Dle tohoto přístupu je enzym schopen difundovat z místa vzniku, neboť je extracelulární a není přichycen k buněčnému povrchu. Enzym schopný difundovat z místa vzniku je schopen aktivovat předlék i v jiných než jen cílových buňkách, což však vede k nežádoucí toxicitě. Pro dosažení určité selektivity bylo navrženo, aby byl užit takový enzymový prekurzor, který je štěpen proteázami, které se vyskytují jen při daném patologickém stavu, a vytváří tak aktivní enzym. Tímto způsobem lze dosáhnout jisté míry selektivity, ale je málo pravděpodobné, že k aktivaci dojde pouze v cílových buňkách. Kromě toho, jakmile je jednou aktivován, enzym bude volně difundovat z cílového místa, tudíž se projeví stejné nevýhody, jak byl již dříve popsán.

Při postupu GDEPT existují tři úrovně selektivity. První je selektivita ve stadiu infekce buňky, to znamená, že jen specifický buněčný typ je zasažen. Takovéto buněčné selektivity lze např. dosáhnout užitím určitého systému přenosu genů *per se*. Příklad tohoto druhu selektivity je popsán v mezinárodní patentové přihlášce WO 95/26412 (UAB Research Foundation), která popisuje použití modifikovaných vláknitých proteinů adenovirů obsahujících buněčně specifické ligandy. K jiným příkladům buněčně specifického zaměování genů patří genový přenos *ex vivo* do specifické buněčné populace jako jsou např. lymfocyty a nebo přímá injekce DNA do svalové tkáně.

Druhou úrovní selektivity je řízení genové exprese po infekci buňky např. použitím buněčně nebo tkáňově specifických promotorů. Pokud se gen přenáší do buňky selektivním způsobem, je důležité, aby byl vybrán takový promotor, který je kompatibilní s aktivitou v daném buněčném typu.

Za třetí úroveň selektivity lze považovat selektivitu exprimovaného genového konstruktů. Selektivitě tohoto typu se dosud věnovala jen skrovná pozornost. V mezinárodní patentové přihlášce WO 96/16179 (Wellcome Foundation) bylo navrženo, aby byl užit takový enzymový prekurzor, který je odštěpen z prekurzoru proteázami, které se vyskytují jen při daném patologickém stavu, a vytváří tak aktivní enzym. Tímto způsobem lze dosáhnout jisté míry selektivity, ale je málo pravděpodobné, že k aktivaci dojde pouze v cílových buňkách. Kromě toho, jakmile je jednou aktivován, enzym bude volně difundovat z cílového místa, takže je zde stejná nevýhoda aktivace předléku v jiných než cílových místech, což vede k nežádoucí cytotoxicitě.

Existuje tedy potřeba systémů ADEPT s vyšší selektivitou, kde by se snížily nežádoucí účinky na normální tkáň, které jsou důsledkem nesprávné aktivace předléku.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález je založen na zjištění, že genový konstrukt protilátka-heterologní enzym může být exprimován intracelulárně a použit v systému ADEPT (nebo jiných systémech jako je AMIRACS - viz dále) pro buněčné zaměřování založené na specifčnosti protilátek, a sice k selektivnímu podávání enzymu dostupného na povrchu buňky. Tento přístup

lze případě využít v kombinaci s jakoukoliv jinou technikou zvyšující specifičnost jako je např. cílená buněčná infekce a/nebo tkáňově specifická exprese.

První aspekt předkládaného vynálezu poskytuje genový konstrukt který kóduje protilátku zaměřující buňku a heterologní enzym aktivující předlék pro použití jako léčivo u savce, přičemž genový konstrukt je schopen exprimovat protilátku a heterologní enzym jako konjugát uvnitř cílové buňky v savčím hostiteli, a konjugát opustí buňku a selektivně se lokalizuje na antigen na buněčném povrchu, který je rozpoznáván protilátkou zaměřující buňku.

Další aspekt předkládaného vynálezu poskytuje genový konstrukt který kóduje část zaměřující buňku a heterologní enzym aktivující předlék pro použití jako léčivo u savce, přičemž genový konstrukt je schopen exprimovat část zaměřující buňku a heterologní enzym jako konjugát uvnitř cílové buňky v savčím hostiteli a je řízen tak, že po expresi opustí buňku a selektivně se lokalizuje na antigen na buněčném povrchu, který je rozpoznáván částí zaměřující buňku.

"Část zaměřující buňku" je definována jako jakýkoliv polypeptid nebo fragment polypeptidu, který se selektivně váže na určitý buněčný typ v hostiteli tím, že rozpoznává antigen na buněčném povrchu. Výhodně je částí zaměřující buňku protilátka. Části zaměřující buňku jiné než protilátky jsou např. ligandy, jak byly popsány pro použití v ligandem řízené enzymové předlékové terapii v mezinárodní patentové přihlášce WO 97/26918 (Cancer Research Campaign Technology Limited), epidermální růstový faktor, heregulin, c-erbB2 a výhodně vaskulární endoteliový růstový faktor.

"Protilátka zaměřující buňku" je definována jako jakákoliv protilátka nebo fragment protilátky, která se

selektivně váže na určitý buněčný typ v hostiteli tím, že rozpoznává antigen na buněčném povrchu. Výhodné protilátky zaměřující buňku jsou např. protilátky specifické pro solidní nádory, výhodněji pro kolorektální nádory, nejvýhodněji je to protilátka anti-CEA, A5B7 nebo ještě výhodněji 806.077. Hybridom 806.077 produkující protilátku byl v souladu s Budapešťskou smlouvou uložen 29. února 1996 v European Collection of Animal cell cultures (ECACC), PHLS Center for Applied Microbiology, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, UK, jako položka č. 96022936.

Protilátka A5B7 se váže na lidský karcinoembryonální antigen (CEA) a je zvláště vhodná k zaměření na kolorektální karcinom. A5B7 je možné získat od firmy DAKO Ltd., 16 Manor Courtyard, Hughenden Avenue, High Wycombe, Bucks HP13 5RE, Anglie. Obecně konjugát protilátky (nebo jejího fragmentu) s enzymem by měl být alespoň divalentní, tzn. jinými slovy měl by být schopen vázat se alespoň ke dvěma antigenům asociovaným s nádorem (mohou být shodné nebo rozdílné). Molékula protilátky může být humanizována známými způsoby jako je např. „CDR roubování“, které bylo popsáno v dokumentu EP 239400 nebo roubováním celých variabilních úseků např. z myši protilátky do lidských konstantních úseků (čímž vznikají „chimérické protilátky“), což bylo popsáno v patentu US 4816567. Humanizované protilátky mohou být užitečné ke snížení imunogeničnosti protilátky (nebo jejího fragmentu). Humanizovaná verze protilátky A5B7 byla popsána v patentové přihlášce WO 92(01059 (Celltech).

Hybridom produkující monoklonální protilátku A5B7 byl 14. července 1993 v souladu s Budapešťskou smlouvou uložen v European Collection of Animal cell cultures (ECACC), PHLS Center for Applied Microbiology, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, UK, jako položka č. 93071411. Protilátku

A5B7 lze z uloženého hybridomu získat užitím standardních postupů odborníkovi známých, jak je popsáno např. v Fenge, C., Fraune, E., Schuegerl, K., in: *Production of Biologicals from Animal Cell in Culture*, Spier, R.E., Griffith, J.R. Meignier, B., eds., Butterworth-Heinemann, 1991, 262-265, Anderson, B.L., Gruenberg, M.L. in *Commercial Production of Monoclonal Antibodies*, Seaver, S. ed., Marcel Dekker, 1987, 175-195. Buňky mohou vyžadovat občasné reklonování limitním ředěním, aby se udržela dobrá hladina produkce protilátek.

„Heterologní enzym“ je definován jako enzym, který působí na substrát, který byl podán hostitelské buňce, přičemž tento enzym není normálně v přírodě přítomen v odpovídajícím kompartmentu hostitele. Enzym může být cizorodý pro savčího hostitele (např. to může být bakteriální enzym jako CPG2) nebo to může být enzym, který se přirozeně nevyskytuje v daném relevantním kompartmentu hostitele (např. použití lysosomu jako enzymu pro ADEPT, viz dále, neboť lysosom se normálně nevyskytuje v krevním oběhu, viz také patent US 5433955, Akzo NV). Relevantní kompartment hostitele je ta část savčího hostitele, ve které je distribuován substrát. Výhodné enzymy jsou enzymy vhodné pro ADEPT nebo AMIRACS (antimetabolit s inaktivací pomocného činidla v místech rakoviny, viz Bagshawe, 1994, *Cell Biophys.* 24/25, 83-91), ale výhodné jsou ADEPT enzymy. Protilátkami řízená enzymová předléková terapie (ADEPT) je známým přístupem v léčení rakoviny. ADEPT využívá nádorově selektivní protilátku konjugovanou s enzymem. Konjugát je podáván pacientovi (zpravidla intravenózně) a ponechá se, aby se lokalizoval do místa nádoru a současně vymizel z krevního oběhu a ostatních normálních tkání. Pak se pacientovi podá předlék, který je enzymem (lokalizovaným v místě nádoru) konvertován na cytotoxický lék, který usmrtí nádorové buňky.

V mezinárodní patentové přihlášce WO 96/20011, publikované 4.července 1996, jsme navrhli systém ADEPT s „obrácenou polaritou“, založený na mutovaných lidských enzymech, které měly výhodu nízké imunogeničnosti ve srovnání např. s bakteriálním enzymy. Konkrétní hostitelovým enzymem byla lidská CPB (viz příklad 15, [D253K] lidská CPB a příklad 16, [D253R] lidská CPB a vhodný předlék (viz příklady 18 a 19). Hostitelský enzym byl mutován, aby se ve srovnání s nativním enzymem změnil způsob interakce mezi enzymem a předlékem ve smyslu rozpoznávání substrátu. V naší následné mezinárodní patentové přihlášce PCT/GB96/01975, publikované 6. března 1997 jako WO 97/07796 byl popsán další postup práce na kombinaci mutanty enzymu CPB/předléku pro ADEPT. Výhodné enzymy vhodné pro ADEPT jsou kterékoliv CPG2 nebo enzymy CPB s obrácenou polaritou, např. kterýkoliv z enzymů [D253K]HCPB, [G251T,D253K]HCPB nebo [A248S,G251T,D253K]HCPB. Výhodná forma CPG2 je forma, kde bylo mutováno jedno glykosylační místo, aby se odstranila nebo snížila glykosylace při expresi v savčích buňkách (viz WO 96/03515, Cancer Research Campaign Technology), což zlepšuje enzymovou aktivitu. Další úvahy se týkaly enzymů jako je např. CPB, která vyžaduje prodoménu, aby se umožnilo správně sestavení struktury, prodoména se může buďto exprimovat separátně (v *trans*) nebo jako součást fúzního proteinu a následně se odstraní.

Purifikaci CPG2 z *Pseudomonas* RS-16 ve velkém měřítku popsali Sherwood et al., 1985, Eur. J. Biochem, 148, 447-453. CPG2 je možné získat z Center for Applied Microbiology, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, UK. CPG2 je také možné získat rekombinantním způsobem. Nukleotidová kódující sekvence pro CPG2 byla popsána v Minton et al., Gene 31, 1984, 31-38. Byla popsána exprese této kódující sekvence v *E. coli* (Chambers, S.P. et al., Appl. Microbiol.

Biotechnol., 1988, 29, 572-578) a v *Saccharomyces cerevisiae* (Clarke, L.E. et al., J. Gen. Microbiol., 1985, 131, 897-904). Celková syntéza genu byly popsána v M. Edwards, Biotech. Lab., 1987, 5, 38-44. Expres heterologních proteinů v *E. coli* byla přehledně popsána v F.A.O. Manrston, DNA Cloning, Vol. III, Practical Approach Series, IRL Press, D.M.Glover, ed., 1987, 59-88. Expres proteinů v kvasinkách byla přehledně popsána v Methods in Enzymology, Vol. 194, Academic Press, 1991, C. Guthrie, G.R. Fink, eds.

Výhodnou oblastí využití vynálezu je oblast léčení rakoviny, ale vynález lze využít i v jiných terapeutických oblastech, jakmile lze vybrat cílový antigen a připravit vhodnou kombinaci enzym/předlék. Tak například zánětlivé nemoci jako je revmatoidní artritida lze léčit např. pomocí protilátky selektivní pro synoviální buňky fúzované s enzymem schopným konvertovat protizánětlivý lék z formy předléku do formy protizánětlivého léku. Použití protilátek cíleně proti revmatoidní artritidě bylo popsáno v Blakey et al., 1988, Scand. J. Rheumatology, Suppl. 76, 279-287.

„Konjugát“ protilátky a enzymu může být fúzní protein (jde o kovalentní vazbu) nebo to může být konjugát vytvořený nekovalentní vazbou mezi protilátkou a enzymem *in situ*. Výhodně je konjugát ve formě fúzního proteinu, výhodněji je protilátková složka takové fúze alespoň divalentní (pro zlepšení vazebné avidity ve srovnání s monovalentní protilátkou. Protilátkové konstrukty postrádající úsek Fc jsou výhodné, zejména pak fragmenty Fab nebo F(ab')₂. Pro fúze CPG2 (nebo fúze s jakýmkoliv jiným než monomerním enzymem) platí zvláštní úvahy, neboť CPG2 je dimerický enzym a protilátka je výhodně divalentní, takže zde existuje potenciál pro nežádoucí kompetující dimerizaci mezi molekulami dvou druhů. Proto výhodná fúze CPG2 je taková, kde

fúzní protein je vytvořen spojením C-konce protilátkového těžkého řetězce Fab (postrádajícího kloubovou oblast) k N-konci molekuly CPG2, dvě takové Fab-CPG2 molekuly dimerizují prostřednictvím dimerizační domény CPG2 a vytvoří se konjugát $(\text{Fab-CPG2})_2$. Pro protilátkové konstrukty s monomerními enzymy jsou výhodné fragmenty F(ab')_2 , zejména fragmenty F(ab')_2 mající kloubový úsek z lidského IgG3. Fúze protilátky a enzymu lze případně získat prostřednictvím krátké peptidové spojky (linkeru) jako je např. $(\text{G}_4\text{S})_3$. Výhodné fúzní konstrukty jsou takové, kde je enzym fúzován k C-konci protilátky prostřednictvím jejího těžkého nebo lehkého řetězce, přičemž výhodná je fúze s těžkým řetězcem protilátky. Tudiž výhodným genovým konstruktem podle předkládaného vynálezu je genový konstrukt pro použití jako léčivo, kde konjugát protilátka-enzym CPG2 je fúzní protein, kde enzym je fúzován k C-konci protilátky prostřednictvím jejího těžkého nebo lehkého řetězce, přičemž když je kódovaný konjugát exprimován, dojde k dimerizaci prostřednictvím dimerizační domény CPG2. Výhodnějším genovým konstruktem podle předkládaného vynálezu je genový konstrukt pro použití jako léčivo, kde fúzní protein Fab-CPG2 je vytvořen prostřednictvím vazby C-konce těžkého řetězce protilátkového Fab k N-konci molekuly CPG2, přičemž dvě molekuly Fab-CPG2, když jsou exprimovány, dimerizují prostřednictvím CPG2 a vytvoří konjugát $(\text{Fab-CPG2})_2$. V jiném provedení vynálezu je výhodný genový konstrukt pro použití jako léčivo konstrukt, kde karboxypeptidáza je vybrána z [D253K]HCPB, [G251T,D253K]HCPB nebo [A248S,G251T,D253K]HCPB.

Uvažuje se o tom, že pokud by bylo možné získat přirozeně multimerní enzym v monomerní formě, přičemž si uchová podstatně enzymovou aktivitu, pak monomerní forma enzymu by se mohla užít k přípravě konjugátu podle

předkládaného vynálezu. Podobně lze uvažovat o tom, že pokud by bylo možné získat přirozeně monomerní enzym v multimerní formě, přičemž by si uchoval podstatnou enzymovou aktivitu, pak by se taková multimerní forma enzymu mohla užít k přípravě konjugátu podle předkládaného vynálezu .

Konjugát je nasměrován k tomu, aby opustil buňku po expresi, a sice tím, že se užije sekreční vedoucí sekvence, která je odštěpena, když konjugát prochází buněčnou membránou. Výhodně je sekreční vedoucí sekvence taková vedoucí sekvence, která se vyskytuje přirozeně s protilátkou.

Další aspekt předkládaného vynálezu poskytuje použití genového konstruktů kódujícího protilátku zaměřující buňku a heterologní enzym pro přípravu léku vhodného pro terapii rakoviny v savčím hostiteli, kde genový konstrukt je schopen exprimovat protilátku a enzym jako konjugát v cílové buňce v savčím hostiteli, přičemž konjugát může poté opustit buňku pro selektivní lokalizaci na antigenu buněčného povrchu, rozpoznaném protilátkou.

Pro přenos genového konstruktů podle předkládaného vynálezu je možné užít jakýkoliv systém vhodný k přenosu, včetně virových a nevirových systémů. K virovým systémům patří retrovirové vektory, adenovirové vektory, adeno-asociované vektory, virus vakcínie, virus Herpes simplex, HIV, leukemický virus myši, virus hepatitidy B a virus chřipky. K nevirovým systémům patří čistá, nekomplexovaná DNA, DNA-liposové komplexy, DNA-proteinové komplexy a DNA pokryté částičky zlata.

Retrovirové vektory postrádají imunogenní proteiny a neexistuje žádná předem vzniklá imunita hostitele, ale infekce je omezena na dělicí se buňky. Retroviry byly již použity v klinických pokusech (Rosenberg et al., N. Engl. J. Med. 1990, 323, 570-578). Retroviry jsou tvořeny genomem RNA,

který je zabalen v obálce pocházející z buněčné membrány hostitelské buňky a virových proteinů. Pro expresi svých genů musí nejdříve reverzně transkribovat svůj pozitivní řetězec RNA do dvojitého řetězce DNA, který se pak integruje do DNA hostitele za pomoci reverzní transkriptázy a integrázy, což jsou proteiny obsažené ve virové částici. Integrovaný provirus je pak schopen užít buněčného mechanismu hostitelské buňky k expresi svých genů.

Myší leukemický virus je široce využíván (Miller et al., Methods Enzymol. 1993, 217: 581-599). Retrovirové vektory jsou konstruovány tak, že se odstraní geny gag, pol a env, aby se tak vytvořil prostor pro odpovídající vložený „náklad“ aby se odstranila replikativní schopnost viru. Virem kódované mRNA se eliminují a to odstraňuje také jakoukoliv potenciální imunitní reakci na transdukovanou buňku. Často jsou jako selekční prostředky vloženy geny kódující rezistenci k antibiotikům. Lze také vložit promotorovou a zesilovací (enhancerovou) funkci, např. pro dosažení tkáňově specifické exprese po podání *in vivo*. Promotorová a zesilovací funkce obsažené v dlouhé terminální repetici retroviru se také mohou užít.

Tyto viry se mohou produkovat pouze ve sbalovacích („pakážovacích“) buněčných liniích. Sbalovací linie se může zkonstruovat tak, že se deletované virové geny (gag, pol, env) stabilně inzerují do buněk, a to tak, že jsou umístěny na různých chromosomech, aby se zabránilo rekombinaci. Sbalovací linie se užije k přípravě produkční linie, která tvoří replikačně defektní retrovirus obsahující relevantní vložený gen tím, že se do ní vnese rekombinantní provirová DNA. Plazmidová DNA, která obsahuje sekvence dlouhé terminální repetice obklopující malý úsek genu gag obsahujícího enkapsidační sekvenci a požadovaný gen (geny) se

transfekuje do sbalovací linie standardním způsobem pro přenos DNA (elektroporace, kalciová precipitace apod.). Varianty tohoto přístupu byly užity, aby se snížila pravděpodobnost vzniku replikačně kompetentního viru (Jolly, D., Cancer Gene Therapy, 1994, 1, 51-64). Spektrum hostitelských buněk viru je určeno genem obalového proteinu (env) a je možné užít substituce genu env s různou buněčnou specifičností. Pro zaměřování lze také využít inkorporace vhodných ligandů do obalového proteinu.

Podávání lze provádět jakoukoliv dostupnou technikou, např. exprese *in vivo* transdukci buněk pacienta, přímou injekcí viru do tkáně a nebo podáváním buněk produkujících retrovirus.

Přístup exprese *in vivo* má nevýhodu, že vyžaduje izolaci a udržování pacientových buněk ve tkáňové kultuře, ale má také výhodu, že je možné snadno kvantifikovat rozsah genového přenosu a je možné zaměřit specifickou populaci buněk. Kromě toho je možné dosáhnout vysokého poměru virových částic a cílových buněk, a tak zlepšit účinnost transdukce (Anderson et al., Hum. Gene Ther., 1990, 1: 331-341; Rosenberg et al., N. Engl. J. Med., 1990, 323: 570-578; Culver et al., Hum. Gene Ther., 1991, 2: 107-109, Nienhuis et al., Cancer, 1991, 67: 2700-2704, Anderson et al., Hum. Gene Ther., 1990, 1: 331-341, Grossman et al., Nat. Genet., 1994, 6: 335-341, Lotze et al., Hum. Gene Ther., 1992, 3: 167-177; Lotze, M.T., Cell Transplant., 1993, 2: 33-47; Lotze et al., Hum. Gene Ther., 1994, 5: 41-55 a patent US 5399346 (Anderson)). V některých případech je nezbytné přímé vložení viru *in vivo*. Retroviry byly užity k léčení mozkových nádorů, kde schopnost retrovirů infikovat pouze dělicí se buňky (tj. nádorové) je zvláště výhodná.

Pro zvýšení účinnosti Oldfield et al. (Hum. Gene Ther., 1993, 4: 39-69) navrhli podávání retrovirové produkční linie přímo do mozkového nádoru pacienta. Myší produkční buňky by přežily v nádoru mozku po dobu několika dnů a secernovaly by retrovirus schopný transdukovat okolní buňky mozkového nádoru. Virus nesoucí gen thymidinkinázy z herpetického viru poskytuje buňky, které lze pak usmrtit ganciclovirem, který je thymidinkinázou metabolizován na toxickou sloučeninu. Retrovirů se týkají patentové dokumenty EP 334301, WO 91/02805 a WO 92/05266 (Viagene) a US 4650764 (University of Wisconsin).

V odborné literatuře byly popsány lidské adenovirové infekce (viz Horwitz, M.S., In Virology, 2nd ed. Raven Press, New York, 1990, pp. 1723-1740). Většina dospělé populace byla exponována adenoviru a má proto antiadenovirové protilátky. Adenoviry obsahují genom z dvouřetězcové DNA a replikují se nezávisle na buněčném dělení hostitele.

Adenovirové vektory mají výhodné vlastnosti. Jsou schopné transdukovat buňky z širokého spektra lidských tkání a lze jimi dosáhnout vysoké hladiny exprese jak v dělicích se tak i v nedělicích buňkách. Lze užít různé cesty podávání včetně intravenózní, intrabiliární, intraperitoneální, intravesikulární, intrakraniální a intrethekální injekce, a také přímé injekce do cílového orgánu. Zaměřování založené na anatomických hranicích je tedy možné.

Adenovirový genom kóduje 15 proteinů, infekce se účastní vláknitý protein, který se váže na receptor na povrchu buňky. Pentonová základna virové kapsidy se váže na integrinové receptorové domény ($\alpha 3\beta 3$ nebo $\alpha 3\beta 5$) na buněčném povrchu, což vede k internalizaci viru. Virová DNA vstupuje do jádra a nezávisle na buněčném dělení zahajuje transkripci. Exprese a replikace jsou kontrolovány geny E1A a E1B (viz Horwitz,

M.S., In Virology, 2nd ed., 1990, pp. 1723-1740). Odstranění genu E1 vede k replikačně nekompetentnímu viru. Exprese adenovirových proteinů vede k vyvolání imunitní reakce, která může ovlivnit zvláště účinnost při opakovaném podání. Avšak současné přístupy, kdy je také z virového genomu odstraněn další adenovirový gen, jako např. E2a (který kontroluje expresi jednoho z obalových proteinů a řady dalších virových proteinů), může odstranit nebo alespoň značně snížit expresi mnoha těchto virových proteinů v cílových buňkách.

Pro konstrukci vektorů byly často užívány sérotypy 2 a 5. Bett et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994, 91: 8802-8806 užili vektorový systém z adenoviru typu 5 s delecemi genů E1 a E3. Buněčná linie „293“ lidských embryonálních ledvinných buněk byly genově upravena tak, aby exprimovala protein E1 a mohla tak transkomplementovat virový genom deficitní v E1. Z média buněk 293 pak může být izolován virus a purifikuje se z plaků postupem limitního ředění (Graham, F.L. and Prevek, L. In Methods in Molecular Biology: Gene Transfer and Expression Protocols, Humana Press 1991, pp. 109-128).

Rekombinantní virus může být pěstován v buňkách v buněčných kulturách linie 293 a izolován lyzí infikovaných buněk a purifikací pomocí centrifugace na hustotním gradientu chloridu cesného. Jeden problém užití buněk 293 pro přípravu rekombinantního adenoviru je to, že díky dodatečným krajním úsekům genů E1 může vzniknout replikačně kompetentní virus (RCA) během produkce virových částic. Ačkoliv je tento materiál pouze adenovirus divokého typu a nikoliv replikačně kompetentní rekombinantní virus, může významně ovlivnit případný výtěžek požadovaného adenovirového materiálu, zvyšuje náklady na přípravu a komplikuje kontrolu kvality jednotlivých výrobních cyklů a připuštění jednotlivých várek

pro klinické použití. Byly vyvinuty alternativní buněčné linie, např. PER.C6, které mají lépe definovanou integraci E1 než buňky 293 (neobsahují okolní virové sekvence), a které neumožňují rekombinační událost, kterou vznikají RCA, a mají tudíž potenciál překonat výše zmíněné problémy produkce viru.

Adenovirové vektory mají nevýhodu relativně krátké doby trvání exprese transgenu díky clearanci imunitního systému a díky ztrátám „ředěním“ při dělení cílových buněk, ale lze očekávat zlepšení adenovirových vektorů. Patentové dokumenty týkající se adenovirů jsou WO 96/03517 (Boehringer), WO 96/13596 (Rhone Poulenc Rorer), WO 95/29993 (University of Michigan) a WO 96/34969 (Canji). Současné pokroky v adenovirových vektorech pro použití v genové terapii nádorů zahrnují vývoj strategií ke snížení imunogeničnosti, chimérické vektory adenovirus/retrovirus a podmíněně (omezeně) replikativní rekombinantní adenovirové systémy, jak uvádějí v přehledu Bilbao et al., Exp. Opin. Ther. Patents, 1997, 7(12): 1427-1446.

Adeno-asociované viry (AAV) (Kotin, R.M., Hum. Gene Ther., 1994, 5: 793-801) obsahující jednořetězcovou DNA, jsou neautonomní parvoviry schopné integrovat se do genomu nedělící se buňky s širokým hostitelským spektrem. Nebylo prokázáno, že by AAV byly spojeny s jakoukoliv lidskou nemocí a je známo, že nevyvolávají žádnou imunitní odpověď.

AAV mají v životním cyklu dvě zřetelně odlišné fáze. Virus divokého typu infikuje hostitelskou buňku, integruje se a zůstává latentní. V přítomnosti adenoviru se indukuje lytická fáze životního cyklu adenoviru, která je závislá na expresi časných adenovirových genů, a vede k aktivní replikaci viru. Genom AAV je tvořen ze dvou otevřených čtecích rámců (zvaných rep a cap) obklopených sekvencemi invertované terminální repetice (ITR). Úsek rep kóduje čtyři

proteiny, které zprostředkovávají replikaci AAV, transkripci virové DNA a mají endonukleázovou funkci, nutnou k integraci do hostitelského genomu. Geny rep jsou jediné geny ze sekvence AAV nutné pro virovou replikaci. Sekvence cap kóduje strukturní proteiny, které tvoří virovou kapsidu. Sekvence ITR obsahují virový replikační počátek, poskytují enkapsidační signály a podílí se na integraci virové DNA. Rekombinantní replikačně defektní viry, které byly vyvinuty pro genovou terapii, postrádají sekvence rep a cap. Replikačně defektní AAV se mohou produkovat kotransfekcí separovaných elementů nezbytných pro replikaci AAV do permisivních buněk linie 293. K patentovým dokumentům týkajícím se AAV patří WO 94/13788 (University of Pittsburgh) a US 4797368 (US Department of Health).

Vektory pro genovou terapii odvozené z pox viru (virus neštovic) byly také popsány (Moss, B., Flexner, C., Annu. Rev. Immunol. 1987, 5: 305-324, Moss, B., Virology, 1990, 2079-21111). Virus vakcínie je velký DNA virus s obalem, který se replikuje v cytoplazmě infikovaných buněk. Infikuje dělicí se i nedělicí buňky mnoha tkání a lze pozorovat genovou expresi z neintegrovaného virového genomu. Rekombinantní virus může být připraven tak, že se transgen vloží do vektoru odvozeného z viru vakcínie a tato DNA se transfekuje do buněk infikovaných vakcínií, kde pak homologní rekombinace vede k produkci viru. Významnou nevýhodou je, že virus vyvolává imunitní reakci hostitele na 150 až 200 virem kódovaných proteinů, což značně komplikuje opakované podávání.

Virus herpes simplex je velký virus obsahující dvouřetězcovou DNA, který se replikuje v jádře infikovaných buněk, a který je vhodný k přenosu genů (viz Kennedy, P.G.E., Steiner, I., Q. J. Med. 1993, 86: 697-702). K výhodám patří

značný hostitelský rozsah, infekce jak dělicích se tak i nedělicích buněk, a možnost vložit rozsáhlou sekvenci cizí DNA do virového genomu prostřednictvím homologní rekombinace. Nevýhodou je obtížné získání virového preparátu bez replikačně kompetentního viru a také silná imunitní odezva. Delece virového genu pro thymidinkinázu vede k replikačně defektním viru v buňkách s nízkou hladinou thymidinkinázy. Buňky, které se intenzivně dělí (právě např. nádorové buňky) mají dostatečnou thymidinkinázovou aktivitu, aby umožnila replikaci. Byla publikována patentová přihláška týkající se herptického viru (WO 92/05263, Cantab Pharmaceuticals).

Uvažovalo se také o řadě jiných virů, např. HIV, leukemických virech myši, viru hepatitidy B a chřipkovém viru, jako možných vektorech pro přenos genů (viz Jolly, D., Cancer Gene Therapy, 1994, 1: 51-64).

Bylo také navrženo použití atenuovaných bakterií *Salmonella typhimurium*, která se specificky zaměřuje a replikuje se v hypoxickém prostředí (jaké se vyskytuje v nekrotických centrech nádoru), jako vektoru pro přenos genů v terapii založené na enzymu jako předléku, TAPET™ (Tumor Amplified Prodrug Enzyme Therapy) firmy Vion Pharmaceuticals. Tento systém nabízí v přenosu genů další alternativu k dříve uvedeným virovým a nevirovým způsobům přenosu genů.

Lze také užít strategie nevirového přenosu DNA. Takové přenosové systémy užívají čistou nekomplexovanou DNA, DNA-liposomové komplexy, DNA-proteinové komplexy a zlaté mikročástice pokryté DNA.

Purifikovaná nukleová kyselina může být injikována přímo do tkáně a vede k přechodné genové expresi např. ve svalové tkáni, což je zvláště účinné v regenerujícím se svalstvu (Wolff et al., Science, 1990, 247: 1465-1468). Davis et

al. (Hum. Gene Ther., 1993, 4: 733-740) publikovali informaci o přímé injekci do zralého svalu. Obecně jsou výhodné kosterní svaly a srdeční sval. Odpovídající patentové dokumenty jsou WO 90/1 1092:, US 5589466 (Vical) a WO 97/05185 (biodegradovatelné hydrogely impregnované DNA pro injekci, Focal).

Pazmidová DNA na zlatých mikročásticích může být „vstřelena“ do buněk (např. epidermis nebo melanomu) pomocí tzv. genového děla. DNA se koprecipituje na částice zlata a pak je vystřelena pomocí elektrického výboje nebo stlačeného plynu jako propelentu (Fynan et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1993, 90: 1 1478-1 1482). Byla užita také elektroporace k usnadnění přenosu DNA do solidních nádorů užitím elektroporační sondy užívající mnohahajlového uspořádání a pulzního rotujícího elektrického pole (Nishi et al., Cancer Res., 1996, 56:1050-1055). Bylo tak dosaženo vysoce účinného genového přenosu do podkožních nádorů s významným zvýšením transfekce buněk a lepšími distribučními charakteristikami než při intratumorové injekční aplikaci.

Liposomy účinkují tak, že obklopují hydrofilní molekulu hydrofobními molekulami, a tím usnadňují vstup do buňky. Liposomy jsou jednovrstevné (unilamelární) nebo vícevrstevné (multilamelární) sféry (váčky) vytvořené z lipidů. Složení lipidů a způsob přípravy ovlivňují strukturu liposomů. Do lipidových membrán mohou být inkorporovány i jiné molekuly. Liposomy mohou být buďto kationtové nebo aniontové. Nicolau et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1983, 80: 1068-1072) publikovali expresi insulinu z aniontových liposomů injikovaných do krys. Aniontové liposomy hlavně zaměřují retikuloendotelové buňky jater, pokud nejsou specificky zaměřeny jiným způsobem. Na povrch liposomů mohou být inkorporovány jiné molekuly, aby změnil chování liposomů,

např. buněčnou specifitu přenosu (Wu G.Y. and Wu, C.H., J. Biol. Chem., 1987, 262: 4429-4432).

Felgner et al. (Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1987, 84: 7413-7417) popsali kationtové liposomy a ukázaly, že váží nukleové kyseliny elektrostatickými interakcemi a vstupují do buňky. Intravenózní injekce kationtových liposomů vedla k expresi transgenu ve většině orgánů, když byla injekce aplikována do aferentní cévy orgánu. Kationtové liposomy mohou být podány také ve formě aerosolu pokud je cílem plicní epitel (Brigham et al., Am. J. Med. Sci., 1989, 298: 278-281). Patentové dokumenty týkající se liposomů jsou WO 90/11092, WO 91/17424, WO 91/16024, WO 93/ 14788 (Vical) a WO 90/01543 (Intracel).

Studie *in vivo* s přenosem genů pomocí kationtových liposomů publikovali Nabel et al., Rev. Gene Hum. Ther. 1994, 5: 79-92, Hyde et al., Nature, 1993, 362: 250-255, a Conary et al., J. Clin. Invest. 1994, 93: 1834-1840).

Mikročástice byly také zkoumány jakožto systémy vhodné k přenosu DNA do fagocytujících buněk. Tento přístup užila firma Pangea Pharmaceuticals v systému ENDOSPHERE™, což je mikrkapsulační přenosový systém DNA, který byl užit ke zvýšení transdukce u fagocytujících buněk jako jsou makrofágy, které pohltí mikrosféry. Mikrosféry obalí plazmidovou DNA, která kóduje potenciálně imunogenní peptidy, které po expresi vedou k prezentaci peptidů prostřednictvím molekul MHC na povrchu buněk, což může stimulovat imunitní odpověď proti takovým peptidům a proteinovým sekvencím, které obsahují stejný epitop. Tento přístup se dnes užívá se zaměřením na vývoj protinádorových vakcín a vakcín proti patogenům, ačkoliv může mít i možné využití v genové terapii.

Stejně jako byly užity syntetické polymery k zabalení DNA, tak byly užity i přírodní obalové proteiny virů, které

jsou schopny homogenního samosestavení do částic podobných virů (VLP). Hlavní strukturní obalový protein VP1 lidského polyomaviru může být exprimován jako rekombinantní protein a je schopen zabalit plazmidovou DNA během samosestavení do VLP. Výsledné částice se pak mohou užít k transdukci různých buněčných linií, přičemž předběžné imunologické studie ukázaly jen slabou imunogenní reakci na VLP založené na VP1. Takové systémy nabízejí atraktivní mezistupeň mezi syntetickými polymerními nevirovými vektory a alternativním virovým přenosovým systémem, neboť kombinují výhody, tj. jednoduchost přípravy a vysokou účinnost transdukce.

Aby se zlepšila specifičnost přenosu genů a exprese u terapeutických genů, zkoumalo se vložení zaměřovacích prvků do přenosových vektorů a použití regulačních prvků exprese, jak samostatně tak i v kombinaci v mnoha přenosových systémech popsaných dříve.

Bylo také dosaženo zlepšení DNA vektorů a lze ho také využít u všech nevirových přenosových systémů. Jde o použití nadšroubovicových minikruhových molekul („supercoiled minicircle“), které publikovala firma RPR Gencell (tyto molekuly nejsou bakteriálního původu a neobsahují replikační počátek ani geny rezistence k antibiotiku, a tak jsou bezpečnější, neboť projevují značnou míru biologického omezení), epizomálních expresních vektorů vyvinutých firmou Copernicus Gene Systems Inc. (replikující se epizomální expresní systém, kde se plazmid amplifikuje sice uvnitř jádra, ale mimo chromosom, a tudíž se eliminuje integrace do genomu) a systémy T7 vyvinuté firmou Progenitor (striktně cytoplazmatický expresní vektor, kde vektor sám exprimuje T7 RNA polymerázu z fága T7 a terapeutický gen je řízen druhým promotorem T7, užívajíc polymerázy generované prvním promotorem). K dalším, obecnějším zlepšením technologie DNA

vektorů patří použití *cis*-působících prvků k dosažení vysoké hladiny exprese (Vical), použití sekvencí odvozených z alfa-repeatu DNA k poskytnutí regulace replikace „jednou za buněčný cyklus“ a použití jaderných zaměřovacích sekvencí (z genu EBNA-1, Calos ve Stanfordu, a Megabios), časného promotoru SV40/enhanceru nebo peptidových sekvencí připojených k DNA.

Zaměřovací systém založený na rozpoznávání buněčných receptorů ligandem připojeným k DNA byl popsán v práci Michael, S.I a Curiel, D.T., *Gene Therapy*, 1994, 1: 223-232. Pomocí ligandu, který je rozpoznáván takovým receptorem, se DNA selektivně váže na cílovou buňku, a pak je jí internalizována (Wu, G., Y and Wu, C.H., *J. Biol. Chem.*, 1987, 262: 4429-4432) Polykationt poly-L-lysin (PLL) byl užit ke spojení řady proteinových ligandů k DNA metodou chemického zesíťení. DNA se elektrostaticky váže na molekuly ligandu PLL. Zaměřovací systém s využitím transferinového receptoru publikovali Zenke et al (*Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 1990, 87: 3655-3659), Wu, G.Y. and Wu, C.H. (*J. Biol. Chem.*, 1987, 262: 4429-4432) užili asialoorosomukoidový receptor a Batra et al. (*Gene Therapy*, 1994, 1: 255-260) užili sacharidy na buněčném povrchu. Činidla jako chlorokin nebo kolokalizované adenoviry se mohou užit ke snížení degradace DNA v lysosomech (viz Fischer, K.J, and Wilson, J.M., *Biochem. J.*, 1994, 299, 49-58). Cristiano et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90: 11548-11552) zkonstruovali komplex adenovirus-DNA-ligand. Patentové dokumenty týkající se receptory zprostředkované endocytózy jsou WO 92/05250 (asialoglykoproteiny, University of Connecticut) a US 5354844 (transferinový receptor, Boehringer).

DNA a ligand mohou být naneseny na povrch adenoviru a může tak vniknout tzv. potažený adenovirus (Fischer, K.J.

and Wilson, J.M., Biochem. J., 1994, 299, 49-58). Avšak přítomnost dvou receptorových drah pro vstup DNA (receptor pro ligand a receptor pro adenovirus) snižuje specifčnost tohoto přenosového systému, ale adenovirovou dráhu je možné eliminovat užitím protilátky proti vláknitému proteinu adenoviru, který je pojátkem s DNA (Michael, S.I. and Curiel, D.T., Gene Therapy, 1994, 1: 223-232). Použití purifikovaných endosomalytických proteinů místo intaktních virových částic je další možností (Seth, P. J. Virol., 1994, 68: 1204-1206).

Exprese genového konstruktů podle předkládaného vynálezu v jeho cílovém místě je výhodně řízena transkripční regulační sekvencí (TRS). TRS je promotor případně kombinovaný s enhancerem a/nebo kontrolním prvkem jako je např. genetický přepínač, který bude popsán dále.

Jedním příkladem TRS je "genetický přepínač", který je možné využít ke kontrole exprese genového konstruktů podle předkládaného vynálezu, jakmile byl jednou vnesen do cílové buňky. Kontrola genové exprese v buňkách vyšších eukaryot prokaryotickými regulačními prvky (které jsou výhodné podle vynálezu) byla popsána v přehledu Gossen et al., TIBS, 18. prosince, 1993, 471-475. Vhodný systém zahrnuje lac operon z *E. coli* a zvláště výhodně operon tetracyklinové rezistence z *E. coli*. K publikacím o tetracyklinové rezistenci patří Gossen et al. (1995) Science 268, 1766; Damke et al (1995) Methods in Enzymology 257, Academic Press; Yin et al (1996) Anal. Biochem. 235, 19S a patenty US 5464758, US 5589362, WO 96/01313 and WO 94/29442 (Bujard). Další možností je přepínač založený na ekdysonu (mezinárodní patentová přihláška PCT/GB96/01195, publikace WO 96/37609, Zeneca). Ještě další možnosti jsou uvedeny dále. Connaught Laboratories (WO 93/20218) popsali syntetický indukovatelný eukaryotický promotor obsahující alespoň dvě odlišné třídy

indukovatelných prvků. Rhone Poulenc Rorer (WO 96/30512) popsali systém podmíněné genové exprese založený na tetracyklinu. Ariad (WO 94/18317) popsali systém založený na dimerizaci proteinů, jehož aktivita byla prokázána *in vivo*. Bert O'Malley z Byalar College of Medicine (WO 93/23431 a US 5364791) popisuje molekulární přepínač založený na použití modifikovaných steroidních receptorů. Whitehead Insitute publikoval indukovatelný genový expresní systém založený na NF-KB (WO 88/05083). Batelle Memorial popsali stresem indukovatelný promotor (evropský patent EP 263908).

K příkladům TRS, který není závislý na typu buněk, patří následující prvky : cytomegalovirový promotor/enhancer, SV40 promotor/enhancer, a promotor/enhancer z dlouhé terminální repetice retroviru. K příkladů TRS, který je závislý na typu buněk (což dodává další stupeň k zaměřování) patří následující: karcionoembryonální antigen (CEA) pro zaměřování buněk tlustého střeva a konečníku, plic a prsu, alfa-fetoprotein (AFP) pro zaměřování transformovaných hepatocytů, tyrosinhydroxyláza, cholinacetyltransferáza nebo neuronově specifická enoláza pro zaměřování neuroblastomů, insulin pro zaměřování pankreasu a gliový kyselý fibroprotein pro zaměřování glioblastomů. Mohou být také užity některé onkogeny, které jsou selektivně exprimovány v některých nádorech, např. HER-2/neu nebo c-erbB2 v nádoru prsu nebo N-myc v neuroblastomech.

Tudíž výhodný genový konstrukt pro použití jako léčivo je konstrukt, který obsahuje transkripční regulační sekvenci obsahující promotor a kontrolní prvek, kterým je genetický vypínač, který řídí expresi genového konstrukt. Výhodný regulační prvek s genetickým vypínačem je regulován přítomností tetracyklinu nebo ekdysonu. Výhodný promotor je závislý na buněčném typu a je vybrán z následujících

promotorů: promotor karcionoembryonálního antigenu (CEA), alfa-fetoproteinu (AFP), tyrosinhydroxylázy, cholinacetyltransferázy, neuronově specifické enolázy, insulinu a gliového kyselého fibroproteinu, HER-2/neu, c-erbB2 a N-myc. Výhodně genový konstrukt pro použití jako léčivo pro podávání savčímu hostiteli je podle předkládaného vynálezu sbalen uvnitř adenoviru. Obecný přehled o cílené genové terapii podali Douglas et al., Tumor Targetting, 1995, 1: 67-84.

Protilátka kódovaná genovým konstruktem podle vynálezu může být ve formě protilátkového konstruktu jako je např. F(ab')₂, F(ab'), Fab, Fv, jednořetězcový Fv a V-min. Spadá sem jakýkoliv protilátkový konstrukt, jako např. nedávno popsany protilátkový fragment "L-F(ab)₂" dle Zapata, 1995, Protein Engineering, 8, 1057-1062. Lze uvažovat také o Fvs s disulfidickými vazbami. Pro konstrukty založené na enzymu CPG2 je výhodná dimerizace Fab fragmentů konstruktů prostřednictvím enzymové dimerizace. Protilátky jiné než lidské mohou být humanizovány pro použití u člověka, aby se snížila imunitní reakce hostitele. Humanizovaná protilátka, příbuzný fragment nebo protilátková vazebná struktura je polypeptid složený z větší části strukturního rámce sekvencí odvozených z lidského imunoglobulinu, který nese aminokyselinové sekvence jiné než lidské ve vazebném místě pro antigen a jeho okolí (komplementaritu určující úseky, CDR). Vhodná metodologie byla popsána podrobně např. v dokumentech WO 91/09967, EP 0328404, Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10029, Mountain a Adair, 1989, Biotechnology and Genetic Engineering Reviews 10, 1, 1992, ale lze uvažovat i o dalších alternativních způsobech humanizace, jako je např. tzv. obkládání povrchových zbytků (viz EP 519596, Merck/NIH, Padlan et al.).

Další aspekt předkládaného vynálezu poskytuje párový dvousložkový systém pro použití v savčím hostiteli, kde složky tvoří: I) první složku, která obsahuje genový konstrukt kódující protilátku zaměřující buňku a heterologní enzym aktivující předlék, kde genový konstrukt je schopen exprimovat protilátku a enzym jako konjugát uvnitř cílové buňky v savčím hostiteli, a kde konjugát může poté opustit cílovou buňku pro selektivní lokalizaci na antigenu buněčného povrchu rozpoznávaném protilátkou, a II) druhou složku, která obsahuje předlék, který může být konvertován enzymem na aktivní lék.

Protilátkou řízená enzymová předléková terapie (ADEPT) je známým způsobem v léčení rakoviny. ADEPT užívá nádorově selektivní protilátky konjugované s enzymem. Konjugát je podáván pacientovi (obvykle intravenózně) a ponechá se, aby se lokalizoval do místa (míst) nádoru a odstranil z krevního oběhu a normálních tkání. Pak se podá pacientovi předlék, který je konvertován enzymem (lokalizovaným v místě nádoru) na cytotoxický lék, který zabíjí nádorové buňky.

Předkládaný vynález lze užít v jakémkoliv systému ADEPT. K vhodným příkladům systému ADEPT patří takové, založené na některém z následujících enzymů: karboxypeptidáza G2; karboxypeptidáza A; aminopeptidáza; alkalická fosfatáza; glykosidáza; β -glukuronidáza; penicilinamidáza; β -laktamáza; cytosindeamináza; nitroreduktáza; nebo na mutovaných hostitelských enzymech jako je karboxypeptidáza A, karboxypeptidáza B a ribonukleáza. Vhodné systémy ADEPT popsali např. Melton RG, 1996, J. National Cancer Institute 88, 1 ; Niculescu-Duvaz, I., 1995, Current Medicinal Chemistry 2, 687; Knox RJ, 1995, Clin. Immunother. 3, 136; WO 88/07378 (CRCT); Blakey et al, Cancer Res. 56, 3287-92, 1996; US 5587161 (CRCT a Zeneca); WO 97/07769 (Zeneca);

a WO 95/13095 (Wellcome). Heterologní enzym může být ve formě katalytické protilátky, viz např. EP 745673 (Zeneca). K dalším přehledným článkům o systémech ADEPT patří Hay a Denny, 1996, *Drugs of the Future*, 21 (9), 917-931 a Blakey, 1997, *Exp. Opin. Ther. Patents*, 7(9), 965-977.

Výhodný přizpůsobený dvousložkový systém podle předkládaného vynálezu je takový, kde:

První složka obsahuje gen kódující heterologní enzym CPG2; a předlék druhé složky je vybrán ze skupiny obsahující N-(4-[N,N-bis(2-iodoethyl)amino]fenoxycarbonyl)-L-glutamovou kyselinu, γ -(3,5-dikarboxy)anilid kyseliny N-(4-[N,N-bis(2-chloroethyl)amino]fenoxycarbonyl)-L-glutamové a N-(4-[N,N-bis(2-chloroethyl)amino]-fenoxycarbonyl)-L-glutamovou kyselinu nebo jejich farmaceuticky přijatelné soli. Výhodné předléky pro použití s CPG2 jsou popsány v následujících patentech firmy Zeneca Limited a Cancer Research Campaign Technology Limited: US 5714148, US 5405990, 5587161 a 5660829.

Další aspekt předkládaného vynálezu poskytuje způsob podání cytotoxického léku na požadované místo, kterýžto způsob obsahuje krok, kdy se hostiteli podá první složka, která obsahuje genový konstrukt podle vynálezu, a pak následuje podání druhé složky, která obsahuje předlék, který může být konvertován na cytotoxický lék heterologním enzymem kódovaným první složkou. Výhodný způsob podání cytotoxického léku na místo podle předkládaného vynálezu je takový způsob, kde první složka obsahuje gen kódující heterologní enzym CPG2 a předlék druhé složky je vybrán ze skupiny obsahující N-(4-[N,N-bis(2-iodoethyl)amino]fenoxycarbonyl)-L-glutamovou kyselinu, γ -(3,5-dikarboxy)anilid kyseliny N-(4-[N,N-bis(2-chloroethyl)amino]fenoxycarbonyl)-L-glutamové a N-(4-[N,N-bis(2-chloroethyl)amino]-fenoxycarbonyl)-L-glutamovou kyselinu nebo jejich farmaceuticky přijatelné soli.

Zkratky použité v popisu vynálezu

AAV	Adeno-asociovaný virus
ADEPT	antilátkou řízená enzymová předléková terapie
AFP	alfa-fetoprotein
AMIRACS	Antimetabolit s inaktivací pomocného činidla v místě nádoru
APS	peroxodvojsíran amonný
b.p.	pár bazí
BPB	bromfenolová modř
CDR	úsek(-y) určující komplementaritu
CEA	karcionembryonální antigen
CL	konstantní doména lehkého řetězce protilátky
CPB	karboxypeptidáza B
CPG2	karboxypeptidáza G2
CPG2 R6	Karboxypeptidáza G2 mutovaná tak, aby se zabránilo glykosylaci po expresi v eukaryotické buňce, viz příklad 1 d
DAB	substrát 3,3'-diaminobenzidinetetrahydrochlorid
DEPC	diethylpyrokarbonát
DMEM	Dulbeccovo médium modifikované Eaglem
ECACC	Evropská sbírka buněčných kultur živočichů
EIA	enzymový imunotest
ELISA	test s enzymem vázaným na imunosorbent
FAS	médium s přísadkou folinové kyseliny
FCS	telecí fetální sérum
Fd	těžký řetězec Fab, Fab' nebo F(ab') ₂ případně obsahující kloubovou oblast
GDEPT	genem řízená enzymové předléková terapie
HAMA	lidská anti-myši protilátka
HCPB	lidská karboxypeptidáza B, výhodně pankreatická

Kloubové oblast (IgG)	krátký peptid bohatý na prolin, který obsahuje cysteiny vytvářející můstky spojující 2 těžké řetězce
HRPO nebo HRP	křenová peroxidáza
IRES	vnitřní ribozomové vstupní místo
MTX	methotrexat
NCA	nespecifický křížově reagující antigen
NCIMB	Národní sbírka průmyslových a mořských bakterií
OPD	ortho-fenylendiamin
PBS	fosfátem pufovaný solný (fyziologický) roztok
PCR	polymerázová řetězová reakce
PGP	N-(4-[N,N-bis(2-chloroethyl)amino-fenoxykarbonyl)-L-glutamová kyselina
preproCPB	proCPB s N-koncovou vedoucí sekvencí
proCPB	CPB s N-koncovou prodoménou
scFv	jednořetězcový Fv
SDS-PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu s dodecyl-sulfátem sodným
SSC	roztok soli s citrátem sodným
TBS	Trisem pufovaný solný roztok
Temed	N,N,N',N'-tetrametyletylenediamin
TFA	trifluorooctová kyselina
TRS	transkripční regulační sekvence
VDEPT	virem řízená enzymová předléková terapie
VH	variabilní úsek těžkého řetězce protilátky
VK	variabilní úsek lehkého řetězce protilátky

V popisu předkládaného vynálezu se uvažuje také o konzervativních náhradách ve specifických sekvencích aminokyselin, které si uchovávají relevantní biologické vlastnosti složky předkládaného vynálezu, ale liší se v sekvenci jednou nebo několika konzervativními substitucemi,

delecemi nebo adicemi aminokyselin. Výhodné jsou zde konkrétně uvedené aminokyselinové sekvence. Typické konzervativní aminokyselinové substituce jsou uvedeny v následující tabulce.

Původní aminokyselina	Příklady substitucí	Výhodná substituce
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro	Pro
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucin	Leu
Leu (L)	Norleucin; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala	Leu
Pro (P)	Gly	Gly
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucin	Leu

Nomenklatura aminokyselin je uvedena v následující tabulce.

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparagová kyselina	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamová kyselina	Glu	E
Glutamin	Gln	Q
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Fenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptofan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V
libovolná aminokyselina	Xaa	X

V popisu předkládaného vynálezu se uvažují variace nukleových kyselin (delece, substituce a adice) specifických sekvencí, které uchovávají jejich schopnost hybridizovat za stringentních podmínek se specifickou sekvencí podle vynálezu. Přitom stringentní podmínky jsou zde definovány jako 6 x SSC, 0,1 % SDS a 60 °C po 5 minut. Avšak výhodné jsou specifické sekvence uvedené v seznamu sekvencí. Chemické analogy přirozených nukleových kyselin jako jsou např.

„peptidové nukleové kyseliny“ (PNA) považujeme za přijatelné ekvivalenty, zvláště pro účely, kdy se nevyžaduje translace do proteinu (Wittung, 1994, Nature 368, 561).

Předkládaný vynález bude dále ilustrován pomocí následujících, vynález nijak neomezuje, příkladů a obrázků. Údaje o teplotě jsou uváděny ve stupních Celsia.

Seznam obrázků

Obr. 1 představuje reprezentativní konstrukt fúzního genu obsahující fragment Fd těžkého řetězce protilátky A5B7 spojený na svém C-konci prostřednictvím flexibilního peptidového linkeru (G4S)₃ s N-koncem polypeptidu CPG2. SS reprezentuje signální sekvenci, L reprezentuje sekvenci linkeru (spojky). CPG2/R6 reprezentuje CPG2 se zrušeným glykosylačním místem díky mutaci, jak je podrobněji vysvětleno v textu.

Obr. 2a ukazuje fúzní protein (Fab-CPG2)₂ s dimerizací uskutečněnou prostřednictvím nekovalentních vazeb mezi dvěma molekulami CPG2.

Obr. 2b ukazuje protilátkový fragment F(ab')₂.

Obr. 3 Ukazuje test ELISA založený na buňkami secernovaném fúzním proteinu. Pouze linie pozitivní na CEA zvýšila hladinu vazby se zvyšujícím se množstvím přidaného fúzního proteinu, zatímco buněčné linie negativní na CEA měly stále konstantní základní hladinu vazby. Vertikální osa reprezentuje hodnoty optické hustoty měřené při 490 nm a horizontální osa představuje množství přidaného fúzního proteinu vyjádřené

v ng proteinu. Graf ukazuje hodnoty získané v pokuse, kde byla řada buněčných linií spolu s negativní kontrolou (bez buněk) inkubována s rostoucím množstvím fúzního proteinu pomocí buněčného testu popsaného v příkladu 6. Výsledky ukazují, že pouze buňky LoVo (CEA pozitivní) projevily zvýšení OD_{490} odpovídající zvýšenému množství přidaného fúzního proteinu. Všechny ostatní buněčné linie (CEA negativní) a kontrola (bez buněk) vykazovaly pouze základní hladinu OD_{490} , která se nezvyšovala po přidání fúzního proteinu. Tyto výsledky skýtají důkaz, že fúzní protein se váže specificky na CEA pozitivní buněčnou linii způsobem závislým na dávce a naopak se neváže na buňky negativní na CEA.

Obr. 4 ukazuje retenci (zadržení) secernovaného fúzního proteinu na rekombinantních nádorových buňkách LoVo. Vertikální osa reprezentuje optickou hustotu měřenou při 490 nm a horizontální osa množství přidané protilátky anti-CEA (IIE6) vyjádřené v ng/ml proteinu. Pokus byl proveden jak je popsáno v příkladu 7 s užitím 3 různých buněčných linií, rekombinantní linie LoVo a Colo320DM (které sami secernují fúzní protein) a kontrolní rodičovské LoVo linie, která nesecekuje fúzní protein. Nejdříve byly buňky fixovány a opláchnuty, aby se odstranil supernatant a všechny nenavázaný materiál a pak se přidávala rostoucí koncentrace protilátky anti-CEA (IIE6) k fixovaným buňkám. Test se vyvolal jak je popsáno v textu, aby se stanovila hladina retence secernovaného materiálu a aby se stanovilo, zda další přidání protilátky zvyšuje signál. Výsledky ukázaly, že bez přidání protilátky anti-CEA kontrolní rodičovská linie LoVo vykazovala pouze základní hladinu hustoty při 490 nm (jak se očekávalo), zatímco rekombinantní linie LoVo dávala velmi

signál OD při 490 nm, což ukazovalo, že materiál fúzního proteinu byl zadržen na CEA pozitivních LoVo buňkách. CEA-negativní rekombinantní buňky Colo320DM dávaly mnohem slabší signál než LoVo buňky, ale přitom byl signál silnější než základní pozadí (pravděpodobně díky nezafixování secernované protilátky na počátku testu). Zvyšování koncentrace protilátky anti-CEA (IIE6) přidávané k fixovaným buňkám ukázalo odpověď závislou na dávce v případě rodičovských buněk LoVo, což ukazuje, že jsou CEA pozitivní a že mohou vázat materiál vážící se na CEA (jako je např. fúzní protein, pokud je přidán). Rekombinantní Colo320DM a LoVo buňky ukázaly jen malé zvýšení signálu OD₄₉₀ se zvyšujícím se množstvím přidávané protilátky s výjimkou buněk LoVo, které vykazovaly slabou odpověď při nejvyšší dávce protilátky. Jelikož rekombinantní buňky Colo320DM jsou CEA negativní, žádné zvýšení signálu díky anti-CEA protilátce se nedalo očekávat. V případě rekombinantních buněk LoVo je zvýšení signálu díky zvýšenému množství protilátky nesnadno hodnotitelné, kromě nejvyšší hodnoty protilátky, díky relativně vysokému počátečnímu signálu.

Obr. 5 ukazuje retenci secernovaného fúzního proteinu na rekombinantních nádorových buňkách LoVo. Vertikální osa reprezentuje medián objemu nádoru (cm³) a horizontální osa představuje čas ve dnech po podání dávky předléku. Pokus byl proveden jak je popsáno v příkladu 12 užitím dávky předléku 60 mg/kg. Výsledky ukázaly, že kontrolní nádory GAD(c) (bez předléku) se zvětšily na 6násobek původní velikosti do 11 dnů (dny po dávce), kdy byly nádory odebrány. Nádory ošetřené předlékem GAD(d) jevily významně pomalejší růst a do 16. dne (dny po dávce) dosáhly pouze 3násobku počáteční velikosti.

Tato data ukazují alespoň na 11 denní zpoždění v růstu nádoru.

Příklady provedení vynálezu

V následujících příkladech, pokud nebude uvedeno jinak, bylo použito následujících metod a materiálů.

DNA byla izolována a purifikována pomocí soupravy GENE CLEAN™ II (Strattech Scientific Ltd. Nebo Bio 101 Inc.). Souprava obsahovala: 1) 6M jodid sodný, 2) koncentrovaný roztok chloridu sodného, Tris a EDTA pro přípravu promývacího roztoku chlorid sodný/etanol/voda, 3) "Glassmilk", což je 1,5 ml lahvička obsahující speciálně formulovanou matrix oxidu křemičitého ve vodě. Toto je technika izolace DNA založená na způsobu, který popsali Vogelstein a Gillespie v Proceedings of the National Academy of Sciences USA (1979) Vol S 76, p 61 S. Stručně shrnuto, postup se soupravou vypadá takto: k jednomu objemu vyříznutého gelu se přidá 3 násobek roztoku jodidu sodného ze soupravy. Agaróza se rozpustí zahřátím na 55 °C po 10 minut a pak se přidá suspenze Glassmilk (5 až 10 ml), vše se dobře promíchá a nechá stát při teplotě místnosti 10 minut. Glassmilk se pak stočí a 3x propláchne roztokem NEW WASH™ (0,5 ml) ze soupravy. promývací pufr se pak odstraní a DNA se eluuje tak, že se Glassmilk inkubuje s vodou (5 až 10 ml) při 55 °C po 10 minut. Vodný supernatant obsahuje DNA, která se pak získá centrifugací. Eluční krok je množné opakovat a supernatanty pak sloučit.

Kompetentní buňky *E. coli* DH5α byly získány od firmy Life Technologies Ltd. (kompetentní buňky DH5α MAX™efficiency).

Minipreparace dvouřetězcové plazmidové DNA se prováděly pomocí soupravy pro izolaci DNA RPMT™ DNA preparation kit firmy Bio 101 Inc. (katalog. č. 2070-400) nebo jiné podobné soupravy. Souprava obsahuje alkalický lýzovací roztok k uvolnění plazmidové DNA z bakteriálních buněk a Glassmilk ve speciálním filtru pro centrifugační mikrozskumavky, který absorbuje uvolněnou DNA, která se pak eluuje sterilní vodou nebo 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7,5.

Standardní polymerázová řetězová reakce (PCR) obsahovala 100 ng plazmidové DNA (pokud není uvedeno jinak), 5 µl dNTP (2,5 mM), 5 µl 10x Enzymový pufr (500 mM KCl, 100 mM Tris pH 8,3), 15mM MgCl₂ a 0,1% želatina), 1 µl základního 25 pM/µl roztoku každého primeru, 0,5 µl termostabilní DNA polymerázy a vodu do celkového objemu 50 µl. Standardní podmínky cyklování PCR byly: 15 cyklů PCR 94° - 90 s, 55 °C - 60 s, 72°C - 120 s, poslední cyklus končil další inkubací v 72 °C po 10 minut.

Byla použita termostabilní DNA polymeráza AMPLITAQ™ od firmy Perkin-Elmer Cetus.

Obecné postupy molekulární biologie, které byly použity, jsou popsány v příručce "Molecular Cloning - A Laboratory Manual" Second Edition, Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989).

Použité médium bez séra bylo médium OPTIMEM™ I Reduced Serum Medium od firmy GibcoBRL (katalog. č. 31985). To je modifikované médium Eagle's Minimum Essential Medium pufrované Hepes a hydrogenuhličitánem sodným, doplněné hypoxantinem, thymidinem, pyruvátem sodným, L-glutaminem stopovými prvky a růstovým faktory.

Činidlo LIPOFECTIN™ (GibcoBRL, katalog. č. 18292-011) je liposomový přípravek 1:1 (hm./hm.) kationtového lipidu N-[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-n,n,n-trimetylamoniumchloridu (DOTMA)

a dioleoylfosfatidyletanolaminu (DOPE) ve filtrované vodě. Spontánně se váže s DNA a vytváří DNA-lipidové komplexy, viz Felgner et al. in Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987) 84, 7431.

G418 (sulfát) je GENETICIN™, GibcoBRL (katalog. č. 11811), což je aminoglykosidové antibiotikum příbuzné gentamycinu, které se používá jako selekční činidlo v molekulárně genetických pokusech.

V testech CEA ELISA byla každá jamka 96jamkové mikrodestičky (NUNC MAXISORBT™) potažena 50 ng CEA v potahovacím uhličitan/hydrogenuhličitanovém pufru pH 9,6 (pufrové tobolky Sigma C3041) a destička se inkubovala ve 4°C přes noc. Pak se destička 3x opláchla PBS-TWEEN™ (PBS + 0,05% TWEEN™ 20) a pak blokovala 150 µl 1% BSA v PBS-TWEEN™ do každé jamky po 1 hodině při teplotě místnosti. Destička se pak opět 3x opláchla PBS-TWEEN™, přidalo se do každé jamky 100 µl testovaného vzorku a destička se inkubovala 2 hodiny při teplotě místnosti. Pak se opět 3x opláchla PBS-TWEEN™ a přidalo se do každé jamky 100 µl ředění 1/500 kozí anti-humánní kappa protilátky značené HRPO (Sigma A 7164) v 1% BSA v PBS-TWEEN™ a destička se inkubovala při teplotě místnosti na kývající se plošině alespoň 1 hodinu. Pak se destička 3x opláchla PBS-TWEEN™ a nakonec ještě jednou v PBS. Pro detekci vazby se přidalo do každé jamky 100 µl vyvíjecího roztoku (jedna tobolky fosfát-citrátového pufru Sigma P4922 rozpuštěná ve 100 ml vody, s přídatkem jedné 30mg tablety o-fenylendiamindihydrochloridu Sigma P4812) a destička se dále inkubovala 15 minut. Reakce byla zastavena přidáním 75 µl 2M H₂SO₄ a byla odečtena absorbance při 490 nm.

Test CEA ELISA užívající anti-CPG2 reportérovou protilátku byl v podstatě shodný s výše popsáním, ale místo kozí anti-humánní kappa protilátky značené HRPO se užila

králičí anti-CPG2 polyklonální sérum ředěné 1/1000 v 1% BSA v PBS-TWEEN™ a destička se inkubovala při teplotě místnosti na kývající se plošině po 2 hodiny. Pak se destička 3x opláchla PBS-TWEEN™, přidala se kozí anti-králičí protilátka značená HRPO (Sigma A-6154) a destička se inkubovala při teplotě místnosti na kývající se plošině po 1 hodinu a pak destička 3x opláchla PBS-TWEEN™ a nakonec ještě jednou v PBS. Pro detekci vazby se přidalo do každé jamky 100 μ l vyvíjecího roztoku (jedna tobolky fosfát-citrátového pufru Sigma P4922 rozpuštěná ve 100 ml vody, s přidavkem jedné 30mg tablety o-fenylendiamindihydrochloridu Sigma P4812) a destička se dále inkubovala 15 minut. Reakce byla zastavena přidáním 75 μ l 2M H_2SO_4 a byla odečtena absorbance při 490 nm.

Analýza westernových blotů transfekčních supernatantů se prováděla následujícím způsobem.

10% minigely pro analýzu transfekce fúzním proteinem byly připraveny pomocí vhodného systému pro minigely (HOEFER MIGHTY SMALL™). 10% rozdělovací gel ("running gel") má složení: 20 ml akrylamid, 6 ml 10 x pufr pro rozdělovací gel, 34 ml H_2O ; 300 ml 20 % SDS; 600 μ l APS, 30 μ l Temed. 10x pufr pro rozdělovací gel je 3,75M Tris pH 8,6. 6% srovnávací gel ("stacking gel") má složení: 9 ml akrylamid, 4,5 ml 10x pufr pro srovnávací gel, 31,5 ml H_2O , 225 μ l 20% SDS, 450 μ l 10% APS, 24 μ l Temed). 10x pufr pro srovnávací gel je 1,25M Tris pH 6,8. 5x elektroforetický pufr pro SDS/PAGE byl 249mM Tris, 799mM glycin, 0,6% (hmotnost/objem) SDS (pH nebylo upraveno).

Příprava vzorků: 2x Laemmliho buffer je 0,125M Tris; 4% SDS, 30% glycerol; 4M urea; 0,002% BPB a případně 5% β -merkaptetoetanol.

Supernatanty: 25 μ l vzorku + 25 μ l 2x LAemmliho pufru, naneseno 40 μ l.

Standardy F(ab')₂ a CPG2: : 2 µl 10 ng/ml standardu; 8 µl H₂O; 10 µl 2x Laemmliho pufu (-merkaptoetanol); naneseo 20 µl.

Markery (standardy) molekulové hmotnosti: byl užit komerční marker RAINBOW™ firmy Amersham, 8 µl vzorku, 8 µl 2x Laemmliho pufu (+merkaptoetanol); naneseo 16 µl.

Podmínky elektroforézy: 30 miliampér dokud barva nedosáhla spodního okraje gelu (přibližně 1 hodinu).

Přenos na membránu ("blotting"): pomocí polosuchého přenosového zařízení firmy LKB na nitrocelulózovou membránu, miliampéry = 0,7 x cm², po 45 minut.

Blokování membrány: 5% sušené odstředěné mléko v PBS-TWEEN™ po 40 minut.

Detekce F(ab')₂: pomocí lehkého řetězce kozí anti-humánní kappa protilátky značené HRPO, ředěné 1/2500 v 0,5% sušeném odstředěném mléku v PBS-TWEEN™, inkubováno přes noc.

Detekce CPG2: myší anti-CPG2 monoklonální protilátka (ředění 1/2000 v 0,5% sušeném odstředěném mléku v PBS-TWEEN™, inkubováno přes noc), kozí anti-myší kappa protilátka značená HRPO, Sigma 674301, ředěná 1/10000 v 0,5% sušeném odstředěném mléku v PBS-TWEEN™, inkubováno alespoň 2 hodiny.

Vyvíjení blotů (přenesených membrán): Chemiluminiscenční detekce HRPO založená na luminolu jako substrátu v přítomnosti zesilovače (Pierce SUPERSIGNAL™ Substrate). Pracovní roztok substrátu byl připraven následovně: doporučený objem 0,125 ml/cm² povrchu membrány. Smíchal se stejný objem roztoku luminolu/zesilovače a stabilního peroxidu, membrána se inkubovala 5 až 10 minut v pracovním roztoku, roztok se odstranil a membrána se umístila do chrániče a exponovala na autoradiografický film (obvykle 30 s až 5 minut).

Uložení mikroorganismů: Plazmid pNG3-Vkss-HuCK byl v souladu s Budapěšťskou smlouvou uložen 11. dubna 1996 v Národní sbírce průmyslových a mořských bakterií (National Collections of Industrial and Marine Bacteria (NCIMB), 23 St Machar Drive, Aberdeen AB2 1RY, Scotland, United Kingdom) jako položka č. NCIMB 40798. Plazmid pNG4-VHss-HuIgG2CH1' byl taktéž uložen v NCIMB 11. dubna 1996 jako položka č. NCIMB 40797. Plazmid pNG3-Vkss-HuCK-NEO byl taktéž uložen v NCIMB 11. dubna 1996 jako položka č. NCIMB 40799. Plazmid pICI266 byl uložen v NCIMB (23 St Machar Drive, Aberdeen AB2 1RY, Scotland, United Kingdom) 11. října 1993 jako položka č. NCIMB 40589.

Trypsinizace: Trypsin EDTA (Gibco BRL, katalog. č. 45300-019) a Hanksův vyvážený solný roztok (HBSS; Gibco BRL, katalog. č. 14170-088) byly předeřátý na 37 °C ve vodní lázni. Stávající média z kultur se odstranila a nahradila objemem HBSS, který byl polovinou původního objemu média, a vrstva buněk byla opatrně promyta tím, že se miska nebo kultivační láhev jemně kývala, aby se odstranily všechny zbytky média obsahujícího sérum. HBSS se odstranilo a byl přidán objem trypsinového roztoku (čtvrtina objemu původního média) a láhev se jemně kývala, aby se zajistilo úplné pokrytí celé vrstvy buněk a ponechalo se stát 5 minut. Trypsin byl inaktivován přidáním normálního kultivačního média (2 x objem trypsinového roztoku). Získaná buněčná suspenze se pak buď kvantifikovala co do počtu buněk nebo se ředila pro další kultivaci, v závislosti na zamýšlených dalších krocích.

Tepelná inaktivace fetálního telecího séra (FCS): FCS (Viralex A15-651, akreditovaná várka neevropského původu) bylo uskladněno při -20 °C. Před použitím bylo ponecháno přes noc ve 4°C úplně roztát. Následující den se inkubovalo ve vodní

lázni 37 °C 15 minut a pak se přeneslo do vodní lázně 56 ° C na 5 minut. Pak se sérum vyjmulo a ponechalo chladnout na teplotu místnosti, poté bylo rozděleno do 50 ml alikvotních částí a uskladněno v -20 °C.

Normální DMEM médium (s užitím složek firmy Gibco BRL): K 500 ml DMEM (katalog. č. 41966086) se přidalo 12,5 ml Hepes (15630-056); 5 ml NEAA (11140-035); 5 ml pen/strep (10378-016) a 50 ml tepelně inaktivovaného FCS.

FAS média (s užitím složek firmy Gibco BRL, pokud není uvedeno jinak): 490 ml DMEM (41966-086); 12,5 ml Hepes (15630-056); 5 ml neesenciálních aminokyselin (11140-035); 5 ml pen/strep (10378-016); 5 ml vitaminů (I 1120-037); 5 ml bazálních aminokyselin (51051-019); folinová kyselina (Sigma F8259) ve finální koncentraci v médiu 10 µg/ml, 50 ml tepelně inaktivovaného FCS; 5 ml směsi dNTP a G418 (50 mg/ml zásobní roztok pro přípravu vhodné selekční koncentrace).

Směs dNTP: 35 mg G (Sigma G6264), 35 mg C (Sigma C4654), 35 mg A (Sigma A4036), 35 mg U (Sigma U3003), 125 mg T (Sigma T1895) byly rozpuštěny ve 100 ml vody, sterilizovány filtrací a uschovány v -20 °C.

Selekce G418: Selekcce buněk LoVo (ATCC CCL 229) se prováděla v koncentraci 1,25 mg/ml, buněk HCT 116 (ATCC CCL 247) a buněk Colo320DM (ATCC CCL 220) v koncentraci 1,5 mg/ml, pokud není uvedeno jinak.

Vektory BLUESCRIPT™ byly získány od firmy Stratagene Cloning Systems.

Expresní vektory s genem Tet-On byly získány od firmy Clontech (Palo Alto, California), položka s katalog. č. K1621-1.

Pokud není uvedeno jinak a nebo není zřejmé ze souvislosti, fúzní konstrukt protilátka-CPG2, o kterém se

píše v příkladech, užívá mutovanou formu CPG2, aby se zabránilo glykosylaci.

Příklad 1

Konstrukce fúzního proteinu (A5B7 Fab-CPG2)₂

Konstrukce fúzního enzymu (A5B7 Fab-CPG2)₂ byla plánována s cílem získat bivalentní molekulu vázající lidský karcinoembryonální antigen (CEA), která má současně enzymovou aktivitu CPG2. S tímto cílem byl navržen počáteční konstrukt, který obsahoval Fd fragment těžkého řetězce protilátky A5B7 navázaný svým C-koncem prostřednictvím flexibilní peptidové spojky (G4S)₃ k N-konci polypeptidu CPG2 (obr. 1).

Protilátka A5B7 se váže na karcinoembryonální antigen (CEA) a je zvláště vhodná k zaměření kolorektálního karcinomu nebo jiných buněk nesoucích CEA antigen (význam CEA jakožto antigenu asociovaného s rakovinou popsali přehledně Shively, J.E. a Beatty, J.D., "CRC Critical Reviews in Oncology/Hematology", vol 2, p355-399, 1994).

Enzym CPG2 je přirozený dimer, obsahuje asociované dvě identické polypeptidové podjednotky. Každá podjednotka tohoto dimeru obsahuje velkou katalytickou doménu a druhou menší doménu, která zprostředkovává dimerizaci.

Obecně řečeno, konjugát protilátka-enzym (nebo protilátkový fragment-enzym) nebo fúzní protein by měl být alespoň divalentní, jinými slovy měl by být schopen vázat alespoň 2 antigeny asociované s nádory (které mohou být shodné nebo různé). V případě fúzního proteinu (A5B7 Fab-CPG2)₂ dochází po expresi k dimerizaci složek stejně jako u nativního enzymu, takže vznikne enzymová molekula

obsahující dva protilátkové fragmenty Fab (a je tudíž bivalentní z hlediska protilátkových vazebných míst) a dvě molekuly CPG2 (obr. 2a).

a) Klonování genů pro protilátku A5B7

Způsoby přípravy, izolace a charakterizace rekombinantní myší protilátky A5B7 F(ab')₂ byly publikovány (mezinárodní patentová přihláška Zeneca Limited, WO 96/20011, příklad 5). V příkladu 5 výše uvedené reference, v oddíle f, byly gen pro protilátku A5B7 klonovány do vektorů GS-SYSTEM™ (Celletch), viz patentové dokumenty WO 87/04462, WO 89/01036, WO 86/05807 a WO 89/10404, kde Fd protilátky A5B7 byl klonován do pEE6 a lehký řetězec do pEE12. Tyto vektory byly zdrojem genů protilátky A5B7 pro konstrukci fúzního proteinu A5B7 Fab-CPG2.

b) Konstrukce chimérického vektoru A5B7

Variabilní úseky myší protilátky byly pomocí PCR amplifikovány z plazmidových vektorů pEE6 a pEE12 užitím vhodných primerů, které obsahují nezbytná restriční místa pro přímé klonování variabilních úseků těžkého a lehkého řetězce do čtecího rámce vektorů pNG4-VHss-HuIgG2CH1' (NCIMB č. 40797) a pNG3-Vkss-HuCK-NEO (NCIMB deposit no. 40799) respectively. Výsledné vektory byly pojmenovány pNG4/A5B7VH-IgG2CH1' (A5B7 chimérický těžký řetězec Fd') a pNG3/ASB7VK-HuCK-NEO (A5B7 chimérický lehký řetězec).

c) Klonování genu CPG2

Gen kódující CPG2 je možné získat z Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, United Kingdom. CPG2 také může být získán rekombinantním způsobem. Nukleotidová sekvence kódující CPG2

byla publikována Minton, N.P. et al., Gene, (1984) 31, 31-38. Expresé kódující sekvence byla popsána v *E. coli* (Chambers S. P. et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 1988, 29: 572-578 a v *Saccharomyces cerevisiae* (Clarke, L.E. et al., Gen Microbiol, 1985, 131, 897-904). Kromě toho gen CPG2 může být připraven jako syntetický DNA konstrukt různými metodami a použit jako výchozí materiál pro další pokusy. Úplná genová syntéza byla popsána v M. Edwards, Am. Biotech Lab., 1987, 5, 38-44, Jayaraman et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 4084-4088, Foguet a Lubbert, 1992, Biotechniques 13, 674-675 a Pierce, 1994, Biotechniques 16, 708.

Jako příprava na klonování genu CPG2 byl konstruován vektor pNG3-Vkss, což je derivát plazmidu pNG3-Vkss-HuCk-Neo (NCIMB č. 40799). Tento vektor byl konstruován tak, že se odstranil neomycinový gen (neboť obsahuje místo pro restriční enzym EcoRI) štěpením restričním enzymem XbaI, pak byl izolován fragment a znovu ligován, čímž vytvořil plazmid pNG3/Vkss-HuCk. Tento meziprodukt byl štěpen enzymy SacI a EcoRI, které vystřihly genový fragment HuCk. Naštěpená DNA pak byla nanášena na 1% agarózový gel a vystřižený fragment oddělený od zbývající části vektoru byl vyříznut z gelu a purifikován. Dva oligonukleotidy CME00261 a CME00262 (sekvence id. č. 1 a 2) byly navrženy a syntetizovány. Oligonukleotidy byly hybridizovány přidáním 200 pmol každého oligonukleotidu do celkového objemu 30 μ l H₂O, zahřáty na 90 °C a ponechány pomalu chladnout na 30 °C. 100 pmol produktu, tj. spojené DNA, bylo ligováno přímo do předtím připraveného vektoru a ligační směs pak byla transformována do *E. coli*. V takto získaném klonu vnesená kazeta DNA vytvořila nový polylinker (vícečetné klonovací místo) pro následné klonování genu CPG2 při tvorbě vektor pNG3-Vkss.

Strukturní gen CPG2 kódující aminokyselinové zbytky Q26 až K415 včetně byl amplifikován pomocí PCR z příslušné DNA pomocí oligonukleotidových primerů za standardních reakčních podmínek PCR. Výsledný produkt PCR byl analyzován na 1% agarózovém gelu, pás očekávané velikosti (přibližně 1200 b.p.) byl vyříznut, purifikován a DNA byla eluována do 20 μ l H_2O . Tento materiál byl pak štěpen SacII, pak byla reakce opět analyzována na 1% agarózovém gelu a pás očekávané velikosti (přibližně 250 b.p.) byl vyříznut a purifikován. Tento fragment byl ligován do plazmidového vektoru pNG3Vkss, který byl předtím štěpen SacII, defosforylován a rozdělen na 1% agarózovém gelu, pás s linearizovaným vektorem byl vyříznut a purifikován, a ligační směs pak byla transformována do *E. coli*. Výsledné klony byly analyzovány na přítomnost a orientaci fragmentu CPG2 SacII restrikční analýzou s enzymy BglII a FseI. Klony, které měly fragment správné velikosti a orientace byly ještě potvrzeny sekvencováním DNA. Tento plazmidový meziprodukt byl nazván pNG3-Vkss-SacIICPG2frag. Tento plazmid byl dále štěpen restrikčními enzymy AgeI a EcoRI, defosforylován a vektorový fragment byl pak izolován. Původní PCR produkt genu CPG2 byl také štěpen enzymy AgeI a EcoRI, fragment velikosti asi 1000 b.p. byl izolován, ligován a transformován do *E. coli*. Výsledné klony byly analyzovány na přítomnost plné délky genu CPG2 (asi 1200 b.p.). pomocí restrikčních enzymů HindIII a EcoRI, klony správné velikosti byly pro potvrzení identity sekvencovány. nakonec byl tento plazmid (pNG3-Vkss-CPG2) štěpen XbaI, defosofrylován, vektorový fragment byl izolován a XbaI fragment neomycinového genu (přibližně 1000 b.p., který byl izolován v dřívějších stadiích) vložen do plazmidu a transformován do *E. coli*. výsledné klony byly testovány na

přítomnost a orientaci neomycinového genu štěpením enzymy XbaI a EcoRI. Výsledný vektor byl označen pNG3-Vkss-CPG2-NEO.

d) Konstrukce varianty CPG2 R6

Plazmid pNG3-Vkss-CPG2-NEO byl užit jako templát pro PCR mutagenezi genu CPG2, aby byla mutovány 3 potenciální glykosylační místa, která byla identifikována v sekvenci bakteriální enzymu divokého typu. Potenciální glykosylační místa (N-X-T/S) byly nalezena v pozicích 222(N-I-T), 264 (N-W-T) a 272 (N-V-S), přičemž číslování pozic je dle publikace Minton, N.P. et al., Gene, 1984, 31, 31-38. Asparaginový zbytek (N) všech 3 glykosylačních míst byl mutován na glutamin (Q), takže glykosylační místa byla zrušena, čímž bylo zabráněno jakékoliv glykosylační události, která by mohla ovlivnit expresi CPG2 nebo enzymovou aktivitu CPG2.

Pro vytvoření varianty CPG2 R6 byla použita taková technika PCR mutageneze, kdy byly mutována všechna 3 místa v jediné reakci. Plazmid pNG3-Vkss-CPG2-NEO byl užit jako templát pro počáteční tři PCR. V reakci R1 byly užity syntetické oligonukleotidové primery CME 00395 a CME 00397 (sekvence id. č. 3 a 4), v reakci R2 byly užity oligonukleotidové promery sekvencí CME 00395 a CME 00399 (sekvence id. č. 3 a 5) a v reakci R3 byly užity syntetické oligonukleotidové primery sekvencí CME 00396 a CME 00400 (sekvence id. č. 6 a 7). Produkty PCR reakce R1 a R2 obsahovaly mutovaná místa 222 a 264 + 272 (v uvedeném pořadí), a R3 produkt jbyl kopií C-koncového segmentu genu CPG2. Produkty R2 a R3 (R2 je přibližně 750 b.p., R3 je přibližně 360 b.p.), po separaci na agaróze a purifikaci, byly spojeny v další PCR reakci. Byly připraveny směsi různých množství produktů R2 a R3 a provedeny další PCR se

syntetickými oligonukleotidy CME 00395 a CME 00396 (sekvence id. č. 3 a 6). Výsledný produkt R4 (přibližně velikosti 1200 b.p.) byl opět amplifikován pomocí PCR s oligonukleotidy CME 00398 a CME 00396 (sekvence id. č. 8 a 6). Výsledný produkt R5 (přibližně velikosti 600 b.p.) byl spojen s produktem R1 (přibližně velikost 620 b.p.) v poslední PCR reakci provedené s oligonukleotidy CME 00395 a CME 00396 (sekvence id. č. 3 a 6). Výsledný produkt R6 (přibližná velikost 1200 bp), který nyní obsahoval všechna tři mutovaná glykosylační místa, mohl být klonován do (po naštěpení restrikčními enzymy AgeI a BsrGI a izolaci výsledného fragmentu) do vektoru pNG3/Vkss-CPG2-Neo (který byl předtím štěpen restrikčními enzymy AgeI a BsrGI a poté izolován). Tak byla připravena požadovaná DNA (sekvence id. č. 9) kódující proteinovou sekvenci CPG2/R6 (sekvence id. č. 10) v expresním vektoru pNG3/Vkss-CPG2R6-Neo.

e) Konstrukce genu fúzního proteinu „Fd těžkého řetězce A5B7-CPG2“

Geny pro fragment těžkého řetězce protilátky a enzymu CPG2 byly získány pomocí PCR amplifikace plazmidového templátu. Plazmid pNG4/A5B7VH-IgG2CH1' byl amplifikován s primery CME 00966 (sekvence id. č. 11) a CME 00969 (sekvence id. č. 12), aby se získala složka A5B7 Fd (přibližně velikosti 300 b.p.) a plazmid pNG3/Vkss-CPG2R6-Neo se amplifikoval s primery CME 00967 (sekvence id. č. 13) a CME 00968 (sekvence id. č. 14) pro získání enzymové složky (přibližně velikosti 1350 b.p.). V každém případě byl reakční produkt PCR nanesen antigen 1% agarózový gel, pás správné velikosti byl vyříznut, purifikován a DNA byla eluována do 20 μ l H₂O.

Další PCR byla provedena, aby se spojily dva reakční produkty dohromady. PCR byla provedena za standardních podmínek s různým množstvím (mezi 0,5 až 2 μ l) každého z PCR produktů v 25 cyklech (místo obvyklých 15 cyklů). Reakční produkt byl analyzován na 1% agarózovém gelu a pás očekávané velikosti (přibližně 1650 b.p.) byl vyříznut, purifikován a eluován do 20 μ l H_2O . Tento materiál byl pak štěpen restrikcčními enzymy *NheI* a *BamHI*, pak byl pás očekávané velikosti (přibližně 1600 b.p.) izolován a purifikován. Vektor pNG4/A5B7VH-IgG2CH1' byl připraven štěpením *NheI* a *BamHI* pro přijetí výše uvedeného produktu PCR, DNA vektoru byla po štěpení defosforylována a větší pás vektorové DNA byl separován od menšího *NheI/BamHI* fragmentu. Vektorový pás byl izolován a purifikován a pak byl podobně naštěpený PCR produkt ligován do připraveného vektoru a ligační směs transformována do *E. coli*. Ze získaných klonů byla připravena DNA a sekvencováním bylo ověřeno, zda obsahují sekvenci fúzního genu. Byla nalezena řada správných klonů a jeden z nich (označený R2.8) byl přejmenován na pNG4/A5B7VH-IgG2CH1/CPG2R6 (sekvence id. č. 15 a 16).

f) Kotransfekce a transientní (přechodná) exprese

Plazmid pNG4/A5B7VH-IgG2CH1/CPG2R6 (kódující fúzní protein protilátkový chimérický Fd - CPG2) a pNG3/A5B7VK-HuCK-NEO (kódující protilátkový chimérický lehký řetězec, sekvence id. 4. 17 a 18) byly kotransfekovány (společně transfekovány) postupem s využitím činidla LIPOFECTIN™ do COS-7 buněk, jak bude popsáno dále. Buňky COS-7 byly vysety na 6jamkové kultivační destičky po 2 x 10⁵ buněk/2ml/jamku ze subkonfluentní kultury a inkubovány přes noc v 37 °C a 5% CO₂. Médium bez séra obsahující LIPOFECTIN™ bylo připraveno následujícím postupem: 12 ml LIPOFECTINU™ a 200 ml média bez

séra se inkubovalo 30 minut při teplotě místnosti. Směs DNA a média bez séra se připravila následovně: 4 mg DNA (2 mg každého kontraktu) do 200 ml média bez séra. 200 ml směsi LIPOFECTIN™ a média bez séra se přidalo ke směsi s DNA a inkubovalo při teplotě místnosti 15 minut. Ke každému vzorku se pak přidalo 600 ml média bez séra. Buňky byly opláchnuty jednou 2 ml média bez séra a pak byl k buňkám přidán 1 ml směsi LIPOFECTIN™/DNA a buňky se inkubovaly 5 hodin ve 37 °C a 5 % CO₂. Směs LIPOFECTIN™/DNA se odstranila a bylo přidáno normální kultivační médium, ve kterém pak byly buňky inkubovány 72 hodin ve 37 °C a 5% CO₂. Buněčný supernatant pak byl sklizen.

g) Analýza fúzního proteinu protilátka-enzym

Supernatant byl analyzován na přítomnost fúzního proteinu pomocí CEA vazebného ELISA testu s užitím lidského kappa lehkého řetězce jakožto reportérové protilátky (pro přítomnost protilátky), ELISA testu s užitím anti-CPG2 reportérové protilátky (pro přítomnost CPG2 fúzního proteinu vázaného ne CEA), HPLC testu CPG2 enzymové aktivity (ke změření specifické aktivity CPG2) a SDS(PAGE s westernovým přenosem (užitím jak lidského kappa lehkého řetězce tak i anti-CPG2 jakožto reportérové protilátky) k detekci exprimovaného materiálu.

HPLC test enzymové aktivity jasně prokázal, že je přítomna CPG2 enzymová aktivita v buněčném supernatantu a oba vazebné testy CEA-ELISA ukázaly vazbu proteinu ve shodě s bivalentní molekulou protilátky A5B7. Skutečnost, že anti-CEA ELISA detekovaná s anti-CPG2 reportérovou protilátkou jasně vykazala vazbu CEA, prokázala, že nejen protilátka, ale i fúzní protein protilátka-CPG2 váže CEA.

Westernový přenos (western blot) s oběma reportérovými protilátkami jasně ukázal podjednotky fúzního proteinu v očekávané velikosti 90 kDa bez pozorovatelné degradace na menší produkty (jako je samostatný Fab nebo enzym).

Jelikož CPG2 je známa tím, že vykazuje enzymatickou aktivitu pouze jako dimer a jelikož byl přítomen pouze fúzní protein protilátka-enzym, bylo zřejmé, že fúzní protein velikosti 90 kDa (dle SDS/PAGE) dimerizuje prostřednictvím přirozeného dimerizačního mechanismu CPG2 a tvoří molekulu dimerního fúzního proteinu protilátka-enzym velikosti 180 kDa (obr. 2a) v „nativních“ podmínkách pufru. Tato molekula vykazuje jak enzymatickou aktivitu CPG2 tak i vazebné vlastnosti k CEA antigenu, které se nijak významně neliší mezi fúzním proteinem a samostatným enzymem a protilátkou.

h) Použití exprimovaného fúzního proteinu a CPG2 předléku v testu cytotoxicity *in vitro*

Byl proveden test buněčné toxicity *in vitro*, ve kterém se porovnal fúzní protein (A5B7-CPG2R6)₂ s „konvenčním“ konjugátem A5B7F(ab')₂-CPG2 vytvořeným spojením A5B7 F(ab')₂ s CPG2 chemickým heterobifunkčním činidlem. V každém případě se materiál vykazující stejnou hladinu CPG2 enzymové aktivity inkuboval s buňkami LoVo, což jsou nádorové buňky nesoucí CEA. Buňky pak byly opláchnuty, aby se odstranil nenavázaný materiál a pak byly resuspendovány v médiu obsahujícím CPG2 fenolový předlék (PGP, viz příklad 2) po dobu 1 hodiny, pak byly buňky opět opláchnuty, resuspendovány v čerstvém médiu a ponechány volně se dělit po 4 dny. Nakonec byly buňky ošetřeny barvivem SRB a byl stanoven jejich počet.

Získané výsledky jasně ukázaly, že fúzní protein (A5B7-CPG2R6)₂ společně s předlékem působil přinejmenším stejné uhynutí buněk a vedl k nižšímu počtu buněk na konci testu než

stejně množství konjugátu A5B7F(ab')₂-CPG2 (se stejným předlékem). Odumírání buněk (vyšší než bazální hladina kontroly) se objevovalo pouze když byl předlék konvertován na aktivní lék enzymem CPG2 (a jelikož buňky byly opláchnuty, aby se odstranil nenavázaný protein, pouze enzym vázaný na buňky zůstal ve stádiu, kdy byl přidán předlék). Takže pokus jasně ukázal, že přinejmenším stejně tak fúzního proteinu A5B7-CPG2R6 zůstalo navázáno jako konvenčního konjugátu A5B7F(ab')₂-CPG2, když dochází k vyššímu stupni odumření buněk (pravděpodobně díky vyšší míře konverze předléku na lék).

i) Konstrukce koexpresního vektoru fúzního proteinu pro použití v tranzientní a trvalé expresi v buněčných liniích

Pro jednoduší způsob transfekce a přímé spojení obou expresních kazet s jedním selekčním markerem byl zkonstruován koexpresní vektor pro expresi fúzního proteinu z existujících vektorů pNG4/A5B7VH-IgG2CH1/CPG2R6 (kódujícího fúzní protein protilátkový Fd-CPG2) a pNG3/A5B7VK-HuCK-NEO (kódujícího lehký protilátkový řetězec). Plazmid pNG4/A5B7VH-IgG2CH1/CPG2R6 byl nejdříve naštěpen restriční enzymem ScaI, reakce nanasena na 1% agarózový gel a pás s linearizovaným vektorem byl vyříznut a purifikován. Vektorová DNA pak byla štěpena restričními enzymy BglII a BamHI, reakce nanasena na 1% agarózový gel a požadovaný pás (přibližně 2700 b.p.) byl vyříznut a purifikován. Plazmid pNG3/A5B7VK-HuCK-NEO byl štěpen restričním enzymem BamHI a pak byl vektor vyříznut z gelu a purifikován. Fragment expresní kazety těžkého řetězce byl pak ligován do připraveného vektoru a ligační směs byla transfekována do *E. coli*. orientace byla ověřena štěpením různými restričními enzymy a byly vybrány klony s kazetou těžkého řetězce ve

stejně orientaci jako kazeta pro lehký řetězec. Tyto plazmidy byly nazvána pNG3-A5B7VK-CPG2/R6-coexp-NEO.

j) Genové vypínače pro expresi proteinů

Lze předvídat, že exprese *in vitro* CPG2 a fúzního proteinu s CPG2 povede k degradaci folátů v médiu, což může vést ke zpomalení růstu buněk nebo k buněčné smrti. Vysoká aktivita enzymu CPG2 pravděpodobně způsobí takový deficit folátu, který je obtížné překonat doplněním folátu do média. Avšak máme za to, že v případě exprese CPG2 nebo fúzního proteinu s CPG2 v savčích buňkách *in vivo* je nepravděpodobné, že nastanou takové problémy, neboť buňky jsou normálně zásobovány všemi látkami potřebnými pro růst normálními oběhovými a buněčnými mechanismy.

Byla zvažována řada možností, jak *in vitro* zabránit možnému vyčerpání kyseliny listové. Jedno z možností bylo užití přísně kontrolovaného vypínacího systému jako jsou např. TET vypínače "TET on" nebo "TET off" (viz Grossen et al., 1995, Science 268: 1766-1769) nebo vypínač ekdyson/muristeron A (No, D. et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 3346-3351). Takové systémy umožňují přesně kontrolovat expresi požadovaného genu a umožňují trvalou transformaci savčích buněk geny, které kódují toxické nebo potenciálně škodlivé expresní produkty. Genový vypínač umožní, že se stabilní rekombinantní buněčné linie obsahující fúzní geny CPG2 snáze založí, budou udržovat a rozmnožovat pro využití k expresi proteinu a jako očkovací kultury pro další pokusy *in vivo*.

Příklad 2

Nádorové buňky HCT116 exprimující fúzní protein protilátka-enzym jsou *in vitro* selektivně ničeny předlékem

HCT116 buňky kolorektálního nádoru (ATCC CCL 247) transfekované genem fúzního proteinu protilátka-enzym podle příkladu 1 mohou být selektivně zabíjeny předlékem, který je konvertován enzymem na aktivní lék.

Aby se toto prokázalo, byly kontrolní netransfekované buňky HCT116 a buňky HCT116 transfekované genem fúzního proteinu protilátka-enzym inkubovány buďto s předlékem, 4-[N,N-bis(2-chloroethyl)amino]-fenyloxymethyl-L-glutamovou kyselinou (PGP, Blakey et al., Br. J. Cancer 72: 1083, 1995) nebo odpovídajícím lékem uvolňovaným CPG2, 4-[N,N-bis(2-chloroethyl)amino]-fenolem. Předlék PGP a lék v koncentracích 5×10^{-4} až 5×10^{-8} M byly přidány na dobu 1 hodiny ve 37 °C na 96jamkové mikródestičky obsahující 1000 až 2500 buněk HCT116 na jamku. Buňky pak byly opláchnuty a inkubovány ve 37 °C po další tři dny. Po opláchnutí, kterým se odstranily odumřelé buňky, se přidala TCA a množství buněčného proteinu adherujícího k destičkám se stanovilo pomocí barvení SRB, jak popsali Skehan et al. (J. Natl. Cancer Inst., 1107, 1990). Síla léku a předléku se hodnotily podle koncentrace, potřebné k dosažení 50% inhibice růstu buněk (IC_{50}).

Působení léku na netransfekované nebo transfekované buňky HCT116 vedlo k hodnotě IC_{50} asi 1 μM . Naproti tomu předlék PGP měl hodnotu IC_{50} 200 μM u netransfekovaných a 1 μM u transfekovaných buněk. Tyto výsledky ukazují, že transfekované buňky, které expimovaly fúzní protein protilátka-CPG2, konvertovaly předlék PGP na mnohem účinnější aktivní lék, zatímco netransfekované buňky HCT116 nebyly

schopny konvertovat předlék. Tudiž transfekované buňky HCT116 byly více než 100x citlivější k PGP předléku z hlediska odumírání buněk ve srovnání s netransfekovanými buňkami HCT116 (viz příklad 1j) týkající se možného vyčerpání folátu v buňkách).

Tato studie ukazuje, že transfekce nádorových buněk genem pro fúzní protein protilátka-enzym může vést k selektivnímu zabití nádorových buněk.

Příklad 3

Protinádorová aktivita předléku PGP v nádorových buňkách HCT116 exprimujících fúzní protein protilátka-CPG2

Protinádorová aktivita *in vivo* předléku PGP v nádorových buňkách HCT116 exprimujících fúzní protein protilátka-CPG2 byla demonstrována následujícím způsobem. Kontrolní netransfekované buňky HCT116 a buňky HCT116 transfekované genem fúzního proteinu protilátka-enzym byly injikovány do "nahých" bezthymových myši (v dávce 1×10^7 buněk na myš). Když byly nádory velikosti 5 až 7 mm v průměru, byl i.p. injikován předlék PGP (3 dávky po 5 až 25 mg/kg v lhodinových intervalech). Protinádorový účinek se posuzoval podle velikosti nádoru měřením "průměru" ve dvou směrech a vypočteným objemem podle vzorce

$$\text{objem} = \pi/6 \times D^2 \times d,$$

kde D je větší průměr a d je menší průměr.

Objem nádoru pak byl vyjádřen relativně k objemu nádoru na počátku terapie předlékem. Protinádorová aktivita byla srovnána s kontrolními skupinami, kterým byl podán PBS (solný

roztok pufrovaný fosfátem, 170mM NaCl, 3,4mM KCl, 12mM Na₂HPO₄, 1,8mM KH₂PO₄, pH 7,2) místo PGP předléku.

Podávání PGP do nádorů HCT116 vzniklých z transfekovaných buněk HCT116 mělo významný protinádorový účinek, jak se dalo soudit podle zmenšující se velikosti nádorů léčených PGP ve srovnání s nádory, které dostávaly PBS, a také podle toho, že nádory léčené PGP ve srovnání s nádory léčenými PBS potřebovaly delší čas k dosažení čtyřnásobku počáteční velikosti. Naproti tomu podávání PGP do nádorů vzniklých z netransfekovaných buněk HCT116 nevedlo k žádnému významnému protinádorovému účinku.

Podobné studie je možné užít k prokázání toho, že gen protilátka-enzym vnesený pomocí vhodného vektoru do nádoru vzniklého z netransfekovaných buněk HCT116, pokud je užit v kombinaci s PGP předlékem, vede k významně protinádorové aktivitě. Netransfekované buňky HCT116 byly injikovány do "nahých" bezthymových myší (v dávce 1×10^7 buněk na myš). Když byly nádory velikosti 5 až 7 mm v průměru, byl injikován do nádoru vektor obsahující gen fúzního proteinu protilátka-enzym. Po 1 až 3 dnech, které se ponechaly pro expresi a navázání fúzního proteinu protilátka-enzym na nádorové buňky HCT116, byl podán PGP předlék stejně jak bylo popsáno výše. To vedlo k významné protinádorové aktivitě ve srovnání s kontrolními myšmi, které dostávaly PBS místo PGP předléku.

Příklad 4

Zlepšená transfekce adherujících buněk užitím doplněného média FAS a/nebo „feeder“ buněk V-79

Lze předvídat, že exprese *in vitro* CPG2 a fúzního proteinu s CPG2 povede k degradaci folátů v médiu, což může vést ke zpomalení růstu buněk nebo k buněčné smrti. Médium FAS (doplněné kyselinou folinovou) zde popsané bylo vyvinuto právě pro buněčné linie exprimující CPG2 nebo fúzní protein s CPG2, aby lépe podporovalo růst takových linií.

Při přípravě na transfekci se adherentní buněčné linie kultivovaly v normálním médiu DMEM a pasážovaly se nejméně třikrát před transfekcí. Buňky V-79 (fibroblasty z plic křečka, získané z MRC radiobiology Unit, Harwell, Oxford, United Kingdom) byly kultivovány v normálním médiu DMEM a pasážovány třikrát před použitím. Před transfekcí byly spočteny v adherentních buňkách živé buňky (pomocí hemocytometru a barvení trypanovou modří) a byly vysety na 6jamkové destičky (Costar 3516) v množství 2×10^5 buněk na jamku a ponechány 18 až 24 hodin, aby se buňky znovu adherovaly.

Pro každou jednotlivou transfekci se přidalo 20 μ l LIPOFECTINU™ k 80 μ l média bez séra a ponechalo se inkubovalo 30 minut při teplotě místnosti. Plazmidová DNA (2 μ g) se přidala do 100 μ l média bez séra, pak se přidala směs LIPOFECTINU™ a ponechala se při teplotě místnosti 15 minut. Jednotlivé 6jamkové destičky byly opláchnuty 2 ml média bez séra v každé jamce, aby se odstranilo všechno sérum, a pak bylo médium nahrazeno 800 μ l čerstvého média bez séra. 200 μ l směsi LIPOFECTIN™/DNA/médium bez séra, která byla předem připravena, se přidalo do každé jamky s buňkami. Destičky se

pak inkubovaly 5 hodin ve 37 °C, směs LIPOFECTIN™/DNA se odstranila a byly přidány 2 ml čerstvého normálního kultivačního média, ve kterém pak byly buňky inkubovány dalších 48 hodin. Transfekované buňky v 6jamkových destičkách byly seškrábnutím uvolněny, buněčná suspenze odsáta a centrifugována. Všechny supernatant byl odstraněn a buněčný pelet byl resuspendován ve 20 ml vhodného kultivačního média (tj. média FAS) obsahujícího vhodné selekční činidlo pro transfekovanou DNA (např. G418) Alikvoty (200 µl) byly vysety na 96 jamkovou destičku ($1,25 \times 10^4$ buněk/jamka).

Aby se zvýšila klonální expanze je možné přidat k transfekovaným buňkám "krmné" („feeder“) fibroblastové buňky. Semikonfluentní krmné buňky V-79 byly trypsinizovány a byly spočteny živé buňky. Buňky pak byly resuspendovány ve sterilní skleněné nádobě na 1×10^6 buněk/ml a ozářeny cesiovým zdrojem dávkou 5000 rad za 12 minut. Buňky pak byly uloženy na 24 až 48 hodin ve 4°C (ozářené buňky jsou metabolicky aktivní ale nedělí se, takže mohou působit jako krmné buňky pro ostatní buňky, aniž by kontaminovaly kulturu). Krmné buňky se vysely na 96 jamkovou destičku, 4×10^4 buněk/jamka, aby vytvořily konfluentní vrstvu pro vznikající rekombinantní klony. Krmné buňky zpočátku také adherují k destičce, ale postupně se uvolňují a vznášejí se v médiu, v jamce zůstávají adherovány pouze rekombinantní klony. Výměna média (200 µl) se prováděla dvakrát týdně, aby se odstranily uvolněné buňky a doplnilo médium. Kolonie byly ponechány vyvíjet se 10 až 14 dnů, pak byl supernatant testován na sekreci fúzního proteinu standardním testem ELISA.

Pro změření rychlosti exprese v případě genového konstruktu fúzního proteinu (A5B7-CPG2)₂ byly rekombinantní buňky vysety v množství 1×10^6 do 10 ml čerstvého normálního

kultivačního média a kultivovány přesně 24 hodin. Supernatant byl pak sklizen, centrifugován, aby se odstranily zbytky buněk a pak testován na enzymovou aktivitu testem ELISA a pomocí HPLC jak bylo popsáno výše. Výsledky pro řadu rekombinantních buněčných linií fúzního proteinu (A5B7-CPG2)₂ jsou ukázány v následující tabulce.

Buněčná linie	Klon	ng/10 ⁶ buněk/24 hodin
HCT116	F7	6550
	C12	3210
	F6	15560
	C1	6151
	B3	4502
	A8	4650
	D5	630
	H9	610
	G11	2081
	H4	2380
	A4	1634
LoVo	B9	8370
	C1	7350
	F12	2983
	C7	10770
	G10	4140
Colo320DM	B3	10540
	G4	4720
	B9	885
	B10	3090
	F12	35660

Příklad 5

Konstrukce nádorové buněčné linie se stabilní indukovatelnou expresí fúzního proteinu (A5B7 Fab-CPG2):

a) Konstrukce indukovatelného expresního vektoru fúzního proteinu

Aby se usnadnila exprese z jednoho indukovatelného savčího promotoru, byla zkonstruována verze fúzního proteinu (A5B7 Fab-CPG2)₂ obsahující IRES (vnitřní ribozomové vstupní místo, viz Sugimoto et al., Biotechnology, 1994, 12, 694-8). Konstruktz pNG3/A5B7VK-HuCK-NEO (chimérický řetězec A5B7, viz příklad 1) byl použit jako templát pro amplifikaci genu lehkého řetězce. Gen byla amplifikován pomocí oligonukleotidů CME 3153 a CME 3231 (sekvence id. č. 19 a 20). Produkt PCR očekávané velikosti (přibližně 700 b.p.) byl purifikován. Tento produkt byl pak štěpen restričními enzymy EcoRI a BamHI a pak purifikován. Získaný fragment byl klonován do vektoru pBleuescript™ KS+ (připraveného naštěpením stejnými restričními enzymy, aby mohl přijmout fragment, a pak defosforylací a purifikací většího pásu). Ligační směs pak byla transformována do *E. coli*. Z klonů byla připravena DNA a analyzována restrikcemi na přítomnost vloženého fragmentu PCR. Vhodné klony byly sekvencovány pro ověření sekvence. Byla získána řada klonů se správnou sekvencí a jeden z těchto klonů byl nazván A5B7Bleuescript.

Podobným způsobem byl amplifikován chimérický těžký řetězec pomocí PCR z plazmidu pNG4/A5B7VH-IgG2CH1/CPG2R6 (viz příklad 1) a oligonukleotidů CME 3151 a CME 3152 (sekvence id. č. 21 a 22). Produkt PCR očekávané velikosti (přibližně 1800 b.p.) byl purifikován. Tento produkt byl pak štěpen restričními enzymy BamHI a XbaI a pak purifikován.

Získaný fragment byl klonován do vektoru pBleuescript™ KS+ (připraveného naštěpením stejnými restrikčními enzymy, aby mohl přijmout fragment, a pak defosforylací a purifikací většího pásu). Ligační směs pak byla transformována do *E. coli*. Z klonů byla připravena DNA a analyzována restrikcemi na přítomnost vloženého fragmentu PCR. Vhodné klony byly sekvencovány pro ověření sekvence. Byla získána řada klonů se správnou sekvencí a jeden z těchto klonů byl nazván BleuescriptFd-CPG2R6.

Sekvence IRES použitá zde pocházela z plazmidu pSXLC (popsaného v Y. Sugimoto et al., Biotechnology, 1994, 12, 694-8, plazmid byl získán od těchto autorů). Sekvence IRES byla vystřižena restrikčními enzymy BamHI a NcoI. Pás očekávané velikosti (přibližně 500 b.p.) byl purifikován a ligován do vektoru Bleuescript™ Fd-CPG2R6 (připraveného naštěpením stejnými restrikčními enzymy). Ligační směs pak byla transformována do *E. coli*. Z klonů byla připravena DNA a analyzována restrikcemi na přítomnost vloženého fragmentu a vhodné klony byly sekvencovány pro ověření sekvence. Byla získána řada klonů se správnou sekvencí a jeden z těchto klonů byl nazván Bleuescript™ IRES Fd-CPG2R6.

Pro usnadnění dalších klonovacích kroků bylo nutné odstranit místo XbaI, které bylo přeneseno ve fragmentu IRES. To bylo provedeno mutagenezí PCR s oligonukleotidovými primery CME 3322 a CME 3306 (sekvence id., č. 23 a 24) a plazmidem Bleuescript™ IRES Fd-CPG2R6 jakožto templátovou DNA. Produkt PCR očekávané velikosti (přibližně 500 b.p.) byl purifikován, štěpen restrikčními enzymy BamHI a NcoI a pak ligován do vektoru Bleuescript™ IRES Fd-CPG2R6 (připraveného naštěpením stejnými restrikčními enzymy). Ligační směs pak byla transformována do *E. coli*. Z klonů byla připravena DNA a analyzována restrikcemi na přítomnost

vloženého fragmentu PCR. Vhodné klony byly sekvencovány pro ověření genové sekvence. Byla získána řada klonů se správnou sekvencí a jeden z těchto klonů byl nazván Bluescript™ IRES Fd-CPG2R6-Xba del.

Fragment chimérického lehkého řetězce A5B7 byl vystřižen z plazmidu A5B7Bluescript™ restrikcí enzymy EcoRI a BamHI. Pás očekávané velikosti (přibližně 700 b.p.) byl purifikován a pak ligován do vhodně připraveného vektoru Bluescript™ IRES Fd-CPG2R6-Xba del a ligační směs pak byla transformována do *E. coli*. Z klonů byla připravena DNA a analyzována restrikcemi na přítomnost vloženého fragmentu PCR. Vhodné klony byly sekvencovány pro ověření genové sekvence. Byla získána řada klonů se správnou sekvencí a jeden z těchto klonů byl nazván Bluescript™ A5B7 IRES Fd-CPG2R6-Xba del. Úplná sekvence chimérického fúzního proteinu A5B7 s IRES je zde uvedena jako sekvence id. č. 52.

Gen chimérického fúzního proteinu A5B7 s IRES byl pak přenesen do expresního vektoru regulovaného tetracyklinem. Vektory s expresním systémem "TET on" byly získány od firmy Clontech. Tetracyklinový vypínatelný expresní vektor pTRE (jinak známý jako pHUD10-3, viz Gossen et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 5547-51) byl připraven pro přijetí fragmentu naštěpením restrikcí enzymy EcoRI a XbaI, defosforylován a velký pás vektoru byl purifikován. Genová kazeta IRES byla vystřižena z plazmidu Bluescript™ A5B7 IRES Fd-CPG2R6-Xba del pomocí stejných enzymů. Získaný fragment přibližné velikosti 3000 b.p. byl ligován do předem připraveného vektoru a ligační směs pak byla transformována do *E. coli*. Z klonů byla připravena DNA a analyzována restrikcemi na přítomnost vloženého fragmentu PCR. Vhodné klony byly sekvencovány pro ověření genové sekvence. Byla

získána řada klonů se správnou sekvencí a jeden z těchto klonů byl nazván pHUD10-3/A5B7IRES Fd-CPG2R6.

b) Konstrukce buněčné linie se stabilní indukovatelnou expresí fúzního proteinu

Pro přípravu rekombinantní linie nádorových buněk HCT116 byl použit standardní způsob transfekce s lipofectinovým činidlem (jak bylo popsáno výše, avšak bez "krmných" buněk). Byla provedena kotransfekce 1 μ g plazmidu pHUD10-3/A5B7IRES Fd-CPG2R6 a 1 μ g transaktivátorového expresního plazmidu pTet-On (ze soupravy firmy Clontech) a pozitivní klony se selektovaly pomocí FAS média obsahujícího 750 μ g G418 /ml.

c) Indukční studie rekombinantních indukovatelných linií HCT116

Získané klony byly rozděleny v duplikátu na 48jamkové misky, 1 x 10⁶ buněk na jamku. Buňky byly kultivovány 48 hodin s tím, že jedna miska byla indukována 2 μ g/ml doxycyklinu a druhá byla neindukovaná kontrol. Expres fúzního proteinu (A5B7 Fab-CPG2)₂ se testovala v buněčném supernatantu testem ELISA a westernovým přenosem, jak bylo popsáno v příkladu 1g. Výsledky jasně demonstrovaly, že indukci fúzního proteinu z indukovatelné buněčné linie pomocí doxycilinu, tak např. pro jeden ze získaných klonů, F11, indukované buňky produkovaly 120 ng/ml fúzního proteinu v supernatantu, zatímco neindukované buňky produkovaly pouze základní hladinu fúzního proteinu odpovídající pozadí (pod 1 ng/ml).

Příklad 6

Buněčný test ELISA na secernovaný fúzní protein

buňky byly vysety na 96 jamkové potažené destičky (Becton Dickinson Biocoat™ poly-D-lysin, katalog. č. 35-6461) v hustotě 1×10^4 buněk/jamka ve 100 μ l normálního média a byly ponechány 40 hodin ve 37 °C. 100 μ l 6% formaldehydu bylo naředěno DMEM a ponecháno 1 hodinu při 4°C. Destičky byly odstředěny a 3 x opláchnuty ponořením v PBS obsahujícím 0,05% Tween™ (první dvě mytí po 2 minutách a poslední 5 minut).

100 μ l z dvojkového ředění supernatantu buněčné kultury obsahujícího fúzní protein nebo chimérickou A5B7 anti-CEA bylo přidáno do každé jamky a destičky byly inkubovány přes noc ve 4°C. destičky pak byly opláchnuty, jak bylo popsáno výše, a v případě chimérického fúzního proteinu se přidalo 100 μ l kozí anti-humánní kappa protilátky značené HRPO (Sigma A 7164) a destička se inkubovala 2 hodiny při teplotě místnosti (detekce pomocí anti-CPG2 byla užita v případě myšího fúzního proteinu scFv). Destičky byly opláchnuty jak bylo popsáno výše a HRP se detekovala pomocí substrátu OPD (Sigma P-8412). Zabarvení se vyvíjelo 5 minut a pak bylo vyvíjení zastaveno 75 μ l 2M H_2SO_4 a odečtena hodnota OD při 490 nm.

V případě fúzního proteinu (A5B7 Fab-CPG2)₂, materiál byl produkován z rekombinantních nádorových buněk Colo320DM (CEA-ve). Obsah fúzního proteinu byl měřen pomocí testu CEA ELISA jak byl popsán výše. Zvyšující se množství fúzního proteinu se přidávalo k řadě buněčných linií negativních na CEA a k CEA pozitivní parentální linii LoVo. Výsledky uvedené na obr. 3 jasně ukazují, že pouze CEA pozitivní linie

vykázaly zvýšenou úroveň vazby s rostoucím množstvím přidaného fúzního proteinu, zatímco CEA negativní buňky jevíly pouze vazbu odpovídající základní úrovni pozadí. To jasně ukazuje, že se fúzní protein specificky váže a udržuje se na CEA pozitivních LoVo buňkách.

Příklad 7

Rekombinantní nádorové buňky LoVo exprimující fúzní protein protilátka-enzym vykazují retenci fúzního proteinu na buněčném povrchu

Bylo ukázáno, že buňky kolorektálního nádoru LoVo transfekované genem fúzního proteinu (A5B7 Fab-CPG2)₂ jednak secernují a také zadržují fúzní protein na svém povrchu.

To bylo demonstrováno srovnáním parentálních Lovo buněk a LoVo buněk secernujících fúzní protein v podmínkách vhodných pro buněčný test ELISA secernovaného fúzního proteinu (viz obr. 4). Podle vývoje zabarvení lze pozorovat, že rekombinantní LoVo buňky zadržují exprimovaný fúzní protein (což se ukazuje jako vysoká míra zabarvení). V kontrolním pokusu s buňkami Colo320DM exprimujícími fúzní protein test ukázal jistou nízkou retenci exprimovaného fúzního proteinu (pravděpodobně nespecifickou) a parentální LoVo buňky měly jen základní aktivitu. Pozitivní kontroly, kde byly protilátky vázající CEA přidány k testovaným buňkám exprimujícím fúzní protein a k parentálním LoVo buňkám, vedly k pozitivnímu signálu u parentálních LoVo buněk (což demonstduje, že CEA je přítomen na parentálních buňkách), ale žádný zvýšený signál nebyl pozorován u buněk Colo320DM (které jsou CEA negativní). Rekombinantní LoVo buňky dávaly tak

silný signál, že přidání protilátky způsobilo tak malý rozdíl vzhledem k celkovému signálu, který byl podstatně vyšší než v kterémkoliv z kontrolních pokusů. Takže se zdá, že fúzní protein anti-CEA protilátka-enzym CPG2 secernovaný CEA pozitivními nádorovými buňkami se váže na povrchu buněk (prostřednictvím CEA), zatímco tentýž protein exprimovaný CEA negativními nádorovými buňkami nevykazuje žádnou takovou vazbu.

Příklad 8

Rekombinantní nádorové buňky LoVo exprimující fúzní protein protilátka-enzym jsou *in vitro* selektivně ničeny předlékem

Nádorové buňky HCT116 exprimující fúzní protein protilátka-enzym jsou *in vitro* selektivně ničeny předlékem, který je konvertován enzymem na aktivní lék.

Aby se toto prokázalo, byly kontrolní netransfekované buňky LoVo a buňky LoVo transfekované genem fúzního proteinu protilátka-enzym CPG2 inkubovány buďto s předlékem, 4-[N,N-bis(2-chloroethyl)amino]-fenyloxycarbonyl-L-glutamovou kyselinou (PGP, Blakey et al., Br. J. Cancer 72: 1083, 1995) nebo odpovídajícím lékem uvolňovaným CPG2, 4-[N,N-bis(2-chloroethyl)amino]-fenolem, stejně jak bylo popsáno v příkladu 2 pro buňky HCT116.

Transfekované buňky, které exprimovaly fúzní protein protilátka-CPG2, konvertovaly předlék PGP na mnohem účinnější aktivní lék, zatímco netransfekované buňky LoVo nebyly schopny konvertovat předlék.

Tato studie ukázala, že transfekce nádorových buněk genem pro fúzní protein protilátka-enzym může vést k selektivnímu zabití nádorových buněk předlékem.

Příklad 9

Založení xenoštěpů nádorů LoVo exprimujících fúzní protein u bezhymových myší

Nádorové rekombinantní buňky LoVo exprimující fúzní protein (A5B7 Fab-CPG2)₂ nebo směs rekombinantních a parentálních buněk LoVo byly injikovány subkutánně do athymových nahých myší (107 buněk na myš). Rychlosti růstu nádorů jak pro 100 %rekombinantní tak pro směs 20 % : 80 % rekombinantní:parentální buňky LoVo byly porovnány s nádory pouze z parentálních buněk. Nepozorovaly se žádné významné rozdíly v růstových křivkách jednotlivých buněčných linií, takže se nemusely provádět žádné korekce při srovnávání těchto buněčných linií. pozorované rychlosti růstu nádorů ukázaly, že v každém případě trvalo 12 dnů než xenoštěpový nádor dosáhl velikosti 10 x 10 mm.

Příklad 10

Stanovení enzymové aktivity ve vzorcích nádorových xenoštěpů

Aby byla k dispozici jako standard pro testy, byla připravena standardní křivka enzymu CPG2 ve 20% homogenátu z normálního nádoru (nádorové parentální buňky). Bylo

provedeno následné ředění vzorků 20% homogenátu z normálního nádoru.

Vyříznutá nádorová tkáň byla vyjmuta z -80°C , kde byla uskladněna (předtím byla bleskově zmrazena v tekutém dusíku) a ponechána roztát. Byly odstraněny všechny zbytky kůže a nádor byl pak skalpelem rozřezán na malé kousky. Pak byla nádorová tkáň přenesena do předem zvážené zkumavky a určena hmotnost nádorové tkáně. Ke vzorku byl přidán 0,2mM ZnCl_2 tak, aby vznikla 20% (hm./obj.) směs, ta se pak homogenizovala a uložila na led. Pak bylo připraveno ředění vzorků nádoru (20% homogenátu), tj. řada neředěný, 1/10, 1/20 a 1/40.

Pro standardní křivku byl ředěn enzym CPG2 na následující koncentrace ve výsledném objemu 400 μl . Podobně bylo připraveno 400 μl z každého vzorku rekombinantního nádoru. Po vyrovnaní teplot na 30°C bylo přidáno k vzorkům 4 μl 10mM methotrexatu (MTX). Reakce byla zastavena po přesně 10 minutách přidáním 600 μl ledového metanolu + 0,2%TFA, centrifugována a supernatant byl odebrán. Substrát a produkt v supernatantu byly separovány pomocí HPLC (užitím katexové kolony HICROM™ S5SCX-100A, mobilní fáze =60% metanol, 40% 60mM mravenčnan amonný/0,1% TFA, detekce při 300 nm). Pro výpočet enzymové aktivity v nádorové tkáni, byla vynesena standardní křivka v jednotkách plochy methotrexatového metabolitu (standardní je, že pouze 20 až 30 % substrátu je metabolizováno, aby se zajistilo, že rychlost není limitována substrátem). Testované vzorky byly analyzovány srovnáním jednotkové plochy metabolitu se standardní křivkou a pak vynásobením ředicím faktorem. Nakonec přijetím pracovního předpokladu, že 1 ml = 1 g byly výsledky vynásobeny 5 (neboť původní naředění vzorků bylo na 20% homogenát).

Výsledky získané se směsí 20 % : 80 % rekombinantní:parentální buňky LoVo exprimující fúzní protein (A5B7 Fab-CPG2) ukázaly následující: Nádory odebrané 5. den vykazovaly průměrnou enzymovou aktivitu 0,26 U/g (rozmezí 0,18 až 0,36 U/g) a nádory odebrané 12. den měly průměrnou enzymovou aktivitu 0,65 U/g (rozmezí 0,19 až 1,1 U/g).

Příklad 11

Stanovení enzymové aktivity ve vzorcích plazmy

Aby byla k dispozici jako standard pro testy, byla připravena standardní křivka enzymu CPG2 ve 20% normální plazmě s následujícími koncentracemi: 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 a 1,0 U/ml. Podobně všechny testované vzorky byly naředěny na 20 % plazmu. další ředění těchto vzorků, tj. 1/10, 1/20 1/50, byla provedena užitím normálního 20% séra. 200 μ l alikvoty každého CPG2 standardu a příslušného ředění testovaného vzorku byly ekvilibrovány na 30 °C. 2 μ l 10 mM MTX byly přidány ke každému vzorku a dobře promíchány. Reakce byla zastavena přesně po 10 minutách /aby se zvýšila citlivost testu inkubační doba může být prodloužena na 30 minut) přidáním 500 μ l ledového metanolu + 0,2% TFA a produkt byl detekován pomocí HPLC, jak bylo popsáno v příkladu 10.

V plazmě nebyla patrná žádná aktivita, kromě řídkých případů, kdy hladina enzymové aktivity v nádoru přesáhla 2,0 U/g, přičemž v takovém případě byla plazmatická hladina enzymu detekována v rozmezí 0,013 až 0,045 U/ml.

Příklad 12

Protinádorová aktivita PGP předléku v LoVo nádorech exprimujících fúzní protein protilátka-CPG2

Rekombinantní nádorové buňky LoVo exprimující fúzní protein (A5B7 Fab-CPG2)₂ nebo směs rekombinantních a parentálních buněk LoVo byly injikovány do "nahých" bezthymových myši jak bylo popsáno v příkladu 9.

Když byly nádory velikosti 5 až 7 mm v průměru, byl i.p. injikován předlék PGP (3 dávky, v DMSO/0,15M hydrogenuhličitanový pufr, po 40 až 80 mg/kg v 1hodinových intervalech).

Protinádorový účinek se posuzoval podle velikosti nádoru měřením "průměru" ve dvou směrech a výpočtem objemu nádoru podle vzorce

$$\text{objem} = \pi/6 \times D^2 \times d,$$

kde D je větší průměr a d je menší průměr.

Objem nádoru pak byl vyjádřen relativně k objemu nádoru na počátku, kdy byl podán předlék, nebo lze alternativně počítat medián objemu nádoru. Protinádorová aktivita byla srovnána s kontrolními skupinami s transfekovanými nebo netransfekovanými bunkami, kterým byl podán pufr bez PGP předléku.

Podávání PGP do nádorů LoVo vzniklých z rekombinantních LoVo buněk nebo směsi rekombinantních a parentálních LoVo buněk mělo významný protinádorový účinek, jak se dalo soudit podle zmenšující se velikosti nádorů léčených PGP ve srovnání s kontrolami, a také podle toho, že nádory léčené PGP ve srovnání s nádory léčenými PBS potřebovaly delší čas k dosažení čtyřnásobku počáteční velikosti (obr. 5).

Naproti tomu podávání PGP do LoVo nádorů vzniklých z netransfekovaných buněk nevedlo k žádnému významnému protinádorovému účinku.

Podobné studie je možné užít k prokázání toho, že gen protilátka-enzym vnesený pomocí vhodného vektoru do LoVo nádoru vzniklého z netransfekovaných parentálních LoVo buněk, pokud je užit v kombinaci s PGP předlékem, vede k významně protinádorové aktivitě. Netransfekované buňky LoVo byly injikovány do "nahých" bezthymových myší (v dávce 1×10^7 buněk na myš). Když byly nádory velikosti 5 až 7 mm v průměru, byl injikován do nádoru vektor obsahující gen fúzního proteinu protilátka-enzym. Po 1 až 3 dnech, které se ponechaly pro expresi a navázání fúzního proteinu protilátka-enzym na nádorové LoVo buňky, byl podán PGP předlék stejně jak bylo popsáno výše. To vedlo k významně protinádorové aktivitě ve srovnání s kontrolami.

Příklad 13

Konstrukce fúzního proteinu (806.077 Fab-CPG2)₂

Konstrukce enzymové fúze (806.077 Fab-CPG2)₂ byla plánována s cílem získat bivalentní molekulu vázající lidský karcinoembryonální antigen (CEA), která má současně enzymovou aktivitu CPG2. S tímto cílem byl navržen počáteční konstrukt, který obsahoval Fd fragment těžkého řetězce protilátky 806.077 navázaný svým C-koncem prostřednictvím flexibilní peptidové spojky (G4S)₃ k N-konci polypeptidu CPG2 (obr. 1, ale A5B7 je nahrazena 806.077).

Protilátka 806.077 (popsaná v mezinárodní patentové přihlášce WO 97/42329, Zeneca Ltd.) se váže na lidský

karcinoembryonální antigen (CEA) s velmi vysokou specifíčností. Takže protilátka 806.077 je zvláště vhodná k zaměření kolorektálního karcinomu nebo jiných buněk nesoucích CEA antigen.

Obecně řečeno, konjugát protilátka-enzym (nebo protilátkový fragment-enzym) nebo fúzní protein by měl být alespoň divalentní, jinými slovy měl by být schopen vázat alespoň 2 antigeny asociované s nádory (které mohou být shodné nebo různé). V případě fúzního proteinu (806.077 Fab-CPG2)₂ dochází po expresi k dimerizaci složek stejně jako u nativního enzymu, takže vznikne enzymová molekula obsahující dva protilátkové fragmenty Fab (a je tudíž bivalentní z hlediska protilátkových vazebných míst) a dvě molekuly CPG2 (obr. 2a).

b) Klonování genů pro protilátku 806.077

Způsoby přípravy, izolace a charakterizace rekombinantní myší protilátky 806.077F(ab')₂ byly publikovány (mezinárodní patentová přihláška WO 97/42329, příklad 7). V příkladu 7.5 výše uvedené reference se popisuje klonování genu pro variabilní úsek protilátky 806.077 do vektorů pBluescript™ KS+. Tyto vektory pak byly zdrojem genů variabilního úseku protilátky 806.077 pro konstrukci genů chimérického těžkého a lehkého řetězce Fd.

b) Konstrukce vektorů chimérické 806.077 protilátky

Mezinárodní patentová přihláška WO 97/42329 v příkladu 8 popisuje klonování genů chimér těžkého a lehkého řetězce Fd protilátky 806.077 do vektorů pNG3-Vkss-HuCk-NEO (NCIMB deposit č. 40799) a pNG4-VHss-HuIgG2CH1' (NCIMB č. 40797). Výsledné vektory byly pojmenovány pNG4/VHss 806.077VH-IgG2CH1' (806.077 chimérický těžký řetězec Fd') a pNG3/VKss

806.077VK-HuCK-NEO (806.077 chimérický lehký řetězec). Tyto vektory byly zdrojem genů protilátky 806.077 pro konstrukci fúzního proteinu 806.077Fab-CPG2.

c) Konstrukce genu fúzního proteinu těžký řetězec 806.077 Fd-CPG2

Klonování a konstrukce genu CPG2 byly popsány v příkladu 1, v části c a d. Podobně konstrukce vektoru pNG4/A5B7VH-IgG2CH1/CPG2R6, který byl použit pro konstrukci těžký řetězec 806.077 Fd-CPG2, byla popsána v příkladu 1, části e. Gen pro variabilní úsek těžkého řetězce 806.077 byl vyjmut z vektoru pNG4/VHss806.077VH-IgG2CH1' štěpením restrikními enzymy HindIII a NheI a pás očekávané velikosti (přibližně 300 b.p.) obsahující variabilní genový úsek byl vyříznut, purifikován. Stejně restrikními enzymy byly užity ke štěpení vektoru pNG4/A5B7VH-IgG2CH1/CPG2R6, aby se variabilní úsek protilátky A5B7 nahradil 806.077. Po štěpení byla DNA defosforylována a větší vektorový pás byl izolován a purifikován. Podobně naštěpené fragmenty variabilních genových úseků pak byly ligovány do tohoto připraveného vektoru a ligační směs pak byla transformována do *E. coli*. Ze získaných klonů byla izolována DNA a klony byly analyzovány restrikními enzymy na přítomnost a orientaci fragmentu a pak byl ještě gen pro fúzní protein potvrzen sekvencováním DNA. Byla nalezena řada odpovídajících klonů a jeden z nich, nazvaný pNG4/VHss806.077VH-IgG2CH1/CPG2 byl vybrán pro další práci. Sekvence fúzního proteinu těžký řetězec 806.077 Fd-CPG2, která byla takto vytvořena, je uvedena jako sekvence id. č. 25 a 26.

d) Kotransfekce, tranzientní exprese a analýza fúzního proteinu

Plazmid pNG4/VHss806.077VH-IgG2CH1/CPG2R6 (kódující fúzní protein protilátkový chimérický Fd - CPG2) a pNG3/A5B7VK-HuCK-NEO (kódující protilátkový chimérický lehký řetězec byly kotransfekovány postupem s využitím činidla LIPOFECTIN™ do COS-7 buněk, jak bylo popsáno v příkladu 1. Analýza fúzního proteinu protilátka-enzym byla provedena také stejně jako v příkladu 1.

HPLC test enzymové aktivity jasně prokázal, že je přítomna CPG2 enzymová aktivita v buněčném supernatantu a oba vazebné testy CEA-ELISA ukázaly vazbu proteinu ve shodě s bivalentní molekulou protilátky 806.077. Skutečnost, že anti-CEA ELISA detekovaná s anti-CPG2 reportérovou protilátkou jasně vykázal vazbu CEA, což ukázalo, že nejen protilátka, ale i fúzní protein protilátka-CPG2 váže CEA.

Westernový přenos (western blot) s oběma reportérovými protilátkami jasně ukázal podjednotky fúzního proteinu (806.077Fab-CPG2)₂ v očekávané velikosti 90 kDa pouze s malým stupněm degradace na menší produkty (jako je samostatný Fab nebo enzym).

Jelikož CPG2 je znám tím, že vykazuje enzymatickou aktivitu pouze jako dimer a jelikož byl přítomen pouze fúzní protein protilátka-enzym, bylo zřejmé, že fúzní protein velikosti 90 kDa (dle SDS/PAGE) dimerizuje prostřednictvím přirozeného dimerizačního mechanismu CPG2 a tvoří molekulu dimerního fúzního proteinu protilátka-enzym velikosti 180 kDa (obr. 2a) v „nativních“ podmínkách pufru. Tato molekula vykazuje jak enzymatickou aktivitu CPG2 tak i vazebné vlastnosti k CEA antigenu, které se nijak významně neliší mezi fúzním proteinem a samostatným enzymem a protilátkou.

e) Konstrukce koexpresního vektoru fúzního proteinu (806.077Fab-CPG2)₂ pro použití k tranzientní a stabilní expresi v buněčných liniích

Pro jednodušší způsob transfekce a přímé spojení obou expresních kazet s jedním selekčním markerem byl zkonstruován koexpresní vektor pro expresi fúzního proteinu z existujících vektorů pNG4/VHss806.077VH-IgG2CH1/CPG2R6 (kódujícího fúzní protein protilátkový Fd-CPG2) a pNG3/VKss 806.077VK-HuCK-NEO (kódujícího lehký protilátkový řetězec). Plazmid pNG4/VHss806.077VH-IgG2CH1/CPG2R6 byl nejdříve naštěpen restriční enzymem ScaI a pás s linearizovaným vektorem byl vyříznut a purifikován. Vektorová DNA pak byla štěpena restričními enzymy BglII a BamHI a požadovaný pás (přibližně 2700 b.p.) byl vyříznut a purifikován. Plazmid pNG3/VKss 806.077VK-HuCK-NEO byl štěpen restričním enzymem BamHI a pak byla DNA defosforylována a vektorový pás byl purifikován. Fragment expresní kazety těžkého řetězce byl pak ligován do připraveného vektoru a ligační směs byla transfekována do *E. coli*. Orientace byla ověřena štěpením různými restričními enzymy a byly vybrány klony s kazetou těžkého řetězce ve stejné orientaci jako lehký řetězec. Tento plazmid byl nazván pNG3- 806.077-CPG2/R6-coexp-NEO.

Příklad 14

Konstrukce fúzního proteinu (55.1scFv-CPG2)₂

Protílátka 55.1 popsaná v Patentu US 5665357 rozpoznává antigen asociovaný s nádorem CA55.1, který je exprimován ve většině kolorektálních nádorů a v normální tkáni tlustého střeva buďto vůbec není nebo je exprimován jen velmi slabě.

Stanovení sekvence cDNA těžkého a lehkého řetězce protilátky 55.1 bylo popsáno v příkladu 3 výše uvedeného patentu. Plazmidový expresní vektor, který dovoluje sekreci protilátkových fragmentů do periplazmy *E. coli* užívající vedoucí sekvence *pelB* (pICI266) byl uložen v souladu s Budapeštskou smlouvou uložen 11. října 1993 v Národní sbírce průmyslových a mořských bakterií (National Collections of Industrial and Marine Bacteria (NCIMB), 23 St Machar Drive, Aberdeen AB2 1RY, Scotland, United Kingdom) jako položka č. NCIMB 40589. Tento vektor byl modifikován, jak je popsáno v Patentu US 5665357, a byl vytvořen pICI1646, a tento plazmid byl užit pro klonování různých fragmentů protilátky 55.1, jak bylo dále popsáno ve výše zmíněném příkladu 3, včetně přípravy konstruktů 55.1scFv, který byl označen pICI1657.

Konstrukt pICI1657 jinak známý jako pICI-55.1scFv) byl použit jako výchozí materiál pro konstrukci fúzního proteinu (55.1scFv-CPG2)₂. Gen 55.1scFv byla amplifikován pomocí oligonukleotidů CME 3270 a CME 3272 (sekvence id. č. 27 a 28) z plazmidu pICI1657 jako templátu. Produkt PCR očekávané velikosti (přibližně 790 b.p.) byl purifikován.

Podobným způsobem byl amplifikován gen CPG2 ve standardní PCR z plazmidu pNG4/A5B7VH-IgG2CH1/CPG2R6 (viz příklad 1) a oligonukleotidů CME 3274 a CME 3275 (sekvence id. č. 29 a 30). Produkt PCR očekávané velikosti (přibližně 1200 b.p.) byl purifikován.

Další reakce PCR byla provedena, aby se spojily dva purifikované PCR produkty. PCR byla provedena za standardních podmínek s různým množstvím (mezi 0,5 až 2 μ l) každého z PCR produktů v 25 cyklech (místo obvyklých 15 cyklů) s oligonukleotidy CME3270 a CME3275 (sekvence id. č. 27 a 30). Reakční produkt očekávané velikosti (přibližně 2000

bp) byl byl vyříznut, purifikován a eluován do 20 μ l H₂O. Tento materiál byl pak štěpen restriční enzymem EcoRI a pak byl purifikován. Vektor pNG4/VHss806.077VH-IgG2CH1/CPG2 byl připraven štěpením EcoRI pro přijetí výše uvedeného produktu PCR, DNA vektoru byla po štěpení defosforylována a větší pás vektorové DNA byl separován od menšího fragmentu. Vektorový pás byl izolován a purifikován a pak byl podobně naštěpený PCR produkt ligován do připraveného vektoru a ligační směs transformována do *E. coli*. Ze získaných klonů byla připravena DNA analyzována na správnou orientaci restričními enzymy HindIII/NotI a sekvencováním bylo ověřeno, zda obsahují sekvenci fúzního genu. Byla nalezena řada klonů se správnou sekvencí a jeden z nich byl označen pNG4/55.1scFv/CPG2R6. DNA a aminokyselinová sekvence tohoto fúzního proteinu jsou zde ukázány jako sekvence id. č. 31 a 32.

Příklad 15

Modifikace plazmidu pNG4/55.1scFv/CPG2R6 pro usnadnění výměny scFv

Během konstrukce plazmidu pNG4/55.1scFv/CPG2R6 bylo vneseno jedinečné místo BspEI (isoschizomer AccIII) do sekvence linkeru (G3S)₃, který je mezi genem pro protilátku a CPG2. Pro usnadnění klonování alternativních scFv konstruktů bylo odstraněno EcoRI místo na 3'konci genu CPG2 v plazmidu pNG4/55.1scFv/CPG2R6, aby se usnadnilo vkládání alternativních genů scFv protilátky ve shodě s čtecím rámcem, jak za plazmidovou signální sekvencí tak na 5'konec CPG2 genu, prostřednictvím klonování fragmentu EcoRI/BspEI. Této modifikace bylo dosaženo PCR mutagenezí, kde nejdříve byl

amplifikován pNG4/55.1scFv/CPG2R6 s oligonukleotidy CME 3903 a CME 3906 (sekvence id. č. 33 a 34). Pak byl pNG4/55.1scFv/CPG2R6 zase amplifikován, ale s oligonukleotidy CME 4040 a CME 3905 (sekvence id. č. 35 a 36). První PCR pás očekávané velikosti 420 b.p. byl purifikován. Druhá reakce byla provedena podobně a očekávaný PCR produkt 450 b.p. byl purifikován.

Další reakce PCR byla provedena, aby se spojily dva purifikované PCR produkty. PCR byla provedena za standardních podmínek v 15 až 25 cyklech s oligonukleotidy CME 3905 a CME 3906 (sekvence id. č. 36 a 34). Reakční produkt očekávané velikosti (přibližně 840 bp) byl purifikován a pak štěpen restrikčními enzymy NotI a XbaI a fragment očekávané velikosti asi 460 b.p. byl purifikován.

Vektor pNG4/55.1scFv/CPG2R6 byl připraven štěpením restrikčními enzymy NotI a XbaI pro přijetí výše uvedeného produktu PCR, DNA vektoru byla po štěpení defosforylována a větší pás vektorové DNA byl separován od menšího fragmentu. Vektorový pás byl izolován a purifikován a pak byl podobně naštěpený PCR produkt ligován do připraveného vektoru a ligační směs transformována do *E. coli*. Ze získaných klonů byla připravena DNA analyzována na správnou orientaci restrikčním enzymem EcoRI a sekvencováním bylo ověřeno, zda obsahují sekvenci modifikovaného fragmentu fúzního genu. Byla nalezena řada klonů se správnou sekvencí a jeden z nich byl označen pNG4/55.1scFv/CPG2R6/delEcoRI. Tato mutace odstranila místo EcoRI, které bylo na 3' konci genu CPG2 a současně vnesla další stop kodon. DNA sekvence genu fúzního protein až po, a včetně obou stop kodonů, je ukázána jako sekvence id. č. 37.

Příklad 16

Konstrukce genu protilátky 806.077scFv

806.077scFv byl vytvořen pomocí vektorů pNG4/VHss806.077VH-IgG2CH1' a pNG3/VKss806.077VK-HuCK-NEO, které byly zdroji genů variabilních úseků 806.077 VH a VK. Gen 806.077VH byl amplifikován z pNG4/VHss806.077VH-IgG2CH1' za standardních podmínek PCR s oligonukleotidy CME 3260 a CME 3266 (sekvence id. č. 39 a 40). 806.077VK byl amplifikován z pNG3/VKss806.077VK-HuCK-NEO s oligonukleotidy CME 3262 a CME 3267 (sekvence id. č. 41 a 42). PCR produkty VH a VK byly purifikovány.

Další reakce PCR byla provedena, aby se spojily dva purifikované PCR produkty. PCR byla provedena za standardních podmínek s různým množstvím (mezi 0,5 až 2 μ l) každého z PCR produktů v 15 až 25 cyklech (místo obvyklých 15 cyklů) s oligonukleotidy CME3260 a CME3262 (sekvence id. č. 39 a 41). Reakční produkt očekávané velikosti (přibližně 730 bp) byl vyřiznut, purifikován a štěpen restričními enzymy NcoI a XhoI a pak byl pás s fragmentem očekávané velikosti 720 b.p. purifikován.

Plazmid pICI1657 (jinak známý jako pICI-55.1scFv) byl dále modifikován vložení dvouřetězcové DNA kazety vytvořené ze dvou oligonukleotidů CME 3143 a 3145 (sekvence id. č. 45 a 46) mezi existující restriční místa XhoI a EcoRI standardním klonovacím postupem, čímž se vytvořil vektor pICI266-55.1scFvtag/his (DNA sekvence výsledného genu 55.1scFvtag/his je uvedena jako sekvence id. č. 47). Vektor byl připraven štěpením restričními enzymy NcoI a XhoI pro přijetí výše uvedeného produktu PCR, DNA vektoru byla po štěpení defosforylována a větší pás vektorové DNA byl separován od

menšího fragmentu. Vektorový pás byl izolován a purifikován a pak byl podobně naštěpený PCR produkt ligován do připraveného vektoru a ligační směs transformována do *E. coli*. Ze získaných klonů byla připravena DNA analyzována restriční enzymem EcoRI, zda obsahují vložený modifikovaný fragment a vhodné klony pak byly sekvencovány, aby byly ověřeny sekvenční změny. Byla nalezena řada klonů se správnou sekvencí a jeden z nich byl označen pICI266/806.077scFvtag/his (alternativně známý jako pICI266-806.077VH/VLscFvtag/his). DNA a proteinová sekvence genu 806.077scFvtag/his jsou uvedeny jako sekvence id. č. 25 a 26.

Příklad 17

Konstrukce fúzního proteinu (806.077scFv-CPG2)₂

Plazmid pICI266/806.077scFvtag/his byl použit jako zdroj 806scFv. Gen byl amplifikován pomocí oligonukleotidů CME 3907 a CME 3908 (sekvence id. č. 48 a 49) a pás očekávané velikosti byl purifikován. Fragment byl naštěpen restričními enzymy EcoRI a BspEI a pak byl pás očekávané velikosti 760 b.p. purifikován.

Plazmid pNG4/55.1scFv/CPG2R6/delEcoRI byl připraven štěpením restričními enzymy EcoRI a BspEI pro přijetí výše uvedeného produktu PCR, DNA vektoru byla po štěpení defosforylována a větší pás vektorové DNA byl separován od menšího fragmentu. Vektorový pás byl izolován a purifikován a pak byl podobně naštěpený PCR produkt ligován do připraveného vektoru a ligační směs transformována do *E. coli*. Ze získaných klonů byla připravena DNA analyzována restričním enzymem EcoRI, zda obsahují vložený modifikovaný

fragment. Vhodné klony pak byly sekvencovány, aby byly ověřeny genové sekvence. Byla nalezena řada klonů se správnou sekvencí a jeden z nich byl označen pNG4/806IscFv/CPG2R6/delEcoRI. DNA a proteinová sekvence genu fúzního proteinu 806IscFvtag/CPG2R6 jsou uvedeny jako sekvence id. č. 50 a 51.

Příklad 18

Kotransfekce a tranzientní exprese fúzních proteinů
protilátka-CPG2

Jak bylo již popsáno v příkladu 1, plazmidy kódující jiné fúzní proteiny mohou být transfekovány standardním způsobem, aby se získala tranzientní exprese kódovaného fúzního proteinu v buňkách COS-7. V případě fúzních proteinů (Fab-CPG2)₂ je možné užít jak kotransfekci vhodných plazmidů nebo transfekci koexprimujících proteinů. Podobně samotné expresní plazmidy fúzních proteinů (scFv-CPG2)₂ mohou být transfekovány stejným způsobem. V každém případě pro jednotlivou transfekci bylo třeba užít 4 mg příslušné DNA.

Příklad 19

Genový vypínač proteinové exprese

Jak bylo již popsáno v příkladu 1, pro expresi fúzních proteinů je možné užít přísně kontrolovaného ale indukovatelného vypínacího systému jako jsou např. "TET on" nebo "TET off" (viz Grossen et al., 1995, Science 268: 1766-

1769) nebo vypínač ekdyson/muristeron A (No, D. et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 3346-3351). Vhodné způsoby a klonovací strategie popsané v příkladu 5 je možné použít pro fúze protilátkový Fab-enzym vyžadující pro expresi sekvenci IRES. Vložení vhodné genové kazety do vypínatelného expresního vektoru je možné použít, jestliže je produktem fúze jediný polypeptidový řetězec jako je tomu např. v konstruktech scFv-enzym.

Příklad 20

Stanovení vlastností fúzních proteinů protilátka-enzym vylučovaných buňkami COS7

Supernatant buněk COS7 může být analyzován na přítomnost protilátkových fúzních proteinů postupem, který byl popsán v příkladu 1g. Podobně lze užít exprimovaný fúzní protein a CPG2 předlék v *in vitro* testu cytotoxicity, jak bylo popsáno v příkladu 1h.

HPLC test enzymové aktivity CPG2 jasně prokáže, zda je přítomna CPG2 enzymová aktivita v buněčném supernatantu a oba vazebné testy CEA-ELISA s anti-CPG2 reportérovou protilátkou potvrdí vazbu proteinu ve shodě s bivalentní molekulou protilátky A5B7 a ukáží, že fúzní protein protilátka-CPG2 (nejen samotná protilátková složka) váže CEA.

Westernový přenos (western blot) s oběma reportérovými protilátkami jasně ukáže podjednotky fúzního proteinu v očekávané velikosti. Jelikož CPG2 je znám tím, že vykazuje enzymatickou aktivitu pouze jako dimer a jelikož je přítomen pouze fúzní protein protilátka-enzym, je zřejmé, že fúzní protein dimerizuje prostřednictvím přirozeného dimerizačního

mechanismu CPG2 a tvoří molekulu dimerního fúzního proteinu v „nativních“ podmínkách pufru. Navíc pak molekula vykazuje jak enzymatickou aktivitu CPG2 tak i vazebné vlastnosti k CEA antigenu, které se nijak významně neliší mezi fúzním proteinem a samostatným enzymem a protilátkou. Výsledky získané v testu cytotoxicity mohou prokázat, že fúzní protein společně s předlékem působil přinejmenším stejné uhynutí buněk a vedl k nižšímu počtu buněk na konci testu než stejné množství konjugátu A5B7F(ab')₂-CPG2 (se stejným předlékem). Odumírání buněk (vyšší než bazální hladina kontroly) se objevuje pouze když je předlék konvertován na aktivní lék enzymem CPG2 (a jelikož buňky byly opláchnuty, aby se odstranil nenavázaný protein, pouze enzym vázaný na buňky zůstal ve stádiu, kdy byl přidán předlék). Takže takový test jasně ukazuje, že přinejmenším stejně tak fúzního proteinu (A5B7-CPG2R6)₂ zůstává navázáno jako konvenčního konjugátu A5B7F(ab')₂-CPG2, když dochází k vyššímu stupni odumření buněk (pravděpodobně díky vyšší míře konverze předléku na lék).

Příklad 21

Stanovení *in vitro* a *in vivo* vlastností fúzních proteinů protilátka-enzym exprimovaných rekombinantními nádorovými buňkami

Přípravu linií nádorových buněk exprimujících fúzní proteiny je možné provést tak jak byla popsána v příkladu 4.

Retence (zadržení) fúzního proteinu na povrchu rekombinantních nádorových buněk LoVo exprimujících fúzní protein protilátka-enzym se dá prokázat způsoby popsanými v příkladu 7. Selektivní zabíjení nádorových buněk LoVo

transfekovaných fúzním proteinem protilátka-enzym CPG2 předlékem, který je konvertován enzymem na aktivní lék, lze demonstrovat postupem popsaným v příkladu 8. Založení xenoštěpů nádorů LoVo exprimujících fúzní protein u bezthymových myši lze provést podle příkladu 9. Stanovení enzymové aktivity ve vzorcích nádorových xenoštěpů je možné provést jak je popsáno v příkladu 10.

Stanovení enzymové aktivity ve vzorcích plazmy se provádí postupem popsaným v příkladu 11. Protinádorová aktivita PGP předléku v LoVo nádorech exprimujících fúzní protein protilátka-CPG2 se může hodnotit postupem podle příkladu 12.

Výsledky z těchto experimentů slouží k průkazu toho, že fúzní protein anti-CEA protilátka-enzym CPG2 secernovaný CEA pozitivními nádorovými buňkami se váže na povrchu buněk (prostřednictvím CEA), zatímco tentýž protein exprimovaný CEA negativními nádorovými buňkami nevykazuje žádnou takovou vazbu.

Výsledky také prokazují, že transfekované buňky, které exprimovaly fúzní protein protilátka-CPG2, konvertovaly předlék PGP na mnohem účinnější aktivní lék, zatímco netransfekované buňky LoVo nebyly schopny konvertovat předlék. Tudiž transfekované LoVo buňky jsou více než 100x citlivější k PGP předléku ve smyslu usmrcení buněk než netransfekované buňky LoVo, což ukazuje, že transfekce nádorových buněk genem pro fúzní protein protilátka-enzym může vést k selektivnímu zabití nádorových buněk předlékem.

Podání PGP do LoVo nádorů založených z rekombinantních LoVo buněk nebo směsi rekombinantních LoVo buněk s parentálními LoVo buňkami může vést k významnému protinádorovému působení, jak lze soudit podle zmenšující se velikosti nádorů léčených PGP ve srovnání s nádory, do

kterých se podával samotný pufr, a významně delšího času, který potřebují nádory léčené PGP k dosažení 4násobku své původní velikosti. Naproti tomu podání PGP do LoVo nádorů vytvořených z netransformovaných buněk nevede k žádnému protinádorovému účinku.

Podobné studie lze provádět k demonstraci toho, že gen protilátka-enzym vnesený prostřednictvím vhodného vektoru do nádoru LoVo vyvinutého z netransformovaných parentálních buněk, pokud se užije v kombinaci s PGP předlékem, vede k významné protinádorové aktivitě. Takže netransfekované LoVo buňky se injikují do bezthymových nahých myší (1×10^7 buněk na myš) a jakmile nádor dosáhne velikosti 5 až 7 mm v průměru, injikuje se do nádoru vektor obsahující gen fúzního proteinu protilátka-enzym. Po 1 až 7 dnech, které jsou potřebné k tomu, aby se fúzní protein protilátka-enzym exprimoval a navázal na nádorové LoVo buňky, podá se PGP předlék, jak bylo již popsáno. To vede k významnému protinádorovému účinku ve srovnání s kontrolními myši, které dostaly pouze pufr místo PGP předléku.

Příklad 22

Příprava fúzního proteinu (myší A5B7Fab-CPG2)₂

Myší fúzního proteinu (myší A5B7Fab-CPG2)₂ byl exprimován z buněk COS-7 a CHO v podstatě shodně s tím, jak to bylo popsáno v části D) příkladu 48 mezinárodní patentové přihlášky WO 97/42329 (Zeneca Ltd., publikována 13. listopadu 1997) tak, že se klonovaly geny pro lehký řetězec A5B7 a Fd A5B7 spojené přes svůj C-konec prostřednictvím spojky (G4S)₃ k CPG2 v koexpresním vektoru pEE14.

Myší lehký řetězec A5B7 byl izolován z pAF8 (popsáno v části g) příkladu 5 Mezinárodní patentové přihlášky WO 96/20011, Zeneca Ltd.). Plazmid pAF8 byl štěpen EcoRI a výsledný fragment velikosti 732 b.p. byl izolován elektroforézou na 1% agarózovém gelu. Tento fragment byl klonován do pEE14 (popsal Bebbington v Methods: Companion to Methods in Enzymology, 1991, 2, 136-145) podobně naštěpeného EcoRI a výsledným plazmidem byly transformovány buňky *E. coli* DH5 α . Transformované buňky byly vysety na misky s L agarem a ampicilenem (100 μ g/ml). Klon obsahující plazmid se správnou sekvencí a správnou orientací fragmentu byl ještě potvrzen sekvencováním DNA (sekvence id. č. 57) a tento plazmid byl nazván pEE14/A5B7muVkmuCk. Aminokyselinová sekvence kódované signální sekvence (aminokyselinové zbytky 1 až 22) a myší lehký řetězec (aminokyselinové zbytky 23 až 235) jsou uvedeny jako sekvence id. č. 58.

Myší gen Fd-CPG2 byl připraven z varianty R6 genu CPG2 (popsáno v příkladu 1 této přihlášky) a myší A5B7Fd sekvence z pAF1 (popsáno v části d) příkladu 5 mezinárodní patentové přihlášky WO 96/20011, Zeneca Ltd.). PCR reakce s oligonukleotidy sekvence id. č. 53 a 54 na PpAF1 poskytla fragment velikosti 247 b.p. Ten byl štěpen HindIIIa BamHI a byl klonován do stejně naštěpeného pUC19. Výsledným plazmidem byly transformovány buňky *E. coli* DH5 α . Transformované buňky byly vysety na misky s L agarem a ampicilinem (100 μ g/ml). Klon obsahující plazmid se správnou sekvencí byl nazván pUC19/muCH1/NcoI-AccIII(Fd). Druhá PCR s oligonukleotidy selvence id. č. 55 a 56 na plazmidu pNG/VKss/CPG2/R6-neo (viz příklad 1) vedla ke vzniku fragmentu velikosti 265 b.p., který byl štěpen HindIIIa EcoRI a klonován do stejně naštěpeného pUC19, čímž vznikl plazmid pUC19/muCH1-spojka-CPG2/AccIII-SacII.

Plazmid pUC19/muCH1/NcoI-AccIII(Fd) byl naštěpen HindIII a AccII a výsledný fragment velikosti 258 b.p. byl izolován elektroforézou na 1% agarózovém gelu. Tento fragment byl klonován do plazmidu pUC19/muCH1-spojka-CPG2/AccIII-SacII naštěpeného HindIIIa AccIII čímž vznikl plazmid pUC19/muCH1-spojka-CPG2/NcoI-SacII. Fragment velikosti 956 b.p. byl izolován z pNG/VkSS/CPG2/R6-neo štěpením SacI a EcoRI. Ten byl pak klonován do stejně naštěpeného pUC19/muCH1-spojka-CPG2/NcoI-SacII, čímž vznikl plazmid pUC19/muCH1-spojka-RC/CPG2(R6). Úplný genový konstrukt byl připraven izolací fragmentu HindIII-NcoI velikosti 498 b.p. z pAF1 a klonováním do HindIII a NcoI naštěpeného pUC19/muCH1-spojka-RC/CPG2(R6). Výsledný plazmid byl transformován do buněk *E. coli* DH5 α . Transformované buňky byly vysety na misky s L agarem a ampicilemem (100 μ g/ml). Klon obsahující plazmid se správnou sekvencí a správnou orientací fragmentu byl ještě potvrzen sekvencováním DNA (sekvence id. č. 59) a tento plazmid byl nazván pUC19/muA5B7RC/CPG2(R6). Aminokyselinová sekvence kódované signální sekvence (aminokyselinové zbytky 1 až 19) a myší Fd-spojka-CPG2 (aminokyselinové zbytky 20 až 647) jsou zde ukázány jako sekvence id. č. 60. Alternativně může být sekvence CPG2 popsána v příkladu 1 získána úplnou syntézou genu a konvertována na variantu R6 způsobem popsaným v části d) příkladu 1 této přihlášky. V takovém případě ze baze C v poloze 933 v sekvenci id. č. 59 změni na G, přitom aminokyselinová sekvence id. č. 60 zůstane nezměněna.

Pro expresi ve vektoru úpEE14 se gen nejdříve klonuje do pEE6 (to je derivát pEE6.hCMV- viz Stephens a Cockett, 1989, Nucleic Acids Resrearch 17, 7110, kde místo HindII proti směru transkripce od CMV promotoru bylo změněno na místo BglII). Plazmid pUC19/muA5B7RC/CPG2(R6) byl štěpen HindIII a EcoRI a výsledný fragmnet velikosti 1974 b.p. byl izolován

elektroforézou na 1% agarózovém gelu. Tento fragment byl pak klonován do HindIII a EcoRI naštěpeného pEE6 a transformován do buněk *E. coli* DH5 α , čímž vznikl plazmid pEE6/muA5B7RC/CPG2(R6). Koexprení vektor pEE14 byl připraven tak, že se nejdříve štěpil pEE6/muA5B7RC/CPG2(R6) BglII a BamHI a fragment velikosti 4320 b.p. byl izolován elektroforézou na 1% agarózovém gelu. Tento fragment byl pak klonován do BglII a BamHI naštěpeného pEE14/A5B7muVkmuCk. Výsledný plazmid byl transformován do buněk *E. coli* DH5 α , čímž vznikl plazmid pEE6/muA5B7RC/CPG2(R6). Transformované buňky byly vysety na misky s L agarem a ampicilemem (100 μ g/ml). Klon obsahující plazmid se správnou sekvencí a správnou orientací fragmentu byl ještě potvrzen sekvencováním DNA (sekvence id. č. 59) a tento plazmid byl nazván pEE14/muA5B7-RC/CPG2(R6).

Pro expresi (myší A5B7Fab-CPG2)₂ byl užit plazmid pEE14/muA5B7-RC/CPG2(R6) k transfekci buněk COS-7 a CHO, jak bylo popsáno v příkladu 48 mezinárodní patentové přihlášky WO 97/42329 (Zeneca Ltd., publikována 13. listopadu 1997). Supernatanty z kultivovaných buněk COS-7 a CHO byly testovány na aktivitu jak bylo popsáno v příkladu 1 této přihlášky a jevíly vazebnou aktivitu CEA a enzymovou aktivitu CPG2.

Příklad 23

Farmaceutický přípravek

Následující příklad ilustruje výhodnou farmaceutickou lékovou formu obsahující genový konstrukt podle předkládaného

vynálezu, kterou lze užít k terapii v kombinaci s vhodným předlékem.

Jedná se o sterilní vodný roztok, pro parenterální injekci nebo přímou injekci do nádorové tkáně, obsahující 10^7 až 10^{11} adenovirových částic, které obsahují genový konstrukt popsany v příkladu 1. Po 3 až 7 dnech se podají tři dávky předléku po 1 g ve formě sterilního roztoku v hodinových intervalech. Předlék je vybrán ze skupiny obsahující N-(4-[N,N-bis(2-iodoethyl)amino]-fenoxycarbonyl)-L-glutamovou kyselinu, gama-(3,5-dikarboxy)anilid kyseliny N-(4-[N,N-bis(2-chloroethyl)amino]-fenoxycarbonyl)-L-glutamové a N-(4-[N,N-bis(2-chloroethyl)amino]-fenoxycarbonyl)-L-glutamovou kyselinu nebo jejich farmaceuticky přijatelné soli.

SEZNAM SEKVENCÍ

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 1:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 21 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 1:

GGGAATTCCT CGAGGAGCTC C

21

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 2:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 27 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 2:

CCGGGGAGCT CCTCGAGGAA TTCCCGC

27

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 3:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 18 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 3:

CAGAAGCGCG ACAACGTG

22

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 4:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 39 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 4:

CGAGGCCTTG CCGGTGATCT GGACCTGCAC GTAGGCGAT 39

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 5:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 63 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 5:

GGGGATGATG TTCGAGACCT GGCCGGCCTT GGCGATGGTC CACTGGAAGC 50
GCAGGTTCTT CGC 63

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 6:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 18 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 6:

CTTGCCGGCG CCCAGATC 18

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 7:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 18 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 7:

GTCTCGAACA TCATCCCC

18

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 8:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 18 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 8:

ATCACCGGCA AGGCCTCG

18

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 9:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 1236 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 9:

ATGGATTTTC AAGTGCAGAT TTTCAGCTTC CTGCTAATCA GTGCTTCAGT CATAATGTCC	60
CGCGGGCAGA AGCGCGACAA CGTGCTGTTC CAGGCAGCTA CCGACGAGCA GCCGGCCGTG	120
ATCAAGACGC TGGAGAAGCT GGTCAACATC GAGACCGGCA CCGGTGACGC CGAGGGCATC	180
GCCGCTGCGG GCAACTTCCT CGAGGCCGAG CTCAAGAACC TCGGCTTCAC GGTCACGCGA	240
AGCAAGTCGG CCGGCCTGGT GGTGGGCGAC AACATCGTGG GCAAGATCAA GGGCCGCGGC	300
GGCAAGAACC TGCTGCTGAT GTCGCACATG GACACCGTCT ACCTCAAGGG CATTCTCGCG	360
AAGGCCCCGT TCCGCGTCGA AGGCGACAAG GCCTACGGCC CGGGCATCGC CGACGACAAG	420
GGCGGCAACG CGGTCATCCT GCACACGCTC AAGCTGCTGA AGGAATACGG CGTGCGCGAC	480
TACGGCACCA TCACCGTGCT GTTCAACACC GACGAGGAAA AGGGTTCCTT CGGCTCGCGC	540

GACCTGATCC AGGAAGAAGC CAAGCTGGCC GACTACGTGC TCTCCTTCGA GCCCACCAGC	600
GCAGGCGACG AAAAATCTC GCTGGGCACC TCGGGCATCG CCTACGTGCA GGTCCAGATC	660
ACCGGCAAGG CCTCGCATGC CGGCGCCGCG CCCGAGCTGG GCGTGAACGC GCTGGTCGAG	720
GCTTCCGACC TCGTGCTGCG CACGATGAAC ATCGACGACA AGGCGAAGAA CCTGCGCTTC	780
CAGTGGACCA TCGCCAAGGC CGGCCAGGTC TCGAACATCA TCCCCGCCAG CGCCACGCTG	840
AACGCCGACG TGCCTACGC GCGCAACGAG GACTTCGACG CCGCCATGAA GACGCTGGAA	900
GAGCGCGCGC AGCAGAAGAA GGTGCCCAG GCGGACGTGA AGGTGATCGT CACGCGCGGC	960
CGCCCGGCCT TCAATGCCGG CGAAGGCGGC AAGAAGCTGG TCGACAAGGC GGTGGCCTAC	1020
TACAAGGAAG CCGGCGGCAC GCTGGGCGTG GAAGAGCGCA CCGGCGCGCG CACCGACGCG	1080
GCCTACGCCG CGCTCTCAGG CAAGCCAGTG ATCGAGAGCC TGGGCCTGCC GGGCTTCGGC	1140
TACCACAGCG ACAAGGCCGA GTACGTGGAC ATCAGCGCGA TTCCGCGCCG CCTGTACATG	1200
GCTGCGCGCC TGATCATGGA TCTGGGCGCC GGCAAG	1236

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 10:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 412 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 10:

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

Val Leu Ser Phe Glu Pro Thr Ser Ala Gly Asp Glu Lys Leu Ser Leu
 195 200 205
 Gly Thr Ser Gly Ile Ala Tyr Val Gln Val Gln Ile Thr Gly Lys Ala
 210 215 220
 Ser His Ala Gly Ala Ala Pro Glu Leu Gly Val Asn Ala Leu Val Glu
 225 230 235 240
 Ala Ser Asp Leu Val Leu Arg Thr Met Asn Ile Asp Asp Lys Ala Lys
 245 250 255
 Asn Leu Arg Phe Gln Trp Thr Ile Ala Lys Ala Gly Gln Val Ser Asn
 260 265 270
 Ile Ile Pro Ala Ser Ala Thr Leu Asn Ala Asp Val Arg Tyr Ala Arg
 275 280 285
 Asn Glu Asp Phe Asp Ala Ala Met Lys Thr Leu Glu Glu Arg Ala Gln
 290 295 300
 Gln Lys Lys Leu Pro Glu Ala Asp Val Lys Val Ile Val Thr Arg Gly
 305 310 315 320
 Arg Pro Ala Phe Asn Ala Gly Glu Gly Gly Lys Lys Leu Val Asp Lys
 325 330 335
 Ala Val Ala Tyr Tyr Lys Glu Ala Gly Gly Thr Leu Gly Val Glu Glu
 340 345 350
 Arg Thr Gly Gly Gly Thr Asp Ala Ala Tyr Ala Ala Leu Ser Gly Lys
 355 360 365
 Pro Val Ile Glu Ser Leu Gly Leu Pro Gly Phe Gly Tyr His Ser Asp
 370 375 380
 Lys Ala Glu Tyr Val Asp Ile Ser Ala Ile Pro Arg Arg Leu Tyr Met
 385 390 395 400
 Ala Ala Arg Leu Ile Met Asp Leu Gly Ala Gly Lys
 405 410

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 11:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 21 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 11:

CCACTCTCAC AGTGAGCTCG G

21

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 12:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 55 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 12:

ACCGCTACCG CCACCACCAG AGCCACCACC GCCAACTGTC TTGTCCACCT TGGTG

55

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 13:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 18 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 13:

ACCCCCTCTA GAGTCGAC

18

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 14:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 54 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 14:

TCTGGTGGTG GCGGTAGCGG TGGCGGGGGT TCCCAGAAGC GCGACAACGT GCTG

54

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 15:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 1929 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 15:

ATGGAGTTGT GGCTGAACCTG GATTTTCCTT GTAACACTTT TAAATGGTAT CCAGTGTGAG	60
GTGAAGCTGG TGGAGTCTGG AGGAGGCTTG GTACAGCCTG GGGGTTCTCT GAGACTCTCC	120
TGTGCAACTT CTGGGTTTAC CTTCACTGAT TACTACATGA ACTGGGTCCG CCAGCCTCCA	180
GGAAAGGCAC TTGAGTGGTT GGGTTTTATT GGAAACAAAG CTAATGGTTA CACAACAGAG	240
TACAGTGCAT CTGTGAAGGG TCGGTTCCACC ATCTCCAGAG ATAAATCCCA AAGCATCCTC	300
TATCTTCAAA TGAACACCCT GAGAGCTGAG GACAGTGCCA CTTATTACTG TACAAGAGAT	360
AGGGGGCTAC GGTCTACTT TGAAGTCTGG GGCCAAGGCA CCACTCTCAC AGTGAGCTCG	420
GCTAGACCA AGGGACCATC GGTCTTCCCC CTGGCCCCCT GCTCCAGGAG CACCTCCGAG	480
AGCACAGCCG CCCTGGGCTG CCTGGTCAAG GACTACTTCC CCGAACCGGT GACGGTGTCTG	540
TGGAAGCTCAG GCGCTCTGAC CAGCGGCGTG CACACCTTCC CGGCTGTCTT ACAGTCTCTA	600
GGACTCTACT CCCTCAGCAG CGTCGTGACG GTGCCCTCCA GCAACTTCGG CACCCAGACC	660
TACACCTGCA ACGTAGATCA CAAGCCCAGC AACACCAAGG TGGACAAGAC AGTTGGCGGT	720

GGTGGCTCTG	GTGGTGGCGG	TAGCGGTGGC	GGGGTTCCC	AGAAGCGCGA	CAACGTGCTG	780
TTCCAGGCAG	CTACCGACGA	GCAGCCGGCC	GTGATCAAGA	CGCTGGAGAA	GCTGGTCAAC	840
ATCGAGACCG	GCACCGGTGA	CGCCGAGGGC	ATCGCCGCTG	CGGGCAACTT	CCTCGAGGCC	900
GAGCTCAAGA	ACCTCGGCTT	CACGGTCACG	CGAAGCAAGT	CGGCCGGCCT	GGTGGTGGGC	960
GACAACATCG	TGGGCAAGAT	CAAGGGCCGC	GGCGGCAAGA	ACCTGCTGCT	GATGTGCGAC	1020
ATGGACACCG	TCTACCTCAA	GGGCATTCTC	GCGAAGGCCC	CGTTCCGCGT	CGAAGGCGAC	1080
AAGGCCTACG	GCCCGGGCAT	CGCCGACGAC	AAGGGCGGCA	ACGCGGTCAT	CCTGCACACG	1140
CTCAAGCTGC	TGAAGGAATA	CGGCGTGCGC	GACTACGGCA	CCATCACCCT	GCTGTTCAAC	1200
ACCGACGAGG	AAAAGGGTTC	CTTCGGCTCG	CGCGACCTGA	TCCAGGAAGA	AGCCAAGCTG	1260
GCCGACTACG	TGCTCTCCTT	CGAGCCCACC	AGCGCAGGCG	ACGAAAAACT	CTCGCTGGGC	1320
ACCTCGGGCA	TGCCTACGT	GCAGGTCCAG	ATCACCGGCA	AGGCCTCGCA	TGCCGGCGCC	1380
GCGCCCCGAGC	TGGGCGTGAA	CGCGCTGGTC	GAGGCTTCCG	ACCTCGTGCT	GCGCACGATG	1440
AACATCGACG	ACAAGGCGAA	GAACCTGCGC	TTCCAGTGA	CCATCGCCAA	GGCCGGCCAG	1500
GTCTCGAACA	TCATCCCCGC	CAGCGCCACG	CTGAACGCCG	ACGTGCGCTA	CGCGCGCAAC	1560
GAGGACTTCG	ACGCCGCCAT	GAAGACGCTG	GAAGAGCGCG	CGCAGCAGAA	GAAGCTGCCC	1620
GAGGCCGACG	TGAAGGTGAT	CGTCACGCGC	GGCCGCCCGG	CCTTCAATGC	CGGCGAAGGC	1680
GGCAAGAAGC	TGGTCGACAA	GGCGGTGGCC	TACTACAAGG	AAGCCGGCGG	CACGCTGGGC	1740
GTGGAAGAGC	GCACCGGGG	CGGCACCGAC	GCGGCCTACG	CCGCGCTCTC	AGGCAAGCCA	1800
GTGATCGAGA	GCCTGGGCCT	GCCGGGCTTC	GGCTACCACA	GCGACAAGGC	CGAGTACGTG	1860
GACATCAGCG	CGATTCCGCG	CCGCCTGTAC	ATGGCTGCGC	GCCTGATCAT	GGATCTGGGC	1920
GCCGGCAAG						1929

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 16:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 643 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(C) TYP VLÁKNA: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 16:

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

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 130 135 140
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
 145 150 155 160
 Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 165 170 175
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 180 185 190
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 195 200 205
 Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn
 210 215 220
 Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Gly Gly
 225 230 235 240
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Lys Arg
 245 250 255
 Asp Asn Val Leu Phe Gln Ala Ala Thr Asp Glu Gln Pro Ala Val Ile
 260 265 270
 Lys Thr Leu Glu Lys Leu Val Asn Ile Glu Thr Gly Thr Gly Asp Ala
 275 280 285
 Glu Gly Ile Ala Ala Ala Gly Asn Phe Leu Glu Ala Glu Leu Lys Asn
 290 295 300
 Leu Gly Phe Thr Val Thr Arg Ser Lys Ser Ala Gly Leu Val Val Gly
 305 310 315 320
 Asp Asn Ile Val Gly Lys Ile Lys Gly Arg Gly Gly Lys Asn Leu Leu
 325 330 335
 Leu Met Ser His Met Asp Thr Val Tyr Leu Lys Gly Ile Leu Ala Lys
 340 345 350
 Ala Pro Phe Arg Val Glu Gly Asp Lys Ala Tyr Gly Pro Gly Ile Ala
 355 360 365
 Asp Asp Lys Gly Gly Asn Ala Val Ile Leu His Thr Leu Lys Leu Leu
 370 375 380
 Lys Glu Tyr Gly Val Arg Asp Tyr Gly Thr Ile Thr Val Leu Phe Asn
 385 390 395 400
 Thr Asp Glu Glu Lys Gly Ser Phe Gly Ser Arg Asp Leu Ile Gln Glu
 405 410 415
 Glu Ala Lys Leu Ala Asp Tyr Val Leu Ser Phe Glu Pro Thr Ser Ala
 420 425 430
 Gly Asp Glu Lys Leu Ser Leu Gly Thr Ser Gly Ile Ala Tyr Val Gln
 435 440 445
 Val Gln Ile Thr Gly Lys Ala Ser His Ala Gly Ala Ala Pro Glu Leu
 450 455 460
 Gly Val Asn Ala Leu Val Glu Ala Ser Asp Leu Val Leu Arg Thr Met
 465 470 475 480
 Asn Ile Asp Asp Lys Ala Lys Asn Leu Arg Phe Gln Trp Thr Ile Ala
 485 490 495
 Lys Ala Gly Gln Val Ser Asn Ile Ile Pro Ala Ser Ala Thr Leu Asn

500 Ala Asp Val Arg Tyr Ala Arg Asn Glu Asp Phe Asp Ala Ala Met Lys
 515 520 525
 Thr Leu Glu Glu Arg Ala Gln Gln Lys Lys Leu Pro Glu Ala Asp Val
 530 535 540
 Lys Val Ile Val Thr Arg Gly Arg Pro Ala Phe Asn Ala Gly Glu Gly
 545 550 555 560
 Gly Lys Lys Leu Val Asp Lys Ala Val Ala Tyr Tyr Lys Glu Ala Gly
 565 570 575
 Gly Thr Leu Gly Val Glu Glu Arg Thr Gly Gly Gly Thr Asp Ala Ala
 580 585 590
 Tyr Ala Ala Leu Ser Gly Lys Pro Val Ile Glu Ser Leu Gly Leu Pro
 595 600 605
 Gly Phe Gly Tyr His Ser Asp Lys Ala Glu Tyr Val Asp Ile Ser Ala
 610 615 620
 Ile Pro Arg Arg Leu Tyr Met Ala Ala Arg Leu Ile Met Asp Leu Gly
 625 630 635 640
 Ala Gly Lys

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 17:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 705 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 17:

ATGGATTTTC AAGTGCAGAT TTTCAGCTTC CTGCTAATCA GTGCTTCAGT CATAATGTCC	60
AGAGGACAAA CTGTTCTCTC CCAGTCTCCA GCAATCCTGT CTGCATCTCC AGGGGAGAAG	120
GTCACAATGA CTTGCAGGGC CAGCTCAAGT GTAACCTACA TTCACTGGTA CCAGCAGAAG	180
CCAGGTTCTT CCCCCAATC CTGGATTTAT GCCACATCCA ACCTGGCTTC TGGAGTCCCT	240
GCTCGCTTCA GTGGCAGTGG GTCTGGGACC TCTTACTCTC TCACAATCAG CAGAGTGGAG	300
GCTGAAGATG CTGCCACTTA TTACTGCCAA CATTGGAGTA GTAAACCACC GACGTTCCGGT	360
GGAGGCACCA AGCTCGAGAT CAAACGGACT GTGGCTGCAC CATCTGTCTT CATCTTCCCG	420
CCATCTGATG AGCAGTTGAA ATCTGGAAT GCCTCTGTTG TGTGCCTGCT GAATAACTTC	480
TATCCCAGAG AGGCCAAAGT ACAGTGGAAG GTGGATAACG CCCTCCAATC GGGTAACTCC	540
CAGGAGAGTG TCACAGAGCA GGACAGCAAG GACAGCACCT ACAGCCTCAG CAGCACCCTG	600
ACGCTGAGCA AAGCAGACTA CGAGAAACAC AAAGTCTACG CCTGCGAAGT CACCCATCAG	660
GGCTGAGTT CGCCCGTCAC AAAGAGCTTC AACAGGGGAG AGTGT	705

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 18:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 235 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 18:

```

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1           5           10           15
Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Thr Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
          20           25           30
Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
          35           40           45
Ser Ser Val Thr Tyr Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
          50           55           60
Pro Lys Ser Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65           70           75           80
Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
          85           90           95
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Trp
          100          105          110
Ser Ser Lys Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          115          120          125
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
          130          135          140
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
145          150          155          160
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
          165          170          175
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
          180          185          190
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
          195          200          205
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
          210          215          220
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225          230          235

```

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 19:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 39 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 19:

AAGCTTGAAT TCGCCGCCAC TATGGATTTT CAAGTGCAG

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 20:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 44 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 20:

TTAATTGGAT CCGAGCTCCT ATTAACACTC TCCCTGTTG AAGC

44

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 21:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 50 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 21:

AAGCTTCCGG ATCCCTGCAG CCATGGAGTT GTGGCTGAAC TGGATTTTCC

50

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 22:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 38 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 22:

AAGCTTAGTC TAGATTATCA CTTGCCGGCG CCCAGATC

38

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 23:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 46 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 23:

CGGGGGATCC AGATCTGAGC TCCTGTAGAC GTCGACATTA ATTCCG

46

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 24:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 30 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina

- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární
 (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 (xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 24:

GGAAAATCCA GTTCAGCCAC AACTCCATGG

30

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 25:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 (A) DÉLKA: 1926 párů bází
 (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární
 (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 (xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 25:

ATGAAGTTGT GGCTGAAC TG GATTTTCCTT GTAACACTTT TAAATGGAAT TCAGTGTGAG	60
GTGCAGCTGC AGCAGTCTGG GGCAGAGCTT GTGAGGTCAG GGGCCTCAGT CAAGTTGTCC	120
TGCACAGCTT CTGGCTTCAA CATTAAAGAC AACTATATGC ACTGGGTGAA GCAGAGGCCT	180
GAACAGGGCC TGGAGTGGAT TG CATGGATT GATCCTGAGA ATGGTGATAC TGAATATGCC	240
CCGAAGTTCC GGGGCAAGGC CACTTTGACT GCAGACTCAT CCTCCAACAC AGCCTACCTG	300
CACCTCAGCA GCCTGACATC TGAGGACACT GCCGTCTATT ACTGTCATGT CCTGATCTAT	360
GCTGGTTATT TGGCTATGGA CTACTGGGGT CAAGGAACCT CAGTCGCCGT GAGCTCGGCT	420
AGCACCAAGG GACCATCGGT CTTCCCCCTG GCCCCCTGCT CCAGGAGCAC CTCCGAGAGC	480
ACAGCCGCCC TGGGCTGCCT GGTC AAGGAC TACTTCCCCG AACCGGTGAC GGTGTCGTGG	540
AACTCAGGCG CTCTGACCAG CGGCGTGAC ACCTTCCCCG CTGTCTACA GTCCTCAGGA	600
CTCTACTCCC TCAGCAGCGT CGTGACGGTG CCCTCCAGCA ACTTCGGCAC CCAGACCTAC	660
ACCTGCAACG TAGATCACA GCCCAGCAAC ACCAAGGTGG ACAAGACAGT TGGCGGTGGT	720
GGCTCTGGTG GTGGCGGTAG CGGTGGCGGG GGTCCCAGA AGCGCGACAA CGTGCTGTTC	780
CAGGCAGCTA CCGACGAGCA GCCGGCCGTG ATCAAGACGC TGGAGAAGCT GGTCAACATC	840
GAGACCGGCA CCGGTGACGC CGAGGGCATC GCCGCTGCGG GCAACTTCCT CGAGGCCGAG	900
CTCAAGAACC TCGGCTTCAC GGTACGCGA AGCAAGTCGG CCGGCCTGGT GGTGGGCGAC	960
AACATCGTGG GCAAGATCAA GGGCCGCGGC GGCAAGAACC TGCTGCTGAT GTCGCACATG	1020
GACACCGTCT ACCTCAAGGG CATTCTCGCG AAGGCCCGGT TCCGCGTCGA AGGCGACAAG	1080
GCCTACGGCC CGGGCATCGC CGACGACAAG GCGGCAACG CGGTCATCCT GCACACGCTC	1140
AAGCTGCTGA AGGAATACGG CGTGCGCGAC TACGGCACCA TCACCGTGCT GTTCAACACC	1200
GACGAGGAAA AGGGTTCCTT CGGCTCGCGC GACCTGATCC AGGAAGAAGC CAAGCTGGCC	1260
GACTACGTGC TCTCCTTCGA GCCCACCAGC GCAGGCGACG AAAA ACTCTC GCTGGGCACC	1320
TGGGCGATCG CCTACGTGCA GGTCCAGATC ACCGGCAAGG CCTCGCATGC CGGCGCCGCG	1380
CCCGAGCTGG GCGTGAACGC GCTGGTGGAG GCTTCCGACC TCGTGCTGCG CACGATGAAC	1440
ATCGACGACA AGGCGAAGAA CCTGCGCTTC CAGTGGACCA TCGCCAAGGC CGGCCAGGTC	1500
TGGAACATCA TCCC CGCCAG CGCCACGCTG AACGCCGACG TGCGCTACGC GCGCAACGAG	1560
GACTTCGACG CCGCCATGAA GACGCTGGAA GAGCGCGCGC AGCAGAAGAA GCTGCCCGAG	1620
GCCGACGTGA AGGTGATCGT CACGCGCGGC CGCCCGGCT TCAATGCCGG CGAAGGCGGC	1680

AAGAAGCTGG TCGACAAGGC GGTGGCCTAC TACAAGGAAG CCGGCGGCAC GCTGGGCGTG 1740
 GAAGAGCGCA CCGGCGGCGG CACCGACGCG GCCTACGCCG CGCTCTCAGG CAAGCCAGTG 1800
 ATCGAGAGCC TGGGCTTGCC GGGCTTCGGC TACCACAGCG ACAAGGCCGA GTACGTGGAC 1860
 ATCAGCGCGA TTCCGCGCCG CCTGTACATG GCTGCGCGCC TGATCATGGA TCTGGGCGCC 1920
 GGCAAG 1926

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 26:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 642 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(C) TYP VLÁKNA: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 26:

Met Lys Leu Trp Leu Asn Trp Ile Phe Leu Val Thr Leu Leu Asn Gly
 1 5 10 15
 Ile Gln Cys Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg
 20 25 30
 Ser Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile
 35 40 45
 Lys Asp Asn Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Ala Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala
 65 70 75 80
 Pro Lys Phe Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Ser Ser Ser Asn
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Leu His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys His Val Leu Ile Tyr Ala Gly Tyr Leu Ala Met Asp Tyr
 115 120 125
 Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Ala Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 130 135 140
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
 145 150 155 160
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 165 170 175
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 180 185 190
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 195 200 205
 Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val
 210 215 220
 Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Gly Gly Gly
 225 230 235 240
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Lys Arg Asp
 245 250 255

Asn Val Leu Phe Gln Ala Ala Thr Asp Glu Gln Pro Ala Val Ile Lys
 260 265 270
 Thr Leu Glu Lys Leu Val Asn Ile Glu Thr Gly Thr Gly Asp Ala Glu
 275 280 285
 Gly Ile Ala Ala Ala Gly Asn Phe Leu Glu Ala Glu Leu Lys Asn Leu
 290 295 300
 Gly Phe Thr Val Thr Arg Ser Lys Ser Ala Gly Leu Val Val Gly Asp
 305 310 315 320
 Asn Ile Val Gly Lys Ile Lys Gly Arg Gly Gly Lys Asn Leu Leu Leu
 325 330 335
 Met Ser His Met Asp Thr Val Tyr Leu Lys Gly Ile Leu Ala Lys Ala
 340 345 350
 Pro Phe Arg Val Glu Gly Asp Lys Ala Tyr Gly Pro Gly Ile Ala Asp
 355 360 365
 Asp Lys Gly Gly Asn Ala Val Ile Leu His Thr Leu Lys Leu Leu Lys
 370 375 380
 Glu Tyr Gly Val Arg Asp Tyr Gly Thr Ile Thr Val Leu Phe Asn Thr
 385 390 395 400
 Asp Glu Glu Lys Gly Ser Phe Gly Ser Arg Asp Leu Ile Gln Glu Glu
 405 410 415
 Ala Lys Leu Ala Asp Tyr Val Leu Ser Phe Glu Pro Thr Ser Ala Gly
 420 425 430
 Asp Glu Lys Leu Ser Leu Gly Thr Ser Gly Ile Ala Tyr Val Gln Val
 435 440 445
 Gln Ile Thr Gly Lys Ala Ser His Ala Gly Ala Ala Pro Glu Leu Gly
 450 455 460
 Val Asn Ala Leu Val Glu Ala Ser Asp Leu Val Leu Arg Thr Met Asn
 465 470 475 480
 Ile Asp Asp Lys Ala Lys Asn Leu Arg Phe Gln Trp Thr Ile Ala Lys
 485 490 495
 Ala Gly Gln Val Ser Asn Ile Ile Pro Ala Ser Ala Thr Leu Asn Ala
 500 505 510
 Asp Val Arg Tyr Ala Arg Asn Glu Asp Phe Asp Ala Ala Met Lys Thr
 515 520 525
 Leu Glu Glu Arg Ala Gln Gln Lys Lys Leu Pro Glu Ala Asp Val Lys
 530 535 540
 Val Ile Val Thr Arg Gly Arg Pro Ala Phe Asn Ala Gly Glu Gly Gly
 545 550 555 560
 Lys Lys Leu Val Asp Lys Ala Val Ala Tyr Tyr Lys Glu Ala Gly Gly
 565 570 575
 Thr Leu Gly Val Glu Glu Arg Thr Gly Gly Gly Thr Asp Ala Ala Tyr
 580 585 590
 Ala Ala Leu Ser Gly Lys Pro Val Ile Glu Ser Leu Gly Leu Pro Gly
 595 600 605
 Phe Gly Tyr His Ser Asp Lys Ala Glu Tyr Val Asp Ile Ser Ala Ile
 610 615 620
 Pro Arg Arg Leu Tyr Met Ala Ala Arg Leu Ile Met Asp Leu Gly Ala

625

630

635

640

Gly Lys

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 27:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 39 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 27:

AAGCTTGGA TTCAGTGTCA GGTCCAAC TG CAGCAGCCT

39

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 28:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 54 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 28:

GCTACCGCCA CCTCCGGAGC CACCACCGCC CCGTTTGATC TCGAGCTTGG TGCC

54

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 29:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 58 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 29:

TCCGGAGGTG GCGGTAGCGG TGGCGGGGGT TCCAGAAGC GCGACAACGT GCTGTTCC

58

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 30:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 24 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 30:

CCTCGAGGAA TTCTTCACT TGCC

24

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 31:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 2019 párů bází
 (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 31:

ATGAAGTTGT GGCTGAACTG GATTTTCCTT GTAACACTTT TAAATGGAAT TCAGTGTGAG	60
GTCCAAGTGC AGCAGCCTGG GGCTGAACTG GTGAAGCCTG GGGCTTCAGT GCAGCTGTCC	120
TGCAAGGCTT CTGGCTACAC CTTCAACCGG TACTGGATAC ACTGGGTGAA GCAGAGGCCT	180
GGACAAGGCC TTGAGTGGAT TGGAGAGGTT AATCCTAGTA CCGGTCGTTT TGAAGTCAAT	240
GAGAAGTTCA AGAACAAGGC CAACTGACT GTAGACAAAT CCTCCACCAC AGCCTACATG	300
CAACTCAGCA GCCTGACATC TGAGGACTCT GCGGTCTATT ACTGTGCAAG AGAGAGGGCC	360
TATGGTTACG ACGATGCTAT GGACTACTGG GGCCAAGGGA CCACGGTCAC CGTCTCCTCA	420
GGTGGCGGTG GCTCGGGCGG TGGTGGGTCG GGTGGCGGCG GATCTGACAT TGAGCTCTCA	480
CAGTCTCCAT CCTCCCTGGC TGTGTCAGCA GGAGAGAAGG TCACCATGAG CTGCAAAATCC	540
AGTCAGAGTC TCCTCAACAG TAGAACCCGA AAGAACTACT TGGCTTGATA CCAGCAGAGA	600
CCAGGGCAGT CTCCTAACT GCTGATCTAT TGGGCATCCA CTAGGACATC TGGGGTCCCT	660
GATCGCTTCA CAGGCAGTGG ATCTGGGACA GATTTCACTC TCACCATCAG CAGTGTGCAG	720
GCTGAAGACC TGGCAATTTA TTACTGCAAG CAATCTTATA CTCTCGGAC GTTCGGTGGA	780
GGCACCAAGC TCGAGATCAA ACGGGGCGGT GGTGGCTCCG GAGGTGGCGG TAGCGGTGGC	840
GGGGGTCCC AGAAGCGCGA CAACGTGCTG TTCCAGGCAG CTACCGACGA GCAGCCGGCC	900
GTGATCAAGA CGCTGGAGAA GCTGGTCAAC ATCGAGACCG GCACCGGTGA CGCCGAGGGC	960
ATCGCCGCTG CGGGCAACTT CCTCGAGGCC GAGCTCAAGA ACCTCGGCTT CACGGTCACG	1020
CGAAGCAAGT CGGCCGGCCT GGTGGTGGGC GACAACATCG TGGGCAAGAT CAAGGGCCGC	1080
GGCGGCAAGA ACCTGCTGCT GATGTCGCAC ATGGACACCG TCTACCTCAA GGGCATTCTC	1140
GCGAAGGCCC CGTTCCGCGT CGAAGGCGAC AAGGCCTACG GCCCGGGCAT CGCCGACGAC	1200
AAGGGCGGCA ACGCGGTCAT CCTGCACACG CTCAGCTGC TGAAGGAATA CGGCGTGC GC	1260
GACTACGGCA CCATCACCGT GCTGTTCAAC ACCGACGAGG AAAAGGGTTC CTTCGGCTCG	1320
CGCGACCTGA TCCAGGAAGA AGCCAAGCTG GCCGACTACG TGCTCTCCTT CGAGCCCACC	1380
AGCGCAGGCG ACGAAAACT CTCGCTGGGC ACCTCGGGCA TCGCTACGT GCAGGTCCAG	1440
ATCACCGGCA AGGCTCGCA TGCCGGCGCC GCGCCGAGC TGGGCGTGAA CGCGCTGGTC	1500
GAGGTTCCG ACCTCGTGCT GCGCACGATG AACATCGACG ACAAGGCGAA GAACCTGCGC	1560
TTCCAGTGGA CCATCGCCAA GGCCGGCCAG GTCTCGAACA TCATCCCCGC CAGCGCCACG	1620
CTGAACGCCG ACGTGCCTA CGCGCGCAAC GAGGACTTCG ACGCCGCCAT GAAGACGCTG	1680
GAAGAGCGCG CGCAGCAGAA GAAGCTGCCC GAGGCCGACG TGAAGGTGAT CGTCACGCGC	1740
GGCCGCCCGG CTTTCAATGC CGGCGAAGGC GGCAAGAAGC TGGTCGACAA GGCGGTGGCC	1800
TACTACAAGG AAGCCGGCGG CACGCTGGGC GTGGAAGAGC GCACCGGCGG CGGCACCGAC	1860
GCGGCCTACG CCGCGCTCTC AGGCAAGCCA GTGATCGAGA GCCTGGGCTT GCCGGGCTTC	1920
GGTACCACA GCGACAAGGC CGAGTACGTG GACATCAGCG CGATTCCGCG CCGCCTGTAC	1980
ATGGCTGCGC GCCTGATCAT GGATCTGGGC GCCGGCAAG	2019

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 32:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 673 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 32:

Met Lys Leu Trp Leu Asn Trp Ile Phe Leu Val Thr Leu Leu Asn Gly
 1 5 10 15
 Ile Gln Cys Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Gln Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Gly Tyr Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Glu Val Asn Pro Ser Thr Gly Arg Ser Asp Tyr Asn
 65 70 75 80
 Glu Lys Phe Lys Asn Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Arg Ala Tyr Gly Tyr Asp Asp Ala Met Asp
 115 120 125
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
 130 135 140
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Ser
 145 150 155 160
 Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Met
 165 170 175
 Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn
 180 185 190
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu
 195 200 205
 Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Thr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr
 210 215 220
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln
 225 230 235 240
 Ala Glu Asp Leu Ala Ile Tyr Tyr Cys Lys Gln Ser Tyr Thr Leu Arg
 245 250 255
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly
 260 265 270
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Lys Arg Asp Asn
 275 280 285
 Val Leu Phe Gln Ala Ala Thr Asp Glu Gln Pro Ala Val Ile Lys Thr
 290 295 300
 Leu Glu Lys Leu Val Asn Ile Glu Thr Gly Thr Gly Asp Ala Glu Gly
 305 310 315 320

Ile Ala Ala Ala Gly Asn Phe Leu Glu Ala Glu Leu Lys Asn Leu Gly
 325 330 335
 Phe Thr Val Thr Arg Ser Lys Ser Ala Gly Leu Val Val Gly Asp Asn
 340 345 350
 Ile Val Gly Lys Ile Lys Gly Arg Gly Gly Lys Asn Leu Leu Leu Met
 355 360 365
 Ser His Met Asp Thr Val Tyr Leu Lys Gly Ile Leu Ala Lys Ala Pro
 370 375 380
 Phe Arg Val Glu Gly Asp Lys Ala Tyr Gly Pro Gly Ile Ala Asp Asp
 385 390 395 400
 Lys Gly Gly Asn Ala Val Ile Leu His Thr Leu Lys Leu Leu Lys Glu
 405 410 415
 Tyr Gly Val Arg Asp Tyr Gly Thr Ile Thr Val Leu Phe Asn Thr Asp
 420 425 430
 Glu Glu Lys Gly Ser Phe Gly Ser Arg Asp Leu Ile Gln Glu Glu Ala
 435 440 445
 Lys Leu Ala Asp Tyr Val Leu Ser Phe Glu Pro Thr Ser Ala Gly Asp
 450 455 460
 Glu Lys Leu Ser Leu Gly Thr Ser Gly Ile Ala Tyr Val Gln Val Gln
 465 470 475 480
 Ile Thr Gly Lys Ala Ser His Ala Gly Ala Ala Pro Glu Leu Gly Val
 485 490 495
 Asn Ala Leu Val Glu Ala Ser Asp Leu Val Leu Arg Thr Met Asn Ile
 500 505 510
 Asp Asp Lys Ala Lys Asn Leu Arg Phe Gln Trp Thr Ile Ala Lys Ala
 515 520 525
 Gly Gln Val Ser Asn Ile Ile Pro Ala Ser Ala Thr Leu Asn Ala Asp
 530 535 540
 Val Arg Tyr Ala Arg Asn Glu Asp Phe Asp Ala Ala Met Lys Thr Leu
 545 550 555 560
 Glu Glu Arg Ala Gln Gln Lys Lys Leu Pro Glu Ala Asp Val Lys Val
 565 570 575
 Ile Val Thr Arg Gly Arg Pro Ala Phe Asn Ala Gly Glu Gly Gly Lys
 580 585 590
 Lys Leu Val Asp Lys Ala Val Ala Tyr Tyr Lys Glu Ala Gly Gly Thr
 595 600 605
 Leu Gly Val Glu Glu Arg Thr Gly Gly Gly Thr Asp Ala Ala Tyr Ala
 610 615 620
 Ala Leu Ser Gly Lys Pro Val Ile Glu Ser Leu Gly Leu Pro Gly Phe
 625 630 635 640
 Gly Tyr His Ser Asp Lys Ala Glu Tyr Val Asp Ile Ser Ala Ile Pro
 645 650 655
 Arg Arg Leu Tyr Met Ala Ala Arg Leu Ile Met Asp Leu Gly Ala Gly
 660 665 670
 Lys

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 33:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 37 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 33:

GGGCGCCGGC AAGTGATAAA ATTCCTCGAG GAGCTCC

37

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 34:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 19 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 34:

CGCCACCTCT GACTTGAGC

19

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 35:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 37 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 35:

GGAGCTCCTC GAGGAATTTT ATCACTTGCC GGC GCCC

37

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 36:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 19 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 36:

GCTGAACGCC GACGTGCC

19

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 37:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 2025 párů bazí

- (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární
 (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 (xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 37:

ATGAAGTTGT GGCTGAACTG GATTTTCCTT GTAACACTTT TAAATGGAAT TCAGTGTGAG	60
GTCCAACTGC AGCAGCCTGG GGCTGAACTG GTGAAGCCTG GGGCTTCAGT GCAGCTGTCC	120
TGCAAGGCTT CTGGCTACAC CTTACCCGGC TACTGGATAC ACTGGGTGAA GCAGAGGCCT	180
GGACAAGGCC TTGAGTGGAT TGGAGAGGTT AATCCTAGTA CCGGTCGTTC TGAATACAAT	240
GAGAAGTTCA AGAACAAGGC CAACTGACT GTAGACAAAT CCTCCACCAC AGCCTACATG	300
CAACTCAGCA GCCTGACATC TGAGGACTCT GCGGTCTATT ACTGTGCAAG AGAGAGGGCC	360
TATGGTTACG ACGATGCTAT GGACTACTGG GGCCAAGGGA CCACGGTCAC CGTCTCCTCA	420
GGTGGCGGTG GCTCGGGCGG TGGTGGGTCG GGTGGCGGCG GATCTGACAT TGAGCTCTCA	480
CAGTCTCCAT CCTCCCTGGC TGTGTCAGCA GGAGAGAAGG TCACCATGAG CTGCAAATCC	540
AGTCAGAGTC TCCTCAACAG TAGAACCCGA AAGAACTACT TGGCTTGGTA CCAGCAGAGA	600
CCAGGGCAGT CTCCTAAACT GCTGATCTAT TGGGCATCCA CTAGGACATC TGGGGTCCCT	660
GATCGCTTCA CAGGCAGTGG ATCTGGGACA GATTTCACTC TCACCATCAG CAGTGTGCAG	720
GCTGAAGACC TGGCAATTTA TTAAGTCAAG CAATCTTATA CTCTTCGGAC GTTCGGTGGA	780
GGCACCAAGC TCGAGATCAA ACGGGGCGGT GGTGGCTCCG GAGGTGGCGG TAGCGGTGGC	840
GGGGGTTCCC AGAAGCGCGA CAACGTGCTG TTCCAGGCAG CTACCGACGA GCAGCCGGCC	900
GTGATCAAGA CGCTGGAGAA GCTGGTCAAC ATCGAGACCG GCACCGGTGA CGCCGAGGGC	960
ATCGCCGCTG CGGGCAACTT CCTCGAGGCC GAGCTCAAGA ACCTCGGCTT CACGGTCACG	1020
CGAAGCAAGT CGGCCGGCCT GGTGGTGGGC GACAACATCG TGGGCAAGAT CAAGGGCCGC	1080
GGCGGCAAGA ACCTGCTGCT GATGTCGCAC ATGGACACCG TCTACCTCAA GGGCATTCTC	1140
GCGAAGGCCC CGTTCGCGCT CGAAGGCGAC AAGGCCTACG GCCCGGGCAT CGCCGACGAC	1200
AAGGGCGGCA ACGCGGTCAT CCTGCACACG CTCAAGCTGC TGAAGGAATA CGGCGTGCGC	1260
GACTACGGCA CCATCACCGT GCTGTTCAAC ACCGACGAGG AAAAGGGTTC CTTGGGCTCG	1320
CGCGACCTGA TCCAGGAAGA AGCCAAGCTG GCCGACTACG TGCTCTCCTT CGAGCCCACC	1380
AGCGCAGGCG ACGAAAACT CTCGCTGGGC ACCTCGGGCA TCGCCTACGT GCAGGTCCAG	1440
ATCACCGGCA AGGCCTCGCA TGCCGGCGCC GCGCCGAGC TGGGCGTGAA CGCGCTGGTC	1500
GAGGCTTCCG ACCTCGTGCT GCGCACGATG AACATCGACG ACAAGGCGAA GAACCTGCGC	1560
TTCCAGTGGA CCATCGCCAA GGCCGGCCAG GTCTCGAACA TCATCCCCGC CAGCGCCACG	1620
CTGAACGCCG ACGTGCCTA CGCGCGCAAC GAGGACTTCG ACGCCGCCAT GAAGACGCTG	1680
GAAGAGCGCG CGCAGCAGAA GAAGCTGCCC GAGGCCGACG TGAAGGTGAT CGTACGCGC	1740
GGCCGCCCGG CCTTCAATGC CGGCGAAGGC GGCAAGAAGC TGGTCGACAA GGCGGTGGCC	1800
TACTACAAGG AAGCCGGCGG CACGCTGGGC GTGGAAGAGC GCACCGGCGG CGGCACCGAC	1860
GCGGCCTACG CCGCGCTCTC AGGCAAGCCA GTGATCGAGA GCCTGGGCCT GCCGGGCTTC	1920
GGCTACCACA GCGACAAGGC CGAGTACGTG GACATCAGCG CGATTCCGCG CCGCCTGTAC	1980
ATGGCTGCGC GCCTGATCAT GGATCTGGGC GCCGCAAGT GATAA	2025

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 38:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 (A) DÉLKA: 288 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární
 (ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 38:

```

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Ala
1           5           10           15
Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu
20           25           30
Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Gln Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly
35           40           45
Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly
50           55           60
Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu Val Asn Pro Ser Thr Gly Arg Ser
65           70           75           80
Asp Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asn Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys
85           90           95
Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp
100          105          110
Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Arg Ala Tyr Gly Tyr Asp Asp
115          120          125
Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly
130          135          140
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile
145          150          155          160
Glu Leu Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly Glu Lys
165          170          175
Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr
180          185          190
Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro
195          200          205
Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Thr Ser Gly Val Pro Asp
210          215          220
Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
225          230          235          240
Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Ile Tyr Tyr Cys Lys Gln Ser Tyr
245          250          255
Thr Leu Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Glu
260          265          270
Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn His His His His His His
275          280          285

```

(2) INFORMACE PRO SEKVENCII S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 39:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 36 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 39:

GCCCAACCAG CCATGGCCGA GGTGCAGCTG CAGCAG

36

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 40:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 54 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 40:

CGACCCACCA CCGCCCGAGC CACCGCCACC CGAGCTCAGC GCGACTGAGG TTCC

54

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 41:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 54 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 41:

TCGGGCGGTG GTGGGTCGGG TGGCGGCGGA TCTCAGATTG TGCTCACCCA GTCT

54

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 42:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 24 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 24:

CCGTTTGATC TCGAGCTTGG TCCC

24

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 43:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 843 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 43:

ATGAAATAAC TATTGCCTAC GGCAGCCGCT GGATTGTTAT TACTCGCTGC CCAACCAGCC

60

ATGCCCGAGG TGCAGCTGCA GCAGTCTGGG GCAGAGCTTG TGAGGTCAGG GGCCTCAGTC	120
AAGTTGTCTT GCACAGCTTC TGGCTTCAAC ATTAAAGACA ACTATATGCA CTGGGTGAAG	180
CAGAGGCGCTG AACAGGGCCT GGAGTGGATT GCATGGATTG ATCCTGAGAA TGGTGATACT	240
GAATATGCCC CGAAGTTCCG GGGCAAGGCC ACTTTGACTG CAGACTCATC CTCCAACACA	300
GCCTACCTGC ACCTCAGCAG CCTGACATCT GAGGACACTG CCGTCTATTA CTGTCATGTC	360
CTGATCTATG CTGGTTATTT GGCTATGGAC TACTGGGGTC AAGGAACCTC AGTCGCCGTC	420
AGCTCGGGTG GCGGTGGCTC GGGCGGTGGT GGGTCGGGTG GCGGCGGATC TCAGATTGTG	480
CTCACCCAGT CTCCAGCAAT CATGTCTGCA TCTCCAGGGG AGAAGGTCAC CATAACCTGC	540
AGTGCCAGCT CAAGTGTAACTTACATGCAC TGGTTCAGC AGAAGCCAGG CACTTCTCCC	600
AAACTCTGGA TTTATAGCAC ATCCAACCTG GCTTCTGGAG TCCCTGCTCG CTTCACTGGC	660
AGTGGATCTG GGACCTCTTA CTCTCTCACA ATCAGCCGAA TGGAGGCTGA AGATGCTGCC	720
ACTTATTACT GCCAGCAAAG GAGTACTTAC CCGCTCACGT TCGGTGCTGG GACCAAGCTC	780
GAGATCAAAC GGGAACAAAA ACTCATCTCA GAAGAAGATC TGAATCACCA CCATCACCAC	840
CAT	843

(2) INFORMACE PRO SEKVENCII S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 44:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 281 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(C) TYP VLÁKNA: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 44:

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

180	185	190
Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser	Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser	
195	200	205
Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly		
210	215	220
Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala		
225	230	235
Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala		
245	250	255
Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu		
260	265	270
Asp Leu Asn His His His His His His		
275	280	

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 45:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 72 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 45:

TCGAGATCAA ACGGGAACAA AAACATCATCT CAGAAGAAGA TCTGAATCAC CACCATCACC 60
 ACCATTAATG AG 72

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 46:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 72 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 46:

AATTCTCATT AATGGTGGTG ATGGTGGTGA TTCAGATCTT CTTCTGAGAT GAGTTTTTGT 60
 TCCCGTTTGA TC 72

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 47:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 846 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 47:

ATGAAATACC TATTGCCTAC GGCAGCCGCT GGATTGTTAT TACTCGCTGC CCAACCAGCC	60
ATGGCCCAGG TCCAAGTCA GCAGCCTGGG GCTGAAGTGG TGAAGCCTGG GGCTTCAGTG	120
CAGCTGTCCT GCAAGGCTTC TGGCTACACC TTCACCGGCT ACTGGATACA CTGGGTGAAG	180
CAGAGGCCTG GACAAGGCCT TGAGTGGATT GGAGAGGTTA ATCCTAGTAC CGGTCGTTCT	240
GACTACAATG AGAAGTTCAA GAACAAGGCC AACTGACTG TAGACAAATC CTCCACCACA	300
GCCTACATGC AACTCAGCAG CCTGACATCT GAGGACTCTG CGGTCTATTA CTGTGCAAGA	360
GAGAGGGCCT ATGGTTACGA CGATGCTATG GACTACTGGG GCCAAGGGAC CACGGTCACC	420
GTCTCCTCAG GTGGCGGTGG CTCGGGCGGT GGTGGGTCGG GTGGCGGCGG ATCTGACATT	480
GAGCTCTCAC AGTCTCCATC CTCCCTGGCT GTGTCAGCAG GAGAGAAGGT CACCATGAGC	540
TGCAAATCCA GTCAGAGTCT CCTCAACAGT AGAACCCGAA AGAACTACTT GGCTTGGTAC	600
CAGCAGAGAC CAGGGCAGTC TCCTAACTG CTGATCTATT GGGCATCCAC TAGGACATCT	660
GGGGTCCCTG ATCGCTTCAC AGGCAGTGGG TCTGGGACAG ATTTCACTCT CACCATCAGC	720
AGTGTGCAGG CTGAAGACCT GGCAATTTAT TACTGCAAGC AATCTTATAC TCTTCGGACG	780
TTGGTGGAG GCACCAAGCT CGAGATCAAA CGGGAACAAA AACTCATCTC AGAAGAAGAT	840
CTGAATCACC ACCATCACCA CCAT	864

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 48:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 34 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 48:

AAGCTTGGAA TTCAGTGTGA GGTGCAGCTG CAGC

34

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 49:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 45 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 49:

CGCCACCTCC GGAGCCACCA CCGCCCCGTT TGATCTCGAG CTTGG

45

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 50:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 1998 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 50:

ATGAAGTTGT	GGCTGAACTG	GATTTTCCTT	GTAACACTTT	TAAATGGAAT	TCAGTGTGAG	60
GTGCAGCTGC	AGCAGTCTGG	GGCAGAGCTT	GTGAGGTCAG	GGGCCTCAGT	CAAGTTGTCC	120
TGCACAGCTT	CTGGCTTCAA	CATTAAAGAC	AACTATATGC	ACTGGGTGAA	GCAGAGGCCT	180
GAACAGGGCC	TGGAGTGGAT	TGCATGGATT	GATCCTGAGA	ATGGTGATAC	TGAATATGCC	240
CCGAAGTTCC	GGGGCAAGGC	CACTTTGACT	GCAGACTCAT	CCTCCAACAC	AGCCTACCTG	300
CACCTCAGCA	GCCTGACATC	TGAGGACACT	GCCGTCTATT	ACTGTCATGT	CCTGATCTAT	360
GCTGGTTATT	TGGCTATGGA	CTACTGGGGT	CAAGGAACCT	CAGTCGCCGT	GAGCTCGGGT	420
GGCGGTGGCT	CGGGCGGTGG	TGGGTCGGGT	GGCGGCGGAT	CTCAGATTGT	GCTCACCCAG	480
TCTCCAGCAA	TCATGTCTGC	ATCTCCAGGG	GAGAAGGTCA	CCATAACCTG	CAGTGCCAGC	540
TCAAGTGTA	CTTACATGCA	CTGGTTCAG	CAGAAGCCAG	GCACTTCTCC	CAAACCTG	600
ATTTATAGCA	CATCCAACCT	GGCTTCTGGA	GTCCCTGCTC	GCTTCAGTGG	CAGTGGATCT	660
GGGACCTCTT	ACTCTCTCAC	AATCAGCCGA	ATGGAGGCTG	AAGATGCTGC	CACCTATTAC	720
TGCCAGCAAA	GGAGTACTTA	CCCGCTCACG	TTCGGTGCTG	GGACCAAGCT	CGAGATCAAA	780
CGGGGCGGTG	GTGGTCCGG	AGGTGGCGGT	AGCGGTGGCG	GGGGTCCCA	GAAGCGCGAC	840
AACGTGCTGT	TCCAGGCAGC	TACCGACGAG	CAGCCGCCCG	TGATCAAGAC	GCTGGAGAAG	900
CTGGTCAACA	TCGAGACCGG	CACCGGTGAC	GCCGAGGGCA	TCGCCGCTGC	GGGCAACTTC	960
CTCGAGGCCG	AGCTCAAGAA	CCTCGGCTTC	ACGGTCACGC	GAAGCAAGTC	GGCCGGCCTG	1020
GTGGTGGGCG	ACAACATCGT	GGGCAAGATC	AAGGSCCGCG	GCGGCAAGAA	CCTGCTGCTG	1080
ATGTCGCACA	TGGACACCGT	CTACCTCAAG	GGCATTCTCG	CGAAGGCCCC	GTTCCGCGTC	1140
GAAGGCGACA	AGGCCTACGG	CCCGGGCATC	GCCGACGACA	AGGGCGGCAA	CGCGGTCATC	1200
CTGCACACGC	TCAAGCTGCT	GAAGGAATAC	GGCGTGCGCG	ACTACGGCAC	CATCACCGTG	1260
CTGTTCAACA	CCGACGAGGA	AAAGGTTTCC	TTCGGCTCGC	GCGACCTGAT	CCAGGAAGAA	1320
GCCAAGCTGG	CCGACTACGT	GCTCTCCTTC	GAGCCCACCA	GCGCAGGCGA	CGAAAACTC	1380
TCGCTGGGCA	CCTCGGGCAT	CGCCTACGTG	CAGGTCCAGA	TCACCGGCAA	GGCCTCGCAT	1440
GCCGGCGCCG	CGCCCGAGCT	GGGCGTGAAC	GCGCTGGTCG	AGGCTCCGA	CCTCGTGCTG	1500
CGCACGATGA	ACATCGACGA	CAAGGCGAAG	AACCTGCGCT	TCCAGTGGA	CATCGCCAAG	1560
GCCGGCCAGG	TCTCGAACAT	CATCCCCGCC	AGCGCCACGC	TGAACGCCGA	CGTGCGCTAC	1620
GCGCGCAACG	AGGACTTCGA	CGCCGCCATG	AAGACGCTGG	AAGAGCGCGC	GCAGCAGAAG	1680
AAGCTGCCCG	AGGCCGACGT	GAAGGTGATC	GTCACGCGCG	GCCGCCCGGC	CTTCAATGCC	1740
GGCGAAGGCG	GCAAGAAGCT	GGTCGACAAG	GCGGTGGCCT	ACTACAAGGA	AGCCGGCGGC	1800
ACGCTGGGCG	TGGAAGAGCG	CACCGGCGGC	GGCACCAGCG	CGGCCTACGC	CGCGCTCTCA	1860
GGCAAGCCAG	TGATCGAGAG	CCTGGGCCTG	CCGGGCTTCG	GCTACCACAG	CGACAAGGCC	1920
GAGTACGTGG	ACATCAGCGC	GATTCCGCGC	CGCCTGTACA	TGGCTGCGCG	CCTGATCATG	1980
GATCTGGGCG	CCGGCAAG					1998

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 51:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 666 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(C) TYP VLÁKNA: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 51:

Met Lys Leu Trp Leu Asn Trp Ile Phe Leu Val Thr Leu Leu Asn Gly

1

5

10

15

Ile Gln Cys Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg

20	25	30
Ser Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile		
35	40	45
Lys Asp Asn Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu		
50	55	60
Glu Trp Ile Ala Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala		
65	70	75
Pro Lys Phe Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Ser Ser Ser Asn		
85	90	95
Thr Ala Tyr Leu His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val		
100	105	110
Tyr Tyr Cys His Val Leu Ile Tyr Ala Gly Tyr Leu Ala Met Asp Tyr		
115	120	125
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Ala Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser		
130	135	140
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln		
145	150	155
Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr		
165	170	175
Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys		
180	185	190
Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala		
195	200	205
Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr		
210	215	220
Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr		
225	230	235
Cys Gln Gln Arg Ser Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys		
245	250	255
Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly		
260	265	270
Gly Gly Gly Ser Gln Lys Arg Asp Asn Val Leu Phe Gln Ala Ala Thr		
275	280	285
Asp Glu Gln Pro Ala Val Ile Lys Thr Leu Glu Lys Leu Val Asn Ile		
290	295	300
Glu Thr Gly Thr Gly Asp Ala Glu Gly Ile Ala Ala Ala Gly Asn Phe		
305	310	315
Leu Glu Ala Glu Leu Lys Asn Leu Gly Phe Thr Val Thr Arg Ser Lys		
325	330	335
Ser Ala Gly Leu Val Val Gly Asp Asn Ile Val Gly Lys Ile Lys Gly		
340	345	350
Arg Gly Gly Lys Asn Leu Leu Leu Met Ser His Met Asp Thr Val Tyr		
355	360	365
Leu Lys Gly Ile Leu Ala Lys Ala Pro Phe Arg Val Glu Gly Asp Lys		
370	375	380
Ala Tyr Gly Pro Gly Ile Ala Asp Asp Lys Gly Gly Asn Ala Val Ile		
385	390	395
		400

Leu His Thr Leu Lys Leu Leu Lys Glu Tyr Gly Val Arg Asp Tyr Gly
 405 410 415
 Thr Ile Thr Val Leu Phe Asn Thr Asp Glu Glu Lys Gly Ser Phe Gly
 420 425 430
 Ser Arg Asp Leu Ile Gln Glu Glu Ala Lys Leu Ala Asp Tyr Val Leu
 435 440 445
 Ser Phe Glu Pro Thr Ser Ala Gly Asp Glu Lys Leu Ser Leu Gly Thr
 450 455 460
 Ser Gly Ile Ala Tyr Val Gln Val Gln Ile Thr Gly Lys Ala Ser His
 465 470 475 480
 Ala Gly Ala Ala Pro Glu Leu Gly Val Asn Ala Leu Val Glu Ala Ser
 485 490 495
 Asp Leu Val Leu Arg Thr Met Asn Ile Asp Asp Lys Ala Lys Asn Leu
 500 505 510
 Arg Phe Gln Trp Thr Ile Ala Lys Ala Gly Gln Val Ser Asn Ile Ile
 515 520 525
 Pro Ala Ser Ala Thr Leu Asn Ala Asp Val Arg Tyr Ala Arg Asn Glu
 530 535 540
 Asp Phe Asp Ala Ala Met Lys Thr Leu Glu Glu Arg Ala Gln Gln Lys
 545 550 555 560
 Lys Leu Pro Glu Ala Asp Val Lys Val Ile Val Thr Arg Gly Arg Pro
 565 570 575
 Ala Phe Asn Ala Gly Glu Gly Gly Lys Lys Leu Val Asp Lys Ala Val
 580 585 590
 Ala Tyr Tyr Lys Glu Ala Gly Gly Thr Leu Gly Val Glu Glu Arg Thr
 595 600 605
 Gly Gly Gly Thr Asp Ala Ala Tyr Ala Ala Leu Ser Gly Lys Pro Val
 610 615 620
 Ile Glu Ser Leu Gly Leu Pro Gly Phe Gly Tyr His Ser Asp Lys Ala
 625 630 635 640
 Glu Tyr Val Asp Ile Ser Ala Ile Pro Arg Arg Leu Tyr Met Ala Ala
 645 650 655
 Arg Leu Ile Met Asp Leu Gly Ala Gly Lys
 660 665

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 52:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 3217 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 52:

GAATTCGCCG CCACTATGGA TTTTCAAGTG CAGATTTTCA GCTTCCTGCT AATCAGTGCT 60
 TCAGTCATAA TGCCAGAGG ACAAAGTGT CTCTCCAGT CTCCAGCAAT CCTGTCTGCA 120
 TCTCCAGGGG AGAAGGTCAC AATGACTTGC AGGGCCAGCT CAAGTGTAAC TTACATTAC 180

TGGTACCAGC AGAAGCCAGG TTCCTCCCCC AAATCCTGGA TTTATGCCAC ATCCAACCTG	240
GCTTCTGGAG TCCCTGCTCG CTTCAAGTGGC AGTGGGTCTG GGACCTCTTA CTCTCTCACA	300
ATCAGCAGAG TGGAGGCTGA AGATGCTGCC ACTTATTACT GCCAACATTG GAGTAGTAAA	360
CCACCGACGT TCGGTGGAGG CACCAAGCTC GAGATCAAAC GGACTGTGGC TGCACCATCT	420
GTCTTCATCT TCCCGCCATC TGATGAGCAG TTGAAATCTG GAACTGCCTC TGTGTGTGTC	480
CTGCTGAATA ACTTCTATCC CAGAGAGGCC AAAGTACAGT GGAAGGTGGA TAACGCCCTC	540
CAATCGGGTA ACTCCCAGGA GAGTGTCACT GAGCAGGACA GCAAGGACAG CACCTACAGC	600
CTCAGCAGCA CCCTGACGCT GAGCAAAGCA GACTACGAGA AACACAAAGT CTACGCCTGC	660
GAAGTCACCC ATCAGGGCCT GAGTTCGCCC GTCAAAAGA GCTTCAACAG GGGAGAGTGT	720
TAATAGGAGC TCGGATCCAG ATCTGAGCTC CTGTAGACGT CGACATTAAT TCCGGTTATT	780
TTCCACCAAT TTGCGTCTT TTGGCAATGT GAGGGCCCGG AAACCTGGCC CTGTCTTCTT	840
GACGAGCATT CCTAGGGGTC TTTCCCTCTT CGCCAAAGGA ATGCAAGGTC TGTGAATGT	900
CGTGAAGGAA GCAGTTCCTC TGGAAGCTTC TTGAAGACAA ACAACGTCTG TAGCGACCTT	960
TTGCAGGCAG CGGAACCCCC CACCTGGCGA CAGGTGCCTC TCGGCCAAA AGCCACGTGT	1020
ATAAGATACA CCTGCAAAGG CGGCACAACC CCAAGTCCAC GTTGTGAGTT GGATAGTTGT	1080
GGAAAGAGTC AAATGGCTCT CCTCAAGCGT ATTCAACAAG GGGCTGAAGG ATGCCCAGAA	1140
GGTACCCCAT TGTATGGGAT CTGATCTGGG GCCTCGGTGC ACATGCTTTA CATGTGTTTA	1200
GTCGAGGTTA AAAAACGTCT AGGCCCCCGG AACCACGGGG ACGTGGTTTT CCTTTGAAAA	1260
ACACGATGAT AATACCATGG AGTTGTGGCT GAACTGGATT TTCCTTGTA CACTTTTAAA	1320
TGGTATCCAG TGTGAGGTGA AGCTGGTGGG GTCTGGAGGA GGCTTGGTAC AGCCTGGGGG	1380
TTCTCTGAGA CTCTCCTGTG CAACTTCTGG GTTCACCTTC ACTGATTACT ACATGAACTG	1440
GGTCCGCCAG CCTCCAGGAA AGGCACTTGA GTGGTTGGGT TTTATTGGAA ACAAAGCTAA	1500
TGGTTACACA ACAGAGTACA GTGCATCTGT GAAGGGTCGG TTCACCATCT CCAGAGATAA	1560
ATCCCAAAGC ATCCTCTATC TTCAAATGAA CACCCTGAGA GCTGAGGACA GTGCCACTTA	1620
TTACTGTACA AGAGATAGGG GGCTACGGTT CTACTTTGAC TACTGGGGCC AAGGCACCAC	1680
TCTCAGATG AGCTCGGCTA GCACCAAGGG ACCATCGGTC TTCCCCCTGG CCCCCTGCTC	1740
CAGGAGCACC TCCGAGAGCA CAGCCGCCCT GGGTGCCTG GTCAAGGACT ACTTCCCCGA	1800
ACCGGTGACG GTGTCGTGGA ACTCAGGCGC TCTGACCAGC GGCGTGCACA CCTTCCGGC	1860
TGTCCTACAG TCCTCAGGAC TCTACTCCCT CAGCAGCGTC GTGACGGTGC CCTCCAGCAA	1920
CTTCGGCACC CAGACCTACA CCTGCAACGT AGATCACAAG CCCAGCAACA CCAAGGTGGA	1980
CAAGACAGTT GGCGGTGGTG GCTCTGGTGG TGCGGTAGC GGTGGCGGGG GTTCCAGAA	2040
GCGCGACAAC GTGCTGTTCC AGGCAGCTAC CGACGAGCAG CCGGCCGTGA TCAAGACGCT	2100
GGAGAAGCTG GTCAACATCG AGACCGGCAC CGGTGACGCC GAGGGCATCG CCGCTGCGGG	2160
CAACTTCCTC GAGGCCGAGC TCAAGAACCT CGGCTTCACG GTCACGCGAA GCAAGTCGGC	2220
CGGCCTGGTG GTGGGCGACA ACATCGTGGG CAAGATCAAG GGCCGCGGCG GCAAGAACCT	2280
GCTGCTGATG TCGCACATGG ACACCGTCTA CCTCAAGGGC ATTCTCGCGA AGGCCCCGTT	2340
CCGCGTCGAA GCGGACAAGG CCTACGGCCC GGGCATCGCC GACGACAAGG GCGGCAACGC	2400
GGTCATCCTG CACACGCTCA AGCTGCTGAA GGAATACGGC GTGCGCGACT ACGGCACCAT	2460
CACCGTGCTG TTCAACACCG ACGAGGAAAA GGGTTCTTTC GGCTCGCGCG ACCTGATCCA	2520
GGAAGAAGCC AAGCTGGCCG ACTACGTGCT CTCCTTCGAG CCCACCAGCG CAGGCGACGA	2580
AAAATCTCTG CTGGGCACCT CGGGCATCGC CTACGTGCAG GTCCAGATCA CCGGCAAGGC	2640
CTCGCATGCC GCGCGCGCGC CCGAGCTGGG CGTGAACGCG CTGGTCGAGG CTTCCGACCT	2700
CGTGCTGCGC ACGATGAACA TCGACGACAA GGCGAAGAAC CTGCGCTTCC AGTGGACCAT	2760
CGCCAAGGCC GGCCAGGTCT CGAACATCAT CCCC GCCAGC GTCCAGCTGA ACGCCGACGT	2820
GCGCTACGCG CGCAACGAGG ACTTCGACGC CGCCATGAAG ACGCTGGAAG AGCGCGCGCA	2880
GCAGAAGAAG CTGCCCAGG CCGACGTGAA GGTGATCGTC ACGCGCGGCC GCCCGGCCTT	2940
CAATGCCGGC GAAGGCGGCA AGAAGCTGGT CGACAAGGCG GTGGCCTACT ACAAGGAAGC	3000

CGGCGGCACG CTGGGCGTGG AAGAGCGCAC CGGCGGCGGC ACCGACGCGG CCTACGCCGC 3060
 GCTCTCAGGC AAGCCAGTGA TCGAGAGCCT GGGCTGCCCG GGCTTCGGCT ACCACAGCGA 3120
 CAAGGCCGAG TACGTGGACA TCAGCGCGAT TCCGCGCCGC CTGTACATGG CTGCGCGCCT 3180
 GATCATGGAT CTGGGCGCCG GCAAGTGATA ATCTAGA 3217

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 53:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 35 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 53:

TGGATCTGAA GCTTAACTA ACTCCATGGT GACCC

35

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 54:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 61 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 54:

GCCACGGATC CCGCCACCTC CGGAGCCACC ACCGCCACAA TCCCTGGGCA CAATTTTCTT

60

G

61

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 55:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 94 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 55:

CCCCAGGAAG CTTGGCGGTG GTGGCTCCGG AGGTGGCGGT AGCGGTGGCG GGGGTTCCCA

60

GAAGCGCGAC AACGTGCTGT TCCAGGCAGC TACC

94

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 56:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 51 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 56:

ATGTGCGAAT TCAGCAGCAG GTTCTTGCCG CCGCGGCCCT TGATCTTGCC C

51

(2) INFORMACE PRO SEKVENCII S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 57:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 732 párů bází

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) TYP VLÁKNA: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(ix) ZNAKY:

(A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS

(B) POZICE: 16...720

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 57:

GAATTCGCCG CCACC ATG GAT TTT CAA GTG CAG ATT TTC AGC TTC CTG CTA	51
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu	
1 5 10	
ATC AGT GCT TCA GTC ATA ATG TCC AGA GGA CAA ACT GTT CTC TCC CAG	99
Ile Ser Ala Ser Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Thr Val Leu Ser Gln	
15 20 25	
TCT CCA GCA ATC CTG TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG GTC ACA ATG ACT	147
Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr	
30 35 40	
TGC AGG GCC AGC TCA AGT GTA ACT TAC ATT CAC TGG TAC CAG CAG AAG	195
Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys	
45 50 55 60	
CCA GGT TCC TCC CCC AAA TCC TGG ATT TAT GCC ACA TCC AAC CTG GCT	243
Pro Gly Ser Ser Pro Lys Ser Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala	
65 70 75	
TCT GGA GTC CCT GCT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAC	291
Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr	
80 85 90	
TCT CTC ACA ATC AGC AGA GTG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT TAT TAC	339
Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr	
95 100 105	
TGC CAA CAT TGG AGT AGT AAA CCA CCG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG	387
Cys Gln His Trp Ser Ser Lys Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys	
110 115 120	
CTG GAA ATC AAA CGG GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA TCC ATC TTC CCA	435
Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro	
125 130 135 140	
CCA TCC AGT GAG CAG TTA ACA TCT GGA GGT GCC TCA GTC GTG TGC TTC	483
Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe	
145 150 155	
TTG AAC AAC TTC TAC CCC AAA GAC ATC AAT GTC AAG TGG AAG ATT GAT	531

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp
 160 165 170
 GGC AGT GAA CGA CAA AAT GGC GTC CTG AAC AGT TGG ACT GAT CAG GAC 579
 Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp
 175 180 185
 AGC AAA GAC AGC ACC TAC AGC ATG AGC AGC ACC CTC ACG TTG ACC AAG 627
 Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys
 190 195 200
 GAC GAG TAT GAA CGA CAT AAC AGC TAT ACC TGT GAG GCC ACT CAC AAG 675
 Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys
 205 210 215 220
 ACA TCA ACT TCA CCC ATT GTC AAG AGC TTC AAC AGG AAT GAG TGT 720
 Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 225 230 235

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 58:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 235 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 58:

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

180	185	190
Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu		
195	200	205
Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser		
210	215	220
Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys		
225	230	235

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 59:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 1974 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(ix) ZNAKY:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS
- (B) POZICE: 16...1956

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 59:

AAGCTTGCCG CCACC ATG AAG TTG TGG CTG AAC TGG ATT TTC CTT GTA ACA	51
Met Lys Leu Trp Leu Asn Trp Ile Phe Leu Val Thr	
1 5 10	
CTT TTA AAT GGT ATC CAG TGT GAG GTG AAG CTG GTG GAG TCT GGA GGA	99
Leu Leu Asn Gly Ile Gln Cys Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly	
15 20 25	
GGC TTG GTA CAG CCT GGG GGT TCT CTG AGA CTC TCC TGT GCA ACT TCT	147
Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser	
30 35 40	
GGG TTC ACC TTC ACT GAT TAC TAC ATG AAC TGG GTC CGC CAG CCT CCA	195
Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro	
45 50 55 60	
GGA AAG GCA CTT GAG TGG TTG GGT TTT ATT GGA AAC AAA GCT AAT GGT	243
Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Gly Phe Ile Gly Asn Lys Ala Asn Gly	
65 70 75	
TAC ACA ACA GAG TAC AGT GCA TCT GTG AAG GGT CGG TTC ACC ATC TCC	291
Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser	
80 85 90	
AGA GAT AAA TCC CAA AGC ATC CTC TAT CTT CAA ATG AAC ACC CTG AGA	339
Arg Asp Lys Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg	
95 100 105	
GCT GAG GAC AGT GCC ACT TAT TAC TGT ACA AGA GAT AGG GGG CTA CGG	387
Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Thr Arg Asp Arg Gly Leu Arg	
110 115 120	
TTC TAC TTT GAC TAC TGG GGC CAA GGC ACC ACT CTC ACA GTC TCC TCA	435
Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Thr Val Ser Ser	
125 130 135 140	

GCC AAA ACG ACA CCC CCA TCT GTC TAT CCA CTG GCC CCT GGA TCT GCT	483
Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala	
145 150 155	
GCC CAA ACT AAC TCC ATG GTG ACC CTG GGA TGC CTG GTC AAG GGC TAT	531
Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr	
160 165 170	
TTC CCT GAG CCA GTG ACA GTG ACC TGG AAC TCT GGA TCT CTG TCC AGC	579
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser	
175 180 185	
GGT GTG CAC ACC TTC CCA GCT GTC CTG CAG TCT GAC CTC TAC ACT CTG	627
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu	
190 195 200	
AGC AGC TCA GTG ACT GTC CCC TCC AGC ACC TGG CCC AGC GAG ACC GTC	675
Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val	
205 210 215 220	
ACC TGC AAC GTT GCC CAC CCG GCC AGC AGC ACC AAG GTG GAC AAG AAA	723
Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys	
225 230 235	
ATT GTG CCC AGG GAT TGT GGC GGT GGT GGC TCC GGA GGT GGC GGT AGC	771
Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser	
240 245 250	
GGT GGC GGG GGT TCC CAG AAG CGC GAC AAC GTG CTG TTC CAG GCA GCT	819
Gly Gly Gly Gly Ser Gln Lys Arg Asp Asn Val Leu Phe Gln Ala Ala	
255 260 265	
ACC GAC GAG CAG CCG GCC GTG ATC AAG ACG CTG GAG AAG CTG GTC AAC	867
Thr Asp Glu Gln Pro Ala Val Ile Lys Thr Leu Glu Lys Leu Val Asn	
270 275 280	
ATC GAG ACC GGC ACC GGT GAC GCC GAG GGC ATC GCC GCT GCG GGC AAC	915
Ile Glu Thr Gly Thr Gly Asp Ala Glu Gly Ile Ala Ala Ala Gly Asn	
285 290 295 300	
TTC CTC GAG GCC GAG CTC AAG AAC CTC GGC TTC ACG GTC ACG CGA AGC	963
Phe Leu Glu Ala Glu Leu Lys Asn Leu Gly Phe Thr Val Thr Arg Ser	
305 310 315	
AAG TCG GCC GGC CTG GTG GTG GGC GAC AAC ATC GTG GGC AAG ATC AAG	1011
Lys Ser Ala Gly Leu Val Val Gly Asp Asn Ile Val Gly Lys Ile Lys	
320 325 330	
GGC CGC GGC GGC AAG AAC CTG CTG CTG ATG TCG CAC ATG GAC ACC GTC	1059
Gly Arg Gly Gly Lys Asn Leu Leu Leu Met Ser His Met Asp Thr Val	
335 340 345	
TAC CTC AAG GGC ATT CTC GCG AAG GCC CCG TTC CGC GTC GAA GGC GAC	1107
Tyr Leu Lys Gly Ile Leu Ala Lys Ala Pro Phe Arg Val Glu Gly Asp	
350 355 360	
AAG GCC TAC GGC CCG GGC ATC GCC GAC GAC AAG GGC GGC AAC GCG GTC	1155
Lys Ala Tyr Gly Pro Gly Ile Ala Asp Asp Lys Gly Gly Asn Ala Val	
365 370 375 380	
ATC CTG CAC ACG CTC AAG CTG CTG AAG GAA TAC GGC GTG CGC GAC TAC	1203
Ile Leu His Thr Leu Lys Leu Leu Lys Glu Tyr Gly Val Arg Asp Tyr	

385	390	395	
GGC ACC ATC ACC GTG CTG TTC AAC ACC GAC GAG GAA AAG GGT TCC TTC			1251
Gly Thr Ile Thr Val Leu Phe Asn Thr Asp Glu Glu Lys Gly Ser Phe			
400	405	410	
GGC TCG CGC GAC CTG ATC CAG GAA GAA GCC AAG CTG GCC GAC TAC GTG			1299
Gly Ser Arg Asp Leu Ile Gln Glu Glu Ala Lys Leu Ala Asp Tyr Val			
415	420	425	
CTC TCC TTC GAG CCC ACC AGC GCA GGC GAC GAA AAA CTC TCG CTG GGC			1347
Leu Ser Phe Glu Pro Thr Ser Ala Gly Asp Glu Lys Leu Ser Leu Gly			
430	435	440	
ACC TCG GGC ATC GCC TAC GTG CAG GTC AAC ATC ACC GGC AAG GCC TCG			1395
Thr Ser Gly Ile Ala Tyr Val Gln Val Asn Ile Thr Gly Lys Ala Ser			
445	450	455	460
CAT GCC GGC GCC GCG CCC GAG CTG GGC GTG AAC GCG CTG GTC GAG GCT			1443
His Ala Gly Ala Ala Pro Glu Leu Gly Val Asn Ala Leu Val Glu Ala			
465	470	475	
TCC GAC CTC GTG CTG CGC ACG ATG AAC ATC GAC GAC AAG GCG AAG AAC			1491
Ser Asp Leu Val Leu Arg Thr Met Asn Ile Asp Asp Lys Ala Lys Asn			
480	485	490	
CTG CGC TTC AAC TGG ACC ATC GCC AAG GCC GGC AAC GTC TCG AAC ATC			1539
Leu Arg Phe Asn Trp Thr Ile Ala Lys Ala Gly Asn Val Ser Asn Ile			
495	500	505	
ATC CCC GCC AGC GCC ACG CTG AAC GCC GAC GTG CGC TAC GCG CGC AAC			1587
Ile Pro Ala Ser Ala Thr Leu Asn Ala Asp Val Arg Tyr Ala Arg Asn			
510	515	520	
GAG GAC TTC GAC GCC GCC ATG AAG ACG CTG GAA GAG CGC GCG CAG CAG			1635
Glu Asp Phe Asp Ala Ala Met Lys Thr Leu Glu Glu Arg Ala Gln Gln			
525	530	535	540
AAG AAG CTG CCC GAG GCC GAC GTG AAG GTG ATC GTC ACG CGC GGC CGC			1683
Lys Lys Leu Pro Glu Ala Asp Val Lys Val Ile Val Thr Arg Gly Arg			
545	550	555	
CCG GCC TTC AAT GCC GGC GAA GGC GGC AAG AAG CTG GTC GAC AAG GCG			1731
Pro Ala Phe Asn Ala Gly Glu Gly Gly Lys Lys Leu Val Asp Lys Ala			
560	565	570	
GTG GCC TAC TAC AAG GAA GCC GGC GGC ACG CTG GGC GTG GAA GAG CGC			1779
Val Ala Tyr Tyr Lys Glu Ala Gly Gly Thr Leu Gly Val Glu Glu Arg			
575	580	585	
ACC GGC GGC GGC ACC GAC GCG GCC TAC GCC GCG CTC TCA GGC AAG CCA			1827
Thr Gly Gly Gly Thr Asp Ala Ala Tyr Ala Ala Leu Ser Gly Lys Pro			
590	595	600	
GTG ATC GAG AGC CTG GGC CTG CCG GGC TTC GGC TAC CAC AGC GAC AAG			1875
Val Ile Glu Ser Leu Gly Leu Pro Gly Phe Gly Tyr His Ser Asp Lys			
605	610	615	620
GCC GAG TAC GTG GAC ATC AGC GCG ATT CCG CGC CGC CTG TAC ATG GCT			1923
Ala Glu Tyr Val Asp Ile Ser Ala Ile Pro Arg Arg Leu Tyr Met Ala			
625	630	635	
GCG CGC CTG ATC ATG GAT CTG GGC GCC GGC AAG TGATAAGAAT TCCTCGAG			1974

Ala Arg Leu Ile Met Asp Leu Gly Ala Gly Lys

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 60:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 647 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(C) TYP VLÁKNA: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 60:

Met	Lys	Leu	Trp	Leu	Asn	Trp	Ile	Phe	Leu	Val	Thr	Leu	Leu	Asn	Gly	1	5	10	15
Ile	Gln	Cys	Glu	Val	Lys	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	20	25	30	
Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Thr	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	35	40	45	
Thr	Asp	Tyr	Tyr	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Ala	Leu	50	55	60	
Glu	Trp	Leu	Gly	Phe	Ile	Gly	Asn	Lys	Ala	Asn	Gly	Tyr	Thr	Thr	Glu	65	70	75	80
Tyr	Ser	Ala	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Lys	Ser	85	90	95	
Gln	Ser	Ile	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Thr	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Ser	100	105	110	
Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Arg	Asp	Arg	Gly	Leu	Arg	Phe	Tyr	Phe	Asp	115	120	125	
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	Thr	130	135	140	
Pro	Pro	Ser	Val	Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro	Gly	Ser	Ala	Ala	Gln	Thr	Asn	145	150	155	160
Ser	Met	Val	Thr	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	165	170	175	
Val	Thr	Val	Thr	Trp	Asn	Ser	Gly	Ser	Leu	Ser	Ser	Gly	Val	His	Thr	180	185	190	
Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Asp	Leu	Tyr	Thr	Leu	Ser	Ser	Ser	Val	195	200	205	
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Thr	Trp	Pro	Ser	Glu	Thr	Val	Thr	Cys	Asn	Val	210	215	220	
Ala	His	Pro	Ala	Ser	Ser	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ile	Val	Pro	Arg	225	230	235	240
Asp	Cys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	245	250	255	
Ser	Gln	Lys	Arg	Asp	Asn	Val	Leu	Phe	Gln	Ala	Ala	Thr	Asp	Glu	Gln	260	265	270	
Pro	Ala	Val	Ile	Lys	Thr	Leu	Glu	Lys	Leu	Val	Asn	Ile	Glu	Thr	Gly	275	280	285	

Thr Gly Asp Ala Glu Gly Ile Ala Ala Ala Gly Asn Phe Leu Glu Ala
 290 295 300
 Glu Leu Lys Asn Leu Gly Phe Thr Val Thr Arg Ser Lys Ser Ala Gly
 305 310 315 320
 Leu Val Val Gly Asp Asn Ile Val Gly Lys Ile Lys Gly Arg Gly Gly
 325 330 335
 Lys Asn Leu Leu Leu Met Ser His Met Asp Thr Val Tyr Leu Lys Gly
 340 345 350
 Ile Leu Ala Lys Ala Pro Phe Arg Val Glu Gly Asp Lys Ala Tyr Gly
 355 360 365
 Pro Gly Ile Ala Asp Asp Lys Gly Gly Asn Ala Val Ile Leu His Thr
 370 375 380
 Leu Lys Leu Leu Lys Glu Tyr Gly Val Arg Asp Tyr Gly Thr Ile Thr
 385 390 395 400
 Val Leu Phe Asn Thr Asp Glu Glu Lys Gly Ser Phe Gly Ser Arg Asp
 405 410 415
 Leu Ile Gln Glu Glu Ala Lys Leu Ala Asp Tyr Val Leu Ser Phe Glu
 420 425 430
 Pro Thr Ser Ala Gly Asp Glu Lys Leu Ser Leu Gly Thr Ser Gly Ile
 435 440 445
 Ala Tyr Val Gln Val Asn Ile Thr Gly Lys Ala Ser His Ala Gly Ala
 450 455 460
 Ala Pro Glu Leu Gly Val Asn Ala Leu Val Glu Ala Ser Asp Leu Val
 465 470 475 480
 Leu Arg Thr Met Asn Ile Asp Asp Lys Ala Lys Asn Leu Arg Phe Asn
 485 490 495
 Trp Thr Ile Ala Lys Ala Gly Asn Val Ser Asn Ile Ile Pro Ala Ser
 500 505 510
 Ala Thr Leu Asn Ala Asp Val Arg Tyr Ala Arg Asn Glu Asp Phe Asp
 515 520 525
 Ala Ala Met Lys Thr Leu Glu Arg Ala Gln Gln Lys Lys Leu Pro
 530 535 540
 Glu Ala Asp Val Lys Val Ile Val Thr Arg Gly Arg Pro Ala Phe Asn
 545 550 555 560
 Ala Gly Glu Gly Gly Lys Lys Leu Val Asp Lys Ala Val Ala Tyr Tyr
 565 570 575
 Lys Glu Ala Gly Gly Thr Leu Gly Val Glu Glu Arg Thr Gly Gly Gly
 580 585 590
 Thr Asp Ala Ala Tyr Ala Ala Leu Ser Gly Lys Pro Val Ile Glu Ser
 595 600 605
 Leu Gly Leu Pro Gly Phe Gly Tyr His Ser Asp Lys Ala Glu Tyr Val
 610 615 620
 Asp Ile Ser Ala Ile Pro Arg Arg Leu Tyr Met Ala Ala Arg Leu Ile
 625 630 635 640
 Met Asp Leu Gly Ala Gly Lys
 645

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Genový konstrukt, který kóduje část zaměřující buňku a heterologní enzym aktivující předlék, pro použití jako léčivo v savčím hostiteli, přičemž genový konstrukt je schopen exprimovat část zaměřující buňku a heterologní enzym aktivující předlék jako konjugát uvnitř buňky, přičemž konjugát je nasměrován tak, že pak opustí buňku, a je elektivně lokalizován na antigenu buněčného povrchu, který je rozpoznáván částí zaměřující buňku.
2. Genový konstrukt pro použití jako léčivo podle nároku 1, kde část zaměřující buňku je protilátka.
3. Genový konstrukt pro použití jako léčivo podle nároku 2, kde protilátka je anti-CEA protilátka vybraná z protilátek A5B7 a 806.077.
4. Genový konstrukt pro použití jako léčivo podle kteréhokoliv z předchozích nároků, kde heterologní enzym aktivující předlék je karboxypeptidáza.
5. Genový konstrukt pro použití jako léčivo podle nároku 4, kde karboxypeptidáza je CPG2.
6. Genový konstrukt pro použití jako léčivo podle nároku 5, kde CPG2 má mutovaná polypeptidová glykosylační místa, aby se odstranila nebo snížila glykosylace po expresi v savčí buňce.

7. Genový konstrukt pro použití jako léčivo podle kteréhokoliv z nároků 5 až 6, kde konjugát "protilátka-enzym CPG2" je fúzní protein, ve kterém je enzym fúzován k C-konci protilátky prostřednictvím těžkého nebo lehkého řetězce protilátky, přičemž dimerizace kódovaného konjugátu po expresi se uskuteční prostřednictvím dimerizační domény CPG2.
8. Genový konstrukt pro použití jako léčivo podle nároku 7, kde fúzní protein je vytvořen navázáním C-konce protilátkového těžkého řetězce Fab k N-konci molekuly CPG2, čímž vytvoří Fab-CPG2, přičemž dvě molekuly Fab-CPG2 po expresi dimerizují prostřednictvím CPG2, takže vytvoří konjugát (Fab-CPG2)₂.
9. Genový konstrukt pro použití jako léčivo podle nároku 4, kde karboxypeptidáza je vybrána z enzymů [D253K]HCPB, [G251T,D253K]HCPB nebo [A248S,G251T,D253K]HCPB.
10. Genový konstrukt pro použití jako léčivo podle kteréhokoliv z předchozích nároků, který obsahuje transkripční regulační sekvenci, kterážto sekvence obsahuje promotor a řídící prvek, přičemž tento prvek obsahuje genetický vypínač pro řízení exprese genového konstruktů.
11. Genový konstrukt pro použití jako léčivo podle nároku 10, kde transkripční regulační sekvence obsahuje jako řídící prvek genetický vypínač, který je regulován přítomností tetracyklinu nebo ekdysonu.

12. Genový konstrukt pro použití jako léčivo podle nároku 10 nebo 11, kde promotor je závislý na buněčném typu a je vybrán z následujících promotorů: karcinoembryonální antigen (CEA), alfa-fetoprotein (AFP), tyrosinhydroxyláza, cholinacetyltransferáza, neuronově specifická enoláza, insulin, gliový kyselý fibroprotein, HER-2/neu, c-erbB2 a N-myc.
13. Genový konstrukt pro použití jako léčivo podle kteréhokoliv z předchozích nároků, který je vložen v adenoviru pro přenos do savčího hostitele.
14. Použití genového konstruktu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 12 k výrobě léčiva pro léčení rakoviny u savců.
15. Uspořádaný dvousložkový systém pro použití na savčím hostiteli v y z n a č u j í c í s e t í m, že složky obsahují
- I) první složka obsahuje genový konstrukt podle kteréhokoliv z nároků 1 až 13, a
 - II) druhá složka obsahuje předlék, který může být konvertován na cytotoxický lék heterologním enzymem kódovaným první složkou.
16. Uspořádaný dvousložkový systém podle nároku 15, v y z n a č u j í c í s e t í m, že první složka obsahuje gen kódující heterologní enzym CPG2, a předlék ve druhé složce je vybrán ze skupiny obsahující N-(4-[N,N-bis(2-iodoetyl)amino]-fenoxykarbonyl)-L-glutamovou kyselinu, gama-(3,5-dikarboxy)anilid kyseliny N-(4-[N,N-bis(2-chloroetyl)amino]-fenoxykarbonyl)-L-glutamové

a N-(4-[N,N-bis(2-chloroethyl)amino]-fenoxycarbonyl)-L-glutamovou kyselinu nebo jejich farmaceuticky přijatelné soli.

17. Způsob podávání cytotoxického léčiva na určené místo v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje krok, kdy se podá hostiteli první složka, která obsahuje genový konstrukt podle kteréhokoliv z nároků 1 až 13, pak následuje podání druhé složky, která obsahuje předlék, který může být konvertován na cytotoxický lék heterologním enzymem kódovaným první složkou.

18. Způsob podle nároku 17 v y z n a č u j í c í s e t í m, že první složka obsahuje gen kódující heterologní enzym CPG2 a předlék ve druhé složce je vybrán ze skupiny obsahující N-(4-[N,N-bis(2-iodoethyl)amino]-fenoxy-karbonyl)-L-glutamovou kyselinu, gama-(3,5-dikarboxy)anilid kyseliny N-(4-[N,N-bis(2-chloroethyl)amino]-fenoxycarbonyl)-L-glutamové a N-(4-[N,N-bis(2-chloroethyl)amino]-fenoxycarbonyl)-L-glutamovou kyselinu nebo jejich farmaceuticky přijatelné soli.

09.11.99

PV 3965-99

~~4612~~

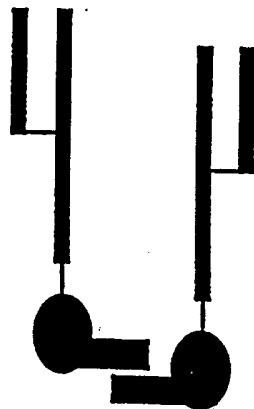
1/3

Obr. 1

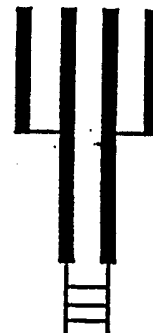


Obr. 2

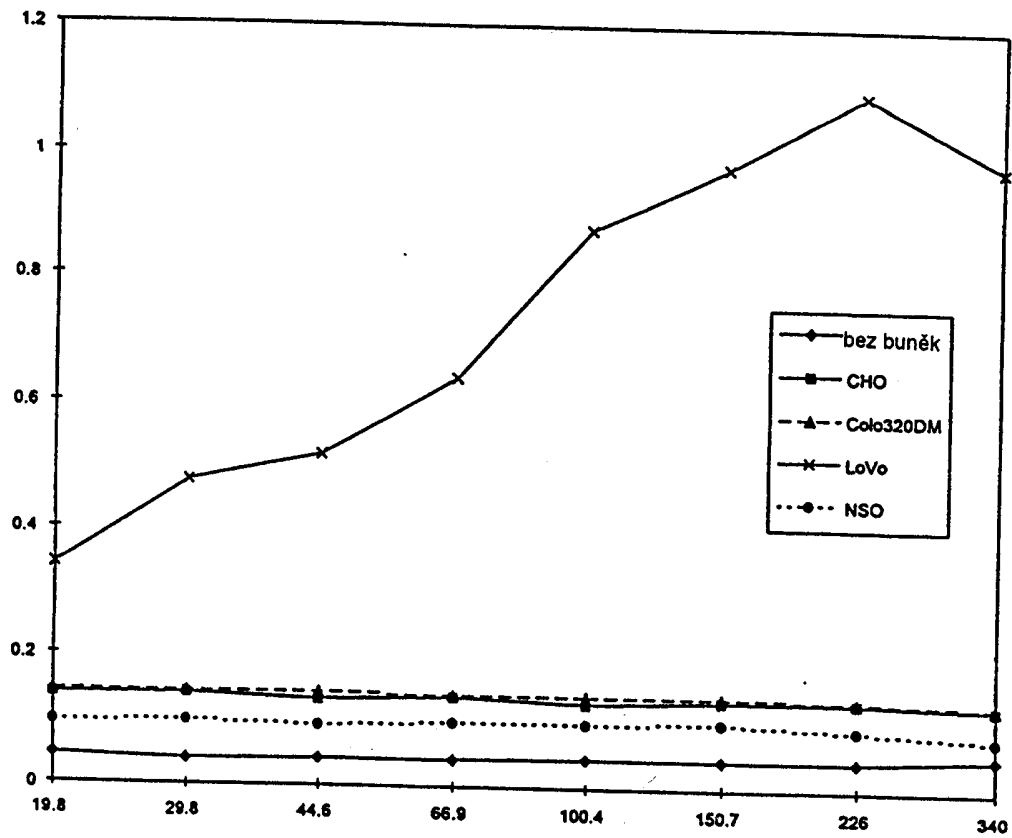
a



b



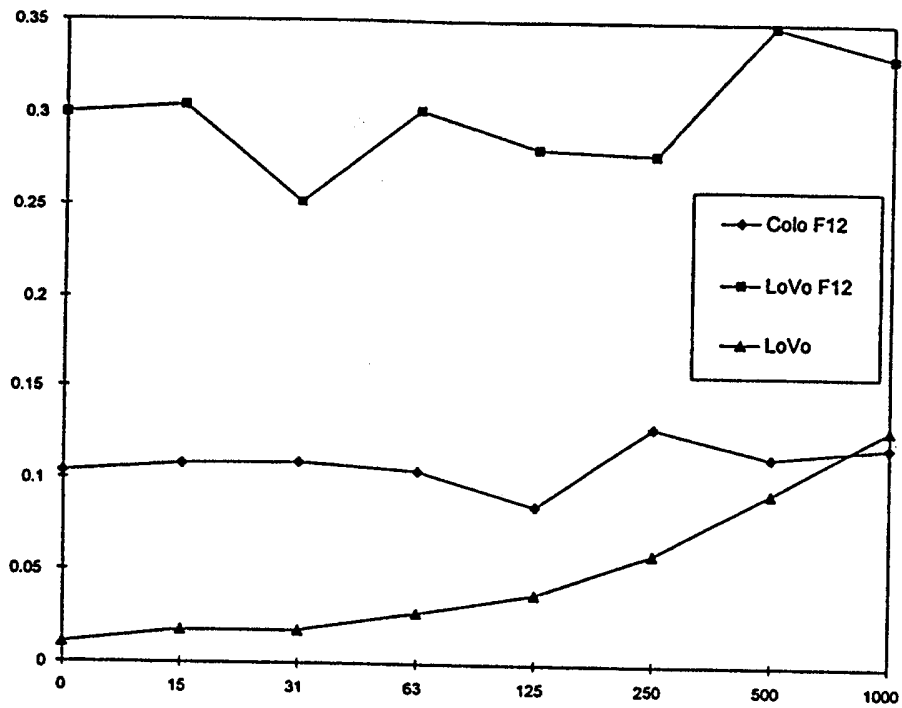
Obr. 3



09.11.99

3/3

Obr. 4



Obr. 5

