

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

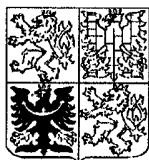
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

586-98

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **05. 09. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **06.09.95**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **95/523894**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12. 08. 98**
(Věstník č. 8/98)

(86) PCT číslo: **PCT/US96/14324**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 97/09351**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 07 K 16/28
C 12 N 15/00
C 12 N 15/13
A 61 K 39/395

(71) Přihlašovatel:

IDEC PHARMACEUTICALS CORPORATION,
San Diego, CA, US;

(72) Původce:

Hanna Nabil, Olivenhain, CA, US;
Newman Roland A., San Diego, CA, US;
Reff Mitchell E., San Diego, CA, US;

(74) Zástupce:

Hakr Eduard Ing., Přístavní 24, Praha 7,
17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Rekombinantní protilátky anti-CD4 pro
humánní terapii a způsoby jejich produk-
ce**

(57) Anotace:

Chimérické protilátky specifické k lidskému antigenu CD4, které v podstatě nemají depleční aktivitu pro T buňky, farmaceutické přípravky obsahující kódující DNA a jejich použití jako léčiva. Chimérické protilátky obsahují sekvence variabilních oblastí opic Starého světa a sekvence lidských konstantních domén, výhodně lidské gama 4 nebo jejich mutovaných forem. Tyto protilátky mají žádoucí terapeutické vlastnosti včetně nízké antigenicity, snížené /nebo chybějící/ depleční aktivity pro T buňky, dobrou afinitu k lidskému CD4 a zvýšenou stabilitu /biologický poločas in vivo/.

CZ 586-98 A3

Rekombinantní protilátky anti-CD4 pro humánní terapii a způsoby jejich produkce

Oblast techniky

Tato přihláška je přihláška částečně pokračovací k patentu Spojených Států č. 08/476 237, který je částečně pokračovací k patentu Spojených Států č. 08/397 072, podaného 25. ledna 1995, který je pokračování patentu Spojených Států č. 07/912 292, podaného 10. července 1992, který je přihláškou částečně pokračovací k patentové přihlášce Newmana et al. Spojených Států č. 07/856 281, podané 23. března 1992, která je částečným pokračováním patentové přihlášky Spojených Států č. 07/735 064, podané 25. července 1991, jež jsou celé, včetně obrázků, zahrnuty tímto v odkazech. Tento vynález se týká rekombinantních protilátek specifických k CD4, které jsou použitelné pro humánní terapii a také způsobů produkce takových protilátek.

Dosavadní stav techniky

CD4 je povrchový glykoprotein primárně exprimovaný na buňkách linie lymfocytů T včetně většiny thymocytů a podskupiny periferních T buněk. Nízké hladiny CD4 jsou také exprimovány některými nelymfoidními buňkami, ačkoliv funkční význam této odchylné buněčné distribuce je neznámý. Na zralých T buňkách vykonává CD4 rozpoznávací funkci prostřednictvím interakce s molekulami MHC II. třídy (MHC = hlavní histokompatibilní systém, které jsou exprimovány na buňkách prezentujících antigen. T buňky CD4⁺ tvoří primárně podskupinu pomahačských („helper“) buněk, které řídí funkce T

a B buněk během imunitních odpovědí na virové, bakteriální, mykotické a parazitární infekce, závislých na T buňkách.

Během patogeneze autoimunitních nemocí, zejména když selže tolerance k vlastním antigenům, T buňky $CD4^+$ přispívají k zánětlivým odpovědím, které mají za následek poškození kloubu a tkáně. Těmto procesům napomáhá doplňování zánětlivými buňkami hemopoetické linie, produkce protilátek, zánětlivých cytokinů a mediátorů a aktivace zabíječských („killer“) buněk.

Revmatoidní artritida (RA), zánětlivá nemoc synovia, je jeden projev autoimunitního jevu, který má za následek erozi, deformitu a zničení kloubů. Jako u většiny autoimunitních nemocí není etiologie RA dobře poznána. Avšak je známo, že RA je charakterizována zvýšenými hladinami aktivovaných T lymfocytů $CD4^+$ v postižených kloubech. V současnosti neexistuje vyléčení RA. První linie léčby RA poskytuje úlevu od příznaků RA a zlepšuje během krátké doby funkční zdatnost. Druhá a třetí linie imunosupresiv a steroidů, jako je azathioprin, metotrexát a prednisolon, zacílené na vlastní nemoc, jsou podávány ve vážnějších případech a jsou buď pouze slabě účinné nebo projevují nepříjemnou toxicitu pro chronickou terapii. Neochraňují také před zničením kloubu.

Nezávisle na RA, buňky $CD4^+$ se účastní také dalších chronických stavů včetně psoriázy, diabetu mellitu závislého na inzulinu, systémového lupus erythematosus a zánětlivých střevních nemocí. Kromě toho je pravděpodobné, že exprese $CD4$ je zapojena i do dalších autoimunitních nemocí.

Při daném zapojení T buněk do rozvoje a udržování autoimunitních nemocí se důležitou léčebnou strategií stala imunosuprese. Dostupné imunosupresivní léky, jako cyklosporin A, jsou úspěšně používány pro léčbu rejekce

transplantátů. Avšak jejich toxické vedlejší účinky je činí nepříjemnými pro chronickou léčbu autoimunitních nemocí.

Deplece (vyčerpání) veškeré T buněčné populace, včetně podskupiny $CD4^+$, se v klinických podmínkách uskutečnila metodami zahrnujícími drenáž ductus thoracicus, celkovým ozářením lymfoidní tkáně a lymfoferezou, což má u některých pacientů za následek klinické zlepšení. Současná strategie je však zaměřena na selektivnější přípravky, které blokují nežádoucí imunitní odpovědi, aniž by způsobily toxicitu pro solidní orgány nebo jiné větší vedlejší účinky. Jeden způsob, jak toto může být potenciálně dosaženo, je selektivní odstranění nebo inaktivace T buněk zprostředkovávajících nemoc použitím monoklonálních protilátek (mAbs). Jednu takovou strategii představují mAbs k $CD4$. Ve zvířecích modelech autoimunity a transplantace, když jsou profylakticky nebo terapeuticky podávány mAbs anti- $CD4$, tyto protilátky ruší nebo zvrátí progresi nemoci. Kromě toho, počáteční výsledky některých klinických zkoušek s mAbs anti- $CD4$ u RA, psoriázy, zánětlivé střevní nemoci a systémové vaskulitidy poskytly určitý předběžný důkaz potenciální terapeutické účinnosti.

Cílem léčby mAbs anti- $CD4$ je v podstatě zrušit autodestruktivní aktivitu buněk $CD4^+$, zejména během akutních fází autoimunitní poruchy. Konečný léčebný cíl je navodit stav imunologické neodpovídnosti (anergii) nebo dlouhodobou toleranci na škodlivé antigeny (nebo specifické tkáně), které udržují vlastní nemoc, aniž by se ohrozila normální obrana hostitele proti oportunním infekcím. Nehledě na RA, mAbs $CD4$ mohou být také prospěšné pro léčbu dalších autoimunitních nemocí, např. diabetu mellitu závislého na inzulinu, systémového lupus erytematosus, psoriázy, zánětlivé střevní nemoci a sclerosis multiplex.

Vzhledem k potenciální důležitosti mAbs anti-CD4 jako imunoterapeutika publikovali již četné společnosti a výzkumné skupiny mAbs anti-CD4 jako potenciální léčebné přípravky. Například Centocor publikoval mAbs anti-CD4 nazývané Centara, což je chimérická myší monoklonální protilátka (mAb) k CD4. Dále Johnson & Johnson/Ortho publikovali OKT-4a, mAb anti-CD4, která je humanizovaná myší mAb. Dále publikovali Burroughs Wellcome mAb anti-CD4, která je humanizovaná potkaní mAb k CD4. Jak Sandoz, tak i MedImmune (ve spolupráci s firmou Merck) vyvinuli anti-CD4 myší humanizované mAbs specifické k CD4. Dále vyvinuli mAbs anti-CD4 také Becton Dickinson, Immunotech a Boehringer Mannheim.

Nehledě na mAbs anti-CD4, byly objeveny různé imunomodulátory a léky potenciálně použitelné pro léčbu RA. Takové imunomodulátory a léky zahrnují např. blokátory buněčné adheze, blokátory cytokinových receptorů, imunotoxiny a antagonisty T buněčných receptorů. Specifické příklady zahrnují interferon gama, anti-ICAM-1 (myší mAb anti-CD54, která blokuje leukocytární transport, adhezi), Campath-1H (potkaní humanizovaná mAb anti-CDw52) receptor IL-1, cA2 (TNF-alfa chimérická mAb), CDP 571 (mAb anti-TNF), anti-IL-2R (humanizovaná myší mAb anti-CD25), SDZ CHH 380 (myší lidská mAb anti-CD7), DAB486 IL-2 (IL-2 fúzní toxin, nespecifický pro buňky CD4 a CD8), Antril (IL-1RA), anti-TCR (mAbs a proteiny, jejichž cílem jsou podskupiny T buněčného receptoru) a Xoma-Zyme-CD5 (myší konjugát anti-CD5 toxinu).

Další imunomodulátory a imunosupresiva mající potenciální použití pro léčbu autoimunitních nemocí zahrnují Rapamycin (perorální imunosupresivum), Therafectin, Leflunomid (imunosupresivní předléky), Tenidap (cytokinová

modulátor/CO- inhibitor), IMM-125 a RS-61443 (perorální imunosupresivum).

Jak bylo již zmíněno, byly publikovány četné monoklonální protilátky k CD4, mající potenciální léčebné použití. Z velké většiny tyto protilátky zahrnují myší mAbs, chimérické nebo myší humanizované mAbs anti-CD4.

Myší monoklonální protilátky mají potenciální využití pro diagnózu lidských onemocnění stejně jako v klinických zkouškách jako léčivo pro léčbu jak akutních, tak chronických lidských onemocnění, včetně leukémií, lymfomů, solidních nádorů (např. střeva, prsu, jaterní nádory), AIDS a autoimunitních nemocí. Avšak myší protilátky jsou nevýhodné, protože mají často za následek imunitní protilátkovou odpověď hostitele proti myším monoklonálním protilátkám.

Byly také publikovány chimérické myší/lidské protilátky. Tyto protilátky obsahují vazebné vlastnosti základní myší protilátky a efektorové funkce sdružené s lidskou konstantní oblastí. Viz např. Cabilly et al., patent Spojených Států č. 4 816 567, Shoemaker et al., patent Spojených Států č. 4 978 775, Beavers et al., patent Spojených Států č. 4 975 369 a Boss et al., patent Spojených Států č. 4 816 397, všechny jsou zahrnuty v odkazech. Všeobecně jsou tyto chimérické protilátky získávány pomocí genomové genové knihovny z DNA extrahované z již existujících myších hybridomů (Nishman et al., Cancer Research, 47, 999, 1987). Knihovna se poté testuje na přítomnost genů pro variabilní oblasti jak těžkého tak i lehkého řetězce, které vykazují správné typy přeskupení protilátkových fragmentů. Klonované geny variabilní oblasti se poté ligují do expresního vektoru, který obsahuje klonované kazety příslušného genu pro lidskou konstantní

oblast těžkého nebo lehkého řetězce. Chimérické geny se poté exprimují v buněčné linii dle výběru, obvykle myší myelomové linii.

Avšak, jakmile jsou takové chimérické protilátky použity v lidské terapii, objevují se také některé problémy. Podobně jako je to u myších monoklonálních protilátek, mohou lidští příjemci produkovat protilátky proti těmto chimérickým protilátkám, což je nevýhodné pro účinnost dlouhodobé terapie chimérickou protilátkou.

Jako zlepšení pro obvyklé chimérické protilátky vyjevilo několik badatelů způsoby produkce lidských monoklonálních protilátek, u kterých se tyto problémy nevyskytují. Viz např. Ehrlich et al., *Clinical Chemistry*, 34, 1681, 1988, Ehrlich et al., *Hybridoma*, 7, 385, 1988, Ehrlich et al., *Hybridoma*, 6, 151, 1987 a Ehrlich et al., *Human Antibody Hybridomas*, 1, 23, 1990. V těchto odkazech se také vyslovuje hypotéza, že protilátky primátů, např. šimpanzí monoklonální protilátky, by mohly být lidmi dobře tolerovány kvůli své strukturní podobnosti s lidskými protilátkami. Avšak produkce protilátek v lidech má samozřejmé etické zábrany.

Protože lidské protilátky nejsou imunogenní u opic rodu *Rhesus* (tj. nevyvolávají protilátkovou odpověď), Ehrlich et al. předpovídají, že protilátky primátů budou neimunogenní u lidí. Ehrlich et al. (viz výše) naznačují, že testování protilátek na lidech není nezbytné, jestliže protilátka primáta má konstantní oblast totožnou se stejnou oblastí lidského imunoglobulinu, nebo alespoň strukturu, která není odlišná od lidského imunoglobulinu více, než se liší různé lidské protilátky od sebe navzájem. Navrhují tedy, že šimpanzí protilátky mohou být užitečné v lidské terapii.

12.05.98

Jako vylepšení známých chimérických protilátek, které jsou často u lidí antigenní, popisují příbuzné přihlášky Spojených Států č. 08/476 237, podaná 7. června 1995, č. 08/347 072, podaná 25. února 1995 a 07/912 212, podaná 10. července 1992, 07/856 281, podaná 23. března 1992 a 07/735 064, podaná 25. července 1991, všechny zahrnuté v odkazech, přípravu monoklonálních protilátek u opic Starého světa a chimérických protilátek z nich odvozených tvořených rekombinantními metodami, které obsahují variabilní doménu protilátky opice Starého světa (např. pavián nebo makak), fúzovanou s klonovanou konstantní oblastí lidskou, šimpanzí nebo z jiné opice nebo kostrovou oblastí protilátky jiné opice. Tyto aplikace konkrétně popisují přípravu takových opičích (z opic Starého světa) a chimérických protilátek z nich odvozených proti lidským antigenům, a také použití těchto chimérických rekombinantních protilátek jako imunoterapeutických přípravků pro léčbu lidských nemocí.

Tyto aplikace jsou založeny na překvapujícím odhalení, že opice evolučně vzdálené (např. opice pavián nebo makak, včetně opic *Macaca fascicularis* a *Macaca rhesus*), jsou na rozdíl od šimpanzů nejenom dostatečně odlišné od lidí, takže je možné, aby v těchto opicích byly pěstovány protilátky proti lidským antigenům, dokonce proti relativně konzervovaným lidským antigenům jako CD4 a CD54, ale tyto opice jsou dostatečně podobné člověku, aby měly protilátky, které jsou strukturálně podobné lidským protilátkám, takže když jsou tyto opičí protilátky nebo z nich odvozené chimérické protilátky podány člověku, nevyvolá se u lidí žádná hostitelská proti-protilátková odpověď.

Tyto aplikace vyjevují, že na rozdíl od některých předchozích protilátek používaných pro lidskou terapii, včetně známých chimérických protilátek, tyto nové chimérické

protilátky netrpí mnoha nedostatky, např. a) imunogenicita a indukce lidské proti-protilátkové (HAA) odpovědi při opakovaném podávání nezbytném při léčbě chronických stavů, 2) relativně krátký poločas rozpadu ve srovnání s lidskými protilátkami a 3) nedostatek efektorových funkcí s lidskými buňkami nebo komplementem.

Nepřítomnost těchto nedostatků je významná výhoda pro lidskou terapii. Například v případě chronické lidské nemoci, včetně autoimunitních nemocí, nebo jakékoliv nemoci, kde je nezbytné dlouhotrvající podávání protilátky, je jednou z hlavních překážek opakované léčby protilátkami hostitelova odpověď na léčebnou protilátku. Odpovědi HAA jsou často nepředvídatelné od pacienta k pacientovi. Také jsou takové odpovědi převážně, i když ne výlučně, namířeny proti konstantní oblasti protilátkové molekuly, a jakmile se jednou objeví, často zabraňují nebo snižují účinnost terapie s touto protilátkou nebo jinou protilátkou stejného izotypu. Rekombinantní chimérické protilátky popsané ve výše odkazovaných aplikacích obcházejí tento problém a umožní vytvoření protilátek příslušné specifity a požadované efektorové funkce a jejich použití v produkci rekombinantních protilátek.

Tyto rekombinantní protilátky všeobecně zahrnují příslušnou část variabilní oblasti protilátky pocházející z imunizované opice, která je nezbytná pro vazbu antigenu, a konstantní oblast protilátky člověka nebo šimpanze. Toto tedy umožní udržení specifit a vysokých afinit opičích monoklonálních protilátek a požadované efektorové funkce příslušnou selekcí lidské nebo šimpanzí konstantní oblasti.

Některé z těchto podobných aplikací uvádějí jako příklad konkrétně opičí/lidskou chimérickou protilátku se specifitou pro CD4, nazývanou CE9.1, která obsahuje

variabilní doménu těžkého a lehkého řetězce monoklonální protilátky anti-CD4 tvořené v opici *Macaca fascicularis* a konstantní oblast lehkého řetězce lambda lidského imunoglobulinu a konstantní oblast těžkého řetězce gama 1 lidského imunoglobulinu. Tato protilátka má určitou depleční aktivitu pro T buňky, ale tato aktivita je nižší ve srovnání s předešlými monoklonálními protilátkami CD4. Avšak je žádoucí produkovat protilátky, které mají menší depleční aktivitu nebo které tuto aktivitu pro T buňky postrádají, protože to může zvyšovat jejich terapeutický potenciál.

Tyto aplikace dále popisují výhodné vektorové systémy pro produkci takových chimérických protilátek, zejména TCAE 5.2 a TCAE 6, které obsahují následující:

1) čtyři transkripční kazety v tandemovém uspořádání:

a) konstantní oblast lehkého řetězce lidského imunoglobulinu. V TCAE 5.2 je to konstantní oblast lehkého řetězce kappa lidského imunoglobulinu (aminokyseliny 108-214, číslované dle Kabata, alotyp Km 3) a v TCAE 6 konstantní oblast lehkého řetězce lambda lidského imunoglobulinu (aminokyseliny 108-215, číslované dle Kabata, genotyp Oz minus, Mcg minus, alotyp Ke minus),

b) konstantní oblast těžkého řetězce lidského imunoglobulinu, v obou konstruktech je to konstantní oblast těžkého řetězce gama lidského imunoglobulinu (aminokyseliny 114-478, číslované dle Kabata, alotyp Gm1a, Gm 12,

c) DHFR, obsahující svůj vlastní eukaryotický promotor a polyadenylační oblast, a

d) NEO, také obsahující svůj vlastní eukaryotický promotor a polyadenylační oblast.

2) kazety lehkého a těžkého řetězce lidského imunoglobulinu obsahují syntetické signální sekvence pro sekreci imunoglobulinových řetězců, a

3) kazety lehkého a těžkého řetězce lidského imunoglobulinu obsahují specifické spojky DNA, které umožňují inzerci variabilních oblastí lehkého a těžkého řetězce imunoglobulinu, které udržují translační čtecí rámec a nemění aminokyseliny normálně nalézané v imunoglobulinových řetězcích.

Avšak nehledě na to, co bylo dříve popsáno, v oboru stále existuje potřeba vylepšených protilátek, které jsou specifické pro CD4, mají pro člověka nízkou antigenicitu a které mohou být terapeuticky použity, např. pro léčbu autoimunitních nemocí, jako je revmatoidní artritida. Konkrétně je zde potřeba produkovat protilátky anti-CD4, které projevují zlepšené vlastnosti, např. delší poločas rozpadu a/nebo které podstatně postrádají nebo jsou zbavené depleční aktivity.

Předměty vynálezu

Předmětem předkládaného vynálezu je poskytnout nové monoklonální a chimérické protilátky specifické pro CD4, které mají zlepšené vlastnosti, např. delší poločas rozpadu, nízkou imunogenicitu u lidí a/nebo sníženou nebo nepřítomnou depleční aktivitu pro T buňky. Konkrétněji je předmětem vynálezu produkovat chimérické protilátky anti-CD4, které obsahují oblast rozeznávající antigen imunoglobulinu opic Starého světa specifickou pro CD4 a lidské nebo opičí sekvence konstantní domény, zejména konstantní oblast lidského lehkého řetězce kappa nebo lambda a sekvence konstantní oblasti lidského těžkého řetězce gama 1 nebo gama 4 nebo mutovaného gama 4 se změněnými efektorovými funkcemi a zlepšenou stabilitou proti izotypu gama 4.

Konkrétnějším předmětem předkládaného vynálezu je poskytnout nové monoklonální a chimérické protilátky obsahující specifickou opičí variabilní těžkou sekvenci anti-CD4, ukázanou na obrázku 1 a opičí variabilní lehkou sekvenci anti-CD4, ukázanou na obrázku 2, fúzovanou s opičími nebo lidskými sekvencemi konstantní domény, výhodně sekvencemi konstantní domény lidského lehkého řetězce kappa nebo lambda a sekvencemi lidské konstantní domény těžkého řetězce gama 1 nebo gama 4 nebo mutovaného gama 4 se změněnými efektorovými funkcemi a zlepšenou stabilitou proti izotypu gama 4.

Dalším předmětem předkládaného vynálezu je poskytnout sekvence DNA, které zajišťují expresi těchto zlepšených chimérických protilátek anti-CD4 a vektory a hostitelské buňky, které mohou být použity pro expresi těchto chimérických protilátek anti-CD4. Takové vektory výhodně obsahují expresní vektory citované v aplikacích, které jsou zde zahrnuty v odkazech, a hostitelské buňky jsou výhodně buňky CHO.

Ještě dalším předmětem předkládaného vynálezu je poskytnout farmaceutické přípravky pro použití v léčbě nebo profylaxi poruch spojených s CD4, zejména autoimunitních nemocí, které obsahují profylakticky nebo terapeuticky účinné množství předmětných zlepšených protilátek anti-CD4 v kombinaci s farmaceuticky přijatelným nosičem.

Ještě dalším předmětem předkládaného vynálezu je poskytnout způsoby léčení nebo profylaxe poruch spojených s CD4, zejména autoimunitních nemocí a dalších stavů, kde je žádoucí imunosuprese podáváním terapeuticky nebo profylakticky účinného množství předmětných nových chimérických protilátek anti-CD4 v kombinaci s farmaceuticky přijatelným nosičem.

Popis obrázků

Obrázek 1 zobrazuje aminokyselinovou a DNA sekvenci variabilní domény lehkého řetězce CE9.1.

Obrázek 2 zobrazuje aminokyselinovou a DNA sekvenci variabilní domény těžkého řetězce CE9.1.

Obrázek 3 zobrazuje aminokyselinovou a DNA sekvenci lidských variabilních a konstantních domén lambda obsažených v CE9.1.

Obrázek 4 zobrazuje DNA a aminokyselinovou sekvenci kódující sekvenci variabilní a konstantní oblasti těžkého řetězce gama 4.

Obrázek 5 zobrazuje DNA a aminokyselinovou sekvenci kódující lidský těžký řetězec gama 4 obsahující mutaci E.

Obrázek 6 zobrazuje DNA a aminokyselinovou sekvenci kódující lidský těžký řetězec gama 4 obsahující mutace P a E.

Obrázky 7-1, 7-2 a 8 ukazují sekvenci nukleové kyseliny různých vedoucích sekvencí použitelných ve vynálezu.

Obrázek 9 ukazuje distribuční graf vazby CE9.1 k čerstvým lidským PMNC, kde pravý horní kvadrant panelu A ukazuje lymfocyty dvojité značené s CE9.1 a OKT3, pravý horní kvadrant panelu B ukazuje populaci dvojité značenou s CE9.1 a OKT4, pravý horní kvadrant panelu C ukazuje nepřítomnost buněk dvojité značených CD8 a CE9.1 a kontrolní panel D ukazuje buňky značené normálním a lidským IgG.

Obrázky 10a, 10b a 10c ukazují vazebné charakteristiky receptoru Fc CE9.1, kde měření ukazují aglutinaci CD4⁺ průtokovým cytometrickým histogramem vazebných fibroblastů s a) γ IFN indukovanými čerstvými monocyty, kde negativní

kontrola využívá fragmenty $f(ab')_2$ z CE9.1, b) čerstvými monocyty s nebo bez indukce γ IFN, a c) v přítomnosti sCD4 nebo za chybění protilátky.

Obrázek 11 ukazuje inhibici smíšené reakce lidských lymfocytů způsobenou CE9.1, kde a) jako odpovídající buňky byly použity čerstvé lidské PBLs a stimulační buňky z nepříbuzného dárce ošetřené mitomycinem C byly použity pro testování inhibičních vlastností koncentrační řady CE9.1 a inhibice se měřila množstvím inkorporovaného thymidinu v produkci IL-2, a b) MLR používající šimpanzí odpovídající buňky a nepříbuzné šimpanzí stimulatory, kde Leu3a, myši proti-lidská CD4, byla použita jako kontrola.

Obrázek 12 ukazuje buněčné cytotoxické vlastnosti CE9.1 závislé na protilátce, kde lýze cílových buněk SupT-18 v přítomnosti interferonu γ stimulovala efektorové buňky a kde 4D9 je myši anti-CD4 monoklonální protilátka IgG2a.

Obrázek 13 ukazuje průtokový cytometrický histogram vazby Clq k buňkám SupT1 v přítomnosti a nepřítomnosti CE9.1, kde bylo zaznamenáváno 10 000 jevů a výsledky jsou vyjádřeny jako histogram, PRO945 jsou polyklonální protilátky z opice s vysokým titrem anti-CD4 v séru, a negativní kontrola byla Clq a anti-Clq v nepřítomnosti CE9.1.

Obrázek 14 ukazuje cytotoxický test CE9.1 závislý na komplementu, kde lýze buněk SupT-18 v přítomnosti CE9.1 a králíčího komplementu, kde 4D9 je myši anti-CD4 kontrola podtřídy IgG2a, která je schopna fixovat komplement, a kde PRO965 je polyklonální směs protilátek ze séra opice *Macaca fascicularis* s vysokým titrem anti-CD4.

Obrázek 15 ukazuje farmakologickou studii vysoké dávky u šesti šimpanzů, kde hladiny CD4 a CD8 v periferní krvi exprimované po období 150-300 dnů, křivky CD3-CD8

vyznačující počet CD4 modulovaných buněk jsou také ukázány. Horní panel: skupina 1 - počty monitorovaných šimpanzů. Šipky vyznačují dávky CE9.1. 2) kontrolní skupin s fyziologickým roztokem, střední panel: skupina 2 - šimpanzi (2) dostávající 10 mg/kg CE9.1. Dávkování se opakovalo, když se počty CD4 vrátily do rozmezí 30% od základní linie. Spodní panel: skupina 3 - šimpanzi (2) dostávající 10 mg/kg CE9.1. Dávkování se opakovalo, když se počty CD4 vrátily do rozmezí 70% od základní linie.

Obrázek 16 zobrazuje vhodné primery pro metodu PCR pro získání konstantní oblasti lidského $\gamma 4$.

Obrázek 17 zobrazuje sekvenci těžkého řetězce CE9 $\gamma 4$ PE.

Obrázek 18 zobrazuje výsledky elektroforézy v neredukujícím SDS-polyakrylamidovém gelu CE9.1, CE9 $\gamma 4$ (G4), CE9 $\gamma 4$ E(G4E) a CE9 γ PE(G4PE). Je vidět poloviční molekula („polo-mer“) o molekulové hmotnosti přibližně 80 kD.

Obrázek 19 obsahuje data pro asociační a disociační fáze progresivních křivek SPR.

Obrázek 20 ukazuje účinek konstruktů CD4 mAb na primární MLR.

Obrázek 21 ukazuje adhezi monocytární linie THP-1 indukované IFN- γ k fibroblastovým transfektantům CD4⁺.

Obrázek 22 zobrazuje FcR a CD4⁺ zprostředkovanou adhezi CE9.1, CE9 $\gamma 4$, CE9 $\gamma 4$ E a CE9 $\gamma 4$ YK.

Obrázek 23 ukazuje CDC a ADCC výsledky s CE9 $\gamma 4$ PE, CE9.1 a myší fixující mAb na HuCD4.

Obrázek 24 ukazuje plazmatické koncentrace následující bolus 1 mg/kg CE9 $\gamma 4$ E a CE9 $\gamma 4$ PE u laboratorního potkana kmene Sprague-Dawley.

Obrázek 25 zobrazuje účinek ošetření s mAbs v protilátkové odpovědi specifické pro ovalbumin u transgenních myší HuCD4.

Detailní popis vynálezu

Předkládaný vynález poskytuje nové monoklonální chimérické protilátky specifické pro CD4, které obsahují část vázající antigen variabilní oblasti anti-CD4 monoklonální protilátky z opice Starého světa fúzovanou k požadovaným sekvencím konstantní domény opice nebo člověka, výhodně konstantní doméně těžkého řetězce gama 1, gama 4 nebo mutovaného gama 4, a lidské sekvenci konstantní domény lehkého řetězce kappa nebo lambda. Tyto protilátky projevují zlepšené vlastnosti ve vztahu k obvyklým monoklonálním protilátkám anti-CD4, např. vysokou afinitu k lidským CD4⁺ a mají u lidí malou nebo žádnou imunogenicitu. Verze gama 4 ukazují sníženou nebo chybějící efektorovou funkci, např. vazebnou aktivitu pro receptor Fc nebo fixaci komplementu, a malou nebo žádnou T buněčnou depleční aktivitu.

Způsoby získávání monoklonálních protilátek z opic Starého světa specifickým k CD4 a klonů, které produkují monoklonální protilátky z opic Starého světa specifické k CD4, mohou být nalezeny ve výše odkazovaných příbuzných patentových přihláškách, které jsou zde zahrnuty v odkazech.

Všeobecně to zahrnuje imunizaci opice Starého světa proti lidskému antigenu CD4 za podmínek, které jsou takové, že opice Starého světa produkuje protilátky anti-CD4, opičí buňky, které jsou zodpovědné za produkci protilátek anti-CD4, se imortalizují, např. hybridomovou fúzí, virovou transformací s *Herpes papio*, jednoduchým B buněčným klonováním (také nazývaným „přechodná imortalizace“), a vytvoření knihovny rekombinantních imunoglobulinů. Ve výhodných provedeních tento způsob zahrnuje výběr opičí

B buňky z leukocytů periferní krve, sleziny, kostní dřeně nebo lymfatické uzliny, výběr jádra, které tvoří příslušnou protilátku, získání imunoglobulinových genů kódujících tuto protilátku z imortalizované buněčné linie, a expresi genů v produkční buněčné linii (tj. buněčné linii, která umožňuje dostatečnou produkci protilátky použitelné pro lidskou terapii). Jak je definováno ve výše zmíněných přihláškách, opice Starého světa zahrnují paviány a opice rodu makak (včetně *Macaca rhesus* a *Macaca fascicularis*).

Jak je pojednáno výše, ve výhodném provedení předmětné chimérické protilátky zahrnují variabilní těžké a variabilní lehké sekvence anti-CD4 z opic Starého světa ukázané na obrázku 1 a obrázku 2, fúzované k lidským sekvencím konstantní domény. Prostředky vhodné pro získání těchto specifických sekvencí variabilní těžké a variabilní lehké domény jsou detailně popsány v přihlášce Spojených Států č. 08/476 237, podané 7. června, 1990 a 08/397 072, podané 25. ledna, 1995, a také 07/912 292, podané 10. července, 1992, všechny jsou zahrnuté v odkazech ve své úplnosti. Tyto přihlášky dále vyjevují úplnou sekvenci nukleové kyseliny a aminokyselinovou sekvenci těchto sekvencí.

Tyto sekvence variabilních domén mohou být fúzovány s jakýmkoliv požadovanými sekvencemi lidské konstantní domény. Konkrétní výběr ovlivní efektorovou funkci výsledné chimérické protilátky anti-CD4. Výhodně konstantní domény lidského těžkého řetězce zahrnují konstantní doménu gama 1, gama4 nebo mutovanou gama 4, zde nazývanou jako gama 4E, nebo mutovanou gama 4, zde nazývanou jako gama 4PEPTID. Výběr gama 4 je výhodný, protože bylo shledáno, že má za následek chimérické protilátky postrádající nebo podstatně postrádající T buněčnou depleční aktivitu (80-100 % relativně ke gama 1). Věří se, že tomu tak je, protože

konstantní doména gama 4 není schopná vazby s komplementem. Konstantní doména může být také mutována tak, aby se zesílily vlastnosti výsledné chimérické protilátky, např. stabilita, a/nebo aby se eliminovala depleční aktivita. Konkrétně modifikace P a E domény gama 4, které jsou popsány níže, jsou modifikace gama 4 v ohybové oblasti, které propůjčují aktivitě zvýšenou stabilitu a odstraňují depleční aktivitu. Kromě toho se očekává, že další modifikace by také měly poskytnout chimérické protilátky mající zesílené vlastnosti.

Konstantní doména lidského lehkého řetězce obsažená v předmětných chimérických protilátkách anti-CD4 je výhodně konstantní oblast lidského lehkého řetězce kappa nebo lambda, výhodněji konstantní oblast lidského lehkého řetězce lambda. Aminokyselinové a DNA sekvence, které kódují lidské konstantní domény gama 1, gama 4, kappa a lambda, jsou v oboru známy. Aminokyselinové sekvence a sekvence nukleové kyseliny pro lidskou gama 4 a mutanty E a PEPTID a sekvence konstantní domény lambda je také možno nalézt na obrázcích 4 až 6 a obrázku 3.

Provedení vynálezu doložená příklady zahrnují specifickou chimérickou monoklonální protilátku anti-CD4, nazývanou CE9.1, která obsahuje domény vázající antigen získané z opic *Macaca fascicularis* imunizovaných lidským sCD4 (ukázáno na obrázcích 1 a 2), v kombinaci s konstantními doménami lidského IgG1 a monoklonálními chimérickými protilátkami z nich pocházejícími, např. CE9γ4, CE9γ4λK a CE9γ4E, CE9γ4PE, které mají tytéž domény vázající antigen z CE9.1, ale byly získány metodami genového inženýrství z kostry vazebné domény Fc lidského IgG4. Monoklonální protilátka CE9γ4E obsahuje mutaci, a sice změnu leucinu na kyselinu glutamovou (L236E) blízko ohybové

oblasti protilátky (modifikace E). Monoklonální protilátka CE9 γ 4PE obsahuje tutéž mutaci leucinu na kyselinu glutamovou a mutaci serinu na prolin (S229P) (modifikace „E“ a „P“). Protilátka CE9 γ 4 λ K se liší od CE9 γ 4 nahrazením konstantní oblasti jejího lehkého řetězce z lidského subtypu K na subtyp λ .

Tyto výměny a mutace konstantní domény byly učiněny proto, že je známo, že biologické odpovědi protilátek IgG závisí na složení jejich domén na karboxy- koncích, tj. na jejich izotypu. Tedy změnou protilátkového izotypu metodami proteinového inženýrství je potenciálně možné, aby se modifikovala biologická odpověď protilátky IgG, a přesněji předmětné chimérické monoklonální protilátky anti-CD4.

Požadovaným výsledkem této strategie bylo to, aby výměna izotypů části Fc protilátky nesnížila vazebnou aktivitu oblastí Fab vázajících antigen CD4. Avšak toto nebylo na začátku známo. Bylo možné, že změna konstantní oblasti nebo její modifikace by mohly nepříznivě ovlivnit vazbu CD4. Proto byly výsledné protilátky testovány, aby se určily účinky modifikace na vlastnosti protilátek, zejména vazbu antigenu CD4. Aby se zjistily možné účinky výměny konstantní domény na vazbu antigenu, byly použity známé testovací způsoby. Konkrétně studie interakce mezi CD4 a CE9.1, CE9 γ 4, CE9 γ 4 λ K, CE9 γ 4E a CE9 γ 4PE byla provedena Scatchardovou analýzou a povrchovou plasmonovou rezonancí (SPR). Výsledky těchto analýz dokázaly, že vazby CD4 ke každé z testovaných protilátek byly rovnocenné. Při SPR bylo shledáno, že ekvilibrační disociační konstanty v 25 °C pro vazbu CD4 k protilátkám byly všechny přibližně 1.0 nmol. Měření dále dokázala, že:

1) vazba CD4 k protilátkám nastává dle dvoustranného nezávislého a identického vazebného modelu, a

2) funkční vazebné vlastnosti domén vázajících antigen jsou nezávislé na strukturálních modifikacích učiněných v části Fc protilátky včetně izotypu gama 1, gama 4 nebo mutovaného gama 4. Proto předkládaný vynález poskytuje důkaz, že výměna izotypu mezi IgG1 a IgG4 je použitelnou strategií pro konstrukci protilátek bez ztráty afinity vázající antigen, a přesněji protilátek k CD4.

Také, jak popsáno níže, bylo zjištěno, že substituce konstantní domény gama 1 doménou gama 4 podstatně snižuje vazbu receptoru Fc, fixaci komplementu a T buněčnou depleční aktivitu a dále, že modifikace E a P odstraňují vazbu receptoru Fc a T buněčnou depleční aktivitu a zajišťují zvýšenou stabilitu protilátky. Proto je rozumné předpokládat, že další chimérické protilátky tvořené podle vynálezu (konstruované tak, aby obsahovaly lidskou konstantní doménu gama 4 nebo její mutované formy) jsou vybrány ty, které mají pozměněnou efektorovou funkci Fc, a které podstatně postrádají nebo jsou úplně zbaveny T buněčné depleční aktivity a/nebo které projevují zvýšenou stabilitu. Způsoby testování T buněčné depleční aktivity, efektorové funkce Fc a stability protilátky jsou v oboru známe.

Předkládaný vynález tedy poskytuje specifické rekombinantní protilátky, které jsou chimérické monoklonální protilátky z primátů/člověka a jsou namířeny proti lidskému antigenu CD4, a které projevují zlepšené vlastnosti, např. nízkou T buněčnou depleční aktivitu a větší stabilitu. Při těchto vlastnostech jsou tyto rekombinantní protilátky konkrétně použitelné jako imunomodulátory a jsou užitečné zejména pro léčbu autoimunitních nemocí, jako je revmatoidní artritida, psoriáza, systémový lupus erytematosus (SLE), a také v imunitních indikacích jiného než autoimunitního původu, jako je nemoc štěp-proti-hostiteli (GVHD) -

transplantační rejekce, astma a HIV. Předmětné protilátky jsou také prospěšné jako doplněk genové terapie. Konkrétně mohou být předmětné protilátky podávány před, současně nebo po podávání vektoru (obsahujícího terapeutickou DNA), aby odvrátily nebo redukovaly hostitelskou humorální odpověď na uvedený vektor. Tyto nemoci jsou příklady CD4 příbuzných stavů.

Jak je detailněji popsáno v příkladech, rekombinantní protilátka CE9.1 vzniká připojením variabilních domén Fv vázajících antigen z *Macaca fascicularis* k lidským konstantním oblastem, např. konstantních domén IgG1. Konkrétněji protilátka CE9.1 obsahuje lidskou doménu gama 1 a konstantní doménu lambda. CE9 γ 4, CE9 γ 4 λ K, CE9 γ 4E a CE9 γ 4PE obsahují konstantní doménu gama 4 nebo její mutovanou formu a konstantní oblast lambda nebo kappa. Sekvence výsledné rekombinantní protilátky jsou nerozlišitelné od sekvencí lidského imunoglobulinu. Jako výsledek by měly tyto protilátky, a také další protilátky CD4 tvořené podobnými způsoby, projevit při podání *in vivo* u lidí sníženou nebo žádnou imunogenicitu a pomalejší vymizení ze séra (sérovou clearance) ve srovnání s podobnými myšími monoklonálními nebo myšími-lidskými chimérickými protilátkami namířenými proti CD4.

Protilátka CE9.1 se váže k doméně 1 lidského CD4, ale ne makaka, což je oblast, která je zapojena do interakce s molekulami MHC třídy II na buňkách prezentujících antigen. Testy také dokázaly, že další protilátky uvedené v příkladech mají stejné vlastnosti pro vazbu antigenu jako CE9.1.

U protilátky CE9.1 byla pozorována silná imunomodulační aktivita jak *in vitro*, tak *in vivo*. Při těchto vlastnostech, tj. snížené imunogenicitě, pomalejší sérové clearanci a

silné imunomodulaci, při srovnání s jinými známými protilidskými mAbs CD4, které pocházejí z myši nebo hlodavců, je tato protilátka, stejně jako další protilátky zde popsané, obzvláště vhodná pro dlouhodobou terapii nemocí, kdy je žádoucí imunosuprese, např. autoimunitní poruchy a chronické zánětlivé nemoci, jako je revmatoidní artritida. Očekává se však, že tyto protilátky budou použitelné pro léčbu mnoha dalších chorobných stavů, včetně, například, Hashimotovy tyreoiditidy, primárního myxedému, tyreotoxikózy - Gravesovy nemoci, perniciózní anémie, autoimunitní atrofické gastritidy, autoimunitní karditidy, Addisonovy nemoci, předčasné menopauzy, diabetu mellitu typu I, Goodpastureova syndromu, myastenien gravis, sclerosis multiplex, mužské infertility, pemfigus vulgaris, pemfigoidu, sympatické oftalmie, fakogenní uveitidy, autoimunitní hemolytické anémie, idiopatické trombocytopenické purpury, idiopatické leukémie, primární biliární cirhózy, aktivní chronické hepatitidy (HBsAg negativní), kryptogenní cirhózy, syndromu zánětlivé nemoci střevní, Sjogrenova syndromu, psoriázy, revmatoidní artritidy, dermatomyozitidy, sklerodermie, smíšené nemoci pojiva, diskoidního lupus erythematosus, systémové vaskulitidy a systémového lupus erythematosus (SLE).

Jak pojednáno výše, revmatoidní artritida (RA) je zánětlivá nemoc synovia, která zahrnuje manifestaci autoimunitního jevu, který má za následek erozi, deformitu a destrukci kloubů. Jak platí pro většinu autoimunitních nemocí, etiologie RA není dobře definována, ale je charakterizována zvýšenými hladinami aktivovaných T lymfocytů CD4⁺ v postižených kloubech. V současnosti neexistuje vyléčení RA a terapie pro léčbu této oslabující nemoci je navržena pouze tak, aby krátkodobě poskytla úlevu

od příznaků a zlepšení ve funkčních schopnostech. Kromě toho, imunosupresiva a steroidy druhé a třetí linie, jako je azathioprin, metotrexát a prednisolon, které cílí na základní nemoc, jsou podávány pouze ve vážnějších případech a jsou obvykle mírně účinné nebo projevují nepříjemnou toxicitu pro používání v chronické léčbě. Na rozdíl od toho se očekává, že předmětná protilátka je vhodná pro dlouhotrvající a chronické podávání díky faktu, že projevuje sníženou imunogenicitu, delší poločas rozpadu a silnou imunomodulační aktivitu ve srovnání s jinými známými protilidskými mAbs CD4, které pocházejí od myši nebo hlodavců.

V podstatě rekombinantní monoklonální protilátky anti-CD4, uvedené jako příklady v této přihlášce, nebo jiné protilátky, tvořené podle předkládaného vynálezu a popsané v již výše citované přihlášce (zahrnuté v odkazech), pravděpodobně zprostředkovávají léčebnou aktivitu zastavením nebo pozměněním destrukční aktivity buněk CD4⁺, zejména během akutních fází autoimunitních poruch jako je revmatoidní artritida. Podávání protilátek podle vynálezu má tedy za následek stav imunologické neodpovídnosti (anergie) nebo dlouhodobé tolerance ke škodlivým antigenům (nebo specifickým tkáním), které udržují základní nemoc, aniž by se ohrozila normální obrana hostitele proti oportunním infekcím. Nehledě na RA, monoklonální protilátky CD4 mohou být prospěšné pro léčbu výše zmíněných nemocí a umožňují konkrétní aplikaci pro léčbu diabetu mellitu závislého na inzulinu, systémového lupus erytematosus, cirhózy, zánětlivé střevní nemoci, sclerosis multiplex, a také dalších autoimunitních nemocí. Mohou být použitelné také v léčení neautoimunitních nemocí, jako je leukémie, lymfom, reakce štěpu proti hostiteli, transplantační rejekce, astma a HIV.

Rekombinantní monoklonální protilátky anti-CD4, tvořené podle vynálezu, zprostředkovávají požadovaný terapeutický účinek *in vivo* prostřednictvím jednoho nebo více následujících mechanismů:

- i) blokování interakce CD4 s molekulami MHC II. třídy,
- ii) utlumení CD4 na buněčném povrchu
- iii) způsobení anergie a/nebo apoptózy,
- iv) deplece buněk CD4, nebo
- v) indukce tolerance k autoantigenům.

Ačkoliv přechodná deplece buněk CD4⁺ má za následek imunosupresi a snad normalizaci jinak hyperaktivního imunitního systému, hlavní mechanismus, kterým protilátky anti-CD4 projevují svůj účinek *in vivo* není nezbytně závislý na depleci T buněk. Má se spíše za to, že vazba protilátky k molekule CD4 zabraňuje aktivaci pomahačských T buněk antigeny vázanými k T buněčnému receptoru, což vede k antigen-specifické T buněčné anergii nebo toleranci. Například protilátka CE9.1, která obsahuje lidskou doménu gama 1, projevuje podstatnou imunosupresivní aktivitu, avšak u šimpanzů vyčerpává buňky CD4 pouze částečně. Kromě toho nyní výsledky klinických zkoušek u lidí naznačují, že tato protilátka má za následek podstatně menší buněčnou depleci ve srovnání s jinými monoklonálními protilátkami.

Také v experimentálních modelech *in vivo*, byla specifická tolerance aloštěpů navozena nedeplečními protilátkami anti-CD4 podávanými v čase transplantace. Udržení stavu tolerance nevyžaduje depleční protilátku anti-CD4, ale zdá se být závislé na nepřerušovaném výskytu antigenu. Na základě těchto zjištění se očekává, že předmětné rekombinantní protilátky nebo jiné rekombinantní protilátky anti-CD4 tvořené podle vynálezu jsou vhodné pro léčbu autoimunitních nemocí. Krátká léčebná schémata s

protilátkami anti-CD4 interferují s odpověďmi pomahačských T buněk proti autoantigenům, což vede k dlouhotrvajícím klinickým zlepšením v nepřítomnosti generalizované imunosuprese.

Na základě informací v předmětné přihlášce a za použití známých metod, odborník může snadno zjistit bezpečný, tolerovaný a účinný režim doložených rekombinantních protilátek anti-CD4 zde vyjevených, a také dalších protilátek tvořených v podstatné shodě s vynálezem.

Jak bylo zmíněno, CE9.1 je monoklonální protilátka anti-CD4, makak/lidská chimérická protilátka molekuly IgG1, která je exprimována v buňkách ovárií čínského křečka (buňky CHO), která projevuje 91-92% homologii s kostrou molekuly lidského imunoglobulinu. Proto tato molekula u lidí projevuje sníženou nebo dokonce žádnou imunitní odpověď a projevuje delší poločas rozpadu v séru při srovnání s myšími monoklonálními nebo myšími/lidskými chimérickými protilátkami. Protilátka projevuje také omezenou zkříženou reaktivitu s lidskými tkáněmi. Například při testování nebyl pozorován žádný důkaz vazby této protilátky k nelymfoidním tkáním. Jak se očekávalo, protilátka se váže k některým, ale ne ke všem lymfoidním buňkám periferní krve a dalších orgánů. Bylo také nalezeno, že tato protilátka reaguje s šimpanzími T buňkami CD4⁺, ale nereaguje s T buňkami CD4⁺ *Macaca rhesus*, *Macaca fascicularis* nebo *Macaca nemestrina*, paviánů, krys, myší nebo králíků. Vzhledem k této reaktivitě, šimpanzi obsahují příslušné druhy k potvrzení farmakologických účinků této protilátky *in vivo*, tj. její schopnost působit jako účinné imunosupresivum.

Protilátka CE9.1 projevuje reverzibilní T buněčnou depleční aktivitu u šimpanzů. Kromě toho je pravděpodobné, že bude lepší oproti současným myším a myším/chimérickým

monoklonálními protilátkami anti-CD4 pro svůj očekávaný delší poločas rozpadu v lidském séru a snížených potenciálních nepříznivých imunogenních účinků. Vzhledem k přítomnosti sekvencí lidské konstantní domény se také očekává, že předmětná protilátka bude při podávání lidem udržovat normální efektorové funkce lidských protilátek. Vskutku byly efektorové funkce protilátky CE9.1, a také dalších zmíněných protilátek, vyhodnoceny v několika odlišných testech. Bylo shledáno, že protilátka CE9.1 projevuje inhibiční aktivitu ve smíšené lymfocytární reakci (MLR), projevuje slabou vazbu Clq, ale neprojevuje buněčnou cytotoxicitu zprostředkovanou komplementem. Bylo také zjištěno, že projevuje buněčnou cytotoxickou aktivitu komplementu závislou na protilátce (ADDC) a váže se k FcR. Protilátka CE9.1 byla také vyhodnocena *in vivo* na šimpanzech, kde bylo zjištěno, že podávání má za následek částečnou depleci buněk CD4 a modulaci receptoru CD4.

Protilátka CE9.1 byla podávána šimpanzům v různých dávkách. Přesněji byly u šimpanze studovány dávky 0,1; 0,3; 1; 5; a 10 mg/kg, které byly podávány v intervalech 7 až 14 dnů. Nebyl pozorován žádný důkaz toxicity. Dávky 1 mg/kg nebo větší způsobily 80-95% redukci v cirkulaci buněk CD4⁺ 24 hodin po podání dávky. Významné snížení buněk CD4⁺ nebyl pozorován sedm dní po dávce 1 mg/kg. Po dávce 5 mg/kg počty cirkulujících buněk CD4⁺ nabyly znovu přibližně 40 % výchozího stavu po sedmi dnech a přibližně 60 % výchozího stavu po čtrnácti dnech. Po dávce 10 mg/kg se počty cirkulujících buněk CD4⁺ po sedmi dnech neobnovily a nabyly znovu pouze 40 % výchozího stavu čtyřicet dva dnů po podání dávky. V dalších klinickopatologických parametrech nebyly pozorovány žádné změny.

Protilátka CE9.1 byla také testována na lidech. Například aktivita protilátky CE9.1 byla vyhodnocena u pacientů s revmatoidní artritidou v jednofázových zkouškách stoupající jednotlivé dávky. Výsledky byly velmi slibné. Přesněji, u poloviny pacientů, kterým byla protilátka podávána, se projevilo alespoň 30% zlepšení stavu malých kloubů, a profil nepříznivých příhod byl extrémně benigní. Kromě toho, jak diskutováno výše, zatímco se původně předpokládalo, že CE9.1 je depleční, ve skutečnosti tato protilátka projevila pouze částečnou a přechodnou depleci po jednom podání. Částečně nedepleční povaha této protilátky může být prospěšná, protože v několika studiích provedených na zvířatech bylo publikováno, že deplece T buněk $CD4^+$ není zjevně nezbytná pro účinnost monoklonálních protilátek $CD4$. (Viz Carteron et al., *Induction of Immune Tolerance During Administration of Monoclonal Antibody to L3 T4 Does Not Depend on L3 T4⁺ Cells*, Underlying Journal of Immunology, 140, 713-716, 1988, Carteron et al., *F(ab')₂ Anti-CD4 and Intact Anti-CD4 Monoclonal Antibodies Inhibit the Accumulation of CD4⁺ T Cells, CD8⁺ T Cells a BT T Cells a B Cells in the kidneys of Lupus-Prone NZB/NZW Mice*, Clinical Immunology Immunopathology, 56, 373-383, 1990). Tato protilátka může tedy působit jako klasický receptorový antagonist a tím, že: i) blokuje interakci $CD4$ svým opačným receptorem MHC II, nebo ii) způsobuje modulaci $CD4$ z buněčného povrchu. Za těchto podmínek jsou T buněčné odpovědi $CD4^+$, které vyžadují zapojení receptoru $CD4$, oslabeny nebo blokovány. Fakt, že předmětná protilátka CE9.1 zjevně projevuje málo depleční aktivity u lidí, je výhodný, protože zlepšuje bezpečnost, odstraňuje potřebu častého sledování počtu buněk $CD4^+$ a také zlepšuje účinnost.

Protilátka CE9.1 byla navržena tak, aby snižovala počty buněk CD4 *in vivo* prostřednictvím receptoru Fc a mechanismů vázajících komplement. Studie na šimpanzech naznačují, že CE9.1 způsobuje částečnou depleci buněk CD4 a počáteční výsledky naznačují, že buněčná deplece u lidí je velmi snížena při srovnání s jinými mAbs CD4. Avšak je také žádoucí produkovat protilátky, které jsou zbaveny depleční aktivity.

Použitelnost „nedeplečních“ mAbs CD4 může být zlepšena vzhledem k následujícím faktům:

- i) pro účinnost mAbs CD4 není vyžadována deplece buněk CD4,
- ii) chybění buněčné deplece CD4 zvyšuje bezpečnost protilátky,
- iii) větší bezpečnost umožňuje, že mAbs jsou použity dříve v průběhu nemoci,
- iv) chybění buněčné deplece CD4 zlepší účinnost, a
- v) chybění buněčné deplece CD4 odstraňuje nebo snižuje potřebu častého monitorování počtu buněk CD4, a tak zvyšuje výhodnost a cenu celkového léčení.

Toto podporují fakta, že na několika zvířecích modelech bylo ukázáno, že pro účinnost mAbs CD4 není vyžadována T buněčná deplece CD4⁺. Tedy nedepleční mAb CD4 působí jako klasický receptorový antagonist a tím, že:

- i) blokuje interakci CD4 se svým opačným receptorem MHCII,
- ii) způsobují modulaci CD4 z buněčného povrchu, nebo
- iii) způsobují T buněčnou anergii a/nebo apoptózu.

Tudíž T buněčné odpovědi CD4⁺, které vyžadují účast receptoru CD4, jsou změněny nebo blokovány.

Všeobecně, T buněčné odpovědi, které jsou řízeny silnými nebo vysokoafinitními antigeny se zdají být

nezávislé na koreceptorových funkcích CD4 a nejsou tedy účinně blokovány mAbs CD4. Naopak T buněčné odpovědi na slabé antigeny (jako autoantigeny) vyžadují koreceptorové funkce CD4 a proto jsou inhibovány mAb CD4. Normálně silně autoreaktivní T buňky (T buňky s vysokou afinitou TCR k vlastním antigenům) jsou v thymu odstraněny „klonální delecí“ a nikdy se tudíž neobjeví v periférii. Na rozdíl od toho T buňky, které řídí autoimunitní odpovědi, se považují za slabě autoreaktivní buňky, které unikly normálním mechanismům periferní tolerance. Takové buňky jsou pro plné zpracování odpovědi závislé na součinnosti koreceptorů, jako je CD4. Proto blokování koreceptorů zbavuje tyto T buňky kritických společných signálních funkcí, které mají za následek částečnou aktivaci nebo anergii. Také, jak zmíněno výše, je dále žádoucí, aby se tvořily chimérické protilátky specifické pro CD4 mající větší stabilitu (delší biologický poločas *in vivo*).

Co se toho týče, byly syntetizovány různé chimérické protilátky, které obsahují lidskou konstantní doménu gama 4. Tato doména byla vybrána, protože podle všeho neváže lidský komplement nebo receptory FCγ1. Proto vznikla hypotéza, že chimérické protilátky obsahující tuto konstantní doménu postrádají nebo podstatně postrádají T buněčnou depleční aktivitu. Byly také vytvořeno několik chimérických protilátek, které obsahovaly známé modifikace konstantní domény gama 4. Konkrétně několik obsahuje modifikaci „E“, která je popsána Duncanem et al., *Nature*, 332, 563-564, 1988, a Winterem et al., WO 88/07089, 1988, kteréžto modifikace byly vyjeveny jako modifikace redukující vazbu komplementu a receptoru FCγ1. Tato modifikace obsahuje změnu leucinu na kyselinu glutamovou v pozici 236 (248 Kabatova číslování), aby se zrušila jakákoliv reziduální vazba

receptoru Fc. Také několik chimérických protilátek obsahuje modifikaci „P“, která je popsána Angalem et al., Mol. Immunol., 30, 105-8, 1993. Tato modifikace, které obsahuje změnu serinu v pozici 229 (241 Kabatova číslování) na prolin, zvyšuje stabilitu (biologický poločas v séru) stabilizací disulfidových vazeb mezi těžkými řetězci a bylo publikováno, že zvyšuje zlepšenou tkáňovou distribuci v porovnání s chimérickým IgG4, který postrádá tuto modifikaci.

Přesněji, základním důvodem pro vývoj CE9 γ 4 bylo odstranění fixace komplementu a snížení vazebných aktivit FcR. Tato protilátka se liší od CE9.1 v tom, že obsahuje lidskou konstantní doménu gama 4 (ne gama 1). Avšak, zatímco bylo toto vyžadováno, výsledek nebyl rutinní nebo předpověditelné povahy. Přítomní vynálezci vskutku našli, že chimérické protilátky obsahující nemodifikovanou γ 9, měly tutéž vazbu receptoru Fc jako protilátka γ 2. Na rozdíl od toho, základním důvodem pro tvorbu CE9 γ 4 λ K bylo zvýšit produktivitu konstruktů γ 4. Tato protilátka se od CE9.1 liší v tom, že obsahuje lidský lehký řetězec kappa a nikoliv lambda. Hodnocení CE9 γ 4 *in vitro* vazebným testem na receptor Fc, který měří vazbu protilátky na stimulované monocyty a monocytární buněčné linie, ukázalo, že CE9 γ 4 stále má významnou vazebnou aktivitu pro receptor Fc. Nadto vazba CE9 γ 4 byla v tomto testovacím systému nerozlišitelná od CE9.1 (gama 1). Základním důvodem pro výrobu CE9 γ 4 tedy bylo kompletně odstranit jakoukoliv reziduální vazbu FcR ve srovnání k chimérickým protilátkám obsahujícím nemodifikovanou γ 4. CE9 γ 4 obsahuje konstantní doménu gama 4 modifikovanou v jednom místě (modifikace E). Konečně, základní důvod pro výrobu CE9 γ 4PE bylo zvýšení stability oproti chimérickým protilátkám obsahujícím nemodifikovanou γ 4

nebo mutaci v jednom místě (modifikace E). Tato protilátka obsahuje konstantní doménu gama 4 modifikovanou ve dvou místech (modifikace P a E).

Jak bylo již diskutováno, lidská konstantní doména $\gamma 4$ byla vybrána jako izotyp pro odstranění efektorových funkcí, tj. reaktivity s lidskými receptory Fc γ nebo C1q, a nepřítomnost deplece buněk CD4⁺ *in vivo*. Tito čtyři kandidáti byli vybráni a exprimováni v buňkách CHO.

Dvě z těchto monoklonálních protilátek byly vybrány pro rozsáhlejší studii, tj. CE9 $\gamma 4$ E a CE9 $\gamma 4$ PE. Jak zmíněno, obě obsahují substituci kyselinou glutamovou v oblasti CH2 vnesenou proto, aby eliminovala reziduální vazbu FcR sdruženou s konstantní oblastí gama 4. Kromě toho CE9 $\gamma 4$ PE obsahuje substituci prolinem v ohybové oblasti, zamýšlenou zvýšit stabilitu interakce disulfidové vazby těžkého řetězce.

Bylo nalezeno, že tyto protilátky jsou nerozeznatelné v jejich afinitě pro CD4, molekulové hmotnosti, stabilitě k tepelné denaturaci, supresi MLR, chybění vazby k FcR a nedostatku aktivity v ADCC a CDC. Tedy obě tyto protilátky splňují *in vitro* kritéria pro vysokoafinitní mAb CD4, které nemají žádné efektorové funkce FcR a komplementu.

Vlastnosti CE9.1 a CE9 $\gamma 4$ PE jsou srovnány v tabulce 1. Snížená vazba receptoru Fc se vztahuje k chimérickým protilátkám, které vážou k receptoru Fc méně než 1 chimérickou protilátku obsahující $\gamma 1$, výhodné je snížení alespoň o 30 až 80 % ve srovnání s tím, a výhodnější je snížení alespoň o 50 až 80 % a nejvýhodnější je úplné odstranění. Avšak, jak doloženo výsledky s nemodifikovanou chimérickou protilátkou gama 4, požadovaný výsledek nebyl předpověditelné povahy.

Tabulka 1

Srovnání efektorových funkcí CE9.1 a CE9γ4PE

Aktivita	CE9.1	CE9γ4PE
<i>In vitro</i>		
MLR	ano	ano
Vazba Clq	slabá	ne
CDC	ne	ne
ADCC	ano	ne
Vazba FcR	ano	ne
<i>In vivo (šimpanz)</i>		
Deplece buněk CD4	částečná	ne
Modulace receptoru CD4	ano	ano
<i>In vivo (transgenní myši HuCD4⁺)</i>		
Deplece buněk CD4	částečná	ne
Modulace receptoru CD4	ano	ano
ADCC = buněčná cytotoxicita závislá na protilátce		
CDC = buněčná cytotoxicita zprostředkovaná komplementem		
FcR = receptor Fc		
MLR = smíšená lymfocytární reakce		

Tyto výsledky tedy potvrzují, že podle vynálezu jsou tvořeny chimérické protilátky, které váží lidský CD4, které postrádají určité efektorové funkce následkem selekce specifických sekvencí konstantních domén.

Při použití chimérických protilátek anti-CD4 doložených v příkladech nebo jiných chimérických protilátek tvořených podle vynálezu jako imunosupresiv nebo modulátorů CD4 pro léčbu autoimunitních nemocí, včetně například revmatoidní artritidy, jsou takové protilátky podávány samotné nebo v kombinaci s dalšími sloučeninami vhodnými pro léčbu

konkrétního chorobného stavu. Například předmětná protilátka může být podávána v kombinaci s dalšími proteiny, jako jsou například monoklonální protilátkové rozpustné receptorové proteiny k TNF-alfa, monoklonální protilátky k receptoru IL-2, monoklonální protilátky a receptorové fúzní proteiny, které antagonizují interakci CD40/gp39 a CTLA 4-IgG v monoklonálních protilátkách, které antagonizují interakci B7/CD28. Také, v případě léčby revmatoidní artritidy, mohou být předmětné protilátky podávány v kombinaci s dalšími léčivy, jako je například Rapamycin, Leflunomid, Tenidap, RS-61443 (mykofenolát mofetil), Surenyl (hyaluronát sodný), peptidová vakcína anti-TCR (V β 17), Anerva X (vakcína anti-MHC) a extrakorporální imunoabsorbenty proteinu A nebo jejich kombinace. Dodatečně může být předmětná protilátka podávána v kombinaci s dalšími protilátkami tvořenými podle vynálezu nebo v oboru známými, které jsou specifické pro lidský CD4. To má za následek synergické účinky, například jestliže se tyto protilátky váží k odlišným epitopům proteinu CD4.

Následující příklady jsou uvedeny pro další popis vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Klonování a exprese opičí/lidské chimérické protilátky se specifitou k CD4

Následující popis je specifický příklad způsobů a protilátek tohoto vynálezu.

Vytváření imortalizovaných linií opičích B buněk

Dospělá opice *Macaca fascicularis* (White Sands New Mexico Primate Center) byla intramuskulárně imunizována na četných místech 150-300 μg rozpustného CD4 (sCD4) nebo buněčnými membránami (1×10^8 buněk) z CD4 pozitivní buněčné linie SupT1 za použití standardního adjuvans. Imunizace se opakovala každé 2-3 týdny celkem šestkrát. Opici byla dána druhá injekce 100 μg sCD4 do inguinální oblasti stehna a o týden později byla chirurgicky odstraněna drenážní lymfatická uzlina z téhož stehna. Lymfocyty byly z lymfatické uzliny odstraněny nařezáním tkáně na plátky a propláchnutím sterilním médiem DMEM. Buněčná suspenze byla procezena skrze nylonové sítko a sebrána odstředěním v 1000 x g po dobu 10 minut.

Přibližně 1×10^8 lymfocytů bylo suspendováno v Tris-amonium chloridovém pufru (16 mM, pH 7,5) a zahřáto na 37 °C po dobu 45 minut. Buňky ošetřené LME byly filtrovány přes nylonový filtr a stočeny. Přidal se 1 ml fetálního telecího séra, buňky se suspendovaly a dvakrát promyly v RPMI bez séra. Buňky byly spočítány a promíchány v jedné 50 mililitrové kónické centrifugační zkumavce se stejným množstvím heteromyelomových buněk K6H6/B5, předem dvakrát promytých v médiu bez séra. Buňky byly jemně suspendovány v 1 ml 50% PEG (polyetylenglykol) přidávaném pomalu s jemným mícháním po dobu 1 minuty. Buňky byly poté resuspendovány přidáním 20 ml média bez séra po dobu 5 minut za mírného míchání, aby se rozředil PEG. Po dvojím promytí médiem bez séra byly buňky resuspendovány v koncentraci $5 \times 10^5/0,1$ ml v médiu RPMI, obsahujícím 20% fetální telecí sérum a gentamycin a umístěny na 96jamkové mikrodestičky pro tkáňové kultury v množství 0,1 ml na jamku. Do každé jamky byl

přidán stejný objem média HAT (0,1 ml) a hybridům bylo umožněno růst po dobu 14-17 dnů před testováním.

Testování fúzovaných buněčných hybridů na tvorbu anti-CD4

Test na určování specifity anti-CD4 byl proveden, jak je popsáno dále: destičky pro ELISA byly povlečeny rekombinantní sCD4 v koncentraci 100 ng na jamku a blokovány 1% bovinním sérovým albuminem v PBS. Z každé jamky byly odstraněny poměrné části 50 μ l hybridomového supernatantu a nechaly se inkubovat po dobu 60 minut s destičkami povlečenými sCD4. Vazba byla detekována inkubací s kozím proti-lidským nebo kozím proti-opičím IgG značeným 125 I po dobu 60 minut. Po promytí čtyřikrát destilovanou vodou byly jamky vzhodnoceny počítačem impulzů gama. Pozitivní jamky byly v duplikátech testovány znovu a hybridomové buňky z těchto jamek byly třikrát subklonovány, poprvé v 5 buňkách na jamku a poté dvakrát v 1 buňce na jamku. V tomto stadiu byly pozitivní anti-sCD4 testovány na schopnost vázat se k CD4 na buněčném povrchu. To bylo provedeno inhibicí vazby myší monoklonální anti-CD4, nazývané 1F3, k CD4 pozitivní buněčné linii supT1. V krátkosti to bylo provedeno společnou inkubací různých množství opičí anti-CD4 a 10 μ g 1F3 značené 125 I s 3×10^5 buněk supT1 na 1 jamku v 96jamkové destičce. Po 1 hodině inkubace při teplotě místnosti (20-25 °C) byly buňky pomocí vakua přemístěny na filtry ze skleněných vláken. Po důkladném promytí PBS byly filtry vyhodnoceny počítačem impulzů gama, aby se určila inhibice vazby 1F3 na buňky supT1 supernatanty opičích hybridomů.

Byl vybrán klon, který tvořil protilátku, která vykazovala silnou inhibici proti 1F3. Klon byl izotypizován za použití lidských izotypizujících reagensií a bylo shledáno, že je IgG2 a má lehký řetězec lambda. Tato buněčná

linie byla pěstována do velkého množství pro klonování jejích imunoglobulinových genů.

Klonování genů variabilní oblasti těžkého a lehkého řetězce z opičích imortalizovaných B buněk

Z 1×10^7 opičích imortalizovaných B buněk byla izolována celková RNA za použití guanidiniumizothiokyanátové metody. Jedna desetina celkové RNA byla použita, aby se vytvořila jednovláknová cDNA za použití oligonukleotidového primeru oligo-dT a reverzní transkriptázy. Jedna desetina množství jednovláknové cDNA byla použita pro reakce PCR (polymerázová řetězová reakce). Každá ze šesti reakcí PCR obsahovala jeden ze šesti 5' oligonukleotidových primerů specifických pro rodinu V_H obsahujících restriční místo Sal I spolu s 3' oligonukleotidem pro konstantní oblast IgG obsahujících místo Nhe I, obojí je ukázáno na obrázku 7-1. Podobně probíhalo pět reakcí PCR, které využívají jeden z pěti 5' oligonukleotidových primerů pro vedoucí sekvenci lambda obsahujících místo Bgl II a 3' primer pro konstantní oblast lambda obsahující místo Avr II. Reakční podmínky byly jak popsáno výše. Každá reakce PCR byla provedena v trojnásobném opakování. Produkty z každé amplifikační reakce pro těžký a lehký řetězec byly analyzovány na 1,2% agarózových gelech. Primer pro těžký řetězec CH4 (5'-ACTAAGTCGACATGAAACACCTGTGGTTCTT-3') a primer lambda (5'-ATCACAGATCTCTCACCATGACCTGCTCCCCTTCTCCTCC-3') dávaly silné pásy při elektroforéze v agarózovém gelu. Produkty těchto reakcí byly použity pro klonování do vektoru TCAE 6, který obsahuje sekvence konstantní oblasti lidského IgG1 a lambda.

Klonování dvou genů variabilní oblasti do expresního vektoru TCAE 6 bylo prováděno postupně. Zaprvé byly produkt PCR těžkého řetězce a vektor TCAE 6 štěpeny restričními

enzymy Sal I a Nhe I, produkty byly poté extrahovány fenolem/chloroformem a přečištěny přes centrifugační kolonu SEPHADEX G-25. Produkt PCR byl ligován do naštěpeného vektoru přes noc ve 14 °C v přítomnosti DNA ligázy T4. Přibližně 500 ng celkové DNA se ligovalo v objemu 10 µl v molárním poměru inzert/vektor 10:1. Ligovaný materiál se použil k transformaci kompetentních buněk XL-1 Blue (Stratagene) a transformované buňky byly vysety na misky s agarem LB obsahujícím ampicilin v koncentraci 50 µg/ml. Kolonie bakterií rezistentních na ampicilin byly sebrány a pěstovány jako 5 mililitrové tkáňové minikultury. Z každé z těchto kultur byla extrahována plazmidová DNA standardní metodou alkalické lýzy, naštěpena restriktčními enzymy Sal I a Nhe I a produkty byly rozděleny na 1,2% agarózovém gelu. Plazmidy s inzerty o přibližné velikosti 450 bp byly použity jako templáty pro následné klonování variabilních oblastí lehkého řetězce. Produkty reakce PCR pro lehký řetězec, a také plazmid obsahující inzert těžkého řetězce byly naštěpeny restriktčními enzymy Bgl II a Avr II a ligovány k sobě. Plazmidové minikultury byly testovány štěpením s Bgl II a Avr II. Štěpné produkty, které udávaly inzert přibližné velikosti 400-450 bp byly považovány za pozitivní. Plazmidy obsahující oba inzerty Sal I/Nhe I a Bgl II/Avr II byly pěstovány ve větším množství pro sekvenování DNA.

Expresní vektory TCAE 5.2 a TCAE 6 pro tandemové chimérické protilátky byly odvozeny z vektoru CLDN, který sám je derivát vektoru RLDN10b (Science, 253, 77-79, 1991). RLDN10b opět je derivátem expresního vektoru TND (DNA, 7, 651-661, 1988).

RLDN10b se liší od vektoru TND v následujícím. Transkripční kazeta (promotor, cDNA a polyadenylační oblast) pro dihydrofolátreduktázu (DHFR) byla umístěna mezi kazetu

tkáňového aktivátoru plazminogenu (t-PA expresní kazeta) a kazetu neomycinfosfotransferázy (NEO) tak, že všechny tři kazety jsou zařazené jedna za druhou a v téže transkripční orientaci. Navíc promotor genu DHFR v CLDN byl nahrazen hlavním promotorem myšího beta globinu (Mol. Cell Biol., 3, 1246-54, 1983) a cDNA t-PA nahrazena mnohočetným klonovacím místem (polylinker). Všechny tři eukaryotické transkripční kazety (expresní, DHFR, NEO) mohou být odděleny od bakteriální plazmidové DNA (derivát pUC9) štěpením s restriční endonukleázou Not I.

CLDN se liší od RLDN10b, protože LTR z Rousova viru před polylinkerem byl nahrazen promotorovým zesilovačem časného genu lidského cytomegaloviru (Cell, 41, 521, 1985).

Expresní vektory TCAE 5.2 a TCAE 6 se liší od CLDN v tom, že:

1) obsahují čtyři transkripční kazety (místo tří) seřazené za sebou:

a) konstantní oblast lehkého řetězce lidského imunoglobulinu získaného prostřednictvím amplifikace cDNA polymerázovou řetězovou reakcí. V TCAE 5.2 to je konstantní oblast lehkého řetězce kappa lidského imunoglobulinu (Kabatovo číslování aminokyselin 108-214, alotyp Km3), a v TCAE 6 konstantní oblast lehkého řetězce lambda lidského imunoglobulinu (Kabatovo číslování aminokyselin 108-215, genotyp Oz minus, Mcg minus, alotyp Ke minus),

b) konstantní oblast těžkého řetězce lidského imunoglobulinu, v obou konstruktech to byla konstantní oblast gama 1 těžkého řetězce lidského imunoglobulinu (Kabatovo číslování aminokyselin 114-748, alotyp Gmla, Gmlz), která byla odvozena prostřednictvím amplifikace cDNA polymerázovou řetězovou reakcí,

c) DHFR, obsahující svůj vlastní eukaryotický promotor a polyadenylační oblast,

d) NEO, také má svůj vlastní eukaryotický promotor a polyadenylační oblast.

2) Kazety lehkého a těžkého řetězce lidského imunoglobulinu obsahují syntetické signální sekvence pro sekreci imunoglobulinových řetězců.

3) Kazety lehkého a těžkého řetězce lidského imunoglobulinu obsahují specifické spojky DNA, které umožňují inzerci variabilních oblastí lehkého a těžkého řetězce imunoglobulinu, které udržují translační čtecí rámec a nepozměňují aminokyseliny normálně nalézané v imunoglobulinových řetězcích. Zavedení popsanych změn vedlo ke konstrukci vektorů TCAE 5.2 a TCAE 6. Klonování genů pro variabilní oblasti lehkého a těžkého řetězce imunoglobulinu z buněčné heterohybridomové linie anti-CD4 E9.1 do TCAE 6 vedlo ke konstrukt, který je uložen v ATCC. Konstrukt, který byl uložen, a který kóduje protilátku CE9.1, obsahuje variabilní oblast těžkého řetězce imunoglobulinu *Macaca fascicularis* a variabilní oblast lehkého řetězce imunoglobulinu *Macaca fascicularis*, jejichž sekvence jsou ukázány na obrázcích 1 a 2, klonované z anti-CD4 buněčné hybridomové linie E9.1. Konstantní oblast těžkého řetězce je lidského původu izotypu gama 1 a alotypu Gm1a, Gm1z. Konstantní oblast lehkého řetězce lambda je také lidského původu, genotypu Oz minus, mcg minus a alotypu Ke minus. Imunoglobulinové geny jsou klonovány do savčího expresního vektoru TCAE 6, popsaném ve výše zmíněných aplikacích zahrnutých v odkazech, který, je-li zaveden elektroporací do savčí buněčné linie CHO, tvoří chimérickou opičí/lidskou protilátku anti-CD4. Konstrukt DNA popsany v tomto textu byl použit pro transformaci bakteriálního kmene XL-1 Blue,

vybrán pomocí antibiotika ampicilinu a uložen jako bakteriální buněčná suspenze ve sterilním živném médiu LB obsahujícím 15% glycerol.

Sekvenování DNA

Plazmidová DNA byla připravena ze 100mililitrových kultur. Byla dále purifikována precipitací (1 objem) se směsí 2,5 M chloridu sodného a 20% polyetylglykolu (6 objemů) na ledu po 15 minut. Po stočení v 10 000 x g po dobu 20 minut byla peleta omyta 70% etanolem, opět stočena a usušena v přístroji Speedivac (Savant). Peleta DNA byla resuspendována v deionizované vodě v koncentraci 150-250 µg/ml. Sekvenování se provádělo s 5 µg dvojvláknové DNA za použití techniky dle Sangera. Byla použity sekvenační primery, které byly homologní k sekvencím v expresním vektoru v protisměru a po směru čtení každého z inzertů lehkého řetězce a těžkého řetězce. Inzerty byly sekvenovány v obou směrech, 5' až 3' a 3' až 5'. Dva klony lehkého řetězce anti-CD4 a dva klony těžkého řetězce anti-CD4, které vznikly z nezávislých reakcí PCR, byly sekvenovány paralelně, aby se určilo, zda nebyla zavedena nějaká nukleotidová změna během reakcí PCR. Oba z vybraných klonů těžkého řetězce a oba klony lehkého řetězce byly shledány identickými po celé délce, což potvrdilo, že během amplifikačního procesu nebyly zavedeny žádné chyby. Sekvence anti-CD4 lehkých a těžkých řetězců jsou ukázány na obrázcích 1 a 2.

Exprese opičí/lidské chimérické anti-CD4

Expresní vektory TCAE 5.2 a TCAE 6 jsou schopné nejen trvalé exprese v buněčných liniích Sp2/0 a CHO, ale protože obsahují počátek SV40, jsou také schopné přechodné exprese v buněčné linii COS. Exprese v buňce COS byla provedena, jak

následuje: buňky COS byly vysety den před transfekcí, takže mohly následující den z 50-70 % splývat. Kultivační médium bylo odstraněno a buňky byly dvakrát promyty transfekčním pufrem (TB- 140 mM NaCl, 25 mM Tris, 5 mM KCl, 0,5 mM Na₂HPO₄, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂). 30 µg plazmidu TCAE 6, purifikovaného chloridem cesným a obsahujícího anti-CD4 opičí/lidské chimérické imunoglobulinové těžké a lehké řetězce, se smísilo se 3 ml DEAE dextranu na misku (1 mg/ml v TB). DNA se inkubovala s buňkami po 1 hodinu ve 37 °C. Roztok DNA byl odstraněn a nahrazen 3 ml 20% glycerolu po dobu 1,5-2,5 minuty, po které byly buňky dvakrát promyty TB. Buňky se inkubovaly v 5 ml čerstvého média obsahujícího 100 µM chlorochin po 3-5 hodin ve 37 °C, a poté byly dvakrát promyty médiem a inkubovaly se 72 hodin s normálním DMEM. Supernatant (100 µl) z transfekovaných buněk COS byl testován v různých ředěních na přítomnost protilátky technikou založenou na testu ELISA. Kozí proti-lidská lambda byla použita k povlečení 96jamkových testovacích destiček a jako detekční protilátka byl použit kozí proti-lidský IgG značený peroxidázou, za standardních podmínek pro testy ELISA. Bylo shledáno, že buňky COS tvoří mezi 10 a 40 ng/ml opičí/lidské chimérické protilátky. Větší objemy supernatantu byly 10x koncentrovány a použity pro přímý vazebný test RIA k CD4 pozitivním buňkám SupT1. Jako pozitivní a negativní kontroly byly použity parentální celá opičí protilátka a irelevantní lidský imunoglobulin. Opičí anti-CD4 a opičí/lidská chimérická anti-CD4 byly také použity pro inhibici vazby vysoce afinitní myší protilátky anti-CD4 (1F3). Tyto výsledky dokázaly, že opičí/lidská rekombinantní protilátka (ATCC č. 69030) se nejenom váže k CD4 pozitivním buňkám, ale je schopná inhibovat vazbu 1F3 k

CD4 pozitivním buňkám v přibližně týchž koncentracích celé opičí protilátky nebo samotné 1F3.

Příklad 2

Tento příklad se týká *in vitro* funkční charakterizace CE9.1, včetně jejího působení na T buněčnou proliferaci a produkci IL-2 v MLR, jejích vazebných vlastností k receptoru Fc a komplementu, a její kapacity zprostředkovávat odpovědi ADCC a CDC. Kromě toho, byly analyzovány účinky *in vivo* na mediaci receptoru CD4 a lymfoidních podskupin v periferní krvi. Bylo analyzováno následující. V tomto příkladě byly použity následující materiály a metody. (Anderson et al., „*In vitro* and *in vivo* characterization of a primatized mAb to human CD4: mAb causes CD4 receptor modulation but not CD4 T cell depletion in chimpanzees”).

Materiál a metody

Molekulární konstrukce a exprese PRIMATIZED™ anti-CD4

Variabilní oblasti imunoglobulinových genů byly amplifikovány PCR a klonovány z heterohybridomů pocházejících z opice imunizované sCD4, jak bylo dříve popsáno (Newman, R.A., et al., „Primatization of recombinant antibodies for immunotherapy of human disease: a macaque/human chimeric antibody against human CD4“, *Biotechnology*, 10, 1455, 1992). Geny variabilních oblastí těžkého a lehkého řetězce byly vloženy do kazetového expresního vektoru, TCAE 6, zařazené za sebou, a exprimovány jako IgG1 λ po trvalé integraci do buněk CHO DHFR⁻ (Newman, výše). Tři běhy amplifikace při zvyšujících se množstvích metotrexátu umožnily vývoj buněčných linií, které expimovaly více než 750 μ g/ml protilátky po dobu 8 dnů.

Vznikla produktivní buněčná linie, která byla pěstována v suspenzní kultuře a progresivně expandovala před inokulací do bioreaktoru z dutých vláken (Evans et al., „Large-scale production of murine monoclonal antibodies using hollow fiber bioreactors“, BioTechniques, 6(8), 762, 1988).

mAb CE9.1 byla purifikována průchodem supernatantu tkáňové kultury z reaktoru přes kolonu Prosep A (300 ml, Bioprocessing Inc.), která byla předem ekvilibrována fyziologickým roztokem pufrovaným fosfátem, pH 7,2, rychlostí 125 ml/min. Kolona byla promývána PBS dokud nebyl dosažen základní výchozí stav, a navázaná protilátka pak byla eluována 5násobkem objemu kolony 0,2 M kyseliny octové/0,1 M glycinovým pufrem, pH 4,0. Výtěžek byl 90%. Eluát byl upraven na pH 5,5 a přečištěn přes kolonu Q-Sepharose (Pharmacia). CE9.1 navázaná na kolonu byla promyta 25 mM Tris-HCl, pH 8,5. Protilátka byla eluována 50 mM Tris-HCl, pH 6,5, obsahujícím 100 mM NaCl a koncentrována filtrací (Millipore Pellicon) proti normálnímu fyziologickému roztoku pro injekce dle USP. CE9.1 se nakonec filtrovala přes filtr 0,04 μm Nylon₆₆ NDP (Pall Filtration).

Vazebná specifita: vazba CE9.1 k buňce SupT-18 CD4⁺

Devadesátišestijamkové mikrotitrační destičky se dnem jamek ve tvaru U (Corning) byly předem blokovány po 1 hodinu na ledu s PBS obsahujícím 0,2% bovinní sérový albumin a 0,1% azid sodný. Buňky SupT-18 (1×10^5), předem promyté tímž pufrem, byly 30 minut inkubovány na ledu s různými koncentracemi CE9.1 (2,4 pg/ml - 10 $\mu\text{g/ml}$). Buňky byly dvakrát promyty a inkubovány 30 minut na ledu s protilátkou druhé vrstvy (koží proti-myši Ig značený FITC). Buňky byly dvakrát promyty, resuspendovány ve fixačním pufru (2%

formaldehyd v PBS) a analyzovány za použití průtokového cytometru FACScan (Becton Dickinson).

Vazebná specifita: průtoková analýza vazby CE9.1 k lidským leukocytům periferní krve

Mononukleární buňky byly izolovány z lidské periferní krve za použití standardní centrifugační techniky s Ficoll/Hypaque (Boyum, A., „Separation of blood leukocytes, granulocytes and lymphocytes“, Tissue Antigens, 4, 269, 1974). Vrstva na rozhraní (interfáze) obsahující mononukleární buňky periferní krve (PMNC) byla odebrána, promyta Hanksovým izotonickým roztokem (HBSS) a buňky byly spočítány. 5×10^6 buněk se inkubovalo s 20 μ l CE9.1 (25 μ g/ml), po 30 minut ve 4 °C. Buňky byly poté promyty s HBSS a inkubovány s 20 μ l kozího proti-lidského IGG-FITC (Fisher Scientific). Po inkubaci na ledu po dalších 30 minut byly buňky analyzovány na přístroji FACScan firmy Becton Dickinson za použití autokompence a prekalibrace s kuličkami Calibrite. Živé lymfocytární populace byly rozpoznány rozptylem přímého a pravoúhlého světelného paprsku a byla tak ohraničena celková populace lymfocytů. Následná měření fluorescence zaznamávala pouze vymezené lymfocytární jevy. mAbs použité pro kvantifikaci dvojité značených buněk a následné studie na šimpanzí krvi zahrnovaly proti-lidský CD3 (Leu-4-FITC, Becton Dickinson), proti-lidský CD5 konjugovaný s fluoresceinem (Leu-2a-FITC, Becton Dickinson), proti-lidský CD8 konjugovaný s fykoerytrinem (Leu-2a-PE, Becton Dickinson), proti-lidský CD20 konjugovaný s fykoerytrinem (Leu-16-PE, Becton Dickinson), kozí proti-lidský IgG F(ab')₂ konjugovaný s fluoresceinem (Cappel) a myši anti-CD4 konjugovaný s fykoerytrinem (OKT4, Ortho Pharmaceuticals).

Zkřížená reaktivita lidské tkáně

Hodnotila se zkřížená reaktivita CE9.1 na normální lidské tkáni. Biotinylovaná CE9.1 se testovala na zmrazených tkáňových řezech nařezaných na kryostatu ze 32 různých tkání za použití avidin-biotinové imunoperoxidázové techniky (Wilchek, M., et al., „The avidin-biotin complex in bioanalytical applications“, Anal. Biochem., 171, 1, 1983). Buňky SupT1 (CD4⁺) byly použity jako pozitivní kontrola a buňky SB (CD4⁻) jako negativní kontrolní buněčná linie. Irelevantní biotinylovaná myši/lidská (IgG1) chimérická protilátka byla použita jako negativní protilátková kontrola.

Pro většinu tkání byly vyšetřovány tři nezávislé vzorky a reaktivita s CE9.1 byla hodnocena ve škále od 0 do 3⁺. V některých tkáních byly různé struktury ve tkáni hodnoceny odděleně. Například v játrech byla hodnoceny nezávisle hepytocyty, žlučovody a Kupfferovy buňky.

Druhová specifita

Periferní krev několika běžných laboratorních primátů a jiných zvířat byla testována s CE9.1 na rozpoznání možné zkřížené reaktivity T buněk CD4 pozitivních. Skupina zahrnovala šimpanze, paviány, *Macaca rhesus*, *Macaca fascicularis* a *Macaca nemestrina*, krysy, myši, králíky a psy. Krevní buňky byly izolovány z 1-5 ml plné krve odstředěním (1500 rpm po 5 min) ve 4 °C a promyty resuspendováním ve stejných objemech PBS. Procedura se opakovala ještě jednou a buňky se resuspendovaly ve stejných objemech fetálního bovinního séra. Dvě stě mikrolitrů buněčné suspenze od každého druhu bylo umístěno do 15mililitrové kónické centrifugační zkumavky s 20 µl CE9.1

(25 mg/ml). Protilátka a buňky se smíchaly, umístily na led po 30 minut, a poté se důkladně promyly s HBSS. Pak se přidalo 20 μ l kozího proti-lidského IgG-FITC (Fisher Scientific) a vzorky se promíchaly. Po inkubaci na ledu po dalších 30 minut byly vzorky z ledu odstraněny a bylo přidáno 10 ml lyzujícího pufru (0,01 M hydrogenuhličitan draselný, pH 7,4, obsahující 0,16 M chlorid amonný a 0,1 M EDTA sodnou sůl), předeřátého na 37 °C. Vzorky se inkubovaly při teplotě místnosti po 15 minut, následovalo odstředění v 1500 rpm po 5 minut. Označené buněčné pelety byly ještě dvakrát promyty v HBSS (pH 7,4) obsahujícím 1% bovinní sérový albumin a 0,05% azid sodný. Označené buňky se fixovaly resuspendováním ve fixačním pufru (0,5 M chlorid sodný obsahující 1,0% formaldehyd, filtrován přes 0,22 μ m filtr). Vzorky se analyzovaly na přístroji FACScan firmy Becton Dickinson, jak popsáno výše.

Funkční testy *in vitro*: jednocestná a trojcestná smíšená lymfocytární reakce

Lidské nebo šimpanzí T buňky ($1,3 \times 10^5$) byly pěstovány s nebo bez CE9.1 v mikrojammkách s plochým dnem po sedm dnů s PBMC ($6,0 \times 10^4$) ošetřenými mitomycinem C, získanými od nepříbuzného dárce lidského nebo šimpanzího původu. Během posledních 18 hodin kultivace byl do kultur přidán ^3H -thymidin, a sice 1 μCi /jamka. Mikrotitrační destičky byly stočeny, buněčné pelety promyty HBSS a poté se počítaly impulzy kapalinovým scintilačním počítačem. Každý vzorek se vyhodnocoval ve třech opakováních.

Lidské MLR se prováděly se vzorky od tří nezávislých nepříbuzných dárců, které byly užity jako stimulátorové a odpovídavé směsi. Tento laboratorní protokol byl použit, aby se maximalizovala možnost dobré odpovědi u náhodných, na HLA

necharakterizovaných vzorků krve (resp. krevních buněk z „buffy coat“) dárců z Červeného kříže. V tomto protokolu nebyl žádný dárcovský vzorek krve ošetřen mitomycinem C ani ozářen.

Adhezivní test buněk THP-1 pro měření vazebné aktivity receptoru Fc pro CE9.1

Tento test závisí na přemostění dvou buněčných linií, jedné exprimující receptor CD4 a druhé receptor Fc, protilátkou anti-CD4. Použitý účastník exprimující CD4 byla adherující myší fibroblastová buněčná linie DAP, která byla transfekována lidskou CD4 (DAP/CD4). Buňky nesoucí receptor Fc byly THP-1. Buňky DAP/CD4 byly umístěny na 96jamkové destičky s plochým dnem (100 μ l/jamka), 25 000 buněk/jamka) a nechaly se přes noc adherovat. Buňky THP-1 byly resuspendovány v 50 ml média RPMI (1×10^6 buněk/ml) a indukovány po 24 hodin ve 37 °C přidáním 50 U/ml γ IFN.

Buňky THP-1 indukované γ IFN byly obarveny kalcinovaným methoxyacetátem, CAM (Molecular Probes), a to následovně: buňky byly promyty plnicím pufrem (PBS dle Dulbecca s vápníkem a hořčíkem a 0,1% bovinním sérovým albuminem) a resuspendovány v množství 5×10^6 buněk/ml v 10 ml téhož pufru. CAM (1 mg/ml v DMSO) byl naředěn (1:50) plnicím pufrem a přidán k buněčným suspenzím THP-1 v poměru 1:1 (objem/objem). Po inkubaci po 20 minut při teplotě místnosti, bylo přidáno ke každým 4 ml směsi buňky/CAM 20 ml čerstvého plnicího pufru a inkubace pokračovala dalších 40 minut při teplotě místnosti. Buňky byly poté dvakrát promyty plnicím pufrem a resuspendovány v množství 8×10^6 buněk/ml. Sériová ředění CE9.1 v PBS (bez vápníku, hořčíku nebo BSA) byla přidána do jamek obsahujících buňky DAP CD4⁺ a inkubována po 5 minut při teplotě místnosti. Poté bylo

přidáno 50 μ l buněčné suspenze THP-1 obarvené CAM a destičky se inkubovaly 1 hodinu při teplotě místnosti ve tmě. Testovaly se také kontrolní jamky bez buněk DAP. Po inkubaci byly jamky třikrát promyty s PBS. Po závěrečném promytí se přidalo 100 μ l PBS na jamku, následováno 10 μ l 20% Tritonu X-100. Po umístění na třepačce po 10-15 sekund, se destičky odečítaly na přístroji Fluoroscan (MTX Lab systems Inc.).

Vazebný test s aktivovanými monocyty pro měření vazebné aktivity receptoru Fc pro CE9.1

Test receptoru Fc byl proveden, jak bylo popsáno pro buňky THP-1 výše, kromě následujících odlišností. Monocyty byly připraveny z čerstvé lidské periferní krve standardní gradientovou separací pomocí Ficoll/Hypaque a Percoll. Monocyty byly stimulovány s γ IFN, jako výše, ale po dobu 48 hodin. Destičky byly povlékány stimulovanými monocyty po 24 hod., a v tomto testu byla CAM, popsaným výše, obarvena linie SupT-18 CD4⁺. Buňky SupT-18 byly poté přidány na destičky povlečené stimulovanými monocyty. Hlavní rozdíl v tomto testu je buněčná linie CD4⁺ obarvená CAM a přidaná k buňkám na destičce nesoucím FcR. Ve výše uvedeném testu používajícím buňky THP-1 byl pořádek obrácený.

Vazba k myším fibroblastům transfekovaným Fc γ RII

Myší fibroblastová buněčná linie (CDW32-L), která byla transfekována lidským FCRH, byla získána od ATCC. Přímá vazba CE9.1 byla stanovena inkubací protilátky v přítomnosti a nepřítomnosti sCD4. Vazba CE9.1 se detekovala inkubací s kozími proti-lidskými Ig-protilátkami konjugovanými s křenovou peroxidázou (Southern Biotech). Fragmenty Fab CE9.1 vznikaly enzymatickým štěpením a byly použity jako negativní kontroly. Hodnoty absorbance získané z CE9.1 (a fragmentů

Fab) preinkubovaných s buňkami za přítomnosti sCD4 byly odečteny od absorbancí získaných pro protilátky v nepřítomnosti sCD4.

Test ADCC (lýze buněk SupT1)

Byly odebírány čerstvé vzorky heparinizované lidské krve a izolovány PMNC standardními centrifugačními postupy na Ficoll/Hypaque. Červené krvinky z interfáze se lyzovaly pufrem s chloridem amonným a buňky byly dvakrát promyty v Hankově izotonickém roztoku. Lymfocyty periferní krve (PBLs) se stimulovaly 10 jednotkami IL-2 na ml RPMI/10% fetálního telecího séra (FCS) po 24 hodin ve 37 °C a 5% CO₂. Po 24 hodinách byly PBLs resuspendovány v RPMI/5% FCS.

Buňky SupT1-18 (1 x 10⁶) byly značeny inkubací se 100 µCi ⁵¹Cr po 1 hodinu ve 37 °C a 5% CO₂. Buňky byly dvakrát promyty s RPMI/5% FCS a 1 x 10⁴ buněk bylo přidáno do každé jamky. Tři dávky protilátky CE9.1 byly sériově naředěny 1:2 s RPMI/5% FCS a poměrné části byly přidány ve třech opakováních do jamek obsahujících SupT1-18 po 30 minut ve 37 °C a 5% CO₂. Jako kontrola maximálního a spontánního uvolnění bylo použito 100 µl 1% Tritonu X-100 a 100 µl média. Do jamek se přidaly PBLs stimulované IL-2 (8 x 10⁵ buněk). Destičky se stočily 3 minuty v 900 rpm a inkubovaly 16 hodin ve 37 °C a 5% CO₂. Byl odebrán supernatant z každé jamky a množství radioaktivity se odečítalo počítačem impulzů gama. Test byl proveden v trojnásobném opakování. Procento buněčné lýzy se určilo za použití následujícího vzorce:

$$\% \text{ lýzy} = \frac{(\text{počet impulzů vzorku} - \text{spontánní počet})}{\text{maximální počet impulzů} - \text{spontánní}} \times 100$$

Clq vazebný test

Clq vazebný test se prováděl pomocí CD4 pozitivní buněčné linie SupT-18 v suspenzi 4×10^6 /ml. K cílovým buňkám CD4 pozitivním v množství 2×10^5 byla přidána CE9.1 a kontrolní afinitní purifikovaná opičí anti-CD4 protilátka (50 μ l) ve stejné koncentraci 20 μ g/ml. Buněčná suspenze a protilátky byly inkubovány po 1 hodinu na ledu, a poté dvakrát promyty 1% BSA v PBS. Do každé zkumavky bylo přidáno 50 μ l lidského Clq (10 μ g/ml) a inkubováno 1 hodinu na ledu. Každá zkumavka byla dvakrát promyta a fixována v 0,5 ml 1% formaldehydu/PBS. Buňky se analyzovaly na průtokovém cytometru FACScan firmy Becton Dickinson za použití programového vybavení Consort 30 pro sběr a analýzu dat.

Test cytotoxicity zprostředkované komplementem

Buňky SupT-18 1×10^6 byly značeny inkubací se 100 μ Ci ^{51}Cr po 1 hodinu ve 37 °C, 5% CO_2 . Buňky byly dvakrát promyty s RPMI/5% FCS a do každé jamky bylo přidáno 1×10^4 buněk. Protilátky CE9.1a kontrolní anti-CD4 byly sériově naředěny 1:2 s RPMI/5% FCS a poměrné části 50 μ l byly přidány v triplicátech do jamek obsahujících SupT-18. Do jamek se přidalo 100 μ l 1% Tritonu X-100 nebo 100 μ l média, aby se změřilo maximální a spontánní uvolňování ^{51}Cr . Po 90 minutách inkubace ve 37 °C, 5% CO_2 byl do jamek přidán králíčí komplement (Cappel) naředěný 1:5. Destičky se inkubovaly dalších 90 minut ve 37 °C, 5% CO_2 , a poté se stočily 3 minuty v 900 rpm. Z každé jamky byl odebrán supernatant a množství radioaktivity se odečítalo na počítači impulzů gama. Test byl proveden v trojnásobném opakování. Procento buněčné lýze se určilo za použití následujícího vzorce:

$$\% \text{ l\acute{y}zy} = \frac{(\text{počet impulzů vzorku} - \text{spontánní počet})}{\text{maximální počet impulzů} - \text{spontánní}} \times 100$$

Studie na šimpanzech *in vivo*

Šest šimpanzů bylo rozděleno do tří skupin po dvou zvířatech: skupina I (kontrolní fyziologický roztok), skupina II (10,0 mg/kg protilátky CE9.1) a skupina III (10,0 mg/kg protilátky CE9.1). Zvířata ve skupině II byla ošetřena znovu 10,0 mg/kg CE9.1 po 30 dnech, pod podmínkou, že se počet jejich T buněk CD4⁺ vrátil na 30 % výchozího stavu. Zvířata ve skupině II byla ošetřena znovu 10,0 mg/kg CE9.1 po 30 dnech, pod podmínkou, že se počet jejich T buněk CD4⁺ vrátil na 70 % výchozího stavu. Jestliže tyto hodnoty nebyly 30. den dosaženy, byla zvířata testována na hodnoty T buněk CD3⁺, CD4⁺ a CD8⁺ ve dvoutýdenních intervalech dokud hodnoty T buněk CD4⁺ nedosáhly příslušnou cílovou hodnotu pro danou skupinu. V ten okamžik zvířata obdržela intravenózně opět 10,0 mg/kg protilátky CE9.1, až do maxima tří dávek.

Určení výchozího stavu celkového počtu bílých krvinek, hodnot lymfocytů a granulocytů, a subpopulací lymfocytů CD3⁺, CD4⁺ a CD8⁺ se prováděly v den -6, v den 0 těsně před podáním dávky a opět 24 hodin a 14 dnů po podání dávky. V této studii byly poskytnuty šimpanzům tři ošetřovací cykly, každý s dávkou 10,0 mg/kg.

Výsledky

Vazebná specifita mAb CE9.1

Měření afinity SPR vazby CE9.1 k rozpustnému CD4 ukázalo Kd 1,0 nM (Brigham-Burke et al., North American BIA Symposium 1995, v tisku). Nebyla pozorována žádná vazba k buněčným liniím CD4⁺ a inhibiční studie prokázaly, že vazba k

buňkám $CD4^+$ je kompletně zrušena rozpustným $CD4$ způsobem odpovídajícím stechiometrickým poměrům.

Pro stanovení specifity reaktivity CE9.1, byla zjišťována vazba k čerstvě izolovaným lidským PBMC průtokovou cytometrií při použití dvojího značení. Obrázek 9 ukazuje, že $2/3$ buněk $CD3^+$ váže CE9.1. V lymfoidní subpopulaci všechny buňky, které vážou OKT4 jsou také pozitivní pro CE9.1, zatímco buňky $CD8^+$ byly všechny negativní. Některé buňky $CD3^-$ také vykazovaly reaktivitu s CE9.1, ačkoliv povaha této reaktivity nebyla jasně určena.

Imunohistochemická analýza byla provedena pro určení tkáňové reaktivity CE9.1, včetně 32 různých normálních lidských tkání lymfoidního a nelymfoidního původu. Nelymfoidní tkáně zahrnovaly hlavní orgány, mozek, srdce, kosterní svalstvo, kůži, játra, ledviny, tkáně žláz a reprodukčních orgánů. Tato analýza neprokázala zkříženou reaktivitu k jakékoliv jiné tkáni než lymfoidního původu, včetně lymfatických uzlin, sleziny, tonzil a periferní krve (data nejsou uvedena). Značení omezené na lymfoidní agregáty bylo také pozorováno v tlustém střevě, plicích, jícnu a kůži.

Inhibice lidské MLR CE9.1

Účinek CE9.1 na T buněčné odpovědi byl vyhodnocován lidskou MLR, jako produkce IL-2 nebo proliferační odpovědi. CE9.1 blokovala jak proliferaci, tak produkci IL-2 s IC_{50} 10-30 ng/ml, s 80% inhibicí v 60 ng/ml (obrázek 10).

Vazebná aktivita receptoru Fc pro CE9.1

Adhezní testy „buňka-buňka“ založené na $CD4$ a receptoru Fc byly vyvinuty, aby se určila reaktivita CE9.1 s receptory Fc na monocytárních buňkách. V jednom uspořádání testu jsou

izolovány monocyty z čerstvých PBMC stočením na perkolovém gradientu, vysazeny na mikrotitrační destičky a stimulovány γ IFN po 48 hodin. Po 48 hodinách byly k aktivovaným adherovaným monocytům přidány značené buňky SupT1 $CD4^+$ v přítomnosti nebo nepřítomnosti CE9.1. V dalším uspořádání tohoto adhezního testu byla γ IFN stimulována monocytární neadherentní buněčná linie THP-1. Po 24 hodinách byly aktivované buňky THP-1 označeny a přidány, v přítomnosti nebo nepřítomnosti CE9.1, k adherovaným $CD4^+$ fibroblastovým transfektantám, které byly předtím (o 24 hodin dříve) vysety na mikrotitrační destičky. V obou případech je adheze „buňka-buňka“ závislá na vazbě mAb k $CD4$ na jedné buňce a k receptorům Fc na buňce druhé.

Data uvedená na obrázcích 10a, 10b a 10c, založená na čerstvých monocytech a T buňkách SupT1 $CD4^+$ aktivovaných γ IFN, ukazují, že CE9.1 zprostředkovává adhezi „buňka-buňka“ způsobem závislým na dávce, s přibližnou ED_{50} 20 ng/ml. Adheze byla kompletně blokována sCD4 a nemůže být zprostředkována fragmentem F(ab')₂ z CE9.1. Monocyty neaktivované γ IFN nebyly schopné vázat CE9.1 (obrázek 10b). Podobná data byla také získána v testu založeném na THP-1 a $CD4^+$ fibroblastovém testu (data nejsou ukázána). Byla také pozorována přímá vazba CE9.1 k myši fibroblastové linii transfekované lidskými receptory FC γ RII (data nejsou ukázána).

Buňkami zprostředkovaná cytotoxicita závislá na protilátce (ADCC)

Ukázalo se, že buňky SupT1 značené radioizotopem použité jako cíle v testu ADCC, jsou specificky lyzovány efektorovými buňkami v přítomnosti CE9.1. Maximální cytotoxicity bylo dosaženo při přibližně 6 μ g/ml s celkovou specifickou lýzou 50% (obr. 12). Jako pozitivní kontrola

byla použita myši anti-CD4 izotypu IgG2a (4D9). Tato protilátka se chovala velmi podobně jako CE9.1 a poskytovala stejný stupeň celkové buněčné lýzy. CE9.1 byla proto velice účinná ve vazbě na receptory Fc na efektorových buňkách a při zprostředkování usmrcování CD4⁺ cílových buněčných linií.

Fixace komplementu CE9.1

Vazba Clq se měřila průtokovou cytometrií, jak bylo popsáno výše (Materiál a metody). Jak je ukázáno na obrázku 13, navzdory faktu, že CE9.1 obsahuje konstantní oblast lidského těžkého řetězce subtypu gama 1, vykazuje pouze minimální vazbu Clq (obr. 13). Afinitně purifikované opičí sérové protilátky anti-CD4 byly účinné ve zprostředkování vazby Clq, což svědčí pro to, že nepřítomnost vazby Clq CE9.1 je vlastnost specifická pro tuto protilátku. Nepřítomnost vazby Clq CE9.1 se odráží v neschopnosti fixovat komplement (obrázek 14). Afinitně purifikované protilátky anti-CD4 z opičího séra a myši monoklonální IgG2a způsobují obě významnou lýzu ve stejném rozmezí koncentrací.

Druhová zkřížená reaktivita CE9.1

Analýza lymfocytů z různých druhů pomocí průtokové cytometrie ukázala, že pouze šimpanzí a lidské buňky váží silně CE9.1. Jediný další druh, který vykazoval slabou reaktivitu s CE9.1 (10x slabší než člověk), byl pavián. Lidské a šimpanzí lymfocyty reagovaly stejně dobře s mAb (tabulka 2). To se odrazilo ve srovnatelné inhibici T buněčné proliferace a produkce IL-2 v šimpanzích MLR protilátkou CE9.1 (data nejsou uvedena).

Tabulka 2

Druh	Reaktivita
Člověk	+++
Šimpanz	+++
Pavián	+
<i>Macaca rhesus</i>	-
<i>Macaca fascicularis</i>	-
<i>Macaca nemestrina</i>	-
Pes	-
Králík	-
Potkan	-
Myš	-

Studie *in vivo* na šesti šimpanzech

Vzhledem k nepřítomnosti deplece buněk CD4 ve studii při použití stoupající dávky u jednoho šimpanze, byla 4 šimpanzům podána dávka 10 mg/kg (kromě toho 2 zvířata v kontrolní skupině obdržela fyziologický roztok). Jak je popsáno v Materiálu a metodách, dvěma skupinám bylo podáno 10 mg/kg v den 0 studie. Obrázek 15 sumarizuje účinky na počet CD4 a CD8 u těchto zvířat. Je možné pozorovat, že byly sníženy buňky exprimující receptor CD4 okamžitě po podání protilátky. Snížení četnosti CD4 bylo vidět pouze okamžitě po každé dávce podané protilátky. V kontrolní skupině s fyziologickým roztokem nebyla pozorována žádná podobná změna ve stavu CD4. Počet CD8 zůstal neovlivněn v průběhu ošetření, ačkoliv byla pozorována denní variabilita (obr. 15, panel vlevo, prázdné kroužky). Při vyšetření populace CD3⁺ - CD8⁺ byly pozorovány méně výrazné poklesy v počtu CD4. Data naznačují výskyt CD3⁺ CD8⁻ T buněčných populací, které mohou být výsledek modulace antigenem CD4. Přesný

mechanismus modulace je v tomto stadiu nejasný, ale může zahrnovat internalizaci nebo ztrátu molekul CD4 jako výsledek zkřížené vazby receptory Fc exprimovanými na jiných lymfoidních nebo monocytárních buňkách. Srovnání buněčných počtů na obrázku 15 ukazuje, že určitá deplece buněk CD4⁺ může nastat, ačkoliv hlavní účinek je způsobený modulací receptoru CD4. Zdá se, že ve většině případů modulační účinek trvá 7-10 dnů přímo po podávání protilátky, po kterých se exprese CD4 vrátí právě pod výchozí hodnoty.

Celkový počet CD4 zůstává snížen relativně k výchozímu stavu o 10-50 %, ale po ukončení ošetření se vrací do normálního rozmezí. Šimpanzi byli sledováni po dobu až 150 dnů (skupiny 1 a 2) nebo 300 dnů (skupina 3). Počet CD4 u zvířat skupiny 2 se vrátil k normálním hodnotám 80 dnů po konečném ošetření, zatímco u zvířat ze skupiny 3 se vrátil ve stejném časovém rámci na 20 % výchozího stavu.

Příklad 3

Tento příklad popisuje genetickou konstrukci expresního vektoru DNA použitého v savčích buňkách k produkci CE9γ4PE, což je makaková/lidská chimérická protilátka anti-CD4, obsahující lidský izotyp γ4 zahrnující změny P a E.

Konstrukce expresního vektoru DNA

Lidský gen těžkého řetězce gama 4 byl izolován metodou PCR z buněčné linie TPIT10.4 (získané od S. Morrisona, UCLA) za použití 5' IDEC primeru č. 479 a 3' IDEC primeru č. 462 (viz obr. 16), které obsahují místa Nhe I a BamH I. Celý klonovaný fragment lidského gama 4 byl sekvenován a shledán identickým s fragmentem popsáním v Kabat et al., (NIH Publication Fifth Edition No. 91-3242, U.S. Dept. Of Health and Human Services, 1991) (viz obr. 17). Fragment

Nhe I/BamH I byl klonován do expresního vektoru Anex 2. Celé geny lehkého a těžkého řetězce imunoglobulinu z tohoto plazmidu byly přesunuty do jiného expresního plazmidu do fragmentu Bgl II až Sac I. Tento plazmid byl nazván anti-CD4 (G4, L, Oz-) v NEOSPLA3F.

Mutageneze PCR byla použita ke změně aminokyselin č. 229 a 236 v konstantní oblasti gama 4. PCR bylo provedeno za použití 5' primeru GE212 (Midland) a 3' IDEC primeru č. 698, které obsahují restrikční místa Nhe I a BspH I (viz obr. 16) a fragment byl klonován do anti-CD4 (G4, L, Oz-) plazmidu ligací tří částí a sekvenční plazmid byl nazván anti-CD4 (G4(PE), L, Oz-) v NEOSPLA3F.

Příklad 4

Expres v buňkách ovaria čínského křečka (CHO)

Integrace plazmidu a výběr klonů produkujících protilátku

Buňky CHO (DG44) (Urlaub et al., Som. Cell. Mol. Genet., 16, 555-566, 1986) byly pěstovány v živném médiu CHO-S-SFM II obsahujícím (GIBCO/BRL, média CHO) 50 μ M hypoxanthin a 8 μ M thymidin (GIBCO/BRL, média CHO). Tato média se nazývají média CHO a HT.

Bylo provedeno 5 elektroporací se 4×10^6 buněk a 5 μ g plazmidové DNA (anti-CD4(γ 4(PE), lambda, Oz-) v NEOSPLA3F) za použití elektroporačního zařízení BTX 600 (BTX, San Diego, CA) v kyvetách na jedno použití o objemu 0,4 ml. Před elektroporací byl plazmid naštěpen s Pac I, což oddělilo geny exprimované v savčích buňkách od části plazmidu používané pro růst plazmidu v bakteriích. Podmínky pro elektroporaci byly 230 V, 400 μ F, 13 Ω . Buňky z každé elektroporace byly vysety na jednu 96jamkovou destičku

(40 000 buněk/jamka). Destičky byly naplněny médiem CHO + HT obsahujícím G418 (Geneticin, GIBCO), 400 $\mu\text{g/ml}$ aktivní sloučeniny, dva dny po elektroporaci, a poté dle potřeby dokud kolonie rostly. Supernatant ze slévajících se (konfluentních) kolonií byl testován na přítomnost chimérického imunoglobulinu testem ELISA specifickým pro lidskou protilátku. Dvacet osm kolonií rezistentních na G418 rostlo na pěti destičkách (ze 480 jamek). Kolonie rezistentní na G418 exprimující nejvíce protilátky, klon 5C1, byly konfluentní 30 dnů po elektroporaci. Analýza metodou Southernova přenosu ukázala, že klon 5C1 začlenil jednu kopii (data neuvedena). Ve čtyřdenní kultuře vyseté v koncentraci 10^5 buněk/ml do 125mililitrové kultivační nádoby se tento klon každých 28 hodin zdvojnásobil a rychlost produkce protilátky byla 0,5 pg/buňka/den (0,9 mg/l).

Amplifikace

Klon 5C1 byl rozmnožen a vyset v různých koncentracích od 10^6 buněk/destička do 3×10^4 buněk/destička na 96jamkové destičky obsahující média CHO + 5 nM metotrexát (MTX, Sigma) (*) Amethopterin). Dvacet dnů později se klon 5C1-5B9 stal konfluentním při 3×10^5 buněk/destička (49 z 96 jamek rostlo na této destičce). Tento klon byl namnožen. Ve čtyřdenní kultuře vyseté v koncentraci 10^5 buněk/ml v T150 se tento klon zdvojnásobil každých 35,5 hodin a rychlost produkce protilátky byla 15,3 pg/buňka/den (18 mg/l). Klon 5C1-5B9 byl rozmnožen a vyset v různých koncentracích od 100 buněk/destička do 3×10^4 buněk/destička na 96jamkové destičky obsahující média CHO + 50 nM metotrexát. Třicet šest dnů později byl klon 5C1-5B9 50C1 konfluentní z 60 % při 10^5 buněk/destička (50 z 96 jamek rostlo na této destičce). Tento klon byl namnožen.

Buněčné banky fáze I rodičovského zásobního kmene CE9γ4PE pro vysévání (PSS, parent seed stock)

PSS klonu 5C1-5B9-50C1 s 50 nM MTX bylo zmrazeno. Buňky byly nejdříve kultivovány v 500mililitrové kultivační nádobě obsahující médium CHO a 50 nM MTX. V okamžiku mražení kultura dosáhla hustoty $1,1 \times 10^6$ buněk/ml s 96% životaschopností a časem zdvojnásobení 29,3 hodiny. Produkce protilátky se určovala „sendvičovým“ testem ELISA a byla přibližně 27 pg/buňka/den. Buňky byly stočením odděleny od média a dávkovány do ampulek v hustotě $2,0 \times 10^7$ buněk/ml v 95% fetálním bovinním séru od JRH Biosciences a 5% obecné hlavní směsi Sigma, přičemž v ampulkách byl zmražen 1 ml mrazicího média s buňkami. Ampulky byly zmrazeny v -70°C a následující den umístěny do nádoby s tekutým dusíkem.

Jedna ampulka PSS s 50 nM MTX byla rozmrazena a obsah byl vyset do 100mililitrové kultivační nádoby obsahující médium CHO a 50 nM MTX. Tři dny později byl obsah kultivační nádoby rozdělen do dvou kultivačních nádob o obsahu 125 ml, hustota buněk byla 10^5 buněk/ml, jedna nádoba obsahovala médium CHO a 50 nM MTX a druhá pouze médium CHO.

Tři dny později bylo 150 ml buněk s médiem z kultivační nádoby se samotným médiem CHO zmrazeno a posláno na vyhodnocení a testování mykoplazmat do Tektagenu. Produkce pokračovala osm týdnů, s MTX i bez něho. Výsledky z Tektagenu prokázaly, že PSS klon 5C1-5B9-50C1, anti-CD4 (gama 4(PEPTID), lambda, Oz-) NEOSPLA3F v CHO, je bez přítomnosti mykoplazmat. Deset ampulek PSS s 50 nM NM bylo přeneseno do tekutého dusíku pro uskladnění.

Hlavní buněčná banka (MCB)

Dvě ampulky PSS s 50 mM MTX klonu 5C1-5B9-50C1 byly rozmrazeny a jejich obsah vyset do 100mililitrové kultivační láhve obsahující médium CHO a 50 nm MTX. Kultura se rozmnožovala 6 dnů do postupně větších kultivačních lahví, dokud nedosáhla objem 2000 ml, s hustotou $9,5 \times 10^5$ a životaschopností 98 %. Buňky byly stočením odděleny od média a resuspendovány v hustotě $2,0 \times 10^7$ buněk/ml v 95% fetálním bovinním séru od JRH Biosciences a 5% Hybrimax DMSO od Sigmy. Buněčná suspenze v zamrazovacím médiu byla rozdělena do poměrných částí (10 ml) do 80 zmrazovacích ampulek označených jako MCB G4PE50-M-A. Ampulky byly zmrazeny v -70°C . Dvacet čtyři hodiny později byla buněčná banka přenesena do tekutého dusíku pro uskladnění.

Příklad 5

Stabilita mAbs CD4

Fyzická a chemická stabilita roztoků CE9γ4PE a CE9γ4E se sledovala po dobu 3 měsíců v 5°C , 40°C a rozptýleném světle pomocí SDS-PAGE (redukující a neredukující), IEF, reverzní fázovou HPLC, vylučovací chromatografií (SEC) a testem ELISA. Počáteční testování RP-HPLC a neredukující SDS-PAGE svědčí pro to, že CE9γ4E je složena ze dvou hlavních druhů, a to neredukované celé molekuly a nekovalentně přidružené molekuly, která se v podmínkách analýzy štěpí do dvou stejných jednotek označených jako „polo-mer“ („halfmer“). Je zajímavé, že nebyly pozorovány žádné větší rozdíly v bio-analytických profilech těchto dvou mAbs při použití metod SEC, IEF, SDS-PAGE (redukující) a ELISA. Množství „polo-merů“ v CE9γ4E je méně než 1 % jak při RP-HPLC, tak SDS-PAGE (neredukující). Obrázek 18 ukazuje

SDS-PAGE (neredukující) analýzu monomeru a „polo-meru“ v roztocích CE9 γ 4PE a CE9 γ 4E. Množství „polo-meru“ v CE9 γ 4E zůstávalo konstantní vzhledem k počátečnímu testování po dobu tří měsíců v jakýchkoliv testovacích podmínkách. Obsah „polo-meru“ v CE9 γ 4PE zůstával pod 2 % po celou dobu za všech testovacích podmínek. Žádný větší rozdíl ve stabilitě mezi CE9 γ 4E a CE9 γ 4PE nebyl pozorován v 5 °C a 40 °C. Roztok CE9 γ 4E skladovaný při rozptýleném světle je poněkud méně stabilní než CE9 γ 4PE. Data naznačují, že „polo-mer“ CE9 γ 4E nemá významný účinek na všeobecnou stabilitu celé molekuly. Žádné větší rozdíly ve fyzikální stabilitě roztoků CE9 γ 4PE a CE9 γ 4E nebyly pozorovány.

Afinita a stechiometrie mAbs CD4 stanovené povrchovou plasmonovou rezonancí (SPR)

Stechiometrie vazby rozpustného CD4 k imobilizovaným mAbs může být určena saturačními vazebnými experimenty na přístroji BIAcore (Pharmacia). Data pro asociační a disociační fáze procedury SPR (obrázek 19) byla analyzována přímo za použití integrované formy rychlostních rovnic, jak je popsali O'Shanessey et al., Anal. Biochem., 212, 467-468, 1993. Shrnutí výsledných údajů o vazbě, vyjádřených v mol CD4/mol mAb, je ukázáno v tabulce 3. Z těchto dat je možné vidět, že ve všech případech je stechiometrie vazby větší než 1,5:1. Vzhledem k tomu, že BIAcore je systém pro interakce v pevné fázi a že imobilizační protokol je náhodný, tyto výsledky naznačují, že obě místa vázající antigen u každé mAb jsou funkční. Stechiometrie vazby CD4 byla tedy tatáž pro všechny mAb a přitom blízká teoretické hodnotě 2,0. Měření afinity dále ukázala, že afinita byla shodná pro všechna komplexu mAb, a to 1,0 nM.

Tabulka 3

Stechiometrie a afinita vazby měřená povrchovou plasmonovou rezonancí

Protilátka	Stechiometrie dle BIAcore	Afinita (nM 25 °C)
CE9.1	1,56	0,99
CE9γ4	1,61	1,34
CE9γ4E	1,72	1,43
CE9γ4λK	1,67	1,08
CE9γ4PE		1,09

Příklad 6

Biologické hodnocení CE9γ4PE *in vitro*

Shrnutí

Aktivita zprostředkovaná oblastí Fab (MLR) a doménou Fc (vazba receptoru Fc, ADCC a CDC) byla srovnávána u CE9.1, CE94PE a dalších derivátů gama 4. Aktivita závislá na Fab (MLR) se mezi protilátkami nelišila, ale byly rozdílné ve vazebných vlastnostech pro receptor Fc. Nemodifikovaný derivát gama 4 CE9γ4 vykázal překvapivě silnou vazbu k receptorům Fc, ale mutace E v CE9γ4E a CE9γ4PE odstranila tuto vazbu, stejně jako aktivitu ADCC.

Účinky mAbs na odpovědi smíšených lymfocytů (MLR)

Test trojsměrné odpovědi smíšených lymfocytů (MLR) se prováděl pro určení účinku konstruktů mAb na T buněčnou proliferaci řízenou alo-antigenem a na produkci IL-2. MLR

jsou závislé na přítomnosti T buněk $CD4^+$ a velká část odpovědi je závislá na účasti receptoru CD4 prostřednictvím interakce s molekulami MHC II. třídy na buňkách prezentujících antigen. Odpověď MLR je *in vitro* korelát aspektů transplantační rejekce *in vivo*. Co se týče dalších farmakologických přípravků jsou MLR také blokovány imunosupresivními přípravky, jako je cyklosporin A.

Všechny konstrukty mAb měly stejnou schopnost blokovat MLR, a to jak proliferační odpověď T buněk, tak produkci IL-2 (obr. 20 a tab. 4). Tedy přesunutí domény V z CE9.1 na struktury lidské $\lambda 4$ a substituce „P a E“ v ohybové a CH2 doméně neovlivnily schopnost mAbs blokovat T buněčné odpovědi závislé na CD4 *in vitro*.

Tabulka 4

Účinek mAbs na MLR - shrnutí

Protilátka	Proliferace (IC50)	Produkce IL-2 (IC50)
CE9.1	20 ng/ml	5 ng/ml
CE9 γ 4	20 ng/ml	5 ng/ml
CE9 γ 4E	20 ng/ml	10 ng/ml
CE9 γ 4 λ K	20 ng/ml	20 ng/ml
CE9 γ 4PE	20 ng/ml	neurčeno

Závěr

Všechny mAbs jsou rovnocenné v inhibici MLR.

Vazebné vlastnosti mAbs pro receptor Fc

Ověření testu pro určení vazby receptoru Fc

CE9 γ 4PE byla navržena tak, aby neměla aktivity vázající FcR. Pro měření této aktivity byl vyvinut test založený na vazbě buněk zprostředkované FcR a CD4 při přemostění pomocí mAbs. Tento test měří současně funkce mAbs vázajících FcR, jako *in vitro* korelát deplece buněk CD4 *in vivo* zprostředkované FcR a mAb.

Obrázek 21 ukazuje, že CE9.1 usnadňuje adhezi monocytárních buněk exprimujících FcR (buňky THP-1 indukované IFN- γ) k fibroblastům CD4⁺ (fibroblastová buněčná linie transfekovaná CD4) v adhezním testu. Vazba je závislá na doménách Fc mAb CE9.1, protože zkrácený F(ab')₂ vazbu neumožňuje. Vazba také vyžaduje místo rozpoznávající antigen na CD4, protože jeho obsazení sCD4 blokuje spojení buňka-buňka.

Určení vazebných aktivit mAbs pro receptor Fc

mAbs CE9.1(IgG1), CE9 γ 4 (IgG4), CE9 γ 4 λ K (hybrid IgG4 λ K), CE9 γ 4E (IgG4, mutant E) a CE9 γ 4PE (IgG4, mutant PE) byly hodnoceny z hlediska schopnosti současně vázat CD4 buněčného povrchu a FcR.

Jak se očekávalo, CE9.1 má v tomto testu dobrou vazebnou aktivitu. Překvapivě konstrukty IgG4 CE9 γ 4 a CE9 γ 4 λ K si podržely dostatečnou afinitu pro FcR, že byly v tomto testu nerozeznatelné od CE9.1. Aktivita v tomto testu se ztratila pouze když byla zavedena substituce „E“, jako v CE9 γ 4E a CE9 γ 4PE (viz obr. 22).

Vazebné vlastnosti CE9 γ 4PE pro Clq *in vitro*

Komplementový systém zahrnuje, mezi svými různými funkčními složkami, schopnost interagovat s určitými typy

protilátek způsobem, který vede k buněčné lýze a destrukci. Lidské protilátky IgG1 jsou normálně schopné vázat Clq a vyčerpat cílové buňky nesoucí povrchové antigeny, pro které jsou specifické. Jiné lidské izotypy, jako IgG4, projevují sníženou schopnost vázat Clq a jsou tedy neschopné deplece cílových buněk. Úprava CE9γ4PE v konstruktu gama 4 může do určité míry dosáhnout takového cíle, že zabrání fixaci komplementu a umožní vazbu protilátky na CD4 cílové buňky při eliminaci potenciálních destruktivních vedlejších účinků.

Srovnání CDC efektorových vlastností CE9γ4PE a CE9.1 se provedlo za použití klasické metody komplementem zprostředkované cytolyzy buněk SupT1 CD4⁺ značených chromem v přítomnosti králičího komplementu. V těchto studiích byl jako pozitivní kontrola použit myší komplement fixující mAb k HuCD4, 4D9 (IgG2a). Jak CE9.1 tak i CE9γ4PE byly neúčinné ve fixaci králičího komplementu (obr. 23). Jak bylo zmíněno již dříve, CE9.1 váže slabě Clq a je tedy neschopná fixovat lidský komplement. Tyto výsledky ukazují, že oba konstrukty jsou neschopné podpořit buněčnou lýzu prostřednictvím komplementového efektorového mechanismu.

ADCC efektorové vlastnosti CE9γ4PE *in vitro*

Buňky s cytotoxickým potenciálem, které mohou vázat mAbs prostřednictvím FcR mohou zprostředkovat ADCC namířenou na cílové buňky pokryté antigenem. Lidské T pomahačské buňky exprimující molekulu CD4 jsou rozpoznávány mAb CE9.1, která spouští cytolytický útok zabíječských buněk nesoucích FcR, granulocytů a/nebo makrofágů. Cílem konstrukce CE9γ4PE bylo odstranit schopnost mAb vázat se k FcR, což by odstranilo schopnost přídatných buněk zprostředkovat depleci cílových

buněk CD4, zatímco by stále umožňovalo mAb, aby zůstala imunosupresivní.

Srovnání ADCC efektorových vlastností CE9γ4PE a CE9.1 se provádělo za použití klasické metody buňkou zprostředkované cytolyzy buněk SupT1 CD4⁺ značených chromem. Myší CD4 mAb 4D9 (IgG2a, K) byla vybrána jako pozitivní kontrola. Efektorové buňky byly leukocyty lidské periferní krve získané z interfáze v hustotním gradientu („buffy coat“). Obrázek 12 ukazuje schopnosti obou mAbs 4D9 a CE9.1 zprostředkovat specifickou lýzu buněk CD4⁺. Za stejných podmínek má CE9γ4PE velice malý účinek.

Tyto výsledky ukazují, že CE9γ4PE je neschopná zprostředkovat buněčnou lýzu prostřednictvím mechanismu FcR nebo komplementu.

Příklad 7

Komparativní PK analýza CE9γ4E a CE9γ4PE

Komparativní farmakokinetika dvou vedoucích λ4 mAbs, CE9γ4E a CE9γ4PE, se vyšetřovala na samcích laboratorního potkana linie Sprague-Dawley. CE9γ4E nebo CE9γ4PE se podávala jako bolus i.v. v dávce 1 mg/kg (čtyři zvířata ve skupině) a 4 týdny po dávce se odebíraly krevní vzorky. Plazmatické koncentrace CE9γ4E a CE9γ4PE se určovaly za použití „sendvičového“ testu ELISA s SCD4/proti-lidským IgG navrženém tak, aby potvrdil nejenom přítomnost cirkulujícího lidského IgG, ale také schopnost vázat rekombinantní lidský rozpustný CD4.

Po podání intravenózního bolusu 1 mg/kg CD4 mAb se plazmatická koncentrace CE9γ4E snižovala trojfázovým způsobem a plazmatická koncentrace CE9γ4PE se snižovala dvojfázovým způsobem (obr. 24). Za účelem srovnání a kvůli

nedostatečnému počtu dat pro adekvátní popis terminální fáze pro CE9γ4E, byly všechny profily plazmatické koncentrace v čase analyzovány za použití dvoufázového modelu. Byla pozorována malá variabilita mezi případy. Převládající sekundární fáze $t_{1/2}$ byla přibližně 4 dny pro CE9γ4E, a 9 dnů pro CE9γ4PE a odpovídala za 67% a 93% celkové plochy pod křivkou závislosti plazmatická koncentrace-čas. Zjevná plazmatická clearance pro CE9γ4PE byla nízká (6,4 ml/hod/kg) a byla přibližně polovina clearance CE9γ4E (1,0 ml/hod/kg). Farmakokinetické vlastnosti PE mutanta λ4 mAb, CE9γ4E, jsou tedy podobné jiným humanizovaným λ1 mAbs u laboratorního potkana.

Dlouhý poločas cirkulace funkčně intaktní CE9γ4PE u laboratorního potkana také svědčí pro to, že CE9γ4PE je při podání člověku pravděpodobně účinná delší dobu.

Tyto výsledky potvrzují, že mutant PE CE9γ4PE má u laboratorního potkana dvakrát nižší plazmatickou clearanci a delší biologický poločas, než mutant CE9γ4E.

Tabulka 5

Farmakokinetické parametry (průměr ± SD) CE9γ4E a CE9γ4PE po i.v. bolusu 1 mg/kg podaném laboratorním potkanům Sprague-Dawley

mAb CD4	CL (ml/h/kg)	AUC _{0-inf} (μg·h/ml)	MRT (h)	$T_{1/2}^{-1}$ (h)	$T_{1/2}^{-2}$ (h)	%AUC ₂	V _{ss} (ml/kg)
CE9γ4E	0,999±137	1010±130	109±12	15,2±3,8	97,7±29,5	55,7±14,2	109±14
CE9γ4E	1,32±0,30	760±138	79,5±16,0	16,6±6,9	95,3±30,8	52,1±20,0	103±18
CE9γ4PE	0,410±0,074	2500±440	295±43	9,9±3,3	224±3,3	93,4±2,2	119±16

Zkratky farmakokinetických parametrů v tab.5 : CL = celková plazmatická clearance, $AUC_{0-\infty}$ = celková plocha pod křivkou závislosti plazmatické koncentrace na čase, MRT = střední rezidenční čas, $T_{1/2}^{-1}$ = zjevný poločas rozpadu v počáteční fázi, $T_{1/2}^{-2}$ = zjevný poločas rozpadu v sekundární fázi, %AUC₂ = procento plochy pod křivkou závislosti plazmatické koncentrace na čase během sekundární fáze, V_{ss} = distribuční objem v rovnovážném stavu.

Vzhledem k těmto výsledkům, CE9γ4PE by měla být vhodná pro terapeutické použití, např. při i.v. podávání. Také další způsoby podávání jsou vhodné.

Příklad 8

Farmakologické studie na vivo

Popis transgenních myších HuCD4

Úvod

Vysoký stupeň druhové specifity CE9.1 a CE9γ4PE komplikuje stanovení účinnosti *in vivo*. Farmakologická odpověď na CE9.1 může být u šimpanze snadno sledována, skrze depleci CD4⁺ buněk závislé na dávce. Očekávaná nepřítomnost této aktivity u CE9γ4PE nás přimělo k použití jiných prostředků pro stanovení účinnosti. Konkrétně, účinnost se studuje na transgenních myších HuCD4. Studie v tomto systému jsou popsány níže.

Transgenní myši HuCD4⁺

U transgenních myši HuCD4 vypěstovaných v UCFS (Killeen et al., EMBO J., 12, 1547-53, 1993), byl endogenní

gen *MuCD4* porušen homologní rekombinací a lidský mini-transgen *CD4* byl zaveden tak, aby podléhal regulaci promotorem *MuCD4*. U těchto myší, které byly kříženy do vzniku homozygotního potomstva, byl *MuCD4* nahrazen *HuCD4*. *HuCD4* obnovuje pozitivní a negativní selekci v thymu, vedoucí k produkci nezávislých pozitivních periferních T buněk $CD4^+$ nebo $CD8^+$, a to v úrovni srovnatelné se stupněm nalezeným u normálních myší. Kromě toho, ve srovnání s rodičovskou generací s vyřazeným genem *MuCD4* („*MuCD4* knockout“), vykazují zralé T buňky *HuCD4* vlastnosti blízké jejich normálním myším protějškům: 1) *in vivo*, sérové hladiny IgG jsou navráceny k normálním hodnotám a 2) tato zvířata vykazují příslušné odpovědi závislé na MHC v *in vitro* NMR.

Genetické pozadí těchto myší je dosti složité kvůli tomu, že bylo třeba použít různé kmeny embryonálních kmenových buněk a myší v původních pokusech s vyřazeným genem („knockout“) a transgenních pokusech. Původní knockout/transgenní myši byly postupně kříženy tak, aby byly v lokusu MHC homozygotní, a tedy myši nyní používané v SB jsou haplotypu H-2^{dd}.

Výsledky ukázaly, že u těchto myší se získá dobrá odpověď na cizorodý antigen, ovalbumin, a počáteční studie prokázaly *in vivo* aktivitu pro CE9γ4PE.

Předběžné vyhodnocení CE9γ4PE u transgenních myší *HuCD4*

Dostali jsme dvanáct transgenních myší *HuCD4* (H-2^{dd}), které byly použity ke srovnání CE9γ4PE s IF3 (myší protilidský *CD4*) a GK1.5. Myším byla podána dávka v den -2, -1 a 0, a to 1 mg protilátky i.p. a byly imunizovány OVA 3 hodiny po poslední dávce. Myši se usmrtily 2 týdny později a sérum a buňky se hodnotily na funkční aktivitu. Protilátková

odpověď specifická pro OVA je ukázána na obrázku 25. Jak se očekávalo, mAb k myšímu CD4 (GK1.5) neměla žádný účinek na humorální odpověď, zatímco obě mAbs k *HuCD4* tuto odpověď blokovaly. Z těchto dvou mAbs byla výraznější CE9γ4PE.

Všechny skupiny myši odpovídaly však na Con A a LS, bylo zde však určité kolísání v odpovědi na ovalbumin a v MLR. To může být způsobeno faktem, že tento soubor zvířat obsahoval jak myši samce, tak samice různého věku.

Myši *MuCD4* $-/-$ (CD4 knockout) a *HuCD4* $+/+$ (transgenní myši) byly ošetřeny s CE9.1, CE9γ4PE nebo fyziologickým roztokem. Studie se prováděla po dobu 28 dnů se vzorky odebíranými ve dnech 1, 3, 7, 14 a 28. Pro sledování osudu T buněk $CD4^+$ a $CD8^+$ byla použita analýza průtokovou cytometrií se třemi značeními splenocytů těchto myši. Pro vyšetření hladiny T buněk byly použity následující protilátky: CD3-PE, OKT4-FITC, CD8-TC. Pro sledování osudu T a B buněk u těchto myši byly použity následující protilátky: CD3-PE, CD2-FITC, CD45-TC. Pro sledování osudu buněk povlečených CE9.1 nebo CE9γ4PE byl použit následující panel mAb: OKT4-PE, Leu3a-FITC, CD3-TC.

Data ukázala, že u transgenních myši (*HuCD4* $+/+$) ošetřených CE9.1 a CE9γ4PE byly všechny $CD4^+$ buňky pokryty protilátkou v 1. den. Povlak přetrvával po několik dnů a 28. den nebyl detekovatelný. Celkový počet buněk $CD4^+$ u myši ošetřených CE9.1 se významně snížil, dokonce 28. den. Na rozdíl od toho myši ošetřené CE9γ4PE nevykázaly žádné snížení celkového počtu buněk $CD4^+$. U obou protilátek byla dokázána, modulace receptoru CD4. Ačkoliv se procento buněk $CD8^+$ u myši ošetřených CE9.1 recipročně zvýšilo, nebylo prokázáno, že tato absolutní čísla byla významně ovlivněna ošetřením. Podobně byly počty buněk $CD8^+$ neovlivněny u myši ošetřených

CE9γ4PE. Ve všech pokusech s kteroukoliv protilátkou zůstal počet B buněk konstantní.

Studie na šimpanzech *in vivo*

U šesti šimpanzů se vyšetřovala deplece T buněk CD4⁺ a/nebo modulace receptoru CD4 buněčného povrchu po infúzích zvyšujících se dávek CE9γ4PE až do 15 mg/kg. Každému šimpanzi se odebíraly vzorky periferní krve tři a dva týdny před začátkem studie, aby se stanovil výchozí stav počtu T buněk CD4⁺. Kromě buněk CD4⁺ se průtokovou cytometrií měřily také hladiny buněk CD3⁺ a CD8⁺. Jako kontrola byla použita mAb OKT4, která se váže k odlišným částem molekuly CD4 a nesoutěží o vazbu s CE9γ4PE. Subtrakcí počtu CD8⁺ od celkového počtu CD3⁺ mohla být vypočítána teoretická hodnota pro počet T buněk CD4⁺. Srovnáním této hodnoty s buňkami CD4⁺ měřenými pomocí OKT4, mohla být rozlišena modulace receptoru CD4 od deplece buněk CD4.

Na začátku studie obdržel každý šimpanz i.v. infúzi fyziologického roztoku. Vzorky krve se odebíraly okamžitě po infúzi a 3 a 14 dnů později. Každému šimpanzi se podala infúze CE9γ4PE (0,05 mg/kg) a 3 a pak 14 dnů později se odebíraly krevní vzorky. Sledoval se počet buněk CD4⁺ a jestliže byl v normálním rozmezí, podala se další dávka CE9γ4PE. Každý šimpanz byl ošetřen podle následujícího schématu: fyziologický roztok, 0,05 mg/kg CE9γ4PE, 1,5 mg/kg CE9γ4PE, fyziologický roztok, 15 mg/kg CE9γ4PE.

Po infúzích fyziologického roztoku nebo CE9γ4PE v dávce 0,05 mg/kg nebyl pozorován žádný účinek na hladiny CD4. Při dávce 1,5 mg/kg byl pozorován povlak buněk CD4⁺ a přechodná a částečná modulace receptorů CD4 buněčného povrchu, ačkoliv nebyla pozorována žádná buněčná deplece CD4⁺. Při dávce 15 mg/kg CE9γ4PE nebyla pozorována buněčná deplece CD4⁺ u

žádného zvířete, ačkoliv u všech zvířat byla pozorována významná modulace. Modulační účinek byl přechodný a vrátil se k výchozímu stavu během 14-21 dnů. U žádného zvířete nebyly pozorovány žádné vedlejší účinky. CE9γ4PE mohla být detekována na buněčném povrchu a v séru do dvou dnů po podávání.

CE9γ4PE byla navržena tak, aby neměla depleční účinek a u žádného zvířete nebyla pozorována deplece, dokonce ani při relativně vysoké dávce 15 mg/kg. CE9γ4PE byla v sérech šimpanzů stabilní a zůstávala v oběhu až 21 dnů.

Použití

Protilátky tvořené způsobem popsáním výše nebo rovnocennými technikami mohou být pro charakterizaci ve funkčních biologických testech purifikovány kombinací afinitní a velikostní chromatografie. Tyto testy zahrnují určení specifity a vazebné afinity, a také efektorové funkce přidružené k exprimovanému izotypu, např. ADCC nebo fixace komplementu. Takové protilátky jsou užívány jako pasivní nebo aktivní terapeutické přípravky proti řadě lidských nemocí, které postihují expresi CD4 a T buňky, včetně B buněčného lymfomu, infekčních nemocí včetně AIDS, autoimunitních a zánětlivých nemocí a transplantace. Protilátky mohou být použity buď ve své nativní formě nebo jako část komplexu protilátka/chelát, protilátka/lék nebo protilátka/toxin. Kromě toho mohou být použity celé protilátky nebo protilátkové fragmenty (Fab₂, Fab, Fv) jako reagentie pro zobrazování, potenciální vakcíny nebo imunogeny v aktivní imunoterapii pro vyvolání anti-idiotypové odpovědi.

Množství protilátky použitelné k vyvolání terapeutického účinku může být určeno standardními

technikami odborníkům dobře známými. Protilátky budou všeobecně poskytovány standardní technikou ve farmaceuticky přijatelném pufru a mohou být podávány jakýmkoliv žádoucím způsobem. Vzhledem k účinnosti předkládaných nárokových protilátek a jejich toleranci člověkem je možné tyto protilátky podávat opakovaně, aby se bojovalo proti různým nemocem nebo chorobným stavům u člověka.

Rekombinantní protilátky anti-CD4 (nebo jejich fragmenty) tohoto vynálezu jsou také použitelné pro navození imunomodulace, např. navození imunosuprese lidského nebo zvířecího imunitního systému. Tento vynález se proto týká způsobu, který profylakticky nebo terapeuticky navozuje imunomodulaci u člověka nebo zvířete, který toho potřebuje, podáváním účinného netoxického množství protilátky podle tohoto vynálezu člověku nebo zvířeti.

Schopnost sloučenin tohoto vynálezu navodit imunomodulaci může být prokázána standardními testy pro tento účel používanými, jako je například test smíšené lymfocytární reakce nebo test měřící inhibici T buněčné proliferace měřením vychytávání thymidinu.

Fakt, že protilátky podle tohoto vynálezu jsou užitečné v navození imunosuprese, znamená, že jsou použitelné v léčbě nebo prevenci rezistence k transplantovaným orgánům nebo tkáním (např. ledviny, srdce, plíce, kostní dřeň, kůže, rohovka atd.) nebo jejich rejekce, léčbě nebo prevenci autoimunitních, zánětlivých, proliferačních a hyperproliferačních nemocí, a kožních manifestací imunologicky zprostředkovaných nemocí (např. revmatoidní artritida, lupus erytematosus, systémový lupus erytematosus, Hashimotovy tyreoiditidy, sclerosis multiplex, myastenia gravis, diabetes I. typu, uveitida, nefrotický syndrom, psoriáza, atopická dermatitida, kontaktní dermatitida a

další ekzematózní dermatitidy, seboroická dermatitida, lichen planus, pemfigus, bulózní pemfigus, bulózní epidermolysis, kopřivka, angioedém, vaskulitidy, erytém, kožní eosinofilie, alopecia areata, atd.), léčba reverzibilní obstrukční nemoci dýchacích cest, střevní záněty a alergie (např. celiakie, proktitida, eosinofilní gastroenteritida, mastocytóza, Crohnova nemoc a ulcerativní kolitida) a potravinové alergie (např. migréna, rýma a ekzém). Předmětné protilátky jsou také potenciálně použitelné pro léčbu neautoimunitních stavů, kde je žádoucí imunomodulace, jako je kromě jiného např. reakce štěpu proti hostiteli (GVHD), transplantační rejekce, astma, HIV, leukémie, lymfom.

Odborník by byl schopný rutinními pokusy určit jaké účinné netoxické množství protilátky by bylo vhodné k navození imunosuprese.

Protilátky (nebo jejich fragmenty) podle tohoto vynálezu jsou také použitelné pro léčení nádorů u savců. Konkrétněji jsou použitelné pro zmenšení nádoru, inhibici nádorového růstu a/nebo prodloužení doby přežití zvířat majících nádor. Tento vynález se tudíž také týká způsobu léčení nádorů u lidí nebo zvířat podáváním účinného netoxického množství protilátky takovému člověku nebo zvířeti. Odborník by byl schopen rutinními pokusy určit jaké účinné netoxické množství protilátky by bylo vhodné k léčení karcinogenních nádorů. Všeobecně se očekává, že účinné dávkování je v rozmezí od 0,05 do 100 mg/kg tělesné váhy/den.

Protilátky podle vynálezu mohou být podávány člověku nebo zvířeti podle výše zmíněných způsobů léčení ve množství dostatečném k vyvolání takového účinku na terapeutickém nebo profylaktickém stupni. Protilátky podle vynálezu mohou být

podávány takovému člověku nebo zvířeti v obvyklé dávkovací formě připravené kombinací protilátky podle vynálezu s obvyklým farmaceuticky přijatelným nosičem nebo ředidlem podle známých technik. Odborníkovi bude zřejmé, že forma a charakter farmaceuticky přijatelného nosiče nebo ředidla závisí na množství aktivní složky, se kterou se bude kombinovat, způsobu podávání a dalších známých proměnných.

Způsob podávání protilátky (nebo jejího fragmentu) podle vynálezu může být perorální, parenterální, inhalací nebo místní. Termín parenterální, jak se zde používá, zahrnuje intravenózní, intramuskulární, subkutánní, rektální, vaginální nebo intraperitoneální podávání. Všeobecně se preferují subkutánní a intramuskulární formy parenterálního podávání.

Denní parenterální a perorální dávkovací schémata pro použití sloučenin podle vynálezu, aby profylakticky nebo terapeuticky navozovaly imunosupresi nebo terapeuticky ošetřily nádory, budou všeobecně v rozmezí od 0,05 do 100, ale výhodně od 0,5 do 10 mg/kg tělesné váhy/den.

Protilátka podle vynálezu může být také podávána inhalací. Inhalací se míní intranazální a perorální inhalační podávání. Příslušné dávkové formy pro takové podávání, jako je aerosolový přípravek nebo inhalátor odměřující dávku, se připraví obvyklými technikami. Preferovaná dávka sloučeniny vynálezu, která bude použita, je všeobecně v rozmezí od 10 do 100 mg.

Protilátka podle vynálezu může být také podávána lokálně. Lokálním podáváním se míní nesystémové podávání a zahrnuje aplikaci protilátkové (nebo jejího fragmentu) sloučeniny podle vynálezu externě na epidermis, bukálně a instilaci této protilátky do ucha, oka a nosu, a kde nevstoupí významně do krevního řečiště. Systémovým podáváním

se míní perorální, intravenózní, intraperitoneální a intramuskulární podávání. Množství protilátky vyžadované pro terapeutický nebo profylaktický účinek bude ovšem kolísat podle vybrané protilátky, povahy a vážnosti léčeného stavu a zvířete podstupujícího léčení a závisí konečně na úsudku lékaře. Vhodná lokální dávka protilátky podle vynálezu bude všeobecně v rozmezí od 1 do 100 mg/kg tělesné váhy/den.

Přípravky

Ačkoliv je možné, aby protilátka nebo její fragment byly podávány samotné, je výhodné je podávat jako farmaceutický přípravek. Aktivní složka pro lokální podávání může být od 0,001 % do 10 % (hmotnostních), např. od 1 % do 2 % hmotnosti přípravku, ačkoliv může být až 10 % (hmotnostních), ale výhodně ne více než 5 % (hmotnostních) a výhodněji od 0,1 % do 1 % (hmotnostních) přípravku.

Přípravky pro lokální použití předkládaného vynálezu obsahují aktivní složku spolu s jedním nebo více přijatelnými nosiči a jakoukoliv další volitelnou složku. Nosič musí být „přijatelný“ ve smyslu kompatibility s dalšími složkami přípravku a nesmí být škodlivý pro příjemce.

Přípravky vhodné pro lokální podávání zahrnují tekuté nebo polotekuté léky vhodné pro penetraci skrze kůži na místo, kde se vyžaduje léčení, jako mazání, locion, krém, mast nebo pasta a kapky vhodné pro podávání do oka, ucha nebo nosu.

Kapky podle předkládaného vynálezu obsahují sterilní vodné nebo olejnaté roztoky nebo suspenze a jsou připravovány rozpuštěním aktivní složky ve vhodném vodném roztoku baktericidního a/nebo fungicidního přípravku a/nebo jakéhokoliv dalšího vhodného konzervačního prostředku a

výhodně zahrnující povrchově aktivní přípravek. Výsledný roztok je poté čištěn filtrací, přenesen do vhodné nádoby, která je poté těsně uzavřena a sterilizována v autoklávu nebo udržováním teploty 90 °C až 100 °C půl hodiny. Alternativně může být roztok sterilizován filtrací a přenesen do nádoby asepticky. Příklady baktericidních a fungicidních přípravků vhodných pro zahrnutí do kapek jsou dusičnan nebo octan fenylrtuťnatý (0,002%), benzalkoniumchlorid (0,01%) a chlorhexidin (0,01%). Vhodná rozpouštědla pro přípravu olejnatého roztoku zahrnují glycerol, naředěný alkohol a propylenglykol.

Lociony podle předkládaného vynálezu zahrnují takové, které jsou vhodné pro aplikaci na kůži nebo do oka. Oční locion zahrnuje sterilní vodný roztok, který volitelně obsahuje baktericidní látku a může být připraven způsobem podobným jako pro přípravu kapek. Lociony nebo linimenta pro použití na kůži mohou také obsahovat přípravek pro urychlené osychání a chlazení kůže, jako alkohol nebo aceton, a/nebo zvlhčovač jako glycerol nebo olej, jako ricinový olej nebo podzemnicový olej.

Krémy, masti nebo pasty podle předkládaného vynálezu jsou polotuhé přípravky aktivní složky pro vnější použití. Mohou být tvořeny mísením aktivní složky v jemně oddělené nebo práškové formě, samotné nebo v roztoku nebo suspenzi v tekutině vodné nebo jiné povahy, pomocí vhodného zařízení, v mastném nebo nemastném základu. Základ může obsahovat uhlovodíky, jako je tvrdý, měkký nebo tekutý parafin, glycerol, včelí vosk, kovové mýdlo, arabskou gumu, olej přírodního původu, jako mandlový, kukuřičný, podzemnicový, ricinový nebo olivový olej, tuk z ovčí vlny, nebo jeho deriváty, nebo mastné kyseliny, jako je stearová nebo olejová spolu s alkoholem, jako je propylenglykol nebo

makrogol. Přípravek může zahrnout jakékoliv vhodné povrchově aktivní činidlo, jako jsou estery sorbitanu nebo jeho polyoxyetylenové deriváty. Mohou být také zahrnuta suspendující činidla, jako jsou přírodní gummy, deriváty celulózy nebo anorganické látky, jako jsou oxidy křemíku, a další složky, jako je lanolín.

Odborníkovi je známo, že optimální kvantitu a odstup jednotlivých dávek protilátky podle vynálezu nebo jejích fragmentů určí povaha a stupeň léčeného stavu, forma, způsob a místo podávání a konkrétní léčené zvíře, a že taková optima mohou být určena obvyklými technikami. Odborníkem bude také oceněno, že optimální léčebný postup, tj. počet dávek protilátky vynálezu nebo jejího fragmentu podávaný denně po definovaný počet dnů, může být odborníky zjištěn při použití testů, které určují obvyklý průběh léčby.

Věříme, že odborník může za použití předchozího popisu využít předkládaný vynález v plném rozsahu bez dalšího podrobného rozpracování. Proto je následující chápáno pouze jako ilustrativní příklad a ne jako omezení rozsahu předkládaného vynálezu jakýmkoliv způsobem.

Přípravek ve formě tobolky

Farmaceutický přípravek podle tohoto vynálezu ve formě tobolky se připraví naplněním standardní tvrdé želatinové tobolky složené ze dvou částí 50 mg protilátky vynálezu nebo jejího fragmentu, ve formě prášku, 100 mg laktózy, 32 mg talku a 8 mg stearanu hořečnatého.

Injekční parenterální přípravek

Farmaceutický přípravek tohoto vynálezu ve formě vhodné pro podávání injekcí se připraví mícháním 1,5 % (hmotnostního) protilátky vynálezu nebo jejího fragmentu v

10% (objemovém) propylenglykolu a vodě. Roztok se sterilizuje filtrací.

Přípravek ve formě masti

Protilátka vynálezu nebo její fragment 1,0 g.

Měkký bílý parafín do 100,0 g.

Protilátka vynálezu nebo její fragment se disperguje v malém objemu vehikula tak, aby vznikl hladký homogenní produkt. Disperzi se poté plní mačkatelné kovové tuby.

Přípravek ve formě krému pro lokální podávání

Protilátka vynálezu nebo její fragment 1,0 g.

Polawax GP 200 20,0 g.

Bezvodý lanolín 2,0 g.

Bílý včelí vosk 2,5 g.

Metylhydroxybenzoan 0,1 g.

Destilovaná voda do 100 g.

Polawax, včelí vosk a lanolín dohromady se zahřejí v 60 °C. Přidá se roztok metylhydroxybenzoanu a při použití míchání vysokou rychlostí se dosáhne homogenizace. Poté se ponechá teplota poklesnout na 50 °C. Pak se přidá protilátka podle vynálezu nebo její fragment a celé množství se důkladně rozptýlí a přípravek se ponechá chlادنout za pomalého míchání.

Přípravek ve formě locionu pro lokální podávání

Protilátka vynálezu nebo její fragment 1,0 g.

Sorbitan monolaurát 0,6 g. Polysorban 20 0,6 g.

Cetostearylalkohol 1,2 g. Glycerin 6,0 g.

Metylhydroxybenzoan 0,2 g.

Purifikovaná voda B.P. do 100,00 ml. (B.P. = britský lékopis)

Metylhydroxybenzoan a glycerin se rozpustí v 70 ml vody v 75 °C. Sorbitan monolaurát, polysorban 20 a cetostearylalkohol se rozpustí dohromady v 75 °C a přidají se k vodnému roztoku. Výsledná emulze se homogenizuje, ponechá se chlazenout za stálého míchání a přidá se protilátka vynálezu nebo její fragment jako suspenze ve zbývajících vodě. Celá suspenze se míchá, dokud se plně nehomogenizuje.

Přípravek ve formě očních kapek

Protilátka vynálezu nebo její fragment 0,5 g.

Metylhydroxybenzoan 0,1 g.

Propylhydroxybenzoan 0,04 g.

Purifikovaná voda B.P. do 100,00 ml.

Metyl a propylhydroxybenzoany se rozpustí v 70 ml purifikované vody v 75 °C a výsledný roztok se ponechá chlazenout. Poté se přidá protilátka vynálezu nebo její fragment a roztok se sterilizuje filtrací přes membránový filtr (velikost pórů 0,022 μm), a asepticky balí do vhodných sterilních nádobek.

Přípravek pro podávání inhalací

Pro aerosolovou nádobku s kapacitou 15-20 ml: smíchej 10 mg protilátky podle vynálezu nebo jejího fragmentu s 0,2-0,5 % lubrikačního činidla, jako je polysorban 85 nebo kyselina olejová, a rozptyl tuto směs v pohonné látce, jako je freon, výhodně v kombinaci (1,2-dichlorotetrafluoroetanu) a difluorochlorometanu a vlož do příslušné aerosolové nádobky upravené buď pro intranazální nebo perorální inhalační podávání. Přípravek pro podávání inhalací pro aerosolovou nádobku s kapacitou 15-20 ml: rozpust 10 mg protilátky podle vynálezu nebo jejího fragmentu v etanolu

(6-8 ml), přidej 0,1-0,2 % lubrikačního činidla, jako je polysorban 85 nebo kyselina olejová, a rozptyl v pohonné látce, jako je freon, výhodně v kombinaci (1,2 dichlorotetrafluoroetanu) a difluorochlorometanu a vlož do příslušné aerosolové nádoby upravené buď pro intranazální nebo perorální inhalační podávání.

Protilátky a farmaceutické přípravky podle vynálezu jsou obzvláště vhodné pro parenterální podávání, tj. subkutánně, intramuskulárně nebo intravenózně. Přípravky pro parenterální podávání obecně obsahují roztok protilátky podle vynálezu nebo jejího fragmentu nebo jejich směsi rozpuštěný v přijatelném nosiči, výhodně ve vodném. Může být použita celá řada vodných nosičů, např. voda, pufrovaná voda, 0,4% fyziologický roztok, 0,3% glycin, a podobně. Tyto roztoky jsou sterilní a bez částic. Tyto roztoky jsou sterilizovány obvyklými, dobře známými sterilizačními technikami. Přípravky mohou obsahovat farmaceuticky přijatelné pomocné látky, jak se vyžaduje při přiblížení se fyziologickým podmínkám, jako jsou pufrující činidla a činidla upravující pH, atd. Koncentrace protilátky podle vynálezu nebo jejího fragmentu v takovém farmaceutickém přípravku může široce kolísat, tj. od méně než 0,5 %, obvykle alespoň 1 %, až do 15 nebo 20 % (hmotnostních), a vybírá se primárně podle objemů tekutin, viskozit atd., podle konkrétního vybraného způsobu podávání.

Farmaceutický přípravek vynálezu pro intramuskulární injekci se připraví tak, aby obsahoval 1 ml sterilní pufrované vody a 50 mg protilátky vynálezu nebo jejího fragmentu. Podobně farmaceutický přípravek vynálezu pro intravenózní infúzi je vyroben tak, že obsahuje 250 ml sterilního Ringerova roztoku a 150 mg protilátky vynálezu nebo jejího fragmentu. Současné způsoby přípravy

parenterálně podavatelných přípravků jsou dobře známy nebo jsou odborníkům zjevné, a jsou detailněji popsány například v Remington's Pharmaceutical Science, 15. vyd., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, zahrnuto v odkazech.

Protilátky podle vynálezu (nebo jejich fragmenty) mohou být lyofilizovány pro uskladnění a před použitím rekonstituovány ve vhodném nosiči. Tato technika se ukázala být účinná u obvyklých imunoglobulinů a mohou být použity lyofilizační a rekonstituční techniky v oboru známé.

V závislosti na zamýšlených výsledcích může být farmaceutický přípravek vynálezu podáván pro profylaktické a/nebo léčebné ošetření. Při léčebné aplikaci se přípravky podávají pacientovi, který již nemocí trpí, v množství postačujícím pro vyléčení nebo alespoň částečně zastavujícím nemoc a její komplikace. U profylaktických aplikací se přípravky obsahující předkládané protilátky nebo jejich směsi podávají pacientovi, který ještě není v chorobném stavu, aby se posílila jeho odolnost.

Jedno nebo více podávání farmaceutických přípravků se provádí dávkami a způsobem, který vybral ošetřující lékař. V každém případě farmaceutický přípravek podle vynálezu poskytne množství pozměněných protilátek (nebo jejich fragmentů) vynálezu postačující účinně léčit pacienta.

Je třeba také poznamenat, že protilátky tohoto vynálezu mohou být použity pro navržení a syntézu buď peptidových nebo nepeptidových sloučenin (mimetik), které mohou být použitelné v téže léčbě, jako protilátka. Viz např. Saragovi et al., Science, 253: 792-795, 1991.

Uložení

Kmen XL1 Blue, anti-CD4 v TCAE 6, který exprimuje CE9.1, byl uložen ve sbírce ATCC pod číslem 69030. Toto uložení bylo učiněno 9. července 1992.

Žadatelé a jejich zmocněnci potvrzují svou zodpovědnost nahradit tyto kultury, kdyby zahynuly před koncem termínu platnosti patentu na ně vydaného, nebo v období 5 let po poslední žádosti o kulturu, nebo po dobu 30 let (příčemž platí nejdelší termín), a svou zodpovědnost uvědomit sbírku o vydání patentu, a od této doby pak bude depozit nezvratně dostupný veřejnosti. Do této doby bude depozit přístupný patentovému zmocněnci za podmínek 37 C.F.R. Oddíl 1-14 a 35 U.S.C. Oddíl 112.

Další provedení jsou v následujících patentových nárocích.

SEZNAM SEKVENCÍ

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 1:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 420 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

- (A) ORGANISMUS: opice

(viii) POZICE V GENOMU:

- (A) CHROMOZOM/SEGMENT: variabilní doména lehkého řetězce CE9.1

(ix) ZNAKY:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS
- (B) POZICE: 4...420

(ix) ZNAKY:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: hotový peptid
- (B) POZICE: 61...420

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

GAC	ATG	AAA	CAC	CTG	TGG	TTC	TTC	CTC	CTC	CTG	GTG	GCA	GCC	CCC	AGA	48
Met	Lys	His	Leu	Trp	Phe	Phe	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	Ala	Pro	Arg		
-19				-15					-10					-5		
TGG	GTC	TTG	TCC	CAG	GTG	CAG	CTG	CAG	GAG	GCG	GGC	CCA	GGA	CTG	GTG	96
Trp	Val	Leu	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ala	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	
			1				5					10				
AAG	CCT	TCG	GAG	ACC	CTG	TCC	CTC	ACC	TGC	AGT	GTC	TCT	GGT	GGC	TCC	144
Lys	Pro	Ser	Glu	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ser	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	
		15					20					25				
ATC	AGC	GGT	GAC	TAT	TAT	TGG	TTC	TGG	ATC	CGC	CAG	TCC	CCA	GGG	AAG	192
Ile	Ser	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Trp	Phe	Trp	Ile	Arg	Gln	Ser	Pro	Gly	Lys	
	30					35				40						
GGA	CTG	GAG	TGG	ATC	GGC	TAC	ATC	TAT	GGC	AGT	GGT	GGG	GGC	ACC	AAT	240
Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Tyr	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Thr	Asn	
45					50				55						60	

TAC AAT CCC TCC CTC AAC AAT CGA GTC TCC ATT TCA ATA GAC ACG TCC	288
Tyr Asn Pro Ser Leu Asn Asn Arg Val Ser Ile Ser Ile Asp Thr Ser	
65 70 75	
AAG AAC CTC TTC TCC CTG AAA CTG AGG TCT GTG ACC GCC GCG GAC ACG	336
Lys Asn Leu Phe Ser Leu Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr	
80 85 90	
GCC GTC TAT TAC TGT GCG AGT AAT ATA TTG AAA TAT CTT CAC TGG TTA	384
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Asn Ile Leu Lys Tyr Leu His Trp Leu	
95 100 105	
TTA TAC TGG GGC CAG GGA GTC CTG GTC ACC GTC TCC	420
Leu Tyr Trp Gly Gln Gly Val Leu Val Thr Val Ser	
110 115 120	

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 2:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
- (A) DÉLKA: 139 aminokyselin
 - (B) TYP: aminokyselina
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

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

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

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 3:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 387 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

- (A) ORGANISMUS: opice

(viii) POZICE V GENOMU:

- (A) CHROMOZOM/SEGMENT: variabilní doména těžkého řetězce CE9.1

(ix) ZNAKY:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS
- (B) POZICE: 4...387

(ix) ZNAKY:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: hotový peptid
- (B) POZICE: 61...387

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

ACC ATG GCC TGG GCT CTG CTG CTC CTC GGC CTC CTT GCT CAC TTT ACA	48
Met Ala Trp Ala Leu Leu Leu Leu Gly Leu Leu Ala His Phe Thr	
-19 -15 -10 -5	
GAC TCT GCG GCC TCC TAT GAG TTG AGT CAG CCT CGC TCA GTG TCC GTG	96
Asp Ser Ala Ala Ser Tyr Glu Leu Ser Gln Pro Arg Ser Val Ser Val	
1 5 10	
TCC CCA GGA CAG ACG GCC GGG TTC ACC TGT GGG GGA GAC AAC GTT GGA	144
Ser Pro Gly Gln Thr Ala Gly Phe Thr Cys Gly Gly Asp Asn Val Gly	
15 20 25	
AGG AAA AGT GTA CAG TGG TAC CAG CAG AAG CCA CCG CAG GCC CCT GTG	192
Arg Lys Ser Val Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Pro Gln Ala Pro Val	
30 35 40	
CTG GTC ATC TAT GCT GAC AGC GAA CGG CCC TCA GGG ATC CCT GCG CGA	240
Leu Val Ile Tyr Ala Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Ala Arg	
45 50 55 60	
TTC TCT GGC TCC AAC TCA GGG AAC ACC GCC ACC CTG ACC ATC AGC GGG	288
Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly	
65 70 75	

12.05.98

86

GTC GAG GCC GGG GAT GAG GCT GAC TAT TAC TGT CAG GTG TGG GAC AGT 336
 Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser
 80 85 90

ACT GCT GAT CAT TGG GTC TTC GGC GGA GGG ACC CGG CTG ACC GTC CTA 384
 Thr Ala Asp His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu
 95 100 105

GGT 387
 Gly

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 4:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 128 aminokyselin
 - (B) TYP: aminokyselina
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

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

Met Ala Trp Ala Leu Leu Leu Gly Leu Leu Ala His Phe Thr Asp
 -19 -15 -10 -5

Ser Ala Ala Ser Tyr Glu Leu Ser Gln Pro Arg Ser Val Ser Val Ser
 1 5 10

Pro Gly Gln Thr Ala Gly Phe Thr Cys Gly Gly Asp Asn Val Gly Arg
 15 20 25

Lys Ser Val Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Pro Gln Ala Pro Val Leu
 30 35 40 45

Val Ile Tyr Ala Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val
 65 70 75

Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Thr
 80 85 90

Ala Asp His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Gly
 95 100 105

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 5:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 702 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

- (A) ORGANISMUS: Homo sapiens

(viii) POZICE V GENOMU:

- (A) CHROMOZOM/SEGMENT: konstantní a variabilní domény lehkého řetězce lambda CE9.1

(ix) ZNAKY:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS
- (B) POZICE: 4...702

(ix) ZNAKY:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: hotový peptid
- (B) POZICE: 1...702

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

ATG GCC TGG GCT CTG CTG CTC CTC GGC CTC CTT GCT CAC TTT ACA GAC	48
Met Ala Trp Ala Leu Leu Leu Leu Gly Leu Leu Ala His Phe Thr Asp	
1 5 10 15	
TCT GCG GCC TCC TAT GAG TTG AGT CAG CCT CGC TCA GTG TCC GTG TCC	96
Ser Ala Ala Ser Tyr Glu Leu Ser Gln Pro Arg Ser Val Ser Val Ser	
20 25 30	
CCA GGA CAG ACG GCC GGG TTC ACC TGT GGG GGA GAC AAC GTT GGA AGG	144
Pro Gly Gln Thr Ala Gly Phe Thr Cys Gly Gly Asp Asn Val Gly Arg	
35 40 45	
AAA AGT GTA CAG TGG TAC CAG CAG AAG CCA CCG CAG GCC CCT GTG CTG	192
Lys Ser Val Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Pro Gln Ala Pro Val Leu	
50 55 60	
GTC ATC TAT GCT GAC AGC GAA CGG CCC TCA GGG ATC CCT GCG CGA TTC	240
Val Ile Tyr Ala Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe	
65 70 75 80	
TCT GGC TCC AAC TCA GGG AAC ACC GCC ACC CTG ACC ATC AGC GGG GTC	288
Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val	
85 90 95	

12.05.98

88

GAG	GCC	GGG	GAT	GAG	GCT	GAC	TAT	TAC	TGT	CAG	GTG	TGG	GAC	AGT	ACT	336
Glu	Ala	Gly	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Val	Trp	Asp	Ser	Thr	
		100						105					110			
GCT	GAT	CAT	TGG	GTC	TTC	GGC	GGA	GGG	ACC	CGG	CTG	ACC	GTC	CTA	GGT	384
Ala	Asp	His	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Arg	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	
		115					120					125				
CAG	CCC	AAG	GCT	GCC	CCC	TCG	GTC	ACT	CTG	TTC	CCG	CCC	TCC	TCT	GAG	432
Gln	Pro	Lys	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Thr	Leu	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu	
	130					135					140					
GAG	CTT	CAA	GCC	AAC	AAG	GCC	ACA	CTG	GTG	TGT	CTC	ATA	AGT	GAC	TTC	480
Glu	Leu	Gln	Ala	Asn	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ile	Ser	Asp	Phe	
145					150					155					160	
TAC	CCG	GGA	GCC	GTG	ACA	GTG	GCC	TGG	AAG	GCA	GAT	AGC	AGC	CCC	GTC	528
Tyr	Pro	Gly	Ala	Val	Thr	Val	Ala	Trp	Lys	Ala	Asp	Ser	Ser	Pro	Val	
				165					170					175		
AAG	GCG	GGA	GTG	GAG	ACC	ACC	ACA	CCC	TCC	AAA	CAA	AGC	AAC	AAC	AAG	576
Lys	Ala	Gly	Val	Glu	Thr	Thr	Thr	Pro	Ser	Lys	Gln	Ser	Asn	Asn	Lys	
			180					185					190			
TAC	GCG	GCC	AGC	AGC	TAC	CTG	AGC	CTG	ACG	CCT	GAG	CAG	TGG	AAG	TCC	624
Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ser	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Trp	Lys	Ser	
		195					200					205				
CAC	AGA	AGC	TAC	AGC	TGC	CAG	GTC	ACG	CAT	GAA	GGG	AGC	ACC	GTG	GAG	672
His	Arg	Ser	Tyr	Ser	Cys	Gln	Val	Thr	His	Glu	Gly	Ser	Thr	Val	Glu	
	210					215					220					
AAG	ACA	GTG	GCC	CCT	ACA	GAA	TGT	TCA	TGA							702
Lys	Thr	Val	Ala	Pro	Thr	Glu	Cys	Ser	*							
225					230											

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 6:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
- (A) DÉLKA: 234 aminokyselin
 - (B) TYP: aminokyselina
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

12.05.98

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

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

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 7:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 1404 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(viii) POZICE V GENOMU:

- (A) CHROMOZOM/SEGMENT: variabilní a konstantní oblasti gama 4 těžkého řetězce

(ix) ZNAKY:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS
- (B) POZICE: 1...1404

(ix) ZNAKY:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: hotový peptid
- (B) POZICE: 1...1404

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

ATG	AAA	CAC	CTG	TGG	TTC	TTC	CTC	CTC	CTG	GTG	GCA	GCC	CCC	AGA	TGG	48
Met	Lys	His	Leu	Trp	Phe	Phe	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	Ala	Pro	Arg	Trp	
1				5					10					15		
GTC	TTG	TCC	CAG	GTG	CAG	CTG	CAG	GAG	TCG	GGC	CCA	GGA	CTG	GTG	AAG	96
Val	Leu	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	
			20					25					30			
CCT	TCG	GAG	ACC	CTG	TCC	CTC	ACC	TGC	AGT	GTC	TCT	GGT	GGC	TCC	ATC	144
Pro	Ser	Glu	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ser	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	
			35				40					45				
AGC	GGT	GAC	TAT	TAT	TGG	TTC	TGG	ATC	CGC	CAG	TCC	CCA	GGG	AAG	GGA	192
Ser	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Trp	Phe	Trp	Ile	Arg	Gln	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	
	50					55				60						
CTG	GAG	TGG	ATC	GGC	TAC	ATC	TAT	GGC	AGT	GGT	GGG	GGC	ACC	AAT	TAC	240
Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Tyr	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	
65				70				75						80		
AAT	CCC	TCC	CTC	AAC	AAT	CGA	GTC	TCC	ATT	TCA	ATA	GAC	ACG	TCC	AAG	288
Asn	Pro	Ser	Leu	Asn	Asn	Arg	Val	Ser	Ile	Ser	Ile	Asp	Thr	Ser	Lys	
				85				90						95		
AAC	CTC	TTC	TCC	CTG	AAA	CTG	AGG	TCT	GTG	ACC	GCC	GCG	GAC	ACG	GCC	336
Asn	Leu	Phe	Ser	Leu	Lys	Leu	Arg	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	
			100					105					110			
GTC	TAT	TAC	TGT	GCG	AGT	AAT	ATA	TTG	AAA	TAT	CTT	CAC	TGG	TTA	TTA	384
Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ser	Asn	Ile	Leu	Lys	Tyr	Leu	His	Trp	Leu	Leu	
			115				120					125				

12.05.98

91

TAC	TGG	GGC	CAG	GGA	GTC	CTG	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA	GCT	AGC	ACC	AAG	432
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Val	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	
130						135				140						
GGC	CCA	TCC	GTC	TTC	CCC	CTG	GCG	CCC	TGC	TCC	AGG	AGC	ACC	TCC	GAG	480
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	
145					150				155						160	
AGC	ACA	GCC	GCC	CTG	GGC	TGC	CTG	GTC	AAG	GAC	TAC	TTC	CCC	GAA	CCG	528
Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	
				165					170					175		
GTG	ACG	GTG	TCG	TGG	AAC	TCA	GGC	GCC	CTG	ACC	AGC	GGC	GTG	CAC	ACC	576
Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	
			180				185						190			
TTC	CCG	GCT	GTC	CTA	CAG	TCC	TCA	GGA	CTC	TAC	TCC	CTC	AGC	AGC	GTG	624
Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	
	195					200						205				
GTG	ACC	GTG	CCC	TCC	AGC	AGC	TTG	GGC	ACG	AAG	ACC	TAC	ACC	TGC	AAC	672
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	
210						215					220					
GTA	GAT	CAC	AAG	CCC	AGC	AAC	ACC	AAG	GTG	GAC	AAG	AGA	GTT	GAG	TCC	720
Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	
225					230				235					240		
AAA	TAT	GGT	CCC	CCA	TGC	CCA	TCA	TGC	CCA	GCA	CCT	GAG	TTC	CTG	GGG	768
Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Ser	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	
			245					250						255		
GGA	CCA	TCA	GTC	TTC	CTG	TTC	CCC	CCA	AAA	CCC	AAG	GAC	ACT	CTC	ATG	816
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	
			260				265						270			
ATC	TCC	CGG	ACC	CCT	GAG	GTC	ACG	TGC	GTG	GTG	GTG	GAC	GTG	AGC	CAG	864
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	
		275				280						285				
GAA	GAC	CCC	GAG	GTC	CAG	TTC	AAC	TGG	TAC	GTG	GAT	GGC	GTG	GAG	GTG	912
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	
290					295						300					
CAT	AAT	GCC	AAG	ACA	AAG	CCG	CGG	GAG	GAG	CAG	TTC	AAC	AGC	ACG	TAC	960
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	
305					310					315					320	
CGT	GTG	GTC	AGC	GTC	CTC	ACC	GTC	CTG	CAC	CAG	GAC	TGG	CTG	AAC	GGC	1008
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	
				325				330					335			
AAG	GAG	TAC	AAG	TGC	AAG	GTC	TCC	AAC	AAA	GGC	CTC	CCG	TCC	TCC	ATC	1056
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	
			340				345					350				
GAG	AAA	ACC	ATC	TCC	AAA	GCC	AAA	GGG	CAG	CCC	CGA	GAG	CCA	CAG	GTG	1104
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	

12.05.98

TAC	ACC	CTG	CCC	CCA	TCC	CAG	GAG	GAG	ATG	ACC	AAG	AAC	CAG	GTC	AGC	1152
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	
370						375					380					
CTG	ACC	TGC	CTG	GTC	AAA	GGC	TTC	TAC	CCC	AGC	GAC	ATC	GCC	GTG	GAG	1200
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	
385					390					395					400	
TGG	GAG	AGC	AAT	GGG	CAG	CCG	GAG	AAC	AAC	TAC	AAG	ACC	ACG	CCT	CCC	1248
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	
				405					410					415		
GTG	CTG	GAC	TCC	GAC	GGC	TCC	TTC	TTC	CTC	TAC	AGC	AGG	CTA	ACC	GTG	1296
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	
			420					425					430			
GAC	AAG	AGC	AGG	TGG	CAG	GAG	GGG	AAT	GTC	TTC	TCA	TGC	TCC	GTG	ATG	1344
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	
	435						440					445				
CAT	GAG	GCT	CTG	CAC	AAC	CAC	TAC	ACA	CAG	AAG	AGC	CTC	TCC	CTG	TCT	1392
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	
	450					455					460					
CTG	GGT	AAA	TGA													1404
Leu	Gly	Lys	*													
465																

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 8:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 468 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

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

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

12.05.98

93

Ser	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Trp	Phe	Trp	Ile	Arg	Gln	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly		
50						55					60						
Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Tyr	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr		
65					70					75					80		
Asn	Pro	Ser	Leu	Asn	Asn	Arg	Val	Ser	Ile	Ser	Ile	Asp	Thr	Ser	Lys		
				85					90					95			
Asn	Leu	Phe	Ser	Leu	Lys	Leu	Arg	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala		
			100					105					110				
Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ser	Asn	Ile	Leu	Lys	Tyr	Leu	His	Trp	Leu	Leu		
	115						120					125					
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Val	Leu	Val	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	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn		
210						215					220						
Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser		
225					230					235					240		
Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Ser	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly		
			245						250					255			
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met		
			260					265					270				
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln		
		275					280					285					
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val		
290						295					300						
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr		
305					310					315					320		
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly		
				325					330					335			
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile		
			340					345					350				

12.05.98

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val
 420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 450 455 460

Leu Gly Lys *
 465

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 9:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 1404 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

- (A) ORGANISMUS: Homo sapiens

(viii) POZICE V GENOMU:

- (A) CHROMOZOM/SEGMENT: těžký řetězec gama 4 s mutací E

(ix) ZNAKY:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS
- (B) POZICE: 1...1404

(ix) ZNAKY:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: hotový peptid
- (B) POZICE: 1...1404

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

ATG AAA CAC CTG TGG TTC TTC CTC CTC CTG GTG GCA GCC CCC AGA TGG	48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp	
1 5 10 15	
GTC TTG TCC CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG	96
Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys	
20 25 30	
CCT TCG GAG ACC CTG TCC CTC ACC TGC AGT GTC TCT GGT GGC TCC ATC	144
Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ser Gly Gly Ser Ile	
35 40 45	
AGC GGT GAC TAT TAT TGG TTC TGG ATC CGC CAG TCC CCA GGG AAG GGA	192
Ser Gly Asp Tyr Tyr Trp Phe Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly	
50 55 60	
CTG GAG TGG ATC GGC TAC ATC TAT GGC AGT GGT GGG GGC ACC AAT TAC	240
Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Gly Ser Gly Gly Gly Thr Asn Tyr	
65 70 75 80	
AAT CCC TCC CTC AAC AAT CGA GTC TCC ATT TCA ATA GAC ACG TCC AAG	288
Asn Pro Ser Leu Asn Asn Arg Val Ser Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys	
85 90 95	
AAC CTC TTC TCC CTG AAA CTG AGG TCT GTG ACC GCC GCG GAC ACG GCC	336
Asn Leu Phe Ser Leu Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala	
100 105 110	
GTC TAT TAC TGT GCG AGT AAT ATA TTG AAA TAT CTT CAC TGG TTA TTA	384
Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Asn Ile Leu Lys Tyr Leu His Trp Leu Leu	
115 120 125	
TAC TGG GGC CAG GGA GTC CTG GTC ACC GTC TCC TCA GCT AGC ACC AAG	432
Tyr Trp Gly Gln Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys	
130 135 140	
GGG CCA TCC GTC TTC CCC CTG GCG CCC TGC TCC AGG AGC ACC TCC GAG	480
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu	
145 150 155 160	
AGC ACA GCC GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCG	528
Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro	
165 170 175	
GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC AGC GGC GTG CAC ACC	576
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr	
180 185 190	
TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC AGC AGC GTG	624
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val	
195 200 205	
GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACG AAG ACC TAC ACC TGC AAC	672
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn	
210 215 220	

12.05.98

96

GTA	GAT	CAC	AAG	CCC	AGC	AAC	ACC	AAG	GTG	GAC	AAG	AGA	GTT	GAG	TCC	720
Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	
225					230					235					240	
AAA	TAT	GGT	CCC	CCA	TGC	CCA	TCA	TGC	CCA	GCA	CCT	GAG	TTC	GAG	GGG	768
Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Ser	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	Gly	
			245						250					255		
GGA	CCA	TCA	GTC	TTC	CTG	TTC	CCC	CCA	AAA	CCC	AAG	GAC	ACT	CTC	ATG	816
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	
			260					265					270			
ATC	TCC	CGG	ACC	CCT	GAG	GTC	ACG	TGC	GTG	GTG	GTG	GAC	GTG	AGC	CAG	864
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	
		275					280					285				
GAA	GAC	CCC	GAG	GTC	CAG	TTC	AAC	TGG	TAC	GTG	GAT	GGC	GTG	GAG	GTG	912
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	
	290				295						300					
CAT	AAT	GCC	AAG	ACA	AAG	CCG	CGG	GAG	GAG	CAG	TTC	AAC	AGC	ACG	TAC	960
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	
305					310					315					320	
CGT	GTG	GTC	AGC	GTC	CTC	ACC	GTC	CTG	CAC	CAG	GAC	TGG	CTG	AAC	GGC	1008
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	
			325						330				335			
AAG	GAG	TAC	AAG	TGC	AAG	GTC	TCC	AAC	AAA	GGC	CTC	CCG	TCC	TCC	ATC	1056
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	
			340					345					350			
GAG	AAA	ACC	ATC	TCC	AAA	GCC	AAA	GGG	CAG	CCC	CGA	GAG	CCA	CAG	GTG	1104
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	
	355					360						365				
TAC	ACC	CTG	CCC	CCA	TCC	CAG	GAG	GAG	ATG	ACC	AAG	AAC	CAG	GTC	AGC	1152
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	
	370					375					380					
CTG	ACC	TGC	CTG	GTC	AAA	GGC	TTC	TAC	CCC	AGC	GAC	ATC	GCC	GTG	GAG	1200
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	
385					390					395				400		
TGG	GAG	AGC	AAT	GGG	CAG	CCG	GAG	AAC	AAC	TAC	AAG	ACC	ACG	CCT	CCC	1248
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	
			405					410						415		
GTG	CTG	GAC	TCC	GAC	GGC	TCC	TTC	TTC	CTC	TAC	AGC	AGG	CTA	ACC	GTG	1296
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	
			420				425						430			
GAC	AAG	AGC	AGG	TGG	CAG	GAG	GGG	AAT	GTC	TTC	TCA	TGC	TCC	GTG	ATG	1344
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	
	435					440						445				

12.05.98

97

CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACA CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT 1392
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
450 455 460

CTG GGT AAA TGA 1404
Leu Gly Lys *
465

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 10:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 468 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

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

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

[illegible]

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 11:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 1404 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

- (A) ORGANISMUS: Homo sapiens

(viii) POZICE V GENOMU:

- (A) CHROMOZOM/SEGMENT: těžký řetězec gama 4 s mutací P a E

(ix) ZNAKY:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS
- (B) POZICE: 1...1404

(ix) ZNAKY:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: hotový peptid
- (B) POZICE: 1...1404

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

ATG AAA CAC CTG TGG TTC TTC CTC CTC CTG GTG GCA GCC CCC AGA TGG	48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp	
1 5 10 15	
GTC TTG TCC CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG	96
Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys	
20 25 30	
CCT TCG GAG ACC CTG TCC CTC ACC TGC AGT GTC TCT GGT GGC TCC ATC	144
Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ser Gly Gly Ser Ile	
35 40 45	
AGC GGT GAC TAT TAT TGG TTC TGG ATC CGC CAG TCC CCA GGG AAG GGA	192
Ser Gly Asp Tyr Tyr Trp Phe Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly	
50 55 60	
CTG GAG TGG ATC GGC TAC ATC TAT GGC AGT GGT GGG GGC ACC AAT TAC	240
Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Gly Ser Gly Gly Gly Thr Asn Tyr	
65 70 75 80	
AAT CCC TCC CTC AAC AAT CGA GTC TCC ATT TCA ATA GAC ACG TCC AAG	288
Asn Pro Ser Leu Asn Asn Arg Val Ser Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys	
85 90 95	
AAC CTC TTC TCC CTG AAA CTG AGG TCT GTG ACC GCC GCG GAC ACG GCC	336
Asn Leu Phe Ser Leu Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala	
100 105 110	

GTC	TAT	TAC	TGT	GCG	AGT	AAT	ATA	TTG	AAA	TAT	CTT	CAC	TGG	TTA	TTA	384
Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ser	Asn	Ile	Leu	Lys	Tyr	Leu	His	Trp	Leu	Leu	
		115					120					125				
TAC	TGG	GGC	CAG	GGA	GTC	CTG	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA	GCT	AGC	ACC	AAG	432
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Val	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	
	130					135					140					
GGG	CCA	TCC	GTC	TTC	CCC	CTG	GCG	CCC	TGC	TCC	AGG	AGC	ACC	TCC	GAG	480
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	
145					150					155					160	
AGC	ACA	GCC	GCC	CTG	GGC	TGC	CTG	GTC	AAG	GAC	TAC	TTC	CCC	GAA	CCG	528
Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	
				165					170					175		
GTG	ACG	GTG	TCG	TGG	AAC	TCA	GGC	GCC	CTG	ACC	AGC	GGC	GTG	CAC	ACC	576
Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	
			180					185					190			
TTC	CCG	GCT	GTC	CTA	CAG	TCC	TCA	GGA	CTC	TAC	TCC	CTC	AGC	AGC	GTG	624
Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	
		195					200					205				
GTG	ACC	GTG	CCC	TCC	AGC	AGC	TTG	GGC	ACG	AAG	ACC	TAC	ACC	TGC	AAC	672
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	
	210					215					220					
GTA	GAT	CAC	AAG	CCC	AGC	AAC	ACC	AAG	GTG	GAC	AAG	AGA	GTT	GAG	TCC	720
Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	
225					230					235					240	
AAA	TAT	GGT	CCC	CCA	TGC	CCA	CCA	TGC	CCA	GCA	CCT	GAG	TTC	GAG	GGG	768
Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	Gly	
			245					250					255			
GGA	CCA	TCA	GTC	TTC	CTG	TTC	CCC	CCA	AAA	CCC	AAG	GAC	ACT	CTC	ATG	816
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	
			260				265						270			
ATC	TCC	CGG	ACC	CCT	GAG	GTC	ACG	TGC	GTG	GTG	GTG	GAC	GTG	AGC	CAG	864
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	
		275					280					285				
GAA	GAC	CCC	GAG	GTC	CAG	TTC	AAC	TGG	TAC	GTG	GAT	GGC	GTG	GAG	GTG	912
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	
	290					295					300					
CAT	AAT	GCC	AAG	ACA	AAG	CCG	CGG	GAG	GAG	CAG	TTC	AAC	AGC	ACG	TAC	960
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	
305					310					315					320	
CGT	GTG	GTC	AGC	GTC	CTC	ACC	GTC	CTG	CAC	CAG	GAC	TGG	CTG	AAC	GGC	1008
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	
				325					330					335		

```

AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GGC CTC CCG TCC TCC ATC 1056
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile
      340                      345                      350

GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAG CCA CAG GTG 1104
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
      355                      360                      365

TAC ACC CTG CCC CCA TCC CAG GAG GAG ATG ACC AAG AAC CAG GTC AGC 1152
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
      370                      375                      380

CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAC CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG 1200
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
      385                      390                      395                      400

TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC 1248
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
      405                      410                      415

GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AGG CTA ACC GTG 1296
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val
      420                      425                      430

GAC AAG AGC AGG TGG CAG GAG GGG AAT GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG 1344
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
      435                      440                      445

CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACA CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT 1392
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
      450                      455                      460

CTG GGT AAA TGA
Leu Gly Lys *
465
1404

```

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 12:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
- (A) DÉLKA: 468 aminokyselin
 - (B) TYP: aminokyselina
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: protein

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

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15
 Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ser Gly Gly Ser Ile
 35 40 45
 Ser Gly Asp Tyr Tyr Trp Phe Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly
 50 55 60
 Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Gly Ser Gly Gly Gly Thr Asn Tyr
 65 70 75 80
 Asn Pro Ser Leu Asn Asn Arg Val Ser Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys
 85 90 95
 Asn Leu Phe Ser Leu Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
 100 105 110
 Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Asn Ile Leu Lys Tyr Leu His Trp Leu Leu
 115 120 125
 Tyr Trp Gly Gln Gly Val Leu Val 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 Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn
 210 215 220
 Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser
 225 230 235 240
 Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly
 245 250 255
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 260 265 270
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln
 275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 290 295 300
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile
 340 345 350
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 355 360 365
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 385 390 395 400
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 405 410 415
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val
 420 425 430
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 435 440 445
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 450 455 460
 Leu Gly Lys *
 465

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 13:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 26 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANISMUS: člověk nebo opice

(viii) POZICE V GENOMU:

(A) CHROMOZOM/SEGMENT: vedoucí sekvence VH1

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

ACTAAGTCGA CATGGACTGG ACCTGG

26

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 14:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 31 párů bází

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) TYP VLÁKNA: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANISMUS: člověk nebo opice

(viii) POZICE V GENOMU:

(A) CHROMOZOM/SEGMENT: vedoucí sekvence VH2

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

ACTAAGTCGA CATGGACATA CTTTGTTCCA C

31

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 15:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 29 párů bází

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) TYP VLÁKNA: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANISMUS: člověk nebo opice

(viii) POZICE V GENOMU:

(A) CHROMOZOM/SEGMENT: vedoucí sekvence VH3

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

ACTAAGTCGA CATGGAGTTT GGGCTGAGC

29

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 16:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 31 párů bazí

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) TYP VLÁKNA: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANISMUS: člověk nebo opice

(viii) POZICE V GENOMU:

(A) CHROMOZOM/SEGMENT: vedoucí sekvence VH4

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

ACTAAGTCGA CATGAAACAC CTGTGGTTCT T

31

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 17:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 31 párů bazí

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) TYP VLÁKNA: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANISMUS: člověk nebo opice

(viii) POZICE V GENOMU:

(A) CHROMOZOM/SEGMENT: vedoucí sekvence VH5

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

ACTAAGTCGA CATGGGGTCA ACCGCCATCC T

31

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 18:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 31 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANISMUS: člověk nebo opice

(viii) POZICE V GENOMU:

(A) CHROMOZOM/SEGMENT: vedoucí sekvence VH6

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

ACTAAGTCGA CATGTCTGTC TCCTTCCTCA T

31

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 19:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 30 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANISMUS: člověk nebo opice

(viii) POZICE V GENOMU:

(A) CHROMOZOM/SEGMENT: vedoucí sekvence VH1 s
místem MluI

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

GGCAGCAGCY ACGCGTGCCC ACTCCGAGGT

30

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 20:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 30 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANISMUS: člověk nebo opice

(viii) POZICE V GENOMU:

(A) CHROMOZOM/SEGMENT: vedoucí sekvence VH2 s místem MluI

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

GACCGTCCCG ACGCGTGTYT TGTCCCAGGT

30

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 21:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANISMUS: člověk nebo opice

(viii) POZICE V GENOMU:

(A) CHROMOZOM/SEGMENT: vedoucí sekvence VH3 s místem MluI

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

GCTATTTTCACGCGTGTCCA GTGTGAG

27

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 22:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

- (A) ORGANISMUS: člověk nebo opice

(viii) POZICE V GENOMU:

- (A) CHROMOZOM/SEGMENT: vedoucí sekvence VH4 s místem MluI

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

GCGGCTCCCA CGCGTGTCTT GTCCAG

27

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 23:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 30 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

- (A) ORGANISMUS: člověk nebo opice

(viii) POZICE V GENOMU:

- (A) CHROMOZOM/SEGMENT: vedoucí sekvence VH5 s místem MluI

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

GGCTGTTCTC ACGCGTGTCT GTGCCGAGGT

30

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 24:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 23 párů bazí

12.05.98

109

- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANISMUS: člověk nebo opice

(viii) POZICE V GENOMU:

(A) CHROMOZOM/SEGMENT: VH1, 3a, 5 primer s místem XhoI

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

CAGGTGCAGC TGCTCGAGTC TGG

23

(2) INFORMACE PRO SEKvenci S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 25:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKvence:

- (A) DÉLKA: 23 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANISMUS: člověk nebo opice

(viii) POZICE V GENOMU:

(A) CHROMOZOM/SEGMENT: VH2 primer s místem XhoI

(xi) POPIS SEKvence: SEKvence S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 25:

CAGGTCAACT TACTCGAGTC TGG

23

(2) INFORMACE PRO SEKvenci S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 26:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKvence:

- (A) DÉLKA: 23 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)
- (iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne
- (vii) PŮVODNÍ ZDROJ:
 - (A) ORGANISMUS: člověk nebo opice
- (viii) POZICE V GENOMU:
 - (A) CHROMOZOM/SEGMENT: VH3b primer s místem XhoI
- (xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 26:

GAGGTGCAGC TGCTCGAGTC TGG

23

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 27:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 23 párů bazí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)
- (iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne
- (viii) POZICE V GENOMU:
 - (A) CHROMOZOM/SEGMENT: VH4 primer s místem XhoI
- (xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 27:

CAGGTGCAGC TGCTCGAGTC GGG

23

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 28:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 23 párů bazí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)
- (iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne
- (vii) PŮVODNÍ ZDROJ:
 - (A) ORGANISMUS: člověk nebo opice

(viii) POZICE V GENOMU:

(A) CHROMOZOM/SEGMENT: VH6 primer s místem XhoI

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

CAGGTACAGC TGCTCGAGTC AGG

23

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 29:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 26 párů bází

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) TYP VLÁKNA: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANISMUS: člověk nebo opice

(viii) POZICE V GENOMU:

(A) CHROMOZOM/SEGMENT: IgG1-4 primer s místem NheI

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

GGCGGATGCG CTAGCTGAGG AGACGG

26

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 30:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 38 párů bází

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) TYP VLÁKNA: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANISMUS: člověk nebo opice

(viii) POZICE V GENOMU:

(A) CHROMOZOM/SEGMENT: primer pro lehký řetězec kappa s místem BglII

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

ATCACAGATC TCTCACCATG GTGTTGCAGA CCCAGGTC

38

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 31:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(viii) POZICE V GENOMU:

- (A) CHROMOZOM/SEGMENT: primer pro lehký řetězec kappa s místem BglII

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

ATCACAGATC TCTCACCATG GRGWCCCCWG CKCAGCT

37

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 32:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 41 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

- (A) ORGANISMUS: člověk nebo opice

(viii) POZICE V GENOMU:

- (A) CHROMOZOM/SEGMENT: primer pro lehký řetězec kappa s místem BglII

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

ATCACAGATC TCTCACCATG GACATGAGGG TCCCCGCTCA G

41

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 33:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 41 párů bazí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)
- (iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne
- (vii) PŮVODNÍ ZDROJ:
 - (A) ORGANISMUS: člověk nebo opice
- (viii) POZICE V GENOMU:
 - (A) CHROMOZOM/SEGMENT: primer pro lehký řetězec kappa s místem BglII
- (xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 33:

ATCACAGATC TCTCACCATG GACACVAGGG CCCCCACTCA G 41

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 34:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 39 párů bazí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)
- (iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne
- (vii) PŮVODNÍ ZDROJ:
 - (A) ORGANISMUS: člověk nebo opice
- (viii) POZICE V GENOMU:
 - (A) CHROMOZOM/SEGMENT: primer pro lehký řetězec lambda s místem BglII
- (xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 34:

ATCACAGATC TCTCACCATG GCCTGGGCTC TGCTGCTCC 39

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 35:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 39 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)
- (iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne
- (vii) PŮVODNÍ ZDROJ:
 - (A) ORGANISMUS: člověk nebo opice
- (viii) POZICE V GENOMU:
 - (A) CHROMOZOM/SEGMENT: primer pro lehký řetězec lambda s místem BglII
- (xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 35:

ATCACAGATC TCTCACCATG GCCTGGGCTC CACTACTTC

39

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 36:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 39 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)
- (iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne
- (vii) PŮVODNÍ ZDROJ:
 - (A) ORGANISMUS: člověk nebo opice
- (viii) POZICE V GENOMU:
 - (A) CHROMOZOM/SEGMENT: primer pro lehký řetězec lambda s místem BglII
- (xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 36:

ATCACAGATC TCTCACCATG ACCTGCTCCC CTCTCCTCC

39

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 37:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

- (A) ORGANISMUS: člověk nebo opice

(viii) POZICE V GENOMU:

- (A) CHROMOZOM/SEGMENT: primer pro lehký řetězec
lambda s místem BglII

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 37:

ATCACAGATC TCTCACCATG GCCTGGACTC CTCTCTTTC

39

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 38:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

- (A) ORGANISMUS: člověk nebo opice

(viii) POZICE V GENOMU:

- (A) CHROMOZOM/SEGMENT: primer pro lehký řetězec
lambda s místem BglII

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

ATCACAGATC TCTCACCATG ACTTGGACCC CACTCCTC

38

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI 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: DNA (genomová)
- (iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ano
- (vii) PŮVODNÍ ZDROJ:
 - (A) ORGANISMUS: člověk nebo opice
- (viii) POZICE V GENOMU:
 - (A) CHROMOZOM/SEGMENT: primer pro lehký řetězec kappa s místy KpnI a BsiW1
- (xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 39:

CCGTTTGATT TCCAGCTTGG TACCTCCACC GAACGT

36

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 40:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 30 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)
- (iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ano
- (vii) PŮVODNÍ ZDROJ:
 - (A) ORGANISMUS: člověk nebo opice
- (viii) POZICE V GENOMU:
 - (A) CHROMOZOM/SEGMENT: primer pro lehký řetězec kappa s místy KpnI a BsiW1
- (xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 40:

TGCAGCATCC GTACGTTTGA TTTCCAGCTT

30

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 41:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 30 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ano

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANISMUS: člověk nebo opice

(viii) POZICE V GENOMU:

(A) CHROMOZOM/SEGMENT: primer pro lehký řetězec
lambda s místy HindIII a KpnI

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

ACCTAGGACG GTAAGCTTGG TACCTCCGCC

30

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 42:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ano

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANISMUS: člověk nebo opice

(viii) POZICE V GENOMU:

(A) CHROMOZOM/SEGMENT: primer pro lehký řetězec
lambda s místem KpnI

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 42:

ACCTAGGACG GTCASSTTGG TACCTCCGCC GAACAC

36

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 43:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 27 párů bazí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)
- (iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ano
- (vii) PŮVODNÍ ZDROJ:
 - (A) ORGANISMUS: člověk nebo opice
- (viii) POZICE V GENOMU:
 - (A) CHROMOZOM/SEGMENT: primer pro lehký řetězec lambda s místem AvrII
- (xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 43:

CTTGGGCTGA CCTAGGACGG TCAGCCG

27

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 44:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 17 párů bazí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)
- (iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne
- (viii) POZICE V GENOMU:
 - (A) CHROMOZOM/SEGMENT: variabilní oblast VH1 těžkého řetězce
- (xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 44:

CCATGGACTG GACCTGG

17

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 45:

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

- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(viii) POZICE V GENOMU:

- (A) CHROMOZOM/SEGMENT: variabilní oblast VH2
těžkého řetězce

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

ATGGACATAC TTTGTTCCAC

20

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 46:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(viii) POZICE V GENOMU:

- (A) CHROMOZOM/SEGMENT: variabilní oblast VH3
těžkého řetězce

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

CCATGGAGTT TGGGCTGAGC

20

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 47:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(viii) POZICE V GENOMU:

(A) CHROMOZOM/SEGMENT: variabilní oblast VH4
těžkého řetězce

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

ATGAAACACC TGTGGTTCTT

20

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 48:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(viii) POZICE V GENOMU:

(A) CHROMOZOM/SEGMENT: variabilní oblast VH5
těžkého řetězce

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

ATGGGGTCAA CCGCCATCCT

20

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 49:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(viii) POZICE V GENOMU:

(A) CHROMOZOM/SEGMENT: variabilní oblast VH6
těžkého řetězce

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

ATGTCTGTCT CCTTCCTCAT

20

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 50:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 16 párů bazí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)
- (iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ano
- (viii) POZICE V GENOMU:
 - (A) CHROMOZOM/SEGMENT: konstantní oblast těžkého řetězce IgM
- (xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 50:

TTGGGGCGGA TGCAC

16

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 51:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 17 párů bazí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)
- (iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ano
- (viii) POZICE V GENOMU:
 - (A) CHROMOZOM/SEGMENT: konstantní oblast těžkého řetězce IgG1-4
- (xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 51:

GATGGGCCCT TGGTGA

17

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 52:

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

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(viii) POZICE V GENOMU:

(A) CHROMOZOM/SEGMENT: variabilní oblast lehkého řetězce kappa

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

GATGACCCAG TCTCCAKCCT C

21

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 53:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(viii) POZICE V GENOMU:

(A) CHROMOZOM/SEGMENT: variabilní oblast lehkého řetězce lambda

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

CTCAYTYRCT GCMCAGGGTC C

21

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 54:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ano

(viii) POZICE V GENOMU:

(A) CHROMOZOM/SEGMENT: konstantní oblast lehkého řetězce kappa

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

AAGACAGATG GTGCAGCCA

19

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 55:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ano

(viii) POZICE V GENOMU:

- (A) CHROMOZOM/SEGMENT: konstantní oblast lehkého řetězce lambda

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

GGAACAGAGT GACCGAGGGG

20

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 56:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 30 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(viii) POZICE V GENOMU:

- (A) CHROMOZOM/SEGMENT: PCR primer pro lidskou konstantní oblast gama 4

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

GGGGGGATCC TCATTTACCC AGAGACAGGG

30

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 57:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 31 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(viii) POZICE V GENOMU:

(A) CHROMOZOM/SEGMENT: PCR primer pro lidskou konstantní oblast gama 4

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

GGGGGCTAGC ACCAAGGGCC CATCCGTCTT C

31

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 58:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 96 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(viii) POZICE V GENOMU:

(A) CHROMOZOM/SEGMENT: mutageneze PCR lidské gama 4

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

CCGGGAGATC ATGAGAGTGT CCTTGGGTTT TGGGGGGAAC AGGAAGACTG 50
ATGGTCCCC CTCGAAGTCA GGTGCTGGGC ATGGTGGGCA TGGGGG 96

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 59:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(viii) POZICE V GENOMU:

(A) CHROMOZOM/SEGMENT: mutageneze PCR lidské gama 4

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

TCCTCAGCTA GCACCAAGGG GCCATCC

27

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Chimérická protilátka specifická k lidskému CD4, která podstatně postrádá depleční aktivitu pro T buňky, a která obsahuje sekvence variabilních oblastí těžkého a lehkého řetězce monoklonální protilátky opice Starého světa tvořené proti lidskému CD4, a lidské sekvence konstantních domén těžkého a lehkého řetězce.

2. Chimérická protilátka podle nároku 1, kde sekvence konstantní domény lidského těžkého řetězce jsou vybrány z (1) nemodifikovaných konstantních domén lidského izotypu gama 4, (2) konstantních domén izotypu gama 4, které byly modifikovány mutagenézou tak, aby se snížila vazba komplementu, vazba receptoru Fcγ1 a/nebo se zvýšila stabilita, a (3) konstantních domén izotypu gama 4 mutovaných v pozici 236 substitucí kyseliny glutamové leucinem a/nebo v pozici 229 substitucí prolinu serinem.

3. Chimérická protilátka podle nároku 1, kde sekvence vázající antigen variabilního těžkého a lehkého řetězce jsou vyloženy na obrázcích 1 a 2.

4. Chimérická protilátka podle nároku 1, která zahrnuje jednu nebo více z následujících vlastností: (i) postrádá nebo vykazuje sníženou vazebnou aktivitu receptoru Fc vzhledem k chimérickým protilátkám γ1, (ii) projevuje sníženou nebo chybějící schopnost fixace komplementu, a (iii) projevuje pozměněný farmakokinetický profil.

5. Chimérická protilátka podle nároku 1, která pozměňuje nebo reguluje imunitní funkce mající vztah k CD4 včetně navození anergie a apoptózy T buněk.
6. Chimérická protilátka anti-CD4, která je vybrána ze skupiny sestávající z CE9 γ 4, CE9 γ 4 λ K, CE9 γ 4E a CE9 γ 4PE.
7. Rekombinantní DNA, která kóduje chimérickou protilátku podle nároku 1.
8. Rekombinantní DNA, která kóduje chimérickou protilátku podle nároku 2.
9. Rekombinantní DNA, která kóduje chimérickou protilátku podle nároku 3.
10. Rekombinantní DNA, která kóduje chimérickou protilátku podle nároku 4.
11. Rekombinantní DNA, která kóduje a zajišťuje expresi chimérické protilátky podle nároku 6.
12. Způsob produkce chimérické protilátky specifické k CD4 v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje expresi rekombinantní DNA podle nároku 7 v rekombinantní hostitelské buňce.
13. Způsob produkce chimérické protilátky specifické k CD4 v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje expresi rekombinantní DNA podle nároku 8 v rekombinantní hostitelské buňce.

14. Způsob produkce chimérické protilátky specifické k CD4 v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje expresi rekombinantní DNA podle nároku 9 v rekombinantní hostitelské buňce.

15. Způsob produkce chimérické protilátky specifické k CD4 v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje expresi rekombinantní DNA podle nároku 10 v rekombinantní hostitelské buňce.

16. Způsob produkce chimérické protilátky specifické k CD4 v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje expresi rekombinantní DNA podle nároku 11 v rekombinantní hostitelské buňce.

17. Způsob léčení nebo prevence stavu majícího vztah k CD4 v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje podávání terapeuticky nebo profylakticky účinného množství chimérické protilátky podle nároku 1.

18. Způsob léčení nebo prevence stavu majícího vztah k CD4 v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje podávání terapeuticky nebo profylakticky účinného množství chimérické protilátky podle nároku 2.

19. Způsob léčení nebo prevence stavu majícího vztah k CD4 v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje podávání terapeuticky nebo profylakticky účinného množství chimérické protilátky podle nároku 3.

20. Způsob léčení nebo prevence stavu majícího vztah k CD4 v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje podávání

terapeuticky nebo profylakticky účinného množství chimérické protilátky podle nároku 4.

21. Způsob léčení nebo prevence stavu majícího vztah k CD4 v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje podávání terapeuticky nebo profylakticky účinného množství chimérické protilátky podle nároku 6.

22. Způsob podle nároku 16 v y z n a č u j í c í s e t í m, že stav mající vztah k CD4 je autoimunitní porucha.

23. Způsob podle nároku 17 v y z n a č u j í c í s e t í m, že stav mající vztah k CD4 je autoimunitní porucha.

24. Způsob podle nároku 18 v y z n a č u j í c í s e t í m, že stav mající vztah k CD4 je autoimunitní porucha.

25. Způsob podle nároku 19 v y z n a č u j í c í s e t í m, že stav mající vztah k CD4 je autoimunitní porucha.

26. Způsob podle nároku 20 v y z n a č u j í c í s e t í m, že stav mající vztah k CD4 je autoimunitní porucha.

27. Způsob podle nároku 21 v y z n a č u j í c í s e t í m, že autoimunitní porucha je revmatoidní artritida, zánětlivá střevní nemoc, psoriáza, diabetes mellitus závislý na inzulinu, systémový lupus erytematosus, cirhóza a sclerosis multiplex.

28. Způsob podle nároku 22 v y z n a č u j í c í s e t í m, že autoimunitní porucha je revmatoidní artritida, zánětlivá střevní nemoc, psoriáza, diabetes mellitus závislý

na inzulinu, systémový lupus erytematosus, cirhóza a sclerosis multiplex.

29. Způsob podle nároku 23 v y z n a č u j í c í s e t í m, že autoimunitní porucha je revmatoidní artritida, zánětlivá střevní nemoc, psoriáza, diabetes mellitus závislý na inzulinu, systémový lupus erytematosus, cirhóza a sclerosis multiplex.

30. Způsob podle nároku 24 v y z n a č u j í c í s e t í m, že autoimunitní porucha je revmatoidní artritida, zánětlivá střevní nemoc, psoriáza, diabetes mellitus závislý na inzulinu, systémový lupus erytematosus, cirhóza a sclerosis multiplex.

31. Způsob podle nároku 25 v y z n a č u j í c í s e t í m, že autoimunitní porucha je revmatoidní artritida, zánětlivá střevní nemoc, psoriáza, diabetes mellitus závislý na inzulinu, systémový lupus erytematosus, cirhóza a sclerosis multiplex.

32. Způsob podle nároku 17 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený stav je porucha jiné povahy než autoimunitní, vybraná ze skupiny sestávající z leukémie, lymfomu, reakce štěpu proti hostiteli, astmatu, transplantační rejekce a infekce HIV.

33. Způsob podle nároku 18 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený stav je porucha jiné povahy než autoimunitní, vybraná ze skupiny sestávající z leukémie, lymfomu, reakce štěpu proti hostiteli, astmatu, transplantační rejekce a infekce HIV.

34. Způsob podle nároku 19 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený stav je porucha jiné povahy než autoimunitní, vybraná ze skupiny sestávající z leukémie, lymfomu, reakce štěpu proti hostiteli, astmatu, transplantační rejekce a infekce HIV.

35. Způsob podle nároku 20 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený stav je porucha jiné povahy než autoimunitní, vybraná ze skupiny sestávající z leukémie, lymfomu, reakce štěpu proti hostiteli, astmatu, transplantační rejekce a infekce HIV.

36. Způsob podle nároku 21 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený stav je porucha jiné povahy než autoimunitní, vybraná ze skupiny sestávající z leukémie, lymfomu, reakce štěpu proti hostiteli, astmatu, transplantační rejekce a infekce HIV.

37. Způsob podle nároku 17 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený stav je zprostředkován buňkami CD4⁺ nebo se jich týká.

12.05.98

1/32

Obr. 1

Sekvence variabilní domény V_H opičího Anti-CD4, pořadí nukleotidů od 1 do 420 bp. Translatovaný je úsek od methioninu vedoucí sekvence ATG (bp 4) po 420 bp. Proteinová sekvence je číslována podle kostry protilátky od aminokyselinového zbytku +1 do posledního aminokyselinového zbytku +120 V_H.

M K H L W F F L L L V A A P R
GAC ATG AAA CAC CTG TGG TTC TTC CTC CTC CTG GTG GCA GCC CCC AGA

+1 10
W V L S Q V Q L Q E A G P G L V
TGG GTC TTG TCC CAG GTG CAG CTG CAG GAG GCG GGC CCA GGA CTG GTG

20
K P S E T L S L T C S V S G G S
AAG CCT TCG GAG ACC CTG TCC CTC ACC TGC AGT GTC TCT GGT GGC TCC

30 40
I S G D Y Y W F W I R Q S P G K
ATC AGC GGT GAC TAT TAT TGG TTC TGG ATC CGC CAG TCC CCA GGG AAG

50 60
G L E W I G Y I Y G S G G G T N
GGA CTG GAG TGG ATC GGC TAC ATC TAT GGC AGT GGT GGG GGC ACC AAT

70
Y N P S L N N R V S I S I D T S
TAC AAT CCC TCC CTC AAC AAT CGA GTC TCC ATT TCA ATA GAC ACG TCC

80 90
K N L F S L K L R S V T A A D T
AAG AAC CTC TTC TCC CTG AAA CTG AGG TCT GTG ACC GCC GCG GAC ACG

100
A V Y Y C A S N I L K Y L H W L
GCC GTC TAT TAC TGT GCG AGT AAT ATA TTG AAA TAT CTT CAC TGG TTA

110 120
L Y W G Q G V L V T S S
TTA TAC TGG GGC CAG GGA GTC CTG GTC ACC GTC TCC

12.05.98

Obr. 2

Sekvence variabilní domény V_{Lambda} opičího Anti-CD44, pořadí nukleotidů od 1 do 387 bp. Translatovaný je úsek od methioninu vedoucí sekvence ATG (bp 4) po 387 bp. Proteinová sekvence je číslována podle kostry protilátky od aminokyselinového zbytku +1 do posledního aminokyselinového zbytku +109 V_{Lambda} .

M	A	W	A	L	L	L	L	G	L	L	A	H	F	T	
ACC	ATG	GCC	TGG	GCT	CTG	CTG	CTC	CTC	GGC	CTC	CTT	GCT	CAC	TTT	ACA
D	S	A	A	S	Y	E	L	S	Q	P	R	S	V	S	V
GAC	TCT	GCG	GCC	TCC	TAT	GAG	TTG	AGT	CAG	CCT	CGC	TCA	GTG	TCC	GTG
S	P	G	Q	T	A	G	F	T	C	G	G	D	N	V	G
TCC	CCA	GGA	CAG	ACG	GCC	GGG	TTC	ACC	TGT	GGG	GGA	GAC	AAC	GTT	GGA
R	K	S	V	Q	W	Y	Q	Q	K	P	P	Q	A	P	V
AGG	AAA	AGT	GTA	CAG	TGG	TAC	CAG	CAG	AAG	CCA	CCG	CAG	GCC	CCT	GTG
L	V	I	Y	A	D	S	E	R	P	S	G	I	P	A	R
CTG	GTC	ATC	TAT	GCT	GAC	AGC	GAA	CGG	CCC	TCA	GGG	ATC	CCT	GCG	CGA
F	S	G	S	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S	G
TTC	TCT	GGC	TCC	AAC	TCA	GGG	AAC	ACC	GCC	ACC	CTG	ACC	ATC	AGC	GGG
V	E	A	G	D	E	A	D	Y	Y	C	Q	V	W	D	S
GTC	GAG	GCC	GGG	GAT	GAG	GCT	GAC	TAT	TAC	TGT	CAG	GTG	TGG	GAC	AGT
T	A	D	H	W	V	F	G	G	G	T	R	L	T	V	L
ACT	GCT	GAT	CAT	TGG	GTC	TTC	GGC	GGA	GGG	ACC	CGG	CTG	ACC	GTC	CTA
109															
G															
GGT															

Délka řetězce anti-cd4 L: 702 bp, výpis sekvence od:1 do:702,
translace od:1 do:700 (celý úsek),
použitý genetický kód: univerzální

Thr Glu Cys Ser TER
ACA GAA TGT TCA TGA

Délka řetězce anti-cd4 G4: 1404 bp, výpis sekvence od:1
do:1404, translace od:1 do:1404 (celý úsek),
použitý genetický kód: univerzální

Met	Lys	His	Leu	Trp	Phe	Phe	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	Ala	Pro	Arg	Trp	Val	Leu	Ser		
ATG	AAA	CAC	CTG	TGG	TTC	TTC	CTC	CTC	CTG	GTG	GCA	GCC	CCC	AGA	TGG	GTC	TTG	TCC		
		9			18			27		36			45				54			
Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr
CAG	GTG	CAG	CTG	CAG	GAG	TGG	GGC	CCA	GGA	CTG	GTG	AAG	CCT	TCG	GAG	ACC	CTG	TCC	CTC	ACC
		66			75			84			93			102			111			120
Cys	Ser	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Trp	Phe	Trp	Ile	Arg	Gln	Ser	Pro
TGC	AGT	GTC	TCT	GGT	GGC	TCC	ATC	ACC	GGT	GAC	TAT	TAT	TGG	TTC	TGG	ATC	CGC	CAG	TCC	CCA
		129			138			147			156			165			174			183
Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Tyr	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro
GGG	AAG	GGA	CTG	GAG	TGG	ATC	GGC	TAC	ATC	TAT	GGC	AGT	GGT	GGG	GGC	ACC	AAT	TAC	AAT	CCC
		192			201			210			219			228			237			246
Ser	Leu	Asn	Asn	Arg	Val	Ser	Ile	Ser	Ile	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Leu	Phe	Ser	Leu	Lys	Leu
TCC	CTC	AAC	AAT	CGA	GTC	TCC	ATT	TCA	ATA	GAC	ACG	TCC	AAG	AAC	CTC	TTC	TCC	CTG	AAA	CTG
		255			264			273			282			291			300			309
Arg	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ser	Asn	Ile	Leu	Lys	Tyr	Leu
AGG	TCT	GTG	ACC	GCC	GCG	GAC	ACG	GCC	GTC	TAT	TAC	TGT	GCG	AGT	AAT	ATA	TTG	AAA	TAT	CTT
		318			327			336			345			354			363			372
His	Trp	Leu	Leu	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Val	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly
CAC	TGG	TTA	TTA	TAC	TGG	GGC	CAG	GGA	GTC	CTG	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA	GCT	AGC	ACC	AAG	GGC
		381			390			399			408			417			426			435
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly
CCA	TCC	GTC	TTC	CCC	CTG	GCG	CCC	TGC	TCC	AGG	AGC	ACC	TCC	GAG	AGC	ACA	GCC	GCC	CTG	GGC
		444			453			462			471			480			489			498
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr
TGC	CTG	GTC	AAG	GAC	TAC	TTC	CCC	GAA	CCG	GTG	ACG	GTG	TCG	TGG	AAC	TCA	GGC	GCC	CTG	ACC
		507			516			525			534			543			552			561
Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val
AGC	GGC	GTG	CAC	ACC	TTC	CCG	GCT	GTC	CTA	CAG	TCC	TCA	GGA	CTC	TAC	TCC	CTC	AGC	AGC	GTG
		570			579			588			597			606			615			624
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro
GTG	ACC	GTG	CCC	TCC																

5/32

Obr. 4 (pokračování)

Proteinová sekvence těžkého řetězce anti-cd4 G4.

AGC AAC ACC AAG GTG	GAC AAG AGA GTT	GAG TCC AAA TAT GGT	CCC CCA TGC CCA TCA TGC CCA
696	705	714	723 732 741 750
Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu	GCA CCT GAG TTC CTG GGG GGA CCA TCA GTC TTC CTG TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACT CTC		
759	768	777	786 795 804 813
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu	ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACG TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAG GAA GAC CCC GAG		
822	831	840	849 858 867 876
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu	GTC CAG TTC AAC TGG TAC GTG GAT GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG		
885	894	903	912 921 930 939
Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu	GAG CAG TTC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG		
948	957	966	975 984 993 1002
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr	AAC GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GGC CTC CCG TCC TCC ATC GAG AAA ACC		
1011	1020	1029	1038 1047 1056 1065
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu	ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAG CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CAG GAG		
1074	1083	1092	1101 1110 1119 1128
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile	GAG ATG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAC CCC AGC GAC ATC		
1137	1146	1155	1164 1173 1182 1191
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu	GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG		
1200	1209	1218	1227 1236 1245 1254
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu	GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AGG CTA ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG GAG		
1263	1272	1281	1290 1299 1308 1317
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser	GGG AAT GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACA CAG AAG AGC		
1326	1335	1344	1353 1362 1371 1380
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys TER	CTC TCC CTG TCT CTG GGT AAA TGA		
1389	1398		

Obr. 5

Proteinová sekvence těžkého řetězce anti-cd4 G4(E).

Délka řetězce anti-cd4 G4(E): 1404 bp, výpis sekvence od:1
do:1404, translace od:1 do:1404 (celý úsek),
použitý genetický kód: univerzální

Met	Lys	His	Leu	Trp	Phe	Phe	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	Ala	Pro	Arg	Trp	Val	Leu	Ser
ATG	AAA	CAC	CTG	TGG	TTC	TTC	CTC	CTC	CTG	GTG	GCA	GCC	CCC	AGA	TGG	GTC	TTG	TCC	
		9			18			27			36			45			54		
Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu	Thr	Leu	Ser	Leu
CAG	GTG	CAG	CTG	CAG	GAG	TCG	GGC	CCA	GGA	CTG	GTG	AAG	CCT	TCG	GAG	ACC	CTG	TCC	CTC
		66			75			84			93			102			111		120
Cys	Ser	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Trp	Phe	Trp	Ile	Arg	Gln	Ser
TGC	AGT	GTC	TCT	GGT	GGC	TCC	ATC	AGC	GGT	GAC	TAT	TAT	TGG	TTC	TGG	ATC	CGC	CAG	TCC
		129			138			147			156			165			174		183
Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Tyr	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Asn
GGG	AAG	GGA	CTG	GAG	TGG	ATC	GGC	TAC	ATC	TAT	GGC	AGT	GGT	GGG	GGC	ACC	AAT	TAC	AAT
		192			201			210			219			228			237		246
Ser	Leu	Asn	Asn	Arg	Val	Ser	Ile	Ser	Ile	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Leu	Phe	Ser	Leu	Lys
TCC	CTC	AAC	AAT	CGA	GTC	TCC	ATT	TCA	ATA	GAC	ACG	TCC	AAG	AAC	CTC	TTC	TCC	CTG	AAA
		255			264			273			282			291			300		309
Arg	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ser	Asn	Ile	Leu	Lys	Tyr
AGG	TCT	GTG	ACC	GCC	GCG	GAC	ACG	GCC	GTC	TAT	TAC	TGT	GCG	AGT	AAT	ATA	TTG	AAA	TAT
		318			327			336			345			354			363		372
His	Trp	Leu	Leu	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Val	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys
CAC	TGG	TTA	TTA	TAC	TGG	GGC	CAG	GGA	GTC	CTG	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA	GCT	AGC	ACC	AAG
		381			390			399			408			417			426		435
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu
CCA	TCC	GTC	TTC	CCC	CTG	GCG	CCC	TGC	TCC	AGG	AGC	ACC	TCC	GAG	AGC	ACA	GCC	GCC	CTG
		444			453			462			471			480			489		498
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu
TGC	CTG	GTC	AAG	GAC	TAC	TTC	CCC	GAA	CCG	GTG	ACG	GTG	TCG	TGG	AAC	TCA	GGC	GCC	CTG
		507			516			525			534			543			552		561
Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser
AGC	GGC	GTG	CAC	ACC	TTC	CCG	GCT	GTC	CTA	CAG	TCC	TCA	GGA	CTC	TAC	TCC	CTC	AGC	AGC
		570			579			588			597			606			615		624
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys
GTG	ACC	GTG	CCC	TCC	AGC	AGC	TTG	GGC	ACG	AAG	ACC	TAC	ACC	TGC	AAC	GTA	GAT	CAC	AAG
		633			642			651											

Obr. 5 (pokračování)

Proteinová sekvence těžkého řetězce anti-cd4 G4(E).

AGC AAC ACC AAG GTG GAC AAG AGA GTT GAG TCC AAA TAT GGT CCC CCA TGC CCA TCA TGC CCA	696	705	714	723	732	741	750
Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu	GCA CCT GAG TTC GAG GGG GGA CCA TCA GTC TTC CTG TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACT CTC	759	768	777	786	795	813
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu	ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACG TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAG GAA GAC CCC GAG	822	831	840	849	858	876
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu	GTC CAG TTC AAC TGG TAC GTG GAT GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG	885	894	903	912	921	939
Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu	GAG CAG TTC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG	948	957	966	975	984	1002
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr	AAC GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GGC CTC CCG TCC TCC ATC GAG AAA ACC	1011	1020	1029	1038	1047	1065
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu	ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAG CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CAG GAG	1074	1083	1092	1101	1110	1128
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile	GAG ATG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAC CCC AGC GAC ATC	1137	1146	1155	1164	1173	1191
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu	GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG	1200	1209	1218	1227	1236	1254
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu	GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AGG CTA ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG GAG	1263	1272	1281	1290	1299	1317
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser	GGG AAT GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACA CAG AAG AGC	1326	1335	1344	1353	1362	1380
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys TER	CTC TCC CTG TCT CTG GGT AAA TGA	1389	1398				

Délka řetězce anti-cd4 G4(PE): 1404 bp, výpis sekvence od:1
do:1404, translace od:1 do:1404 (celý úsek),
použitý genetický kód: univerzální

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

9/32

Obr. 6 (pokračování)

Proteinová sekvence těžkého řetězce anti-cd4 G4(PE).

AGC AAC ACC AAG GTG GAC AAG AGA GTT GAG TCC AAA TAT GGT CCC CCA TGC CCA CCA TGC CCA	696	705	714	723	732	741	750	
Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu	GCA CCT GAG TTC GAG GGG GGA CCA TCA GTC TTC CTG TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACT CTC	759	768	777	786	795	804	813
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu	ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACG TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAG GAA GAC CCC GAG	822	831	840	849	858	867	876
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu	GTC CAG TTC AAC TGG TAC GTG GAT GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CCG GAG	885	894	903	912	921	930	939
Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu	GAG CAG TTC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG	948	957	966	975	984	993	1002
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr	AAC GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GGC CTC CCG TCC TCC ATC GAG AAA ACC	1011	1020	1029	1038	1047	1056	1065
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu	ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAG CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CAG GAG	1074	1083	1092	1101	1110	1119	1128
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile	GAG ATG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAC CCC AGC GAC ATC	1137	1146	1155	1164	1173	1182	1191
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu	GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG	1200	1209	1218	1227	1236	1245	1254
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu	GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AGG CTA ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG GAG	1263	1272	1281	1290	1299	1308	1317
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser	GGG AAT GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACA CAG AAG AGC	1326	1335	1344	1353	1362	1371	1380
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys TER	CTC TCC CTG TCT CTG GGT AAA TGA	1389	1398					

Obr. 7 - 1

Oligonukleotidové primery pro amplifikaci těžkého řetězce variabilních úseků opičího imunoglobulinu

5'souhlasné („sense“) primery

A. Primery obsahující místo SalI pro časně vedoucí sekvence těžkých řetězců člověka nebo opice

- V_H1 5' ACTAAGTCGACATGGACTGGACCTGG 3'
- V_H2 5' ACTAAGTCGACATGGACATACTTTGTTCCAC 3'
- V_H3 5' ACTAAGTCGACATGGAGTTTGGGCTGAGC 3'
- V_H4 5' ACTAAGTCGACATGAAACACCTGTGGTTCTT 3'
- V_H5 5' ACTAAGTCGACATGGGGTCAACCGCCATCCT 3'
- V_H6 5' ACTAAGTCGACATGTCTGTCTCCTTCCTCAT 3'

B. Primery obsahující místo MluI pro pozdní vedoucí sekvence těžkých řetězců člověka nebo opice

- V_H1 5' G GCA GCA GC(CT) ACG CGT GCC CAC TCC GAG GT 3' ⁺¹
- V_H2 5' G ACC GTC CCG ACG CGT GT(TC) TTG TCC CAG GT 3' ⁺¹
- V_H3 5' GCT ATT TTC ACG CGT GTC CAG TGT GAG 3' ⁺¹
- V_H4 5' GCG GCT CCC ACG CGT GTC CTG TCC CAG 3' ⁺¹
- V_H5 5' G GCT GTT CTC ACG CGT GTC TGT GCC GAG GT 3' ⁺¹

Obr. 7 - 1 (pokračování)

C. Primery obsahující místo XhoI pro sekvenci kostry 1 člověka nebo opice

V_H1,3a,5 ⁺¹ CAGGTGCAGCTGCTCGAGTCTGG
V_H2 ⁺¹ CAGGTCAACTTACTCGAGTCTGG
V_H3b ⁺¹ GAGGTGCAGCTGCTCGAGTCTGG
V_H4 ⁺¹ CAGGTGCAGCTGCTCGAGTCGGG
V_H6 ⁺¹ CAGGTACAGCTGCTCGAGTCAGG

3' primery opačné orientace („anti-sense“)

A. Primery (řetězce opačné orientace) obsahující místo NheI pro konstantní oblast těžkých řetězců člověka nebo opice

IgG₁₋₄ ⁺¹¹⁸ 5' GGC GGA TGC GCT AGC TGA GGA GAC GG 3' ⁺¹¹⁰
Nhe I

Obr. 7 - 2

Oligonukleotidové primery pro amplifikaci variabilních oblastí lehkých řetězců opičího imunoglobulinu

5' souhlasné („sense“) primery

A. Primery obsahující místo BglII pro časnou vedoucí sekvenci lehkého kapu řetězce člověka nebo opice

5' ATCACAGATCTCTCACCATGGTGTTCAGACCCAGGTC 3'

5' ATCACAGATCTCTCACCATGG(GA)G(AT)CCCC(TA)GC(TG)CAGCT 3'

5' ATCACAGATCTCTCACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAG 3'

5' ATCACAGATCTCTCACCATGGACAC(GAC)AGGGCCCCCACTCAG 3'

B. Primery obsahující místo BglII pro časnou vedoucí sekvenci lehkého lambda řetězce člověka nebo opice

ATCACAGATCTCTCACCATGGCCTGGGCTCTGCTGCTCC 3'

ATCACAGATCTCTCACCATGGCCTGGGCTCCACTACTTC 3'

ATCACAGATCTCTCACCATGACCTGCTCCCCTCTCCTCC 3'

ATCACAGATCTCTCACCATGGCCTGGACTCCTCTCTTTC 3'

ATCACAGATCTCTCACCATGACTTGGACCCCACTCCTC 3'

Obr. 7 - 2 (pokračování)

3' primery opačné orientace („anti-sense“)

A. Primery (řetězce opačné orientace) obsahující místa KpnI a BsiWI pro konstantní oblast lehkého kapa řetězce člověka nebo opice

C_{kappa} +108 5' CCG TTT GAT TTC CAG CTT GGT ACC TCC ACC GAA CGT 3' +97
Kpn 1
+112 5' TGC AGC ATC CGT ACG TTT GAT TTC CAG CTT 3' +103
BsiW1

B. Primery (řetězce opačné orientace) obsahující místa KpnI, HindIII a AvrII pro konstantní oblast lehkého lambda řetězce člověka nebo opice

[illegible]

Obr. 8

A. Variabilní oblast těžkého řetězce

VH1	5'	CCATGGACTGGACCTGG	3'
VH2	5'	ATGGACATACTTTGTTCCAC	3'
VH3	5'	CCATGGAGTTTGGGCTGAGC	3'
VH4	5'	ATGAAACACCTGTGGTTCTT	3'
VH5	5'	ATGGGGTCAACCGCCATCCT	3'
VH6	5'	ATGTCTGTCTCCTTCCTCAT	3'

B. Konstantní oblast těžkého řetězce, vlákno opačné orientace („antisense“)

IgM	5'	⁺¹¹⁹ T TGG ⁺¹¹⁵ GGC GGA TGC ACT 3'
IgG ₁₋₄	5'	⁺¹¹⁹ GA TGG ⁺¹¹⁵ GCC CTT GGT GGA 3'

C. Variabilní oblast lehkého řetězce

Kappa	5'	⁺⁴ G ATG ACC CAG TCT CCA (G/T) ⁺¹⁰ CC TC 3'
Lambda	5'	⁻⁹ CTC A(C/T)T (T/C)(G/A)C TGC (A/C)CA ⁻³ GGG TCC 3'

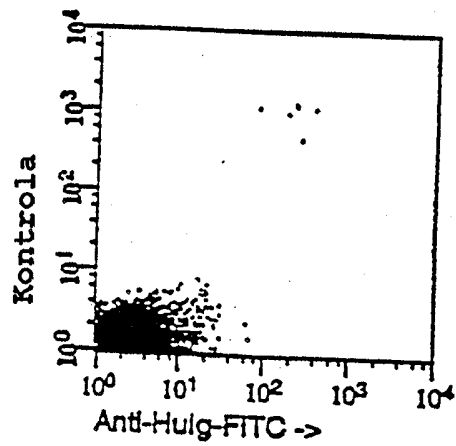
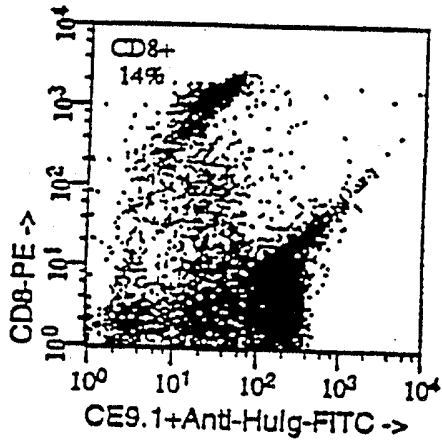
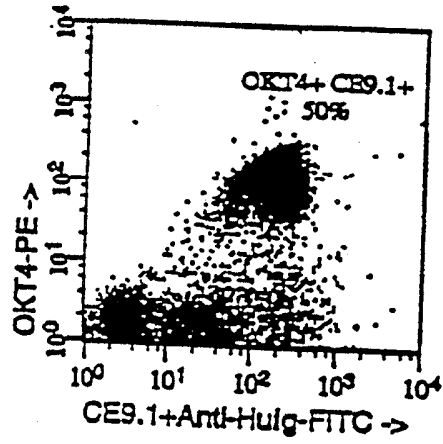
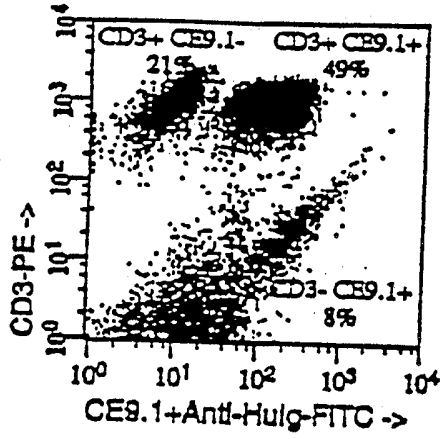
D. Konstantní oblast lehkého řetězce, vlákno opačné orientace („antisense“)

Kappa	5'	⁺¹¹⁵ AA GAC AGA TGG TGC AGC CA ⁺¹¹⁰ 3'
Lambda	5'	⁺¹¹⁸ G GAA CAG AGT GAC CGA ⁺¹¹² GGG G 3'

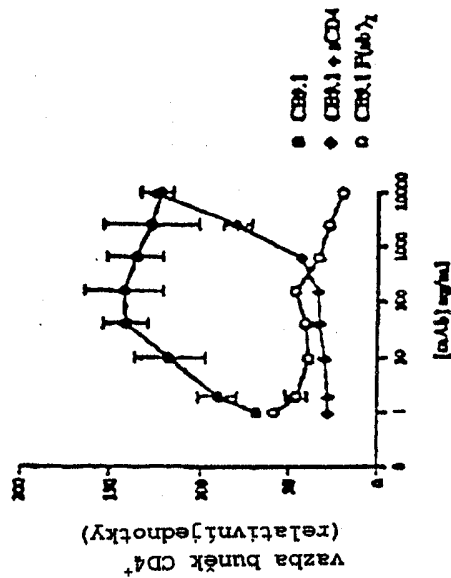
PV 586-98
12.05.98

15/32

Obr. 9

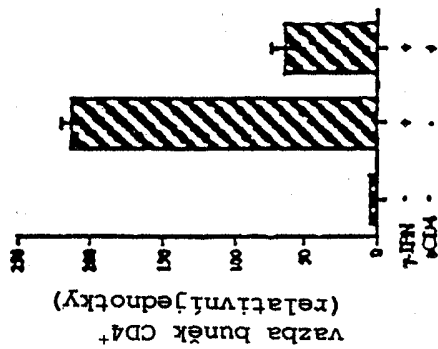


CE9.1 zprostředkovaná
vazba $CD4^+$ buněk k monocytům
ošetřeným γ IFN a inhibice $CD4$



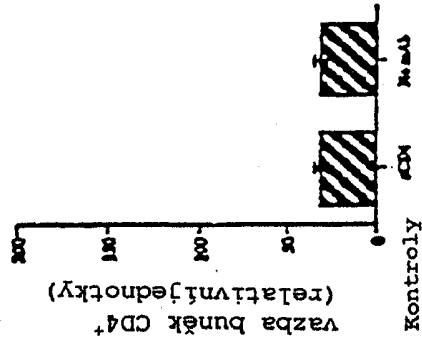
Obr. 10a

Vliv monocytů ošetřených
 γ IFN na vazbu $CD4^+$ buněk
zprostředkovanou CE9.1



Obr. 10b

Vazba $CD4^+$ buněk na
monocyty ošetřené γ IFN

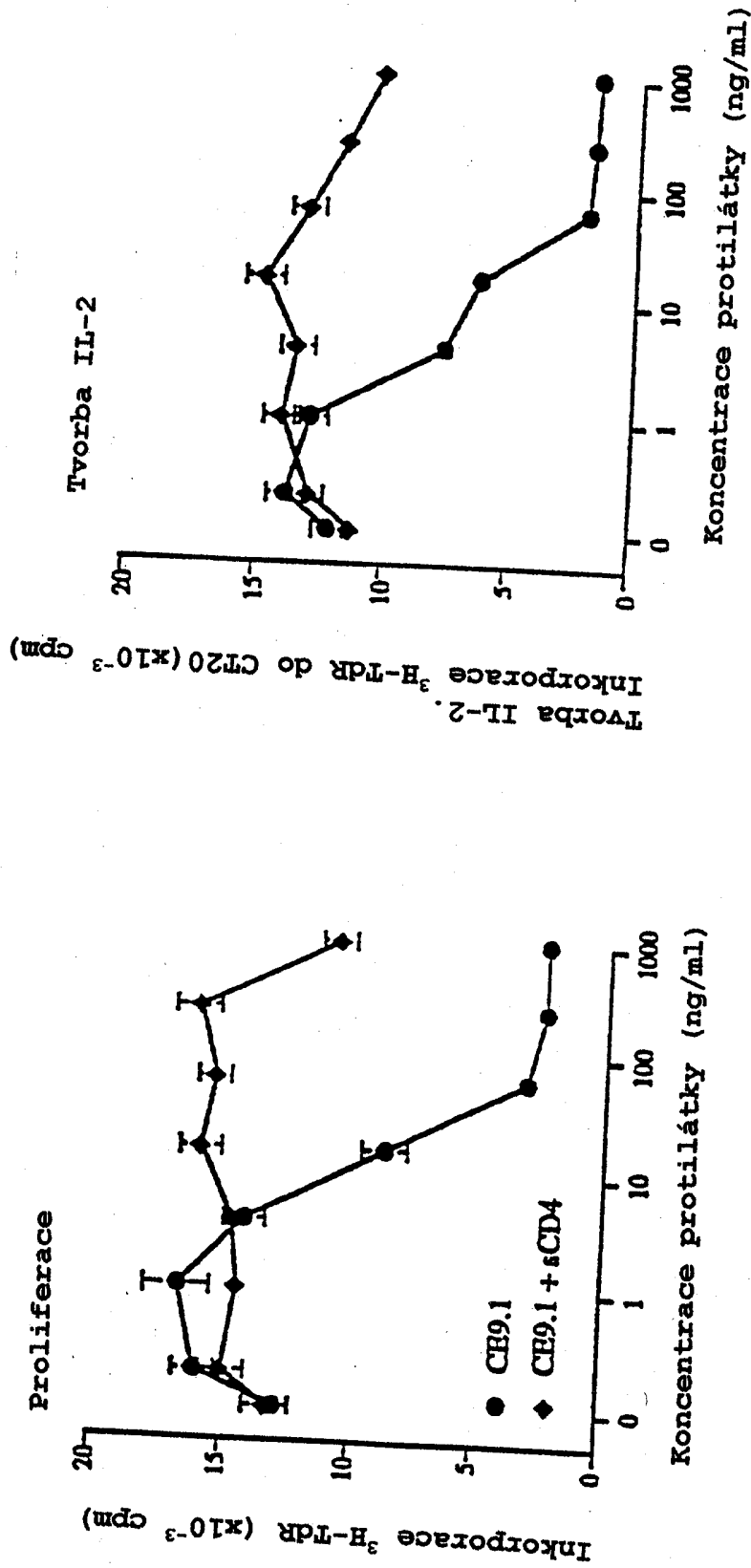


Obr. 10c

Obr. 10

17/32

Vliv CE9.1 na proliferaci a IL-2 odpověď v primární MLR

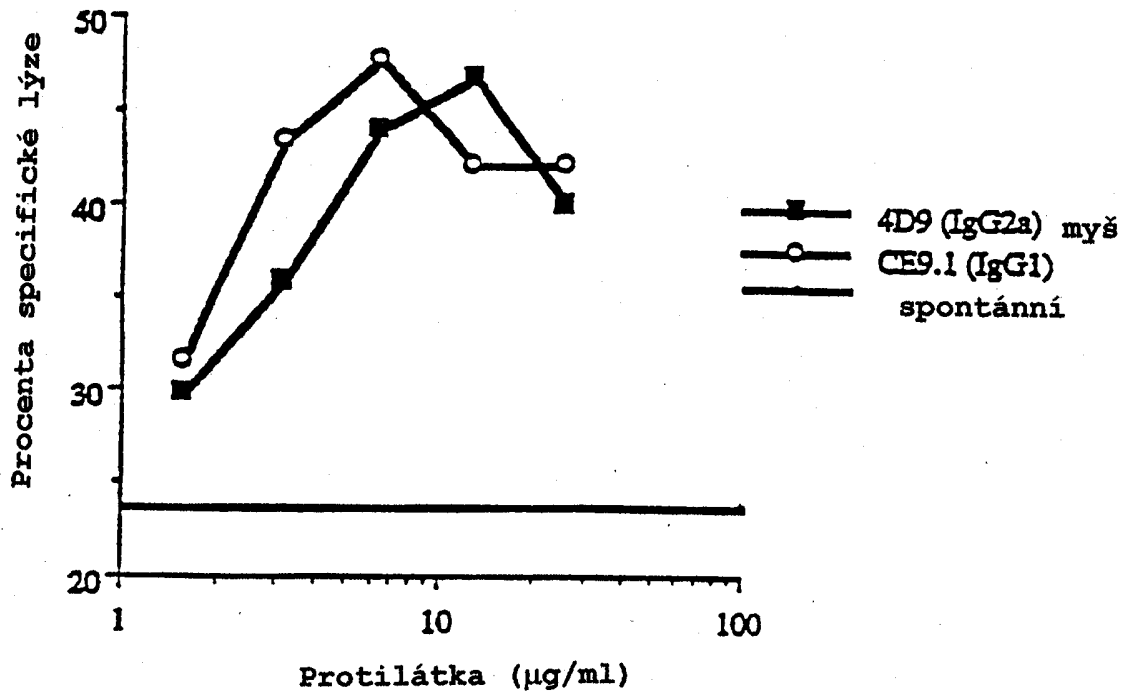


Obr. 11

18/32

Obr. 12

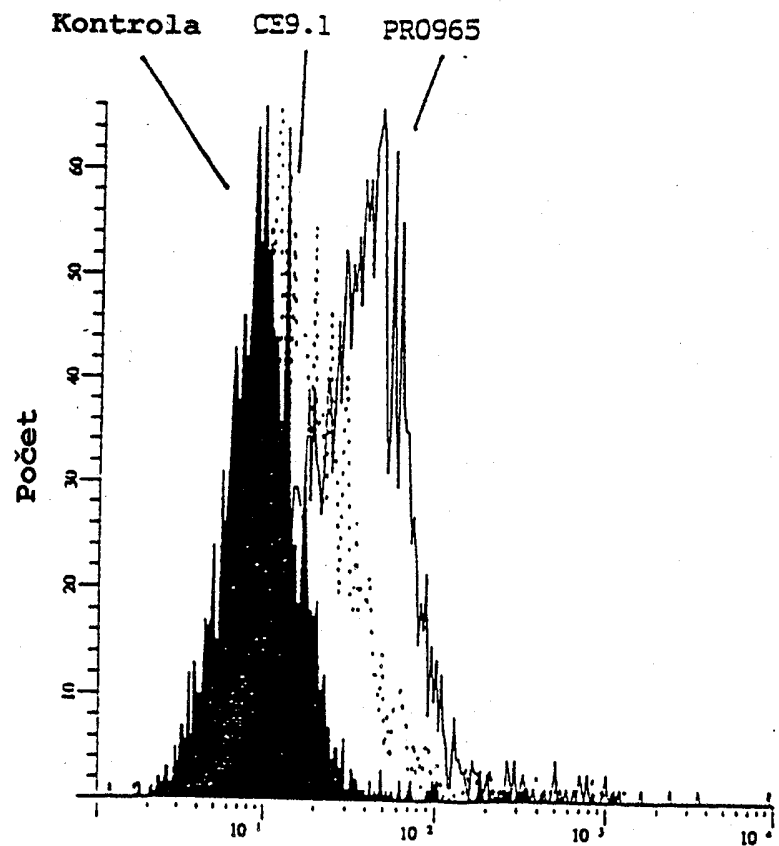
Specifická lýze buněk SupT1-18 v přítomnosti protilátek CE9.1 a 4D9 typu Anti-CD4



PV 586-98
12.05.98

19/32

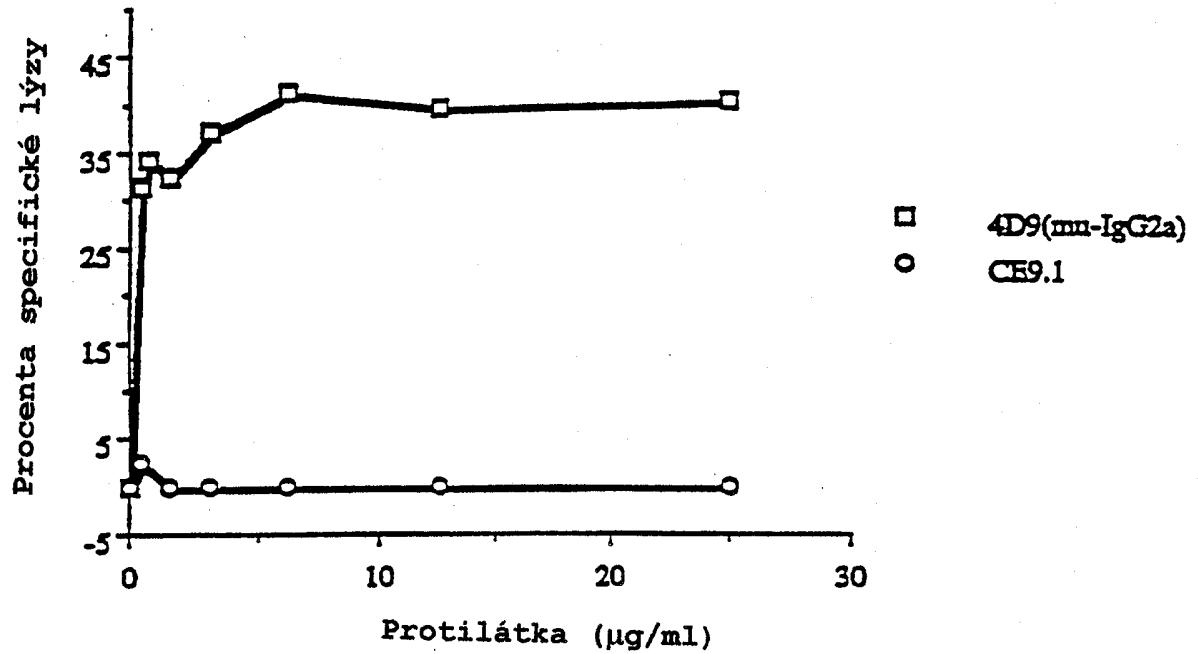
Obr. 13



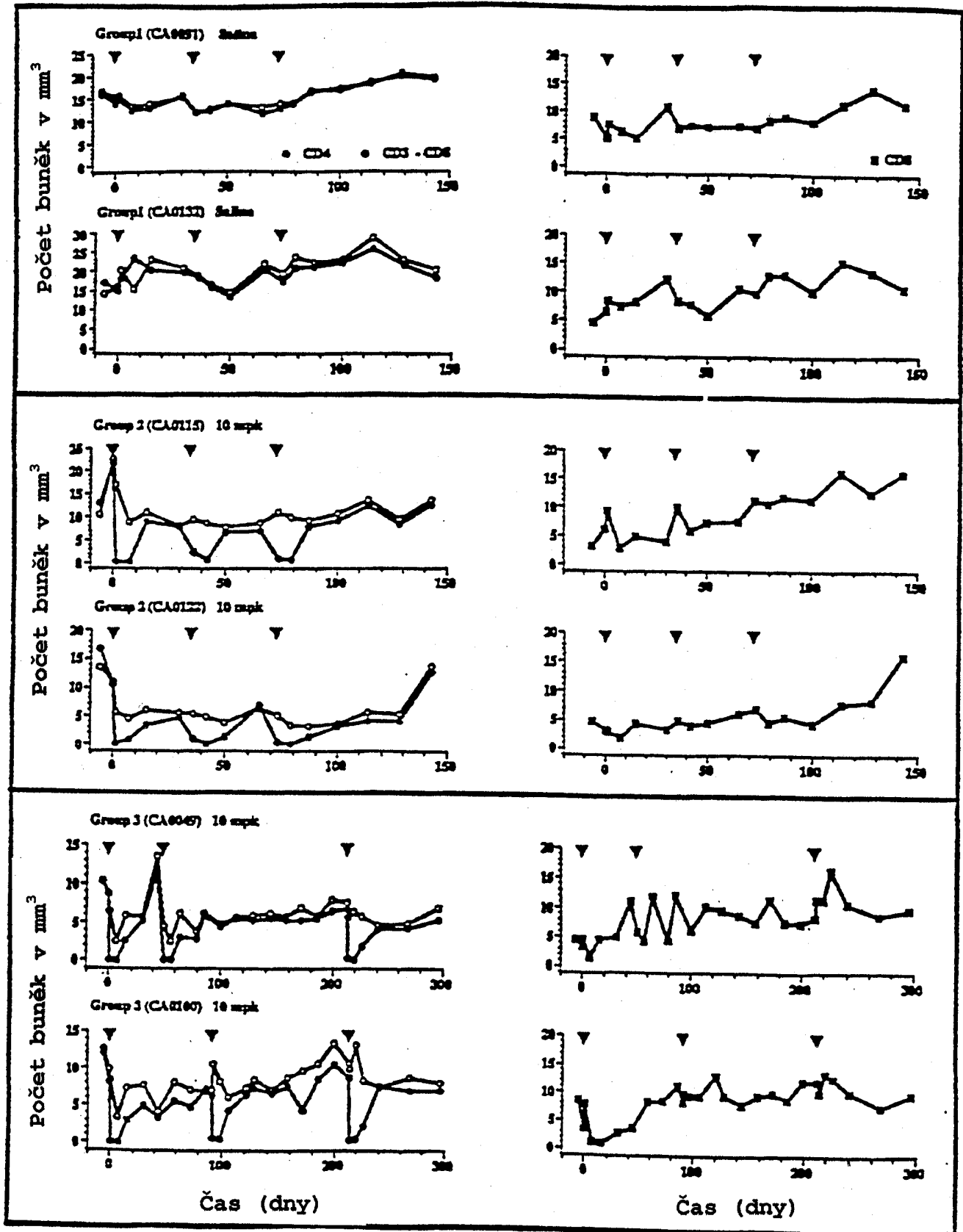
Vazba Clq k CE9.1 na buňky CD4+ SupT1

Obr. 14

Lýza buněk T1-18 protilátkami CE9.1 a 4D9 typu Anti-CD4 zprostředkovaná komplemtem



Počty buněk CD4 a CD8 u šimpanzů opakovaně ošetřovaných CE9.1
v dávce 10 mg/kg tělesné hmotnosti (mpk).



Obr. 15

Obr. 16

PCR primery pro konstantní oblast lidského $\gamma 4$

~~DEC-462 5' PCR Primer~~

5' GGGG GGA TCC TCA TTT ACC CAG AGA CAG GG 3'
BamH I

~~DEC-479 5' PCR Primer~~

5' GGGG GCT AGC ACC AAG GGC CCA TCC GTC TTC 3'
Nhe I

PCR mutageneze lidského $\gamma 4$

~~DEC-698 5' PCR Primer~~

5' CCG GGA GAT CAT GAG AGT GTC CTT GGG TTT TGG GGG GAA CAG GAA GAC
BspH I

TGA TGG TCC CCC CTC GAA CTC AGG TGC TGG GCA TGG TGG GCA TGG GGG 3'
Glu Pro

~~Midland-GE212 5' PCR Primer~~

Nhe I
5' TCC TCA GCT AGC ACC AAG GGG CCA TCC 3'
ruší místo ApaI

Obr. 17

Sekvence těžkého řetězce CD4 monoklonální protilátky SB
217969 (CE9γ4PE)

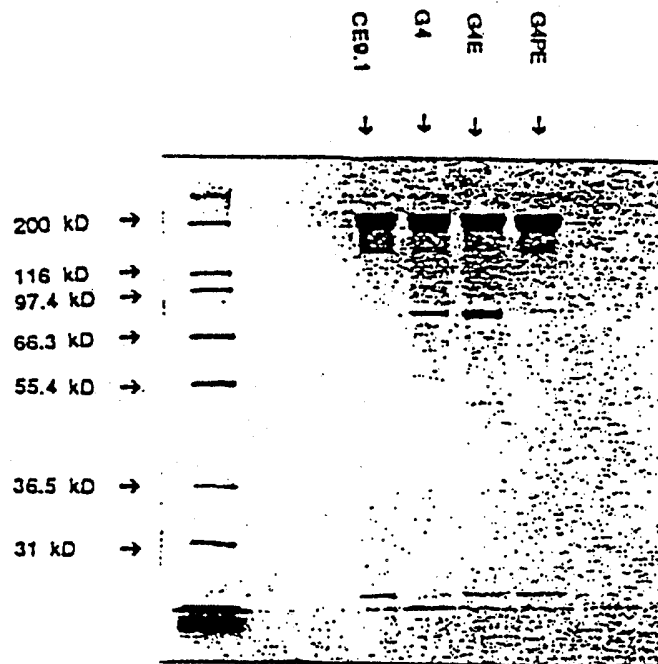
	Met	Lys	His	Leu	Trp	Phe	Phe	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	Ala	Pro	Arg	Trp	Val	Leu	Ser	
	ATG	AAA	CAC	CTG	TGG	TTC	TTC	CTC	CTC	CTG	GTG	GCA	GCC	CCC	AGA	TGG	GTC	TTG	TCC	
			9			18			27			36			45			54		
+1																				
Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr
CAG	GTG	CAG	CTG	CAG	GAG	TGG	GGC	CCA	GGA	CTG	GTG	AAG	CCG	TGG	GAG	ACC	CTG	TCC	CTC	ACC
	66				75			84			93			102			111			120
Cys	Ser	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Trp	Phe	Trp	Ile	Arg	Gln	Ser	Pro
TGC	AGT	GTC	TCT	GGT	GGC	TCC	ATC	AGC	GGT	GAC	TAT	TAT	TGG	TTC	TGG	ATC	CGC	CAG	TCC	CCA
	129				138			147			156			165			174			183
Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Tyr	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro
GGG	AAG	GGA	CTG	GAG	TGG	ATC	GGC	TAC	ATC	TAT	GGC	AGT	GGT	GGG	GGC	ACC	AAT	TAC	AAT	CCC
	192				201			210			219			228			237			246
Ser	Leu	Asn	Asn	Arg	Val	Ser	Ile	Ser	Ile	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Leu	Phe	Ser	Leu	Lys	Leu
TCC	CTC	AAC	AAT	CGA	GTC	TCC	ATT	TCA	ATA	GAC	ACG	TCC	AAG	AAC	CTC	TTC	TCC	CTG	AAA	CTG
	255				264			273			282			291			300			309
Arg	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ser	Asn	Ile	Leu	Lys	Tyr	Leu
AGG	TCT	GTG	ACC	GCC	GCG	GAC	ACG	GCC	GTC	TAT	TAC	TGT	GCG	AGT	AAT	ATA	TTG	AAA	TAT	CTT
	318				327			336			345			354			363			372
His	Trp	Leu	Leu	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Val	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly
CAC	TGG	TTA	TTA	TAC	TGG	GGC	CAG	GGA	GTC	CTG	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA	GCT	AGC	ACC	AAG	GGG
	381				390			399			408			417			426			435

Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr
CCA	TCC	GTC	TTC	CCC	CTG	GCG	CCC	TGC	TCC	AGG	AGC	ACC	TCC	GAG	AGC	AC
		444			453			462			471			480		
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser
TGC	CTG	GTC	AAG	GAC	TAC	TTC	CCC	GAA	CCG	GTG	ACG	GTG	TCC	TGG	AAC	TCA
		507			516			525			534			543		
Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
AGC	GGC	GTG	CAC	ACC	TTC	CCG	GCT	GTC	CTA	CAG	TCC	TCA	GGA	CTC	TAC	TCC
		570			579			588			597			606		
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val
GTG	ACC	GTG	CCC	TCC	_GC	AGC	TTC	GGC	ACG	AAG	ACC	TAC	ACC	TGC	AAC	GTA
		633			642			651			660			669		
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys
AGC	AAC	ACC	AAG	GTG	GAC	AAG	AGA	GTT	GAG	TCC	AAA	TAT	GGT	CCC	CCA	TGC
		696			705			714			723			732		
Ala	Pro	Glu	Phe	Gln	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro
GCA	CCT	GAG	TTC	GAG	GGG	GGA	CCA	TCA	GTC	TTC	CTG	TTC	CCC	CCA	AAA	CCC
		759			768			777			786			795		
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln
ATG	ATC	TCC	CGG	ACC	CCT	GAG	GTC	ACC	TGC	GTG	GTG	GTG	GAC	GTG	AGC	CAG
		822			831			840			849			858		
Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr
GTC	CAG	TTC	AAC	TGG	TAC	GTG	GAT	GGC	GTG	GAG	GTG	CAT	AAT	GCC	AAG	ACA
		885			894			903			912			921		
Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His
GAG	CAG	TTC	AAC	AGC	ACG	TAC	CCT	GTG	GTC	AGC	GTC	CTC	ACC	GTC	CTG	CAC
		948			957			966			975			984		
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser
AAC	GGC	AAG	GAG	TAC	AAG	TGC	AAG	GTC	TCC	AAC	AAA	GGC	CTC	CCG	TCC	TCC
		1011			1020			1029			1038			1047		
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro
ATC	TCC	AAA	GCC	AAA	GGG	CAG	CCC	CGA	GAG	CCA	CAG	GTG	TAC	ACC	CTG	CCC
		1074			1083			1092			1101			1110		
Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
GAG	ATG	ACC	AAG	AAC	CAG	GTC	AGC	CTG	ACC	TGC	CTG	GTC	AAA	GSC	TTC	TAC
		1137			1146			1155			1164			1173		
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr
GCC	GTG	GAG	TGG	GAG	AGC	AAT	GGG	CAG	CCG	GAG	AAC	AAC	TAC	AAG	ACC	ACG
		1200			1209			1218			1227			1236		
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser
GAC	TCC	GAC	GGC	TCC	TTC	TTC	CTC	TAC	AGC	AGG	CTA	ACC	GTG	GAC	AAG	AGC
		1263			1272			1281			1290			1299		
Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr
GGG	AAT	GTC	TTC	TCA	TGC	TCC	GTG	ATG	CAT	GAG	GCT	CTG	CAC	AAC	CAC	TAC
		1326			1335			1344			1353			1362		
Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys	TER									
CTC	TCC	CTG	TCT	CTG	GGT	AAA	TGA									
		1389			1398											

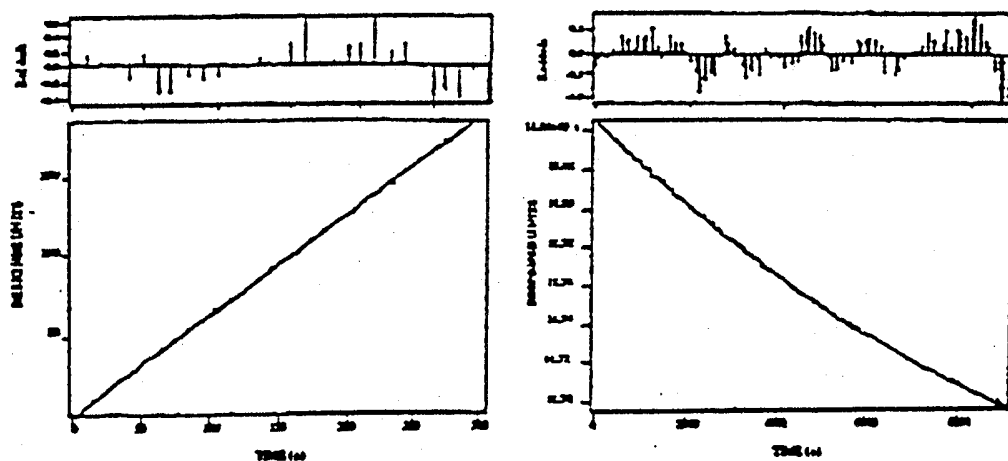
25/32

PV 586-98
10.05.98

Obr. 18



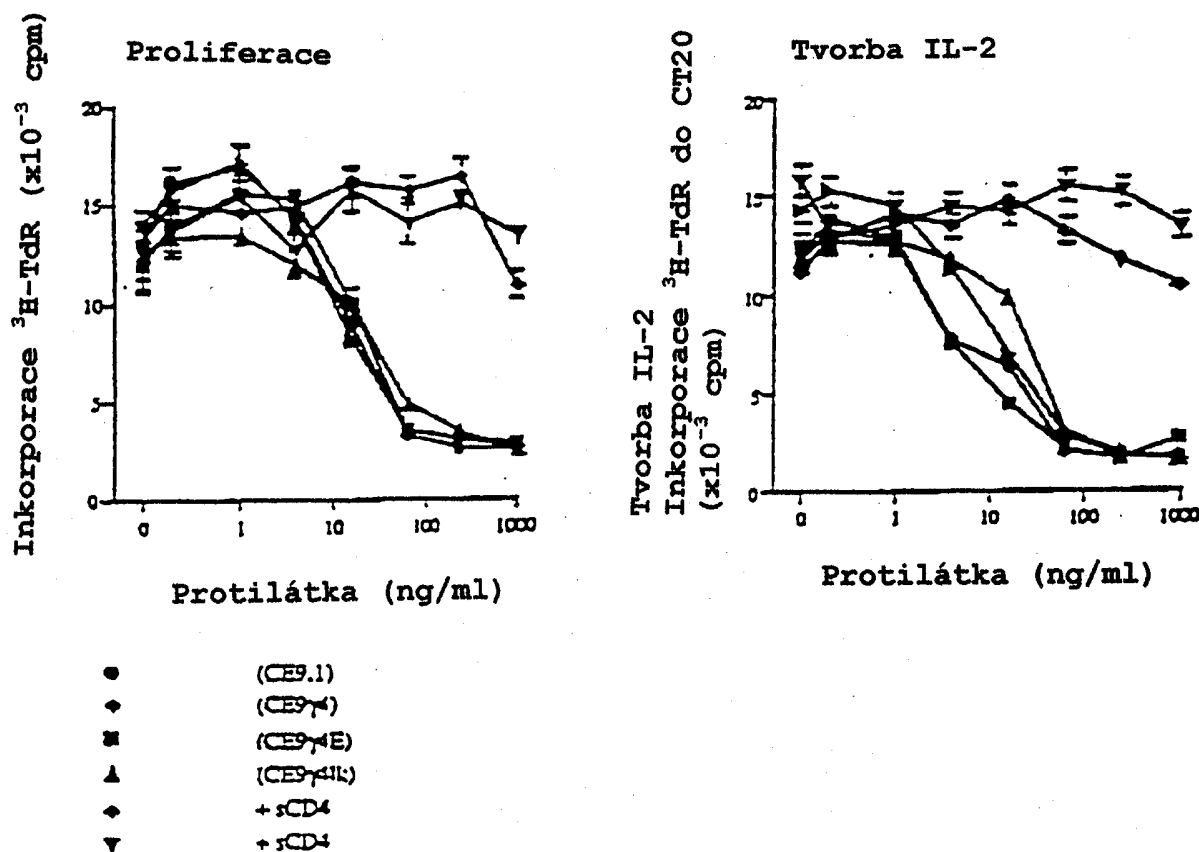
Obr. 19



Asociační (vlevo) a disociační (vpravo) fáze SPR

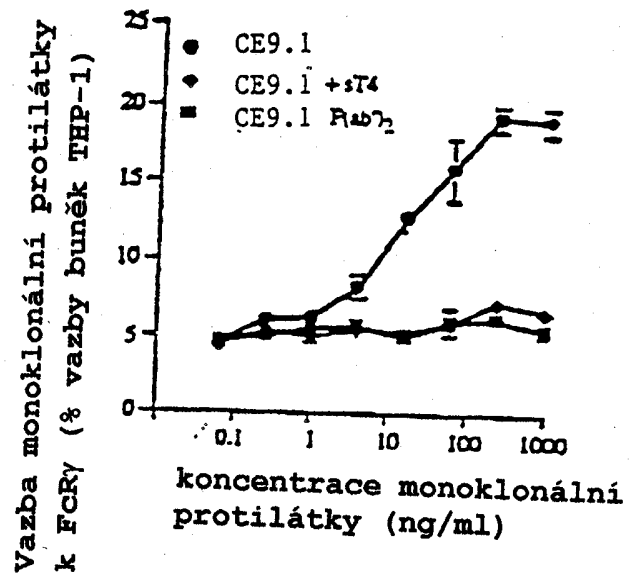
Obr. 20

Vliv konstruktů monoklonálních protilátek CD4 na primární MLR



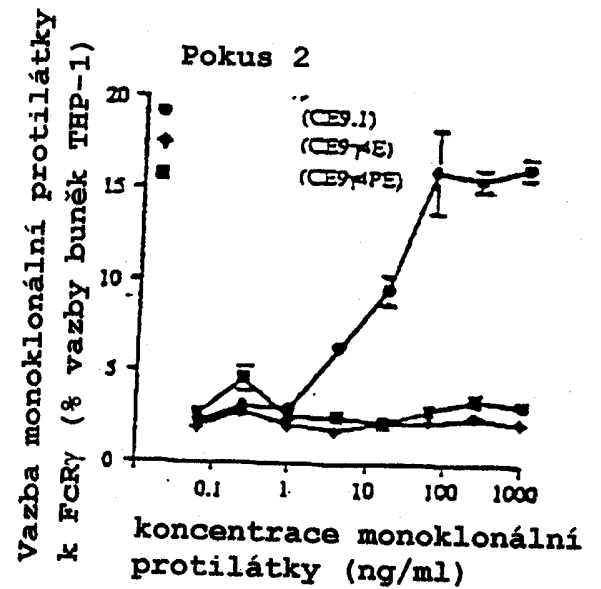
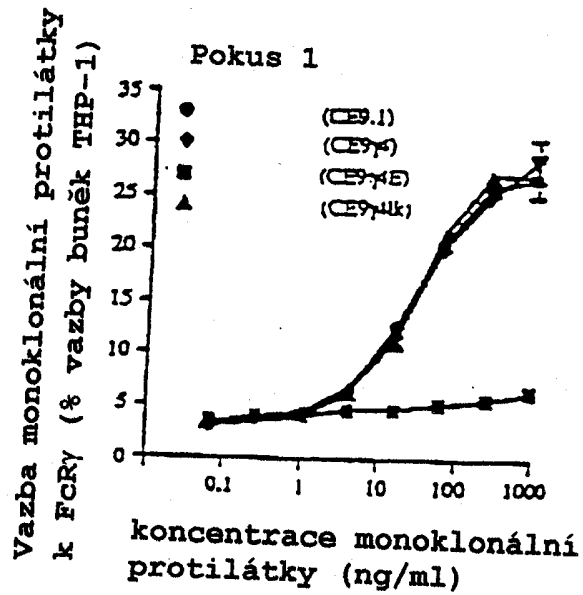
Obr. 21

Vazba CE9.1 k FcR γ na buňkách THP-1
v testu mezibuněčné adheze
zprostředkované FcR γ -CD4

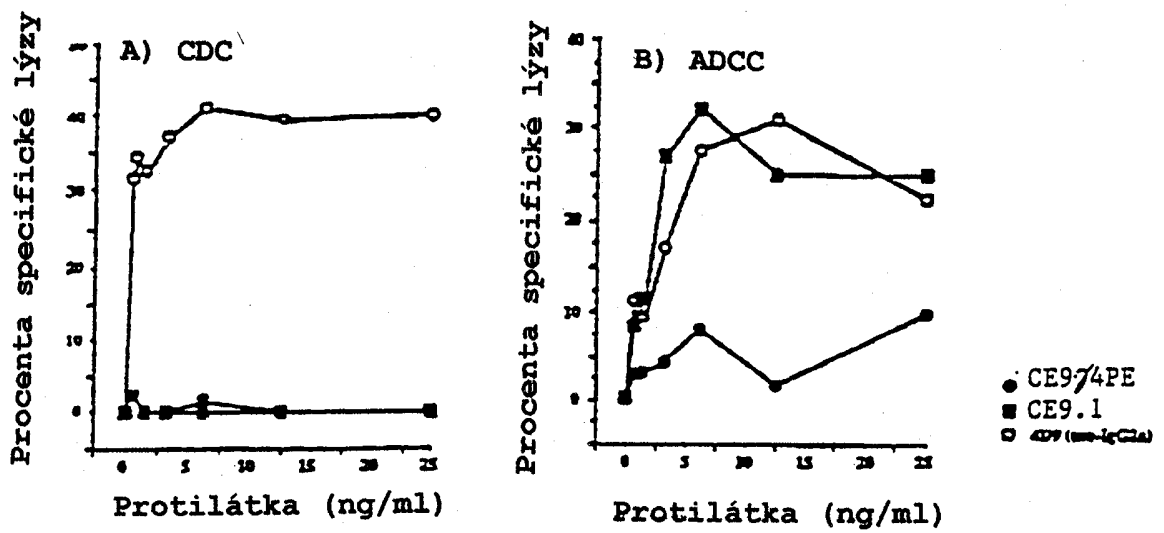


Obr. 22

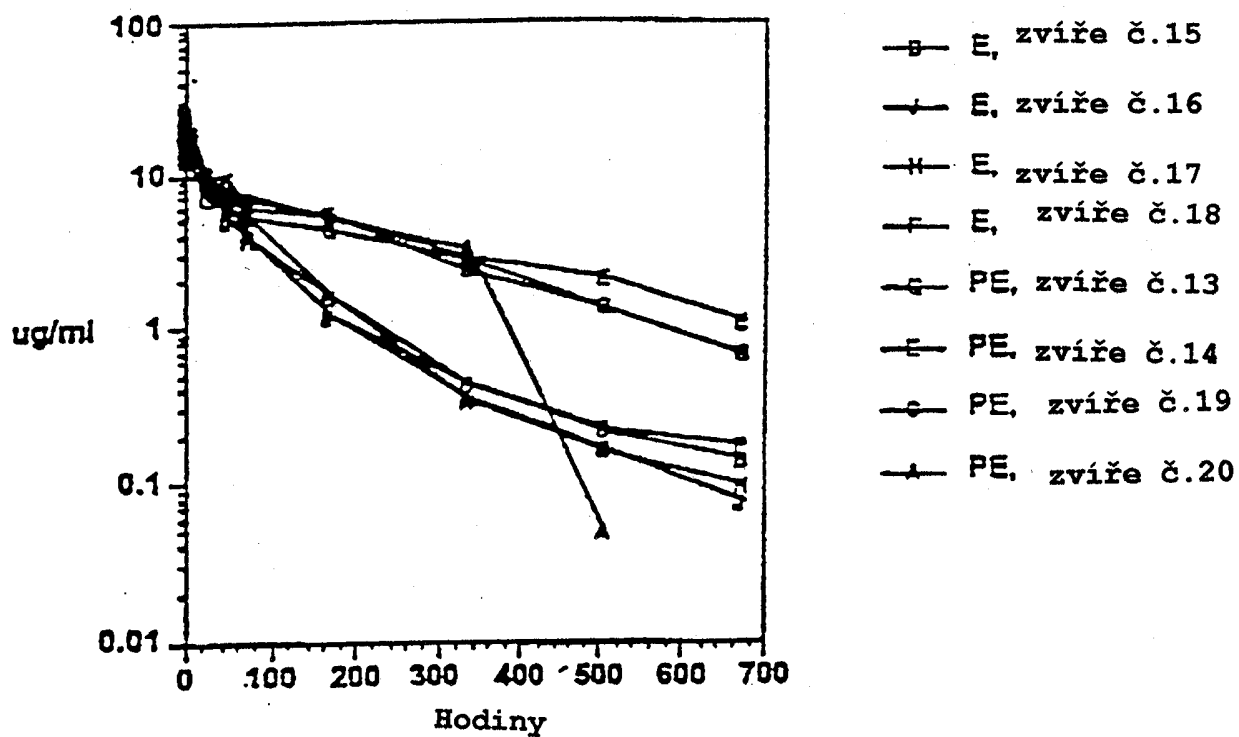
Vazba mutantních CE9 γ k FcR γ na buňkách THP-1 v testu mezibuněčné adheze zprostředkované FcR γ -CD4



Obr. 23



Obr. 24

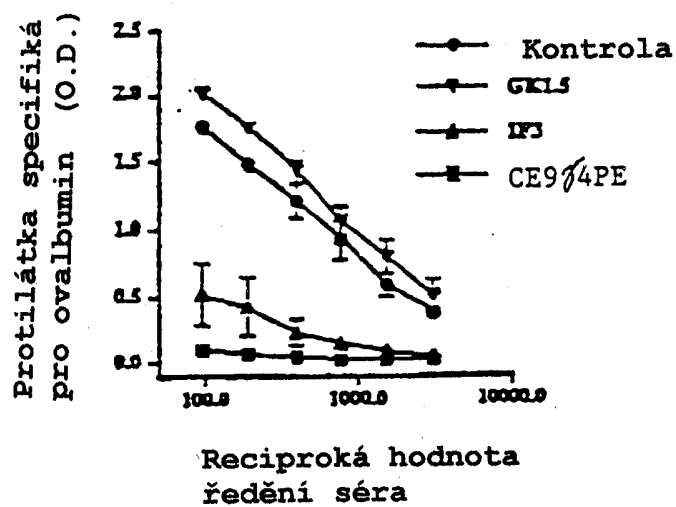


Plazmatické koncentrace následující i.v. bolus 1mg/kg CE9γ4E nebo E a CE9γ4PE nebo PE u samců laboratorního potkana linie Sprague-Dawley.

šarže TMS-24254-2, přibližný obsah „polo-merů“ 30%

Obr. 25

Vliv ošetření monoklonální protilátkou
na odpověď specifickou pro ovalbumin
u transgenních myši HuCD4



Hodnoty jsou průměry $\pm$ střední chyba
pro skupinu 3 myši