

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

**2000 -3601**

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **02.04.1999**  
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **03.04.1998**  
(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/91850**  
(33) Země priority: **JP**  
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14.03.2001**  
(Věstník č. 3/2001)  
(86) PCT číslo: **PCT/JP99/01768**  
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/51743**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>:

**C 12 N 15/13**  
**C 12 P 21/08**  
**C 12 N 5/10**  
**A 61 P 7/02**

(71) Přihlašovatel:  
CHUGAI SEIAKU KABUSHIKI KAISHA, Tokyo, JP;

(72) Původce:  
Sato Koh, Gotenba-shi, JP;  
Adachi Hideki, Gotenba-shi, JP;  
Yabuta Naohiro, Gotenba-shi, JP;

(74) Zástupce:  
PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1, Praha 4,  
14000;

(54) Název přihlášky vynálezu:  
**Chimerní řetězec protilátky, chimerní protilátka  
proti lidskému tkáňovému faktoru, v oblast,  
zušlechtěný řetězec protilátky, zušlechtěná  
protilátka, DNA, expresní vektor, hostitel, způsob  
přípravy a léčebné činidlo**

(57) Anotace:  
Zušlechtěná protilátka proti lidskému tkáňovému faktoru (TF), která obsahuje A: zušlechtěný H řetězec, který obsahuje: (1) V oblast H řetězce, která obsahuje CDRs z H řetězce myší monoklonální protilátky proti lidskému TF a FRs z H řetězce lidské protilátky, a (2) C oblast z H řetězce lidské protilátky; a B: zušlechtěný L řetězec, který obsahuje: (1) V oblast L řetězce, která obsahuje CDRs z L řetězce myší monoklonální protilátky proti lidskému TF a FRs z L řetězce lidské protilátky, a (2) C oblast z L řetězce lidské protilátky.

**CZ 2000 - 3601 A3**

13.12.00

1

proti lidskému tkáňovému faktoru V2000-3601

88301

Chimerní řetězec protilátky, chimerní protilátka / V oblast, zušlechtěný řetězec protilátky, zušlechtěná protilátka, DNA, expresní vektor, hostitel, způsob přípravy a léčebné činidlo

### Oblast techniky

Předložený vynález se týká chimerních protilátek člověk/myš, které obsahují variabilní oblast (V oblast) z myší monoklonální protilátky proti lidskému tkáňovému faktoru (TF) a konstantní oblast (C oblast) z lidské protilátky; zušlechtěné protilátky v níž oblasti určující komplementaritu (CDRs) V oblasti lehkého řetězce (L řetězec) a V oblasti těžkého řetězce (H řetězec) myší monoklonální protilátky proti lidskému TF byly přeneseny do lidské protilátky; L řetězce a H řetězce uvedené protilátky; a fragmentu V oblasti, vytvářejícího L řetězec nebo H řetězec uvedené protilátky. Předložený vynález se také týká způsobu přípravy zušlechtěné protilátky proti lidskému TF.

Předložený vynález se také týká DNA kódující výše uvedenou protilátku, specificky jejího V fragmentu a DNA kódující L řetězec nebo H řetězec, který obsahuje V oblast. Předložený vynález se také týká rekombinantního vektoru, který obsahuje výše uvedenou DNA a hostitele transformovaného uvedeným vektorem.

Předložený vynález se také týká způsobu přípravy chimerní protilátky a zušlechtěné protilátky proti lidskému TF. Předložený vynález se také týká farmaceutického prostředku a léčebného činidla pro syndrom roztroušené nitrožilní srážlivosti (DIC), který obsahuje jako aktivní složku zušlechtěnou protilátku proti lidskému TF.

### Dosavadní stav techniky

Tkáňový faktor (TF), receptor pro koagulační faktor VII exprimovaný na povrchu buněk, hraje nezastupitelnou roli v aktivaci koagulačních faktorů IX a X tím, že vytvoří komplex s koagulačním faktorem VII, a byl definován jako iniciační faktor reakcí krevního srážení.

O tkáňovém faktoru je známo, že je exprimován ve fibroblastech, buňkách hladkých svalů atd., které tvoří krevní cévy a že má hemostatickou funkci v tom, že aktivuje systém krevního srážení v okamžiku poškození cévy.

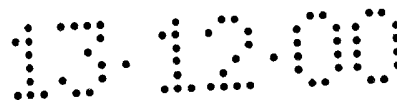
DIC je nemoc v níž aktivace systému krevního srážení v krevní cévě vede k systematickému mnohotnému výskytu krevních sraženin, hlavně v drobných cévách. Není neobvyklé, že snížení počtu krevních destiček a koagulačních faktorů, způsobené jejich spotřebováním, vede ke krvácení, které je jevem opačným ke krevnímu srážení. Mnohotné mikrosraženiny mohou způsobit nedostatečnou mikrocirkulaci krve ve významných orgánech, která pokud jednou vznikne, vede k nevratné funkční nedostatečnosti a ke špatné prognóze DIC a v tomto smyslu je DIC považována za závažnou nemoc.

Výskyt nemocí, které se za ní skrývají, stanovený z výzkumných zpráv, které v letech 1990 až 1992 pořídila studijní skupina pro výzkum specifických nemocí způsobených poruchami krevní srážlivosti z ministerstva zdravotnictví a sociální péče je: hematologické malignity asi 30 %; pevné nádory asi 20 %; infekce asi 15 %; nemoci z oblasti porodnictví asi 10 %; nemoci jater asi 6 %; šoky asi 5 % a kardiovaskulární nemoci asi 3 %. Výskyt DIC je asi 15% u leukémií, asi 6 až 7% u maligních lymfomů a asi 3% u pevných nádorů.

DIC se vyvíjí doprovázena různými výše uvedenými nemocemi, ale jejich příčina je tatáž, jedná se o TF. Má se tedy za to, že mechanismus vzniku DIC je tento: abnormálně vysoká tvorba a/nebo exprese TF v rakovinných buňkách při akutní leukémii, maligním lymfomu a v pevných nádorech; zvýšená tvorba a/nebo exprese TF v monocyttech a/nebo buňkách buněčné výstelky cév při infekcích (zvláště při sepsi způsobené gram-negativními bacily); příliv TF do krve z nekrotické jaterní tkáně při prudkém zánětu jater; exprese TF v průsvitu krevní cévy při výduti srdečnice, srdeční výduti a obrovských hemangiomech; a též příliv TF do krve při nemocích z oblasti porodnictví (embolie amniotické tekutiny a předčasné odloučení placenty), operačních zákrocích, poraněních a popáleninách.

Léčení původních nemocí (které se za DIC skrývají) je hlavním cílem, který však není snadno uskutečnitelný.

Jako běžná metoda léčení DIC se používá protisrážlivá terapie a substituční terapie. Při protisrážlivé terapii jsou hlavně používány heparinové přípravky (frakcionovaný heparin, heparin s nízkou molekulární hmotností). Také jsou používány



syntetické inhibitory proteázy („gabexate mesilate“ „nafamost mesilate“) a koncentrovaná plazma (anti-thrombin III, přípravky s aktivovaným proteinem C). Pro substituční terapii jsou koncentráty krevních destiček, čerstvě zmražené plazmy (náhrada fibrinogenu), promyté červené krvinky a podobně.

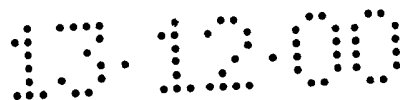
Avšak nynější léčebná činidla nejsou uspokojivá z hlediska účinnosti, vedlejších účinků a ve většině případů je úplné zbavení DIC nemožné. Proto existuje nutnost používat léky, které mají vysoké léčebné účinky a malé vedlejší účinky.

Na druhé straně je možno jako nové pokusy v léčení DIC zmínit trombomodulinové přípravky, hirudin, anti-PAF činidla, tkáňový faktor inhibice biochemické dráhy (TFPI). Pozornost vzbuzují selektivní inhibitory FXa jakožto orálně podávaná protikoagulační a/nebo protitrombotická činidla. Také je jako činidlo, které neutralizuje aktivitu TF v WO 88/07543 popsána myší monoklonální protilátka proti lidskému TF a WO 96/40921 popisuje zušlechťenou protilátku proti lidskému TF.

Od myších monoklonálních protilátek proti lidskému TF je očekáváno, že budou tvořit bezpečné a účinné léčebné činidlo tím, že nevykazují příznaky krvácení, které je spojené s hlavním účinkem na DIC. Avšak myší monoklonální protilátky jsou vysoce imunogenní (někdy označováno jako „antigenní“) a tím je léčebná hodnota myších protilátek u lidí omezena. Například poločas myších protilátek v lidském těle je relativně krátký a proto nemohou plně projevit své předpokládané účinky. Dále lidská protimyší protilátka (HAMA), která se vyvine jako odpověď na podanou myší protilátku, způsobuje imunologické reakce, které jsou nežádoucí a pro pacienta nebezpečné. Tedy myší monoklonální protilátky nemohou být lidem podávány opakovaně.

Aby se vyřešily tyto problémy, byly vyvinuty metody jejichž cílem je snížit imunogenicitu protilátek odvozených z jiných živočichů než je člověk, jako jsou (z nichž pocházejí monoklonální protilátky) například myši. Jednou z nich je metoda přípravy chimerní protilátky, v níž variabilní oblast (V oblast) protilátky pochází z myší monoklonální protilátky a její konstantní oblast (C oblast) pochází z vhodné lidské protilátky.

Protože takto získaná chimerní protilátka obsahuje variabilní oblast původní myší protilátky v její kompletní formě, má se za to, že se bude vázat k antigenu s totožnou afinitou, s jakou se váže původní myší protilátka. Dále je v chimerní protilátce podstatně snížen poměr aminokyselinových sekvencí, pocházejících z jiného živočicha než je člověk a tedy se předpokládá, že bude mít ve srovnání s původní myší



protilátkou sníženou imunogenicitu. Je však stále možné, že vznikne imunologická odpověď na myší variabilní oblast (LoBuglio, A. F. a kol., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 86: 4220-4224, 1989).

Od druhé metody snížení imunogenicity myší protilátky je, třebaže je mnohem komplikovanější, očekáváno že drasticky sníží potenciální imunogenicitu myší protilátky. V této metodě je samotná oblast určující komplementaritu (CDR– complementarity determining region) z myší protilátky přenesena do lidské variabilní oblasti a je tak vytvořena „pозměněná“ lidská variabilní oblast. Pokud je to žádoucí, některé aminokyselinové sekvence podpůrných oblastí (FRs– framework regions), které zpevňují CDRs, mohou být přeneseny z variabilní oblasti myší protilátky do lidské variabilní oblasti, aby se dosáhlo co nejtěsnějšího možného přiblížení k původní struktuře myší protilátky. Potom je zušlechtěná přestavěná lidská variabilní oblast ligována k lidské konstantní oblasti. V konečné podobě přestavěné, zušlechtěné protilátky, jsou pouze CDRs a malá část FRs odvozeny z aminokyselinových sekvencí jiných živočichů, než je člověk. CDRs obsahují hypervariabilní aminokyselinové sekvence a nevykazují druhově specifické sekvence.

Pro informace, týkající se zušlechtěných protilátek viz Riechmann, L. a kol., Nature, 332: 323-327, 1988; Verhoeye, M. a kol., Science, 239: 1534-1536, 1988; Kettleborough, C. A. a kol., Protein Engng., 4: 773-783, 1991; Maeda, H. a kol., Human Antibodies and Hybridoma, 2: 124-134, 1991; Gorman, S. D. a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 4181-4185, 1991; Tempest, P. R. a kol., Bio/Technology, 9: 266-271, 1991; Co, M. S. a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 2869-2873, 1991; Cater, P. a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285-4289, 1992; Co, M. S. a kol., J. Immunol., 148: 1149-1154, 1992 a Seto, K. a kol., Cancer Res., 53, 851-856, 1993.

Při běžné technologii zušlechtování protilátek, část podpůrné oblasti (FR) obsahuje aminokyselinovou sekvenci, která byla přenesena z variabilní oblasti myší protilátky do lidské variabilní oblasti. Pak když je podána jako léčebné činidlo lidem existuje riziko, že se vytvoří protilátky místu, které má aminokyselinovou sekvenci, která u lidí není přítomna, třebaže by se jednalo pouze o jednu až několik aminokyselin. Aby se riziku předešlo, byl vynalezen třetí druh zušlechtovací technologie. Tato metoda obsahuje, pro čtyři FRs (FR1 až FR4) vyžadované pro podporu trojrozměrné struktury tří CDRs, substituci FR lidské protilátky, která má vysokou homologii s FR myší protilátky přítomné v databázi, pomocí jedné FR jako

jednotky. V takovém případě, je z lidských protilátek, přítomných v databázi vybráno několik FRs, které jsou postupně přesouvány, až je připravena zušlechtěná protilátka s vysokou aktivitou.

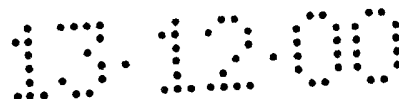
Tímto způsobem je možno konstruovat zušlechtěné protilátky, v nichž všechny FRs s výjimkou CDRs ve variabilní oblasti, mají aminokyselinové sekvence odvozené v lidské protilátce. Pak by zušlechtěná protilátka, nesoucí myší CDR neměla dále mít vyšší imunogenicitu, než má lidská protilátka obsahující lidskou CDR.

Ačkoli se očekává, jak bylo zmíněno výše, že zušlechtěná protilátka bude vhodná pro léčebné účely, není znám žádný ustálený postup, který by byl univerzálně použitelný pro jakoukoli protilátku pro přípravu zušlechtěné protilátce, a tedy jsou pro konstrukci zušlechtěných protilátek, které vykazují dostatečnou vazebnou aktivitu a neutralizační aktivitu ke specifickému antigenu vyžadovány různé důmyslné postupy (viz například Sato, K. a kol., Cancer Res., 53: 851-856, 1993).

#### Podstata vynálezu

Předmětem předloženého vynálezu je poskytnout chimerní protilátku člověk/myš, obsahující variabilní oblast (V oblast) z myší monoklonální protilátce proti lidskému tkáňovému faktoru (TF) a konstantní oblast (C oblast) z lidské protilátce, zušlechtěné protilátce, v níž oblasti určující komplementaritu (CDRs) lehkého řetězce (L řetězec) V oblasti myší monoklonální protilátce proti lidskému TF byly připojeny k lidské protilátce, L řetězec a H řetězec uvedené protilátce a fragment V oblasti, tvořící L řetězec nebo H řetězec uvedené protilátce. Dále předmětem předloženého vynálezu je poskytnout postup přípravy zušlechtěné protilátce proti lidskému TF.

Dále je předmětem předloženého vynálezu poskytnout DNA kódující výše uvedenou protilátku, specificky fragment její V oblasti a DNA kódující L řetězec nebo H řetězec, které obsahuje V oblast. Dále je předmětem předloženého vynálezu poskytnout rekombinantní DNA vektor obsahující uvedenou DNA a hostitele, transformovaného uvedeným vektorem. Dále je předmětem předloženého vynálezu poskytnout farmaceutický prostředek a léčebné činidlo pro syndrom roztroušené nitrožilní srážlivosti (DIC), obsahující jako aktivní složku zušlechtěnou protilátku proti lidskému TF.



Po intenzivních studiích, jak řešit výše uvedené problémy, autoři předloženého vynálezu úspěšně získali myši monoklonální protilátku proti lidskému TF, u níž je imunogenicita pro lidi redukována, a též vyvinuli postup přípravy nové zušlechtěné protilátky, čímž je předložený vynález kompletně završen.

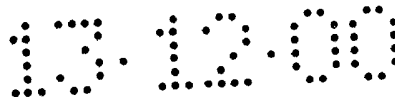
Předložený vynález se tedy týká chimerního H řetězce, který obsahuje C oblast H řetězce lidské protilátky a fragment V oblasti H řetězce myši monoklonální protilátky proti lidskému TF. Jako příklad V oblasti H řetězce může být uvedena ta, která obsahuje aminokyselinovou sekvenci uvedenou v SEQ ID NO: 9 (sekvence č. 9) a jako příklad C oblasti může být uvedena ta, která je odvozena z oblasti C $\gamma$ 4.

Dále se předložený vynález týká chimerního L řetězce, obsahujícího C oblast L řetězce lidské protilátky a fragment V oblasti L řetězce myši monoklonální protilátky proti lidskému TF. Jako příklad V oblasti L řetězce může být uvedena ta, která obsahuje aminokyselinovou sekvenci uvedenou v SEQ ID NO: 15 a jako příklad C oblasti L řetězce může být uvedena ta, která je odvozena z oblasti C $\kappa$ .

Dále se předložený vynález týká chimerní monoklonální protilátky člověk/myš proti lidskému TF, přičemž zmíněná protilátka obsahuje výše uvedený chimerní H řetězec a chimerní L řetězec.

Předložený vynález týká také fragmentu V oblasti H řetězce zušlechtěné protilátky, přičemž zmíněný fragment obsahuje podpůrné oblasti (FRs) 1 až 4 z V oblasti H řetězce lidské protilátky a oblasti určující komplementaritu (CDRs) 1 až 3 V oblasti H řetězce z myši monoklonální protilátky proti lidskému TF. Jako příklad CDR 1 až 3 mohou být uvedeny ty, které obsahují aminokyselinové sekvence uvedené v SEQ ID NO: 133 až 135. Jako příklad FR1 V oblasti H řetězce lidské protilátky může být uvedena FR1 lidské protilátky, která je má 40% nebo vyšší homologii s FR1 V oblasti H řetězce myši protilátky; jako příklad FR2 může být uvedena FR2 lidské protilátky, která je má 40% nebo vyšší homologii s FR2 V oblasti H řetězce myši protilátky; jako příklad FR3 může být uvedena FR3 lidské protilátky, která je má 40% nebo vyšší homologii s FR3 V oblasti H řetězce myši protilátky; a jako příklad FR4 může být uvedena FR4 lidské protilátky, která je má 40% nebo vyšší homologii s FR4 V oblasti H řetězce myši protilátky.

Výhodněji může být jako příklad FR1 V oblasti H řetězce lidské protilátky uvedena FR1 lidské protilátky, která je má 50% nebo vyšší homologii s FR1 V oblasti H řetězce myši protilátky; jako FR2 může být uvedena FR2 lidské protilátky, která je má



70% nebo vyšší homologii s FR2 V oblasti H řetězce myší protilátky; jako příklad FR3 může být uvedena FR3 lidské protilátky, která je má 65% nebo vyšší homologii s FR3 V oblasti H řetězce myší protilátky; a jako příklad FR4 může být uvedena FR4 lidské protilátky, která je má 80% nebo vyšší homologii s FR4 V oblasti H řetězce myší protilátky. Jako specifické příklady mohou být jako FR1 V oblasti H řetězce lidské protilátky uvedena lidská protilátka L39130; jako FR2 může být uvedena lidská protilátka L39130, lidská protilátka P01742 a lidská protilátka Z80844; jako FR3 může být uvedena lidská protilátka L39130; lidská protilátka Z34963, lidská protilátka P01825, lidská protilátka M62723, lidská protilátka Z80844, lidská protilátka L04345, lidská protilátka S78322, lidská protilátka Z26827, lidská protilátka U95239 a lidská protilátka L03147; a jako FR4 může být uvedena lidská protilátka L39130.

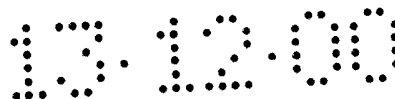
Jako výhodné příklady může být jako FR1 V oblasti H řetězce lidské protilátky uvedena lidská protilátka L39130; jako FR2 může být uvedena lidská protilátka L39130 a lidská protilátka Z80844; jako FR3 může být uvedena lidská protilátka Z34963, lidská protilátka M62723 a lidská protilátka U95239; a jako FR4 může být uvedena lidská protilátka L39130. Jako ještě výhodnější příklady může být jako FR1 V oblasti H řetězce lidské protilátky uvedena lidská protilátka L39130; jako FR2 může být uvedena lidská protilátka L39130; jako FR3 může být uvedena lidská protilátka Z34963 a lidská protilátka U95239; a jako FR4 může být uvedena lidská protilátka L39130.

Zde používaná čísla v podpurných oblastech jsou založena na definicích Kabata (Kabat, E. A. a kol., US Dept. Health and Services, US Government Printing Offices, 1991).

Předložený vynález se také týká fragmentu V oblasti H řetězce zušlechtěné protilátky, přičemž uvedený fragment obsahuje kteroukoli z aminokyselinových sekvencí, uvedených v SEQ ID NO: 30, 40, 42, 50, 52, 58, 60, 64, 70, 72, 76, 78, 82 a 84.

Předložený vynález se také týká fragmentu V oblasti L řetězce zušlechtěné protilátky, přičemž uvedený fragment obsahuje FRs 1 až 4 V oblasti L řetězce lidské protilátky a CDRs 1 až 3 z V oblasti L řetězce myší monoklonální protilátky proti lidskému TF. Jako příklad CDR 1 až 3 mohou být uvedeny ty, které obsahují aminokyselinové sekvence uvedené v SEQ ID NO: 136 až 138. Jako FR1 V oblasti L řetězce lidské protilátky může být uvedena lidská protilátka, která je má 40% nebo vyšší homologii s FR1 V oblasti L řetězce myší protilátky; jako FR2 může být uvedena





FR2 lidské protilátky, která je má 40% nebo vyšší homologii s FR2 V oblasti L řetězce myší protilátky; jako FR3 může být uvedena FR3 lidské protilátky, která je má 40% nebo vyšší homologii s FR3 V oblasti L řetězce myší protilátky; a jako příklad FR4 může být uvedena FR4 lidské protilátky, která je má 40% nebo vyšší homologii s FR4 V oblasti L řetězce myší protilátky.

Výhodněji může být jako příklad FR1 V oblasti L řetězce lidské protilátky uvedena FR1 lidské protilátky, která je má 75% nebo vyšší homologii s FR1 V oblasti L řetězce myší protilátky; jako FR2 může být uvedena FR2 lidské protilátky, která je má 80% nebo vyšší homologii s FR2 V oblasti L řetězce myší protilátky; jako FR3 může být uvedena FR3 lidské protilátky, která je má 70% nebo vyšší homologii s FR3 V oblasti L řetězce myší protilátky; a jako FR4 může být uvedena FR4 lidské protilátky, která je má 80% nebo vyšší homologii s FR4 V oblasti L řetězce myší protilátky. Jako specifické příklady mohou být jako FR1 V oblasti L řetězce lidské protilátky uvedena lidská protilátka Z37332; jako FR2 může být uvedena lidská protilátka Z37332 a lidská protilátka X93625; jako FR3 může být uvedena lidská protilátka Z37332; lidská protilátka S68699 a lidská protilátka P01607; a jako FR4 může být uvedena lidská protilátka Z37332.

Jako ještě výhodnější příklady může být jako FR1 L oblasti H řetězce lidské protilátky uvedena lidská protilátka Z37332; jako FR2 může být uvedena lidská protilátka X93625; jako FR3 může být uvedena lidská protilátka S68699; a jako FR4 může být uvedena lidská protilátka Z37332.

Zde používaná čísla v podpůrných oblastech jsou založena na definicích Kabata (Kabat, E. A. a kol., US Dept. Health and Services, US Government Printing Offices, 1991).

Předložený vynález se také týká fragmentu V oblasti L řetězce zušlechtěné protilátky, přičemž uvedený fragment obsahuje kteroukoli z aminokyselinových sekvencí, uvedených v SEQ ID NO: 93, 99, 101, 107 a 109.

Předložený vynález týká také H řetězce zušlechtěné protilátky proti lidskému TF, přičemž zmíněný řetězec obsahuje fragment V oblasti H řetězce výše uvedené zušlechtěné protilátky a fragment C oblasti H řetězce lidské protilátky. Jako C oblast lze uvést Cy4; jako FRs 1 až 4 odvozené z lidské protilátky mohou být uvedeny ty, které jsou odvozené z lidské protilátky L39130 (FR1), lidské protilátky L39130 (FR2), lidské protilátky Z34963 (FR3) nebo lidské protilátky U95239 (FR3), lidské protilátky



L39130 (FR4); a jako CDRs 1 až 3 mohou být uvedeny ty, které jsou odvozené z aminokyselinových sekvencí, uvedených v SEQ ID NO: 133 až 135.

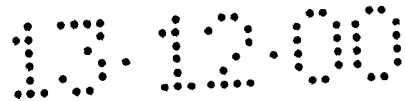
Předložený vynález týká také L řetězce zušlechtěné protilátky proti lidskému TF, přičemž zmíněný řetězec obsahuje fragment L oblasti H řetězce výše uvedené zušlechtěné protilátky a fragment C oblasti L řetězce lidské protilátky. Jako C oblast lze uvést C<sub>k</sub>; jako FRs 1 až 4 odvozené z lidské protilátky mohou být uvedeny ty, které jsou odvozené z lidské protilátky Z37332 (FR1), lidské protilátky X93625 (FR2), lidské protilátky S68699 (FR3) a lidské protilátky Z37332 (FR4); a jako CDRs 1 až 3 mohou být uvedeny ty, které jsou odvozené z aminokyselinových sekvencí, uvedených v SEQ ID NO: 136 až 138.

Předložený vynález týká také L řetězce zušlechtěné protilátky proti lidskému TF, přičemž zmíněná protilátka obsahuje L řetězec a H řetězec výše uvedené zušlechtěné protilátky.

Předložený vynález týká také procesu přípravy zušlechtěné protilátky proti lidskému TF. Proces zušlechťování se týká metod výběru FRs, které zpevňují strukturu CDRs 1 až 3, jež jsou rozpoznávacími místy na antigenu pro H řetězec a L řetězec. Předložený vynález se tedy týká metody výběru některé FRs z lidské protilátky, která má vysokou homologii s FR myši protilátky s každou FR jako jednotkou, a vytvoření zušlechtěné protilátky, která má požadovanou aktivitu, postupným přesunutím FR.

Přesněji řečeno, jedním příkladem procesu přípravy přirozené zušlechtěné protilátky, která má oblast určující komplementaritu (CDR) odvozenou z živočicha jiného než je člověk a podpůrnou oblast (FR) odvozenou z přirozené lidské protilátky a která má sníženou imunogenicitu, je uvedená metoda, která obsahuje kroky:

- (1) příprava monoklonální protilátky živočicha jiného než je člověk, která reaguje s požadovaným antigenem;
- (2) příprava několika lidských protilátek, které mají vysokou homologii s aminokyselinovou sekvencí FR v monoklonální protilátce, uvedené v bodu (1);
- (3) zaměnění čtyř FRs jedné z lidských protilátek, uvedených v bodu (2), za odpovídající FRs z monoklonální protilátky živočicha jiného než je člověk, uvedené v bodu (1) a vytvoření tak první zušlechtěné protilátky;
- (4) zjištění schopnosti zušlechtěné protilátky, vytvořené výše v bodu (3), vázat se k antigenu nebo neutralizovat biologickou aktivitu antigenu;



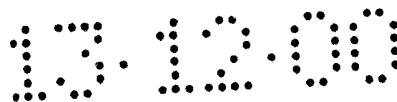
- (5) zaměnění jedné až tří FRs zušlechtěné protilátky, vytvořené v bodu (3), za odpovídající FRs z lidské protilátky, která je odlišná od té, která byla použita v bodu (3), u lidských protilátek připravených v bodu (2) a vytvoření tak druhé zušlechtěné protilátky;
- (6) porovnání schopnosti druhé zušlechtěné protilátky, vytvořené výše v bodu (5) a první zušlechtěné protilátky, vytvořené výše v bodu (3), vázat se k antigenu nebo neutralizovat biologickou aktivitu antigenu a tak vybrat zušlechtěnou protilátku, která má výhodnou aktivitu;
- (7) provedení výše uvedených kroků (3) až (6) u zušlechtěné protilátky, vybrané výše v bodu (6); a
- (8) opakování výše uvedených kroků (3) až (6) dokud není získána zušlechtěná protilátka, která má aktivitu odpovídající monoklonální protilátce živočicha jiného než je člověk a uvedené výše v bodu (1).

Jakmile je jednou získána zušlechtěná protilátka, která má určitý stupeň aktivity neutralizace lidského TF, je proveden další průzkum homologie specifických FR v H řetězci a L řetězci V oblasti a tímto způsobem může být vybrána lidská protilátka, která má vysokou homologii. Přidáním takto získané lidské protilátky ke skupině několika lidských protilátek ve výše uvedeném kroku (2) a dalším opakováním kroků (3) až (6), může být získána zušlechtěná protilátka, která má požadovanou aktivitu.

Předložený vynález se také týká DNA kódující fragment V oblasti H řetězce nebo fragment V oblasti L řetězce myší monoklonální protilátky proti TF. Jako příklad aminokyselinové sekvence a kódující DNA fragmentu V oblasti H řetězce nebo fragmentu V oblasti L řetězce je možno uvést tu, která obsahuje nukleotidové sekvence uvedené v SEQ ID NO: 9 respektive 15.

Předložený vynález se také týká DNA kódující chimerní H řetězec nebo chimerní L řetězec. Jako DNA kódující uvedený H řetězec může být uvedena ta, která obsahuje nukleotidové sekvence uvedené v SEQ ID NO: 9, a jako DNA kódující uvedený L řetězec může být uvedena ta, která obsahuje nukleotidové sekvence uvedené v SEQ ID NO: 15.

Předložený vynález se také týká DNA kódující fragment V oblasti H řetězce nebo fragment V oblasti L řetězce výše uvedené zušlechtěné protilátky. Jako DNA kódující fragment V oblasti H řetězce je možno uvést tu, která obsahuje kteroukoli z nukleotidových sekvencí uvedených v SEQ ID NO: 29, 39, 41, 49, 51, 57, 59, 63, 69,



71, 75, 77, 81 nebo 83, a jako DNA kódující fragment V oblast L řetězce je možno uvést tu, která obsahuje kteroukoli z nukleotidových sekvencí uvedených v SEQ ID NO: 92, 98, 100, 106 nebo 108.

Předložený vynález se také týká DNA kódující H řetězec zušlechtěné protilátky.

Předložený vynález se také týká DNA H řetězce zušlechtěné protilátky, přičemž uvedená DNA obsahuje DNA kódující aminokyselinové sekvence, uvedené v SEQ ID NO: 30, 40, 42, 50, 52, 58, 60, 64, 70, 72, 76, 78, 82 nebo 84. Jako příklad uvedené DNA je možno zmínit tu, která obsahuje kteroukoli z nukleotidových sekvencí uvedených v SEQ ID NO: 29, 39, 41, 49, 51, 57, 59, 63, 69, 71, 75, 77, 81 nebo 83.

Předložený vynález se také týká DNA kódující L řetězec výše uvedené zušlechtěné protilátky.

Předložený vynález se také týká DNA L řetězce zušlechtěné protilátky, přičemž uvedená DNA obsahuje DNA kódující aminokyselinové sekvence, uvedené v SEQ ID NO: 93, 99, 101, 107 nebo 109. Jako příklad uvedené DNA je možno zmínit tu, která obsahuje kteroukoli z nukleotidových sekvencí uvedených v SEQ ID NO: 92, 98, 100, 106 nebo 108.

Předložený vynález se také týká rekombinantního DNA vektoru, obsahujícího kteroukoli výše popsanou DNA.

Předložený vynález se také týká transformací, prováděných výše popsaným rekombinantním DNA vektorem.

Předložený vynález se také týká způsobu přípravy chimerní protilátky nebo zušlechtěné protilátky proti lidskému TF, přičemž uvedená metoda obsahuje kultivaci výše uvedených transformantů a získání chimerní protilátky nebo zušlechtěné protilátky proti lidskému TF z vypěstované kultury.

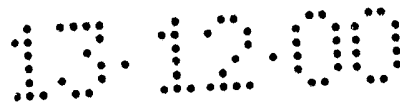
Předložený vynález se také týká farmaceutických prostředků a léčebných činidel pro DIC, které obsahují jako účinnou složku výše uvedenou zušlechtěnou protilátku.

Nejlepší způsob provedení vynálezu

Předložený vynález bude nyní vysvětlen s dalšími podrobnostmi.

#### 1. Příprava myších monoklonální protilátky proti lidskému TF

Myší monoklonální protilátka proti lidskému TF může být připravena tak, že je vytvořen hybridom pomocí fúze buněk produkujících protilátku, které jsou získané z živočichů imunizovaných daným antigenem, s myelomovými buňkami, poté je ze



získaného hybridomu selektován klon, který produkuje protilátku, která specificky inhibuje aktivitu TF.

Tedy slezinné buňky myši imunizované TF jakožto antigenem, který byl jako čištěn z lidské placenty, byly fúzovány s myelomovými buňkami a byl tak připraven hybridom. Za účelem hromadného prohledávání hybridomů byla pomocí buněčného ELISA testu, který využívá buněčné linie J82, která silně produkuje TF, určována vazebná schopnost protilátky k TF a její schopnost neutralizovat TF byla určena v testovacím systému, který používá jako míru aktivity inhibování aktivace koagulačního faktoru X (faktor X: FX). Výsledkem bylo, že byly úspěšně založeny hybridomy, které produkují 6 protilátek, které silně inhibují aktivaci FX komplexu TF/VIIa.

### (1) Příprava antigenu

Jako TF pro imunizaci zvířat může být zmíněn peptid, který je částí aminokyselinové sekvence TF, vytvořeného rekombinační DNA technologií nebo chemickou syntézou, nebo TF získaného z lidské placenty. Například je možno jako antigen použít TF purifikovaný z lidské placenty podle metody Ito a kol., (Ito T. a kol., J. Biochem. 114: 691-696, 1993).

Získaný TF je smíchán s adjuvans a takto získaná směs je použita jako antigen. Jako adjuvans je možno uvést Freudovo kompletní adjuvans nebo Freudovo nekompletní adjuvans, kterékoli z nich může být ve směsi použito.

### (2) Imunizace a odebírání buněk produkujících protilátky

Antigen získaný výše popsaným způsobem může být podáván savcům jiným než je člověk, například savcům jako jsou myši, krysy, koně, opice, králíci, kozy, ovce a podobně. Imunizace může být provedena pomocí jakékoli existující metody a je hlavně prováděna intravenózními, subkutánními a intraperitoneálními injekcemi a podobně. Období imunizace je např. v intervalu od několika dní do několika týdnů, výhodně v intervalu 4 až 21 dní.

Buňky produkující protilátku mohou být odebírány 2 až 3 dny po posledním dnu imunizace. Jako buňky produkující protilátku mohou být lze uvést slezinné buňky, lymfatické buňky a buňky periferní krve a obecně jsou používány slezinné buňky. Množství antigenu, které by mělo být použito pro každou imunizaci je 0,1 až 100  $\mu\text{g}$  na myš.

### (3) Určování titru protilátky

Aby byla potvrzena úroveň imunitní odpovědi imunizovaného zvířete a vybrán požadovaný hybridom z buněk po provedené buněčné fúzi, je určován titer protilátky v krvi imunizovaného zvířete popř. v supernatantu kultury buněk, které produkují protilátku.

Jako metody pro detekci protilátky je možno zmínit známé metody, jako je enzymimunologický test (EIA), radioimunologický test (RIA), imunosorbční test s vázaným enzymem (ELISA) a podobně.

#### (4) Buněčná fúze

Jako myelomové buňky, fúzující s buňkami produkujícími protilátku jsou používány buněčné linie odvozené z myší, krys, lidí atd., které jsou běžně dostupné osobám se zkušenostmi v tomto oboru. Jako používané buněčné linie je možno uvést ty, které mají takové vlastnosti jako je resistance k lékům, neschopnost v nefúzovaném stavu přežít v selekčním médiu (například médium HAT) a schopnost přežít pouze ve fúzovaném stavu. Obecně jsou používány kmeny rezistentní k 8-azaguaninu a tyto buněčné linie postrádají hypoxantin-guanidin-fosforybosyltransferázu a proto nemohou přežít v médiu, obsahujícím hypoxantin, aminopterin a tymidin (médium HAT).

Jako myelomové buňky jsou používány převážně různé známé buněčné linie, jako jsou P3 (P3X63Ag8.653) (J. Immunol. 123: 1548-1550, 1979), P3X63Ag8.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology 81: 1-7, 19778), NS-1 (Kohler, G. a Milstein, C., Eur. J. Immunol. 6: 511-519, 1976), MPC-11 (Margulies, D. H., Cell 8: 405-415, 1976), SP2/0 (Shulman, S. F. a kol., J. Immunol. Methods (1980) 35: 1-21, 1980), S194 (Trowbridge, I. S., J. Exp. Med. 148: 313-323, 1978), R210 (Galfre, G. a kol., Nature 277: 131-133, 1979) a podobné.

Buňky produkující protilátky lze získat ze slezinných buněk, lymfatických buněk a podobně. Tedy z výše uvedených živočichů jsou odebrány nebo sbírány sleziny, lymfatické uzliny atd. a tyto tkáně jsou dispergovány. Dispergované buňky jsou při přípravě požadovaných buněk produkujících protilátky resuspendovány v médiu nebo pufru jako jsou PBS, DMEM a RPMI1640, filtrovány přes nerezové sítko a centrifugovány.

Výše uvedené myelomové buňky a buňky produkující protilátky jsou podrobeny buněčné fúzi.

Buněčná fúze může být provedena tak, že se myelomové buňky a buňky produkující protilátky přivedou do kontaktu při teplotě 30 až 37 °C po dobu 1 až 15

minut v přítomnosti urychlovače fúze ve vzájemném poměru 1:1 až 1:10 v kultivačním médiu pro živočišné buňky, jako jsou MEM, DMEM, RPMI1640 a podobně. Aby se buněčná fúze urychlila, mohou být použity urychlovače buněčné fúze nebo fúzující viry, jako jsou polyethylenglykol (PEG) o molekulové hmotnosti 1 000 až 6 000, polyvinylalkohol nebo Sendai virus (HVJ). Dále je možno pro fúzování buněk produkujících protilátky s myelomovými buňkami použít komerčně dostupné přístroje pro buněčnou fúzi (například elektroporace), které používají elektrické stimulační.

#### (5) Selekce a klonování hybridomů

Z fúzovaných buněk může být vybrán požadovaný hybridom. Jako příklad mohou být uvedeny metody, které používají selektivního růstu buněk v selekčním médiu. Tak je buněčná suspenze po naředění vhodným médiem vyseta na mikrotitrační destičky, do nichž je přidáno selekčním médiem (jako je HAT). Jako výsledek mohou být rostoucí buňky získány ve formě hybridomu.

Testování hybridomů je prováděno metodou konečného ředění, pomocí třídění fluorescenčně aktivovaných buněk a podobně a nakonec může být získán hybridom produkující protilátku.

Výběr hybridomu, který produkuje protilátku, může být proveden za použití kombinace různých testovacích systémů. Například mohou být kombinovány systém rozpoznávací antigen, jako je buněčný ELISA test, systém měřící TF-neutralizační aktivitu, který používá jako měřítko aktivitu faktoru Xa a systém testování neutralizační aktivity, jako je systém měření schopnosti inhibování koagulace plazmy, a je tak získán hybridom produkující monoklonální protilátku, která má požadovanou aktivitu. Tímto postupem mohou být získány hybridomy produkující monoklonální protilátku, jako jsou ATR-2, ATR-3, ATR-4, ATR-5, ATR-7 a ATR-8.

#### (6) Odebírání monoklonálních protilátek

Jako metody odebírání monoklonálních protilátek ze získaných hybridomů je možno uvést běžné metody pěstování buněčných kultur, metoda vytváření ascitů a podobně.

Při použití metody pěstování buněčných kultur je hybridom kultivován v kultivačním médiu pro živočišné buněčné kultury, jako je RPMI1640 doplněné 10 až 20 % fetálního telecího séra, médium DMEM, médium bez séra nebo podobně, za podmínek kultivace (například 37 °C, koncentrace 5% CO<sub>2</sub>) po dobu 2 až 14 dní, a poté je protilátka získána ze supernatantu buněčné kultury.

Při použití metody vytváření ascitů je hybridom podán intraperitoneálně živočišnému druhu, který je podobný tomu druhu savce, z něhož jsou odvozeny myelomové buňky a hybridom vyroste do velkých rozměrů. Potom je 1 až 4 týdny později odebrán ascites nebo sérum.

Když je vyžadována purifikace protilátky ve výše uvedené metodě získání protilátky, purifikace je provedena po vybrání vhodné, známé metody, jako je frakcionace síranem amonným, chromatografie na iontoměničích a afinitní chromatografie, nebo pomocí jejich kombinace.

## 2. Klonování DNA kódující V oblast monoklonální protilátky proti TF

### (i) Příprava mRNA

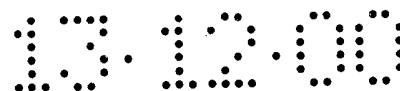
Aby bylo možno klonovat DNA kódující V oblast H řetězce a V oblast L řetězce myší monoklonální protilátky proti lidskému TF, je izolována pomocí známé metody, jako je např. metody pomocí guanidinu a ultracentrifugace, celková RNA ze získaného hybridomu (Chirgwin, J. M. a kol., *Biochemistry*, 18: 5294-5299, 1979) a potom je mRNA purifikována pomocí sloupce oligo (dT)-celulózy, který je součástí soupravy pro purifikaci mRNA (mRNA Purification Kit – Pharmacia Biotech) a podobně. mRNA může být také purifikována bez toho, že by byla izolována celková RNA, a to pomocí QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia Biotech).

### (ii) Příprava a amplifikace DNA

Z RNA získané jak bylo popsáno výše v kroku (i) je pomocí reverzní transkriptázy syntetizována V oblast L řetězce, popřípadě V oblast H řetězce. Syntéza cDNA může být provedena pomocí Oligo-dT primeru nebo jiného vhodného primeru (například primer pro syntézu cDNA, který je součástí soupravy), který hybridizuje s C oblastí L řetězce nebo s C oblastí H řetězce.

Amplifikace cDNA může být provedena pomocí PCR, založené na metodě 5'-RACE (Frohman, M. A. a kol., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85,8998-9002, 1988, Belyavsky, A. a kol., *Nucleic Acids Res.* 17: 2919-2932, 1989), která používá soupravu 5'-Ample FINDER RACE kit (CLONETECH) společně s L řetězcem a H řetězcem. Ke koncům dvojláknové cDNA, syntetizované jak bylo popsáno výše, je připojen cDNA adaptér a poté je provedena polymerázová řetězová reakce (PCR) pro DNA kódující V oblast H řetězce a V oblast L řetězce (DNA kódující fragment V oblasti L řetězce je zde zkráceně označen „DNA V oblasti L řetězce“ nebo „DNA kódující V oblast L řetězce“; totéž platí pro V oblast H řetězce atd.).





Při amplifikaci DNA V oblast H řetězce může být jako 5'-koncový primer použit Adapter primer 1, primer MHC-G1 (SEQ ID NO: 1) pro konstantní oblast H řetězce myší protilátky (ATR-2, ATR-3, ATR-4 a ATR-5) (oblast cy1) nebo primer MHC-G2a (SEQ ID NO: 2) (ATR-7 a ATR-8) (oblast cy2a) (S. T. Jones a kol., *Biotechnology*, 9: 88, 1991). Například jako 5'-koncový primer může být použit Adapter primer 1, který je součástí soupravy a jako 3'-koncový primer lze použít primer pro konstantní oblast L řetězce k řetězce (oblast C<sub>k</sub>) myší protilátky (jako je primer MKC, který má nukleotidovou sekvenci jaká je uvedena v SEQ ID NO: 3).

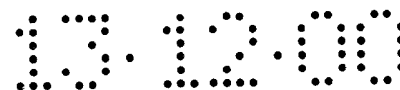
(iii) Purifikace DNA a určování nukleotidové sekvence

U produktů PCR je provedena agarózová elektroforéza podle známého postupu. Po vyříznutí požadovaného DNA fragmentu byla DNA znovu extrahována a purifikována, potom byla ligována do vektorové DNA.

DNA může být purifikována buď extrakcí pomocí fenolu a chloroformu (J. Sambrook a kol., *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) nebo pomocí komerčně dostupné soupravy (například GENE CLEAN II; BIO101). Vektorová DNA, použitá pro připojení fragmentů DNA, může být kterákoli ze známých vektorových DNA (například pUC19 a Bluescript atd.).

Výše uvedená DNA a vektorová DNA jsou ligovány pomocí známé ligační soupravy (vyráběná v Takara Shuzo) a je tak získán rekombinovaný vektor. Poté co je výsledný rekombinovaný DNA vektor vnesen do kompetentních buněk *Escherichia coli* JM109 (Nippongene) atd., jsou selektovány kolonie rezistentní k ampiciklinu a pak je vektorová DNA připravena na základě známé metody (J. Sambrook a kol., *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Poté co je výše uvedený vektor štěpen pomocí restrikčního enzymu, nukleotidová sekvence DNA o kterou se jedná, může být určena pomocí známé metody (například pomocí dideoxy-metody) (J. Sambrook a kol., *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Ve shodě s předloženým vynálezem může být použit automatický přístroj pro určování nukleotidové sekvence (DNA Sequencer 373A, Perkin-Elmer).

(iv) V oblast H řetězce a V oblast L řetězce tvoří místo, které váže antigen a všeobecná struktura je vzájemně podobná. Tedy každé 4 podpůrné oblasti (FRs) jsou spojeny třemi hypervariabilními oblastmi, tj. oblastmi určujícími komplementaritu (CDRs). Aminokyselinové sekvence FRs jsou dosti konzervativní, zatímco aminokyselinové sekvence CDRs jsou velmi vysoce variabilní (Kabat, E. A. a kol.,



„Sequence of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1983).

Mnoho oblastí výše uvedených čtyř FRs má strukturu  $\beta$ -listu, což má za následek, že CDR vytváří smyčku. CDR může někdy být částí struktury  $\beta$ -listu. Tři CDR jsou tedy udržovány ve vzájemné těsné blízkosti v prostoru a FRs vytváří spolu s třemi CDRs místo, které váže antigen.

Na základě těchto skutečností, upravením aminokyselinové sekvence myší monoklonální protilátky proti lidskému TF podle databáze aminokyselinových sekvencí protilátek vytvořených Kabatem („Sequence of Proteins of Immunological Interest“, US Dept. Health and Human Services, 1983), může být testována její homologie a tedy je možno nalézt CDRs.

Sekvence CDRs pozměněné inzercí, substitucí nebo delecí mohou být do předloženého vynálezu zahrnuty, pokud si podrží aktivitu vazby na lidský TF nebo schopnost neutralizovat lidský TF, když je pomocí nich vytvořena zušlechtěná protilátka. Například je možno zmínit takové, které mají homologii 90 až 100% s každou CDRs pro SEQ ID NO: 133 až 138 nebo s každou CDRs v oblasti V se SEQ ID NO: 139 až 141, 143 až 144, 145 až 147 a 149 až 150.

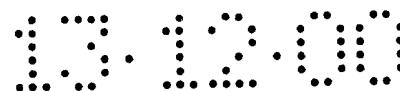
Jako výhodné je možno zmínit ty sekvence, které mají homologii 95 až 100%. Jako ještě výhodnější je možno zmínit ty sekvence, které mají homologii 98 až 100%.

### 3. Příprava expresního vektoru chimerní protilátky

Jakmile byly DNA fragmenty kódující myší L řetězec (L řetězec nebo H řetězec protilátky může zde být označen jako „myší L řetězec“ pro myší protilátku a „lidský H řetězec“ pro H řetězec lidské protilátky) a myší V oblast H řetězce jednou klonovány, DNA kódující myší V oblast je ligována do DNA kódující konstantní oblast lidské protilátky a exprimována, aby byla získána chimerní protilátka proti lidskému TF.

Základní metody pro přípravu chimerní protilátky zahrnují spojení myší leader sekvence a sekvence V oblasti v klonované cDNA k sekvenci, kódující konstantní oblast lidské protilátky, již v expresním vektoru pro savčí buňky. Alternativní možností je vazba myší leader sekvence a sekvence V oblasti v klonované cDNA k sekvenci, kódující C oblast lidské protilátky a potom její připojení do expresního vektoru pro savčí buňky.

Fragmenty C oblasti lidské protilátky mohou být fragment z C oblasti H řetězce a C oblasti L řetězce kterékoli lidské protilátky. Například je možno zmínit cy1, cy2, cy3



nebo cy4, jako ty které pocházejí z C oblasti H řetězce a cλ nebo ck jako ty, které pocházejí z L oblasti H řetězce.

Pro přípravu chimerní protilátky je připraven expresní vektor obsahující DNA kódující V oblast myšího H řetězce a C oblast H řetězce, pod kontrolou oblasti regulující expresi, jako je systém zesilovač transkripce/promotor, a jednoduchý expresní vektor (viz např. WO 94/11523), obsahující DNA kódující V oblast myšího L řetězce a C oblast L řetězce, pod kontrolou oblasti regulující expresi, jako je systém zesilovač transkripce/promotor. Poté je expresní vektor použit ke kotransformaci hostitelské buňky, jako je savčí buňka, a transformované buňky jsou kultivovány in vitro nebo in vivo pro produkci chimerní protilátky (viz například WO 91/16928). jako jednoduché vektory lze použít expresní vektor N5KG1(V) pro protilátku typu IgG1k a expresní vektor N5KG4P pro protilátku typu IgG4k.

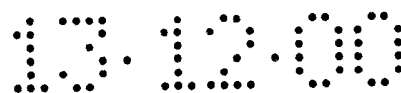
(i) Konstrukce H řetězce chimerní protilátky

Expresní vektor pro H řetězec chimerní protilátky je možno získat vnesením cDNA kódující V oblast myšího H řetězce do vhodného expresního vektoru, který obsahuje DNA kódující C oblast H řetězce lidské protilátky. Jako C oblast H řetězce je možno uvést například oblasti Cy1, Cy2, Cy3 nebo Cy4.

Jak je to prováděno zde, aby došlo ke vnesení cDNA kódující V oblast myšího H řetězce do expresního vektoru, může být do uvedené cDNA vnesena pomocí PCR metody vhodná nukleotidová sekvence. Například taková vhodná nukleotidová sekvence může být vnesena do expresního vektoru tak, že je provedena PCR za pomoci PCR primerů navržených tak, abychom měli rozpoznávací sekvenci vhodného restričního enzymu na 5'-konci uvedené cDNA a pro zvýšení účinnosti transkripce bezprostředně před iniciačním místem uvedené cDNA Kozakovu konsensuální sekvenci (Kozak, M. a kol., J. Mol. Biol. 196: 947-950, 1987) a PCR primerů navržených tak, abychom měli rozpoznávací sekvenci vhodného restričního enzymu na 3'-konci uvedené cDNA.

Po opracování takto konstruované cDNA, kódující v oblast myšího H řetězce vhodným restričním enzymem, je tato vložena do výše uvedeného a potom je zkonstruován expresní vektor pro chimerní H řetězec, který obsahuje DNA kódující C oblast (Cy1 nebo Cy4) H řetězce.

(ii) Konstrukce expresního vektoru, který obsahuje cDNA kódující k řetězec L řetězce chimerní protilátky



Expresní vektor pro L řetězec chimerní protilátky je možno získat vnesením cDNA kódující V oblast myšího L řetězce do vhodného expresního vektoru, který obsahuje DNA kódující C oblast L řetězce lidské protilátky. Jako C oblast L řetězce je možno uvést například oblasti C $\kappa$  a C $\lambda$ .

Jak je to prováděno zde, aby byl zkonstruován expresní vektor obsahující cDNA kódující V oblast myšího L řetězce, může být do uvedené cDNA vnesena pomocí PCR metody vhodná nukleotidová sekvence. Například taková vhodná nukleotidová sekvence může být vnesena do uvedené cDNA tak, že je provedena PCR za pomoci PCR primerů navržených tak, abychom měli rozpoznávací sekvenci vhodného restrikčního enzymu na 5'-konci uvedené cDNA a pro zvýšení účinnosti transkripce Kozakovu konsensuální sekvenci, a PCR primerů navržených tak, abychom měli rozpoznávací sekvenci vhodného restrikčního enzymu na 3'-konci uvedené cDNA.

Po opracování takto konstruované cDNA, kódující v oblast myšího L řetězce vhodným restrikčním enzymem, je tato vložena do výše uvedeného a potom je zkonstruován expresní vektor pro chimerní L řetězec, který obsahuje DNA kódující C oblast (C $\kappa$ ) L řetězce.

#### 4. Příprava zušlechtěných protilátek

##### (1) Vyhledávání homologie lidských protilátek

Aby byla vytvořena zušlechtěná protilátka v níž jsou CDRs z myší monoklonální protilátky zabudovány do lidské protilátky, je výhodná vysoká homologie mezi FRs myší monoklonální protilátky a FRs lidské protilátky. Tedy V oblasti H řetězce a L řetězce myší monoklonální protilátky proti lidskému TF jsou porovnány s V oblastí všech známých protilátek, jejichž struktura byla publikována pomocí Databanky. Současně jsou porovnávány s podskupinami lidských protilátek (HSG: lidská podskupina) (Kabat, E. A. a kol., „Sequence of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1983) klasifikovanými Kabat a kol., na základě délky FR a homologie aminokyselin.

Na základě HSG klasifikace podle Kabat a kol., V oblasti lidského H řetězce mohou být seskupeny do skupin HSGI až III; například V oblast H řetězce myší monoklonální protilátky ATR-5 proti lidskému TF má homologii 67,8% s konsensuální sekvencí HSGI. Na druhé straně V oblasti lidských  $\kappa$  forem L řetězců mohou být seskupeny do skupin HSGI až IV; například V oblast  $\kappa$  formy L řetězce myší

monoklonální protilátky ATR-5 proti lidskému TF má homologii 72,3% s konsenzuální sekvencí HSGI.

Pokud je myší protilátka zušlechťována běžnou technologií, aminokyselinová sekvence některých FRs V oblasti myší protilátky, které podporují CDR, mohou být pokud je to žádoucí, vneseny do FR v lidské V oblasti, takže struktura CDR zušlechtěné V oblasti může přesněji napodobovat CDR strukturu původní myší protilátky. Avšak neexistují pevná pravidla které aminokyseliny FR V oblasti myší protilátky mají být vneseny do FR v lidské protilátce. Proto je tedy vyžadováno velké množství práce pro určení aminokyselin, které jsou podstatné pro zachování struktury CDR.

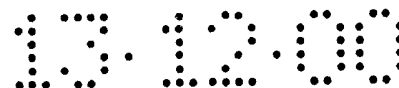
Také existuje riziko, že může vzniknout lidská protilátka proti aminokyselinové sekvenci vnesené do lidské V oblasti z V oblasti myší protilátky. Podle předloženého vynálezu, aby byly v zušlechtěné protilátce změněny všechny aminokyselinové sekvence kromě CDR na aminokyselinové sekvence odvozené z lidské protilátky, byly v lidské protilátce vyhledány takové FRs, které mají vysokou homologii s FR myších protilátek, přítomných v databázi, s jednou FR jako jednotkou, pro čtyři FRs (FR1 až 4), které jsou vyžadovány pro zachování trojrozměrné struktury CDR. Následuje výsledek vyhledávání homologie v databázi pro každou FR V oblasti H řetězce a V oblasti L řetězce monoklonální protilátky ATR-5.

Tabulka 1

Číslo FR	Přístupové číslo	Homologie s každou FR V oblasti H řetězce myší protilátky (%)	SEQ ID NO:
H řetězec FR1	L39130	53,0	110
H řetězec FR2	L39130	92,9	111
	P01742	71,4	112
	Z80844	78,6	113
H řetězec FR3	L39130	62,5	114
	Z34963	71,9	115
	P01825	53,1	116
	M62723	68,8	117
	Z80844	68,8	118
	L04345	65,6	119
	S78322	75,0	120
	Z26827	56,3	121
	U95239	65,6	122
	L03147	65,6	123
H řetězec FR4	L39130	90,9	124

Tabulka 2

Číslo FR	Přístupové číslo	Homologie s každou FR V oblasti L řetězce myší protilátky (%)	SEQ ID NO:
L řetězec FR1	Z37332	78,3	1250
L řetězec FR2	Z37332	80,0	126
	S65921	80,0	127
	X93625	80,0	128
L řetězec FR3	Z37332	71,9	129
	S68699	75,0	130
	P01607	71,9	131
L řetězec FR4	Z37332	90,0	132



## (2) Navrhování DNA kódující V oblast zušlechtěné protilátky

Prvním krokem při navrhování DNA kódující V oblast zušlechtěné protilátky je vybrat každou FR V oblasti lidské protilátky, které jsou pak základem návrhu. Pro záměny FR je potřeba pro každou FR vybrat vysoce variabilní FR V oblasti lidské protilátky.

Pro monoklonální protilátku ATR-3, která je předmětem tohoto vynálezu, byly na základě průzkumu homologie mezi V oblastmi H řetězce všech myších protilátek a každou FR H řetězce, vybrány tři FRs V oblasti pro FR2 a 10 pro FR3. Pro L řetězec mohou být na základě průzkumu homologie mezi V oblastmi L řetězce myších protilátek a každou FR H řetězce vybrány tři FRs V oblasti lidské protilátky pro FR2 a 3 pro FR3.

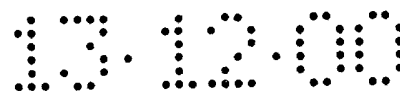
Pro obě zušlechtěné V oblasti H řetězce a L řetězce je možno vybrat V oblasti L řetězce L39130 a Z37332, které mají vysokou homologii s V oblastmi H řetězce, respektive L řetězce myší protilátky ATR-5. Aby bylo umožněno snadné zaměňování při vytváření zušlechtěných protilátek, je možné navrhnout vhodná rozpoznávací místa pro restrikční enzymy na vhodných místech v každé CDR a FR. Při tomto postupu může být snadno zaměněna pouze jedna z FRs.

Příklady takových míst jsou např. rozpoznávací místo restrikčního enzymu EcoT22I v zušlechtěném H řetězci CDR1, rozpoznávací místo restrikčního enzymu Ball v CDR2, rozpoznávací místo restrikčního enzymu NcoI v CDR3 a rozpoznávací místo restrikčního enzymu XhoI ve FR3, například rozpoznávací místo restrikčního enzymu AflIII v zušlechtěném L řetězci CDR1, rozpoznávací místo restrikčního enzymu SpeI v CDR2, rozpoznávací místo restrikčního enzymu PstI v CDR3 a rozpoznávací místo restrikčního enzymu AccIII ve FR3.

Na základě takto navržené verze může být provedena záměna pro každou FR, aby byla získána zušlechtěná protilátka, která má požadovanou aktivitu.

## (3) Příprava fragmentu V oblasti zušlechtěné protilátky

Zušlechtěná protilátka, která je předmětem tohoto vynálezu je ta, kdy FRs C oblasti a V oblasti uvedené protilátky jsou odvozeny z lidské protilátky a CDR V oblasti je odvozena z myší protilátky. Fragmenty V oblasti zušlechtěné protilátky, která je předmětem tohoto vynálezu, mohou být, pokud jsou dostupné DNA fragmenty lidské protilátky, připraveny metodou nazývanou „přenos CDR“ pomocí PCR metody. Jak je užívána zde, je „přenos CDR“ metoda, v níž je vytvořen DNA fragment kódující CDR myší protilátky, který je zaměněn za CDR lidské protilátky jako matrici.



Když nejsou k dispozici DNA fragmenty lidské protilátky jako matrice, nukleotidové sekvence zaznamenané v databázi mohou být syntetizovány pomocí DNA syntetizátoru a V oblast zušlechtěné protilátky může být vytvořena pomocí metody PCR. Dále, pokud je v databázi zaznamenána pouze aminokyselinová sekvence, úplná nukleotidová sekvence může být dedukována na základě aminokyselinové sekvence a na frekvenci kodonů, použitých v protilátkách, jak je publikováno v Kabat E. A. a kol. (US Dep. Health and Human Services, US Government Printing Offices, 1991). Nukleotidová sekvence může být syntetizována pomocí DNA syntetizátoru a fragmenty V oblasti zušlechtěné protilátky mohou být vytvořeny pomocí metody PCR.

(i) Konstrukce DNA a expresního vektoru, kódujícího V oblast zušlechtěného H řetězce

Podle předloženého vynálezu může být DNA kódující V oblast zušlechtěného H řetězce konstruována tak, že je získán gen, kódující V oblast H řetězce lidské protilátky, který bude použit jako matrice, poté je syntetizována úplná nukleotidová sekvence DNA kódující kódující V oblast zušlechtěného H řetězce pomocí DNA syntetizátoru a následuje použití PCR metody. Například protilátka L39130, která má vysokou homologii s V oblastí H řetězce myší monoklonální protilátky ATR-5 proti lidskému TF, může být vytvořena jako zušlechtěná V oblast H řetězce verze „a“. Například aby byla vytvořena zušlechtěná V oblast H řetězce verze „a“, je odděleně použito 5 primerů, které jsou uvedeny v SEQ ID NOs: 22 až 26 a dva vnější primery, které jsou uvedeny v SEQ ID NOs: 27 a 28.

Primery pro přenos CDR hR5Hv1s (SEQ ID NO: 22), hR5Hv2s (SEQ ID NO: 23) a hR5Hv4s (SEQ ID NO: 24) mají směr DNA sekvence proti směru přepisu a primery pro přenos CDR hR5Hv3A (SEQ ID NO: 25) a hR5Hv5A (SEQ ID NO: 26) mají směr DNA sekvence po směru přepisu a každý z nich má 18 až 35 bází komplementární sekvence na obou koncích primeru. Primer hR5Hv1S je navržen tak, aby měl Kozakovu konsenzuální sekvenci (Kozak, M. a kol., J. Mol. Biol. 196: 947-950, 1987) a rozpoznávací místo pro Sall a hR5Hv5A je navržen tak, aby měl rozpoznávací místo pro NheI. Vnější primery hR5HvPrS (SEQ ID NO: 27) a hR5HvPrA (SEQ ID NO: 28) jsou také homologické s primery pro přenos CDR hR5Hv1s a hR5Hv5A.

Za použití PCR metody je 5 primerů sestaveno tak, aby syntetizovaly cDNA o plné délce a po přidání vnějšího primeru je tato DNA amplifikována. Sestavení pomocí PCR metody, které je zde použito znamená, že hR5Hv1s, hR5Hv2s, hR5Hv4s,





hR5Hv3A a hR5Hv5A jsou teplotně hybridizovány svými komplementárními sekvencemi a je syntetizována DNA V oblasti H řetězce o plné délce.

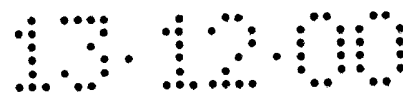
C oblastí H řetězce lidské protilátky může být jakákoli C oblast lidského H řetězce a jako příklad je možno zmínit lidské H řetězce Cy1, Cy2, Cy3 nebo Cy4.

DNA V oblasti H řetězce zušlechtěné protilátky, konstruovaná jak je popsáno výše, může být připojena k DNA C oblasti H řetězce kterékoli lidské protilátky, například C oblastí lidského H řetězce Cy1 nebo Cy4. Jak je popsáno v konstrukci H řetězce chimerní protilátky, po opracování vhodným restriktivním enzymem je připojena k DNA kódující C oblast lidského H řetězce pod kontrolou expresně regulační oblasti, jako je systém zesilovač transkripce/promotor, čímž je vytvořen expresní vektor obsahující DNA zušlechtěné V oblasti H řetězce a C oblast lidského H řetězce.

(ii) Konstrukce DNA a expresního vektoru, kódujícího V oblast zušlechtěného L řetězce

Jako v případě DNA kódující V oblast zušlechtěného H řetězce, může být podle předloženého vynálezu DNA kódující V oblast zušlechtěného L řetězce konstruována tak, že je získán gen L řetězce lidské protilátky, který bude použit jako matrice a poté syntetizována úplná nukleotidová sekvence DNA kódující V oblast zušlechtěného L řetězce pomocí DNA syntetizátoru a následovně PCR metodou. Například protilátka Z37332, která má vysokou homologii s V oblastí L řetězce myší monoklonální protilátky ATR-5 proti lidskému TF, může být vytvořena jako zušlechtěná V oblast L řetězce verze „a“.

Například aby byla vytvořena zušlechtěná V oblast L řetězce verze „a“, primery pro přenos CDR h5Lv1S (SEQ ID NO: 85) a h5Lv4S (SEQ ID NO: 86) mají směr DNA sekvence proti směru přepisu a primery pro přenos CDR h5Lv2A (SEQ ID NO: 87), h5Lv3A (SEQ ID NO: 88) a h5Lv5A (SEQ ID NO: 89) mají směr DNA sekvence po směru přepisu a každý z nich má 18 až 35 bází komplementární sekvence na obou koncích primeru. Primer h5Lv1S je navržen tak, aby měl Kozakovu konsenzuální sekvenci (Kozak, M. a kol., J. Mol. Biol. 196: 947-950, 1987) a rozpoznávací místo pro restriktivní enzym BglII a h5Lv5A je také navržen tak, aby měl rozpoznávací místo pro restriktivní enzym SphI. Vnější primery h5LvS (SEQ ID NO: 90) a h5LvA (SEQ ID NO: 91) jsou také homologické s primery pro přenos CDR h5Lv1s a h5Lv5A.



Jako u zušlechtěné V oblasti H řetězce je za použití PCR metody sestaveno 5 primerů tak, aby syntetizovaly cDNA o plné délce a po přidání vnějšího primeru může být tato DNA amplifikována.

C oblastí L řetězce lidské protilátky může být jakákoli C oblast lidského L řetězce a jako příklad je možno zmínit lidský L řetězec C $\lambda$  a C $\kappa$ .

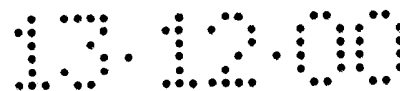
DNA V oblasti L řetězce zušlechtěné protilátky, konstruovaná jak je popsáno výše, může být připojena k DNA C oblasti L řetězce kterékoli lidské protilátky, například odvozené z oblastí C $\kappa$  nebo C $\lambda$  lidského L řetězce. Po opracování vhodným restričním enzymem je připojena k DNA kódující C oblast lidského L řetězce pod kontrolou expresně regulační oblasti, jako je systém zesilovač transkripce/promotor, čímž je vytvořen expresní vektor obsahující DNA zušlechtěné V oblasti L řetězce a k řetězec C oblasti lidského L řetězce.

I když je fragment V oblasti zušlechtěné protilátky vytvořen tak jak bylo výše popsáno, není vždy jasné, zda uvedený fragment V oblasti bude mít protilátkovou aktivitu (tj. schopnost vázat antigen, schopnost neutralizovat antigen atd.) Je tedy nezbytné zkoumat přítomnost aktivity tak, že je spojen se zušlechtěným H řetězcem a exprimován v živočišných buňkách jako jsou buňky COS-7.

### (iii) Záměna FR V oblasti H řetězce a L řetězce zušlechtěné protilátky

Autoři předloženého vynálezu provedli v živočišných buňkách, jako jsou buňky COS-7, přechodnou expresi zušlechtěné protilátky, která obsahovala zušlechtěnou V oblast H řetězce a L řetězce, aby prozkoumali vazebnou a neutralizační schopnost antigenu a zjistili, že antigen má vazebnou a neutralizační schopnost, ale že aktivita není dostatečná ve srovnání s chimerní protilátkou.

Autoři předloženého vynálezu mohou rozřešit tento problém postupnou záměnou každé FR zušlechtěné V oblasti H řetězce a L řetězce. Protilátky použité při zaměňování FR mohou být vybrány z existujících databází. FR z vybrané lidské protilátky může být syntetizována na základě nukleotidové sekvence uvedené v databázích, pomocí DNA syntetizátoru. Současně, jak je zmíněno výše, mohou být pomocí přidání navržených rozpoznávacích sekvencí restričních enzymů k CDR nebo FR, snadno zaměněny za FR V oblasti H řetězce a L řetězce zušlechtěné protilátky, vytvořené jak bylo popsáno výše. Zkoumáním aktivity takto vytvořené zušlechtěné protilátky může být získána zušlechtěná protilátka, která má vazebnou aktivitu pro antigen a neutralizační aktivitu.



Například FR3 V oblasti H řetězce zušlechtěné protilátky může být zaměněna za FR3, odvozenou z lidské protilátky Z34963 (GenBank, Borrentzen M. a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 12917-12921, 1994).

FR zaměňující primer F3RFFS (SEQ ID NO: 35) a F3RFBS (SEQ ID NO: 36) mají směr DNA sekvence proti směru přepisu a F3RFFA (SEQ ID NO: 37) a F3RFBA (SEQ ID NO: 38) mají směr DNA sekvence po směru přepisu. FR zaměňující primery F3RFFS, F3RFBS, F3RFFA a F3RFBA mohou být syntetizovány pomocí DNA syntetizátoru.

F3RFFS a F3RFBS, a F3RFFA a F3RFBA byly teplotně hybridizovány a vzniklé produkty byly štěpeny Ball a XhoI, respektive NcoI a XhoI. Poté byly vneseny do plazmidu hATR5Hva/CVIDEC (Ball/XhoI), připraveného štěpením pomocí Ball a XhoI a potvrzením jeho nukleotidové sekvence byl získán plazmid, který má správnou sekvenci. Takto získaný plazmid obsahující H řetězec zušlechtěné protilátky byl označen jako hATR5Hvb/CVIDEC a zušlechtěný H řetězec, obsažený v plazmidu byl označen jako verze „b“. Nukleotidová sekvence a odpovídající aminokyselinová sekvence jsou uvedeny v SEQ ID NO: 39 a aminokyselinová sekvence verze „b“ je uvedena v SEQ ID NO: 40.

Podobným způsobem může také být zaměněna FR odvozená z V oblasti H řetězce a L řetězce jiné lidské protilátky vybrané z databáze, za FR V oblasti H řetězce a L řetězce zušlechtěné lidské protilátky.

Aby byla vybrána výhodnější lidská protilátka pro záměnu FR z V oblasti H řetězce a L řetězce zušlechtěné lidské protilátky, je možno provést následující. Kombinace verze „b“ H řetězce zušlechtěné protilátky a L řetězce chimerní protilátky má neutralizační aktivitu rovnající se neutralizační aktivitě chimerní protilátky nebo myší protilátky. Avšak kombinace verze „b“ H řetězce zušlechtěné protilátky a verze „a“ L řetězce zušlechtěné protilátky má neutralizační aktivitu nižší, než je neutralizační aktivita chimerní protilátky nebo myší protilátky.

V takových případech aby se vybrala lidská protilátka, která by mohla být kandidátem pro záměnu FR, může být proveden průzkum homologie, například pro FR3 (přístupové číslo Z34963: SEQ ID NO: 115) verze „b“ H řetězce zušlechtěné protilátky a může být získána lidská protilátka, která má vysokou homologii s touto sekvencí. Jako příklad V oblasti H řetězce FR3 takto vybrané lidské protilátky je možno uvést U95239 (SEQ ID NO: 122) a L03147 (SEQ ID NO: 123).

Aminokyselinové sekvence takto připravené V oblasti H řetězce zušlechtěné protilátky jsou uvedeny v tabulce 3 a 4, a aminokyselinová sekvence V oblasti L řetězce zušlechtěné protilátky je uvedena v tabulce 5.

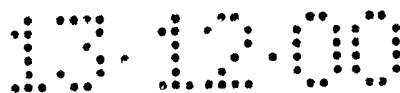
Tabulka 3  
 Aminokyselínové sekvence V oblasti H řetězce

	FRI			CDR1	FR2	CDR2		
	1	2	3			4	5	6
L39130(a)	123456789012345678901234567890	12345678901234567890	12345678901234567890	12345678901234567890	012A3456789012345			
Z34963(b)	QVQLLESGAVLARPGTSVKISCKASGFNIK	DYYMH	WVKQRPGQGLEBWIG	GNDPANGHSMYDPKFKQG				
M30885(c)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M62723(d)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Z80844(e)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
L04345(f)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S78322(g)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Z26827(h)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
U95239(i)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
L03147(j)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
P01742(b1)	-----	-----	-----	-----	-----R-A-----	-----M-----	-----	-----
P01742(d1)	-----	-----	-----	-----	-----R-A-----	-----M-----	-----	-----
Z80844(b3)	-----	-----	-----	-----	-----R-A-----	-----	-----	-----
Z80844(d3)	-----	-----	-----	-----	-----R-A-----	-----	-----	-----



Tabulka 4  
 Aminokyselínové sekvence v oblasti H řetězce (pokračování)

	7	8	9	10	11
	FR3			CDR3	FR4
	67890123456789012ABC345678901234	56789012	34567890123	56789012	34567890123
L39130(a)	RAKLTAATSASIAYLEFFSSLTNE	DSAVYYCAR	DSGYAMDY	WGQGTL	VTVSS
Z34963(b)	-VTI--D--TNT--M-L--RS--T-I-				
M30885(c)	-VTMLVD--KNQFS-RL--V-AA-T-				
M62723(d)	-VTI--DE-T-T--M-L--RS--F--				
Z80844(e)	-VSI--DE-TK--M-LN--RS--T--F--				
L04345(f)	-VTI--DT-T-T--M-LR--RSD-T-				
S78322(g)	K-T---DE-S-T--MQL--RS--S--				
Z26827(h)	-VTMS-DK-S-A---QWT--KAS-T-I-F--				
U95239(i)	-VTI--D--T-TVFM-L--RS--T--				
L03147(j)	-VTF--D---NT--M-LR--RSA-T-				
P01742(b1)	-VTI--D--TNT--M-L--RS--T-I-				
P01742(d1)	-VTI--DE-T-T--M-L--RS--F--				
Z80844(b3)	-VTI--D--TNT--M-L--RS--T-I-				
Z80844(d3)	-VTI--DE-T-T--M-L--RS--F--				

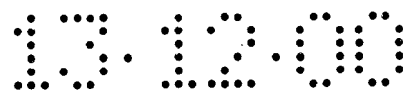


Tabulka 5  
Aminokyselinové sekvence V oblasti L řetězce

	FR1		CDR1	FR2		CDR2
	1	2	3	4	5	
	12345678901234567890123	45678901234	5678901234	567890123456789	0123456	
Z37332(a)	DIQMTQSPSSLSASV	GDRVTITC	KASQDIKSFLS	WYQQKPGKAPKLLIY	YATSLAD	
S68699(b)	-----	-----	-----	-----	-----	
P01607(c)	-----	-----	-----	-----	-----	
S65921(b1)	-----	-----	-----	-F-----S--T--	-----	
X93625(b2)	-----	-----	-----	-----E--S--	-----	

	FR3			CDR3	FR4	
	6	7	8	9	10	
	78901234567890123456789012345678	901234567	8901234567			
Z37332(a)	GVPSRFSGSGSGTDF	TLTISSLPEDFATYYC	LQHGESPYT	FGG	TKVEIK	
S68699(b)	-----	-----Y-----	-----	-----	-----	
P01607(c)	-----	-----Y-----	-----I-----	-----	-----	
S65921(b1)	-----	-----Y-----	-----	-----	-----	
X93625(b2)	-----	-----Y-----	-----	-----	-----	



Každá verze V oblasti H řetězce a L řetězce takto konstruované zušlechtěné protilátky může být připojena k DNA kterékoli C oblasti lidského H řetězce nebo C oblasti L řetězce, například k oblasti Cy4 lidského H řetězce nebo oblasti Ck lidského L řetězce. Po opracování vhodným restrikcčním enzymem je připojena k DNA kódující Cy4 oblast lidského H řetězce a Ck oblast lidského L řetězce pod kontrolu expresně regulační oblasti, jako je systém zesilovač transkripce/promotor, čímž je vytvořen expresní vektor kódující obě verze DNA zušlechtěné V oblasti H řetězce a L řetězce a DNA kódující oblast Cy4 lidského H řetězce a oblast Ck lidského L řetězce.

DNA kódující V oblast H řetězce zušlechtěné protilátky a C oblast lidského H řetězce, konstruovaná jak bylo uvedeno výše a DNA kódující zušlechtěnou V oblast L řetězce a C oblast lidského L řetězce jsou vneseny do jednoho vektoru (viz například WO/11523) a poté je uvedený vektor použit pro transformaci hostitelských buněk. Pak mohou být transformované buňky kultivovány in vivo nebo in vitro, aby produkovaly požadovanou protilátku.

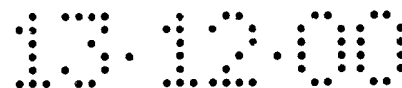
#### 5. Produkce chimerní protilátky a zušlechtěné protilátky

Aby byla produkována chimerní protilátka nebo zušlechtěná protilátka, může být DNA kódující V oblast H řetězce a C oblast H řetězce a DNA kódující V oblast L řetězce a C oblast L řetězce připojeny do jednoho vektoru, který je transformován do vhodných hostitelských buněk, které pak protilátku produkují. Tedy pro expresi chimerní protilátky je DNA kódující myší leader sekvenci v klonované cDNA a V oblast myšího H řetězce a C oblast lidského H řetězce a DNA kódující myší leader sekvenci a V oblast myšího L řetězce a C oblast lidského H řetězce jsou vneseny do jednoho vektoru (viz například WO/11523) pod kontrolu expresně regulační oblasti, jako je např. systém zesilovač transkripce/promotor.

Pro expresi zušlechtěné protilátky je DNA kódující V oblast zušlechtěného H řetězce a C oblast lidského H řetězce a DNA kódující V oblast zušlechtěného L řetězce a C oblast lidského H řetězce vneseny do jednoho expresního vektoru (viz například WO/11523) pod kontrolu expresně regulační oblasti, jako je např. systém zesilovač transkripce/promotor. Tyto vektory jsou použity pro transformaci hostitelských buněk. Pak mohou být transformované buňky kultivovány in vivo nebo in vitro, a tímto způsobem může být produkována chimerní nebo zušlechtěná protilátka.

Také mohou být vytvořeny dva expresní vektory, přičemž každý obsahuje V oblast H řetězce a V oblast L řetězce. Tedy pro chimerní protilátku jsou vytvořeny dva





expresní vektory, kdy jeden obsahuje DNA kódující V oblast myšího H řetězce a C oblast lidského H řetězce pod kontrolou systému zesilovač transkripce/promotor a druhý expresní vektor obsahuje DNA kódující V oblast myšího L řetězce a C oblast lidského L řetězce pod kontrolou systému zesilovač transkripce/promotor, a pro zušlechtěnou protilátku jsou vytvořeny dva expresní vektory, kdy jeden obsahuje DNA kódující V oblast zušlechtěného H řetězce a C oblast lidského H řetězce pod kontrolou systému zesilovač transkripce/promotor a druhý expresní vektor obsahuje DNA kódující V oblast zušlechtěného L řetězce a C oblast lidského L řetězce pod kontrolou systému zesilovač transkripce/promotor.

Jinou možností pro chimerní protilátku je vytvořit expresní vektor který obsahuje DNA kódující V oblast myšího H řetězce a C oblast lidského H řetězce a DNA kódující V oblast myšího L řetězce a C oblast lidského L řetězce pod kontrolu expresně regulační oblasti, jako je např. systém zesilovač transkripce/promotor, a pro zušlechtěnou protilátku je vytvořit expresní vektor který obsahuje DNA kódující V oblast zušlechtěného H řetězce a C oblast lidského H řetězce a DNA kódující V oblast zušlechtěného L řetězce a C oblast lidského L řetězce pod kontrolu expresně regulační oblasti, jako je např. systém zesilovač transkripce/promotor.

Tyto expresní vektory jsou potom použity pro kotransformaci hostitelských buněk, jako jsou savčí buňky a transformované buňky jsou kultivovány in vivo nebo in vitro pro produkci chimerní nebo zušlechtěné protilátky (viz například WO 91/16928).

Jak je zde výše uvedeno, transformant transformovaný genem, kódujícím požadovanou chimerní protilátku nebo zušlechtěnou protilátku je kultivován a produkována chimerní protilátka nebo zušlechtěná protilátka může být oddělena zevnitř buněk nebo z vnějšího prostředí okolo buněk a purifikována do homogenního stavu.

Izolace anebo purifikace chimerní protilátky nebo zušlechtěné protilátky, nebo požadovaného proteinu, který je předmětem tohoto vynálezu, může být provedena pomocí sloupce Sepharosy s Proteinem A. Jinými metodami jsou mimo jiné separační anebo purifikační metody používané pro běžné proteiny. Například chimerní protilátka nebo zušlechtěná protilátka může být izolována anebo purifikována vhodným spojením různých chromatografických metod, ultracentrifugace, vysolování, dialýzy a podobně.

Pro produkci chimerní protilátky nebo zušlechtěné protilátky proti lidskému TF, která je předmětem tohoto vynálezu, může být používán kterýkoli expresní systém. Když jsou například používány eukaryotické buňky, mohou to být buňky živočišné

(například udržované linie savčích buněk), buňky hub nebo buňky kvasinek, když jsou používány prokaryotické buňky, mohou to být buňky bakteriální (jako jsou buňky *Escherichia coli*). S výhodou je chimerní protilátka nebo zušlechtěná protilátka, která je předmětem tohoto vynálezu, exprimována v savčích buňkách, jako jsou buňky COS nebi buňky CHO.

V těchto případech mohou být pro expresi v savčích buňkách použity vhodné běžné promotory. Například je s výhodou používán bezprostředně časný promotor lidského cytomegaloviru (HCMV). Příklady expresních vektorů, které obsahují HCMV promotor zahrnují HCMV-VH-HC $\gamma$ 1, HCMV-VL-HC $\kappa$  a podobně, a dále ty, které jsou odvozeny od pSV2neo (WO 92-19759).

Jiné promotory pro expresi genů v savčích buňkách, které mohou být použity v předloženém vynálezu zahrnují virové promotory, jako jsou promotory retroviru, polyomaviru, adenoviru a opičího viru 40 (SV40) a promotory odvozené ze savčích buněk, jako je lidský faktor 1 $\alpha$  pro prodlužování polypeptidového řetězce (HEF1 $\alpha$ ). Exprese může být například snadno dosaženo pomocí metody Mulligan a kol., (Nature (1979) 277: 108), kde je použit promotor SV40, nebo pomocí metody Mizushima a kol., (Nucleic Acids Res. (1990) 18: 5322), kde je použit promotor HEF1 $\alpha$ .

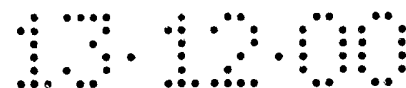
Jako počátky replikace mohou být použity ty, které jsou odvozeny z SV40, polyomaviru, adenoviru, hovězího papilomaviru (BPV) a podobně. Navíc pro zmnožení počtu genových kopií v systému hostitelské buňky mohou expresní vektory obsahovat selektovatelné markery jako jsou gen pro fosforybosltransferázu APH (3') II nebo I (neo), gen pro thymidinkinázu (TK) gen pro xanthinguaninfosforybosltransferázu (Ecogpt) *Escherichia coli*, gen pro dihydrofolátreduktázu (dhfr) a podobně.

## 6. Hodnocení vazebné aktivity k antigenu a neutralizační aktivity chimerní protilátky a zušlechtěné protilátky

### (1) Měření koncentrace protilátky pomocí testu ELISA

Koncentrace získané purifikované protilátky může být měřena pomocí testu ELISA.

ELISA destičky pro měření koncentrace protilátky mohou být připraveny následujícím způsobem: v každé jamce 96-jamkové destičky (například Maxisorp, NUNC) je imobilizováno 100  $\mu$ l kozí protilátky proti lidskému IgG $\gamma$  (BioSource), připravené v koncentraci 1  $\mu$ g/ml.



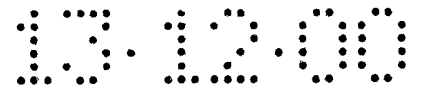
Po blokování pomocí 200  $\mu$ l ředěného pufru (zde označován jako DB; 50 mM Tris-HCl, 1 mM  $MgCl_2$ , 0,15 M NaCl, 0,05% Tween 20, 0,02%  $NaN_3$ , 1% hovězí sérumalbumin (BSA), pH 7,2), jsou ke každé jamce přidány supernatanty z kultur buněk COS-7 nebo buněk CHO, v nichž byla exprimována chimerní protilátka nebo zušlechtěná protilátka, nebo je purifikovaná chimerní protilátka nebo zušlechtěná protilátka sériově ředěna a poté přidána do každé jamky. Potom je přidáno 100  $\mu$ l kozí protilátky proti lidskému IgG, konjugované s alkalickou fosfatázou, dále je přidáno 100  $\mu$ l roztoku substrátu o koncentraci 1 mg/ml (Sigma104, p-nitrofenylfosfát, SIGMA) a nakonec je měřena absorbance 405/655 nm pomocí odečítacího zařízení pro mikrodestičky Microplate Reader (Bio Rad). Jako standard pro měření koncentrace byl použit lidský IgG4k (The Binding Site).

### (2) Měření vazebné aktivity k antigenu

Destičky buněčného ELISA testu pro měření vazebné aktivity k antigenu jsou připraveny následujícím způsobem: buňky lidského karcinomu močového měchýře J82 (ATCC HTB-1) jsou naočkovány do 60 jamek 96-jamkové destičky pro pěstování buněčných kultur v koncentraci  $1 \times 10^5$  buněk. Toto je kultivováno (médiem RPMI1640 obsahující 10 % fetálního hovězího séra (GIBCO)) jeden den v  $CO_2$  inkubátoru, aby bylo buňkám umožněno se uchytit. Po odstranění kultivačního média je každá jamka dvakrát promyta 300  $\mu$ l PBS. Poté je přidáno ke každé jamce 100  $\mu$ l PBS, obsahujícího 4% paraformaldehyd (tento pufr je zde označován PFA/PBS) a umístěno na led po dobu 10 minut, aby došlo k imobilizaci buněk.

PFA/PBS je odstraněn a každá jamka je dvakrát promyta 300  $\mu$ l PBS a poté blokována 250  $\mu$ l DB. 100  $\mu$ l supernatantů z kultur, obsahujících chimerní protilátku nebo zušlechtěnou protilátku nebo purifikovanou chimerní protilátku nebo sériově ředěné zušlechtěné protilátky, je přidáno do každé jamky a inkubováno při teplotě místnosti po dobu 2 hodin. Po promytí oplachovacím pufrem (zde je označován jako RB PBS, obsahující 0,05 % Tweenu 20) je přidáno 100  $\mu$ l kozí protilátky proti lidskému IgG<sub>y</sub>, konjugovaná s alkalickou fosfatázou (BioSource), která je 1000x zředěná v DB. Po inkubaci při teplotě místnosti po dobu 1 hodiny a promytí RB je přidán roztok substrátu a poté je měřena absorbance při 405/655 nm pomocí přístroje na odečítání mikrodestiček (BioRad).

### (3) Měření neutralizační aktivity



Neutralizační aktivita myší protilátky, chimerní protilátky a zušlechtěné protilátky může být měřena s použitím indexu inhibiční aktivity produkce faktoru Xa tromboplastinem odvozeným z lidské placenty, Thromborel S (Boehringer AG). Tedy 60  $\mu$ l pufru (TBS obsahující 5 mM  $\text{CaCl}_2$  a 0,1% BSA) je přidáno k 10  $\mu$ l 1,25 mg/ml Thromborelu S a 10  $\mu$ l vhodně ředěné protilátky, směs je potom inkubována v 96-jamkové destičce při teplotě místnosti po dobu 1 hodiny.

Dále tam bylo přidáno 10  $\mu$ l jak lidského faktoru X (Celsus Laboratories) o koncentraci 3.245  $\mu$ g/ml, tak lidského faktoru VIIa (Enzyme Research) o koncentraci 82,5 ng/ml a inkubace pokračovala při teplotě místnosti další 1 hodinu. Reakce byla zastavena přidáním 10  $\mu$ l 0,5 M EDTA, je přidáno 50  $\mu$ l roztoku chromogenního substrátu a je určena absorbance při 405/655 nm. Po jednohodinové reakci při teplotě místnosti je absorbance při 405/655 nm měřena znovu. Neutralizační aktivita může být určena spočítáním zbytkové aktivity (%) z každé změny v absorbanci, přičemž změna absorbance při nepřidání žádné protilátky je považována za 100 % aktivitu.

Roztok chromogenního substrátu je připraven rozpuštěním chromogenního substrátu Testzyme S-2222 (Chromogenix) podle přiložených instrukcí, dvojnásobným zředěním purifikovanou vodou a poté smícháním s roztokem polybrenu (0,6 mg/ml hexamethylenbromidu, SIGMA) v poměru 1 : 1.

#### (7) Analýza kinetiky interakce zušlechtěné protilátky a rozpustného TF

Kinetické parametry, tj. disociační konstanty (KD), konstanty disociační rychlosti (kdiss) a konstanty rychlosti vazby (kass) protilátky proti TF, která je předmětem tohoto vynálezu, mohou být určeny pomocí BIACORE.

Rekombinantní protein G je imobilizován na sensorickém čipu k němuž je protilátka navázána a purifikovaný rekombinantní TF (rozpustný TF 1 až 219 v němž byl označen FLAG peptid) (zde označováno jako rozpustný TF) je použit jako antigen, zatímco rozpustné TF připravené v různých koncentracích, jsou použity jako analytická činidla. Ze získaného senzogramu jsou vypočteny kinetické parametry (konstanty disociační rychlosti kdiss a konstanty rychlosti vazby kass) a z nich může být spočítána disociační konstanta. O kinetické analýze viz například „Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system“ (Karlsson, R. a kol., (1991) J. Immunol. Methods 145: 229-240).

Přednost je dávana takové protilátce proti TF, která je předmětem tohoto vynálezu, která má menší hodnoty disociačních konstant (KD), protože bude mít vyšší



neutralizační aktivitu. Je výhodné u protilátky proti TF, která je předmětem tohoto vynálezu, když hodnoty KD nejsou větší než  $2,30 \times 10^{-8}$  [1/M], výhodnější je, když nejsou větší než  $2,30 \times 10^{-9}$  [1/M] a nejvýhodnější je, když nejsou větší než  $1,17 \times 10^{-9}$  [1/M].

Mimoto jsou hodnoty KD určeny ze dvou parametrů, konstanty disociační rychlosti (kdiss) a konstanty rychlosti vazby (kass) ( $KD = kdiss/kass$ ). Je tedy zřejmé, že když kdiss je malá a kass velká, je získána malá hodnota KD.

Specificky v případě protilátky proti TF, která je předmětem tohoto vynálezu, kdiss nemusí být větší než  $9,52 \times 10^{-3}$  [1/s]. Výhodnější je, když kdiss není větší než  $9,52 \times 10^{-4}$  [1/s] a nejvýhodnější je, když kdiss není větší než  $6,5 \times 10^{-4}$  [1/s].

Na druhé straně hodnoty kass mohou být větší než  $4,15 \times 10^4$  [1/M•s]. Je výhodné, když nejsou hodnoty kass menší než  $4,15 \times 10^5$  [1/M•s] a nejvýhodnější je, když nejsou hodnoty kass menší než  $4,65 \times 10^5$  [1/M•s].

Mimoto výhodná protilátka proti TF nemá hodnotu kdiss větší než  $9,52 \times 10^{-3}$  [1/s] a hodnotu kass menší než  $4,15 \times 10^5$  [1/M•s].

Přesněji řečeno, u protilátek proti TF, které jsou předmětem tohoto vynálezu, jsou hodnoty KD v rozsahu od  $1,09 \times 10^{-10}$  až  $2,30 \times 10^{-8}$  [1/M], výhodněji v rozsahu od  $1,09 \times 10^{-9}$  až  $2,30 \times 10^{-8}$  [1/M] a nejvýhodněji v rozsahu od  $1,09 \times 10^{-9}$  až  $2,30 \times 10^{-8}$  [1/M].

Mimoto jsou hodnoty kdiss v rozsahu od  $5,06 \times 10^{-4}$  až  $9,52 \times 10^{-3}$  [1/s], výhodněji v rozsahu od  $5,06 \times 10^{-4}$  až  $9,52 \times 10^{-4}$  [1/s] a nejvýhodněji v rozsahu od  $5,06 \times 10^{-4}$  až  $6,49 \times 10^{-4}$  [1/s].

Hodnoty kass jsou v rozsahu od  $4,15 \times 10^4$  až  $5,44 \times 10^5$  [1/M•s], výhodněji v rozsahu od  $4,15 \times 10^5$  až  $5,44 \times 10^5$  [1/M•s] a nejvýhodněji v rozsahu od  $4,65 \times 10^5$  až  $5,44 \times 10^5$  [1/M•s].

Třebaže tyto hodnoty KD, hodnoty kdiss a hodnoty kass mohou být získány vedle BIACORE, pomocí analýzy podle Scatcharda a podobně, použití BIACORE je dávana přednost.

#### 8. Měření reaktivity zušlechtěné protilátky s lidským TF

Metodu hybridizace typu dot-blot je možno použít pro zkoumání reaktivity nedenaturovaného TF, TF denaturovaného za neredukujících podmínek a TF denaturovaného za redukujících podmínek.



Pro zkoumání je možno použít TF, který byl purifikován z lidské tkáně nebo byl exprimován v savčích buňkách, jako jsou buňky CHO a purifikován. Jako denaturační činidlo mohou být použity namísto močoviny guanidinydrochlorid nebo SDS atd. Jako redukční činidlo může být namísto DTT použito redukční činidlo redukující SH skupiny, jako je například 2-merkaptoethanol. Pro detekci zušlechtěné protilátky může být použita protilátka proti lidskému IgG, která je značená různými sloučeninami. Jako jsou používány zde, značící činidla mohou být radioizotopy, biotin, fluorogenní sloučeniny jako je FITC, enzymy jako jsou peroxidáza a alkalická fosfatáza, a podobně. Protilátka proti TF, která je předmětem tohoto vynálezu, reaguje s jakýmkoli nedenaturovaným TF, TF denaturovaným za neredukujících podmínek a TF denaturovaným za redukujících podmínek.

9. Farmaceutické prostředky a léčebná činidla pro DIC, obsahující jako aktivní složku zušlechtěnou protilátku

Aby byl potvrzen léčebný účinek zušlechtěné protilátky na lidský TF, zušlechtěná protilátka proti lidskému TF je podávána živočichu, který má silné příznaky DIC a potom jsou ukazatele DIC měřeny, aby se léčebné účinky potvrdily.

Zde používanou protilátkou je zušlechtěná protilátka proti lidskému TF. Protilátka neutralizuje aktivitu lidského TF tím že se na lidský TF váže a přednostně zde může být uvedena zušlechtěná protilátka ATR5. Metoda přípravy zušlechtěné protilátky ATR5 je popsána v Příkladech.

Protilátka zde používaná může být purifikována do vysoké čistoty spojením běžných purifikačních postupů jako je vysolování, metoda gelové filtrace jako je HPLC, afinitní chromatografie používající sloupec s Proteinem A, a podobně. U takto purifikované protilátky je možno s vysokou přesností pomocí běžných imunologických postupů, jako je radioimunologický test (RIA), enzymoimunologický test (EIA, ELISA) nebo metodou imunofluorescenčně značených protilátek (imunofluorescenční analýza) a podobně potvrdit, že rozpoznává lidský TF .

Farmaceutické prostředky nebo léčebná činidla pro DIC, která jsou předmětem tohoto vynálezu, obsahující jako aktivní složku zušlechtěnou protilátku proti TF mohou být podávány buď systémově nebo lokálně, ne však orálně. Například metodu podávání je možno vybrat mezi těmito: intravenózní injekce jako je kapací infúze, intramuskulární injekce, intraperitoneální injekce a podkožní injekce a výběr může být proveden na základě věku a stavu pacienta. Účinná dávka je vybrána v rozsahu 0,01

až 1000 mg na kg tělesné hmotnosti na jedno podání. Jinou možností je vybrat dávku 10 mg/pacienta, s výhodou 1 až 1000 mg/pacienta.

Farmaceutické prostředky a léčebná činidla pro DIC, která jsou předmětem tohoto vynálezu, obsahující jako aktivní složku zušlechtěnou protilátku proti TF mohou v závislosti na způsobu podávání obsahovat farmaceuticky přijatelné nosiče nebo přísady. Příklady takových nosičů nebo přísad jsou voda, farmaceuticky přijatelná organická rozpouštědla, kolagen, polyvinylalkohol, polyvinylpyrolidon, karboxyvinylové polymery, sodná sůl karboxymethylcelulózy, sodná sůl kyseliny polyakrylové, alginát sodný, ve vodě rozpustný dextran, sodná sůl karboxymethylovaného škrobu, pektin, methylcelulóza, xanthanová guma, arabská guma, kasein, želatina, agar, diglycerin, glycerin, propylenglykol, polyethylenglykol, vazelína, parafín, stearylalkohol, kyselina stearová, lidský sérumalbumin (HSA), manitol, sorbitol, laktóza, farmaceuticky přijatelné povrchově aktivní látky a podobně. Přísady je možno vybírat podle potřeby mimo jiné z výše uvedených látek nebo jejich kombinací, v závislosti na dávkové formě předloženého vynálezu.

#### Účinky vynálezu

Podle předloženého vynálezu je poskytnuta chimerní protilátka a zušlechtěná protilátka proti lidskému TF a postup přípravy zušlechtěné protilátky. Tyto protilátky jsou pro svoji nízkou antigenicitu užitečné jako léčebná činidla.

#### Přehled obrázků na výkresech

Obrázek 1 je graf, který porovnává aktivitu vazby k antigenu u protilátky chimerní H řetězec/chimerní L řetězec, protilátky zušlechtěný H řetězec verze a/chimerní L řetězec a protilátky chimerní H řetězec/zušlechtěný L řetězec verze a.

Obrázek 2 je graf, který porovnává schopnost neutralizovat lidský TF u protilátky chimerní H řetězec/chimerní L řetězec, protilátky zušlechtěný H řetězec verze a/chimerní L řetězec a protilátky chimerní H řetězec/zušlechtěný L řetězec verze a.

Obrázek 3 je graf, který porovnává aktivitu vazby k antigenu u protilátky chimerní H řetězec/chimerní L řetězec a protilátky zušlechtěný H řetězec verze a/chimerní L řetězec verze a.

Obrázek 4 je graf, který porovnává schopnost neutralizovat lidský TF u myši monoklonální protilátky ATR-5 proti TF, protilátky chimerní H řetězec/chimerní L řetězec, protilátky zušlechtěný H řetězec verze a/zušlechtěný L řetězec verze a.

Obrázek 5 je graf, který porovnává aktivitu vazby k antigenu u protilátky chimerní H řetězec/chimerní L řetězec, protilátky zušlechtěný H řetězec verze b/chimerní L řetězec a protilátky zušlechtěný H řetězec verze b/zušlechtěný L řetězec verze a.

Obrázek 6 je graf, který porovnává aktivitu vazby k antigenu u protilátky chimerní H řetězec/chimerní L řetězec, protilátky zušlechtěný H řetězec verze c/chimerní L řetězec a protilátky zušlechtěný H řetězec verze d/chimerní L řetězec.

Obrázek 7 je graf, který porovnává schopnost neutralizovat lidský TF u protilátky chimerní H řetězec/chimerní L řetězec, protilátky zušlechtěný H řetězec verze b/chimerní L řetězec, protilátky zušlechtěný H řetězec verze c/chimerní L řetězec a protilátky zušlechtěný H řetězec verze d/chimerní L řetězec.

Obrázek 8 je graf, který porovnává schopnost neutralizovat lidský TF u protilátky chimerní H řetězec/chimerní L řetězec a protilátky zušlechtěný H řetězec verze b/zušlechtěný L řetězec verze a.

Obrázek 9 je graf, který porovnává aktivitu vazby k antigenu u protilátky chimerní H řetězec/chimerní L řetězec, protilátky chimerní H řetězec/zušlechtěný L řetězec verze b a protilátky chimerní H řetězec/zušlechtěný L řetězec verze c.

Obrázek 10 je graf, který porovnává schopnost neutralizovat lidský TF u protilátky chimerní H řetězec/chimerní L řetězec, protilátky chimerní H řetězec/zušlechtěný L řetězec verze b a protilátky chimerní H řetězec/zušlechtěný L řetězec verze c.

Obrázek 11 je graf, který porovnává aktivitu vazby k antigenu u protilátky chimerní H řetězec/chimerní L řetězec, protilátky zušlechtěný H řetězec verze b /zušlechtěný L řetězec verze b a protilátky zušlechtěný H řetězec verze b /zušlechtěný L řetězec verze c.

Obrázek 12 je graf, který porovnává schopnost neutralizovat lidský TF u protilátky chimerní H řetězec/chimerní L řetězec, protilátky zušlechtěný H řetězec verze b/zušlechtěný L řetězec verze b a protilátky zušlechtěný H řetězec verze b/zušlechtěný L řetězec verze c.



Obrázek 13 je graf, který porovnává aktivitu vazby k antigenu u protilátky chimerní H řetězec/chimerní L řetězec, protilátky zušlechtěný H řetězec verze b /zušlechtěný L řetězec verze b a protilátky zušlechtěný H řetězec verze d/zušlechtěný L řetězec verze b.

Obrázek 14 je graf, který porovnává schopnost neutralizovat lidský TF u protilátky chimerní H řetězec/chimerní L řetězec, protilátky zušlechtěný H řetězec verze b/zušlechtěný L řetězec verze b a protilátky zušlechtěný H řetězec verze d/zušlechtěný L řetězec verze b.

Obrázek 15 je graf, který porovnává aktivitu vazby k antigenu u protilátky chimerní H řetězec/chimerní L řetězec, protilátky zušlechtěný H řetězec verze e/chimerní L řetězec a protilátky zušlechtěný H řetězec verze e/zušlechtěný L řetězec verze b.

Obrázek 16 je graf, který porovnává schopnost neutralizovat lidský TF u protilátky chimerní H řetězec/chimerní L řetězec a protilátky zušlechtěný H řetězec verze e/chimerní L řetězec.

Obrázek 17 je graf, který porovnává aktivitu vazby k antigenu u protilátky chimerní H řetězec/chimerní L řetězec a protilátky zušlechtěný H řetězec verze g/zušlechtěný L řetězec verze b.

Obrázek 18 je graf, který porovnává schopnost neutralizovat lidský TF u protilátky chimerní H řetězec/chimerní L řetězec a protilátky zušlechtěný H řetězec verze g/ zušlechtěný L řetězec verze b.

Obrázek 19 je graf, který porovnává aktivitu vazby k antigenu u protilátky chimerní H řetězec/chimerní L řetězec, protilátky zušlechtěný H řetězec verze b3/zušlechtěný L řetězec verze b a protilátky zušlechtěný H řetězec verze d3/zušlechtěný L řetězec verze b.

Obrázek 20 je graf, který porovnává schopnost neutralizovat lidský TF u protilátky chimerní H řetězec/chimerní L řetězec, protilátky zušlechtěný H řetězec verze b3/zušlechtěný L řetězec verze b a protilátky zušlechtěný H řetězec verze d3/zušlechtěný L řetězec verze b.

Obrázek 21 je graf, který porovnává aktivitu vazby k antigenu u protilátky chimerní H řetězec/chimerní L řetězec, protilátky zušlechtěný H řetězec verze i/chimerní L řetězec a protilátky zušlechtěný H řetězec verze j/chimerní L řetězec.

Obrázek 22 je graf, který porovnává aktivitu vazby k antigenu u protilátky chimerní H řetězec/chimerní L řetězec, protilátky zušlechtěný H řetězec verze i/zušlechtěný L řetězec verze b a protilátky zušlechtěný H řetězec verze j/zušlechtěný L řetězec verze b.

Obrázek 23 je graf, který porovnává schopnost neutralizovat lidský TF u protilátky chimerní H řetězec/chimerní L řetězec, protilátky zušlechtěný H řetězec verze i/chimerní L řetězec a protilátky zušlechtěný H řetězec verze j/chimerní L řetězec.

Obrázek 24 je graf, který porovnává schopnost neutralizovat lidský TF u protilátky chimerní H řetězec/chimerní L řetězec, protilátky zušlechtěný H řetězec verze b/zušlechtěný L řetězec verze b, protilátky zušlechtěný H řetězec verze i/zušlechtěný L řetězec verze b a protilátky zušlechtěný H řetězec verze j/zušlechtěný L řetězec verze b.

Obrázek 25 je graf, který porovnává aktivitu vazby k antigenu u protilátky chimerní H řetězec/chimerní L řetězec, protilátky chimerní H řetězec/ zušlechtěný L řetězec verze b1 a protilátky chimerní H řetězec/zušlechtěný L řetězec verze b2.

Obrázek 26 je graf, který porovnává schopnost neutralizovat lidský TF u protilátky chimerní H řetězec/chimerní L řetězec, protilátky chimerní H řetězec/ zušlechtěný L řetězec verze b1 a protilátky chimerní H řetězec/zušlechtěný L řetězec verze b2.

Obrázek 27 je graf, který porovnává aktivitu vazby k antigenu u protilátky chimerní H řetězec/chimerní L řetězec a protilátky zušlechtěný H řetězec verze b/zušlechtěný L řetězec verze b2.

Obrázek 28 je graf, který porovnává schopnost neutralizovat lidský TF u protilátky chimerní H řetězec/chimerní L řetězec, protilátky zušlechtěný H řetězec verze i/zušlechtěný L řetězec verze b, protilátky zušlechtěný H řetězec verze b/zušlechtěný L řetězec verze b a protilátky zušlechtěný H řetězec verze b/zušlechtěný L řetězec verze b2.

Obrázek 29 je graf, který porovnává aktivitu vazby k antigenu u protilátky chimerní H řetězec/chimerní L řetězec, protilátky zušlechtěný H řetězec verze i/zušlechtěný L řetězec verze b1 a protilátky zušlechtěný H řetězec verze i/zušlechtěný L řetězec verze b2.

Obrázek 30 je graf, který porovnává schopnost neutralizovat lidský TF u protilátky chimerní H řetězec/chimerní L řetězec, protilátky zušlechtěný H řetězec verze

i/zušlechtěný L řetězec verze b, protilátky zušlechtěný H řetězec verze i/zušlechtěný L řetězec verze b1 a protilátky zušlechtěný H řetězec verze i/zušlechtěný L řetězec verze b2.

Obrázek 31 je graf, který porovnává aktivitu vazby k antigenu u protilátky chimerní H řetězec/chimerní L řetězec, protilátky zušlechtěný H řetězec verze b/zušlechtěný L řetězec verze b, protilátky zušlechtěný H řetězec verze i/zušlechtěný L řetězec verze b a protilátky zušlechtěný H řetězec verze i/zušlechtěný L řetězec verze b2.

Obrázek 32 je graf, který porovnává schopnost neutralizovat lidský TF (schopnost inhibovat tvorbu faktoru Xa způsobenou TF) u protilátky chimerní H řetězec/chimerní L řetězec, protilátky zušlechtěný H řetězec verze b/zušlechtěný L řetězec verze b, protilátky zušlechtěný H řetězec verze i/zušlechtěný L řetězec verze b a protilátky zušlechtěný H řetězec verze i/zušlechtěný L řetězec verze b2.

Obrázek 33 je graf, který porovnává schopnost neutralizovat lidský TF (schopnost inhibovat vazbu faktoru X) u protilátky chimerní H řetězec/chimerní L řetězec, protilátky zušlechtěný H řetězec verze b/zušlechtěný L řetězec verze b, protilátky zušlechtěný H řetězec verze i/zušlechtěný L řetězec verze b a protilátky zušlechtěný H řetězec verze i/zušlechtěný L řetězec verze b2.

Obrázek 34 je graf, který porovnává schopnost neutralizovat lidský TF (schopnost inhibovat koagulaci plazmy způsobenou TF) u protilátky chimerní H řetězec/chimerní L řetězec, protilátky zušlechtěný H řetězec verze b/zušlechtěný L řetězec verze b a protilátky zušlechtěný H řetězec verze i/zušlechtěný L řetězec verze b2.

Obrázek 35 je graf, který porovnává reaktivitu s lidským TF, opracovaným za různých podmínek, u protilátky chimerní H řetězec/chimerní L řetězec, protilátky zušlechtěný H řetězec verze b/zušlechtěný L řetězec verze b, protilátky zušlechtěný H řetězec verze i/zušlechtěný L řetězec verze b a protilátky zušlechtěný H řetězec verze i/zušlechtěný L řetězec verze b2.

### Příklady provedení vynálezu

Nyní budou vysvětleny další podrobnosti předloženého vynálezu uvedením následujících příkladů.

Příklad 1: Klonování DNA kódující V oblast myší monoklonální protilátky proti lidskému TF

(1) Příprava mRNA

mRNA byla připravena z hybridomů ATR-2, ATR-3, ATR-4, ATR-5 (IgG1 $\kappa$ ), ATR-7 a ATR-8 (IgG2 $\alpha$ ) pomocí purifikační soupravy QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia Biotech). Každý druh hybridomových buněk byl kompletně homogenizován v extrakčním pufru podle návodu, připojeného k soupravě a potom byla mRNA purifikována pomocí sloupce s oligo (dT)-celulózou, po kterém následovalo srážení ethanolem. Sraženina mRNA byla rozpuštěna v elučním pufru.

(2) Příprava a amplifikace cDNA genu kódujícího V oblast myší protilátky

(i) Klonování cDNA V oblasti H řetězce

Klonování genu kódujícího V oblast H řetězce myší monoklonální protilátky proti lidskému TF bylo provedeno pomocí metody 5'-RACE (Frohman, M. A. a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8998-9002, 1988; Belyavski, A. a kol., Nucleic Acids Res. 17: 2919-2932, 1989). Pro metodu 5'-RACE byla použita souprava Marathon cDNA Amplification Kit (CLONTECH) a postup byl proveden podle návodu, k soupravě přiloženého.

Za použití asi 1  $\mu$ g mRNA, připravené jak bylo popsáno výše, jako matrice, byly přidány cDNA syntetizující primery, přiložené k soupravě, poté byla provedena reakce s reverzní transkriptázou při teplotě 42 °C po dobu 60 minut, aby se uskutečnila reverzní transkripce na cDNA. Tato pak reagovala s DNA polymerázou I, DNA ligázou a Rnázou H při teplotě 16 °C po dobu 1,5 hodiny a s T4 DNA polymerázou při teplotě 16 °C po dobu 45 minut, aby došlo k syntéze dvojřetězcové cDNA. Dvojřetězcová cDNA byla extrahována fenolem a chloroformem a vysrážena ethanolem.

V reakci s T4 DNA ligázou, provedenou při 16 °C přes noc, byl na oba konce dvojřetězcové cDNA připojen adapter. Reakční směs byla 50x zředěna 10 mM Tricin-KOH (pH 8,5), obsahujícím 0,1 mM EDTA. Za použití tohoto jako matrice byl pomocí PCR amplifikován gen, kódující V oblast H řetězce. Adapterový primer 1, přiložený k soupravě byl použit jako 5'-koncový primer a jako 3'-koncový primer byly použity primer MHC-G1 (SEQ ID NO: 1) (ATR-2, ATR-3, ATR-4 a ATR-5) nebo primer MHC-G2a (SEQ ID NO: 2) (ATR-7 a ATR-8) (S. T. Jones, a kol., Biotechnology, 9: 88-89, 1991).

PCR reakční roztoky pro V oblast H řetězce protilátek ATR-2, 3, 4 a 5 obsahovaly ve 100  $\mu$ l: 120 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM KCl, 6 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,1% Triton X-100, 0,001% BSA, 0,2 mM deoxyribonukleotidtrifosfáty (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2,5 jednotky KOD DNA polymerázy (Toyo Boseki), 30 – 50 pmol adapterového primeru 1, rovněž tak primeru MHC-G1 a 1 – 5  $\mu$ l reakční směsi cDNA, k níž byl adapter ligován.

Všechny PCR reakce byly provedeny pomocí DNA termálního cykleru 480 (Perkin-Elmer) a u PCR bylo provedeno třicet cyklů při teplotách 94 °C po dobu 30 vteřin, 55 °C po dobu 30 vteřin a 74 °C po dobu 1 minuty.

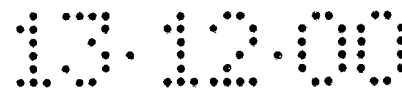
#### (ii) Klonování cDNA V oblasti L řetězce

Klonování genu kódujícího V oblast L řetězce myší monoklonální protilátky proti lidskému TF bylo provedeno pomocí metody 5'-RACE (Frohman, M. A. a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8998-9002, 1988; Belyavski, A. a kol., Nucleic Acids Res. 17: 2919-2932, 1989). Pro metodu 5'-RACE byla použita souprava Marathon cDNA Amplification Kit (CLONTECH) a postup byl proveden podle návodu, k soupravě přiloženého.

Za použití asi 1  $\mu$ g mRNA, připravené jak bylo popsáno výše, jako matrice, byly přidány cDNA syntetizující primery, přiložené k soupravě, poté byla provedena reakce s reverzní transkriptázou při teplotě 42 °C po dobu 60 minut, aby se uskutečnila reverzní transkripce na cDNA. Tato pak reagovala s DNA polymerázou I, DNA ligázou a Rnázou H při teplotě 16 °C po dobu 1,5 hodiny a s T4 DNA polymerázou při teplotě 16 °C po dobu 45 minut, aby došlo k syntéze dvojřetězcové cDNA. Dvojřetězcová cDNA byla extrahována fenolem a chloroformem a vysrážena ethanolem.

V reakci s T4 DNA ligázou, provedenou při 16 °C přes noc, byl na oba konce dvojřetězcové cDNA připojen adapter. Reakční směs byla 50x zředěna 10 mM Tricin-KOH (pH 8,5), obsahujícím 0,1 mM EDTA. Za použití tohoto jako matrice byl pomocí PCR amplifikován gen, kódující V oblast L řetězce. Adapterový primer 1 byl použit jako 5'-koncový primer a jako 3'-koncový primer byl použit primer MKC (SEQ ID NO: 3) (S. T. Jones, a kol., Biotechnology, 9: 88-89, 1991).

PCR reakční roztoky obsahovaly ve 100  $\mu$ l: 120 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM KCl, 6 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,1% Triton X-100, 0,001% BSA, 0,2 mM deoxyribonukleotidtrifosfáty (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2,5 jednotky



KOD DNA polymerázy (Toyo Boseki), 30 – 50 pmol adapterového primeru 1, rovněž tak primeru MKC a 1  $\mu$ l reakční směsi cDNA, k níž byl adapter ligován.

Všechny PCR reakce byly provedeny pomocí DNA termálního cykleru 480 (Perkin-Elmer) a u PCR bylo provedeno třicet cyklů při teplotách 94 °C po dobu 30 vteřin, 55 °C po dobu 30 vteřin a 74 °C po dobu 1 minuty.

### (3) Purifikace a fragmentace PCR produktů

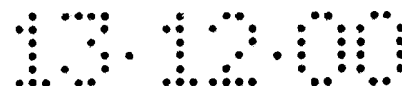
Výše uvedená PCR reakční směs byla extrahována fenolem s chloroformem a fragmenty amplifikované DNA byly získány etanolovou precipitací. Fragmenty DNA byly štěpeny restriční enzymem XmaI (New England Biolabs) při teplotě 37 °C po dobu 1 hodiny. Štěpící směs pro XmaI byla rozdělena pomocí elektroforézy na agarózovém gelu 2% až 3% NuSieve GTG (FMC BioProducts) a byly vyříznuty agarózové proužky, obsahující fragmenty DNA dlouhé asi 500 bázových párů pro V oblast H řetězce a rovněž tak asi 500 bázových párů pro L oblast H řetězce. Agarózové proužky byly extrahovány fenolem s chloroformem a fragmenty DNA byly vysráženy ethanolem a poté rozpuštěny v 10  $\mu$ l 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), který obsahuje 1 mM EDTA (zde je označován TE).

Fragmenty DNA štěpené XmaI, připravené jak bylo popsáno výše, obsahující geny kódující V oblast myšího H řetězce a V oblast myšího L řetězce a plazmidový vektor pUC19, připravený štěpením XmaI byly ligovány pomocí soupravy DNA ligation kit ver.2 (Takara Shuzo) tak, že reagovaly při 16 °C po dobu 1 hodiny, podle návodu přiloženého k soupravě.

Ligační směs byla přidána k 100  $\mu$ l kompetentních buněk E. coli JM109 (Nippongene) a byla inkubována po dobu 30 minut na ledu a 1 minutu při 42 °C.

Poté bylo k této směsi přidáno 300  $\mu$ l bujónu Hi-Competence Broth (Nippongene) a inkubováno při 37 °C po dobu 1 hodiny. Pak byla Escherichia coli vyseta na agar v LB médiu (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, a kol., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), obsahujícím 100  $\mu$ g/ml ampicilinu (zde označováno jako agar v médiu LBA) a inkubována přes noc při 37 °C, aby byly získány transformanty E. coli.

Transformanty byly inkubovány přes noc ve 3 nebo 4 ml média LB, obsahujícího 50  $\mu$ g/ml ampicilinu (zde označováno jako LBA médium) při 37 °C a z buněčné frakce byla připravena plazmidová DNA pomocí soupravy QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN) a poté byla určena nukleotidová sekvence.



#### (4) Určení nukleotidové sekvence genu kódujícího V oblast myší protilátky

Nukleotidová sekvence cDNA kódující oblasti ve výše uvedeném plazmidu byla určena pomocí soupravy Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer) pomocí sekvenátoru DNA Sequencer 373A (Perkin-Elmer). Jako sekvenační primery byly použity M13 Primer 4 (Takara Shuzo) (SEQ ID NO: 4) a M13 Primer RV (Takara Shuzo) (SEQ ID NO: 5) a sekvence byla určena potvrzením nukleotidové sekvence v obou směrech.

Takto získané plazmidy, obsahující gen, kódující V oblast myšího H řetězce, odvozený z hybridomů ATR-2, ATR-3, ATR-4, ATR-5, ATR-7 a ATR-8 byly označeny jako ATR-xHv/pUC19 ( $x = 2, 3, 4, 5, 7$  nebo  $8$ ) a takto získané plazmidy, obsahující gen, kódující V oblast myšího L řetězce, odvozený z hybridomů ATR-2, ATR-3, ATR-4, ATR-5, ATR-7 a ATR-8 byly označeny jako ATR-xLv/pUC19 ( $x = 2, 3, 4, 5, 7$  nebo  $8$ ). Nukleotidové sekvence genů kódujících V oblast H řetězce každé myší protilátky, obsažené v plazmidu ATR-xHv/pUC19 ( $x = 2, 3, 4, 5, 7$  nebo  $8$ ) (včetně odpovídajících aminokyselinových sekvencí) jsou uvedeny v SEQ ID NO: 6 až 11, nukleotidové sekvence genů kódujících V oblast L řetězce každé myší protilátky, obsažené v plazmidu ATR-xLv/pUC19 ( $x = 2, 3, 4, 5, 7$  nebo  $8$ ) (včetně odpovídajících aminokyselinových sekvencí) jsou uvedeny v SEQ ID NO: 12 až 17.

#### Příklad 2: Konstrukce chimerní protilátky

Byla připravena chimerní protilátka ATR-5, v níž byla V oblast myší ATR-5 protilátky připojena k C oblasti lidské protilátky. Expresní vektor této chimerní protilátky byl zkonstruován tak, že byl připojen gen kódující V oblast ATR-5 protilátky do expresního vektoru, kódujícího C oblast lidské protilátky.

##### (1) Konstrukce V oblasti H řetězce chimerní protilátky

V oblast H řetězce protilátky ATR-5 byla modifikována pomocí PCR metody, aby ji bylo možno zabudovat do expresního vektoru, kódujícího C oblast H řetězce lidské protilátky. 5'-koncový primer ch5HS (SEQ ID NO: 18) byl navržen tak, aby hybridizoval s 5'-koncem DNA, kódující V oblast a měl Kozakovu konsenzuální sekvenci (Kozak, M. a kol., J. Mol. Biol. 196: 947-970, 1987) a rozpoznávací sekvenci pro restriční enzym Sall. 3'-koncový primer ch5HA (SEQ ID NO: 19) byl navržen tak, aby hybridizoval s 3'-koncem DNA, kódující J oblast a měl rozpoznávací sekvenci pro restriční enzym NheI.

PCR reakční roztoky obsahovaly ve 100  $\mu$ l: 120 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM KCl, 6 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,1% Triton X-100, 0,001% BSA, 0,2 mM deoxyribonukleotidtrifosfáty (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2,5 jednotky KOD DNA polymerázy (Toyo Boseki), 50 pmol primeru ch5HS a primeru ch5HA a 1  $\mu$ l plazmidu ATR5Hv/pUC19 jako matricovou DNA. Všechny PCR reakce byly provedeny pomocí DNA termálního cykleru 480 (Perkin-Elmer) a u PCR bylo provedeno třicet cyklů při teplotách 94 °C po dobu 30 vteřin, 55 °C po dobu 30 vteřin a 74 °C po dobu 1 minuty.

PCR reakční směs byla extrahována fenolem s chloroformem a fragmenty amplifikované DNA byly získány etanolovou precipitací. Fragmenty DNA byly štěpeny restričními enzymy NheI (Takara Shuzo) při teplotě 37 °C po dobu 1 hodiny a poté restričními enzymy Sall (Takara Shuzo) při teplotě 37 °C po dobu 1 hodiny. Štěpící směs byla rozdělena pomocí elektroforézy na agarózovém gelu 2% až 3% NuSieve GTG (FMC BioProducts) a byly vyříznuty agaróзовые proužky, obsahující fragmenty DNA dlouhé asi 450 bázových párů. Agaróзовые proužky byly extrahovány fenolem s chloroformem, fragmenty DNA byly vysráženy ethanolem a poté rozpuštěny v 20  $\mu$ l TE.

Jako klonovací vektor byl použit vektor s pozmeněným promotorem (označovaný zde jako CVIDEC), do něhož byly vneseny rozpoznávací sekvence pro restriční enzymy NheI, Sall a SphI, BglII. Fragment genu, připravený tak jak bylo popsáno výše, kódující v oblasti vyššího H řetězce a vektor CVIDEC, připravený štěpením NheI a Sall, byly ligovány pomocí DNA ligační soupravy ver. 2 (Takara Shuzo) tak, že reagovaly při 16 °C po dobu 1 hodiny, podle návodu přiloženého k soupravě.

Ligační směs byla přidána k 100  $\mu$ l kompetentních buněk *E. coli* JM109 (Nippongene) a byla inkubována po dobu 30 minut na ledu a 1 minutu při 42 °C. Poté bylo k této směsi přidáno 300  $\mu$ l bujónu Hi-Competence Broth (Nippongene) a inkubováno při 37 °C po dobu 1 hodiny. Pak byla *Escherichia coli* vyseta na agar v LB médiu a inkubována přes noc při 37 °C, aby byl získán transformant *E. coli*. Transformant byl inkubován přes noc ve 3 ml média LBA při 37 °C a z buněčné frakce byla připravena plazmidová DNA pomocí soupravy QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN). Nukleotidová sekvence cDNA kódující oblasti ve výše uvedeném plazmidu byla určena pomocí soupravy Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer) pomocí sekvenátoru DNA Sequencer 373A (Perkin-Elmer).



Jako sekvenační primery byly použity M13 Primer 4 (Takara Shuzo) a M13 Primer RV (Takara Shuzo) a sekvence byla určena potvrzením nukleotidové sekvence v obou směrech. Plazmid který obsahuje gen, kódující V oblast H řetězce ATR-5 protilátky, rozpoznávací sekvenci pro Sall a Kozakovu konsenzuální sekvenci na 5'-konci a rozpoznávací sekvenci pro NheI na 3'-konci byl označen jako chATR5Hv/CVIDEC.

## (2) Konstrukce V oblasti L řetězce chimerní protilátky

V oblast L řetězce protilátky ATR-5 byla modifikována pomocí PCR metody, aby ji bylo možno zabudovat do expresního vektoru, kódujícího C oblast L řetězce lidské protilátky. 5'-koncový primer ch5LS (SEQ ID NO: 20) byl navržen tak, aby hybridizoval s 5'-koncem DNA, kódující V oblast a měl Kozakovu konsenzuální sekvenci (Kozak, M. a kol., J. Mol. Biol. 196: 947-970, 1987) a rozpoznávací sekvenci pro restriční enzym BglII. 3'-koncový primer ch5LA (SEQ ID NO: 21) byl navržen tak, aby hybridizoval s 3'-koncem DNA, kódující J oblast a měl rozpoznávací sekvenci pro restriční enzym SpII.

PCR reakční roztoky obsahovaly ve 100  $\mu$ l: 120 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM KCl, 6 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,1% Triton X-100, 0,001% BSA, 0,2 mM deoxyribonukleotidtrifosfáty (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2,5 jednotky KOD DNA polymerázy (Toyo Boseki), 50 pmol primeru ch5LS a primeru ch5LA a 1  $\mu$ l plazmidu ATR5Lv/pUC19 jako matricovou DNA. Všechny PCR reakce byly provedeny pomocí DNA termálního cykleru 480 (Perkin-Elmer) a u PCR bylo provedeno třicet cyklů při teplotách 94 °C po dobu 30 vteřin, 55 °C po dobu 30 vteřin a 74 °C po dobu 1 minuty.

PCR reakční směs byla extrahována fenolem s chloroformem a fragmenty amplifikované DNA byly získány etanolovou precipitací. Fragmenty DNA byly štěpeny restričním enzymem SpII (Takara Shuzo) při teplotě 37 °C po dobu 1 hodiny a poté restričním enzymem BglII (Takara Shuzo) při teplotě 37 °C po dobu 1 hodiny. Štěpící směs byla rozdělena pomocí elektroforézy na agarózovém gelu 3% NuSieve GTG (FMC BioProducts) a byly vyříznuty agarózové proužky, obsahující fragmenty DNA dlouhé asi 400 bázových párů. Agarózové proužky byly extrahovány fenolem s chloroformem, fragmenty DNA byly vysráženy ethanolem a poté rozpuštěny v 20  $\mu$ l TE.

Fragment genu, připravený tak jak bylo popsáno výše, kódující V oblast myšního L řetězce a vektor CVIDEC, připravený štěpením SpII a BglII, byly ligovány pomocí

DNA ligační soupravy ver. 2 (Takara Shuzo) tak, že reagovaly při 16 °C po dobu 1 hodiny, podle návodu přiloženého k soupravě.

Ligační směs byla přidána k 100 µl kompetentních buněk *E. coli* JM109 (Nippongene) a byla inkubována po dobu 30 minut na ledu a 1 minutu při 42 °C. Poté bylo k této směsi přidáno 300 µl bujónu Hi-Competence Broth (Nippongene) a inkubováno při 37 °C po dobu 1 hodiny. Pak byla *Escherichia coli* vyseta na agar v LB médiu a inkubována přes noc při 37 °C, aby byl získán transformant *E. coli*. Transformant byl inkubován přes noc ve 3 ml média LBA při 37 °C a z buněčné frakce byla připravena plazmidová DNA pomocí soupravy QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN). Nukleotidová sekvence cDNA kódující oblasti ve výše uvedeném plazmidu byla určena pomocí soupravy Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer) pomocí sekvenátoru DNA Sequencer 373A (Perkin-Elmer). Jako sekvenační primery byly použity M13 Primer 4 (Takara Shuzo) a M13 Primer RV (Takara Shuzo) a sekvence byla určena potvrzením nukleotidové sekvence v obou směrech. Plazmid který obsahuje gen, kódující V oblast L řetězce ATR-5 protilátky a který má rozpoznávací sekvenci pro BglII a Kozakovu konsenzuální sekvenci na 5'-konci a rozpoznávací sekvenci pro SphI na 3'-konci byl označen jako chATR5Lv/CVIDEC.

### (3) Konstrukce expresního vektoru pro chimerní protilátku

Expresní vektor pro chimerní protilátku byl konstruován za použití expresního vektoru pro protilátku zavedeného v IDEC Pharmaceutical. Jako vektory byly použity expresní vektor H5KG1(V) pro protilátku typu IgG1 a expresní vektor N5KG4P pro protilátku typu IgG4. Chimerní vektor pro protilátku ATR-5 byl vytvořen spojením genu kódujícího V oblast H řetězce ATR-5 s Sall-NheI místem umístěným bezprostředně před C oblastí H řetězce lidské protilátky v expresním vektoru N5KG1(V) nebo N5KG4P a spojením genu kódujícího V oblast L řetězce ATR-5 s BglIII-SphI místem umístěným bezprostředně před C oblastí L řetězce lidské protilátky v expresním vektoru N5KG1(V) nebo N5KG4P.

#### (i) Vnesení V oblasti H řetězce

Plazmid chATR5Hv/CVIDEC byl štěpen restriční enzymem NheI (Takara Shuzo) při teplotě 37 °C po dobu 3 hodin a poté restriční enzymem Sall (Takara Shuzo) při teplotě 37 °C po dobu 3 hodin. Štěpící směs byla rozdělena pomocí elektroforézy na agarózovém gelu 1,5% NuSieve GTG (FMC BioProducts) a byly

vyříznuty agarózové proužky, obsahující fragmenty DNA dlouhé asi 450 bázových párů. Agarózové proužky byly extrahovány fenolem s chloroformem, fragmenty DNA byly vysráženy ethanolem a poté rozpuštěny v 20  $\mu$ l TE.

Expresní vektory N5KG1(V) a N5KG4P byly štěpeny restriční enzymem NheI (Takara Shuzo) při teplotě 37 °C po dobu 3 hodin a poté restriční enzymem Sall (Takara Shuzo) při teplotě 37 °C po dobu 3 hodin. Štěpící směs byla rozdělena pomocí elektroforézy na agarózovém gelu 1,5% NuSieve GTG (FMC BioProducts) a byly vyříznuty agarózové proužky, obsahující fragmenty DNA dlouhé asi 9000 bázových párů. Agarózové proužky byly extrahovány fenolem s chloroformem, fragmenty DNA byly vysráženy ethanolem a poté rozpuštěny v 20  $\mu$ l TE.

DNA fragment Sall-NheI, připravený tak jak bylo popsáno výše, obsahující gen kódující V oblast H řetězce a N5KG1(V) nebo N5KG4P štěpené Sall a NheI, byly ligovány pomocí DNA ligační soupravy ver. 2 (Takara Shuzo) tak, že reagovaly při 16 °C po dobu 1 hodiny, podle návodu přiloženého k soupravě.

Ligační směs byla přidána k 100  $\mu$ l kompetentních buněk *E. coli* JM109 (Nippongene) a byla inkubována po dobu 30 minut na ledu a 1 minutu při 42 °C. Poté bylo k této směsi přidáno 300  $\mu$ l bujónu Hi-Competence Broth (Nippongene) a inkubováno při 37 °C po dobu 1 hodiny. Pak byla *Escherichia coli* vyseta na 100  $\mu$ g/ml agar v LBA médiu a inkubována přes noc při 37 °C, aby byl získán transformant *E. coli*. Transformant byl inkubován přes noc ve 3 ml média LBA při 37 °C a z buněčné frakce byla připravena plazmidová DNA pomocí soupravy QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN). Tyto plazmidy, které obsahují geny, kódující H řetězec chimerní protilátky ATR-5 byly označeny jako chATR5Hv/N5KG1(V), respektive chATR5Hv/N5KG4P.

#### (ii) Vnesení V oblasti L řetězce

Plazmid chATR5Lv/CVIDEC byl štěpen restričními enzymy BglII (Takara Shuzo) a SphI (Takara Shuzo) při teplotě 37 °C po dobu 1,5 hodiny. Štěpící směs byla rozdělena pomocí elektroforézy na agarózovém gelu 1,5% NuSieve GTG (FMC BioProducts) a byly vyříznuty agarózové proužky, obsahující fragmenty DNA dlouhé asi 400 bázových párů. Agarózové proužky byly extrahovány fenolem s chloroformem, fragmenty DNA byly vysráženy ethanolem a poté rozpuštěny v 20  $\mu$ l TE.

Plazmidy chATR5Hv/N5KG1(V) a chATR5Hv/N5KG4P byly štěpeny restričními enzymy BglII (Takara Shuzo) a SphI (Takara Shuzo) při teplotě 37 °C po dobu 1,5 hodiny. Štěpící směs byla rozdělena pomocí elektroforézy na agarózovém gelu 1,5%

NuSieve GTG (FMC BioProducts) a byly vyříznuty agarózové proužky, obsahující fragmenty DNA dlouhé asi 9400 bázových párů. Agarózové proužky byly extrahovány fenolem s chloroformem, fragmenty DNA byly vysráženy ethanolem a poté rozpuštěny v 20  $\mu$ l TE.

DNA fragment *SplI*-*BglIII*, připravený tak jak bylo popsáno výše, obsahující gen kódující V oblast L řetězce a *chATR5Hv/N5KG1(V)* nebo *chATR5Hv/N5KG4P* štěpený *SplI* a *BglIII*, byly ligovány pomocí DNA ligační soupravy ver. 2 (Takara Shuzo) tak, že reagovaly při 16 °C po dobu 1 hodiny, podle návodu přiloženého k soupravě.

Ligační směs byla přidána k 100  $\mu$ l kompetentních buněk *E. coli* JM109 (Nippongene) a byla inkubována po dobu 30 minut na ledu a 1 minutu při 42 °C. Poté bylo k této směsi přidáno 300  $\mu$ l bujónu Hi-Competence Broth (Nippongene) a inkubováno při 37 °C po dobu 1 hodiny. Pak byla *Escherichia coli* vyseta na 100  $\mu$ g/ml agar v LBA médiu a inkubována přes noc při 37 °C, aby byl získán transformant *E. coli*. Transformant byl inkubován přes noc při 37 °C v 1 litru média 2xYT, obsahujícím 50  $\mu$ g/ml ampicilinu a z buněčné frakce byla připravena plazmidová DNA pomocí soupravy Plasmid Maxi Kit (QIAGEN). Tyto plazmidy, které obsahují geny, kódující chimerní protilátku ATR-5 byly označeny jako *chATR5/N5KG1(V)*, respektive *chATR5/N5KG4P*.

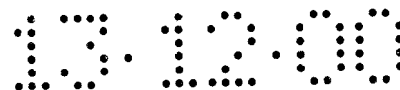
#### (4) Transfekce do buněk COS-7

Aby bylo možno zhodnotit vazebnou aktivitu k antigenu a neutralizační aktivitu chimerní protilátky, byly výše uvedené expresní plazmidy transfekovány do buněk COS-7 a protilátky byly přechodně exprimovány.

Plazmid *chATR5/N5KG1(V)* nebo *chATR5/N5KG4P* byl transdukován do buněk COS-7 elektroporací pomocí přístroje Gene Pulser (Bio Rad). Padesát  $\mu$ g plazmidu bylo přidáno do 0,78 ml buněk COS-7, suspendovaných v PBS (-) podle Dulbecca (označováno zde jako PBS) na buněčnou koncentraci  $1 \times 10^7$  buněk/ml, a směs byla podrobena pulsům 1500 V a při kapacitě 25  $\mu$ F.

Po 10 minutách zotavení při teplotě místnosti, byly elektroporované buňky suspendovány v médiu DMEM, obsahujícím 5% fetální hovězí sérum s ultranízkým obsahem IgG (GIBCO) a kultivovány v 10 cm kultivačních miskách v 5% CO<sub>2</sub> inkubátoru. Po 24 hodinové kultivaci byl odsát supernatant a pak bylo přidáno médium HBCHO bez séra (Irvine Scientific). Po další 72 hodinové kultivaci byl supernatant odebrán a centrifugován, aby byly odstraněny zbytky buněk.

#### (5) Purifikace protilátek



Ze supernatantů buněčných kultur COS-7 byly purifikovány chimerní protilátky pomocí rProtein A Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech) následujícím způsobem.

Jeden mililitr rProtein A Sepharose Fast Flow byl naplněn do sloupce a ten byl ekvilibrován 10 objemy TBS. Supernatant z buněčné kultury COS-7 byl nanesen na ekvilibrovaný sloupec, který byl potom promyt 10 objemy TBS.

Absorbovaná protilátková frakce potom byla vymyta 13,5 ml 2,5 mM HCl (pH 3,0) a eluát byl bezprostředně poté neutralizován přidáním 1,5 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,0).

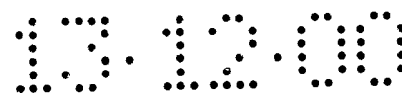
Rozpouštědlo potom bylo u purifikované frakce protilátek zaměněno za 50 mM Tris-HCl (pH 7,6), obsahující 150 mM NaCl (zde označovaný jako TBS) tak, že byla provedena dvakrát ultrafiltrace pomocí přípravků Centriprep 100 (Amicon) a na závěr byla frakce protilátek koncentrována do 1,5 ml.

#### (6) Ustavení stabilně produkující linie buněk CHO

Aby byla ustavena buněčná linie, která bude stabilně produkovat chimerní protilátka, byl výše uvedený expresní plazmid vnesen do buněk CHO (DG44), přizpůsobených růstu v médiu bez séra CHO-S-SFMII (GIBCO).

Plazmid chATR5/N5KG1(V) nebo chATR5/N5KG4P byl štěpen restrikcčním enzymem SspI (Takara Shuzo), aby byla DNA linearizována a po extrakci fenolem a chloroformem byla DNA získána etanolovým srážením. Linearizovaný plazmid byl vnesen do buněk DG44 pomocí elektroporace přístrojem Gene Pulser (Bio Rad). Deset  $\mu\text{g}$  plazmidu bylo přidáno do 0,78 ml buněk DG44, suspendovaných v PBS na buněčnou koncentraci  $1 \times 10^7$  buněk/ml, a směs byla podrobena pulsům 1500 V a při kapacitě 25  $\mu\text{F}$ .

Po 10 minutách zotavení při teplotě místnosti, byly elektroporované buňky suspendovány v médiu CHO-S-SFMII (GIBCO), obsahujícím hypoxanthin/thymidin (GIBCO) a kultivovány ve dvou 96-jamkových kultivačních destičkách (Falcon) v 5%  $\text{CO}_2$  inkubátoru. Jeden den po započetí kultivace bylo médium zaměněno za selekční médium CHO-S-SFMII (GIBCO) s obsahem hypoxanthinu/thymidinu (GIBCO) a 500  $\mu\text{g/ml}$  GENETICIN (G418 sulfát GIBCO), aby byly selektovány buňky, do nichž byl vnesen gen pro protilátku. Dva týdny po výměně selekčního média byly buňky prohlíženy pod mikroskopem. Když byl pozorován dobrý buněčný růst, bylo měřeno množství produkované protilátky pomocí ELISA testu, jehož provedení pro měření koncentrace protilátky je popsáno níže, a byly vybrány buňky vykazující vysokou produkci protilátky.



### Příklad 3: Konstrukce zušlechtěné protilátky

#### (1) Konstrukce H řetězce zušlechtěné protilátky

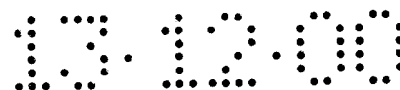
##### (i) Konstrukce verze „a“ zušlechtěného H řetězce

H řetězec zušlechtěné protilátky ATR-5 byl vytvořen přenosem CDR pomocí PCR metody. Aby byla vytvořena verze „a“ H řetězce zušlechtěné protilátky, která má FRs odvozené z lidské protilátky L39130 (DDBJ, Gao L. a kol., nepublikováno, 1995), bylo použito 7 primerů. Primery pro přenos CDR hR5Hv1S (SEQ ID NO: 22), hR5Hv2S (SEQ ID NO: 23) a hR5Hv4S (SEQ ID NO: 24) mají DNA sekvenci proti směru přepisu DNA a primery pro přenos CDR hR5Hv3A (SEQ ID NO: 25) a hR5Hv4A (SEQ ID NO: 26) mají DNA sekvenci ve směru přepisu DNA, přičemž každý primer má 18 až 35 bázových párů komplementární sekvence na obou svých koncích.

Primer hR5Hv1S byl navržen tak, aby měl Kozakovu konsensuální sekvenci (Kozak, M. a kol., J. Mol. Biol. 196: 947-950, 1987) a rozpoznávací místo pro Sall a hR5Hv5A je navržen tak, aby měl rozpoznávací místo pro NheI. Vnější primery hR5HvPrS (SEQ ID NO: 27) má homologii s primerem pro přenos CDR hR5Hv1S a hR5HvPrA (SEQ ID NO: 28) má homologii s primerem pro přenos CDR hR5Hv5A.

Primery pro přenos CDR hR5Hv1S, hR5Hv2S, hR5Hv3A, hR5Hv4S a hR5Hv5A, a vnější primery hR5HvPrS a hR5HvPrA byly syntetizovány a purifikovány ve Pharmacia Biotech.

PCR reakce byla provedena pomocí KOD DNA polymerázy (Toyo Boseki) za použití přiloženého pufru za těchto podmínek: 120 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM KCl, 6 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,1% Triton X-100, 0,001% BSA, 0,2 mM deoxyribonukleotidtrifosfáty (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2,5 jednotky KOD DNA polymerázy (Toyo Boseki) a 5 pmol každého z primerů pro přenos CDR hR5Hv1S, hR5Hv2S, hR5Hv3A, hR5Hv4S a hR5Hv5A v objemu 98  $\mu\text{l}$ , a to 5 cyklů při teplotách 94 °C po dobu 30 vteřin, 50 °C po dobu 1 minuty a 72 °C po dobu 1 minuty. Po dalším přidání 100 pM vnějších primerů hR5HvPrS a hR5HvPrA byla provedena PCR reakce 25 cyklů v objemu 100  $\mu\text{l}$  při stejných teplotních cyklech. ch5HS a primeru ch5HA a 1  $\mu\text{l}$  plazmidu ATR5Hv/pUC19 jako matricovou DNA. Fragmenty DNA amplifikované PCR reakcí byly rozděleny pomocí elektroforézy na agarózovém gelu 2% NuSieve GTG (FMC BioProducts).



Agarózové proužky, obsahující fragmenty DNA dlouhé asi 430 bázových párů byly vyříznuty, byly k nim přidány tři objemy (ml/g) pufru TE a poté extrahovány fenolem, fenolem s chloroformem a chloroformem, aby byly DNA fragmenty purifikovány. Po precipitaci purifikované DNA etanolem byla třetina objemu rozpuštěna v 17  $\mu$ l vody. Získaná PCR reakční směs byla štěpena NheI a Sall, a potom ligována do plazmidového vektoru CVIDEC, připraveného štěpením NheI a Sall pomocí DNA ligační soupravy ver. 2 (Takara Shuzo) podle návodu přiloženého k soupravě.

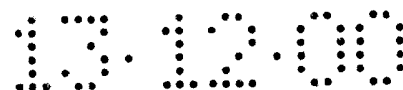
Ligační směs byla přidána k 100  $\mu$ l kompetentních buněk *E. coli* JM109 (Nippongene) a byla inkubována po dobu 30 minut na ledu a 1 minutu při 42 °C. Poté bylo k této směsi přidáno 300  $\mu$ l bujónu Hi-Competence Broth (Nippongene) a inkubováno při 37 °C po dobu 1 hodiny, pak byla *E. coli* vyseta na agar v LBA médiu a inkubována přes noc při 37 °C, aby byl získán transformant *E. coli*. Transformant byl inkubován přes noc ve 3 ml média LBA při 37 °C a z buněčné frakce byla připravena plazmidová DNA pomocí soupravy QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN).

Nukleotidová sekvence cDNA kódující oblast v plazmidu byla určena pomocí soupravy Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer) pomocí sekvenátoru DNA Sequencer 373A (Perkin-Elmer). Jako sekvenační primery byly použity M13 Primer 4 (Takara Shuzo) a M13 Primer RV (Takara Shuzo) a sekvence byla určena potvrzením nukleotidové sekvence v obou směrech.

Protože byly pozorovány mutace anebo delece před a za rozpoznávacím místem pro EcoT221, byl každý z fragmentů, který měl správnou sekvenci, ligován a potom znovu subklonován v CVIDEC pro určení nukleotidové sekvence. Plazmid který měl správnou sekvenci byl označen jako hATR5Hva/CVIDEC. Nukleotidová sekvence a jí odpovídající aminokyselinová sekvence verze „a“ zušlechtěného H řetězce, která je obsažena v plazmidu hATR5Hva/CVIDEC, jsou uvedeny v SEQ ID NO: 29. Aminokyselinová sekvence verze „a“ je také ukázána v SEQ ID NO: 30.

(ii) Konstrukce verzí „b“ a „c“ zušlechtěného H řetězce

Verze „b“ a „c“ byly připraveny záměnou FR3 verze „a“ za FR3, odvozenou z jiné lidské protilátky, pomocí metody záměny FR. Aby byla zaměněna verze FR3 ve verzi „b“ za jinou odvozenou z lidské protilátky Z34963 (DDBJ, Borretzen M. a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 12917-12921, 1994), byly použity 4 primery, kódující FR3. Primery pro záměnu FR F3RFFS (SEQ ID NO: 31) a F3RFBS (SEQ ID NO: 32) mají DNA sekvenci proti směru přepisu DNA a primery F3RFFA (SEQ ID NO: 33) a F3RFBA



(SEQ ID NO: 34) mají DNA sekvenci ve směru přepisu DNA. Primery F3RFFS a F3RFFA mají vzájemně komplementární sekvence a mají na obou koncích rozpoznávací sekvence pro XhoI a NcoI.

Aby byla zaměněna verze FR3 ve verzi „c“ za jinou odvozenou z lidské protilátky P01825 (SWISS-PROT, Poljak R.J. a kol., Biochemistry, 16: 3412-3420, 1977), byly použity 4 primery, kódující FR3. Primery pro záměnu FR F3NMFS (SEQ ID NO: 35) a F3NMBS (SEQ ID NO: 36) mají DNA sekvenci proti směru přepisu DNA a primery F3NMFA (SEQ ID NO: 37) a F3NMBA (SEQ ID NO: 38) mají DNA sekvenci ve směru přepisu DNA.

Primery F3NMFS a F3NMFA mají vzájemně komplementární sekvence a mají na obou koncích rozpoznávací sekvence pro Ball a XhoI.

Primery F3RFFS, F3RFBS, F3RFFA, F3RFBA, F3NMFS, F3NMBS, F3NMFA a F3NMBA byla syntetizována ve Pharmacia Biotech. Primery F3NMFA a F3NMBA, respektive F3RFBS a F3RFBA byly teplotně hybridizovány a štěpeny Ball a XhoI, respektive NcoI a XhoI. Byly vneseny do plazmidu hATR5Hva/CVIDEC (Ball/NcoI), připraveného štěpením Ball a NcoI a byla určena jeho nukleotidová sekvence. Plazmid který měl správnou sekvenci byl označen hATR5Hvb/CVIDEC. Nukleotidová sekvence a jí odpovídající aminokyselinová sekvence verze „b“ zušlechtěného H řetězce, která je obsažena v plazmidu hATR5Hvb/CVIDEC, jsou uvedeny v SEQ ID NO: 39. Aminokyselinová sekvence verze „b“ je také ukázána v SEQ ID NO: 40.

Primery F3NMFS a F3NMFA, respektive F3NMBS a F3NMBA byly teplotně hybridizovány a štěpeny Ball a XhoI, respektive NcoI a XhoI. Byly vneseny do plazmidu hATR5Hva/CVIDEC (Ball/NcoI), připraveného štěpením Ball a NcoI a byla určena jeho nukleotidová sekvence. Plazmid který měl správnou sekvenci byl označen hATR5HvC/CVIDEC. Nukleotidová sekvence a jí odpovídající aminokyselinová sekvence verze „C“ zušlechtěného H řetězce, která je obsažena v plazmidu hATR5HvC/CVIDEC, jsou uvedeny v SEQ ID NO: 41. Aminokyselinová sekvence verze „C“ je také ukázána v SEQ ID NO: 42.

(iii) Konstrukce verzí „d“ a „e“ zušlechtěného H řetězce

Verze „d“ a „e“ byly připraveny záměnou FR3 verze „a“ za FR3, odvozenou z jiné lidské protilátky, pomocí metody záměny FR. Aby byla zaměněna verze FR3 ve verzi „d“ za jinou odvozenou z lidské protilátky M62723 (DDBJ, Pascual V. a kol., J. Clin. Invest., 86: 1320-1328, 1990), byly použity 4 primery, kódující FR3. Primer pro záměnu





FR F3EPS (SEQ ID NO: 43) má DNA sekvenci proti směru přepisu DNA a primer F3EPA (SEQ ID NO: 44) má DNA sekvenci ve směru přepisu DNA a 3'-konce primerů mají vzájemně komplementární sekvence 18 bázových párů dlouhé.

Vnější primery F3PrS (SEQ ID NO: 45) a F3PrA (SEQ ID NO: 46) mají homologii s primery pro záměnu FR F3EPS a F3EPA a mohou také být použity pro záměnu jiných FR. Aby byla zaměněna verze FR3 ve verzi „e“ za jinou odvozenou z lidské protilátky Z80844 (DDBJ, Thomsett AR. a kol., nepublikováno), byly vytvořeny 2 primery, kódující FR3. Primery pro záměnu FR F3VHS (SEQ ID NO: 47) má DNA sekvenci proti směru přepisu DNA a primer F3VHA (SEQ ID NO: 48) má DNA sekvenci ve směru přepisu DNA a 3'-konce primerů mají vzájemně komplementární sekvence 18 bázových párů dlouhé. F3EPS, F3EPA, F3PrS, F3PrA, F3VHS a F3VHA byly syntetizovány ve Pharmacia Biotech.

PCR reakce byla provedena pomocí KOD DNA polymerázy (Toyo Boseki) za použití přiloženého pufru za podmínek, kdy obsahovala 5  $\mu$ l 1  $\mu$ M primerů pro záměnu FR F3EPS a F3EPA nebo F3VHS a F3VHA, 0,2 mM deoxyribonukleotidtrifosfáty, 1 mM  $MgCl_2$  a 2,5 jednotky KOD DNA polymerázy v objemu 100  $\mu$ l reakční směsi, a to 5 cyklů při teplotách 94 °C po dobu 30 vteřin, 50 °C po dobu 1 minuty a 74 °C po dobu 1 minuty. Po dalším přidání 100 pM vnějších primerů F3PrS a F3PrA, byla provedena PCR reakce 25 cyklů při stejných teplotních cyklech.

Fragmenty DNA amplifikované PCR reakcí byly rozděleny pomocí elektroforézy na agarózovém gelu 2% NuSieve GTG (FMC BioProducts). Agarózové proužky, obsahující fragmenty DNA dlouhé asi 424 bázových párů byly vyříznuty, byly k nim přidány tři objemy (ml/g) pufru TE a poté extrahovány fenolem, fenolem s chloroformem a chloroformem, aby byly DNA fragmenty purifikovány. Po precipitaci purifikované DNA etanolem byla třetina objemu rozpuštěna v 14  $\mu$ l vody. Získaná PCR reakční směs byla štěpena Ball a NcoI, a potom ligována do plazmidového vektoru hATR5Hva/CVIDEC (Ball/NcoI), připraveného štěpením Ball a NcoI, a byla určena nukleotidová sekvence. Plazmidy které měly správnou sekvenci byly označeny jako hATR5Hvd/CVIDEC a hATR5Hve/CVIDEC. Nukleotidová sekvence a jí odpovídající aminokyselinová sekvence verze „d“ zušlechtěného H řetězce, která je obsažena v plazmidu hATR5Hvd/CVIDEC, jsou uvedeny v SEQ ID NO: 49, a aminokyselinová sekvence verze „d“ je také ukázána v SEQ ID NO: 50. Nukleotidová sekvence a jí odpovídající aminokyselinová sekvence verze „e“ zušlechtěného H řetězce, která je obsažena



v plazmidu hATR5Hve/CVIDEC, jsou uvedeny v SEQ ID NO: 51, a aminokyselinová sekvence verze „e“ je také ukázána v SEQ ID NO: 52.

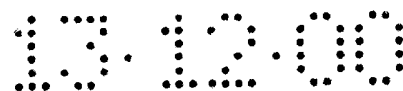
(iv) Konstrukce verzí „f“ a „g“ zušlechťeného H řetězce

Verze „f“ a „g“ byly připraveny záměnou FR3 verze „a“ za FR3, odvozenou z jiné lidské protilátky, pomocí metody záměny FR. Aby byla zaměněna verze FR3 ve verzi „f“ za jinou odvozenou z lidské protilátky L04345 (DDBJ, Hillson JL. a kol., J. Exp. Med., 178: 331-336, 1993) a aby byla zaměněna verze FR3 ve verzi „g“ za jinou odvozenou z lidské protilátky S78322 (DDBJ, Bejcek BE. a kol., Cancer Res., 55: 2346-2351, 1995) byly syntetizovány 2 primery, každý kódující FR3. Primer pro záměnu FR F3SSS (SEQ ID NO: 53) verze „f“ má DNA sekvenci proti směru přepisu DNA a primer F3SSA (SEQ ID NO: 54) má DNA sekvenci ve směru přepisu DNA a 3'-konce primerů mají vzájemně komplementární sekvence 18 bázových párů dlouhé.

Primer F3CDS (SEQ ID NO: 55) verze „g“ má DNA sekvenci proti směru přepisu DNA a primer F3CDA (SEQ ID NO: 56) má DNA sekvenci ve směru přepisu DNA a 3'-konce primerů mají vzájemně komplementární sekvence 18 bázových párů dlouhé. F3SSS, F3SSA, F3CDS a F3CDA byly syntetizovány a purifikovány ve Pharmacia Biotech. PCR reakce byla provedena pomocí KOD DNA polymerázy (Toyo Boseki) za použití přiloženého pufru za podmínek, kdy obsahovala 5  $\mu$ l 1  $\mu$ M primerů pro záměnu FR F3SSS a F3SSA nebo F3CDS a F3CDA, 0,2 mM deoxyribonukleotidtrifosfáty, 1 mM  $MgCl_2$  a 2,5 jednotky KOD DNA polymerázy v objemu 100  $\mu$ l reakční směsi, a to 5 cyklů při teplotách 94 °C po dobu 30 vteřin, 50 °C po dobu 1 minuty a 74 °C po dobu 1 minuty. Po dalším přidání 100 pM vnějších primerů F3PrS a F3PrA, byla provedena PCR reakce 25 cyklů při stejných teplotních cyklech.

Fragmenty DNA amplifikované PCR reakcí byly rozděleny pomocí elektroforézy na agarózovém gelu 2% NuSieve GTG (FMC BioProducts). Agarózové proužky, obsahující fragmenty DNA dlouhé asi 424 bázových párů byly vyříznuty, byly k nim přidány tři objemy (ml/g) pufru TE a poté extrahovány fenolem, fenolem s chloroformem a chloroformem, aby byly DNA fragmenty purifikovány. Po precipitaci purifikované DNA etanolem byla třetina objemu rozpuštěna v 14  $\mu$ l vody. Získaná PCR reakční směs byla štěpena Ball a NcoI, a potom ligována do plazmidového vektoru hATR5Hva/CVIDEC (Ball/NcoI), připraveného štěpením Ball a NcoI, a byla určena nukleotidová sekvence.

Plazmidy které měly správnou sekvenci byly označeny jako hATR5Hvf/CVIDEC a hATR5Hvg/CVIDEC. Nukleotidová sekvence a jí odpovídající aminokyselinová



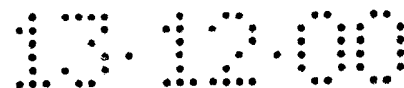
sekvence verze „f“ zušlechtěného H řetězce, která je obsažena v plazmidu hATR5Hvf/CVIDEC a aminokyselinová sekvence verze „f“ jsou uvedeny v SEQ ID NO: 57 a SEQ ID NO: 58. Nukleotidová sekvence a jí odpovídající aminokyselinová sekvence verze „g“ zušlechtěného H řetězce, která je obsažena v plazmidu hATR5Hvg/CVIDEC a aminokyselinová sekvence verze „g“, jsou uvedeny v SEQ ID NO: 59 a SEQ ID NO: 60.

(v) Konstrukce verze „h“ zušlechtěného H řetězce

Verze „h“ byla připravena záměnou FR3 verze „a“ za FR3, odvozenou z jiné lidské protilátky, pomocí metody záměny FR. Aby byla zaměněna verze FR3 ve verzi „h“ za jinou odvozenou z lidské protilátky Z26827 (DDBJ, van Der Stoep a kol., J. Exp. Med., 177: 99-107, 1993) byly syntetizovány 2 primery, každý kódující FR3. Primer pro záměnu FR F3ADS (SEQ ID NO: 61) verze „h“ má DNA sekvenci proti směru přepisu DNA a primer F3ADA (SEQ ID NO: 62) má DNA sekvenci ve směru přepisu DNA a 3'-konce primerů mají vzájemně komplementární sekvence 18 bázových párů dlouhé.

Primery F3ADS a F3ADA byly syntetizovány a purifikovány ve Pharmacia Biotech. PCR reakce byla provedena pomocí KOD DNA polymerázy (Toyo Boseki) za použití přiloženého pufru za podmínek, kdy obsahovala 5  $\mu$ l 1  $\mu$ M primerů pro záměnu FR F3ADS a F3ADA, 0,2 mM deoxyribonukleotidtrifosfáty, 1 mM MgCl<sub>2</sub> a 2,5 jednotky KOD DNA polymerázy v objemu 100  $\mu$ l reakční směsi, a to 5 cyklů při teplotách 94 °C po dobu 30 vteřin, 50 °C po dobu 1 minuty a 74 °C po dobu 1 minuty. Po dalším přidání 100 pM vnějších primerů F3PrS a F3PrA, byla provedena PCR reakce 25 cyklů při stejných teplotních cyklech. Fragmenty DNA amplifikované PCR reakcí byly rozděleny pomocí elektroforézy na agarózovém gelu 2% NuSieve GTG (FMC BioProducts).

Agarózové proužky, obsahující fragmenty DNA dlouhé asi 424 bázových párů byly vyříznuty, byly k nim přidány tři objemy (ml/g) pufru TE a poté extrahovány fenolem, fenolem s chloroformem a chloroformem, aby byly DNA fragmenty purifikovány. Po precipitaci purifikované DNA etanolem byla třetina objemu rozpuštěna v 14  $\mu$ l vody. Získaná PCR reakční směs byla štěpena Ball a NcoI, a potom ligována do plazmidu hATR5Hva/CVIDEC (Ball/NcoI), připraveného štěpením Ball a NcoI, a byla určena nukleotidová sekvence. Plazmidy které měly správnou sekvenci byly označeny jako hATR5Hvh/CVIDEC. Nukleotidová sekvence a jí odpovídající aminokyselinová sekvence verze „h“ zušlechtěného H řetězce, která je obsažena v plazmidu



hATR5Hvh/CVIDEC a aminokyselinová sekvence verze „h“ jsou uvedeny v SEQ ID NO: 63. Aminokyselinová sekvence verze „h“ je uvedena v SEQ ID NO: 64.

(vi) Konstrukce verzí „i“ a „j“ zušlechtěného H řetězce

Verze „i“ a „j“ byly připraveny záměnou FR3 verze „a“ za FR3, odvozenou z jiné lidské protilátky, pomocí metody záměny FR. Aby byla zaměněna verze FR3 ve verzi „i“ za jinou odvozenou z lidské protilátky U95239 (DDBJ, Manheimer-Lory AAJ. nepublikováno) a aby byla zaměněna verze FR3 ve verzi „j“ za jinou odvozenou (U95239: 10026-10030, 1992) byly syntetizovány 2 primery, každý kódující FR3. Primer pro záměnu FR F3MMS (SEQ ID NO: 65) verze „i“ má DNA sekvenci proti směru přepisu DNA a primer F3MMA (SEQ ID NO: 66) má DNA sekvenci ve směru přepisu DNA a 3'-konce primerů mají vzájemně komplementární sekvence 18 bázových párů dlouhé.

Primer F3BMS (SEQ ID NO: 67) verze „j“ má DNA sekvenci proti směru přepisu DNA a primer F3BMA (SEQ ID NO: 68) má DNA sekvenci ve směru přepisu DNA a 3'-konce primerů mají vzájemně komplementární sekvence 18 bázových párů dlouhé. F3MMS, F3MMA, F3BMS a F3BMA byly syntetizovány a purifikovány ve Pharmacia Biotech. PCR reakce byla provedena pomocí Ampli Taq Gold (Perkin Elmer) za použití přiloženého pufru za podmínek, kdy obsahovala 5  $\mu$ l 1  $\mu$ M primerů pro záměnu FR F3MMS a F3MMA nebo F3BMS a F3BMA, 0,2 mM deoxyribonukleotidtrifosfáty, 1 mM  $MgCl_2$  a 2,5 jednotky Ampli Taq Gold v objemu 100  $\mu$ l reakční směsi, a to 5 cyklů při teplotách 94 °C po dobu 30 vteřin, 50 °C po dobu 1 minuty a 74 °C po dobu 1 minuty. Po dalším přidání 100 pM vnějších primerů F3PrS a F3PrA, byla provedena PCR reakce 25 cyklů při stejných teplotních cyklech.

Fragmenty DNA amplifikované PCR reakcí byly rozděleny pomocí elektroforézy na agarózovém gelu 2% NuSieve GTG (FMC BioProducts). Agarózové proužky, obsahující fragmenty DNA dlouhé asi 424 bázových párů byly vyříznuty, byly k nim přidány tři objemy (ml/g) pufru TE a poté extrahovány fenolem, fenolem s chloroformem a chloroformem, aby byly DNA fragmenty purifikovány. Po precipitaci purifikované DNA etanolem byla třetina objemu rozpuštěna v 14  $\mu$ l vody. Získaná PCR reakční směs byla štěpena Ball a NcoI, a potom ligována do plazmidového vektoru hATR5Hva/CVIDEC (Ball/NcoI), připraveného štěpením Ball a NcoI, a byla určena nukleotidová sekvence.

Plazmidy které měly správnou sekvenci byly označeny jako hATR5Hvi/CVIDEC a hATR5Hvj/CVIDEC. Nukleotidová sekvence a jí odpovídající aminokyselinová sekvence verze „i“ zušlechtěného H řetězce, která je obsažena v plazmidu



hATR5Hvi/CVIDEC a aminokyselinová sekvence verze „i“ jsou uvedeny v SEQ ID NO: 69 a SEQ ID NO: 70. Nukleotidová sekvence a jí odpovídající aminokyselinová sekvence verze „j“ zušlechtěného H řetězce, která je obsažena v plazmidu hATR5Hvj/CVIDEC a aminokyselinová sekvence verze „j“, jsou uvedeny v SEQ ID NO: 71 a SEQ ID NO: 72.

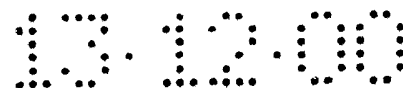
(vii) Konstrukce verzí „b1“ a „d1“ zušlechtěného H řetězce

Verze „b1“ a „d1“ byly připraveny záměnou FR3 verzích „b“ a „d“ za FR2, odvozenou z jiné lidské protilátky, pomocí metody záměny FR. Aby byla zaměněna verze FR2 za jinou odvozenou z lidské protilátky P01742 (SWISS-PROT, Cunningham BA. Biochemistry, 9: 3161-3171, 1970), byly syntetizovány 2 primery kódující FR2. Primer pro záměnu FR F2MPS (SEQ ID NO: 73) má DNA sekvenci proti směru přepisu DNA a primer F2MPA (SEQ ID NO: 74) má DNA sekvenci ve směru přepisu DNA. Také mají vzájemně komplementární sekvence a rozpoznávací místa pro EcoT221 a Ball na obou svých koncích.

Primery F2MPS a F2MPA byly syntetizovány a purifikovány ve Pharmacia Biotech. Primery F2MPS a F2MPA byly teplotně hybridizovány a štěpeny EcoT221 a Ball. Byly vneseny do plazmidů hATR5Hvb/CVIDEC (EcoT221/Ball) a hATR5Hvd/CVIDEC (EcoT221/Ball) připravených štěpením EcoT221 a Ball, a byla určena nukleotidová sekvence. Plazmidy které měly správnou sekvenci byly označeny jako hATR5Hvb1/CVIDEC a hATR5Hvd1/CVIDEC. Nukleotidová sekvence a jí odpovídající aminokyselinová sekvence verze „b1“ zušlechtěného H řetězce, která je obsažena v plazmidu hATR5Hvb1/CVIDEC a aminokyselinová sekvence verze „b1“ jsou uvedeny v SEQ ID NO: 75 a SEQ ID NO: 76. Nukleotidová sekvence a jí odpovídající aminokyselinová sekvence verze „d1“ zušlechtěného H řetězce, která je obsažena v plazmidu hATR5Hvd1/CVIDEC a aminokyselinová sekvence verze „d1“, jsou uvedeny v SEQ ID NO: 77 a SEQ ID NO: 78.

(viii) Konstrukce verzí „b3“ a „d3“ zušlechtěného H řetězce

Verze „b3“ a „d3“ byly připraveny záměnou FR3 verzích „b“ a „d“ za FR2, odvozenou z jiné lidské protilátky, pomocí metody záměny FR. Aby byla zaměněna verze FR2 za jinou odvozenou z lidské protilátky Z80844 (DDDJ, Thomsett AR. a kol., nepublikováno), byly syntetizovány 2 primery kódující FR2. Primer pro záměnu FR F2VHS (SEQ ID NO: 79) má DNA sekvenci proti směru přepisu DNA a primer F2VHA (SEQ ID NO: 80) má DNA sekvenci ve směru přepisu DNA. Také mají vzájemně



komplementární sekvence a rozpoznávací místa pro EcoT221 a Ball na obou svých koncích. Syntéza a purifikace primery F2VHS a F2VHA byly zadány Pharmacia Biotech.

Primery F2VHS a F2VHA byly teplotně hybridizovány a štěpeny EcoT221 a Ball. Byly vneseny do plazmidů hATR5Hvb/CVIDEC (EcoT221/Ball) a hATR5Hvd/CVIDEC (EcoT221/Ball) připravených štěpením EcoT221 a Ball, a byla určena nukleotidová sekvence. Plazmidy které měly správnou sekvenci byly označeny jako hATR5Hvb3/CVIDEC a hATR5Hvd3/CVIDEC. Nukleotidová sekvence a jí odpovídající aminokyselinová sekvence verze „b3“ zušlechtěného H řetězce, která je obsažena v plazmidu hATR5Hvb3/CVIDEC a aminokyselinová sekvence verze „b3“ jsou uvedeny v SEQ ID NO: 81 a SEQ ID NO: 82. Nukleotidová sekvence a jí odpovídající aminokyselinová sekvence verze „d3“ zušlechtěného H řetězce, která je obsažena v plazmidu hATR5Hvd3/CVIDEC a aminokyselinová sekvence verze „d3“, jsou uvedeny v SEQ ID NO: 83 a SEQ ID NO: 84.

(2) Konstrukce V oblasti L řetězce zušlechtěné protilátky

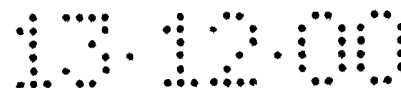
(i) verze „a“

V oblast L řetězce zušlechtěné protilátky ATR-5 byl vytvořen přenosem CDR pomocí PCR metody. Aby byla vytvořen L řetězec zušlechtěné protilátky (verze „a“), která má podpurné oblasti odvozené z lidské protilátky Z37332 (DDBJ, Welschof M. a kol., J. Immunol. Methods, 179: 203-214, 1995), bylo použito 7 primerů.

Primery pro přenos CDR h5Lv1S (SEQ ID NO: 85) a h5Lv4S (SEQ ID NO: 86) mají DNA sekvenci proti směru přepisu DNA a primery pro přenos CDR h5Lv2A (SEQ ID NO: 87), h5Lv3A (SEQ ID NO: 88) a h5Lv5A (SEQ ID NO: 89) mají DNA sekvenci ve směru přepisu DNA, přičemž každý primer má 20 bázových párů komplementární sekvence na obou svých koncích. Vnější primery h5LvS (SEQ ID NO: 90) a h5LvA (SEQ ID NO: 91) mají homologii s primery pro přenos CDR h5Lv1S a h5Lv5A.

Syntetiza a purifikace primerů pro přenos CDR h5Lv1S, h5Lv4S, h5Lv2A, h5Lv3A, h5Lv5A, h5LvS a h5LvA byly zadány ve Pharmacia Biotech.

PCR reakční roztoky obsahovaly ve 100  $\mu$ l 120 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM KCl, 6 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,1% Triton X-100, 0,001% BSA, 0,2 mM deoxyribonukleotidtrifosfáty (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2,5 jednotky KOD DNA polymerázy (Toyo Boseki) a 50 pmol primerů pro přenos CDR h5Lv1S, h5Lv4S, h5Lv2A, h5Lv3A a h5Lv5A.



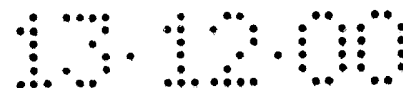
PCR byla provedena v DNA termálním cykleru 480 (Perkin-Elmer) a to 5 cyklů při teplotách 94 °C po dobu 30 vteřin, 50 °C po dobu 1 minuty a 72 °C po dobu 1 minuty, aby se 5 primerů pro přenos CDR sestavilo. Po dalším přidání 100 pM vnějších primerů h5LvS a h5LvA byla provedena PCR reakce 30 cyklů při teplotách 94 °C po dobu 30 vteřin, 52 °C po dobu 1 minuty a 72 °C po dobu 1 minuty pro amplifikaci sestavených DNA fragmentů.

PCR reakční směs byla rozdělena pomocí elektroforézy na agarózovém gelu 3% NuSieve GTG (FMC BioProducts) a agarózové proužky, obsahující fragmenty DNA dlouhé asi 400 bázových párů byly vyříznuty. Agarózové proužky byly extrahovány fenolem s chloroformem a DNA fragmenty byly získány etanolovou precipitací. Získané DNA fragmenty byly štěpeny restričními enzymy S<sub>ph</sub>I (Takara Shuzo) a B<sub>gl</sub>III (Takara Shuzo) při 30 °C po dobu 4 hodin. Štěpící směs byla extrahována fenolem s chloroformem a po etanolové precipitaci byla DNA fragmenty rozpuštěny v 10  $\mu$ l TE. DNA fragment S<sub>ph</sub>I-B<sub>gl</sub>III, připravený jak bylo popsáno výše a kódující V oblast zušlechtěného L řetězce a vektor CVIDEC, připravený štěpením S<sub>ph</sub>I a B<sub>gl</sub>III byly potom ligovány pomocí DNA ligační soupravy ver. 2 (Takara Shuzo) podle návodu přiloženého k soupravě.

Ligační směs byla přidána k 100  $\mu$ l kompetentních buněk *E. coli* JM109 (Nippongene) a byla inkubována po dobu 30 minut na ledu a 1 minutu při 42 °C. Poté bylo k této směsi přidáno 300  $\mu$ l bujónu Hi-Competence Broth (Nippongene) a inkubováno při 37 °C po dobu 1 hodiny, pak byla *E. coli* vyseta na agar v LBA médiu a inkubována přes noc při 37 °C, aby byl získán transformant *E. coli*. Transformant byl inkubován přes noc ve 3 ml média LBA a z buněčných frakcí byla připravena plazmidová DNA pomocí soupravy QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN).

Nukleotidová sekvence cDNA kódující oblasti v plazmidu byla určena pomocí soupravy Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer) pomocí sekvenátoru DNA Sequencer 373A (Perkin-Elmer). Jako sekvenační primery byly použity M13 Primer 4 (Takara Shuzo) a M13 Primer RV (Takara Shuzo) a sekvence byla určena potvrzením nukleotidové sekvence v obou směrech.

Plazmid který obsahuje gen kódující V oblast L řetězce zušlechtěné protilátky a který má rozpoznávací sekvenci pro B<sub>gl</sub>III a Kozakovu sekvenci na 5'-konci, a rozpoznávací sekvenci pro S<sub>ph</sub>I na 3'-konci byl označen jako hATR5LvA/CVIDEC. Nukleotidová sekvence (včetně jí odpovídající aminokyselinové sekvence) verze „a“



zušlechtěného L řetězce je uvedený v SEQ ID NO: 92. Aminokyselinová sekvence verze „a“ je také ukázána v SEQ ID NO: 93.

(ii) Verze „b“ a „c“

Verze „b“ a „c“ byly připraveny záměnou (metoda záměny FR) FR3 verze „a“. Pro verzi „b“ byla použita FR3 odvozená z lidské protilátky S68699 (DDBJ, Houghs L. a kol., *Exp. Clin. Immunogen et.*, 10: 141-151, 1993) a pro verzi „c“ byla použita FR3 odvozená z lidské protilátky P01607 (SWISS-PROT, Epp O. a kol., *Biochemistry*, 14: 4943-4952, 1975).

Primery F3SS (SEQ ID NO: 94) a F3SA (SEQ ID NO: 95) kódující FR3 verze „b“, nebo primery F3RS (SEQ ID NO: 96) a F3RA (SEQ ID NO: 97) kódující FR3 verze „c“ mají vzájemně komplementární sekvence a mají na obou koncích rozpoznávací sekvence pro restrikční enzymy KpnI a PstI.

Syntéza a purifikace primerů F3SS, F3SA, F3RS a F3RA byla zadána ve Pharmacia Biotech. 100 pM primerů F3SS a F3SA, respektive F3RS a F3RA bylo teplotně hybridizováno při 96 °C po dobu 2 minut a při 50 °C po dobu 2 minut a byly tak vytvořeny dvojřetězcové DNA fragmenty.

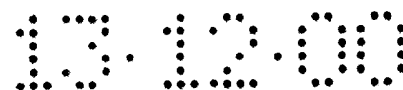
Tyto dvojřetězcové DNA fragmenty byly štěpeny restrikčním enzymem KpnI (Takara Shuzo) při 37 °C po dobu 1 hodiny a potom restrikčním enzymem Pst (Takara Shuzo) při 37 °C po dobu 1 hodiny. Štěpící směs byla extrahována fenolem a chloroformem a po její precipitaci etanolem byla rozpuštěna v 10 µl TE.

Plazmid hATR5Lva/CVIDEC byl štěpen restrikčním enzymem KpnI (Takara Shuzo) při 37 °C po dobu 1 hodiny a potom restrikčním enzymem Pst (Takara Shuzo) při 37 °C po dobu 1 hodiny. Štěpící směs byla rozdělena pomocí agarové elektroforézy na 1,5% NuSieve GTC (FMC BioProducts) a byly vyříznuty agaróзовые proužky, obsahující DNA fragmenty dlouhé okolo 3000 bázových párů. Agaróзовые proužky byly extrahovány fenolem a chloroformem a po precipitaci DNA fragmentů etanolem, byly tyto rozpuštěny v TE.

DNA fragment KpnI-PstI, připravený jak bylo popsáno výše, kódující FR3 verzi „b“ nebo „c“ a vektor hATR5Lva/CVIDEC, z něhož byla FR3 odstraněna štěpením s KpnI a PstI, byly potom ligovány pomocí DNA ligační soupravy ver. 2 (Takara Shuzo) podle návodu přiloženého k soupravě.

Ligační směs byla přidána k 100 µl kompetentních buněk *E. coli* JM109 (Nippongene) a byla inkubována po dobu 30 minut na ledu a 1 minutu při 42 °C. Poté





bylo k této směsi přidáno 300  $\mu$ l bujónu Hi-Competence Broth (Nippongene) a inkubováno při 37 °C po dobu 1 hodiny, pak byla *E. coli* vyseta na agar v LBA médiu a inkubována přes noc při 37 °C, aby byl získán transformant *E. coli*. Transformant byl inkubován přes noc ve 3 ml média LBA a z buněčných frakcí byla připravena plazmidová DNA pomocí soupravy QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN).

Nukleotidová sekvence cDNA kódující oblasti v plazmidu byla určena pomocí soupravy Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer) pomocí sekvenátoru DNA Sequencer 373A (Perkin-Elmer). Jako sekvenační primery byly použity M13 Primer 4 (Takara Shuzo) a M13 Primer RV (Takara Shuzo) a sekvence byla určena potvrzením nukleotidové sekvence v obou směrech.

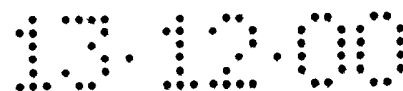
Plazmidy které obsahují gen kódující verzi „b“ nebo „c“ v níž byla nahrazena FR3 verze „a“ L řetězce zušlechtěné protilátky, byly označeny jako hATR5Lvb/CVIDEC nebo hATR5Lvc/CVIDEC. Nukleotidová sekvence a jí odpovídající aminokyselinová sekvence verze „b“ zušlechtěného L řetězce obsaženého v plazmidu hATR5Lvb/CVIDEC a aminokyselinová sekvence verze „b“ jsou uvedeny v SEQ ID NO: 98 a SEQ ID NO: 99. Nukleotidová sekvence a jí odpovídající aminokyselinová sekvence verze „c“ zušlechtěného L řetězce obsaženého v plazmidu hATR5Lvc/CVIDEC a aminokyselinová sekvence verze „c“ jsou uvedeny v SEQ ID NO: 100 a SEQ ID NO: 101.

(iii) Verze „b1“ a „b2“

Verze „b1“ a „b2“ byly připraveny záměnou FR2 verze „b“. Pro verzi „b1“ byla použita FR2 odvozená z lidské protilátky S65921 (DDBJ, Tonge DW a kol., Year Immunol., 7: 56-62, 1993) a pro verzi „b2“ byla použita FR2 odvozená z lidské protilátky X93625 (DDBJ, Cox JP a kol., Eur. J. Immunol., 24: 827-836, 1994).

Primery F2SS (SEQ ID NO: 102) a F2SA (SEQ ID NO: 103) kódující FR2 verze „b1“, nebo primery F2XS (SEQ ID NO: 104) a F2XA (SEQ ID NO: 105) kódující FR2 verze „b2“ mají vzájemně komplementární sekvence a mají na obou koncích rozpoznávací sekvence pro restriční enzymy AflII a SpeI. Primery F2SS, F2SA, F2XS a F2XA byly syntetizovány ve Pharmacia Biotech. 100 pM primerů F2SS a F2SA, respektive F2XS a F2XA bylo teplotně hybridizováno při 96 °C po dobu 2 minut a při 50 °C po dobu 2 minut a byly tak vytvořeny dvojřetězcové DNA fragmenty.

Tyto dvojřetězcové DNA fragmenty byly štěpeny restričními enzymy AflII (Takara Shuzo) a SpeI (Takara Shuzo) při 37 °C po dobu 1 hodiny. Štěpící směs byla



extrahována fenolem a chloroformem a poté co byly DNA fragmenty precipitovány etanolem, byly rozpuštěny v TE.

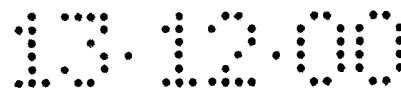
Plazmid hATR5Lvb/CVIDEC byl štěpen restričními enzymy AflII (Takara Shuzo) a SpeI (Takara Shuzo) při 37 °C po dobu 1 hodiny. Štěpící směs byla rozdělena pomocí agarové elektroforézy na 1,5% NuSieve GTC (FMC BioProducts) a byly vyříznuty agaróзовé proužky, obsahující DNA fragmenty dlouhé okolo 3000 bázových párů. Agaróзовé proužky byly extrahovány fenolem a chloroformem a po precipitaci DNA fragmentů etanolem, byly tyto rozpuštěny v TE.

DNA fragment AflII-SpeI, připravený jak bylo popsáno výše, kódující FR2 verzi „b1“ nebo „b2“ a vektor hATR5Lvb/CVIDEC, z něhož byla FR2 odstraněna štěpením s AflII a SpeI, byly potom ligovány pomocí DNA ligační soupravy ver. 2 (Takara Shuzo) podle návodu přiloženého k soupravě.

Ligační směs byla přidána k 100 µl kompetentních buněk *E. coli* JM109 (Nippongene) a byla inkubována po dobu 30 minut na ledu a 1 minutu při 42 °C. Poté bylo k této směsi přidáno 300 µl bujónu Hi-Competence Broth (Nippongene) a inkubováno při 37 °C po dobu 1 hodiny, pak byla *E. coli* vyseta na agar v LBA médiu a inkubována přes noc při 37 °C, aby byl získán transformant *E. coli*. Transformant byl inkubován přes noc ve 3 ml média LBA a z buněčných frakcí byla připravena plazmidová DNA pomocí soupravy QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN).

Nukleotidová sekvence cDNA kódující oblasti v plazmidu byla určena pomocí soupravy Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer) pomocí sekvenátoru DNA Sequencer 373A (Perkin-Elmer). Jako sekvenační primery byly použity M13 Primer 4 (Takara Shuzo) a M13 Primer RV (Takara Shuzo) a sekvence byla určena potvrzením nukleotidové sekvence v obou směrech.

Plazmidy které obsahují gen kódující verzi „b1“ nebo „b2“ v níž byla nahrazena FR2 verze „b“ L řetězce zušlechtěné protilátky, byly označeny jako hATR5Lvb1/CVIDEC respektive hATR5Lv2/CVIDEC. Nukleotidová sekvence a jí odpovídající aminokyselinová sekvence verze „b1“ zušlechtěného L řetězce obsaženého v plazmidu hATR5Lvb1/CVIDEC a aminokyselinová sekvence verze „b1“ jsou uvedeny v SEQ ID NO: 106 a SEQ ID NO: 107. Nukleotidová sekvence a jí odpovídající aminokyselinová sekvence verze „b2“ zušlechtěného L řetězce obsaženého v plazmidu hATR5Lvb2/CVIDEC a aminokyselinová sekvence verze „b2“ jsou uvedeny v SEQ ID NO: 108 a SEQ ID NO: 109.



### (3) Konstrukce expresního vektoru pro zušlechtěnou protilátku

#### (i) Spojení zušlechtěného H řetězce a chimerního L řetězce

Plazmid hATR5Hva/CVIDEC, obsahující V oblast H řetězce byl štěpen NheI a Sall, a získaný cDNA fragment V oblasti zušlechtěného H řetězce byl vnesen do chATR5/N5KG4P (Sall/NheI), připraveného štěpením chATR5/N5KG4P, protilátku exprimujícího plazmidového vektoru chATR-5, pomocí NheI a Sall. Takto vytvořený plazmid byl označen hHva-chLv/N5KG4P.

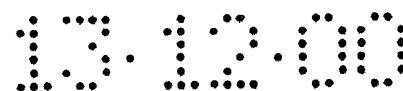
Plazmid hATR5Hvb/CVIDEC, obsahující V oblast H řetězce byl štěpen NheI a Sall, a získaný cDNA fragment V oblasti zušlechtěného H řetězce byl vnesen do chATR5/N5KG4P (Sall/NheI), připraveného štěpením chATR5/N5KG4P, protilátku exprimujícího plazmidového vektoru chATR-5, pomocí NheI a Sall. Takto vytvořený plazmid byl označen hHvb-chLv/N5KG4P.

Plazmidy hATR5Hvc/CVIDEC, hATR5Hvd/CVIDEC a hATR5Hve/CVIDEC, obsahující V oblast H řetězce byly štěpeny NheI a Sall, a získané cDNA fragmenty V oblasti zušlechtěného H řetězce byly vneseny do chATR5/N5KG4P (Sall/NheI), připraveného štěpením chATR5/N5KG4P, protilátku exprimujícího plazmidového vektoru chATR-5, pomocí NheI a Sall. Takto vytvořené plazmidy byly označeny hHvc-chLv/N5KG4P, hHvd-chLv/N5KG4P a hHve-chLv/N5KG4P.

Plazmidy hATR5Hvf/CVIDEC a hATR5Hvh/CVIDEC, obsahující V oblast H řetězce byly štěpeny NheI a Sall, a získané cDNA fragmenty V oblasti zušlechtěného H řetězce byly vneseny do chATR5/N5KG4P (Sall/NheI), připraveného štěpením chATR5/N5KG4P, protilátku exprimujícího plazmidového vektoru chATR-5, pomocí NheI a Sall. Takto vytvořené plazmidy byly označeny hHvf-chLv/N5KG4P a hHvh-chLv/N5KG4P.

Plazmidy hATR5Hvi/CVIDEC a hATR5Hvj/CVIDEC, obsahující V oblast H řetězce byly štěpeny NheI a Sall, a získané cDNA fragmenty V oblasti zušlechtěného H řetězce byly vneseny do chATR5/N5KG4P (Sall/NheI), připraveného štěpením chATR5/N5KG4P, protilátku exprimujícího plazmidového vektoru chATR-5, pomocí NheI a Sall. Takto vytvořené plazmidy byly označeny hHvi-chLv/N5KG4P a hHvj-chLv/N5KG4P.

Plazmidy hATR5Hvb1/CVIDEC a hATR5Hvd1/CVIDEC, obsahující V oblast H řetězce byly štěpeny NheI a Sall, a získané cDNA fragmenty V oblasti zušlechtěného H řetězce byly vneseny do chATR5/N5KG4P (Sall/NheI), připraveného štěpením



chATR5/N5KG4P, protilátku exprimujícího plazmidového vektoru chATR-5, pomocí NheI a Sall. Takto vytvořené plazmidy byly označeny hHvb1-chLv/N5KG4P a hHvd1-chLv/N5KG4P.

(ii) Spojení zušlechtěného L řetězce a chimerního H řetězce

Pomocí protilátku exprimujícího vektoru N5KG4P byl zušlechtěný L řetězec spojen s chimerním H řetězcem a exprimován.

Plazmidy hATR5Lva/CVIDEC, hATR5Hvb/CVIDEC, hATR5Lvc/CVIDEC, hATR5Hvb1/CVIDEC a hATR5Hvb2/CVIDEC byly štěpeny restrikními enzymy BglII (Takara Shuzo) a SpII (Takara Shuzo) při teplotě 37 °C po dobu 2-3 hodin. Štěpící směs byla rozdělena pomocí elektroforézy na agarózovém gelu 1,5% nebo 2% NuSieve GTG (FMC BioProducts) a byly vyříznuty agarózové proužky, obsahující fragmenty DNA dlouhé asi 400 bázových párů. Agarózové proužky byly extrahovány fenolem a fragmenty DNA byly vysráženy ethanolem a poté rozpuštěny v TE.

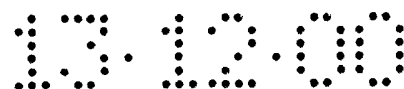
DNA fragment SpII-BglII, obsahující gen kódující V oblast zušlechtěného L řetězce každé z těchto verzí a hATR5Hv/N5KG4P štěpený SpII a BglII, byly ligovány pomocí DNA ligační soupravy ver. 2 (Takara Shuzo) tak, že reagovaly při 16 °C po dobu 1 hodiny, podle návodu přiloženého k soupravě.

Ligační směs byla přidána k 100 µl kompetentních buněk *E. coli* JM109 (Nippongene) a byla inkubována po dobu 30 minut na ledu a 1 minutu při 42 °C. Poté bylo k této směsi přidáno 300 µl bujónu Hi-Competence Broth (Nippongene) a inkubováno při 37 °C po dobu 1 hodiny. Pak byla *Escherichia coli* vyseta na 100 µg/ml agar v LBA médiu a inkubována přes noc při 37 °C, aby byl získán transformant *E. coli*.

Transformant byl inkubován přes noc v 250 nebo 500 ml média LBA a z buněčných frakcí byla připravena plazmidová DNA pomocí soupravy QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN). Plazmidy, do nichž byly vneseny geny, kódující chimerní H řetězec a zušlechtěný L řetězec, byly označeny jako chHv-hLva/N5KG4P, chHv-hLvb/N5KG4P, chHv-hLvc/N5KG4P, chHv-hLvb1/N5KG4P a chHv-hLvb2/N5KG4P.

(iii) Spojení zušlechtěného L řetězce a chimerního H řetězce

Plazmid hATR5Hva/CVIDEC, obsahující V oblast H řetězce byl štěpen NheI a Sall, a získaný cDNA fragment V oblasti zušlechtěného H řetězce byl vnesen do hLva/N5KG4P (Sall/NheI), připraveného štěpením plazmidu chHV-hLva/N5KG4P, obsahujícího cDNA sekvenci verze „a“ L řetězce zušlechtěné protilátky ATR-5, pomocí NheI a Sall. Takto vytvořený plazmid byl označen hHva-hLva/N5KG4P.



Plazmidy hATR5Hvb/CVIDEC a hATR5Hvc/CVIDEC, obsahující V oblast H řetězce byly štěpeny NheI a Sall, a získané cDNA fragmenty V oblasti zušlechtěného H řetězce byly vneseny do hLva/N5KG4P (Sall/NheI), připraveného štěpením plazmidu chHv-hLva/N5KG4P, obsahujícího cDNA sekvenci verze „a“ L řetězce zušlechtěné protilátky ATR-5, pomocí NheI a Sall. Takto vytvořené plazmidy byly označeny hHvb-hLva/N5KG4P a hHvc-hLva/N5KG4P.

Plazmidy hATR5Hvb/CVIDEC, hATR5Hvd/CVIDEC a hATR5Hve/CVIDEC, obsahující V oblast H řetězce byly štěpeny NheI a Sall, a získané cDNA fragmenty V oblasti zušlechtěného H řetězce byly vneseny do hLva/N5KG4P (Sall/NheI), připraveného štěpením plazmidu chHv-hLvb/N5KG4P, obsahujícího cDNA sekvenci verze „a“ L řetězce zušlechtěné protilátky ATR-5, pomocí NheI a Sall. Takto vytvořené plazmidy byly označeny hHvb-hLvb/N5KG4P, hHvd-hLvd/N5KG4P a hHve-hLvb/N5KG4P.

Plazmidy hATR5Hvf/CVIDEC, hATR5Hvg/CVIDEC a hATR5Hvh/CVIDEC, obsahující V oblast H řetězce byly štěpeny NheI a Sall, a získané cDNA fragmenty V oblasti zušlechtěného H řetězce byly vneseny do hLvb/N5KG4P (Sall/NheI), připraveného štěpením plazmidu chHv-hLvb/N5KG4P, obsahujícího cDNA sekvenci verze „b“ L řetězce zušlechtěné protilátky ATR-5, pomocí NheI a Sall. Takto vytvořené plazmidy byly označeny hHvf-hLvb/N5KG4P, hHvg-hLvd/N5KG4P a hHvh-hLvb/N5KG4P.

Plazmidy hATR5Hvi/CVIDEC a hATR5Hvj/CVIDEC, obsahující V oblast H řetězce byly štěpeny NheI a Sall, a získané cDNA fragmenty V oblasti zušlechtěného H řetězce byly vneseny do hLvb/N5KG4P (Sall/NheI), připraveného štěpením plazmidu chHv-hLvb/N5KG4P, obsahujícího cDNA sekvenci verze „b“ L řetězce zušlechtěné protilátky ATR-5, pomocí NheI a Sall. Takto vytvořené plazmidy byly označeny hHvi-hLvb/N5KG4P a hHvj-hLvb/N5KG4P.

Plazmidy hATR5Hvb1/CVIDEC a hATR5Hvd1/CVIDEC, obsahující V oblast H řetězce byly štěpeny NheI a Sall, a získané cDNA fragmenty V oblasti zušlechtěného H řetězce byly vneseny do hLvb/N5KG4P (Sall/NheI), připraveného štěpením plazmidu chHv-hLvb/N5KG4P, obsahujícího cDNA sekvenci verze „b“ L řetězce zušlechtěné protilátky ATR-5, pomocí NheI a Sall. Takto vytvořené plazmidy byly označeny hHvb1-hLvb/N5KG4P a hHvd1-hLvb/N5KG4P.



Plazmidy hATR5Hvb3/CVIDEC a hATR5Hvd3/CVIDEC, obsahující V oblast H řetězce byly štěpeny NheI a Sall, a získané cDNA fragmenty V oblasti zušlechtěného H řetězce byly vneseny do hLvb/N5KG4P (Sall/NheI), připraveného štěpením plazmidu chHv-hLvb/N5KG4P, obsahujícího cDNA sekvenci verze „b“ L řetězce zušlechtěné protilátky ATR-5, pomocí NheI a Sall. Takto vytvořené plazmidy byly označeny hHvb3-hLvb/N5KG4P a hHvd3-hLvb/N5KG4P.

Plazmid hATR5Hvb/CVIDEC, obsahující V oblast H řetězce byl štěpen NheI a Sall, a získaný cDNA fragment V oblasti zušlechtěného H řetězce byl vnesen do hLvb1/N5KG4P (Sall/NheI) a hLvb2/N5KG4P (Sall/NheI), připravených štěpením plazmidů chHv-hLvb1/N5KG4P a chHv-hLvb2/N5KG4P, obsahujících cDNA sekvenci verzí „b1“ a „b2“ L řetězce zušlechtěné protilátky ATR-5, pomocí NheI a Sall. Takto vytvořené plazmidy byly označeny hHvb-hLvb1/N5KG4P a hHvb-hLvb2/N5KG4P.

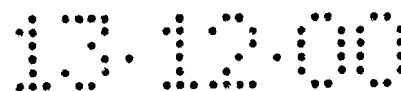
Plazmid hATR5Hvi/CVIDEC, obsahující V oblast H řetězce byl štěpen NheI a Sall, a získaný cDNA fragment V oblasti zušlechtěného H řetězce byl vnesen do hLvb1/N5KG4P (Sall/NheI) a hLvb2/N5KG4P (Sall/NheI), připravených štěpením plazmidů chHv-hLvb1/N5KG4P a chHv-hLvb2/N5KG4P, obsahujících cDNA sekvenci verzí „b1“ a „b2“ L řetězce zušlechtěné protilátky ATR-5, pomocí NheI a Sall. Takto vytvořené plazmidy byly označeny hHvi-hLvb1/N5KG4P a hHvi-hLvb2/N5KG4P.

#### (4) Transfekce do buněk COS-7

Aby bylo možno zhodnotit vazebnou aktivitu k antigenu a neutralizační aktivitu chimerní protilátky, byly výše uvedené expresní plazmidy transfekovány do buněk COS-7 a protilátky byly přechodně exprimovány.

Zkonstruovaný expresní plazmidový vektor byl transdukován do buněk COS-7 elektroporací pomocí přístroje Gene Pulser (Bio Rad). Padesát  $\mu\text{g}$  nebo 20  $\mu\text{g}$  plazmidu bylo přidáno do 0,78 ml buněk COS-7, suspendovaných v PBS na buněčnou koncentraci  $1 \times 10^7$  buněk/ml, a směs byla podrobena pulsům 1500 V a při kapacitě 25  $\mu\text{F}$ .

Po 10 minutách zotavení při teplotě místnosti, byly elektroporované buňky suspendovány v médiu DMEM, obsahujícím 5% fetální hovězí sérum s ultranízkým obsahem IgG (GIBCO) a kultivovány v 10 cm nebo 15 cm kultivačních miskách v 5%  $\text{CO}_2$  inkubátoru. Po 24 hodinové kultivaci byl odsát supernatant a pak bylo přidáno médium HBCHO bez séra (Irvine Scientific). Po další 72 hodinové nebo 96 hodinové kultivaci byl supernatant odebrán a centrifugován, aby byly odstraněny zbytky buněk.



#### (5) Purifikace protilátek

Ze supernatantů buněčných kultur COS-7 byly purifikovány chimerní protilátky pomocí soupravy Affigel Protein A MAPSII (Bio Rad) nebo rProtein A Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech). Purifikace pomocí soupravy Affigel Protein A MAPSII byla provedena podle návodu, přiloženého k soupravě. Purifikace pomocí soupravy rProtein A Sepharose Fast Flow byla provedena následujícím způsobem:

Jeden mililitr rProtein A Sepharose Fast Flow byl naplněn do sloupce a ten byl ekvilibrován 10 objemy TBS. Supernatant z buněčné kultury COS-7 byl nanesen na ekvilibrovaný sloupec, který byl potom promyt 10 objemy TBS. Absorbovaná protilátková frakce potom byla vymyta 13,5 ml 2,5 mM HCl (pH 3,0) a eluát byl bezprostředně poté neutralizován přidáním 1,5 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,0).

Rozpouštědlo potom bylo u purifikované frakce protilátek zaměněno za TBS tak, že byla provedena dvakrát nebo třikrát ultrafiltrace pomocí přípravků Centriprep 30 nebo 100 (Amicon) a na závěr byla frakce protilátek koncentrována do 1,5 ml.

#### Příklad 4: Kvantifikace protilátek a hodnocení aktivity

##### (1) Měření koncentrace protilátek pomocí destiček ELISA pro měření protilátek

Destičky ELISA pro měření koncentrace protilátek byly připraveny následujícím způsobem: v každé jamce 96-jamkové destičky ELISA (Maxisorb, NUNC) bylo imobilizováno 100  $\mu$ l kozí protilátky proti lidskému IgG<sub>1</sub> (BioSource), připravené v koncentraci 1  $\mu$ g/ml v imobilizačním pufru (0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, 0,02% NaN<sub>3</sub>, pH 9,6) (zde označován jako CB). Po blokování pomocí 200  $\mu$ l ředěného pufru (50 mM Tris-HCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,15 M NaCl, 0,05% Tween 20, 0,02% NaN<sub>3</sub>, 1% hovězí sérumalbumin (BSA), pH 8,1) (zde označován jako DB), jsou ke každé jamce přidány supernatanty z kultur buněk COS-7 nebo buněk CHO, v nichž byla exprimována chimerní protilátka nebo zušlechtěná protilátka, nebo je purifikovaná chimerní protilátka nebo zušlechtěná protilátka sériově ředěna v DB a poté přidána do každé jamky.

Po inkubaci při teplotě místnosti po dobu 1 hodiny následovalo promytí PBS podle Dulbecca, obsahujícím 0,05% Tween 20 (zde označován jako RB) bylo přidáno 100  $\mu$ l v DB 1000x zředěné kozí protilátky proti lidskému IgG, konjugované s alkalickou fosfatázou (BioSource). Po inkubaci 1 hodinu při teplotě místnosti a promytí RB, bylo přidáno 100  $\mu$ l roztoku substrátu Sigma104 (p-nitrofenylfosfát, SIGMA) naředěného v substrátovém pufru (50 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9,8) na koncentraci 1 mg/ml

a nakonec byla měřena absorbance 405/655 nm pomocí odečítacího zařízení pro mikrodestičky Microplate Reader (Bio Rad). Jako standard pro měření koncentrace byl použit lidský IgG4κ (The Binding Site).

### (2) Měření vazebné aktivity k antigenu

Destičky buněčného ELISA testu pro měření vazebné aktivity k antigenu byly připraveny následujícím způsobem: Byly použity buňky lidského karcinomu močového měchýře J82 (ATCC HTB-1). Do 60 jamek 96-jamkové destičky pro pěstování buněčných kultur bylo naočkováno  $1 \times 10^5$  buněk J82. Toto bylo kultivováno (médium RPMI1640 obsahující 10 % fetálního hovězího séra (GIBCO)) jeden den v CO<sub>2</sub> inkubátoru, aby bylo buňkám umožněno se uchytit. Po odstranění kultivačního média byla každá jamka dvakrát promyta s 300  $\mu$ l PBS. Poté je přidáno ke každé jamce 100  $\mu$ l PBS, obsahujícího 4% paraformaldehyd (tento pufr je zde označován PFA/PBS) a umístěno na led po dobu 10 minut, aby došlo k imobilizaci buněk.

PFA/PBS byl odstraněn a každá jamka byla dvakrát promyta 300  $\mu$ l PBS a poté blokována 250  $\mu$ l DB. Supernatanty buněčných kultur nebo purifikované protilátky byly sériově ředěné v DB, kterého bylo přidáno 100  $\mu$ l do každé jamky. Po inkubaci 2 hodiny při teplotě místnosti a promytí RB, bylo přidáno 100  $\mu$ l kozí protilátky proti lidskému IgG $\gamma$ , konjugovaná s alkalickou fosfatázou (BioSource), která byla 1000x zředěná v DB. Po inkubaci při teplotě místnosti po dobu 1 hodiny a promytí RB byl přidán roztok substrátu a poté byla měřena absorbance při 405/655 nm pomocí přístroje na odečítání mikrodestiček (BioRad).

### (3) Měření neutralizační aktivity

Neutralizační aktivita myší protilátky, chimerní protilátky a zušlechtěné protilátky byla měřena s použitím indexu inhibiční aktivity produkce faktoru Xa tromboplastinem odvozeným z lidské placenty, Thromborel S (Boehringer AG). Tedy 60  $\mu$ l pufru (TBS obsahující 5 mM CaCl<sub>2</sub> a 0,1% BSA) bylo přidáno k 10  $\mu$ l 1,25 mg/ml Thromborelu S a 10  $\mu$ l vhodně ředěné protilátky, směs potom byla inkubována v 96-jamkové destičce při teplotě místnosti po dobu 1 hodiny. Dále bylo přidáno 10  $\mu$ l lidského faktoru X (Celsus Laboratories) o koncentraci 3.245  $\mu$ g/ml a lidského faktoru VIIa (Enzyme Research) o koncentraci 82,5 ng/ml a inkubace pokračovala při teplotě místnosti další 1 hodinu.

Reakce byla zastavena přidáním 10  $\mu$ l 0,5 M EDTA, bylo k ní přidáno 50  $\mu$ l roztoku chromogenního substrátu a byla měřena absorbance při 405/655 nm pomocí přístroje na odečítání mikrodestiček Microplate Reader (Bio Rad). Po jednohodinové



reakci při teplotě místnosti byla absorbance při 405/655 nm měřena znovu. Neutralizační aktivita může být určena spočítáním zbytkové aktivity (%) z každé změny v absorbanci, přičemž změna absorbance za 1 hodinu při nepřidání žádné protilátky je považována za 100 % aktivitu.

Roztok chromogenního substrátu byl připraven rozpuštěním chromogenního substrátu Testzyme S-2222 (Chromogenix) podle přiloženého návodu, dvojnásobným zředěním purifikovanou vodou a smícháním s roztokem polybrenu (0,6 mg/ml hexamethylenbromidu, SIGMA) v poměru 1 : 1.

#### (4) Hodnocení aktivity

##### (i) Kombinace verze „a“ zušlechtěného H řetězce a chimerního L řetězce

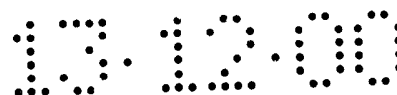
Byla vytvořena protilátka (a-ch), v níž je kombinována verze „a“ zušlechtěného H řetězce s chimerním L řetězcem a byla testována její vazebná aktivita k antigenu pomocí buněčného ELISA testu. Bylo zjištěno, že množství vázané k antigenu se při vysokých koncentracích snižuje (obrázek 1). Neutralizační aktivita proti antigenu, měřená pomocí inhibice produkce FXa byla slabá ve srovnání s neutralizační aktivitou pozitivní kontrolní chimerní protilátky (ch-ch) (obrázek 2). Proto bylo rozhodnuto o provedení dalších verzí zušlechtěného H řetězce pomocí záměn FR. Zde použitá chimerní protilátka byla jedna z těch, které byly exprimovány v buňkách COS-7 a byly purifikovány a hodnoceny.

##### (ii) Kombinace verze „a“ zušlechtěného L řetězce a chimerního H řetězce

Byla vytvořena protilátka (ch-a), v níž je kombinována verze „a“ zušlechtěného L řetězce s chimerním H řetězcem a byla testována její vazebná aktivita k antigenu pomocí buněčného ELISA testu. Bylo zjištěno, že má vazebnou aktivitu stejnou nebo vyšší než je vazebná aktivita chimerní protilátky (obrázek 1). Na druhé straně byla neutralizační aktivita proti antigenu slabá ve srovnání s neutralizační aktivitou pozitivní kontrolní chimerní protilátky (obrázek 2). Proto bylo rozhodnuto o provedení dalších verzí zušlechtěného L řetězce pomocí záměn FR. Zde použitá chimerní protilátka byla jedna z těch, které byly exprimovány v buňkách COS-7 a byly purifikovány a hodnoceny.

##### (iii) Kombinace verze „a“ zušlechtěného H řetězce a verze „a“ zušlechtěného L řetězce

Byla vytvořena protilátka (a-a), v níž je kombinována verze „a“ zušlechtěného H řetězce s verzí „a“ zušlechtěného L řetězce a byla testována její vazebná aktivita



k antigenu pomocí buněčného ELISA testu. Bylo zjištěno, že množství vázané k antigenu se při vysokých koncentracích snižuje (obrázek 3). Neutralizační aktivita proti antigenu, měřená pomocí inhibice produkce FXa byla slabá ve srovnání s neutralizační aktivitou pozitivní kontrolní chimerní protilátky (obrázek 4). Proto bylo rozhodnuto o provedení dalších verzí zušlechtěného H řetězce a L řetězce pomocí záměn FR. Zde použitá chimerní protilátka byla jedna z těch, které byly exprimovány v buňkách COS-7 a byly purifikovány a hodnoceny.

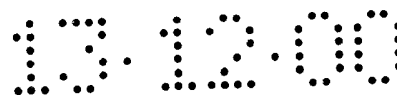
(iv) Kombinace verzí „b“, „c“ a „d“ zušlechtěného H řetězce a chimerního L řetězce

Byly vytvořeny protilátky („b-ch“, „c-ch“ a „d-ch“), v nichž je kombinován zušlechtěný H řetězec, u kterého byly provedeny další verze pomocí záměn FR, s chimerním L řetězcem a byla testována jejich vazebná aktivita k antigenu pomocí buněčného ELISA testu. Bylo zjištěno, že kombinace „d-ch“ vykazovala vazebnou aktivitu srovnatelnou s vazebnou aktivitou chimerní protilátky, a „b-ch“ a „c-ch“ vykazovaly poněkud nižší vazebnou aktivitu (obrázky 5 a 6). Na druhé straně neutralizační aktivita proti antigenu byla ve srovnání s neutralizační aktivitou pozitivní kontrolní chimerní protilátky téměř shodná u „b-ch“ a poněkud slabší u „d-ch“. U kombinace „c-ch“ byla výrazně slabší než u chimerní protilátky (obrázek 7). Proto byly verze „b“ a „d“ zušlechtěného H řetězce považovány za zušlechtěné H řetězce, vykazující vysokou aktivitu.

(v) Kombinace verze „b“ zušlechtěného H řetězce a verze „a“ zušlechtěného L řetězce

Byla vytvořena protilátka („b-a), v níž je kombinována verze „b“ zušlechtěného H řetězce, u kterého byly provedeny další verze pomocí záměn FR, se zušlechtěným L řetězcem a byla testována její vazebná aktivita k antigenu pomocí buněčného ELISA testu. Bylo zjištěno, že množství vázané k antigenu se při vysokých koncentracích snižuje (obrázek 5). Na druhé straně neutralizační aktivita proti antigenu byla ve srovnání s neutralizační aktivitou pozitivní kontrolní chimerní protilátky výrazně slabší (obrázek 8). Proto byly kombinace „b-a“ a „a-a“ považovány za zušlechtěné H řetězce, vykazující vysokou aktivitu. Zde použitá chimerní protilátka byla jedna z těch, které byly exprimovány v buňkách COS-7 a byly purifikovány a hodnoceny.

(vi) Kombinace verzí „b“ a „c“ zušlechtěného L řetězce a chimerního H řetězce



Byly vytvořeny protilátky („ch-b“ a „ch-c“), v nichž jsou kombinovány verze „b“ a „c“ zušlechtěného L řetězce, s chimerním H řetězcem a u obou bylo zjištěno, že mají vazebnou aktivitu k antigenu a neutralizační aktivitu proti antigenu shodnou s chimerní protilátkou (obrázky 9 a 10). Proto byly verze „b“ a „c“ vybrány jako kandidát pro L řetězec zušlechtěné protilátky. Myší protilátka s verzí „b“, která má počet aminokyselin o jednu menší, je považována pokud jde o antigenicitu, za dokonalejší než verze je „c“. Zde použitá chimerní protilátka byla jedna z těch, které byly exprimovány v buňkách CHO DG44 a byly purifikovány a hodnoceny.

(vii) Kombinace verze „b“ zušlechtěného H řetězce a verzí „b“ a „c“ zušlechtěného L řetězce

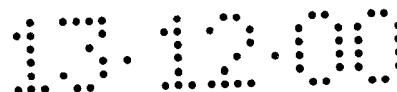
Byly vytvořeny protilátky („b-b“ a „b-c“), v nichž je kombinována verze „b“ zušlechtěného H řetězce s verzemi „b“ a „c“ zušlechtěného L řetězce a byla testována jejich vazebná vazebná aktivita k antigenu a neutralizační aktivita proti antigenu. Obě měly slabě nižší aktivitu než má chimerní protilátka a to jak u vazebné aktivity k antigenu tak u neutralizační aktivity proti antigenu (obrázky 11 a 12).

(viii) Kombinace verzí „b“ a „d“ zušlechtěného H řetězce a verze „b“ zušlechtěného L řetězce

Byly vytvořeny protilátky („b-b“ a „d-b“), v nichž je kombinován zušlechtěný H řetězec, u kterého byly provedeny další verze pomocí záměn FR, s verzí „b“ zušlechtěného L řetězce a byla testována jejich vazebná aktivita k antigenu pomocí buněčného ELISA testu. Bylo zjištěno, že kombinace „d-b“ vykazovala vazebnou aktivitu srovnatelnou s vazebnou aktivitou chimerní protilátky, a „b-b“ vykazovala poněkud nižší vazebnou aktivitu při vysoké koncentraci (obrázek 13). Na druhé straně neutralizační aktivita proti antigenu byla ve srovnání s neutralizační aktivitou pozitivní kontrolní chimerní protilátky slabě nižší u „b-b“ a výrazně slabší u „d-b“ (obrázek 14). Bylo tedy ukázáno, že verze „b-b“ je verze vykazující vysokou neutralizační aktivitu, zatímco verze „d-b“ je verze vykazující vysokou vazebnou aktivitu.

(ix) Kombinace verze „e“ zušlechtěného H řetězce a chimerního L řetězce a verze „b“ zušlechtěného L řetězce

Byly vytvořeny protilátky („e-ch“ a „e-b“), v nichž je kombinována verze „e“ zušlechtěného H řetězce s chimerním L řetězcem a zušlechtěnou verzí „b“. Kombinace „e-ch“ vykazovala vazebnou aktivitu srovnatelnou s vazebnou aktivitou chimerní protilátky, ale u kombinace „e-b“ bylo množství exprimované protilátky velmi malé a



většina vazebné aktivity byla ztracena (obrázek 15). Neutralizační aktivita proti antigenu byla u kombinace „e-ch“ ve srovnání s neutralizační aktivitou pozitivní kontrolní chimerní protilátky výrazně nižší (obrázek 16). Bylo tedy uzavřeno, že verze „e“ H řetězce v kombinaci s verzí „b“ L řetězce dobře nefunguje.

(x) Kombinace verzí „f“, „g“ a „h“ zušlechtěného H řetězce a verze „b“ zušlechtěného L řetězce

Byly vytvořeny protilátky („f-b“, „g-b“ a „h-b“), v nichž jsou kombinovány verze „f“, „g“ a „h“ zušlechtěného H řetězce s verzí „b“ zušlechtěného L řetězce. U protilátek „f-b“ a „h-b“ bylo množství exprimované protilátky velmi malé. U verzí „f“ a „h“ byla kombinace s chimerním L řetězcem vytvořena, ale nebyla exprimována. Kombinace „g-b“ dosáhla nasycení při nízké koncentraci a vykazovala vazebnou aktivitu slabší než chimerní protilátka (obrázek 17). Neutralizační aktivita proti antigenu byla u kombinace „g-b“ ve srovnání s neutralizační aktivitou chimerní protilátky výrazně slabší (obrázek 18).

(xi) Kombinace verzí „b1“ a „d1“ zušlechtěného H řetězce a verze „b“ zušlechtěného L řetězce

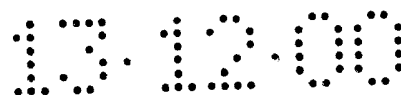
Byly vytvořeny protilátky („b1-b“ a „d1-b“), v nichž jsou kombinovány verze „b1“ a „d1“ zušlechtěného H řetězce s verzí „b“ zušlechtěného L řetězce. Téměř žádná protilátka nebyla u žádné z nich exprimována. Kombinace s chimerním L řetězcem byly pro ně vytvořeny, ale nebyly exprimovány.

(xii) Kombinace verzí „b3“ a „d3“ zušlechtěného H řetězce a verze „b“ zušlechtěného L řetězce

Byly vytvořeny protilátky („b3-b“ a „d3-b“), v nichž jsou kombinovány verze „b3“ a „d3“ zušlechtěného H řetězce s verzí „b“ zušlechtěného L řetězce. Bylo zjištěno, že vazebná aktivita k antigenu u kombinace „d3-b“ byla ve srovnání s vazebnou aktivitou chimerní protilátky slabě nižší, a u kombinace „b3-b“ byla mnohem nižší (obrázek 19). Neutralizační aktivita proti antigenu byla u kombinace „b3-b“ vyšší než u kombinace „b-b“, ale byla nižší ve srovnání s neutralizační aktivitou chimerní protilátky, a u kombinací „d3-b“ a „b-b“ byla neutralizační aktivita proti antigenu shodná (obrázek 20).

(xiii) Kombinace verzí „i“ a „j“ zušlechtěného H řetězce a chimerního L řetězce a verze „b“ zušlechtěného L řetězce

Byly vytvořeny protilátky („i-ch“ a „j-b“), v nichž jsou kombinovány verze „i“ a „j“ zušlechtěného H řetězce s chimerním L řetězcem a protilátky („i-b“ a „j-b“) v nichž jsou



kombinovaný verze „i“ a „j“ zušlechtěného H řetězce s verzí „b“ zušlechtěného L řetězce a byla testována jejich vazebná aktivita k antigenu a neutralizační aktivita proti antigenu. Vazebná aktivita byla u kterékoli z nich téměř shodná s vazebnou aktivitou chimerní protilátky (obrázky 21 a 22). Kombinace „i-ch“ vykazovala neutralizační aktivitu vyšší než chimerní protilátka a kombinace „j-ch“ vykazovala neutralizační aktivitu výrazně nižší než chimerní protilátka (obrázek 23). Kombinace „i-b“ vykazovala neutralizační aktivitu stejnou jako chimerní protilátka a kombinace „j-b“ vykazovala neutralizační aktivitu výrazně nižší než chimerní protilátka (obrázek 24).

(xiv) Verze „b1“ a „b2“ zušlechtěného L řetězce

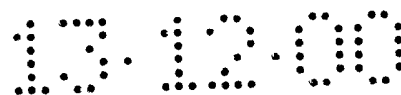
Když byly vytvořeny protilátky („ch-b1“ a „ch-b2“), v nichž jsou kombinovány verze „b1“ a „b2“ zušlechtěného L řetězce s chimerním H řetězcem, obě vykazovaly vazebnou aktivitu k antigenu shodnou s vazebnou aktivitou chimerní protilátky (obrázek 25). Co se týká neutralizační aktivity proti antigenu, kombinace „ch-b1“ vykazovala vazebnou aktivitu shodnou s vazebnou aktivitou chimerní protilátky, zatímco kombinace „ch-b2“ vykazovala při vyšší koncentraci vazebnou aktivitu slabě vyšší než chimerní protilátka (obrázek 26). Verze „b1“ a „b2“ mohou být kandidáty na L řetězec zušlechtěné protilátky, ale „b2“ je lepší v tom, že její aktivita je silnější.

(xv) Kombinace verze „b“ zušlechtěného H řetězce a verze „b“ zušlechtěného L řetězce

Byla vytvořena protilátka („b-b2“), v níž je kombinována verze „b“ zušlechtěného H řetězce s verzí „b2“ zušlechtěného L řetězce a byla testována její vazebná aktivita k antigenu a neutralizační aktivita proti antigenu. Vazebná aktivita byla slabě nižší než vazebná aktivita chimerní protilátky (obrázek 27). Neutralizační aktivita, třebaže byla slabě vyšší než neutralizační aktivita kombinace „b-b“, byla nižší než neutralizační aktivita kombinace „i-b“ (obrázek 28).

(xvi) Kombinace verze „i“ zušlechtěného H řetězce a verzí „b1“ nebo „b2“ zušlechtěného L řetězce

Byly vytvořeny protilátky („i-b1“ a „i-b2“), v nichž je kombinována verze „i“ zušlechtěného H řetězce s verzemi „b1“ nebo „b2“ zušlechtěného L řetězce a byla testována jejich vazebná aktivita k antigenu a neutralizační aktivita proti antigenu. Vazebná aktivita kombinace „i-b2“ byla téměř shodná s vazebnou aktivitou chimerní protilátky (obrázek 29). Neutralizační aktivita „i-b1“ a „i-b2“ byla vyšší než neutralizační



aktivita chimerní protilátky a kombinace „i-b“, a měla sestupnou tendenci v řadě „i-b2“ > i-b1“ (obrázek 30).

**Příklad 5: Příprava buněk CHO produkujících zušlechtěnou protilátku a hodnocení její aktivity**

**(1) Založení buněčné linie, která stabilně produkuje protilátku**

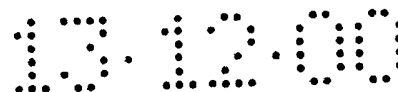
Aby byla založena buněčná linie, která stabilně produkuje zušlechtěnou protilátku (b-b, i-b a i-b2), byl vektor exprimující protilátkový gen vnesen do buněk CHO (DG44), přizpůsobených růstu v médiu bez séra.

DNA plazmidů hHvb-hLvb/N5KG4P, hHvi-hLvb/N5KG4P a hHvi-hLvb2/N5KG4P byly štěpeny restriční enzymem SspI (Takara Shuzo) a linearizovány, poté byly extrahovány fenolem s chloroformem a purifikovány etanolovou precipitací. Linearizovaný expresní vektor byl vnesen do buněk DG44 elektroporací pomocí přístroje (Gene Pulser; Bio Rad). Buňky byly suspendovány v PBS na buněčnou koncentraci  $1 \times 10^7$  buněk/ml a k asi 0,8 ml této suspenze bylo přidáno 19 až 50  $\mu\text{g}$  DNA, a směs byla podrobena pulsům 1500 V a při kapacitě 25  $\mu\text{F}$ .

Po 10 minutách zotavení při teplotě místnosti, byly elektroporované buňky suspendovány v médiu CHO-S-SFMII (GIBCO), obsahujícím hypoxanthin/thymidin (GIBCO) (zde označované jako HT), a tato suspenze byla naočkována na 96-jamkové destičky (Falcon) v množství 100  $\mu\text{l}$ /jamku a kultivovány v 5%  $\text{CO}_2$  inkubátoru. Osm až devět hodin po začátku kultivace bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$ /jamku média CHO-S-SFMII, obsahující HT a 1 mg/ml geneticinu (GIBCO), čímž se změnila koncentrace geneticinu v médiu na selektivní koncentraci 500  $\mu\text{g/ml}$ , a byly selektovány buňky, do nichž byl vnesen protilátkový gen. Médium bylo vyměněno za čerstvé jednou za 3 až 4 dny, přičemž byla vždy vyměněna polovina objemu. V době asi 2 týdny po výměně za selekční médium, byl odebrán vzorek supernatantu z jamek, kde byl 4 až 5 dní po výměně pozorován uspokojivý růst buněk. Koncentrace exprimované protilátky v supernatantu buněčné kultury byl měřena pomocí testu ELISA, popsaného výše pro měření koncentrace protilátek a byly vybrány buňky, které měly vysoký výtěžek produkce.

**(2) Purifikace zušlechtěné protilátky ve velkém měřítku**

Buněčné linie DG44, jejichž selekce byla popsána výše a které produkovaly zušlechtěné protilátky („b-b“, „i-b“ a „i-b2“), byly kultivovány několik dní ve



dvou rolerových láhvích (CORNING) o objemu 500 ml v médiu CHO-S-SFMII, poté bylo kultivační médium odebráno, přidáno čerstvé médium CHO-S-SFMII a pokračováno v kultivaci. Kultivační médium bylo centrifugováno, aby byly odstraněny zbytky buněk a filtrováno pomocí 0,22  $\mu\text{m}$  nebo 0,45  $\mu\text{m}$  filtru. Opakováním tohoto postupu byly získány celkem asi 2 litry supernatantu z každé kultury. Ze získaných supernatantů kultur byly purifikovány protilátky pomocí systému ConSep LC100 (Millipore), spojeného s afinitním sloupcem Proteinu A (Poros).

### (3) Měření koncentrace protilátek pomocí testu ELISA

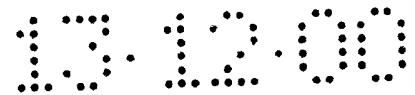
Destičky ELISA pro měření koncentrace protilátek byly připraveny následujícím způsobem: v každé jamce 96-jamkové destičky ELISA (Maxisorb, NUNC) bylo imobilizováno 100  $\mu\text{l}$  kozí protilátky proti lidskému IgG $\gamma$  (BioSource), připravené v koncentraci 1  $\mu\text{g/ml}$  v CB. Po blokování pomocí 200  $\mu\text{l}$  DB, jsou ke každé jamce přidány supernatanty z kultur buněk CHO, v nichž byla exprimována protilátka, nebo byla purifikovaná protilátka sériově ředěna v DB a poté přidána do každé jamky.

Po inkubaci při teplotě místnosti po dobu 1 hodiny a promytí RB, bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  v DB 1000x zředěné kozí protilátky proti lidskému IgG, konjugované s alkalickou fosfatázou (BioSource). Po inkubaci 1 hodinu při teplotě místnosti a promytí RB, bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  roztoku substrátu a nakonec byla měřena absorbance 405/655 nm pomocí odečítacího zařízení pro mikrodestičky Microplate Reader (Bio Rad). Jako standard pro měření koncentrace byl použit lidský IgG4k (The Binding Site).

### (4) Měření vazebné aktivity k antigenu

Destičky buněčného ELISA testu pro měření vazebné aktivity k antigenu byly připraveny následujícím způsobem: byly použity buňky lidského karcinomu močového měchýře J82 (ATCC HTB-1), které byly naočkovány do 96-jamkové kultivační destičky v koncentraci  $1 \times 10^5$  buněk. Toto bylo kultivováno (médium RPMI1640 obsahující 10 % fetálního hovězího séra (GIBCO)) jeden den v CO<sub>2</sub> inkubátoru, aby bylo buňkám umožněno se uchytit. Po odstranění kultivačního média byla každá jamka dvakrát promyta PBS. Poté je přidáno ke každé jamce 100  $\mu\text{l}$  PFA/PBS a umístěno na led na dobu 10 minut, aby došlo k imobilizaci buněk.

PFA/PBS byl odstraněn a každá jamka byla dvakrát promyta 300  $\mu\text{l}$  PBS a poté blokována 250  $\mu\text{l}$  DB. Na základě výše uvedených výsledků měření byly purifikované protilátky sériově ředěny DB s faktorem 2 počínaje od koncentrace 10  $\mu\text{g/ml}$  a 100  $\mu\text{l}$  tohoto ředění bylo přidáno do každé jamky. Po inkubaci 2 hodiny při teplotě místnosti a



promytí RB, bylo přidáno 100  $\mu$ l kozí protilátky proti lidskému IgG $\gamma$ , konjugovaná s alkalickou fosfatázou (BioSource), která byla 1000x zředěná v DB. Po inkubaci při teplotě místnosti po dobu 1 hodiny a promytí RB bylo přidáno 100  $\mu$ l roztoku substrátu a poté byla měřena absorbance při 405/655 nm pomocí přístroje na odečítání mikrodestiček (BioRad).

(5) Měření neutralizační aktivity proti TF (faktor inhibující aktivitu působící proti produkci FXa)

Inhibiční aktivita zušlechtěné protilátky na produkci Faktoru Xa byla měřena jako index inhibiční aktivity proti aktivitě podporující produkci Faktoru Xa, kterou vykazuje thromboplastin odvozený z lidské placenty, Thromborel S (Boehringer AG). Tedy 60  $\mu$ l pufru (TBS obsahující 5 mM CaCl<sub>2</sub> a 0,1% BSA) bylo přidáno k 10  $\mu$ l 5 mg/ml Thromborelu S a 10  $\mu$ l protilátky, směs potom byla inkubována v 96-jamkové destičce při teplotě místnosti po dobu 1 hodiny. Protilátka byla sériově ředěna pufrům (ředící faktor 5) počínaje koncentrací 200  $\mu$ g/ml.

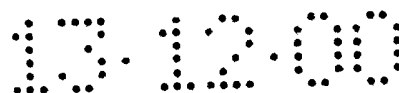
Dále bylo přidáno 10  $\mu$ l lidského faktoru X (Celsus Laboratories) o koncentraci 3.245  $\mu$ g/ml a lidského faktoru VIIa (Enzyme Research) o koncentraci 82,5 ng/ml a inkubace pokračovala při teplotě místnosti dalších 45 minut. Reakce byla zastavena přidáním 10  $\mu$ l 0,5 M EDTA. Bylo k ní přidáno 50  $\mu$ l roztoku chromogenního substrátu a byla měřena absorbance při 405/655 nm pomocí přístroje na odečítání mikrodestiček Microplate Reader (Bio Rad). Po reakci při teplotě místnosti 30 minut byla absorbance při 405/655 nm měřena znovu. Zbytková aktivita (%) byla určena z každé změny v absorbanci, přičemž změna absorbance za 30 minut při nepřidání žádné protilátky je považována za 100 % aktivitu.

Roztok chromogenního substrátu byl připraven rozpuštěním chromogenního substrátu Testzyme S-2222 (Chromogenix) podle přiloženého návodu a smícháním s roztokem polybrenu (0,6 mg/ml hexamethylenbromidu, SIGMA) v poměru 1 : 1.

(6) Měření neutralizační aktivity proti TF (inhibiční aktivita proti vazbě FX)

Inhibiční aktivita zušlechtěné protilátky proti vazbě FX byla měřena pomocí thromboplastinu odvozeného z lidské placenty - Thromborel S (Boehringer AG), přičemž je předem vytvořen komplex TF a Faktoru VIIa a inhibiční aktivita proti vazbě FX byla měřena pomocí aktivity komplexu TF-FVIIa na produkci Faktoru Xa jako ukazatele. Tedy 60  $\mu$ l pufru (TBS obsahující 5 mM CaCl<sub>2</sub> a 0,1% BSA) bylo přidáno k 10  $\mu$ l 5 mg/ml Thromborelu S a 10  $\mu$ l lidského faktoru VIIa (Enzyme Research) o





koncentraci 82,5 ng/ml protilátky, a směs byla preinkubována v 96-jamkové destičce při teplotě místnosti po dobu 1 hodiny.

Dále bylo přidáno 10  $\mu$ l lidské protilátky, inkubováno při teplotě místnosti 5 minut a přidáno 10  $\mu$ l lidského faktoru X (Celsus Laboratories) o koncentraci 3.245  $\mu$ g/ml a inkubace pokračovala při teplotě místnosti dalších 45 minut. Protilátka byla sériově ředěna s faktorem 2 v pufru, přičemž počáteční koncentrace byla 200  $\mu$ g/ml. Reakce byla zastavena přidáním 10  $\mu$ l 0,5 M EDTA. Bylo k ní přidáno 50  $\mu$ l roztoku chromogenního substrátu a byla měřena absorbance při 405/655 nm pomocí přístroje na odečítání mikrodestiček Microplate Reader (Bio Rad). Po reakci při teplotě místnosti 30 minut byla absorbance při 405/655 nm měřena znovu. Zbytková aktivita (%) byla určena z každé změny v absorbanci, přičemž změna absorbance za 30 minut při nepřidání žádné protilátky je považována za 100 % aktivitu.

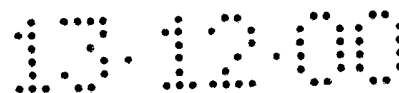
Roztok chromogenního substrátu byl připraven rozpuštěním chromogenního substrátu Testzyme S-2222 (Chromogenix) podle přiloženého návodu a smícháním s roztokem polybrenu (0,6 mg/ml hexamethylenbromidu, SIGMA) v poměru 1 : 1.

#### (7) Měření neutralizační aktivity proti inhibiční aktivitě plazmové koagulace

Jako ukazatel neutralizační aktivity zušlechtěné protilátky proti TF (inhibiční aktivitě plazmové koagulace) byl použit prothrombinový čas, určený pomocí thromboplastinu odvozeného z lidské placenty - Thromborel S (Boehringer AG). Tedy 100  $\mu$ l lidské plazmy (Cosmo Bio) bylo umístěno do zkumavky a přidáno 50  $\mu$ l protilátky, zředěné na různé koncentrace a zahřáto 3 minuty na 37 °C. Dále bylo přidáno 50  $\mu$ l 1,25 mg/ml Thromborelu S, který byl předem zahřát na 37 °C, čímž byla započata koagulace plazmy. Doba koagulace byla měřena pomocí Amelung KC-10A, spojeného s Amelung CR-A (obojí od M. C. Medical).

Protilátka byla sériově ředěna pufrům TBS (ředící faktor 2), obsahujícím 0,1% BSA (zde označovaný jako BSA-TBS) počínaje koncentrací 80  $\mu$ g/ml. Jako 100% koagulační aktivita plazmy byla považována koagulační doba vzorku, kam nebyla přidána protilátka a zbytková TF aktivita byla spočtena z každé koagulační doby naměřené u vzorků s protilátkou na základě standardní křivky, získané vynesemím koncentrací Thromborelu S a koagulační doby.

Standardní křivka byla vytvořena z různých koncentrací Thromborelu S a naměřené doby koagulace. Padesát  $\mu$ l BSA-TBS bylo přidáno k 50  $\mu$ l vhodně naředěného Thromborelu S, zahřáto 3 minuty na 37 °C a potom bylo přidáno 100  $\mu$ l



lidské plazmy předeřtáté na 37 °C, čímž byla započata koagulace plazmy a měření doby koagulace. Thromborel S byl sériově naředěn (ředící faktor 2) v Hanksově pufru (GIBCO), obsahujícím 25 mM CaCl<sub>2</sub>, přičemž počáteční koncentrace byla 6,25 mg/ml. Koncentrace Thromborelu S byly vyneseny na ose X a doby koagulace na ose Y ve dvojím logaritmickém vynesení a to bylo považováno za standardní křivku.

#### (8) Hodnocení aktivity

Všechny zušlechtěné protilátky, „b-b“, „i-b“ a „i-b2“ měly aktivitu stejnou nebo větší než je aktivita chimerní protilátky (obrázek 31). U inhibiční aktivity proti produkci FXa, aktivity inhibující vazbu FX a rovněž u aktivity inhibující koagulaci plazmy měly zušlechtěné protilátky „b-b“, „i-b“ a „i-b2“ aktivitu stejnou nebo větší než je aktivita chimerní protilátky a aktivita měla sestupnou tendenci v rámci řady „i-b2“ > „i-b“ > „b-b“ (obrázky 32, 33 a 34).

#### Příklad 6: Kinetická analýza interakcí TF a protilátek proti TF pomocí BIACORE

Kinetická analýza reakcí antigen-protilátka byla provedena pomocí BIACORE. Rekombinantní protein G byl imobilizován na senzorigickém čipu, na něž byla navázána protilátka. Jako antigen byl použit purifikovaný rekombinantní TF (rozpustný TF v němž byl označující FLAG peptid v poloze 1 až 219) a rozpustný TF, připravený v různých koncentracích byl použit jako analytické činidlo. Ze získaného sensorogramu byly spočteny kinetické parametry (konstanty rychlosti disociace  $k_{diss}$  a konstanty rychlosti vazby  $k_{ass}$ ). Pro kinetickou analýzu se odkazuje na „Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system“ (Karlsson, R. a kol., (1991) J. Immunol. Methods 145: 229-240).

#### (1) Imobilizace Proteinu G na senzorigický čip

Protein G (ZYMED) je imobilizován na senzorigický čip CM5 (BIACORE). Jako pohyblivý pufr byl použit HBS-EP (0,01 M HEPES, pH 7,0, 1,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% polysorbat 20 (objem/ objem)) (BIACORE) a rychlost průtoku byla 5 µl/minutu. Karboxylové skupiny na karboxymetyldextranu na senzorigickém čipu CM5 byly aktivovány injekcí směsi 0,05 M N-hydroxysukcinimid (NHS)/ 0,2 M N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-karbodiimidhydrochlorid (EDC). Poté bylo injektováno 10 µl 50 µg/ml Proteinu G a toto bylo třikrát opakováno kvůli imobilizaci. Protein G byl připraven rozpuštěním v 10 mM pufru Tris-HCl (pH 7,5) na koncentraci 10 mg/ml a zředěním na 50 µg/ml v 10 mM pufru octanu sodného (pH 4,0). Dále bylo injektováno 100 µl 1,0 M

hydrochloridu ethanolaminu (pH 8,5), aby byl blokován přebytek aktivních skupin. Dále bylo injektováno 10  $\mu$ l 0,1 M pufru glycin-kyselina chlorovodíková (pH 2,5) a 10  $\mu$ l 10 mM kyseliny chlorovodíkové, aby byly odmyty nekovalentně vázané sloučeniny. Když bylo toto provedeno pro každou průtokovou buňku a bylo injektováno 10  $\mu$ l 72 nM verze „ib2“ zušlechtěné protilátky proti TF, bylo potvrzeno, že se navázalo přibližně 1000 RU.

### (2) Interakce imobilizované protilátky proti TF a lidského TF

Lidský TF u něhož byl připojen označující FLAG peptid k C-konci aminokyselinové sekvence 1 až 219, byl exprimován v buňkách CHO a purifikován. Tento preparát byl potom použit jako rozpustný TF.

Výše uvedená procedura byla provedena u každé z průtokových buněk č. 1 až 3.

### (3) Kinetická analýza interakce

Soubory údajů byly načteny a bylo provedeno porovnání vzorků reakcí, přičemž jako základní stav byl použit senzogram pufru HBS-EP. Dále byla provedena kinetická analýza pomocí analytického aplikačního software „BIOevaluation 2.1“ (Pharmacia), připraveného výlučně pro BIACORE, který počítá kinetické parametry (konstanty vazebné rychlosti  $k_{ass}$  a konstanty disociační rychlosti  $k_{diss}$ ) pomocí porovnávání křivek. Aby byly určeny konstanty vazebné rychlosti  $k_{ass}$ , byl použit model analýzy 4 (BIOevaluation 2.1 Softwarová příručka, A1 až A5). Na základě hodnot vypočtených pro každou průtokovou buňku byly získány kinetické parametry pro každou protilátku. Výsledek (průměr hodnot vypočtených pro každou průtokovou buňku  $\pm$  standardní odchylka) je uveden v Tabulce 6.

Tabulka 6

Kinetické parametry chimerních a zušlechtěných  
protilátek proti lidskému TF (n = 3)

	chimerní	b-b	i-b	i-b2
$k_{diss}$ [ $\times 10^{-4}$ l/s ]	5,06 $\pm$ 0,12	9,52 $\pm$ 0,22	6,49 $\pm$ 0,17	6,35 $\pm$ 1,15
$k_{ass}$ [ $\times 10^5$ l/Ms ]	4,65 $\pm$ 0,32	4,15 $\pm$ 0,27	4,67 $\pm$ 0,30	5,44 $\pm$ 0,36
KD [ $\times 10^{-9}$ M ]	1,09 $\pm$ 0,09	2,30 $\pm$ 0,15	1,39 $\pm$ 0,13	1,17 $\pm$ 0,11

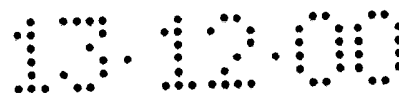
Příklad 7: Měření reaktivity zušlechtěné protilátky proti TF s lidským TF

Pomocí hybridizační metody typu dot-blot („Protein Experimental Method for Molecular Biological Research, Revised“, Yodosha, vyd. Takenawa Tadaomi, str. 101) byla zkoumána reaktivita s nedenaturovaným TF, s TF denaturovaným za neredukujících podmínek a s TF denaturovaným za redukujících podmínek. Byl použit TF, v němž bylo použito označení pomocí FLAG pro extracelulární oblast, byl exprimován v buňkách CHO a byl purifikován (shTF). shTF byl ředěn v každém ze tří pufrů (pufr A: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; pufr B: 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 8 M močovina; pufr C: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 8 M močovina, 5 mM DTT). Nereduktivně byl TF zpracován pomocí pufru A, zatímco nereduktivní denaturace TF byla provedena pomocí pufru B a reduktivně denaturovaný TF byl získán pomocí pufru C. Na každý vzorek bylo působeno 24 hodin při teplotě místnosti. Potom byl vzorek nanesen na nitrocelulózovou membránu (Bio Rad). Na membránu bylo nanášeno 0,5  $\mu$ l, 1  $\mu$ l a 2  $\mu$ l vzorku (3  $\mu$ g/ml) a membrána byla na vzduchu usušena. Byla blokována v DB (50 mM Tris-HCl, pH 8,1, 0,15 M NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,05% (objem/objem) Tween 20, 0,02% (hmotnost/objem) NaN<sub>3</sub>, 1% (hmotnost/objem) BSA). Membrána byla ponechána reagovat v DB obsahujícím zušlechtěnou protilátku proti TF nebo v samotném DB (kontrola). Po promytí v PBS, obsahujícím 0,05% (objem/objem) Tween 20, membrána reagovala s DB, obsahujícím protilátku proti lidskému IgG, označenou peroxidázou (DAKO). Po promytí v PBS, obsahujícím 0,05% (objem/objem) Tween 20 byla membrána zpracována pomocí činidla ECL Western Blotting reagent (Amersham) a byla exponována 30 vteřin na rentgenový film.

Jak je ukázáno na obrázku 35, chimerní protilátka proti TF a zušlechtěná protilátka proti TF (verze „bb“, „ib“ a „ib2“) reagovaly se všemi formami TF - nedenaturovaným TF, TF denaturovaným za neredukujících podmínek a TF denaturovaným za redukujících podmínek.

#### Příklad 8: Potvrzení antitrombotických účinků na krysích modelech akutní DIC

Antitrombotické účinky protilátky proti TF byly potvrzeny na krysím modelu thromboplastinem indukované DIC. Roztok lidského thromboplastinu byl kontinuálně injekčně podáván do žíly krysích samců kmene SD, v dávce 40 mg/kg po dobu 3 hodin, aby se vytvořil model DIC. Protilátka proti TF (chimerní protilátka a zušlechtěná protilátka proti TF i-b2) byla podávána intravenózně v dávce 0,2 mg/kg 5 minut před začátkem injekčního podávání roztoku thromboplastinu. Patnáct minut po ukončení



kontinuálního podávání roztoku thromboplastinu, byla do citrátu odebrána krev z břišní tepny a byly u ní zjišťovány počet krevních destiček, čas částečně aktivovaného thromboplastinu (aPTT), koncentrace fibrinogenu (Fib), koncentrace rozpustného komplexu monomeru fibrinu (sFMC) a komplex trombin/antitrombin III.

Výsledek uvedený v tabulce 7 naznačuje, že kontinuální injekční podávání roztoku thromboplastinu způsobuje pokles počtu krevních destiček, zvýšení aPTT, sníženou koncentraci fibrinogenu, zvýšené koncentrace sFMC a TAT a zřejmý hyperkoagulační stav. Naopak jak chimerní protilátka tak zušlechtěná protilátka proti lidskému TF tyto změny potlačují stejně silně.

Výsledek ukazuje, že zušlechtěná protilátka proti TF je účinná jako antitrombotické činidlo.

Tabulka 7

měřená veličina	skupina bez podávaného thromboplastinu	kontrolní skupina s podávaným roztokem	skupina s podávanou chimerní protilátkou	skupina s podávanou zušlechtěnou protilátkou
počet krevních destiček ( $\times 10^4/\text{mm}^3$ )	115,5 $\pm$ 11,8	82,9 $\pm$ 14,3	100,7 $\pm$ 12,9	96,1 $\pm$ 13,3
aPTT (s)	20,1 $\pm$ 1,1	36,2 $\pm$ 13,9	22,3 $\pm$ 0,7 <sup>a)</sup>	21,8 $\pm$ 1,3 <sup>a)</sup>
koncentrace fibrinogenu (norm. skupina je 100 %)	100,0 $\pm$ 4,2	64,8 $\pm$ 20,0	101,0 $\pm$ 6,6 <sup>a)</sup>	98,9 $\pm$ 5,7 <sup>a)</sup>
sFMC ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	74,2 $\pm$ 5,5	3517 $\pm$ 3645	129,9 $\pm$ 46,8 <sup>a)</sup>	66,5 $\pm$ 23,0 <sup>a)</sup>
koncentrace TAT (ng/ml)	3,4 $\pm$ 0,6	29,6 $\pm$ 31,0	3,8 $\pm$ 0,7 <sup>a)</sup>	4,2 $\pm$ 0,9

(průměr  $\pm$  standardní odchylka)

Hladiny významnosti odchylek vzhledem ke kontrolní skupině s podávaným roztokem jsou: a):  $p < 0,01$ , b):  $p < 0,05$

Referenční příklad 1: Příprava monoklonální protilátky proti lidskému TF

(1) Purifikace lidského TF

Purifikace TF z lidské placenty byla provedena podle metody Ito (Ito, T. a kol., J. Biol. Chem., 114: 691-696, 1993). Lidská placenta byla homogenizována ve fyziologickém roztoku pufovaném Trisem (TBS, pH 7,5), obsahujícím 1,0 mM hydrochlorid benzamidinu, 1 mM fenylmethylsulfonylfluorid, 1 mM diisopropylfluorofosfát a 0,02% azid sodný a potom byl precipitát zbaven tuku pomocí vychlazeného acetonu. Získaný odtučněný prášek byl suspendován ve výše uvedeném pufru, obsahujícím 2% Triton X-100, aby došlo k rozpuštění TF.

Supernatant byl zpracován afinitní chromatografií za použití sloupce Concanavalin A-Sepharose 4B (Pharmacia) a sloupce Sepharose 4B s navázanými protilátkami proti TF a byl získán purifikovaný TF. Ten byl koncentrován pomocí ultrafiltrační membrány (PM-10, Amicon) a byl uložen jako purifikovaný vzorek při 4 °C.

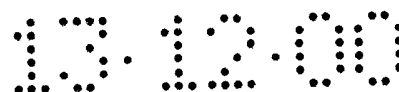
Obsah TF v purifikovaném vzorku byl kvantifikován sendvičovým testem ELISA, který kombinuje komerčně dostupné monoklonální protilátky proti TF (American Diagnostica) s rekombinantním TS jako standardem.

Čistota v purifikovaném vzorku byla potvrzena testováním vzorku pomocí SDS-PAGE za použití 4 až 20% hustotního gradientového polyakrylamidového gelu se závěrečným obarvením stříbrem.

## (2) Imunizace a příprava hybridomu

Po smíšení purifikovaného lidského TF (přibližně 70 µg/ml) se stejným objemem Freudova kompletního adjuvans (Difco) bylo do břicha subkutánně imunizováni 5 týdnů staří myši samci kmene Balb/c (Nippon Charles River) dávkou 10 µg TF/myš. Dvanáctý, 18. a 25. den byly podávány subkutánně zesilovací dávky 5 µg/myš TF smíšeného s Freudovým nekompletním adjuvans a jako závěrečná imunizace byl 32. den podán intraperitoneálně roztok TF zředěného v PBS v dávce 5 µg/myš.

Tři dny po závěrečné imunizaci byly ze čtyř myší připraveny slezinné buňky a byly fúzovány pomocí polyethylenglykolové metody s myší myelomovou buněčnou linií P3U1 při poměru buněk 1/5. Fúzované buňky byly suspendovány v médiu RPMI-1640 (dále zde označováno jako médium RPMI) (Lifetech Oriental), které obsahovalo 10% fetální hovězí sérum a byly vysety do 400 jamek/myš (přibližně 400 buněk/jamku) na 96-jamkových destičkách. První, 2., 3. a 5. den po fúzi byla polovina média vyměněna za médium RPMI (dále zde označované jako médium HAT), obsahující HAT (Dainippon Seiyaku) s přísadou H1 (Boehringer Mannheim GmbH), aby byla provedena HAT selekce hybridomů.



Hybridomy selektované pomocí dále popsané prohledávací metody byly klonovány tak, že bylo dvakrát provedeno koncové ředění.

Při koncovém ředění bylo do 96-jamkových destiček vyseto průměrně 0,8 buňky na jamku. Z jamek, kde byl mikroskopickým pozorováním potvrzen růst jedné kolonie, byly vybrány klony na základě měření vazebné aktivity k TF a neutralizační aktivity proti TF. Získané klony byly převedeny z média HAT do média RPMI. Pokud se potvrdilo, že při přizpůsobení novému médiu nedošlo ke snížení produkce protilátky, bylo znovu provedeno koncové ředění, kterým bylo klonování zakončeno. Předchozím postupem byly připraveny hybridomy, které produkovaly 6 protilátek (ATR-2, 3, 4, 5, 7 a 8), které silně inhibovaly vazbu komplexu TF/faktor VIIa a faktoru X.

### 3. Tvorba ascitů a purifikace protilátek

Tvorba ascitů z připravených hybridomů byla provedena pomocí standardního postupu. Tedy  $10^6$  hybridomových buněk, které byly kultivovány in vitro, bylo intraperitoneálně očkováno samcům myši kmene Balb/c, kterým byl předem dvakrát intravenózně podán minerální olej. Ascity byly odebírány od myši, které měly 1 až 2 týdny po očkování zduřelé břicho.

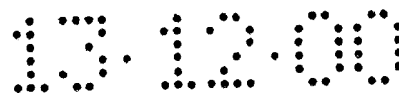
Purifikace protilátky z ascitů byla provedena pomocí systému ConSepLC100 (Millipore), který byl vybaven sloupcem s Proteinem A (Nippon Gaishi).

### 4. Buněčný ELISA test

Buňky lidského karcinomu močového měchýře J82 (Fair D. S. a kol., J. Biol. Chem., 262: 11692-11698, 1987), o kterých je známo že velmi silně exprimují TF, byly získány z ATCC a byly pasážovány a udržovány v médiu RPMI za podmínek 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> a 100% vlhkost.

Destičky buněčného ELISA testu byly připraveny naočkováním buněk J82 do 96-jamkové destičky v koncentraci  $10^5$  buněk/jamku, kultivací 1 den za výše uvedených podmínek, odstranění média a dvojnásobné opláchnutí fyziologickým roztokem pufovaným fosfátem (PBS), přidání 4% roztoku paraformaldehydu (PFA) a ponechání stát 10 minut na ledu, aby došlo k imobilizaci. Po odstranění PFA byla destička opláchnuta PBS, byl na ní přidán Tris pufr (blokuující pufr), obsahující 1% BSA a 0,02% azid sodný a destička byla uložena při 4 °C do použití.

Buněčný ELISA test byl proveden následujícím způsobem. Z destičky připravené výše popsaným způsobem byl odstraněn blokuující pufr, byl přidán roztok protilátky proti TF nebo supernatantu z hybridomových kultur a ponecháno reagovat 1,5 hodiny při



teplotě místnosti. Po promytí PBS, obsahujícím 0,05 % Tweenu 20, je přidána kozí protilátka proti myšímu IgG (H+L) (Zymed), konjugovaná s alkalickou fosfatázou, a ponechána 1 hodinu reagovat. Po promytí byla přidána 1 mg/ml dvojsodná sůl p-nitrofenylfosfátu (Sigma) a o hodinu později byla měřena absorbance při 405/655 nm pro určení množství protilátky proti TF, vázané k buňkám J82.

#### (5) Systém pro testování neutralizační aktivity proti TF, využívající jako ukazatel aktivitu faktoru Xa

K 50  $\mu$ l trisem pufovaného fyziologického roztoku (TBS: pH 7,6), obsahující 5 mM  $\text{CaCl}_2$  a 0,1% hovězího sérumalbuminu, bylo přidáno 10  $\mu$ l roztoku tromboplastinu odvozeného z lidské placenty (5 mg/ml) (Thromborel S) (Boehring) a 10  $\mu$ l roztoku faktoru VIIa (82,5 ng/ml) (American Diagnostics) a reakce probíhala 1 hodinu při teplotě místnosti, aby byl umožněn vznik komplexu TF/faktor VIIa. Poté bylo přidáno 10  $\mu$ l roztoku protilátky proti TF s předem určenou koncentrací nebo supernatantu z hybridomové kultury a 10  $\mu$ l roztoku faktoru X (Celsus Laboratories) a reakce probíhala 45 minut při teplotě místnosti a poté byla zastavena přidáním 10  $\mu$ l 0,5 M EDTA. Poté bylo k reakci 50  $\mu$ l roztoku 2 mM S-2222 (Daiichi Kagaku Yakuhin) a změřené změny v absorbanci při 405/655 nm po 30 minutách byly brány jako míra aktivity TF, podporující produkci faktoru X. Touto metodou může být určena aktivita protilátky, která inhibuje vazbu komplexu TF/ faktor VII a faktoru X.

#### 6. Systém pro testování inhibiční aktivity proti koagulaci plazmy

Padesát  $\mu$ l vhodně ředěného roztoku protilátky proti TF bylo smícháno se 100  $\mu$ l komerčně dostupné normální lidské plazmy (Kojin Bio) a reagovalo 3 minuty při 37 °C. Potom bylo přidáno 50  $\mu$ l roztoku tromboplastinu odvozeného z lidské placenty (1,25 mg/ml) a byla měřena doba do koagulace plazmy pomocí přístroje na měření koagulace plazmy (CR-A: Amelung).

#### 7. Určení izotypu protilátky

Pro supernatanty z hybridomových kultur a u purifikovaných protilátek byla pro potvrzení izotypu protilátky používána souprava s myšími monoklonálními protilátkami (vyrobena Amersham). Výsledek je uveden dále.



Tabulka 8

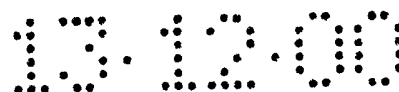
## Imunoglobulinový izotyp monoklonální protilátky proti TF

ATR-2	IgG1, k
ATR-3	IgG1, k
ATR-3	IgG1, k
ATR-4	IgG1, k
ATR-5	IgG1, k
ATR-7	IgG2a, k
ATR-8	IgG2a, k

## Referenční příklad 2: Způsob přípravy rozpustného lidského TF

Rozpustný lidský TF (shTF) byl připraven následujícím způsobem. Gen kódující leader oblast lidského TF, v níž byly aminokyseliny v pozici 220 a dále zaměněny značícím peptidem FLAG M2, byl vložen do expresního vektoru savčích buněk (obsahující gen rezistence proti neomycinu a gen pro DHFR) a vnesen do buněk CHO. Pokud se týká cDNA sekvence lidského TF, bylo odkázáno na článek James H. Morrissey a kol., (Cell (1987) 50: 129-135). Genová sekvence a aminokyselinová sekvence tohoto rozpustného lidského TF je ukázána v SEQ ID NO: 151. Po selekci látkou G418 byly vybrány exprimující buňky, které byly podrobeny amplifikaci exprese pomocí methotrexátu a byly založeny buňky exprimující shTF.

Buňky byly kultivovány v médiu bez séra CHO-S-SFMII (GIBCO), aby byl získán supernatant kultur, obsahující shTF. Ten byl 2x zředěn stejným objemem pufru 40 mM Tris-HCl (pH 8,5), a byl potom nanesen na sloupec Q-Sepharose Fast Flow (100 ml, Pharmacia Biotech), ekvilibrovaný puftrem 20 mM Tris-HCl (pH 8,5). Po promytí tímž puftrem, obsahujícím 0,1 M NaCl, byla koncentrace NaCl změněna na 0,3 M a shTF byl ze sloupce eluován. K získané frakci shTF byl přidán síran amonný do konečné koncentrace 2,5 M a byla centrifugována (10 000 ot/min, 20 min), aby se vysrážely kontaminující proteiny. Supernatant byl přidán k Butyl TOYOPEARL (30 ml, TOSOH) a potom byl promýván 50 mM Tris-HCl puftrem (pH 6,8), obsahujícím 2,5 M síran amonný. V 50 mM Tris-HCl pufru (pH 6,8) byla koncentrace síranu amonného lineárně snižována z 2,5 na 0 M, aby došlo k vymytí shTF ze sloupce. Frakce obsahující nejvíce shTF byly koncentrovány pomocí Centri-Prep 10 (Amicon). Koncentrát byl nanesen na sloupec TSKgel G3000SWG (21,5 x 600 mm, TOSOH), ekvilibrovaný puftrem 20 mM



Tris-HCl (pH 7,0), obsahujícím 150 mM NaCl a byly odebrány frakce obsahující nejvíce shTF. Ty byly sterilizovány filtrací přes membránový filtr 0,22  $\mu\text{m}$  a produkt byl používán jako rozpustný lidský TF (shTF). Koncentrace vzorku byla spočítána za předpokladu, že molární extinkční koeficient vzorku  $\epsilon = 40\ 130$  a molekulová hmotnost = 43 210.

#### Seznam sekvencí

Obsah seznamu sekvencí <223> je následující:

SEQ ID NO: 1: Primer MHC-G1

SEQ ID NO: 2: Primer MHC-G2a

SEQ ID NO: 3: Primer MKC

SEQ ID NO: 4: M13 Primer M4

SEQ ID NO: 5: M13 Primer RV

SEQ ID NO: 6: Nukleotidová sekvence kódující V oblast H řetězce myší monoklonální protilátky ATR-2 proti TF a její aminokyselinová sekvence

SEQ ID NO: 7: Nukleotidová sekvence kódující V oblast H řetězce myší monoklonální protilátky ATR-3 proti TF a její aminokyselinová sekvence

SEQ ID NO: 8: Nukleotidová sekvence kódující V oblast H řetězce myší monoklonální protilátky ATR-4 proti TF a její aminokyselinová sekvence

SEQ ID NO: 9: Nukleotidová sekvence kódující V oblast H řetězce myší monoklonální protilátky ATR-5 proti TF a její aminokyselinová sekvence

SEQ ID NO: 10: Nukleotidová sekvence kódující V oblast H řetězce myší monoklonální protilátky ATR-7 proti TF a její aminokyselinová sekvence

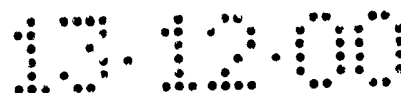
SEQ ID NO: 11: Nukleotidová sekvence kódující V oblast H řetězce myší monoklonální protilátky ATR-8 proti TF a její aminokyselinová sekvence

SEQ ID NO: 12: Nukleotidová sekvence kódující V oblast L řetězce myší monoklonální protilátky ATR-2 proti TF a její aminokyselinová sekvence

SEQ ID NO: 13: Nukleotidová sekvence kódující V oblast L řetězce myší monoklonální protilátky ATR-3 proti TF a její aminokyselinová sekvence

SEQ ID NO: 14: Nukleotidová sekvence kódující V oblast L řetězce myší monoklonální protilátky ATR-4 proti TF a její aminokyselinová sekvence

SEQ ID NO: 15: Nukleotidová sekvence kódující V oblast L řetězce myší monoklonální protilátky ATR-5 proti TF a její aminokyselinová sekvence



SEQ ID NO: 16: Nukleotidová sekvence kódující V oblast L řetězce myší monoklonální protilátky ATR-7 proti TF a její aminokyselinová sekvence

SEQ ID NO: 17: Nukleotidová sekvence kódující V oblast L řetězce myší monoklonální protilátky ATR-8 proti TF a její aminokyselinová sekvence

SEQ ID NO: 18: Primer ch5HS

SEQ ID NO: 19: Primer ch5HA

SEQ ID NO: 20: Primer ch5LS

SEQ ID NO: 21: Primer ch5LA

SEQ ID NO: 22: Primer hR5Hv1S pro přenos CDR

SEQ ID NO: 23: Primer hR5Hv28 pro přenos CDR

SEQ ID NO: 24: Primer hR5Hv4S pro přenos CDR

SEQ ID NO: 25: Primer hR5Hv3A pro přenos CDR

SEQ ID NO: 26: Primer hR5Hv5A pro přenos CDR

SEQ ID NO: 27: Primer hR5HvPrS

SEQ ID NO: 28: Primer hR5HvPrA

SEQ ID NO: 29: Aminokyselinová sekvence verze "a" V oblasti zušlechtěného H řetězce a nukleotidová sekvence, která ji kóduje

SEQ ID NO: 30: Aminokyselinová sekvence verze "a" V oblasti zušlechtěného H řetězce

SEQ ID NO: 31: Primer F3RFFS pro záměnu FR

SEQ ID NO: 32: Primer F3RFBS pro záměnu FR

SEQ ID NO: 33: Primer F3RFFA pro záměnu FR

SEQ ID NO: 34: Primer F3RFBA pro záměnu FR

SEQ ID NO: 35: Primer F3NMFS pro záměnu FR

SEQ ID NO: 36: Primer F3NMBS pro záměnu FR

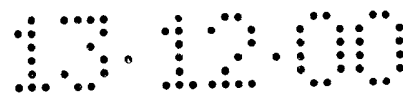
SEQ ID NO: 37: Primer F3NMFA pro záměnu FR

SEQ ID NO: 38: Primer F3NMBA pro záměnu FR

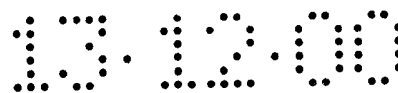
SEQ ID NO: 39: Aminokyselinová sekvence verze "b" V oblasti zušlechtěného H řetězce a nukleotidová sekvence, která ji kóduje

SEQ ID NO: 40: Aminokyselinová sekvence verze "b" V oblasti zušlechtěného H řetězce

SEQ ID NO: 41: Aminokyselinová sekvence verze "c" V oblasti zušlechtěného H řetězce a nukleotidová sekvence, která ji kóduje



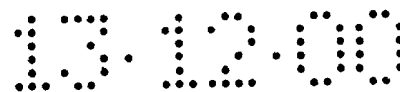
- SEQ ID NO: 42: Aminokyselinová sekvence verze "c" V oblasti zušlechtěného H řetězce
- SEQ ID NO: 43: Primer F3EPS pro záměnu FR
- SEQ ID NO: 44: Primer F3EPA pro záměnu FR
- SEQ ID NO: 45: Primer F3PrS
- SEQ ID NO: 46: Primer F3PrA
- SEQ ID NO: 47: Primer F3VHS pro záměnu FR
- SEQ ID NO: 48: Primer F3VHA pro záměnu FR
- SEQ ID NO: 49: Aminokyselinová sekvence verze "d" V oblasti zušlechtěného H řetězce a nukleotidová sekvence, která ji kóduje
- SEQ ID NO: 50: Aminokyselinová sekvence verze "d" V oblasti zušlechtěného H řetězce
- SEQ ID NO: 51: Aminokyselinová sekvence verze "e" V oblasti zušlechtěného H řetězce a nukleotidová sekvence, která ji kóduje
- SEQ ID NO: 52: Aminokyselinová sekvence verze "e" V oblasti zušlechtěného H řetězce
- SEQ ID NO: 53: Primer F3SSS pro záměnu FR
- SEQ ID NO: 54: Primer F3SSA pro záměnu FR
- SEQ ID NO: 55: Primer F3CDS pro záměnu FR
- SEQ ID NO: 56: Primer F3CDA pro záměnu FR
- SEQ ID NO: 57: Aminokyselinová sekvence verze "f" V oblasti zušlechtěného H řetězce a nukleotidová sekvence, která ji kóduje
- SEQ ID NO: 58: Aminokyselinová sekvence verze "f" V oblasti zušlechtěného H řetězce
- SEQ ID NO: 59: Aminokyselinová sekvence verze "g" V oblasti zušlechtěného H řetězce a nukleotidová sekvence, která ji kóduje
- SEQ ID NO: 60: Aminokyselinová sekvence verze "g" V oblasti zušlechtěného H řetězce
- SEQ ID NO: 61: Primer F3ADS pro záměnu FR
- SEQ ID NO: 62: Primer F3ADA pro záměnu FR
- SEQ ID NO: 63: Aminokyselinová sekvence verze "h" V oblasti zušlechtěného H řetězce a nukleotidová sekvence, která ji kóduje



- SEQ ID NO: 64: Aminokyselinová sekvence verze "h" V oblasti zušlechtěného H řetězce
- SEQ ID NO: 65: Primer F3MMS pro záměnu FR
- SEQ ID NO: 66: Primer F3MMA pro záměnu FR
- SEQ ID NO: 67: Primer F3BMS pro záměnu FR
- SEQ ID NO: 68: Primer F3BMA pro záměnu FR
- SEQ ID NO: 69: Aminokyselinová sekvence verze "i" V oblasti zušlechtěného H řetězce a nukleotidová sekvence, která ji kóduje
- SEQ ID NO: 70: Aminokyselinová sekvence verze "i" V oblasti zušlechtěného H řetězce
- SEQ ID NO: 71: Aminokyselinová sekvence verze "j" V oblasti zušlechtěného H řetězce a nukleotidová sekvence, která ji kóduje
- SEQ ID NO: 72: Aminokyselinová sekvence verze "j" V oblasti zušlechtěného H řetězce
- SEQ ID NO: 73: Primer F2MPS pro záměnu FR
- SEQ ID NO: 74: Primer F2MPA pro záměnu FR
- SEQ ID NO: 75: Aminokyselinová sekvence verze "b1" V oblasti zušlechtěného H řetězce a nukleotidová sekvence, která ji kóduje
- SEQ ID NO: 76: Aminokyselinová sekvence verze "b1" V oblasti zušlechtěného H řetězce
- SEQ ID NO: 77: Aminokyselinová sekvence verze "d1" V oblasti zušlechtěného H řetězce a nukleotidová sekvence, která ji kóduje
- SEQ ID NO: 78: Aminokyselinová sekvence verze "d1" V oblasti zušlechtěného H řetězce
- SEQ ID NO: 79: Primer F2VHS pro záměnu FR
- SEQ ID NO: 80: Primer F2VHA pro záměnu FR
- SEQ ID NO: 81: Aminokyselinová sekvence verze "b3" V oblasti zušlechtěného H řetězce a nukleotidová sekvence, která ji kóduje
- SEQ ID NO: 82: Aminokyselinová sekvence verze "b3" V oblasti zušlechtěného H řetězce
- SEQ ID NO: 83: Aminokyselinová sekvence verze "d3" V oblasti zušlechtěného H řetězce a nukleotidová sekvence, která ji kóduje
- SEQ ID NO: 84: Aminokyselinová sekvence verze "d3" V oblasti zušlechtěného H řetězce
- SEQ ID NO: 85: Vektor h5Lv1S pro záměnu FR



- SEQ ID NO: 86: Vektor h5Lv4S pro záměnu FR
- SEQ ID NO: 87: Vektor h5Lv2A pro záměnu FR
- SEQ ID NO: 88: Vektor h5Lv3A pro záměnu FR
- SEQ ID NO: 89: Vektor h5Lv5A pro záměnu FR
- SEQ ID NO: 90: Primer h5LvS
- SEQ ID NO: 91: Primer h5LvA
- SEQ ID NO: 92: Aminokyselinová sekvence verze "a" V oblasti zušlechtěného L řetězce a nukleotidová sekvence, která ji kóduje
- SEQ ID NO: 93: Aminokyselinová sekvence verze "a" V oblasti zušlechtěného L řetězce
- SEQ ID NO: 94: Primer F3SS pro záměnu FR
- SEQ ID NO: 95: Primer F3SA pro záměnu FR
- SEQ ID NO: 96: Primer F3RS pro záměnu FR
- SEQ ID NO: 97: Primer F3RA pro záměnu FR
- SEQ ID NO: 98: Aminokyselinová sekvence verze "b" V oblasti zušlechtěného L řetězce a nukleotidová sekvence, která ji kóduje
- SEQ ID NO: 99: Aminokyselinová sekvence verze "b" V oblasti zušlechtěného L řetězce
- SEQ ID NO: 100: Aminokyselinová sekvence verze "c" V oblasti zušlechtěného L řetězce a nukleotidová sekvence, která ji kóduje
- SEQ ID NO: 101: Aminokyselinová sekvence verze "c" V oblasti zušlechtěného L řetězce
- SEQ ID NO: 102: Primer F2SS pro záměnu FR
- SEQ ID NO: 103: Primer F2SA pro záměnu FR
- SEQ ID NO: 104: Primer F2XS pro záměnu FR
- SEQ ID NO: 105: Primer F2XA pro záměnu FR
- SEQ ID NO: 106: Aminokyselinová sekvence verze "b1" V oblasti zušlechtěného L řetězce a nukleotidová sekvence, která ji kóduje
- SEQ ID NO: 107: Aminokyselinová sekvence verze "b1" V oblasti zušlechtěného L řetězce
- SEQ ID NO: 108: Aminokyselinová sekvence verze "b2" V oblasti zušlechtěného L řetězce a nukleotidová sekvence, která ji kóduje



SEQ ID NO: 109: Aminokyselinová sekvence verze "b2" V oblasti zušlechtěného L řetězce

SEQ ID NO: 110: Aminokyselinová sekvence FR1 všech verzí V oblasti zušlechtěného H řetězce

SEQ ID NO: 111: Aminokyselinová sekvence FR2 verzí "a" až "j" V oblasti zušlechtěného H řetězce

SEQ ID NO: 112: Aminokyselinová sekvence FR2 verzí "b1" a "d1" V oblasti zušlechtěného H řetězce

SEQ ID NO: 113: Aminokyselinová sekvence FR2 verzí "b3" a "d3" V oblasti zušlechtěného H řetězce

SEQ ID NO: 114: Aminokyselinová sekvence FR3 verze "a" V oblasti zušlechtěného H řetězce

SEQ ID NO: 115: Aminokyselinová sekvence FR3 verzí "b", „b1“ a „b3“ V oblasti zušlechtěného H řetězce

SEQ ID NO: 116: Aminokyselinová sekvence FR3 verze "c" V oblasti zušlechtěného H řetězce

SEQ ID NO: 117: Aminokyselinová sekvence FR3 verzí "d", „d1“ a „d3“ V oblasti zušlechtěného H řetězce

SEQ ID NO: 118: Aminokyselinová sekvence FR3 verze "e" V oblasti zušlechtěného H

SEQ ID NO: 119: Aminokyselinová sekvence FR3 verze "f" V oblasti zušlechtěného H

SEQ ID NO: 120: Aminokyselinová sekvence FR3 verze "g" V oblasti zušlechtěného H

SEQ ID NO: 121: Aminokyselinová sekvence FR3 verze "h" V oblasti zušlechtěného H

SEQ ID NO: 122: Aminokyselinová sekvence FR3 verze "i" V oblasti zušlechtěného H

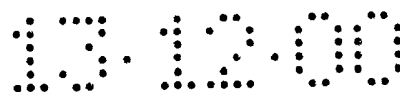
SEQ ID NO: 123: Aminokyselinová sekvence FR3 verze "j" V oblasti zušlechtěného H

SEQ ID NO: 124: Aminokyselinová sekvence FR4 všech verzí V oblasti zušlechtěného H řetězce

SEQ ID NO: 125: Aminokyselinová sekvence FR1 všech verzí V oblasti zušlechtěného L řetězce

SEQ ID NO: 126: Aminokyselinová sekvence FR2 verzí "a", „b“ a „c“ V oblasti zušlechtěného L řetězce

SEQ ID NO: 127: Aminokyselinová sekvence FR2 verze "b1" V oblasti zušlechtěného L řetězce



- SEQ ID NO: 128: Aminokyselinová sekvence FR2 verze "b2" V oblasti zušlechtěného L řetězce
- SEQ ID NO: 129: Aminokyselinová sekvence FR3 verze "a" V oblasti zušlechtěného L řetězce
- SEQ ID NO: 130: Aminokyselinová sekvence FR3 verzí "b", „b1“ a „b2“ V oblasti zušlechtěného L řetězce
- SEQ ID NO: 131: Aminokyselinová sekvence FR3 verze "c" V oblasti zušlechtěného L řetězce
- SEQ ID NO: 132: Aminokyselinová sekvence FR4 všech verzí V oblasti zušlechtěného L řetězce
- SEQ ID NO: 133: Aminokyselinová sekvence CDR1 všech verzí V oblasti zušlechtěného H řetězce
- SEQ ID NO: 134: Aminokyselinová sekvence CDR2 všech verzí V oblasti zušlechtěného H řetězce
- SEQ ID NO: 135: Aminokyselinová sekvence CDR3 všech verzí V oblasti zušlechtěného H řetězce
- SEQ ID NO: 136: Aminokyselinová sekvence CDR1 všech verzí V oblasti zušlechtěného L řetězce
- SEQ ID NO: 137: Aminokyselinová sekvence CDR2 všech verzí V oblasti zušlechtěného L řetězce
- SEQ ID NO: 138: Aminokyselinová sekvence CDR3 všech verzí V oblasti zušlechtěného L řetězce
- SEQ ID NO: 139: Aminokyselinová sekvence V oblasti H řetězce myší monoklonální protilátky ATR-2 proti lidskému TF
- SEQ ID NO: 140: Aminokyselinová sekvence V oblasti H řetězce myší monoklonální protilátky ATR-3 proti lidskému TF
- SEQ ID NO: 141: Aminokyselinová sekvence V oblasti H řetězce myší monoklonální protilátky ATR-4 proti lidskému TF
- SEQ ID NO: 142: Aminokyselinová sekvence V oblasti H řetězce myší monoklonální protilátky ATR-5 proti lidskému TF
- SEQ ID NO: 143: Aminokyselinová sekvence V oblasti H řetězce myší monoklonální protilátky ATR-7 proti lidskému TF



SEQ ID NO: 144: Aminokyselinová sekvence V oblasti H řetězce myší monoklonální protilátky ATR-8 proti lidskému TF

SEQ ID NO: 145: Aminokyselinová sekvence V oblasti L řetězce myší monoklonální protilátky ATR-2 proti lidskému TF

SEQ ID NO: 146: Aminokyselinová sekvence V oblasti L řetězce myší monoklonální protilátky ATR-3 proti lidskému TF

SEQ ID NO: 147: Aminokyselinová sekvence V oblasti L řetězce myší monoklonální protilátky ATR-4 proti lidskému TF

SEQ ID NO: 148: Aminokyselinová sekvence V oblasti L řetězce myší monoklonální protilátky ATR-5 proti lidskému TF

SEQ ID NO: 149: Aminokyselinová sekvence V oblasti L řetězce myší monoklonální protilátky ATR-7 proti lidskému TF

SEQ ID NO: 150: Aminokyselinová sekvence V oblasti L řetězce myší monoklonální protilátky ATR-8 proti lidskému TF

SEQ ID NO: 151: Aminokyselinová sekvence rozpustného lidského TF a nukleotidová sekvence, která ji kóduje

SEQ ID NO: 152: Aminokyselinová sekvence rozpustného lidského TF

PATENTOVÉ NÁROKY *PV2010-2601**88304*

1. Chimerní těžký (H) řetězec, obsahující variabilní (V) oblast H řetězce myší monoklonální protilátky proti lidskému tkáňovému faktoru (TF) a konstantní (C) oblast H řetězce lidské protilátky, přičemž uvedená V oblast H řetězce má kteroukoli z následujících aminokyselinových sekvencí:
  - (1) aminokyselinová sekvence SEQ ID NO: 139 (ATR-2),
  - (2) aminokyselinová sekvence SEQ ID NO: 140 (ATR-3),
  - (3) aminokyselinová sekvence SEQ ID NO: 141 (ATR-4),
  - (4) aminokyselinová sekvence SEQ ID NO: 142 (ATR-5),
  - (5) aminokyselinová sekvence SEQ ID NO: 143 (ATR-7),
  - (6) aminokyselinová sekvence SEQ ID NO: 144 (ATR-8).
2. Chimerní H řetězec podle nároku 1, kde uvedená V oblast H řetězce má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 142.
3. Chimerní H řetězec podle nároků 1 nebo 2, kde uvedená C oblast H řetězce je oblast Cy1, Cy2, Cy3 nebo Cy4.
4. Chimerní H řetězec podle kteréhokoli z nároků 1 až 3, kde uvedená V oblast H řetězce má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 142 a uvedená C oblast H řetězce je oblast Cy4.
5. Chimerní lehký (L) řetězec obsahující V oblast L řetězce myší monoklonální protilátky proti lidskému TF a C oblast L řetězce lidské protilátky, přičemž uvedená V oblast L řetězce má kteroukoli z následujících aminokyselinových sekvencí:
  - (1) aminokyselinová sekvence SEQ ID NO: 145 (ATR-2),
  - (2) aminokyselinová sekvence SEQ ID NO: 146 (ATR-3),
  - (3) aminokyselinová sekvence SEQ ID NO: 147 (ATR-4),
  - (4) aminokyselinová sekvence SEQ ID NO: 148 (ATR-5),
  - (5) aminokyselinová sekvence SEQ ID NO: 149 (ATR-7),
  - (6) aminokyselinová sekvence SEQ ID NO: 150 (ATR-8).

6. Chimerní L řetězec podle nároku 5, kde uvedená V oblast H řetězce má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 148.
7. Chimerní L řetězec podle nároků 5 nebo 6, kde uvedená C oblast L řetězce je oblast Cλ nebo Cκ.
8. Chimerní L řetězec podle kteréhokoli z nároků 5 až 7, kde uvedená V oblast L řetězce má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 148 a uvedená C oblast L řetězce je oblast Cκ.
9. Chimerní protilátka proti lidskému TF obsahující chimerní H řetězec podle kteréhokoli z nároků 1 až 4 a chimerní L řetězec podle kteréhokoli z nároků 5 až 8.
10. Chimerní protilátka proti lidskému TF obsahující chimerní H řetězec podle kteréhokoli z nároků 1 až 4 a chimerní L řetězec podle kteréhokoli z nároků 5 až 8.
11. V oblast zušlechtěného H řetězce, obsahujícího oblast určující komplementaritu (CDR) z V oblasti H řetězce myší monoklonální protilátky proti lidskému TF a podpůrnou oblast (FR) V oblasti H řetězce lidské protilátky, přičemž uvedené CDRs obsahují následující aminokyselinové sekvence:  
H-CDR1: Asp Tyr Tyr Met His (SEQ ID NO: 133),  
H-CDR2: Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe Gln Gly (SEQ ID NO: 134) a  
H-CDR3: Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr (SEQ ID NO: 135).
12. V oblast zušlechtěného H řetězce, kde uvedené FRs obsahují následující aminokyselinové sekvence:  
H-FR1: Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys (SEQ ID NO: 110),  
HFR-2: kterákoli z následujících sekvencí (1) až (3):

- (1) Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly (SEQ ID NO: 111),
- (2) Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly (SEQ ID NO: 112),
- (3) Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly (SEQ ID NO: 113),

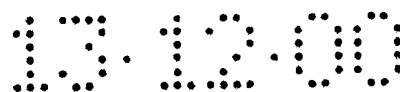
H-FR3: kterákoli z následujících sekvencí (1) až (10):

- (1) Arg Ala Lys Leu Thr Ala Ala Thr Ser Ala Ser Ile Ala Tyr Leu Glu Phe Ser Ser  
Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg (SEQ ID NO: 114),
- (2) Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser  
Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg (SEQ ID NO: 115),
- (3) Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser  
Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg (SEQ ID NO: 116),
- (4) Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser  
Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg (SEQ ID NO: 117),
- (5) Arg Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Lys Ile Ala Tyr Met Glu Leu Asn Ser  
Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg (SEQ ID NO: 118),
- (6) Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser  
Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg (SEQ ID NO: 119),
- (7) Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser  
Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Ser Cys Ala Arg (SEQ ID NO: 120),
- (8) Arg Val Thr Met Ser Ala Asp Lys Ser Ser Ser Ala Ala Tyr Leu Gln Trp Thr Ser  
Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Arg (SEQ ID NO: 121),
- (9) Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Phe Met Glu Leu Ser Ser  
Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg (SEQ ID NO: 122) a
- (10) Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg  
Ser Leu Arg Ser Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg (SEQ ID NO: 123)

a

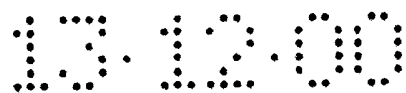
FR4: Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser (SEQ ID NO: 124).

- (3) V oblast zušlechtěného H řetězce podle nároků 11 nebo 12, která má aminokyselinovou sekvenci, která je uvedena v SEQ ID NO: 30 (verze a), SEQ ID NO: 40 (verze b), SEQ ID NO: 42 (verze c), SEQ ID NO: 50 (verze d), SEQ ID NO: 52 (verze e), SEQ ID NO: 58 (verze f), SEQ ID NO: 60 (verze g), SEQ ID NO: 64 (verze h), SEQ ID NO: 70 (verze i), SEQ ID NO: 72 (verze j), SEQ ID



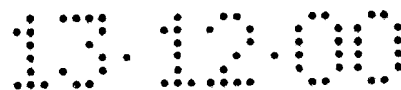
NO: 76 (verze b1), SEQ ID NO: 78 (verze d1), SEQ ID NO: 82 (verze b3) nebo SEQ ID NO: 84 (verze d3).

14. V oblast zušlechtěného H řetězce podle kteréhokoli z nároků 11 až 12, která má aminokyselinovou sekvenci, která je uvedena v SEQ ID NO: 40 (verze b).
15. V oblast zušlechtěného H řetězce podle kteréhokoli z nároků 11 až 12, která má aminokyselinovou sekvenci, která je uvedena v SEQ ID NO: 70 (verze i).
16. V oblast zušlechtěného L řetězce, obsahující CDRs V oblasti zušlechtěného L řetězce z myší monoklonální protilátky proti lidskému TF a FRs V oblasti lidského L řetězce, kde uvedené CDRs zahrnují následující aminokyselinové sekvence:  
L-CDR1: Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Phe Leu Ser (SEQ ID NO: 136),  
L-CDR2: Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp (SEQ ID NO: 137) a  
L-CDR3: Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr Thr (SEQ ID NO: 138).
17. V oblast zušlechtěného L řetězce podle nároku 16 nebo 12, kde uvedené FRs zahrnují následující aminokyselinové sekvence:  
L-FR1: Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys (SEQ ID NO: 125),  
L-FR2: kterákoli z následujících sekvencí (1) až (3):  
(1) Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr (SEQ ID NO: 126),  
(2) Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile Tyr (SEQ ID NO: 127) a  
(3) Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr (SEQ ID NO: 128),  
L-FR3: kterákoli z následujících sekvencí (1) až (3):  
(1) Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys (SEQ ID NO: 129),  
(2) Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys (SEQ ID NO: 130) a

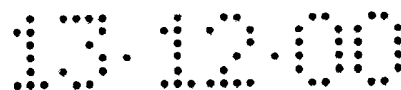


(3) Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile  
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys (SEQ ID NO: 131) a  
L-FR4: Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys (SEQ ID NO: 132).

18. V oblast zušlechtěného L řetězce podle nároků 16 nebo 17, která má aminokyselinovou sekvenci, která je uvedena v SEQ ID NO: 93 (verze a), SEQ ID NO: 99 (verze b), SEQ ID NO: 101 (verze c), SEQ ID NO: 107 (verze b1) nebo SEQ ID NO: 109 (verze b2).
19. V oblast zušlechtěného L řetězce podle kteréhokoli z nároků 16 až 18, která má aminokyselinovou sekvenci, která je uvedena v SEQ ID NO: 99 (verze b).
20. V oblast zušlechtěného L řetězce podle kteréhokoli z nároků 16 až 18, která má aminokyselinovou sekvenci, která je uvedena v SEQ ID NO: 109 (verze b2).
21. Zušlechtěný H řetězec protilátky proti lidskému TF, kde uvedený řetězec obsahuje V oblast zušlechtěného H řetězce podle kteréhokoli z nároků 11 až 15, a C oblast H řetězce lidské protilátky.
22. Zušlechtěný H řetězec protilátky proti lidskému TF, kde uvedený řetězec obsahuje V oblast (verzi b) zušlechtěného H řetězce podle nároku 14, a C oblast H řetězce lidské protilátky.
23. Zušlechtěný H řetězec protilátky proti lidskému TF, kde uvedený řetězec obsahuje V oblast (verzi i) zušlechtěného H řetězce podle nároku 15, a C oblast H řetězce lidské protilátky.
24. Zušlechtěný H řetězec podle kteréhokoli z nároků 21 až 23, kde uvedená C oblast H řetězce lidské protilátky je Cy1, Cy2, Cy3 nebo Cy4.
25. Zušlechtěný L řetězec protilátky proti lidskému TF, kde uvedený řetězec obsahuje V oblast zušlechtěného L řetězce podle kteréhokoli z nároků 16 až 20, a C oblast L řetězce lidské protilátky.

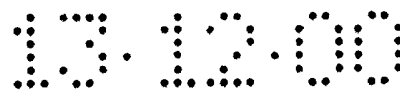


26. Zušlechtěný L řetězec protilátky proti lidskému TF, kde uvedený řetězec obsahuje V oblast (verzi b) zušlechtěného L řetězce podle nároku 19, a C oblast L řetězce lidské protilátky.
27. Zušlechtěný L řetězec protilátky proti lidskému TF, kde uvedený řetězec obsahuje V oblast (verzi b2) zušlechtěného L řetězce podle nároku 20, a C oblast L řetězce lidské protilátky.
28. Zušlechtěný L řetězec podle kteréhokoli z nároků 25 až 27, kde uvedená C oblast L řetězce lidské protilátky je Cλ nebo Cκ.
29. Zušlechtěná protilátka proti lidskému TF, kde uvedená protilátka obsahuje zušlechtěný H řetězec podle kteréhokoli z nároků 21 až 27, a zušlechtěný L řetězec podle kteréhokoli z nároků 25 až 28.
30. Zušlechtěná protilátka proti lidskému TF, kde uvedená protilátka obsahuje zušlechtěný H řetězec (verzi b) podle nároku 22, a zušlechtěný L řetězec (verzi b) podle nároku 26.
31. Zušlechtěná protilátka proti lidskému TF, kde uvedená protilátka obsahuje zušlechtěný H řetězec (verzi i) podle nároku 23, a zušlechtěný L řetězec (verzi b) podle nároku 26.
32. Zušlechtěná protilátka proti lidskému TF, kde uvedená protilátka obsahuje zušlechtěný H řetězec (verzi i) podle nároku 23, a zušlechtěný L řetězec (verzi b2) podle nároku 27.
33. DNA kódující chimerní H řetězec podle kteréhokoli z nároků 1 až 4.
34. DNA kódující chimerní H řetězec podle kteréhokoli z nároků 2 až 4.
35. DNA kódující chimerní L řetězec podle kteréhokoli z nároků 5 až 8.



36. DNA kódující chimerní L řetězec podle kteréhokoli z nároků 6 až 8.
37. DNA kódující V oblast zušlechtěného H řetězce podle kteréhokoli z nároků 11 až 15.
38. DNA kódující V oblast zušlechtěného H řetězce (verzi b) podle nároku 14.
39. DNA kódující V oblast zušlechtěného H řetězce (verzi i) podle nároku 15.
40. DNA kódující V oblast zušlechtěného L řetězce podle kteréhokoli z nároků 16 až 20.
41. DNA kódující V oblast zušlechtěného L řetězce (verzi b) podle nároku 19.
42. DNA kódující V oblast zušlechtěného L řetězce (verzi b2) podle nároku 20.
43. DNA kódující zušlechtěný H řetězec podle kteréhokoli z nároků 21 až 24.
44. DNA kódující zušlechtěný H řetězec (verzi b) podle nároku 22 nebo 24.
45. DNA kódující zušlechtěný H řetězec (verzi i) podle nároku 23 nebo 24.
46. DNA kódující zušlechtěný L řetězec podle kteréhokoli z nároků 25 až 28.
47. DNA kódující zušlechtěný L řetězec (verzi b) podle nároku 26 nebo 28.
48. DNA kódující zušlechtěný L řetězec (verzi b2) podle nároku 27 nebo 28.
49. Expresní vektor, který obsahuje DNA kódující chimerní řetězec H podle nároku 33.
50. Expresní vektor, který obsahuje DNA kódující chimerní řetězec H podle nároku 34.





51. Expresní vektor, který obsahuje DNA kódující chimerní řetězec L podle nároku 35.
52. Expresní vektor, který obsahuje DNA kódující chimerní řetězec L podle nároku 36.
53. Expresní vektor, který obsahuje DNA kódující chimerní řetězec H podle nároku 33 a DNA kódující chimerní řetězec L podle nároku 35.
54. Expresní vektor, který obsahuje DNA kódující chimerní řetězec H podle nároku 34 a DNA kódující chimerní řetězec L podle nároku 36.
55. Expresní vektor, který obsahuje DNA kódující zušlechtěný řetězec H podle nároku 43.
56. Expresní vektor, který obsahuje DNA kódující verzi b zušlechtěného řetězce H podle nároku 44.
57. Expresní vektor, který obsahuje DNA kódující verzi i zušlechtěného řetězce H podle nároku 45.
58. Expresní vektor, který obsahuje DNA kódující zušlechtěný řetězec L podle nároku 46.
59. Expresní vektor, který obsahuje DNA kódující verzi b zušlechtěného řetězce L podle nároku 47.
60. Expresní vektor, který obsahuje DNA kódující verzi b2 zušlechtěného řetězce L podle nároku 48.
61. Expresní vektor, který obsahuje DNA kódující zušlechtěný řetězec H podle nároku 43 a DNA kódující zušlechtěný řetězec L podle nároku 46.

62. Expresní vektor, který obsahuje DNA kódující verzi b zušlechtěného řetězce H podle nároku 44 a DNA kódující verzi h zušlechtěného řetězce L podle nároku 47.
63. Expresní vektor, který obsahuje DNA kódující verzi i zušlechtěného řetězce H podle nároku 45 a DNA kódující verzi b zušlechtěného řetězce L podle nároku 47.
64. Expresní vektor, který obsahuje DNA kódující verzi i zušlechtěného řetězce H podle nároku 45 a DNA kódující verzi b2 zušlechtěného řetězce L podle nároku 48.
65. Hostitel transformovaný expresním vektorem, který obsahuje DNA kódující chimerní řetězec H podle nároku 49 a expresním vektorem, který obsahuje DNA kódující chimerní řetězec L podle nároku 51.
66. Hostitel transformovaný expresním vektorem, který obsahuje DNA kódující chimerní řetězec H podle nároku 50 a expresním vektorem, který obsahuje DNA kódující chimerní řetězec L podle nároku 52.
67. Hostitel transformovaný expresním vektorem podle nároku 53.
68. Hostitel transformovaný expresním vektorem podle nároku 54.
69. Hostitel transformovaný expresním vektorem, který obsahuje DNA kódující zušlechtěný řetězec H podle nároku 55 a expresním vektorem, který obsahuje DNA kódující zušlechtěný řetězec L podle nároku 58.
70. Hostitel transformovaný expresním vektorem, který obsahuje DNA kódující verzi b zušlechtěného řetězce H podle nároku 56 a expresním vektorem, který obsahuje DNA kódující verzi b zušlechtěného řetězce L podle nároku 59.

71. Hostitel transformovaný expresním vektorem, který obsahuje DNA kódující verzi i zušlechtěného řetězce H podle nároku 57 a expresním vektorem, který obsahuje DNA kódující verzi b2 zušlechtěného řetězce L podle nároku 6.
72. Hostitel transformovaný expresním vektorem podle nároku 61.
73. Hostitel transformovaný expresním vektorem podle nároku 62.
74. Hostitel transformovaný expresním vektorem podle nároku 63.
75. Hostitel transformovaný expresním vektorem podle nároku 64.
76. Hostitel transformovaný expresním vektorem, který obsahuje DNA kódující verzi i zušlechtěného řetězce H podle nároku 57 a expresním vektorem, který obsahuje DNA kódující verzi b zušlechtěného řetězce L podle nároku 59.
77. Způsob přípravy chimerní protilátky proti lidskému TF, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje kultivaci hostitele podle nároku 65 a odebírání chimerní protilátky z uvedené kultury.
78. Způsob přípravy chimerní protilátky proti lidskému TF, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje kultivaci hostitele podle nároku 66 a odebírání chimerní protilátky z uvedené kultury.
79. Způsob přípravy chimerní protilátky proti lidskému TF, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje kultivaci hostitele podle nároku 67 a odebírání chimerní protilátky z uvedené kultury.
80. Způsob přípravy chimerní protilátky proti lidskému TF, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje kultivaci hostitele podle nároku 68 a odebírání chimerní protilátky z uvedené kultury.

81. Způsob přípravy zušlechtěné protilátky proti lidskému TF, vyznačující se tím, že obsahuje kultivaci hostitele podle nároku 69 a odebrání zušlechtěné protilátky z uvedené kultury.
82. Způsob přípravy zušlechtěné protilátky proti lidskému TF, vyznačující se tím, že obsahuje kultivaci hostitele podle nároku 70 a odebrání zušlechtěné protilátky z uvedené kultury.
83. Způsob přípravy zušlechtěné protilátky proti lidskému TF, vyznačující se tím, že obsahuje kultivaci hostitele podle nároku 71 a odebrání zušlechtěné protilátky z uvedené kultury.
84. Způsob přípravy zušlechtěné protilátky proti lidskému TF, vyznačující se tím, že obsahuje kultivaci hostitele podle nároku 72 a odebrání zušlechtěné protilátky z uvedené kultury.
85. Způsob přípravy zušlechtěné protilátky proti lidskému TF, vyznačující se tím, že obsahuje kultivaci hostitele podle nároku 73 a odebrání zušlechtěné protilátky z uvedené kultury.
86. Způsob přípravy zušlechtěné protilátky proti lidskému TF, vyznačující se tím, že obsahuje kultivaci hostitele podle nároku 74 a odebrání zušlechtěné protilátky z uvedené kultury.
87. Způsob přípravy zušlechtěné protilátky proti lidskému TF, vyznačující se tím, že obsahuje kultivaci hostitele podle nároku 75 a odebrání zušlechtěné protilátky z uvedené kultury.
88. Způsob přípravy zušlechtěné protilátky proti lidskému TF, vyznačující se tím, že obsahuje kultivaci hostitele podle nároku 76 a odebrání zušlechtěné protilátky z uvedené kultury.

89. Způsob přípravy přirozené zušlechtěné protilátky, která má oblasti určující komplementaritu (CDRs) odvozeny z jiného organismu než člověka a podpurnou oblast (FR) má odvozenou z přirozené lidské protilátky a která má sníženou imunogenitu, vyznačující se tím, že obsahuje kroky:
- (1) příprava monoklonální protilátky u jiného organismu než člověka, reagující proti zájmovému antigenu;
  - (2) příprava množství druhů lidských protilátek, které mají vysokou homologii s aminokyselinovými sekvencemi v FRs monoklonálních protilátek, které jsou uvedeny výše v bodě (1);
  - (3) záměna čtyř FRs jedné lidské protilátky, které jsou uvedeny výše v bodě (2) za odpovídající FRs monoklonální protilátky jiného organismu než člověka, která je uvedena výše v bodě (1) a vytvořit první zušlechtěnou protilátku;
  - (4) určení schopnosti zušlechtěné protilátky, které je připravena výše v bodě (3) vázat se k antigenu nebo neutralizovat biologickou aktivitu antigenu;
  - (5) záměna jedné až tří FRs zušlechtěné protilátky, které je připravena výše v bodě (3) za odpovídající FRs lidské protilátky, které se liší od protilátky použité v bodě (3), u lidských protilátek, připravených v bodě (2) a vytvořit druhou zušlechtěnou protilátku;
  - (6) porovnání schopnosti druhé zušlechtěné protilátky, vytvořené výše v bodě (5) a první zušlechtěné protilátky, vytvořené výše v bodě (3) vázat se k antigenu nebo neutralizovat biologickou aktivitu antigenu a tím vybrat zušlechtěnou protilátku, která má výhodnější aktivitu;
  - (7) provedení výše uvedených kroků (3) až (6) u zušlechtěné protilátky, vybrané výše v bodě (6); a
  - (8) opakování výše uvedených kroků (3) až (6) dokud se nepodaří získat zušlechtěnou protilátku, která má aktivitu odpovídající monoklonální protilátce jiného živočicha než je člověk, uvedené výše v bodě (1).
90. Způsob přípravy podle nároku 89, vyznačující se tím, že uvedený antigen o který jde, je lidský tkáňový faktor (TF).
91. Zušlechtěná protilátka, připravená způsobem přípravy podle nároku 89.

92. Zušlechtěná protilátka, připravená způsobem přípravy podle nároku 90.
93. Léčebné činidlo pro syndrom roztroušené nitrožilní srážlivosti (DIC), v y z n a č u -  
j í c í s e t í m, že obsahuje zušlechtěnou protilátku podle kteréhokoli z nároků  
29 až 32 a nároku 92.

## SEZNAM SEKVENCÍ

- <110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA
- <120> Zušlechtěné protilátky proti lidskému tkáňovému faktoru (TF) a způsob přípravy zušlechtěných protilátek
- <130> G821
- <150> JP 10-91850
- <151> 1998-04-03
- <160> 152
- <210> 1
- <211> 28
- <212> DNA
- <213> Umělá sekvence
- <220>
- <223> Primer MHC-G1
- <400> 1
- ggatcccggg ccagtggata gacagatg** 28
- <210> 2
- <211> 27
- <212> DNA
- <213> Umělá sekvence
- <220>

<223> Primer MHC-G2a

<400> 2

**ggatcccggg agtggataga ccgatgg**

27

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Primer MKC

<400> 3

**ggatcccggg tggatggtgg gaagatg**

27

<210> 4

<211> 17

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> M13 Primer M4

<400> 4

**gttttcccag tcaogac**

17

<210> 5

<211> 17

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>



<223> M13 Primer RV

<400> 5

caggaaacag ctatgac

17

<210> 6

<211> 411

<212> DNA

<213> Myš

<220>

<221> signální peptid

<222> (1)...(57)

<220>

<221> maturovaný peptid

<222> (58)...(441)

<223> Nukleotidová sekvence kódující V oblast H řetězce  
myši monoklonální protilátky ATR-2 proti TF

<400> 6

atg gaa tgg agc tgg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act aca ggt 48

Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Thr Gly

-15 -10 -5

gtc cac tct gag atc cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag 96

Val His Ser Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys

1 5 10

cct ggg gct tca gtg aag gta tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc 144

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe

15 20 25

act gac tac aac atg tac tgg gtg aag cag agc cat gga aag agc ctt 192

Thr Asp Tyr Asn Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu

30 35 40 45

gag tgg att gga tat att gat cct tac aat ggt ggt act atc tac aac 240

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn

50 55 60

```

cag aag ttc aag ggc aag gcc aca ttg act gtt gac aag tcc tcc agc      288
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
      65              70              75
aca gcc ttc atg cat ctc aac agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc      336
Thr Ala Phe Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
      80              85              90
tat tac tgt gca aga gga ggg gaa ggg tac tac ttt gac tac tgg ggc      384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Glu Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
      95              100             105
caa ggc acc act ctc aca gtc tcc tca                                  411
Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
110              115

```

```

<210>      7
<211>     411
<212>     DNA
<213>     Myš

```

```

<220>
<221>     signální peptid
<222>     (1)...(57)
<220>
<221>     maturovaný peptid
<222>     (58)...(441)
<223>     Nukleotidová sekvence kódující V oblast H řetězce
           myší monoklonální protilátky ATR-3 proti TF

```

```

<400>      7
atg gaa tgg agc tgg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act aca ggt      48
Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Thr Gly
      -15              -10              -5
gtc cac tct gag atc cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag      96
Val His Ser Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
      1              5              10

```

```

cct ggg gct tca gtg aag gta tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc      144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
    15                20                25
act gac tac aac atg tac tgg gtg aag cag agc cat gga aag agc ctt      192
Thr Asp Tyr Asn Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu
    30                35                40                45
gag tgg att gga tat att gat cct tac aat ggt ggt act atc tac aac      240
Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn
                50                55                60
cag aag ttc aag ggc aag gcc aca ttg act gtt gac aag tcc tcc agc      288
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
                65                70                75
aca gcc ttc atg cat ctc aac agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc      336
Thr Ala Phe Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
                80                85                90
tat tac tgt gca aga gga ggg gaa ggg tac tac ttt gac tac tgg ggc      384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Glu Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
                95                100                105
caa ggc acc act ctc aca gtc tcc tca      411
Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
110                115

```

<210>

8

<211>

408

<212>

DNA

<213>

Myš

<220>

<221>

signální peptid

<222>

(1)...(57)

<220>

<221>

maturovaný peptid

<222>

(58)...(408)

<223>

Nukleotidová sekvence kódující V oblast H řetězce  
myši monoklonální protilátky ATR-4 proti TF

<400> 8

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48  
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly  
-15 -10 -5

gtc aat tca gag gtt cag ctg cag cag tct ggg gct gag ctt gtg agg 96  
Val Asn Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg  
1 5 10

cca ggg gcc tta gtc aag ttg tcc tgc aaa gct tct ggc ttc aac att 144  
Pro Gly Ala Leu Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile  
15 20 25

aaa gac tac tat atg cac tgg gtg aag cag agg cct gaa cag ggc ctg 192  
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu  
30 35 40 45

gag tgg att gga ttg att gat cct caa aat ggt aat act ata tat gac 240  
Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asp Pro Gln Asn Gly Asn Thr Ile Tyr Asp  
50 55 60

ccg aag ttc cag ggc aag gcc agt ata aca gca gac aca tcc tcc aac 288  
Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Ser Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn  
65 70 75

aca gcc tac ctg cag ctc agc agc ctg aca tct gag gac act gcc gtc 336  
Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val  
80 85 90

tat tac tgt gat aga gac tcg ggc tat gct atg gac tac tgg ggt caa 384  
Tyr Tyr Cys Asp Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
95 100 105

gga acc tca gtc acc gtc tcc tca 408  
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
110 115

<210> 9  
<211> 408  
<212> DNA  
<213> Myš

<220>  
<221> signální peptid  
<222> (1)...(57)

<220>  
 <221> maturovaný peptid  
 <222> (58)...(408)  
 <223> Nukleotidová sekvence kódující V oblast H řetězce  
 myší monoklonální protilátky ATR-5 proti TF

<400> 9

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg	48
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly	
-15 -10 -5	
gtc aat tca gag gtt cag ctg cag cag tct ggg act aac ctt gtg agg	96
Val Asn Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Asn Leu Val Arg	
1 5 10	
cca ggg gcc tta gtc aag ttg tcc tgc aaa ggt tct ggc ttc aac att	144
Pro Gly Ala Leu Val Lys Leu Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Asn Ile	
15 20 25	
aaa gac tac tat atg cac tgg gtg aag cag agg cct gaa cag ggc ctg	192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
gag tgg att gga ggg aat gat cct gcg aat ggt cat agt atg tat gac	240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp	
50 55 60	
ccg aaa ttc cag ggc aag gcc agt ata aca gca gac aca tcc tcc aac	288
Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Ser Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn	
65 70 75	
aca gcc tac ctg cag ctc agc agc ctg aca tct gag gac act gcc gtc	336
Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val	
80 85 90	
tat ttc tgt gct aga gac tcg ggc tat gct atg gac tac tgg ggt caa	384
Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln	
95 100 105	
gga acc tca gtc acc gtc tcc tca	408
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser	
110 115	

<210> 10  
 <211> 411

<212> DNA  
 <213> Myš

<220>  
 <221> signální peptid  
 <222> (1)...(57)  
 <220>  
 <221> maturovaný peptid  
 <222> (58)...(411)  
 <223> Nukleotidová sekvence kódující V oblast H řetězce  
 myši monoklonální protilátky ATR-7 proti TF

<400> 10

atg gaa tgg agc tgg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act aca ggt	48
Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Thr Gly	
-15 -10 -5	
gtc cac tct gac atc cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag	96
Val His Ser Asp Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys	
1 5 10	
cct ggg tct tca gtg aag gta tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc	144
Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe	
15 20 25	
cct gac tac aac ata ttc tgg gtg aag cag agc cat gga aag agc ctt	192
Pro Asp Tyr Asn Ile Phe Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu	
30 35 40 45	
gag tgg att gga tat att gat cct tac act ggt ggt act ggc tac aac	240
Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Thr Gly Gly Thr Gly Tyr Asn	
50 55 60	
cag aag ttc aac gac aag gcc aca ttg act gtt gac aag tcc tcc agc	288
Gln Lys Phe Asn Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser	
65 70 75	
aca gcc ttc atg cat ctc aac agc cta aca tct gag gac tct gca gtc	336
Thr Ala Phe Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val	
80 85 90	

tat tac tgt gca aga ggt ttc tac tat gat tac gac tgt tac tgg ggc 384  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Phe Tyr Tyr Asp Tyr Asp Cys Tyr Trp Gly  
           95                          100                          105

caa ggg act ctg gtc act gtc tct gca 411  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 110                                  115

<210> 11

<211> 411

<212> DNA

<213> Myš

<220>

<221> signální peptid

<222> (1)...(57)

<220>

<221> maturovaný peptid

<222> (58)...(411)

<223> Nukleotidová sekvence kódující V oblast H řetězce  
 myši monoklonální protilátky ATR-8 proti TF

<400> 11

atg gaa tgg agc tgg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act aca ggt 48  
 Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Thr Gly  
                           -15                          -10                          -5

gtc cac tct gac atc cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag 96  
 Val His Ser Asp Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys  
                           1                          5                          10

cct ggg gct tca gtg aag gta tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc 144  
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe  
           15                          20                          25

act gac tac aac ata ttc tgg gtg aag cag agc cat gga aag agc ctt 192  
 Thr Asp Tyr Asn Ile Phe Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu  
   30                          35                          40                          45

gag tgg att gga tat att gat cct tac act ggt ggt act ggc tac aac 240  
 Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Thr Gly Gly Thr Gly Tyr Asn  
                   50                  55                  60  
 cag aag ttc aac gac aag gcc aca ttg act gtt gac aag tcc tcc agc 288  
 Gln Lys Phe Asn Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser  
                   65                  70                  75  
 aca gcc ttc atg cat ctc aac agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc 336  
 Thr Ala Phe Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val  
                   80                  85                  90  
 tat tac tgt gca aga ggt ttc tac tat gat tac gac tgt tac tgg ggc 384  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Phe Tyr Tyr Asp Tyr Asp Cys Tyr Trp Gly  
                   95                  100                  105  
 caa ggg act ctg gtc act gtc tct gca 411  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 110                  115

<210> 12  
 <211> 375  
 <212> DNA  
 <213> Myš

<220>  
 <221> signální peptid  
 <222> (1)...(54)  
 <220>  
 <221> maturovaný peptid  
 <222> (55)...(375)  
 <223> Nukleotidová sekvence kódující V oblast L řetězce  
 myši monoklonální protilátky ATR-2 proti TF

<400> 12  
 atg ctc act cag ctc ctg gga tta ctg ctg ctc tgg ttt gca ggt ggt 48  
 Met Leu Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Phe Ala Gly Gly  
                   -15                  -10                  -5



```

aaa tgt gac att cag atg acc cag tct cct gcc tcc cag tct gca tct      96
Lys Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Gln Ser Ala Ser
      1              5              10
ctg gga gaa agt gtc acc atc aca tgc ctg gca agt cag acc att ggt      144
Leu Gly Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly
      15              20              25              30
aca tgg tta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa tct cct cag gtc      192
Thr Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Val
              35              40              45
ctg att tat gct gca acc agc ttg gca gat ggg gtc cca tca agg ttc      240
Leu Ile Tyr Ala Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe
              50              55              60
agt ggt agt gga tct ggc aca aaa ttt tct ttc aag atc agc agc cta      288
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Lys Phe Ser Phe Lys Ile Ser Ser Leu
              65              70              75
cag gct gaa gat ttt gta agt tat tac tgt caa caa ctt tac agt act      336
Gln Ala Glu Asp Phe Val Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Tyr Ser Thr
              80              85              90
ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa      375
Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
      95              100              105

```

<210> 13

<211> 375

<212> DNA

<213> Myš

<220>

<221> signální peptid

<222> (1)...(54)

<220>

<221> maturovaný peptid

<222> (55)...(375)

<223> Nukleotidová sekvence kódující V oblast L řetězce  
myši monoklonální protilátky ATR-3 proti TF

<400> 13  
 atg ctc act cag ctc ctg gga tta ctg ctg ctc tgg ttt gca ggt ggt 48  
 Met Leu Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Phe Ala Gly Gly  
 -15 -10 -5  
 aaa tgt gac att cag atg acc cag tct cct gcc tcc cag tct gca tct 96  
 Lys Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Gln Ser Ala Ser  
 1 5 10  
 ctg gga gaa agt gtc acc atc aca tgc ctg gca agt cag acc att ggt 144  
 Leu Gly Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly  
 15 20 25 30  
 aca tgg tta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa tct cct cag gtc 192  
 Thr Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Val  
 35 40 45  
 ctg att tat gct gca acc agc ttg gca gat ggg gtc cca tca agg ttc 240  
 Leu Ile Tyr Ala Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe  
 50 55 60  
 agt ggt agt gga tct ggc aca aaa ttt tct ttc aag atc agc agc cta 288  
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Lys Phe Ser Phe Lys Ile Ser Ser Leu  
 65 70 75  
 cag gct gaa gat ttt gta agt tat tac tgt caa caa ctt tac agt act 336  
 Gln Ala Glu Asp Phe Val Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Tyr Ser Thr  
 80 85 90  
 ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa 375  
 Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 95 100 105

<210> 14

<211> 387

<212> DNA

<213> Myš

<220>

<221> signální peptid

<222> (1)...(66)

<220>

<221> maturovaný peptid

<222> (67)...(387)

<223> Nukleotidová sekvence kódující V oblast L řetězce  
myši monoklonální protilátky ATR-4 proti TF

<400> 14

```

atg gac atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg      48
Met Asp Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp
      -20                      -15                      -10

ttt cca ggt atc aga tgt gac atc aag atg acc cag tct cca tcc tcc      96
Phe Pro Gly Ile Arg Cys Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
      -5                      1                      5                      10

atg tat gcc tcg ctg gga gag aga gtc act atc act tgc aag gcg agt      144
Met Tyr Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser
                      15                      20                      25

cag gac att aaa acc ttt tta agc tgg tac cag cag aaa cca tgg caa      192
Gln Asp Ile Lys Thr Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Trp Gln
                      30                      35                      40

tct cct aag acc ctg atc tat tat gca aca agc ttg gca gat ggg gtc      240
Ser Pro Lys Thr Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val
                      45                      50                      55

cca tca aga ttc agt ggc agt gga tct ggg caa gat tat tct cta acc      288
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr
                      60                      65                      70

atc agc agc ctg gag tct gac gat tca gca act tat tac tgt cta cag      336
Ile Ser Ser Leu Glu Ser Asp Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln
                      75                      80                      85                      90

cat ggt gag agc ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aaa ctg gaa ata      384
His Gly Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
                      95                      100                      105

aaa      387
Lys

```

<210> 15

<211> 381

<212> DNA

<213> Myš

- <220>
- <221> signální peptid
- <222> (1)...(60)
- <220>
- <221> maturovaný peptid
- <222> (61)...(381)
- <223> Nukleotidová sekvence kódující V oblast L řetězce  
myši monoklonální protilátky ATR-5 proti TF

```

<400>      15
atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg ttt cca      48
Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro
-20                -15                -10                -5
ggg atc aga tgt gac atc aag atg acc cag tct cca tcc tct atg tat      96
Gly Ile Arg Cys Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr
                1                5                10
gca tcg ctg gga gag aga gtc act atc act tgc aag gcg agt cag gac      144
Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
                15                20                25
att aaa agc ttt tta agt tgg tac cag caa aaa cca tgg aaa tct cct      192
Ile Lys Ser Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Trp Lys Ser Pro
                30                35                40
aag acc ctg atc tat tat gca aca agc ttg gca gat ggg gtc cca tca      240
Lys Thr Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser
                45                50                55                60
aga ttc agt ggc agt gga tct ggg caa gat tat tct cta acc atc aac      288
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Asn
                65                70                75
aac ctg gag tct gac gat aca gca act tat tat tgt cta cag cat ggt      336
Asn Leu Glu Ser Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly
                80                85                90
gag agc ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa      381
Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
                95                100                105

```

<210> 16  
 <211> 393  
 <212> DNA  
 <213> Myš

<220>  
 <221> signální peptid  
 <222> (1)...(57)  
 <220>  
 <221> maturovaný peptid  
 <222> (58)...(394)  
 <223> Nukleotidová sekvence kódující V oblast L řetězce  
 myši monoklonální protilátky ATR-7 proti TF

<400> 16

atg agt cct gcc cag ttc ctg ttt ctg tta gtg ctc tgg att cgg gaa	48
Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Arg Glu	
-15                                  -10                                  -5	
atc aac ggt gat gtt gtg ctg acc cag act cca ctc act ttg tcg gtt	96
Ile Asn Gly Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val	
1                                  5                                  10	
acc att gga caa cca gcc tcc gtc tct tgc aag tca agt cag agc ctc	144
Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Val Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu	
15                                  20                                  25	
tta gat agt gat gga aag aca tat ttg aat tgg ttg tta cag agg cca	192
Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro	
30                                  35                                  40                                  45	
ggc cag tct cca aag cgc ctg atc tat ctt gtg tct aaa ctg gac tct	240
Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser	
50                                  55                                  60	
gga gtc cct gac agg ttc act ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca	288
Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr	
65                                  70                                  75	

```

ctg aaa atc agc aga gtg gag gct gag gat ttg gga gtt tat tat tgt      336
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys
      80                      85                      90
tgg caa gat aca cat ttt ccg gac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg      336
Trp Gln Asp Thr His Phe Pro Asp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
      95                      100                      105
gaa ata aaa                                                              393
Glu Ile Lys
110

```

```

<210>      17
<211>      393
<212>      DNA
<213>      Myš

```

```

<220>
<221>      signální peptid
<222>      (1)...(57)
<220>
<221>      maturovaný peptid
<222>      (58)...(393)
<223>      Nukleotidová sekvence kódující V oblast L řetězce
      myši monoklonální protilátky ATR-8 proti TF

```

```

<400>      17
atg agt cct gcc cag ttc ctg ttt ctg tta gtg ctc tgg att cgg gat      48
Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Arg Asp
      -15                      -10                      -5
atc aac ggt gat gtt gta ctg acc cag act cca ctc act ttg tcg gtt      96
Ile Asn Gly Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val
      1                      5                      10
acc att gga caa cca gcc tcc gtc tct tgc aag tca agt cag agc ctc      144
Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Val Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu
      15                      20                      25

```

```

tta gat agt gat gga aag aca tat ttg aat tgg ttg tta cag agg cca      192
Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro
 30                35                40                45
ggc cag tct cca aag cgc cta atc tat ctg gtg tct aaa ctg gac tct      240
Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
                50                55                60
gga gtc cct gac agg ttc act ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca      288
Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
                65                70                75
ctg aaa atc agc aga gtg gag gct gag gat ttg gga gtt tat tat tgt      336
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys
                80                85                90
tgg caa gat aca cat ttt ccg gac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg      384
Trp Gln Asp Thr His Phe Pro Asp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
                95                100                105
gaa ata aaa      393
Glu Ile Lys
110

```

```

<210>      18
<211>      35
<212>      DNA
<213>      Umělá sekvence

```

```

<220>
<223>      Primer ch5HS

```

```

<400>      18
gtctgtcgac ccacatgaa atgcagctgg gtcac      35

```

```

<210>      19
<211>      28
<212>      DNA
<213>      Umělá sekvence

```

<220>

<223> Primer ch5HA

<400> 19

**tgttgctagc tgaggagacg gtgactga**

28

<210> 20

<211> 35

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Primer ch5LS

<400> 20

**gtctagatct ccaccatgag ggcccctgct cagtt**

35

<210> 21

<211> 28

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Primer ch5LA

<400> 21

**tgttcgtacg ttttatttcc agcttggt**

28

<210> 22

<211> 104

<212> DNA

<213> Umělá sekvence



<220>

<223> Primer hR5Hv1S pro přenos CDR

<400> 22

**ttctgtogac ccaccatgaa atgcagctgg gtcattcttct tcctgatggc agtggttaca 60**  
**ggggttaact cacaggtgca gctggttgag tctggagctg tgct 104**

<210> 23

<211> 108

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Primer hR5Hv28 pro přenos CDR

<400> 23

**acaggtgcag ctggttgagt ctggagctgt gctggcaagg cctgggactt ccgtgaagat 60**  
**ctcctgcaag gcttccgat tcaacattaa agactactat atgcattg 108**

<210> 24

<211> 108

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Primer hR5Hv4S pro přenos CDR

<400> 24

**gaatggccat agtatgtatg acccgaaatt ccagggcagg gccaaactga ctgcagccac 60**  
**atccgccagt attgcctact tggagttctc ggcctgaca aatgagga 108**

<210> 25

<211> 110

<212> DNA  
 <213> Umělá sekvence  
  
 <220>  
 <223> Primer hR5Hv3A pro přenos CDR  
  
 <400> 25  
**tcatacatac tatggccatt cgcaggatca ttcccaccaa tccattctag accctgtcca 60**  
**ggcctctggt ttaccaatg catatagtag tctttaatgt tgaatccgga 110**

<210> 26  
 <211> 110  
 <212> DNA  
 <213> Umělá sekvence  
  
 <220>  
 <223> Primer hR5Hv5A pro přenos CDR  
  
 <400> 26  
**agaagctagc tgaggagacg gtgaccaggg tgccttgcc ccagtagtcc atggcatagc 60**  
**ccgagtctct tgcacagtaa tagaccgacg aatcctcatt tgtcaggctc 110**

<210> 27  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Umělá sekvence  
  
 <220>  
 <223> Primer hR5HvPrS  
  
 <400> 27  
**ttctgtcgac ccaccatga 19**

<210> 28  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Umělá sekvence

<220>  
 <223> Primer hR5HvPrA

<400> 28  
**agaagctagc tgaggagac** 19

<210> 29  
 <211> 415  
 <212> DNA  
 <213> Umělá sekvence

<220>  
 <221> signální peptid  
 <222> (1)...(57)  
 <220>  
 <221> maturovaný peptid  
 <222> (58)...(415)  
 <223> Nukleotidová sekvence kódující verzi "a" V oblasti  
 zušlechtěného H řetězce

<400> 29  
**atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg** 48  
**Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly**  
 -15 -10 -5  
**gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg** 96  
**Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg**  
 1 5 10

```

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att      144
Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile
    15                20                25

aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta      192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
    30                35                40                45

gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac      240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp
                    50                55                60

ccg aaa ttc cag ggc agg gcc aaa ctg act gca gcc aca tcc gcc agt      288
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Ala Lys Leu Thr Ala Ala Thr Ser Ala Ser
                    65                70                75

att gcc tac ttg gag ttc tcg agc ctg aca aat gag gat tct gcg gtc      336
Ile Ala Tyr Leu Glu Phe Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val
    80                85                90

tat tac tgt gca aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa      384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
    95                100                105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc                                415
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
110                115

```

<210> 30

<211> 119

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Aminokyselinová sekvence verze "a" V oblasti  
zušlechtěného H řetězce

<400> 30

```

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr
    1                5                10                15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
                    20                25                30

```

```

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

```

```

<210>      31
<211>      100
<212>      DNA
<213>      Umělá sekvence

```

```

<220>
<223>      Primer F3RFFS pro záměnu FR

```

```

<400>      31
ttcttgcca tagtatgtat gaccgaaat tccagggccg agtcacaatc actgcagaca      60
catccacgaa cacagcctac atggagctct cgagtctgag      100

```

```

<210>      32
<211>      75
<212>      DNA
<213>      Umělá sekvence

```

```

<220>
<223>      Primer F3RFBS pro záměnu FR

```

```

<400>      32

```

**ggagctctcg agtctgagat ctgaggacac agccatttat tactgtgcaa gagactcggg 60**  
**ctatgccatg gttct 75**

<210> 33  
 <211> 100  
 <212> DNA  
 <213> Umělá sekvence

<220>  
 <223> Primer F3RFFA pro záměnu FR

<400> 33  
**ctcagactcg agagctccat gtaggctgtg ttcgtggatg tgtctgcagt gattgtgact 60**  
**cggccctgga atttcgggtc atacatacta tggccaagaa 100**

<210> 34  
 <211> 75  
 <212> DNA  
 <213> Umělá sekvence

<220>  
 <223> Primer F3RFBA pro záměnu FR

<400> 34  
**agaacccatgg catagcccga gtctcttgca cagtaataaa tggctgtgtc ctcagatctc 60**  
**agactogaga gctcc 75**

<210> 35  
 <211> 100  
 <212> DNA  
 <213> Umělá sekvence

<220>  
 <223> Primer F3NMFS pro záměnu FR

<400> 35  
**ttcttggcca tagtatgtat gaccogaaat tccagggccg agtcacaatg ctggtagaca 60**  
**catccaagaa ccagttctcc ctgaggctct cgagtgtgac 100**

<210> 36  
 <211> 75  
 <212> DNA  
 <213> Umělá sekvence

<220>  
 <223> Primer F3NMBS pro záměnu FR

<400> 36  
**gaggctctcg agtgtgacag ccgcgacac agccgtatat tactgtgcaa gagactcggg 60**  
**ctatgccatg gttct 75**

<210> 37  
 <211> 100  
 <212> DNA  
 <213> Umělá sekvence

<220>  
 <223> Primer F3NMFA pro záměnu FR

<400> 37  
**gtcacactcg agagcctcag ggagaactgg ttcttggatg tgtctaccag cattgtgact 60**  
**cggccctgga atttcgggtc atacatacta tggccaagaa 100**

<210> 38  
 <211> 75  
 <212> DNA  
 <213> Umělá sekvence

<220>

<223> Primer F3NMBA pro záměnu FR

<400> 38

agaaccatgg catagcccga gtctcttgca cagtaatata cggctgtgtc cggggctgtc 60  
 acactcgaga gcctc 75

<210> 39

<211> 414

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<221> signální peptid

<222> (1)...(57)

<220>

<221> maturovaný peptid

<222> (58)...(414)

<223> Nukleotidová sekvence kódující verzi "b" V oblasti  
 zušlechtěného H řetězce

<400> 39

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48  
 Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly  
                   -15                  -10                  -5  
 gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96  
 Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg  
                   1                  5                  10  
 cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144  
 Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile  
           15                  20                  25  
 aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta 192  
 Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu  
   30                  35                  40                  45



```

gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac      240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp
          50                      55                      60
ccg aaa ttc cag ggc cga gtc aca atc act gca gac aca tcc acg aac      288
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn
          65                      70                      75
aca gcc tac atg gag ctc tcg agt ctg aga tct gag gac aca gcc att      336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile
          80                      85                      90
tat tac tgt gca aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa      384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
          95                      100                     105
ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc                               414
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
110                      115

```

<210> 40

<211> 119

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Aminokyselinová sekvence verze "a" V oblasti  
zušlechtěného H řetězce

<400> 40

```

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

```

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser  
 115

<210> 41  
 <211> 414  
 <212> DNA  
 <213> Umělá sekvence

<220>  
 <221> signální peptid  
 <222> (1)...(57)  
 <220>  
 <221> maturovaný peptid  
 <222> (58)...(414)  
 <223> Nukleotidová sekvence kódující verzi "c" V oblasti  
 zušlechtěného H řetězce

<400> 41  
 atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48  
 Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly  
 -15 -10 -5  
 gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96  
 Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg  
 1 5 10  
 cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144  
 Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile  
 15 20 25  
 aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta 192  
 Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu  
 30 35 40 45

gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240  
 Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp  
                   50                                  55                                  60  
 ccg aaa ttc cag ggc cga gtc aca atg ctg gta gac aca tcc aag aac 288  
 Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn  
                   65                                  70                                  75  
 cag ttc tcc ctg agg ctc tcg agt gtg aca gcc gcg gac aca gcc gta 336  
 Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val  
                   80                                  85                                  90  
 tat tac tgt gca aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
                   95                                  100                                  105  
 ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser  
 110                                  115

- <210> 42
- <211> 119
- <212> PRT
- <213> Umělá sekvence
  
- <220>
- <223> Aminokyselinová sekvence verze "c" V oblasti  
 zušlechtěného H řetězce

<400> 42  
 Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr  
   1                  5                                  10                                  15  
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr  
                   20                                  25                                  30  
 Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
                   35                                  40                                  45  
 Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe  
   50                                  55                                  60  
 Gln Gly Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
   65                                  70                                  75                                  80

13.12.00

Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
100 105 110  
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser  
115

<210> 43  
<211> 100  
<212> DNA  
<213> Umělá sekvence

<220>  
<223> Primer F3EPS pro záměnu FR

<400> 43  
**ttcttggcca tagtatgtat gaccggaaat tccagggcag agtcacgatt actgoggacg** 60  
**aatccacgag cacagcctac atggagctct cgagtctgag** 100

<210> 44  
<211> 75  
<212> DNA  
<213> Umělá sekvence

<220>  
<223> Primer F3EPA pro záměnu FR

<400> 44  
**agaaccatgg catagcccga gtctctcgca cagaaatata cgccgagtc ctcagatctc** 60  
**agactcgaga gctcc** 75

<210> 45  
<211> 20  
<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Primer F3PrS

<400> 45  
**ttottggcca tagtatgtat** 20

<210> 46  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Primer F3PrA

<400> 46  
**agaaccatgg catagccc** 18

<210> 47  
<211> 100  
<212> DNA  
<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Primer F3vHS pro záměnu FR

<400> 47  
**ttottggcca tagtatgtat gaccogaaat tccagggcag agtctcgatt accgcgacg** 60  
**agtcaacgaa gatagcctac atggagctca acagtctgag** 100

<210> 48  
<211> 75

<212> DNA  
 <213> Umělá sekvence

<220>  
 <223> Primer F3vHA pro záměnu FR

<400> 48  
**agaaccatgg catagcccga gtctctcgca cagaaataaa cggccgtgtc ctcagatctc 60**  
**agactggtga gctcc 75**

<210> 49  
 <211> 414  
 <212> DNA  
 <213> Umělá sekvence

<220>  
 <221> signální peptid  
 <222> (1)...(57)  
 <220>  
 <221> maturovaný peptid  
 <222> (58)...(414)  
 <223> Nukleotidová sekvence kódující verzi "d" V oblasti  
 zušlechtěného H řetězce

<400> 49  
**atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48**  
**Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly**  
 -15 -10 -5  
**gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96**  
**Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg**  
 1 5 10  
**cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144**  
**Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile**  
 15 20 25

```

aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta      192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 30                      35                      40                      45
gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac      240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp
                      50                      55                      60
ccg aaa ttc cag ggc aga gtc acg att act gcg gac gaa tcc acg agc      288
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser
                      65                      70                      75
aca gcc tac atg gag ctc tcg agt ctg aga tct gag gac tcg gcc gta      336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val
                      80                      85                      90
tat ttc tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa      384
Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
                      95                      100                      105
ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc                                414
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
110                      115

```

<210> 50

<211> 119

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Aminokyselinová sekvence verze "d" V oblasti  
zušlechtěného H řetězce

<400> 50

```

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

```

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser  
 115

<210> 51  
 <211> 414  
 <212> DNA  
 <213> Umělá sekvence  
  
 <220>  
 <221> signální peptid  
 <222> (1)...(57)  
 <220>  
 <221> maturovaný peptid  
 <222> (58)...(414)  
 <223> Nukleotidová sekvence kódující verzi "e" V oblasti  
 zušlechtěného H řetězce

<400> 51  
 atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48  
 Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly  
 -15 -10 -5  
 gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96  
 Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg  
 1 5 10  
 cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144  
 Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile  
 15 20 25



```

aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta      192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 30                      35                      40                      45
gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac      240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp
                      50                      55                      60
ccg aaa ttc cag ggc aga gtc tcg att acc gcg gac gag tca acg aag      288
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Lys
                      65                      70                      75
ata gcc tac atg gag ctc aac agt ctg aga tct gag gac acg gcc gtt      336
Ile Ala Tyr Met Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
                      80                      85                      90
tat ttc tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa      384
Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
                      95                      100                      105
ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc                                414
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
110                      115

```

<210> 52

<211> 119

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Aminokyselinová sekvence verze "e" V oblasti  
zušlechtěného H řetězce

<400> 52

```

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

```

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Arg Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Lys Ile Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser  
 115

<210> 53  
 <211> 100  
 <212> DNA  
 <213> Umělá sekvence

<220>  
 <223> Primer F3SSS pro záměnu FR

<400> 53  
**ttcttggcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggcag agtcacgatt accgaggaca 60**  
**catccacgag cacagcctac atggagctca ggagcctgag 100**

<210> 54  
 <211> 75  
 <212> DNA  
 <213> Umělá sekvence

<220>  
 <223> Primer F3SSA pro záměnu FR

<400> 54  
**agaaccatgg catagcccga gtctctcgca cagtaataca cggccgtgtc gtcagatctc 60**  
**aggctcctga gctcc 75**

<210> 55  
 <211> 100  
 <212> DNA  
 <213> Umělá sekvence  
  
 <220>  
 <223> Primer F3CDS pro záměnu FR  
  
 <400> 55  
**ttcttggcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggcaa agccactctg actgcagacg 60**  
**aatcctocag cacagcctac atgcaactct cgagcctacg 100**

<210> 56  
 <211> 75  
 <212> DNA  
 <213> Umělá sekvence  
  
 <220>  
 <223> Primer F3CDA pro záměnu FR  
  
 <400> 56  
**agaaccatgg catagcccgga gtctcttgca caagaataga ccgcagagtc ctcagatcgt 60**  
**aggctcgaga gttgc 75**

<210> 57  
 <211> 414  
 <212> DNA  
 <213> Umělá sekvence  
  
 <220>  
 <221> signální peptid  
 <222> (1)...(57)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; maturovaný peptid

&lt;222&gt; (58)...(414)

<223> Nukleotidová sekvence kódující verzi "f" V oblasti  
zušlechtěného H řetězce

&lt;400&gt; 57

```

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg      48
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
          -15                -10                -5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg      96
Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg
          1                5                10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att      144
Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile
          15                20                25

aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta      192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
          30                35                40                45

gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac      240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp
          50                55                60

ccg aaa ttc cag ggc aga gtc acg att acc gcg gac aca tcc acg agc      288
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser
          65                70                75

aca gcc tac atg gag ctc agg agc ctg aga tct gac gac acg gcc gtg      336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
          80                85                90

tat tac tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa      384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
          95                100                105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc      414
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
110                115

```

&lt;210&gt; 58

&lt;211&gt; 119

<212> PRT  
 <213> Umělá sekvence

<220>  
 <223> Aminokyselinová sekvence verze "f" V oblasti  
 zušlechtěného H řetězce

<400> 58

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

<210> 59  
 <211> 414  
 <212> DNA  
 <213> Umělá sekvence

<220>  
 <221> signální peptid  
 <222> (1)...(57)  
 <220>  
 <221> maturovaný peptid

<222> (58)...(414)

<223> Nukleotidová sekvence kódující verzi "g" V oblasti  
zušlechtěného H řetězce

<400> 59

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg	48
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly	
-15 -10 -5	
gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg	96
Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg	
1 5 10	
cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att	144
Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile	
15 20 25	
aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta	192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac	240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp	
50 55 60	
ccg aaa ttc cag ggc aaa gcc act ctg act gca gac gaa tcc tcc agc	288
Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser	
65 70 75	
aca gcc tac atg caa ctc tcg agc cta cga tct gag gac tct gcg gtc	336
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val	
80 85 90	
tat tct tgt gca aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa	384
Tyr Ser Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln	
95 100 105	
ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc	414
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser	
110 115	

<210> 60

<211> 119

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Aminokyselinová sekvence verze "g" V oblasti  
zušlechtěného H řetězce

<400>

60

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

<210>

61

<211>

100

<212>

DNA

<213>

Umělá sekvence

<220>

<223> Primer F3ADS pro záměnu FR

<400>

61

ttcttgcca	tagtatgtat	gacccgaaat	tccagggccg	cgtcaccatg	tcagccgaca	60
agtoctccag	cgccgcctat	ttacagtgga	ccagcctaa			100

<210> 62  
 <211> 75  
 <212> DNA  
 <213> Umělá sekvence

<220>  
 <223> Primer F3ADA pro záměnu FR

<400> 62  
**agaaccatgg catagcccga gtctctcgcg cagaaatata tggcgggtgtc cgaggcotta 60**  
**aggctggtcc actgt 75**

<210> 63  
 <211> 414  
 <212> DNA  
 <213> Umělá sekvence

<220>  
 <221> signální peptid  
 <222> (1)...(57)  
 <220>  
 <221> maturovaný peptid  
 <222> (58)...(414)  
 <223> Nukleotidová sekvence kódující verzi "h" V oblasti  
 zušlechtěného H řetězce

<400> 63  
**atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48**  
**Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly**  
                   -15                  -10                  -5  
**ggt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96**  
**Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg**  
                   1                  5                  10



cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144  
 Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile  
 15 20 25  
 aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta 192  
 Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu  
 30 35 40 45  
 gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240  
 Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp  
 50 55 60  
 ccg aaa ttc cag ggc cgc gtc acc atg tca gcc gac aag tcc tcc agc 288  
 Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Ser Ala Asp Lys Ser Ser Ser  
 65 70 75  
 gcc gcc tat tta cag tgg acc agc ctt aag gcc tcg gac acc gcc ata 336  
 Ala Ala Tyr Leu Gln Trp Thr Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Ile  
 80 85 90  
 tat ttc tgc gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384  
 Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 95 100 105  
 ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser  
 110 115

&lt;210&gt;

64

&lt;211&gt;

119

&lt;212&gt;

PRT

&lt;213&gt;

Umělá sekvence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

Aminokyselinová sekvence verze "h" V oblasti  
 zušlechtěného H řetězce

&lt;400&gt;

64

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr  
 20 25 30

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

<210> 65  
 <211> 100  
 <212> DNA  
 <213> Umělá sekvence

<220>  
 <223> Primer F3MMS pro záměnu FR

<400> 65  
**ttcttgcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggcag agtcacgatt accgcggaca 60**  
**catcgacgag cacagtcttc atggaactga gcagcctgag 100**

<210> 66  
 <211> 75  
 <212> DNA  
 <213> Umělá sekvence

<220>  
 <223> Primer F3MMA pro záměnu FR

<400> 66

**agaaccatgg catagcccga gtctctcgca cagtaataca cggccgtgtc ttcagatctc 60**  
**aggctgctca gttcc 75**

<210> 67

<211> 100

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Primer F3BMS pro záměnu FR

<400> 67

**ttcttgcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggcag agtcaccttt accgcgaca 60**  
**catccgcgaa cacagcctac atggagttga ggagcctcag 100**

<210> 68

<211> 75

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Primer F3BMA pro záměnu FR

<400> 68

**agaaccatgg catagcccga gtctctcgca caataataaa cagccgtgtc tgcagatctg 60**  
**aggctctca actcc 75**

<210> 69

<211> 414

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<221> signální peptid

<222> (1)...(57)

<220>

<221> maturovaný peptid

<222> (58)...(414)

<223> Nukleotidová sekvence kódující verzi "i" V oblasti  
zušlechtěného H řetězce

<400> 69

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg	48
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly	
-15 -10 -5	
gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg	96
Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg	
1 5 10	
cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att	144
Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile	
15 20 25	
aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta	192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac	240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp	
50 55 60	
ccg aaa ttc cag ggc aga gtc acg att acc gcg gac aca tcg acg agc	288
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser	
65 70 75	
aca gtc ttc atg gaa ctg agc agc ctg aga tct gaa gac acg gcc gtg	336
Thr Val Phe Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val	
80 85 90	
tat tac tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln	
95 100 105	

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser  
 110 115

414

&lt;210&gt; 70

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Umělá sekvence

&lt;220&gt;

<223> Aminokyselinová sekvence verze "i" V oblasti  
 zušlechtěného H řetězce

&lt;400&gt; 70

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

&lt;210&gt; 71

&lt;211&gt; 414

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Umělá sekvence

<220>  
 <221> signální peptid  
 <222> (1)...(57)  
 <220>  
 <221> maturovaný peptid  
 <222> (58)...(414)  
 <223> Nukleotidová sekvence kódující verzi "j" V oblasti  
 zušlechtěného H řetězce

<400> 71

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg	48
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly	
-15 -10 -5	
gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg	96
Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg	
1 5 10	
cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att	144
Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile	
15 20 25	
aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta	192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac	240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp	
50 55 60	
ccg aaa ttc cag ggc aga gtc acc ttt acc gcg gac aca tcc gcg aac	288
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ala Asn	
65 70 75	
aca gcc tac atg gag ttg agg agc ctc aga tot gca gac acg gct gtt	336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Ala Asp Thr Ala Val	
80 85 90	
tat tat tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln	
95 100 105	

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser  
 110 115

414

<210> 72  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Umělá sekvence

<220>  
 <223> Aminokyselinová sekvence verze "j" V oblasti  
 zušlechtěného H řetězce

<400> 72

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

<210> 73  
 <211> 79  
 <212> DNA  
 <213> Umělá sekvence

<220>

<223> Primer F2MPS pro záměnu FR

<400> 73

**ttctatgcat tgggtgcgcc aggetccagg acagggcctg gagtggatgg gagggaatga** 60

**tcctgcgaat ggccattct** 79

<210> 74

<211> 79

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Primer F2MPA pro záměnu FR

<400> 74

**agaatggcca ttcgcaggat cattccctcc catccactcc aggccctgtc ctggagcctg** 60

**gcgcacccaa tgcatajaa** 79

<210> 75

<211> 414

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<221> signální peptid

<222> (1)...(57)

<220>

<221> maturovaný peptid

<222> (58)...(414)

<223> Nukleotidová sekvence kódující verzi "b1" v oblasti zušlechtěného H řetězce



<400> 75  
 atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48  
 Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly  
 -15 -10 -5  
 gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96  
 Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg  
 1 5 10  
 cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144  
 Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile  
 15 20 25  
 aaa gac tac tat atg cat tgg gtg cgc cag gct cca gga cag ggc ctg 192  
 Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
 30 35 40 45  
 gag tgg atg gga ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240  
 Glu Trp Met Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp  
 50 55 60  
 ccg aaa ttc cag ggc cga gtc aca atc act gca gac aca tcc acg aac 288  
 Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn  
 65 70 75  
 aca gcc tac atg gag ctc tcg agt ctg aga tct gag gac aca gcc att 336  
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile  
 80 85 90  
 tat tac tgt gca aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 95 100 105  
 ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser  
 110 115

<210> 76

<211> 119

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Aminokyselinová sekvence verze "b1" V oblasti

zušlechtěného H řetězce

<400> 76  
 Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr  
 20 25 30  
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser  
 115

- <210> 77
- <211> 414
- <212> DNA
- <213> Umělá sekvence
  
- <220>
- <221> signální peptid
- <222> (1)...(57)
- <220>
- <221> maturovaný peptid
- <222> (58)...(414)
- <223> Nukleotidová sekvence kódující verzi "d1" v oblasti zušlechtěného H řetězce
  
- <400> 77

```

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg      48
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
      -15                -10                -5
gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg      96
Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg
      1                5                10
cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att      144
Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile
      15                20                25
aaa gac tac tat atg cat tgg gtg cgc cag gct cca gga cag ggc ctg      192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
      30                35                40                45
gag tgg atg gga ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac      240
Glu Trp Met Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp
      50                55                60
ccg aaa ttc cag ggc aga gtc acg att act gcg gac gaa tcc acg agc      288
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser
      65                70                75
aca gcc tac atg gag ctc tcg agt ctg aga tct gag gac tcg gcc gta      336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val
      80                85                90
tat ttc tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa      384
Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
      95                100                105
ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc      414
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
110                115

```

<210> 78

<211> 119

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Aminokyselinová sekvence verzi "d1" V oblasti  
zušlechtěného H řetězce

<400> 78

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

<210> 79

<211> 79

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Primer F2VHS pro záměnu FR

<400> 79

ttctatgcat tgggtgcgac aggccctgg acaaggcctt gagtggattg gagggaatga 60  
 tcctgccaat ggccatctt 79

<210> 80

<211> 79

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Primer F2VHA pro záměnu FR

<400> 80

aagatggcca ttgcaggat cattcctcc aatcactca agccctgtc caggggctg 60  
 tcgcacccaa tgcatagaa 79

<210> 81

<211> 414

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<221> signální peptid

<222> (1)...(57)

<220>

<221> maturovaný peptid

<222> (58)...(414)

<223> Nukleotidová sekvence kódující verzi "b3" v oblasti zušlechtěného H řetězce

<400> 81

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48  
 Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly  
                   -15                                  -10                                  -5  
 gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96  
 Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg  
                   1                                  5                                  10  
 cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144  
 Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile  
           15                                  20                                  25  
 aaa gac tac tat atg cat tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt 192  
 Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
   30                                  35                                  40                                  45

```

gag tgg att gga ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac      240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp
                    50                      55                      60

ccg aaa ttc cag ggc cga gtc aca atc act gca gac aca tcc acg aac      288
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn
                    65                      70                      75

aca gcc tac atg gag ctc tcg agt ctg aga tct gag gac aca gcc att      336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile
                    80                      85                      90

tat tac tgt gca aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa      384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
                    95                      100                     105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc      414
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
110                      115

```

```

<210>      82
<211>     119
<212>     PRT
<213>     Umělá sekvence

```

```

<220>
<223>     Aminokyselinová sekvence verze "b3" V oblasti
           zušlechtěného H řetězce

```

```

<400>      82
Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr
  1                      5                      10                      15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
                    20                      25                      30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
                    35                      40                      45
Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe
                    50                      55                      60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
                    65                      70                      75                      80

```

```

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
                85                        90                        95
Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
                100                      105                      110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
                115

```

```

<210>      83
<211>      414
<212>      DNA
<213>      Umělá sekvence

```

```

<220>
<221>      signální peptid
<222>      (1)...(57)
<220>
<221>      maturovaný peptid
<222>      (58)...(414)
<223>      Nukleotidová sekvence kódující verzi "d3" V
                oblasti zušlechtěného H řetězce

```

```

<400>      83
atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg      48
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
                -15                        -10                        -5
gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg      96
Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg
                1                        5                        10
cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att      144
Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile
                15                        20                        25
aaa gac tac tat atg cat tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt      192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
                30                        35                        40                        45

```

```

gag tgg att gga ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac      240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp
          50                      55                      60
ccg aaa ttc cag ggc aga gtc acg att act gcg gac gaa tcc acg agc      288
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser
          65                      70                      75
aca gcc tac atg gag ctc tcg agt ctg aga tct gag gac tcg gcc gta      336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val
          80                      85                      90
tat ttc tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa      384
Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
          95                      100                     105
ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc                                414
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
110                      115

```

```

<210>      84
<211>     119
<212>     PRT
<213>     Umělá sekvence

```

```

<220>
<223>     Aminokyselinová sekvence verze "d3" V oblasti
           zušlechtěného H řetězce

```

```

<400>      84
Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr
  1                      5                      10                      15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
          20                      25                      30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
          35                      40                      45
Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe
          50                      55                      60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
          65                      70                      75                      80

```



```

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
                85                90                95
Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
                100                105                110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
                115

```

```

<210>      85
<211>      98
<212>      DNA
<213>      Umělá sekvence

```

```

<220>
<223>      Vektor h5Lv1S pro záměnu FR

```

```

<400>      85
gtctagatct ccaccatgag ggccccctgct cagttttttg ggatcttggt gctctggttt      60
ccagggatcc gatgtgacat ccagatgacc cagtctcc                                  98

```

```

<210>      86
<211>      98
<212>      DNA
<213>      Umělá sekvence

```

```

<220>
<223>      Vektor h5Lv4S pro záměnu FR

```

```

<400>      86
ttggcagatg ggggtcccatc aaggttcagt ggctccggat ctggtaccga tttcactctc      60
accatctcga gtctgcaacc tgaagatddd gcaactta                                  98

```

```

<210>      87
<211>      98
<212>      DNA

```

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Vektor h5Lv2A pro záměnu FR

<400> 87

**cttaagaagc ttttaatgtc ctgtgaggcc ttgcacgtga tggtgactct gtctcctaca 60**  
**gatgcagaca gggaggatgg agactgggtc atctggat 98**

<210> 88

<211> 98

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Vektor h5Lv3A pro záměnu FR

<400> 88

**gatgggacc catctgcaa actagttgca taatagatca ggagcttagg ggctttccct 60**  
**ggtttctgct gataccaact taagaagctt ttaatgtc 98**

<210> 89

<211> 94

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Vektor h5Lv5A pro záměnu FR

<400> 89

**tgttcgtacg tttgatctcc accttgggtcc ctccgccgaa cgtgtacggg ctctcaccat 60**  
**gctgcagaca gtagtaagtt gcaaaatctt cagg 94**

<210> 90  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Umělá sekvence

<220>  
 <223> Primer h5LvS

<400> 90  
**gtctagatct ccaccatgag**

20

<210> 91  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Umělá sekvence

<220>  
 <223> Primer h5LvA

<400> 91  
**tgttcgtacg tttgatctc**

19

<210> 92  
 <211> 381  
 <212> DNA  
 <213> Umělá sekvence

<220>  
 <221> signální peptid  
 <222> (1)...(60)  
 <220>  
 <221> maturovaný peptid

<222> (61)...(381)

<223> Nukleotidová sekvence kódující verzi "a" V oblasti  
zušlechtěného L řetězce

<400> 92

atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg ttt cca	48
Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro	
-20 -15 -10 -5	
ggg atc cga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct	96
Gly Ile Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser	
1 5 10	
gca tct gta gga gac aga gtc acc atc acg tgc aag gcc tca cag gac	144
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp	
15 20 25	
att aaa agc ttc tta agt tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct	192
Ile Lys Ser Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro	
30 35 40	
aag ctc ctg atc tat tat gca act agt ttg gca gat ggg gtc cca tca	240
Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser	
45 50 55 60	
agg ttc agt ggc tcc gga tct ggt acc gat ttc act ctc acc atc tcg	288
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser	
65 70 75	
agt ctg caa cct gaa gat ttt gca act tac tac tgt ctg cag cat ggt	336
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly	
80 85 90	
gag agc ccg tac acg ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa	381
Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
95 100 105	

<210> 93

<211> 107

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Aminokyselinová sekvence verze "a" V oblasti  
zušlechtěného L řetězce

<400> 93

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

<210> 94

<211> 77

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Primer F3SS pro záměnu FR

<400> 94

gtctggtacc	gattacactc	tcacatctc	gagcctccag	cctgaagatt	ttgcaactta	60
ctattgtctg	cagaaca					77

<210> 95

<211> 77

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Primer F3SA pro záměnu FR

<400> 95

**tgttctgcag acaatagtaa gttgcaaaat cttcaggctg gaggctcgag atggtgagag 60**  
**tgtaatcggg accagac 77**

<210> 96

<211> 77

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Primer F3RS pro záměnu FR

<400> 96

**gtctggtacc gattacactc tcaccatctc gagcctccag cctgaagata ttgcaactta 60**  
**ctattgtctg cagaaca 77**

<210> 97

<211> 77

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Primer F3RA pro záměnu FR

<400> 97

**tgttctgcag acaatagtaa gttgcaaatat cttcaggctg gaggctcgag atggtgagag 60**  
**tgtaatcggg accagac 77**

<210> 98

<211> 381  
 <212> DNA  
 <213> Umělá sekvence

<220>  
 <221> signální peptid  
 <222> (1)...(60)  
 <220>  
 <221> maturovaný peptid  
 <222> (61)...(381)  
 <223> Nukleotidová sekvence kódující verzi "b" V oblasti  
 zušlechtěného L řetězce

<400> 98

atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg ttt cca	48
Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro	
-20 -15 -10 -5	
ggg atc cga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct	96
Gly Ile Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser	
1 5 10	
gca tct gta gga gac aga gtc acc atc acg tgc aag gcc tca cag gac	144
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp	
15 20 25	
att aaa agc ttc tta agt tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct	192
Ile Lys Ser Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro	
30 35 40	
aag ctc ctg atc tat tat gca act agt ttg gca gat ggg gtc cca tca	240
Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser	
45 50 55 60	
agg ttc agt ggc tcc gga tct ggt acc gat tac act ctc acc atc tcg	288
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser	
65 70 75	
agc ctc cag cct gaa gat ttt gca act tac tat tgt ctg cag cat ggt	336
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly	
80 85 90	

gag agc ccg tac acg ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa 381  
 Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
           95                          100                          105

<210> 99

<211> 107

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Aminokyselinová sekvence verze "b" V oblasti  
 zušlechtěného L řetězce

<400> 99

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

<210> 100

<211> 381

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<221> signální peptid



<222> (1)...(60)  
 <220>  
 <221> maturovaný peptid  
 <222> (61)...(381)  
 <223> Nukleotidová sekvence kódující verzi "c" V oblasti  
 zušlechtěného L řetězce

<400> 100

atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg ttt cca	48
Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro	
-20 -15 -10 -5	
ggg atc cga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct	96
Gly Ile Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser	
1 5 10	
gca tct gta gga gac aga gtc acc atc acg tgc aag gcc tca cag gac	144
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp	
15 20 25	
att aaa agc ttc tta agt tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct	192
Ile Lys Ser Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro	
30 35 40	
aag ctc ctg atc tat tat gca act agt ttg gca gat ggg gtc cca tca	240
Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser	
45 50 55 60	
agg ttc agt ggc tcc gga tct ggt acc gat tac act ctc acc atc tcg	288
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser	
65 70 75	
agc ctc cag cct gaa gat att gca act tac tat tgt ctg cag cat ggt	336
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly	
80 85 90	
gag agc ccg tac acg ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa	381
Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
95 100 105	

<210> 101  
 <211> 107  
 <212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Aminokyselinová sekvence verze "c" V oblasti  
zušlechtěného L řetězce

<400> 101

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

<210> 102

<211> 72

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Primer F2SS pro záměnu FR

<400> 102

gtctcttaag ttggtccag cagaaaccag ggaaatctcc taagaccctg atctactatg	60
caactagtaa ca	72

<210> 103

<211> 72  
 <212> DNA  
 <213> Umělá sekvence  
  
 <220>  
 <223> Primer F2SA pro záměnu FR  
  
 <400> 103  
**tgttactagt tgcataagtag atcagggctc taggagattt ccctggtttc tgctggaacc 60**  
**aacttaagag ac 72**

<210> 104  
 <211> 72  
 <212> DNA  
 <213> Umělá sekvence  
  
 <220>  
 <223> Primer F2XS pro záměnu FR  
  
 <400> 104  
**gtctcttaag ttggtatcag cagaaaccag agaaagcccc taagtccttg atctattatg 60**  
**caactagtaa ca 72**

<210> 105  
 <211> 72  
 <212> DNA  
 <213> Umělá sekvence  
  
 <220>  
 <223> Primer F2XA pro záměnu FR  
  
 <400> 105  
**tgttactagt tgcataatag atcagggact taggggcttt ctctggtttc tgctgatacc 60**

aacttaagag ac

72

<210>	106		
<211>	381		
<212>	DNA		
<213>	Umělá sekvence		
<220>			
<221>	signální peptid		
<222>	(1)...(60)		
<220>			
<221>	maturovaný peptid		
<222>	(61)...(381)		
<223>	Nukleotidová sekvence kódující verzi "b1" v oblasti zušlechtěného L řetězce		
<400>	106		
atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg ttt cca			48
Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro			
-20	-15	-10	-5
ggg atc cga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct			96
Gly Ile Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser			
	1	5	10
gca tct gta gga gac aga gtc acc atc acg tgc aag gcc tca cag gac			144
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp			
	15	20	25
att aaa agc ttc tta agt tgg ttc cag cag aaa cca ggg aaa tct cct			192
Ile Lys Ser Phe Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro			
	30	35	40
aag acc ctg atc tac tat gca act agt ttg gca gat ggg gtc cca tca			240
Lys Thr Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser			
	45	50	55
agg ttc agt ggc tcc gga tct ggt acc gat tac act ctc acc atc tcg			288
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser			
	65	70	75

agc ctc cag cct gaa gat ttt gca act tac tat tgt ctg cag cat ggt 336  
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly  
                   80                                  85                                  90  
 gag agc ccg tac acg ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa 381  
 Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
                   95                                  100                                  105

<210> 107  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Umělá sekvence

<220>  
 <223> Aminokyselinová sekvence verze "b1" V oblasti  
 zušlechtěného L řetězce

<400> 107  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
   1                  5                                  10                                  15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Phe  
                   20                                  25                                  30  
 Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile  
                   35                                  40                                  45  
 Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
                   50                                  55                                  60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
   65                                  70                                  75                                  80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr  
                   85                                  90                                  95  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
                   100                                  105

<210> 108  
 <211> 381  
 <212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<221> signální peptid

<222> (1)...(60)

<220>

<221> maturovaný peptid

<222> (61)...(381)

<223> Nukleotidová sekvence kódující verzi "b2" v oblasti zušlechtěného L řetězce

<400> 108

atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg ttt cca	48
Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro	
-20 -15 -10 -5	
ggg atc cga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct	96
Gly Ile Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser	
1 5 10	
gca tct gta gga gac aga gtc acc atc acg tgc aag gcc tca cag gac	144
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp	
15 20 25	
att aaa agc ttc tta agt tgg tat cag cag aaa cca gag aaa gcc cct	192
Ile Lys Ser Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro	
30 35 40	
aag tcc ctg atc tat tat gca act agt ttg gca gat ggg gtc cca tca	240
Lys Ser Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser	
45 50 55 60	
agg ttc agt ggc tcc gga tct ggt acc gat tac act ctc acc atc tcg	288
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser	
65 70 75	
agc ctc cag cct gaa gat ttt gca act tac tat tgt ctg cag cat ggt	336
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly	
80 85 90	
gag agc ccg tac acg ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa	381
Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
95 100 105	

- <210> 109
- <211> 107
- <212> PRT
- <213> Umělá sekvence
  
- <220>
- <223> Aminokyselinová sekvence verze "b2" V oblasti  
zušlechtěného L řetězce

<400> 109

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

- <210> 110
- <211> 30
- <212> PRT
- <213> Umělá sekvence

<220>

<223> Aminokyselinová sekvence FR1 všech verzí V oblasti  
zušlechtěného H řetězce

<400> 110

Gln	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Ala	Val	Leu	Ala	Arg	Pro	Gly	Thr
				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys		
			20					25					30		

<210> 111

<211> 14

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Aminokyselinová sekvence FR2 verzí "a" až "j" V  
oblasti zušlechtěného H řetězce

<400> 111

Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly
				5					10				

<210> 112

<211> 14

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Aminokyselinová sekvence FR2 verzí "b1" a "d3" V  
oblasti zušlechtěného H řetězce

<400> 112



Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly  
                                   5                                  10

- <210> 113  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Umělá sekvence
- <220>  
 <223> Aminokyselinová sekvence FR2 verzí "b3" a "d3" v oblasti zušlechtěného H řetězce

<400> 113  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
                                   5                                  10

- <210> 114  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Umělá sekvence
- <220>  
 <223> Aminokyselinová sekvence FR3 verze "a" v oblasti zušlechtěného H řetězce

<400> 114  
 Arg Ala Lys Leu Thr Ala Ala Thr Ser Ala Ser Ile Ala Tyr Leu Glu  
                                   5                                  10                                  15  
 Phe Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
                                   20                                  25                                  30

- <210> 115  
 <211> 32

<212> PRT  
 <213> Umělá sekvence

<220>  
 <223> Aminokyselinová sekvence FR3 verzí (b), (b1) a (b3) V oblasti zušlechtěného H řetězce

<400> 115  
**Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu**  
                               5                              10                              15  
**Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg**  
                               20                              25                              30

<210> 116  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Umělá sekvence

<220>  
 <223> Aminokyselinová sekvence FR3 verze "c" V oblasti zušlechtěného H řetězce

<400> 116  
**Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Arg**  
                               5                              10                              15  
**Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg**  
                               20                              25                              30

<210> 117  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Umělá sekvence

<220>

<223> Aminokyselinová sekvence FR3 verzí "d", "d1" a "d3" V oblasti zušlechtěného H řetězce

<400> 117

Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu
				5					10					15	
Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg
			20					25					30		

<210> 118

<211> 32

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Aminokyselinová sekvence FR3 verze "e" V oblasti zušlechtěného H řetězce

<400> 118

Arg	Val	Ser	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Lys	Ile	Ala	Tyr	Met	Glu
				5					10					15	
Leu	Asn	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg
			20					25					30		

<210> 119

<211> 32

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Aminokyselinová sekvence FR3 verze "f" V oblasti  
zušlechtěného H řetězce

<400> 119

Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu
				5					10					15	
Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg
			20					25					30		

<210> 120

<211> 32

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Aminokyselinová sekvence FR3 verze "g" V oblasti  
zušlechtěného H řetězce

<400> 120

Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln
				5					10					15	
Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Ser	Cys	Ala	Arg
			20					25					30		

<210> 121

<211> 32

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Aminokyselinová sekvence FR3 verze "h" V oblasti  
zušlechtěného H řetězce

<400> 121

Arg	Val	Thr	Met	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Ala	Ala	Tyr	Leu	Gln
				5				10						15	
Trp	Thr	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg
			20					25					30		

<210> 122

<211> 32

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Aminokyselinová sekvence FR3 verze "i" V oblasti  
zušlechtěného H řetězce

<400> 122

Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Phe	Met	Glu
				5				10						15	
Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg
			20					25					30		

<210> 123

<211> 32

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Aminokyselinová sekvence FR3 verze "j" V oblasti  
zušlechtěného H řetězce

<400> 123

Arg	Val	Thr	Phe	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Ala	Asn	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu
				5				10						15	

Leu Arg Ser Leu Arg Ser Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30

<210> 124

<211> 13

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Aminokyselinová sekvence FR4 všech verzí V oblasti  
 zušlechtěného H řetězce

<400> 124

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser  
 5 10

<210> 125

<211> 23

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Aminokyselinová sekvence FR1 všech verzí V oblasti  
 zušlechtěného L řetězce

<400> 125

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
 20

<210> 126

<211> 15

<212> PRT  
 <213> Umělá sekvence

<220>  
 <223> Aminokyselinová sekvence FR2 verzí "a", "b" a "c"  
 V oblasti zušlechtěného L řetězce

<400> 126

<b>Trp</b>	<b>Tyr</b>	<b>Gln</b>	<b>Gln</b>	<b>Lys</b>	<b>Pro</b>	<b>Gly</b>	<b>Lys</b>	<b>Ala</b>	<b>Pro</b>	<b>Lys</b>	<b>Leu</b>	<b>Leu</b>	<b>Ile</b>	<b>Tyr</b>
				5						10				15

<210> 127  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Umělá sekvence

<220>  
 <223> Aminokyselinová sekvence FR2 verze "b1" V oblasti  
 zušlechtěného L řetězce

<400> 127

<b>Trp</b>	<b>Phe</b>	<b>Gln</b>	<b>Gln</b>	<b>Lys</b>	<b>Pro</b>	<b>Gly</b>	<b>Lys</b>	<b>Ser</b>	<b>Pro</b>	<b>Lys</b>	<b>Thr</b>	<b>Leu</b>	<b>Ile</b>	<b>Tyr</b>
				5						10				15

<210> 128  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Umělá sekvence

<220>  
 <223> Aminokyselinová sekvence FR2 verze "b2" V oblasti  
 zušlechtěného L řetězce

<400> 128

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr  
 5 10 15

<210> 129

<211> 32

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Aminokyselinová sekvence FR3 verze "a" V oblasti  
 zušlechtěného L řetězce

<400> 129

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 5 10 15  
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 130

<211> 32

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Aminokyselinová sekvence FR3 verzí "b", "b1" a  
 "b2" V oblasti zušlechtěného L řetězce

<400> 130

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr  
 5 10 15  
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 20 25 30



<210> 131  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Umělá sekvence

<220>

<223> Aminokyselinová sekvence FR3 verze "c" V oblasti  
 zušlechtěného L řetězce

<400> 131

<b>Gly</b>	<b>Val</b>	<b>Pro</b>	<b>Ser</b>	<b>Arg</b>	<b>Phe</b>	<b>Ser</b>	<b>Gly</b>	<b>Ser</b>	<b>Gly</b>	<b>Ser</b>	<b>Gly</b>	<b>Thr</b>	<b>Asp</b>	<b>Tyr</b>	<b>Thr</b>
				5					10					15	
<b>Leu</b>	<b>Thr</b>	<b>Ile</b>	<b>Ser</b>	<b>Ser</b>	<b>Leu</b>	<b>Gln</b>	<b>Pro</b>	<b>Glu</b>	<b>Asp</b>	<b>Ile</b>	<b>Ala</b>	<b>Thr</b>	<b>Tyr</b>	<b>Tyr</b>	<b>Cys</b>
			20					25					30		

<210> 132  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Umělá sekvence

<220>

<223> Aminokyselinová sekvence FR4 všech verzí V oblasti  
 zušlechtěného L řetězce

<400> 132

<b>Phe</b>	<b>Gly</b>	<b>Gly</b>	<b>Gly</b>	<b>Thr</b>	<b>Lys</b>	<b>Val</b>	<b>Glu</b>	<b>Ile</b>	<b>Lys</b>
				5				10	

<210> 133  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Umělá sekvence

<220>

<223> Aminokyselinová sekvence CDR1 všech verzí V  
oblasti zušlechtěného H řetězce

<400> 133

**Asp Tyr Tyr Met His**

5

<210> 134

<211> 17

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Aminokyselinová sekvence CDR2 všech verzí V  
oblasti zušlechtěného H řetězce

<400> 134

**Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe Gln**

5

10

15

**Gly**

<210> 135

<211> 8

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Aminokyselinová sekvence CDR3 všech verzí V  
oblasti zušlechtěného H řetězce

<400> 135

**Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr**

5

<210> 136

<211> 11

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Aminokyselinová sekvence CDR1 všech verzí V  
oblasti zušlechtěného L řetězce

<400> 136

**Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Phe Leu Ser**

5

10

<210> 137

<211> 7

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Aminokyselinová sekvence CDR2 všech verzí V  
oblasti zušlechtěného L řetězce

<400> 137

**Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp**

5

<210> 138

<211> 9

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Aminokyselinová sekvence CDR3 všech verzí V oblasti zušlechtěného L řetězce

<400> 138

Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr Thr

5

<210> 139

<211> 118

<212> PRT

<213> Myš

<220>

<223> Aminokyselinová sekvence kódující V oblast H řetězce myší monoklonální protilátky ATR-2 proti TF

<400> 139

Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr

20

25

30

Asn Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe

50

55

60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Phe

65

70

75

80

Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Gly Gly Glu Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100

105

110

Thr Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 140

<211> 118

<212> PRT

<213> Myš

<220>

<223> Aminokyselinová sekvence kódující V oblast H  
řetězce myši monoklonální protilátky ATR-3 proti  
TF

<400> 140

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

<210> 141

<211> 117

<212> PRT

<213> Myš

<220>

<223> Aminokyselinová sekvence kódující V oblast H  
řetězce myší monoklonální protilátky ATR-4 proti  
TF

<400> 141

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

<210> 142

<211> 117

<212> PRT

<213> Myš

<220>

<223> Aminokyselinová sekvence kódující V oblast H  
řetězce myší monoklonální protilátky ATR-5 proti  
TF

<400> 142

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

<210>          143  
 <211>          118  
 <212>          PRT  
 <213>          Myš

<220>  
 <223>          Aminokyselinová sekvenca kódujúci V oblasť H  
                   řetězce myši monoklonální protilátky ATR-7 proti  
                   TF

<400>          143  
 Asp Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ser  
   5  10  15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Pro Asp Tyr  
   20  25  30  
 Asn Ile Phe Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
   35  40  45  
 Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Thr Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe  
   50  55  60

Asn Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Phe  
 65 70 75 80  
 Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Gly Phe Tyr Tyr Asp Tyr Asp Cys Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 Leu Val Thr Val Ser Ala  
 115

<210> 144

<211> 118

<212> PRT

<213> Myš

<220>

<223> Aminokyselinová sekvence kódující V oblast H  
 řetězce myší monoklonální protilátky ATR-8 proti  
 TF

<400> 144

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



<210> 145  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Myš

<220>

<223> Aminokyselinová sekvence kódující V oblast L  
 řetězce myší monoklonální protilátky ATR-2 proti  
 TF

<400> 145

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

<210> 146  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Myš

<220>

<223> Aminokyselinová sekvence kódující V oblast L  
řetězce myši monoklonální protilátky ATR-3 proti  
TF

<400> 146

```

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

```

<210> 147

<211> 107

<212> PRT

<213> Myš

<220>

<223> Aminokyselinová sekvence kódující V oblast L  
řetězce myši monoklonální protilátky ATR-4 proti  
TF

<400> 147

```

Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly
                    5                10                15

```

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

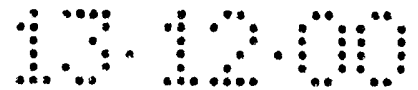
- <210> 148
- <211> 107
- <212> PRT
- <213> Myš

<220>

<223> Aminokyselinová sekvence kódující V oblast L  
 řetězce myší monoklonální protilátky ATR-5 proti  
 TF

<400> 148

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



Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr  
85 90 95  
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 149  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> Myš

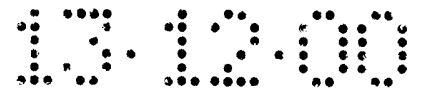
<220>

<223> Aminokyselinová sekvence kódující V oblast L  
řetězce myši monoklonální protilátky ATR-7 proti  
TF

<400> 149

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

<210> 150  
<211> 112  
<212> PRT



<213> Myš

<220>

<223> Aminokyselinová sekvence kódující V oblast L  
řetězce myší monoklonální protilátky ATR-8 proti  
TF

<400> 150

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

<210> 151

<211> 780

<212> DNA

<213> Homosapiens

<220>

<223> DNA kódující rozpustný lidský TF

<400> 151

```

atg gag acc cct gcc tgg ccc cgg gtc ccg cgc ccc gag acc gcc gtc      48
Met Glu Thr Pro Ala Trp Pro Arg Val Pro Arg Pro Glu Thr Ala Val
      -30                -25                -20

gct cgg acg ctc ctg ctc ggc tgg gtc ttc gcc cag gtg gcc ggc gct      96
Ala Arg Thr Leu Leu Leu Gly Trp Val Phe Ala Gln Val Ala Gly Ala
      -15                -10                -5                -1

tca ggc act aca aat act gtg gca gca tat aat tta act tgg aaa tca      144
Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser
      1                5                10                15

act aat ttc aag aca att ttg gag tgg gaa ccc aaa ccc gtc aat caa      192
Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln
      20                25                30

gtc tac act gtt caa ata agc act aag tca gga gat tgg aaa agc aaa      240
Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys
      35                40                45

tgc ttt tac aca aca gac aca gag tgt gac ctc acc gac gag att gtg      288
Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val
      50                55                60

aag gat gtg aag cag acg tac ttg gca cgg gtc ttc tcc tac ccg gca      366
Lys Asp Val Lys Gln Thr Tyr Leu Ala Arg Val Phe Ser Tyr Pro Ala
      65                70                75                80

ggg aat gtg gag agc acc ggt tct gct ggg gag cct ctg tat gag aac      384
Gly Asn Val Glu Ser Thr Gly Ser Ala Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Asn
      85                90                95

tcc cca gag ttc aca cct tac ctg gag aca aac ctc gga cag cca aca      432
Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr Leu Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr
      100                105                110

att cag agt ttt gaa cag gtg gga aca aaa gtg aat gtg acc gta gaa      480
Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Val Asn Val Thr Val Glu
      115                120                125

gat gaa cgg act tta gtc aga agg aac aac act ttc cta agc ctc cgg      528
Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr Phe Leu Ser Leu Arg
      130                135                140

gat gtt ttt ggc aag gac tta att tat aca ctt tat tat tgg aaa tct      576
Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser
      145                150                155                160

```

```

tca agt tca gga aag aaa aca gcc aaa aca aac act aat gag ttt ttg      624
Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu
                165                170                175
att gat gtg gat aaa gga gaa aac tac tgt ttc agt gtt caa gca gtg      672
Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val
                180                185                190
att ccc tcc cga aca gtt aac cgg aag agt aca gac agc ccg gta gag      720
Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu
                195                200                205
tgt atg ggc cag gag aaa ggg gaa ttc aga gaa gac tac aaa gac gat      768
Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Glu Asp Tyr Lys Asp Asp
                210                215                220
gac gat aaa taa      780
Asp Asp Lys
225

```

```

<210>      152
<211>      259
<212>      PRT

```

```

<220>
<223>      Aminokyselinová sekvence rozpustného lidského TF

```

```

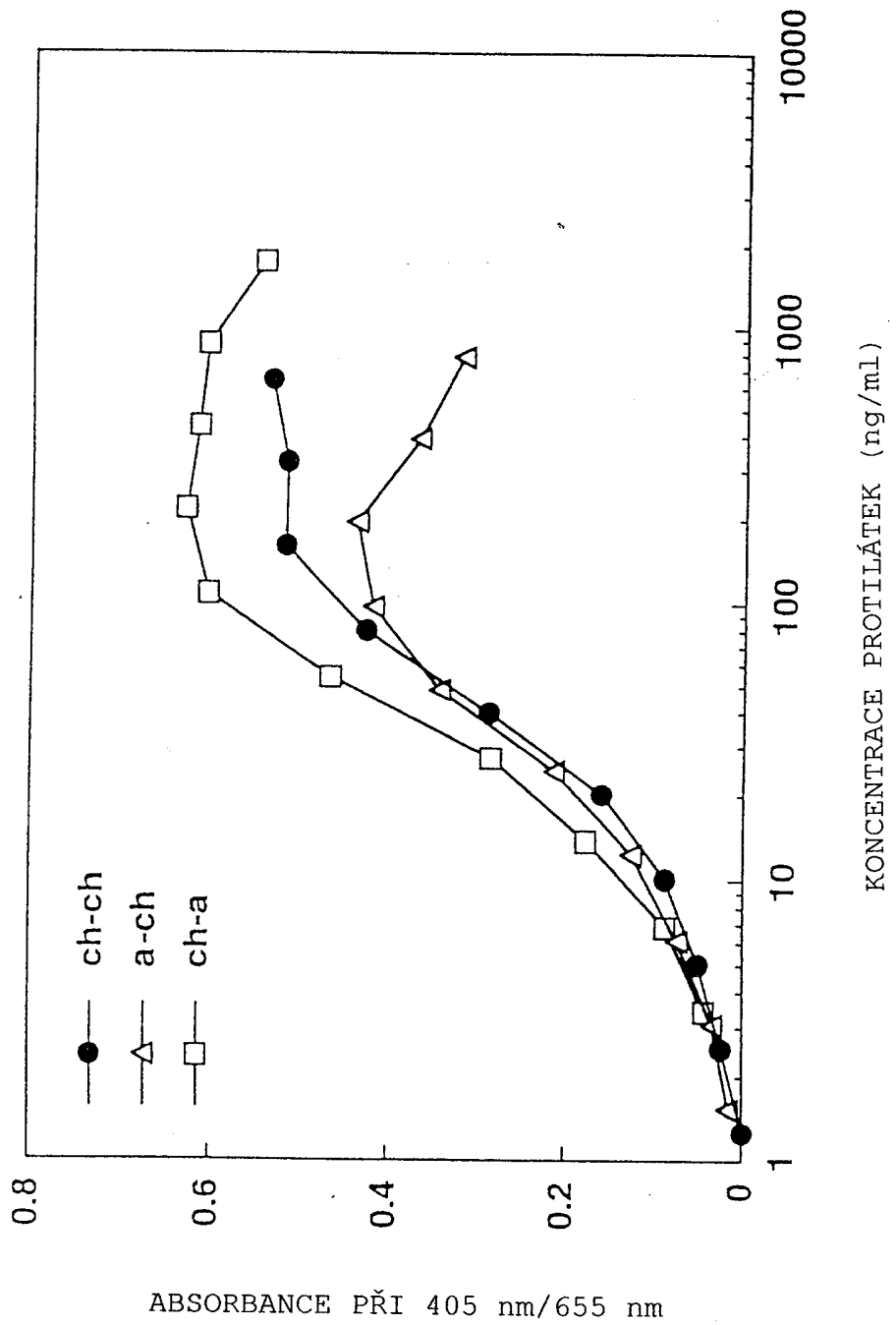
<400>      152
Met Glu Thr Pro Ala Trp Pro Arg Val Pro Arg Pro Glu Thr Ala Val
                -30                -25                -20
Ala Arg Thr Leu Leu Leu Gly Trp Val Phe Ala Gln Val Ala Gly Ala
                -15                -10                -5                -1
Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser
    1                5                10                15
Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln
                20                25                30
Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys
                35                40                45
Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val
    50                55                60

```

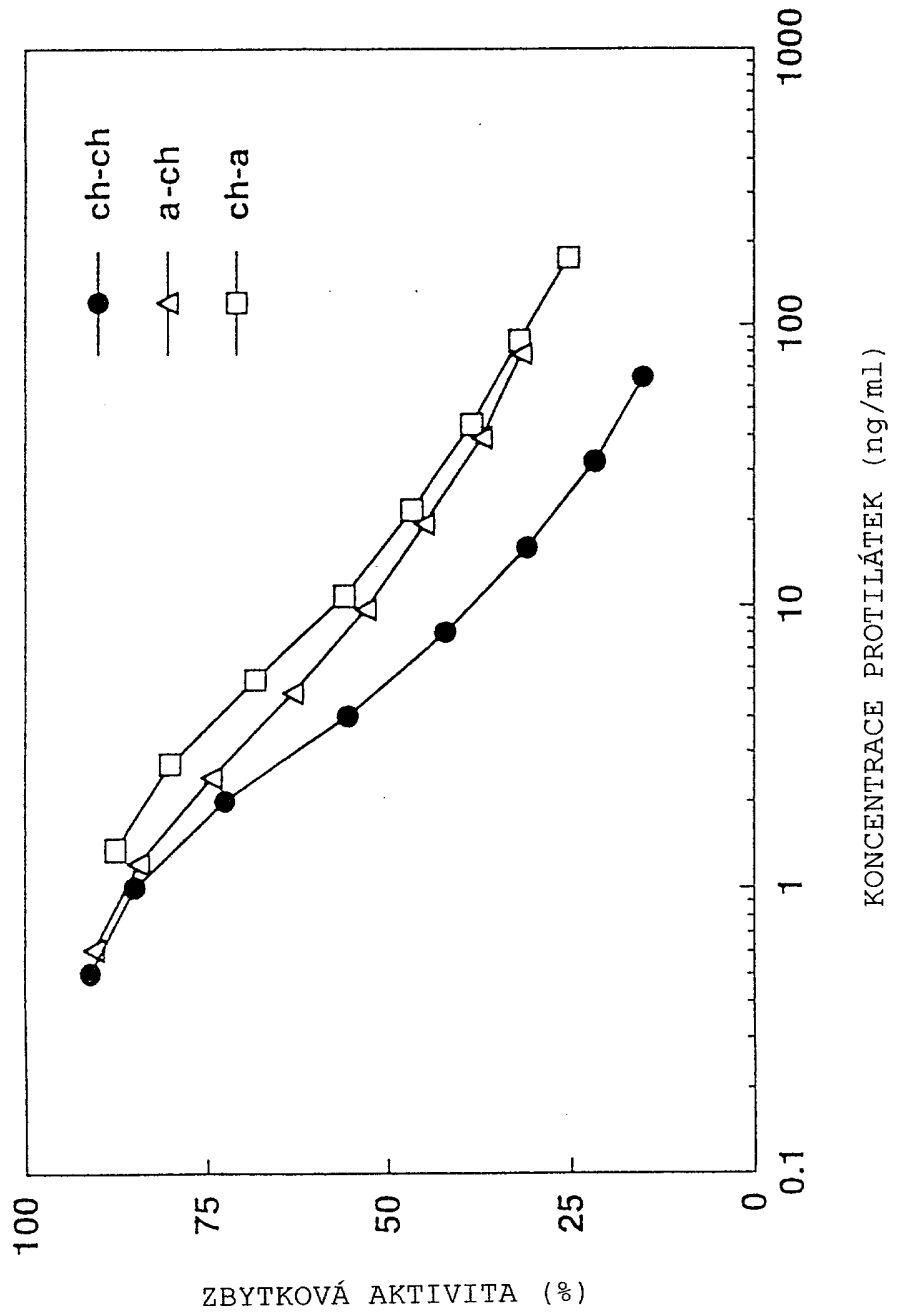
Lys	Asp	Val	Lys	Gln	Thr	Tyr	Leu	Ala	Arg	Val	Phe	Ser	Tyr	Pro	Ala
65					70					75					80
Gly	Asn	Val	Glu	Ser	Thr	Gly	Ser	Ala	Gly	Glu	Pro	Leu	Tyr	Glu	Asn
			85						90					95	
Ser	Pro	Glu	Phe	Thr	Pro	Tyr	Leu	Glu	Thr	Asn	Leu	Gly	Gln	Pro	Thr
			100					105					110		
Ile	Gln	Ser	Phe	Glu	Gln	Val	Gly	Thr	Lys	Val	Asn	Val	Thr	Val	Glu
		115					120						125		
Asp	Glu	Arg	Thr	Leu	Val	Arg	Arg	Asn	Asn	Thr	Phe	Leu	Ser	Leu	Arg
		130					135					140			
Asp	Val	Phe	Gly	Lys	Asp	Leu	Ile	Tyr	Thr	Leu	Tyr	Tyr	Trp	Lys	Ser
145					150						155				160
Ser	Ser	Ser	Gly	Lys	Lys	Thr	Ala	Lys	Thr	Asn	Thr	Asn	Glu	Phe	Leu
				165						170				175	
Ile	Asp	Val	Asp	Lys	Gly	Glu	Asn	Tyr	Cys	Phe	Ser	Val	Gln	Ala	Val
			180						185					190	
Ile	Pro	Ser	Arg	Thr	Val	Asn	Arg	Lys	Ser	Thr	Asp	Ser	Pro	Val	Glu
		195						200					205		
Cys	Met	Gly	Gln	Glu	Lys	Gly	Glu	Phe	Arg	Glu	Asp	Tyr	Lys	Asp	Asp
	210						215						220		
Asp	Asp	Lys													
225															



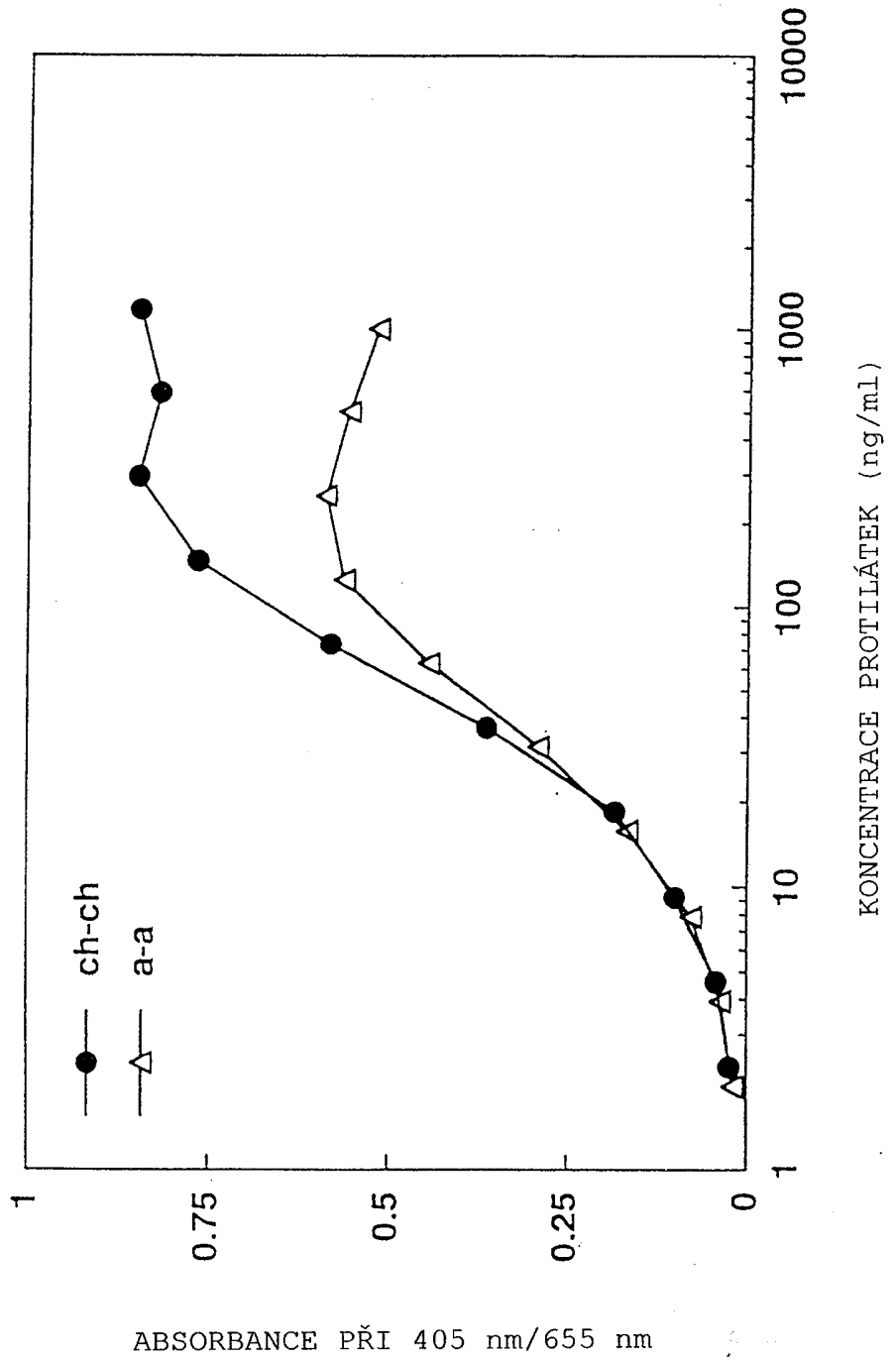
Obr. 1



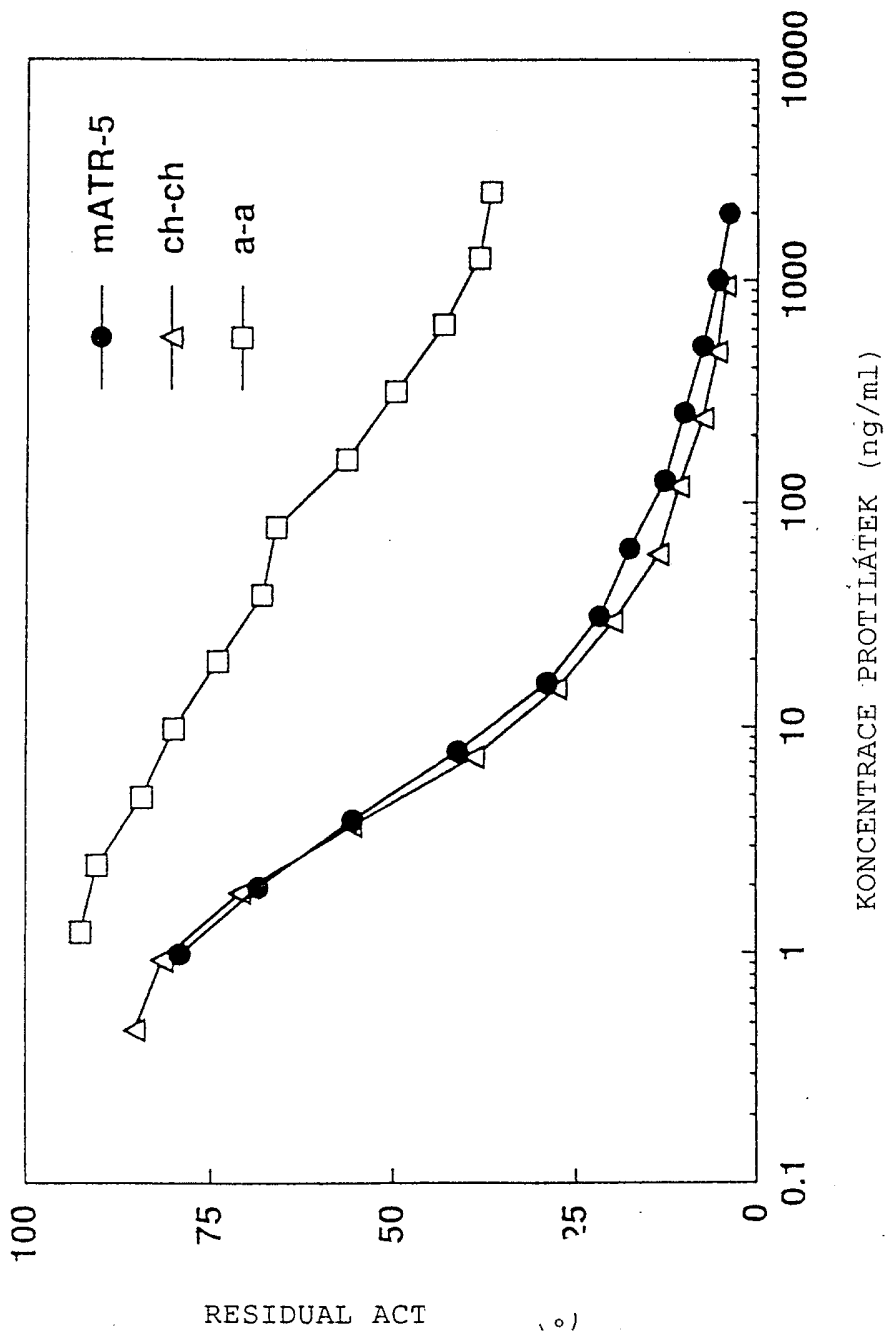
Obr. 2



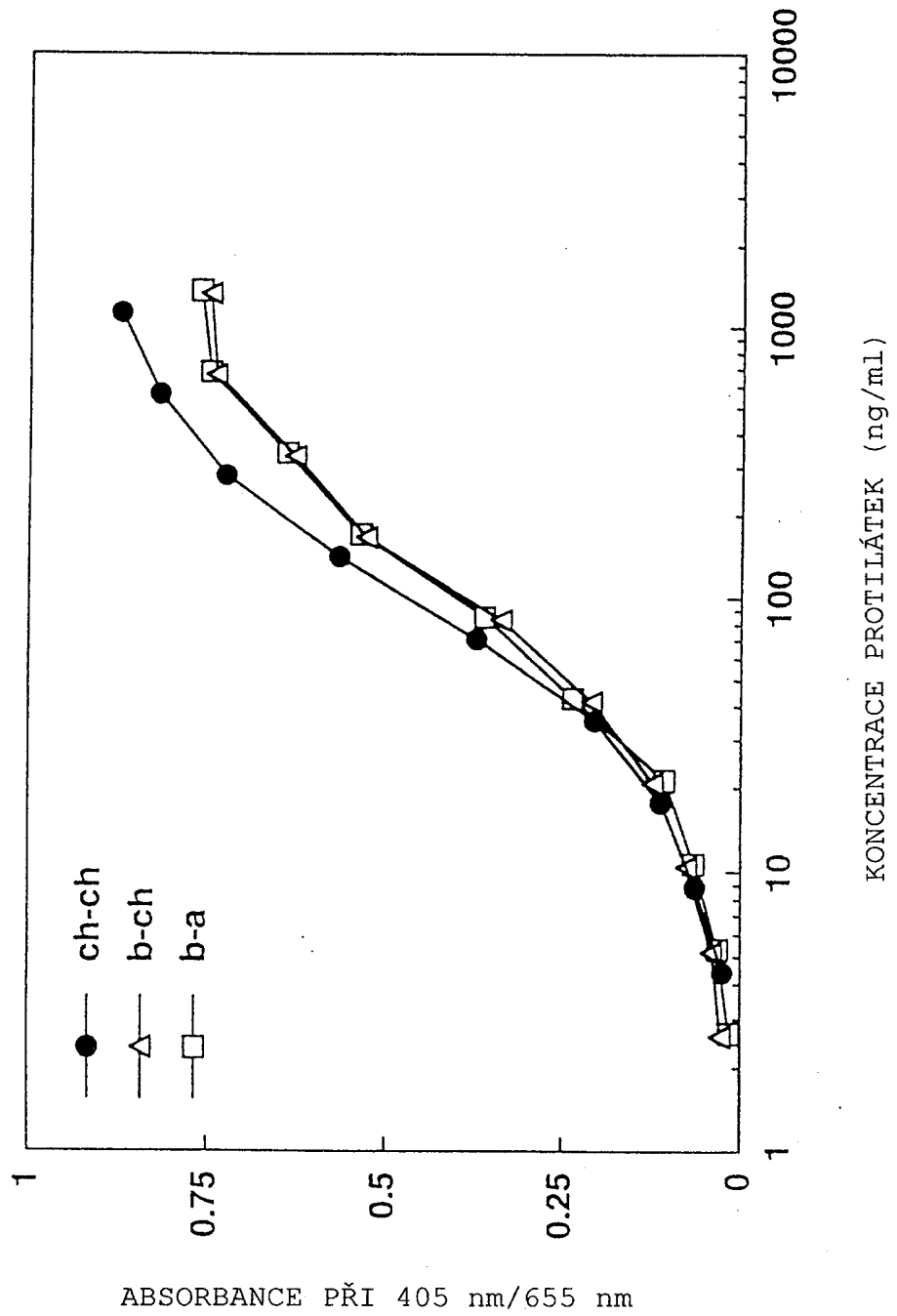
Obr. 3



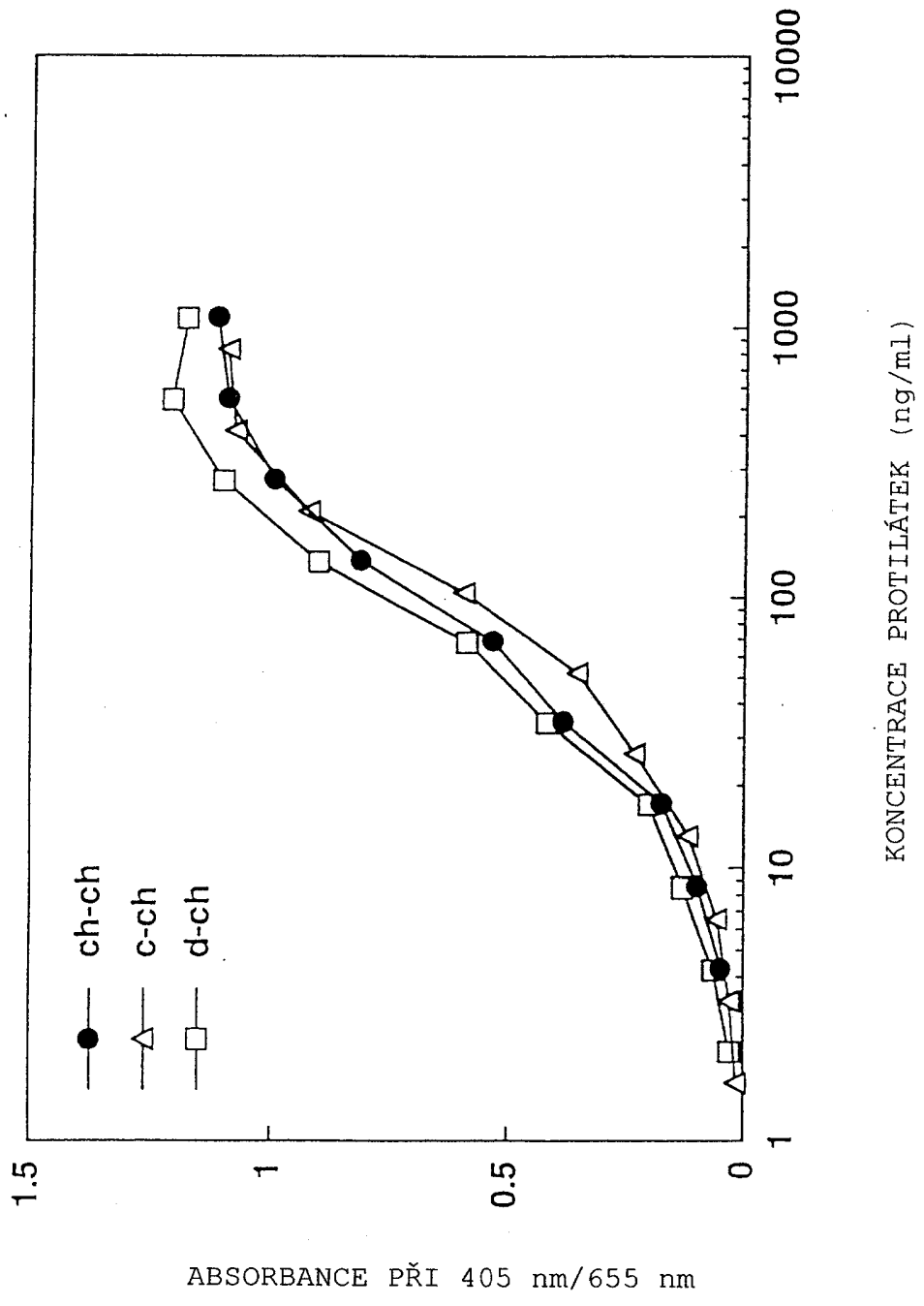
Obr. 4



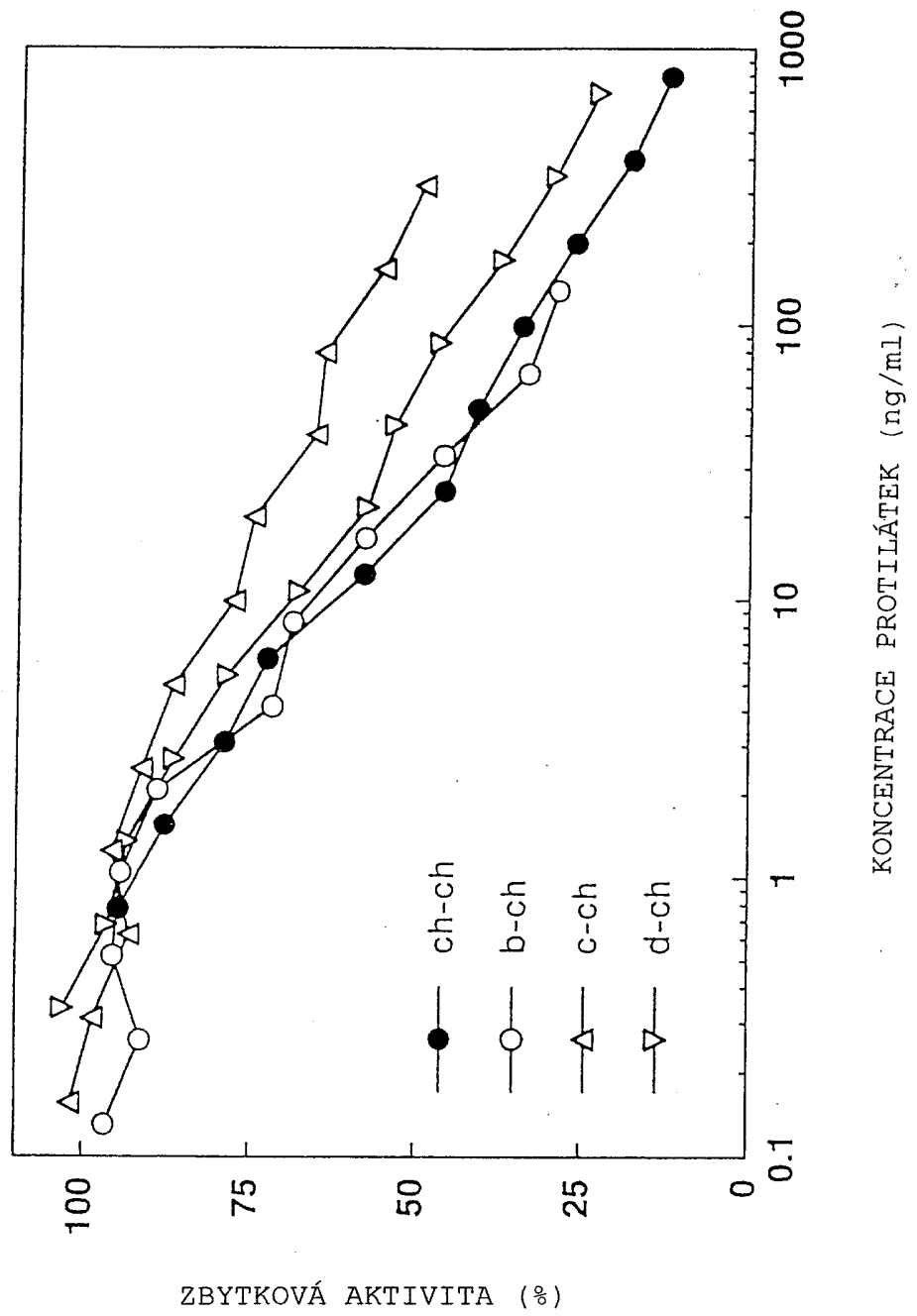
Obr. 5



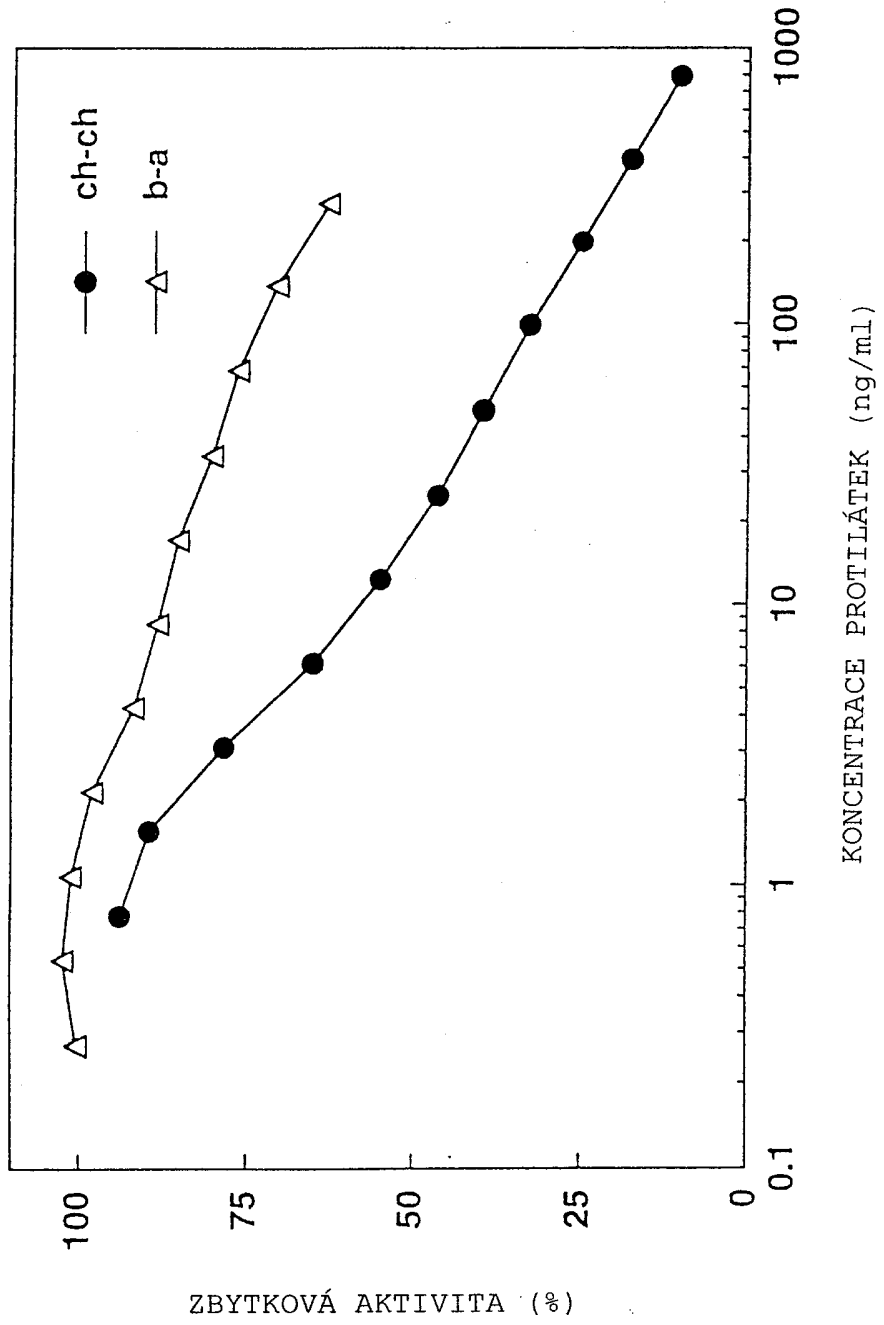
Obr. 6



Obř. 7

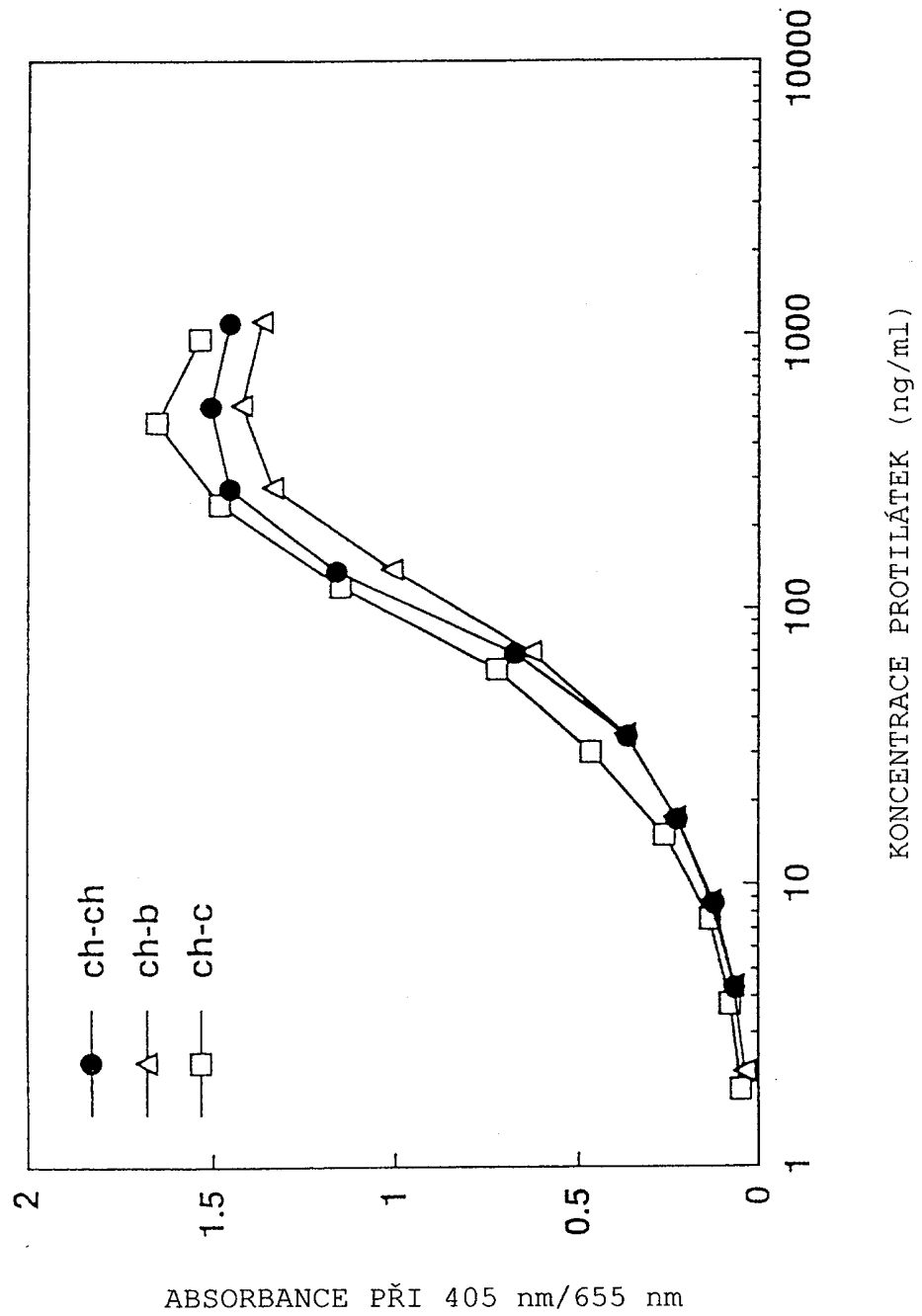


Obr. 8

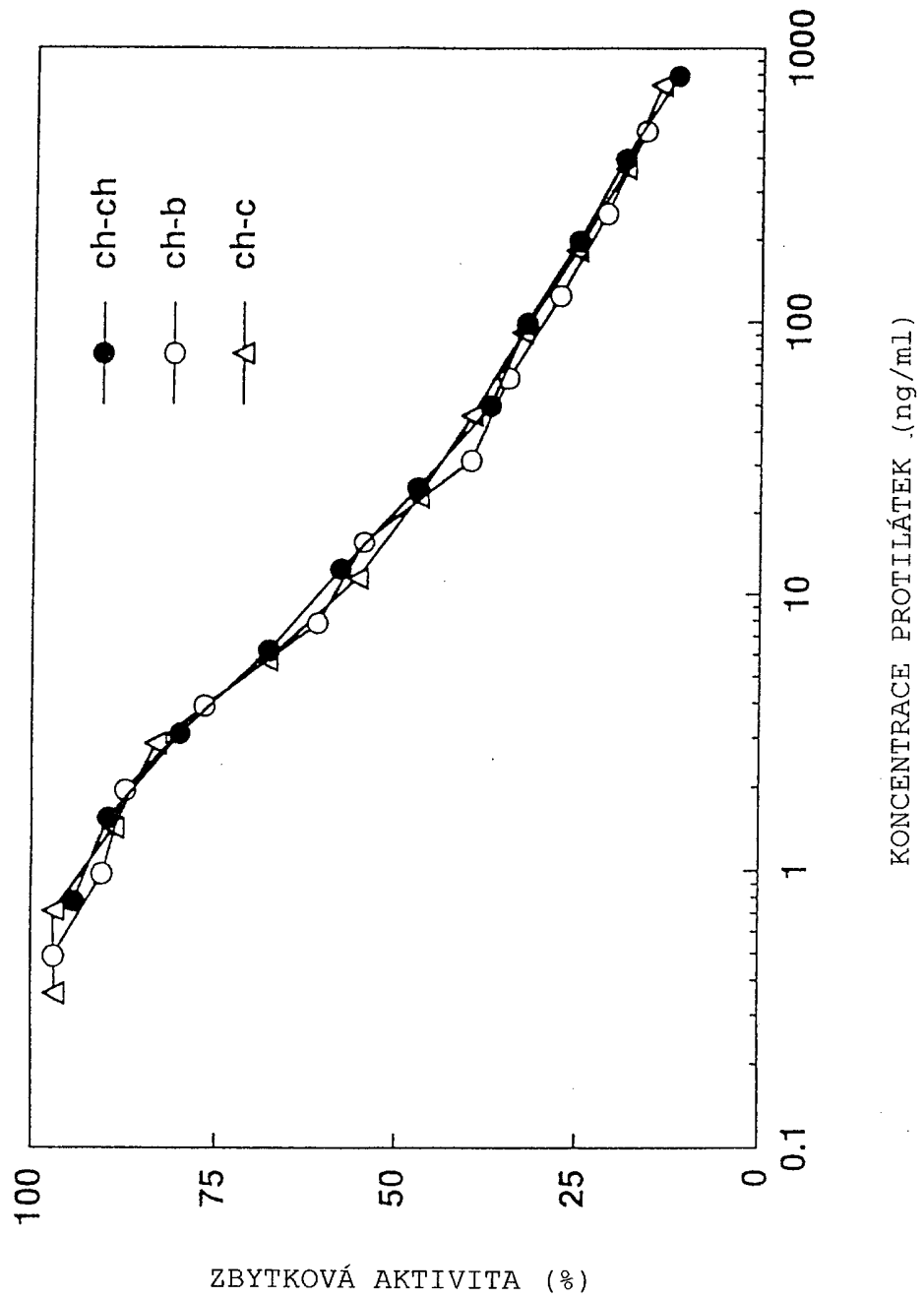




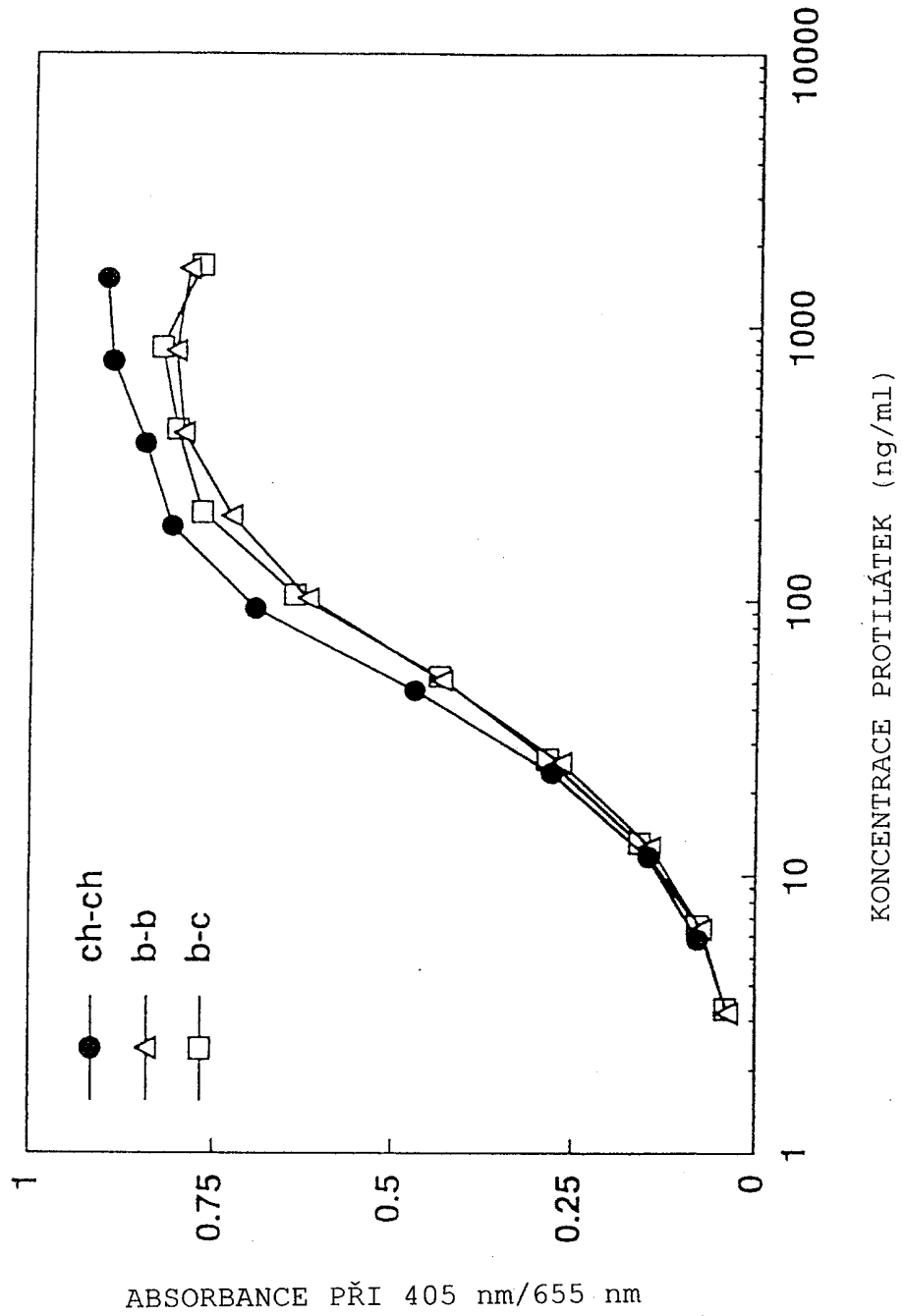
Obr. 9



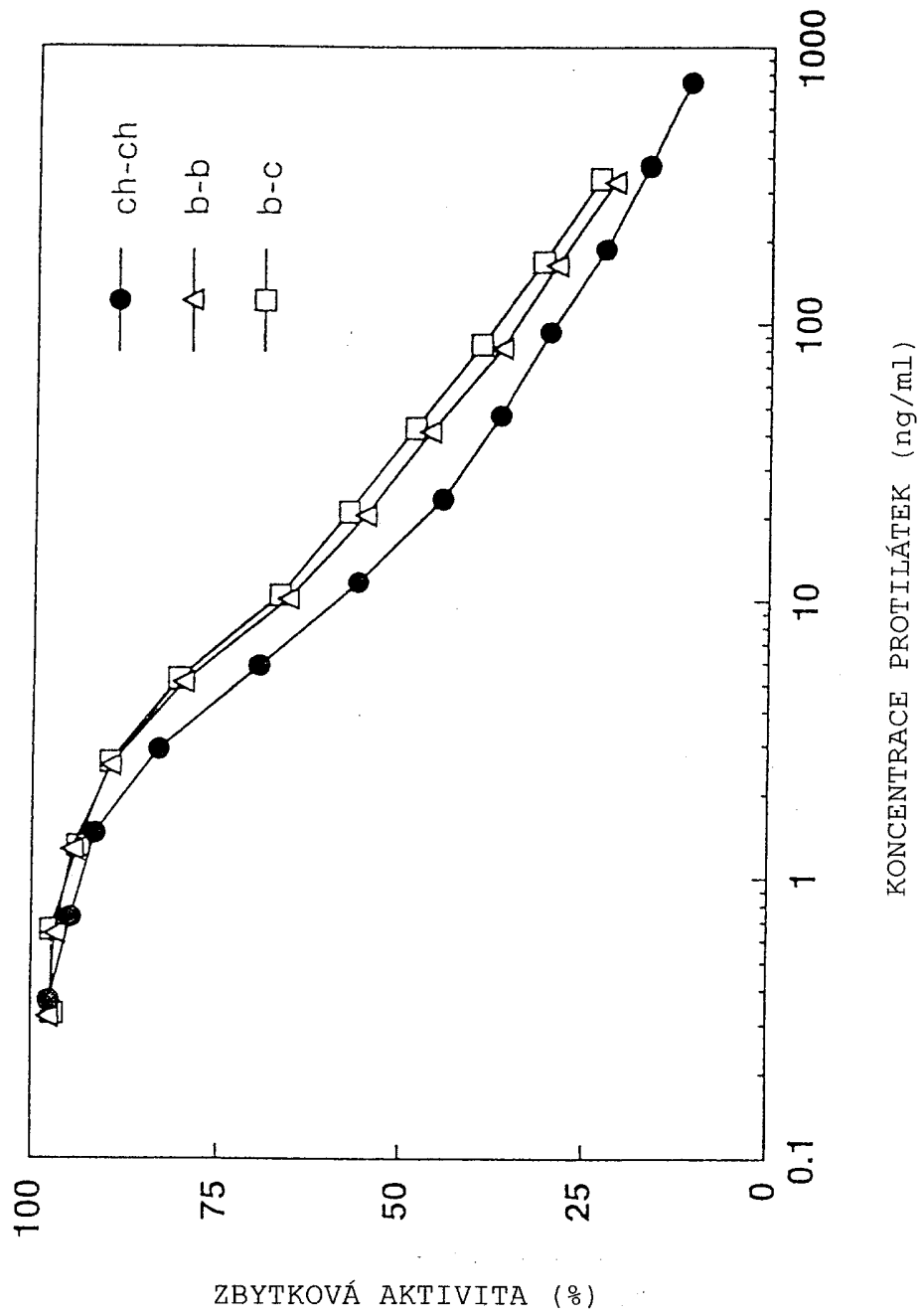
Obr. 10



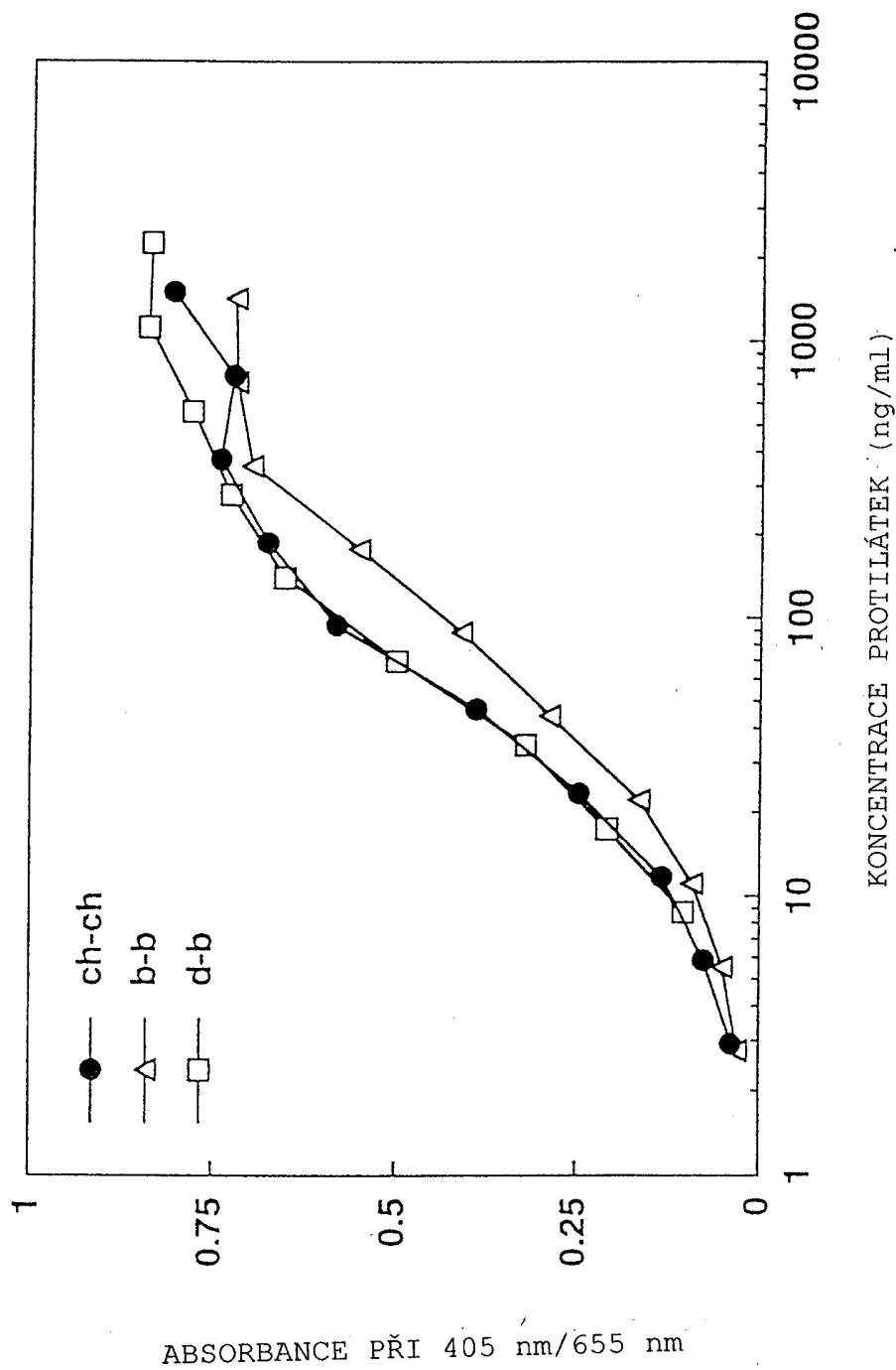
Obr. 11



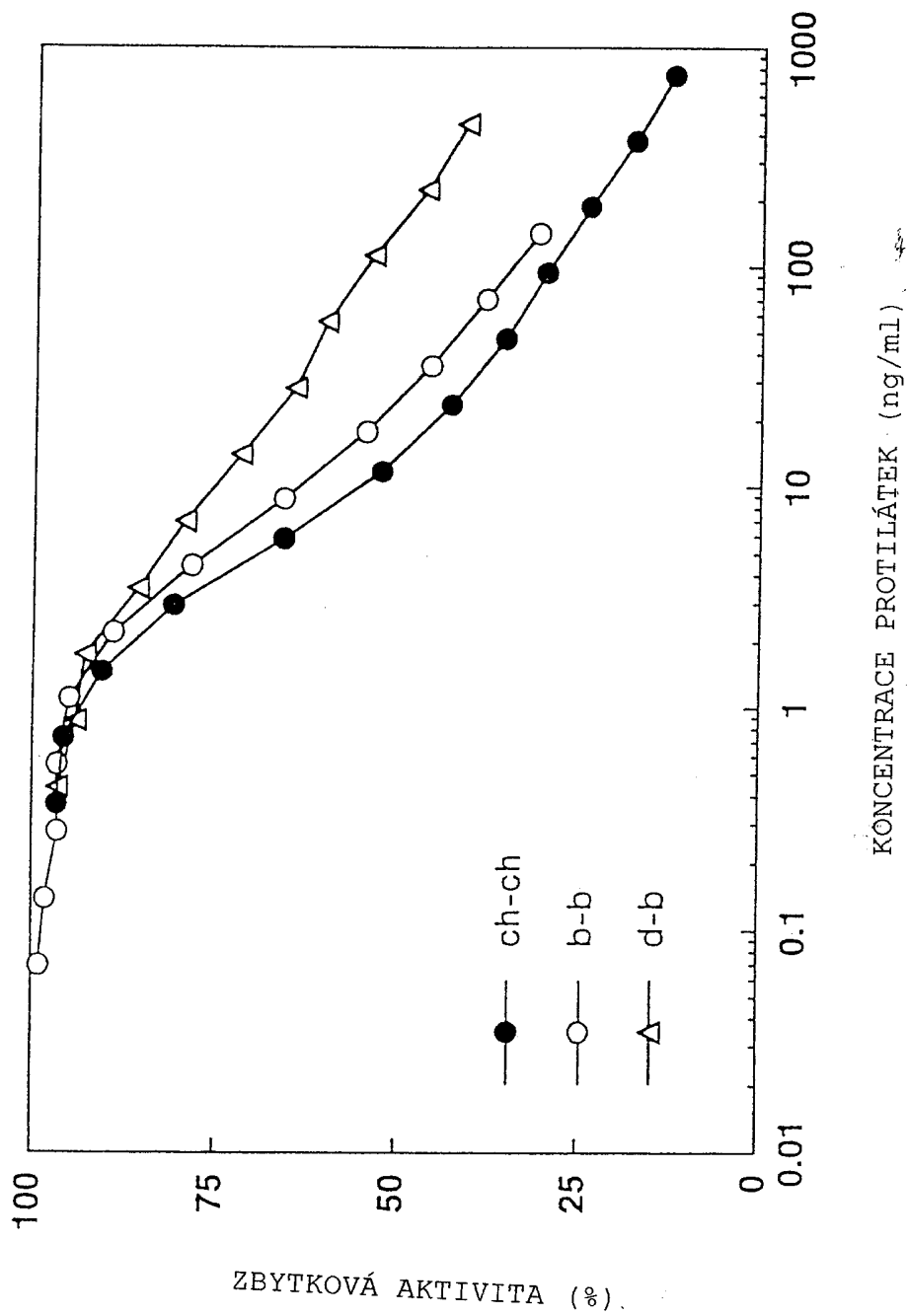
Obr. 12



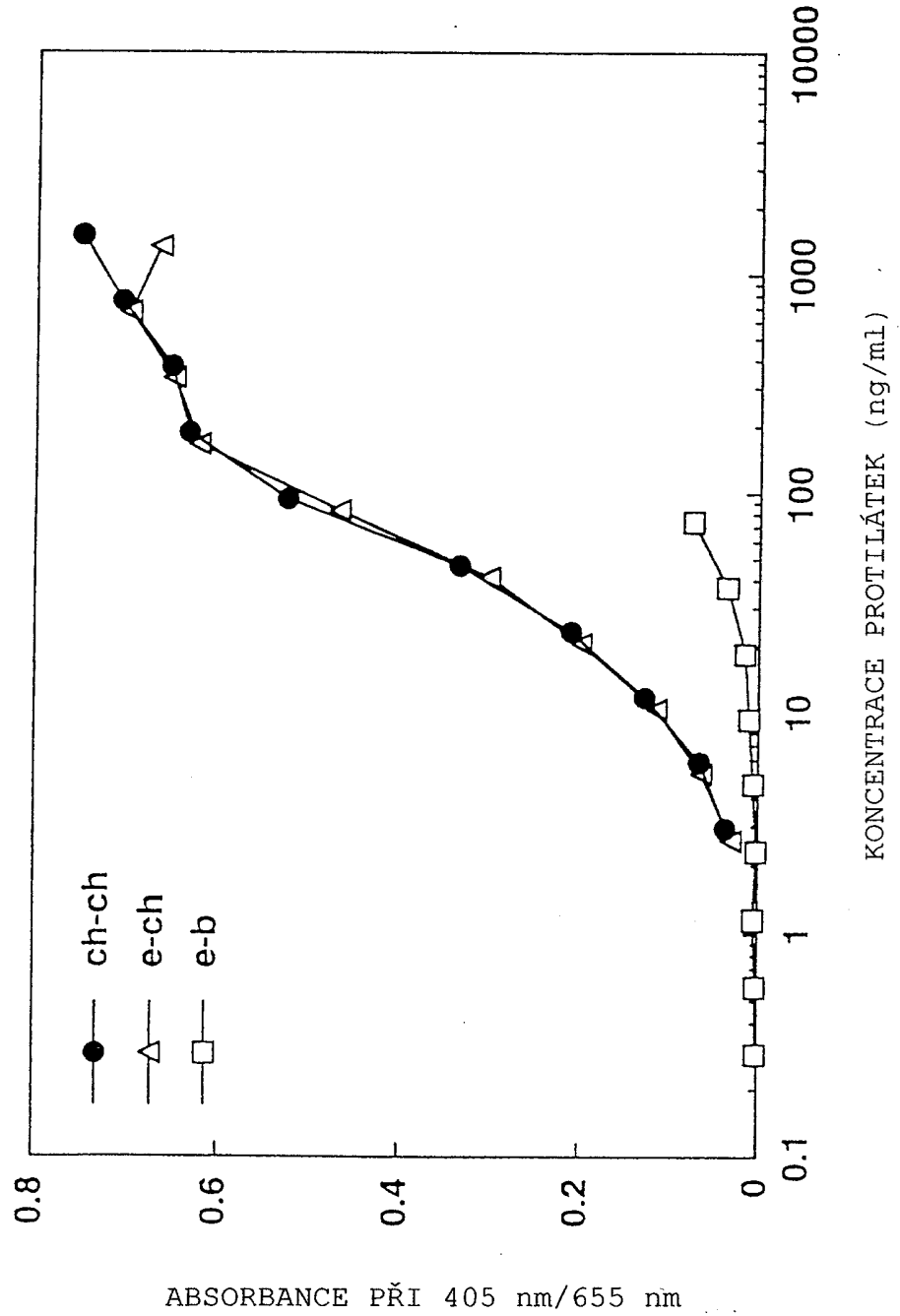
Obr. 13



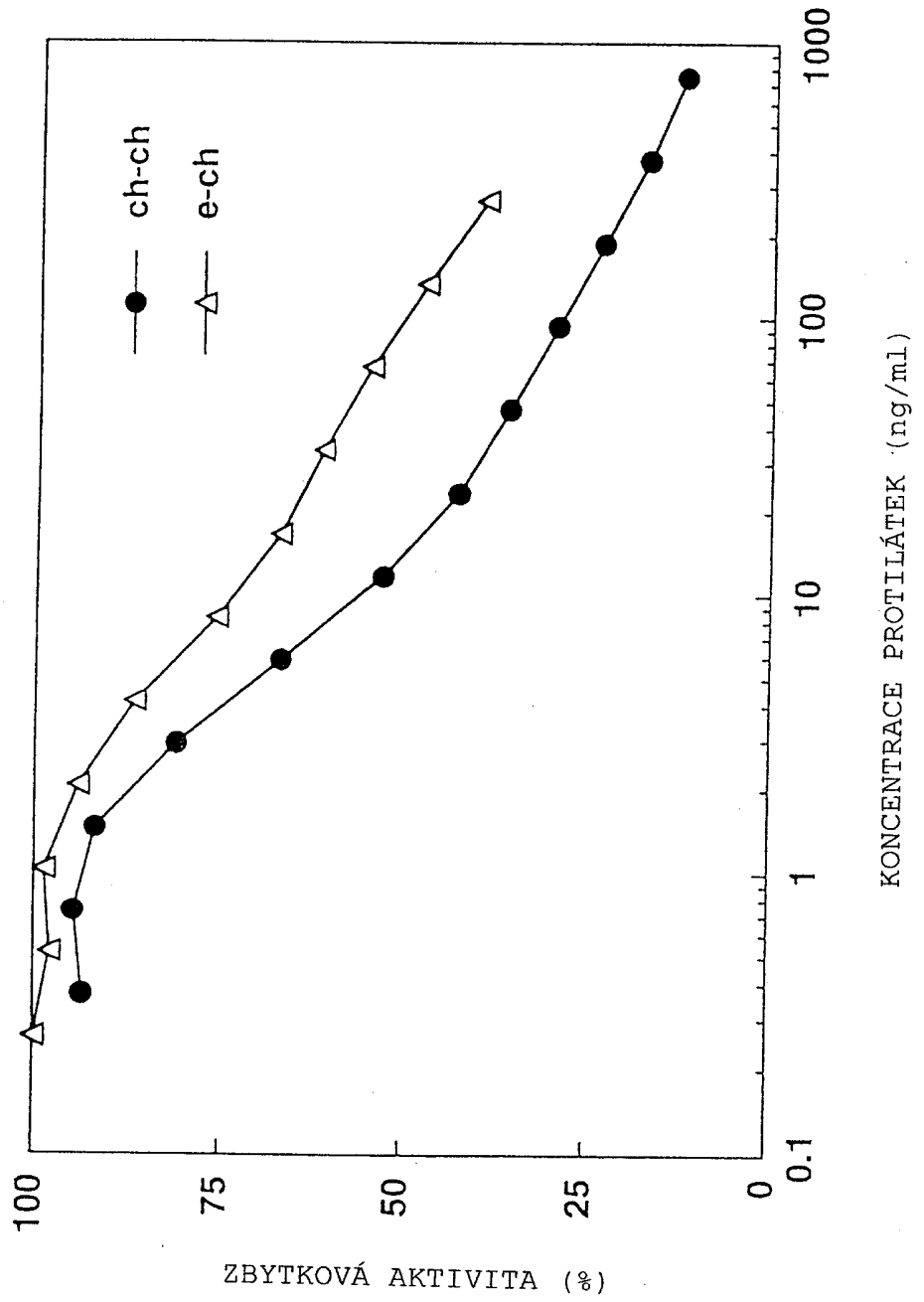
Obr. 14



Obr. 15

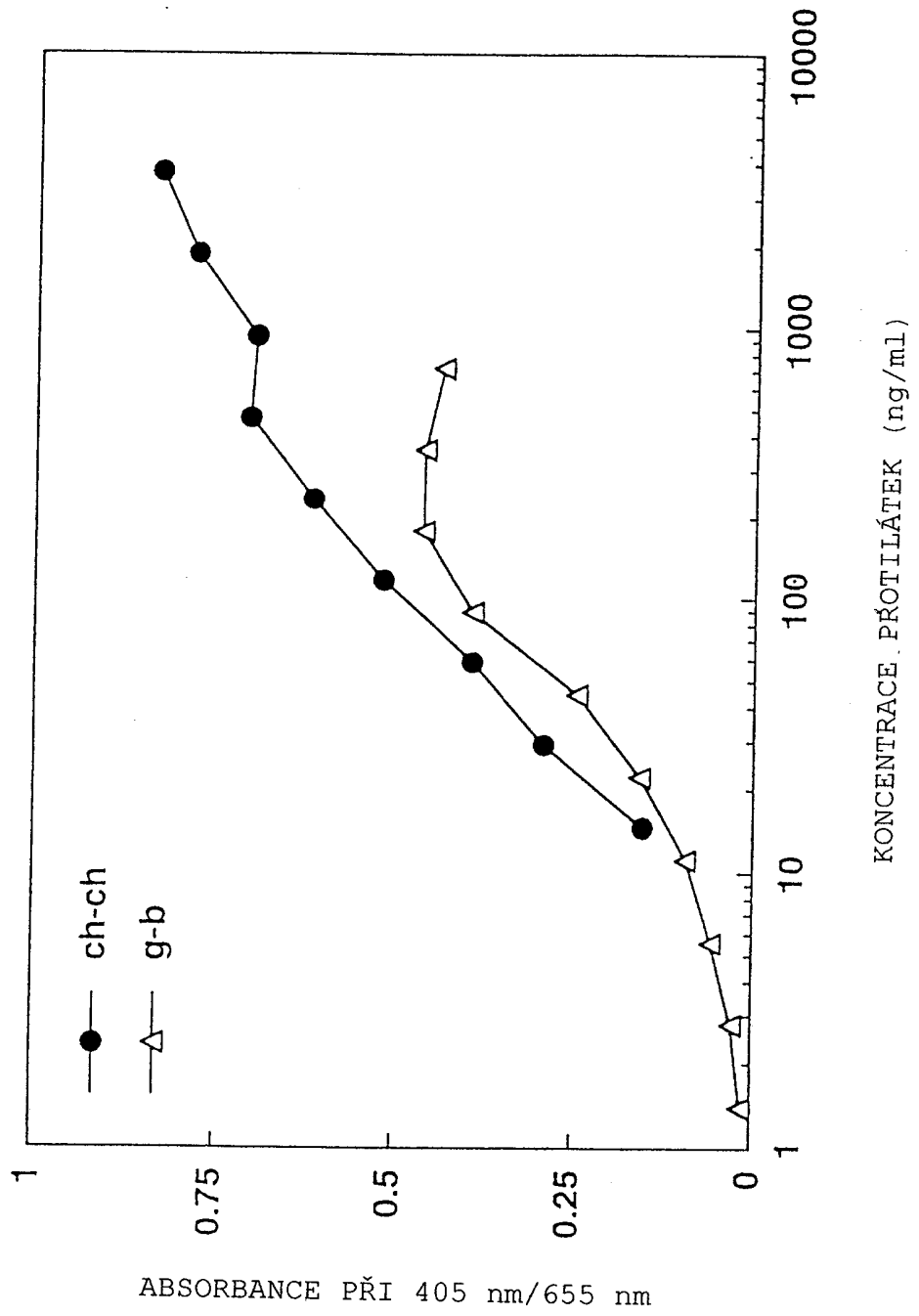


Obr. 16

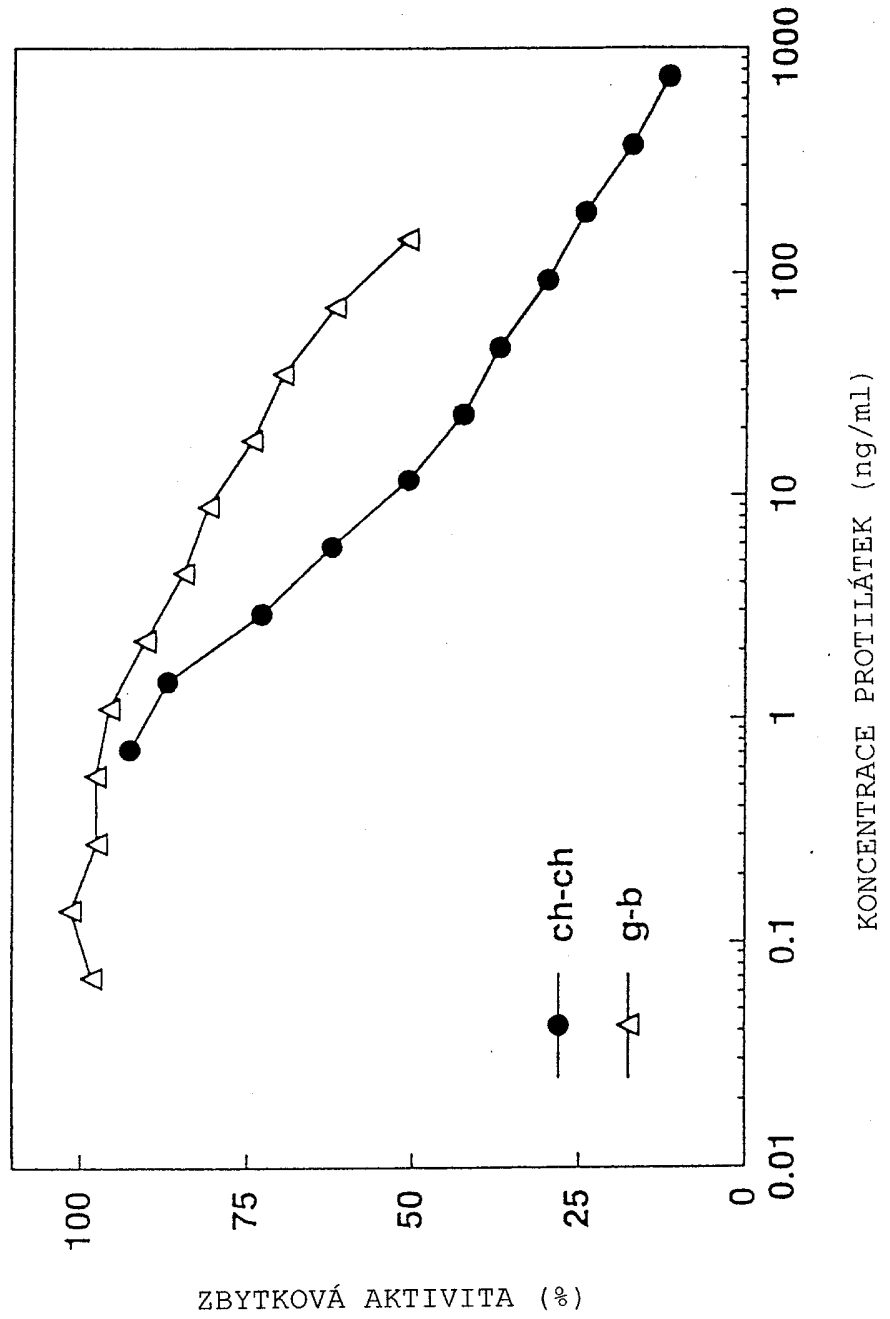




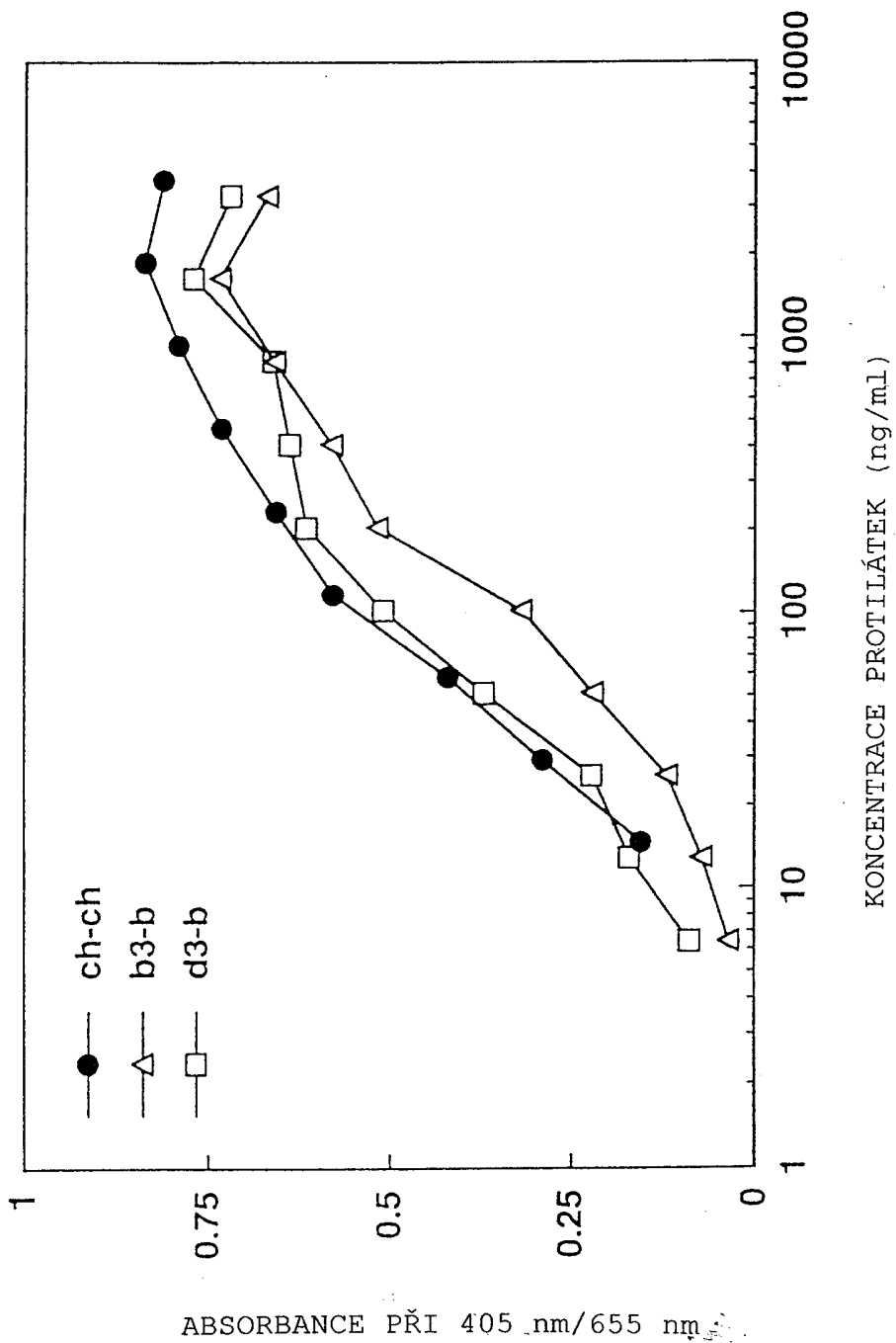
Obr. 17



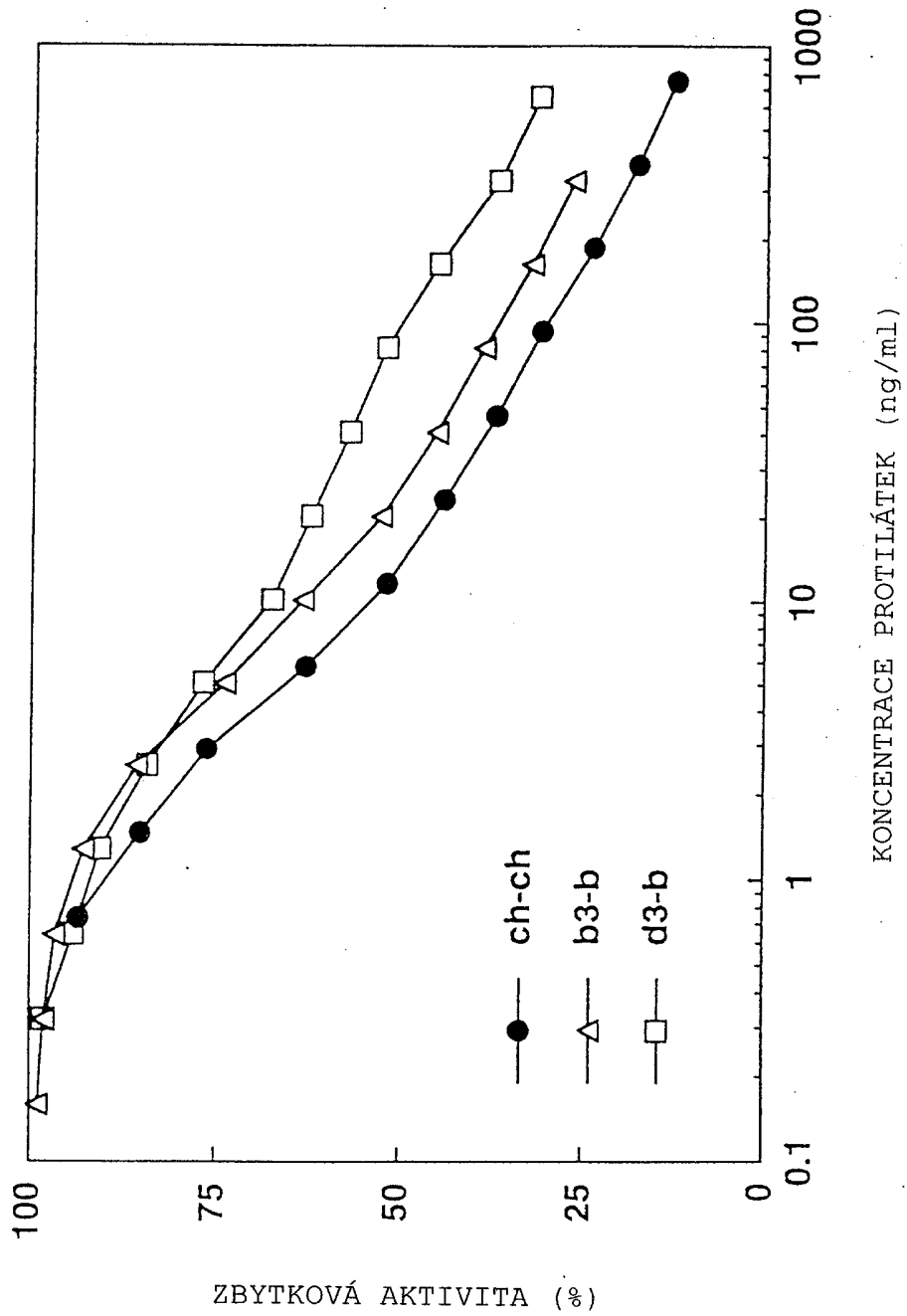
Obr. 18



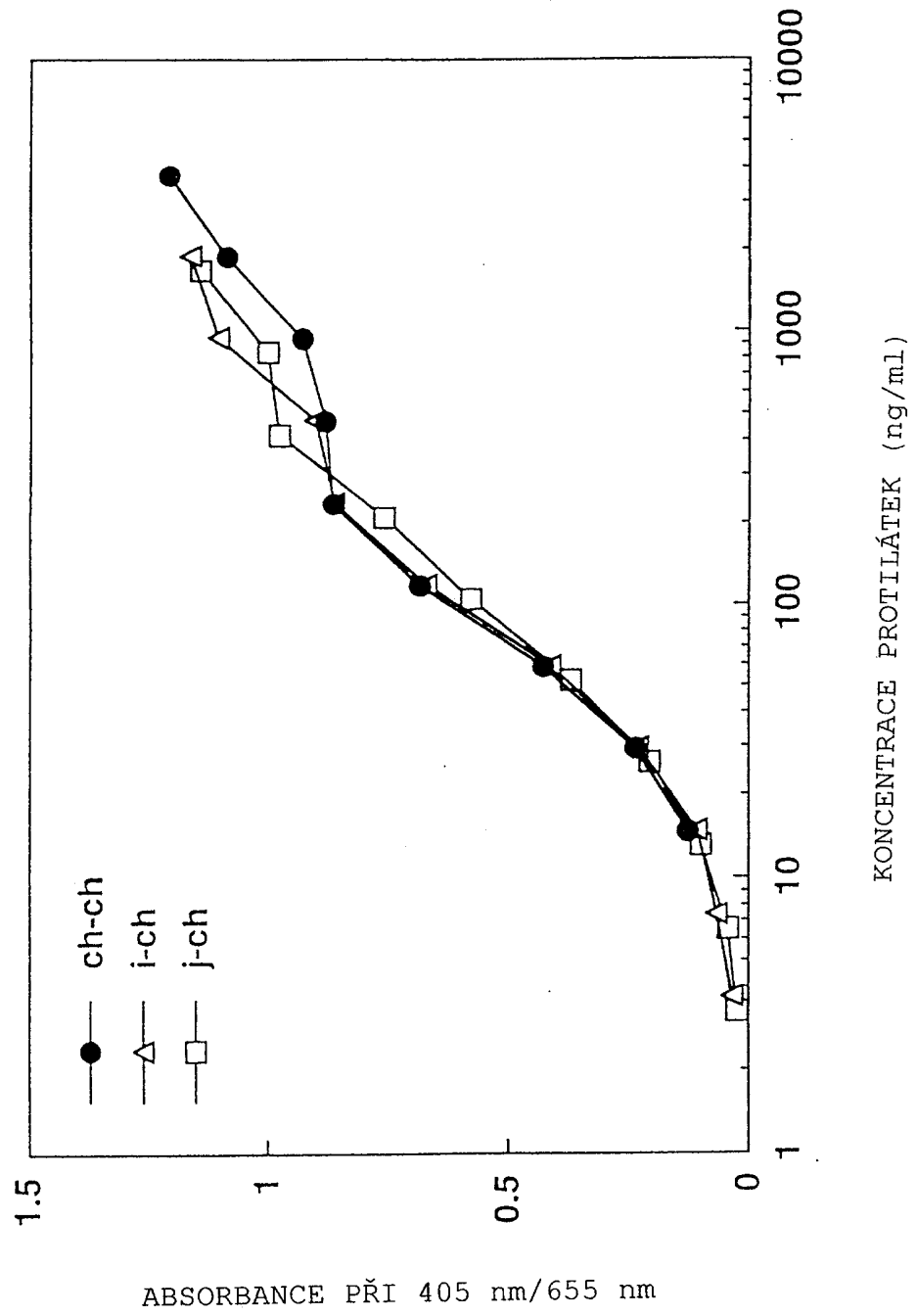
Obr. 19



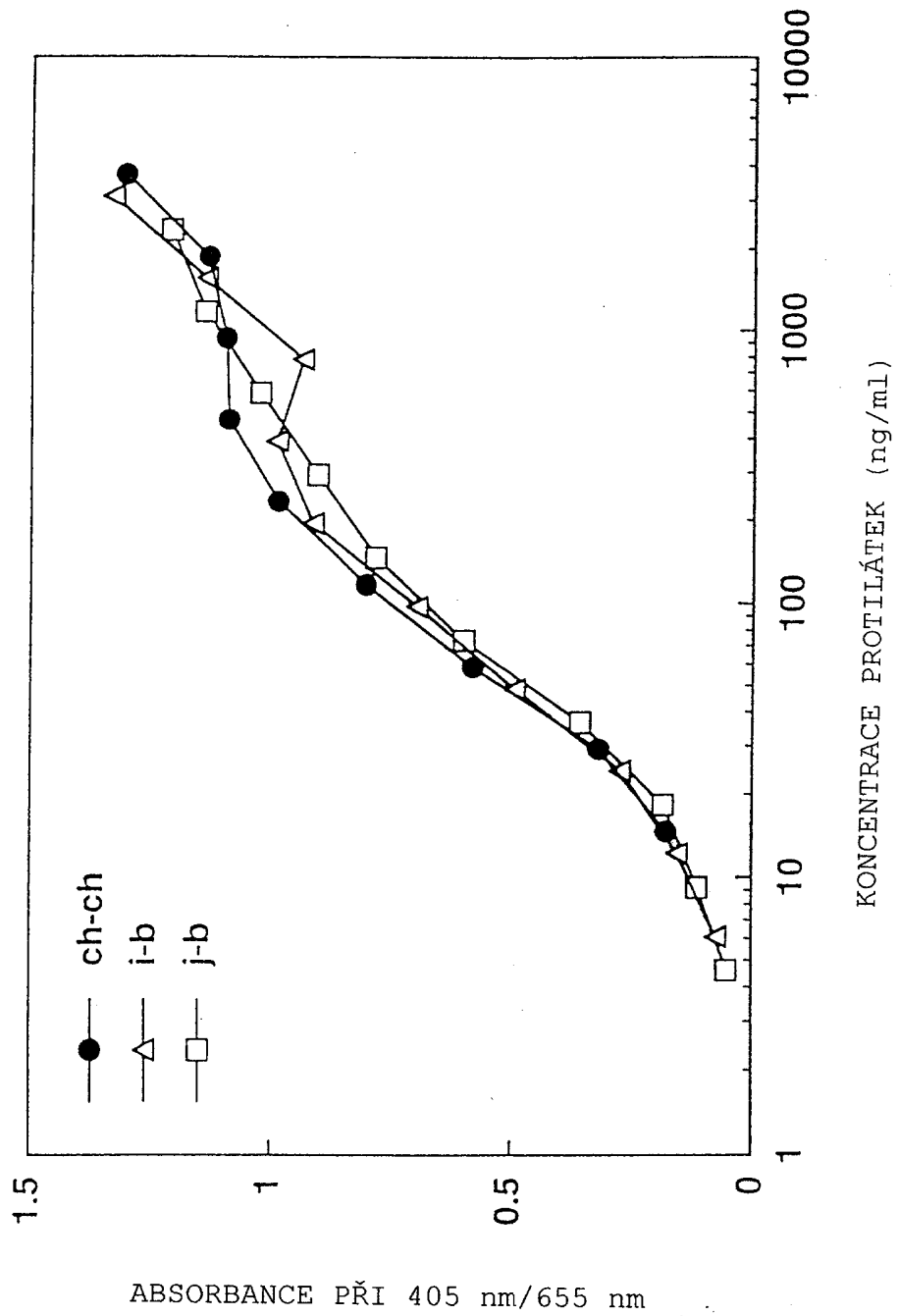
Obr. 20



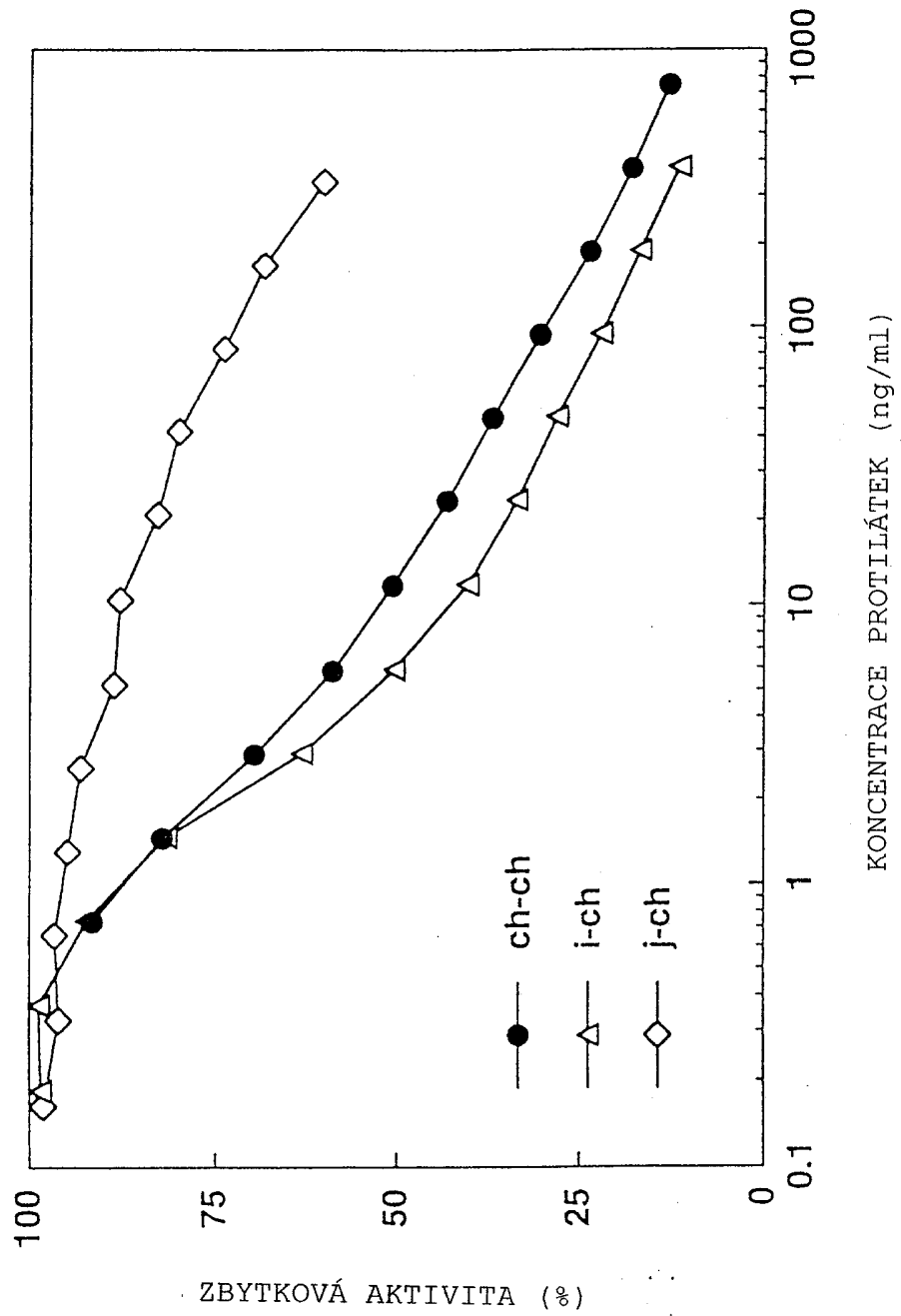
Obr. 21



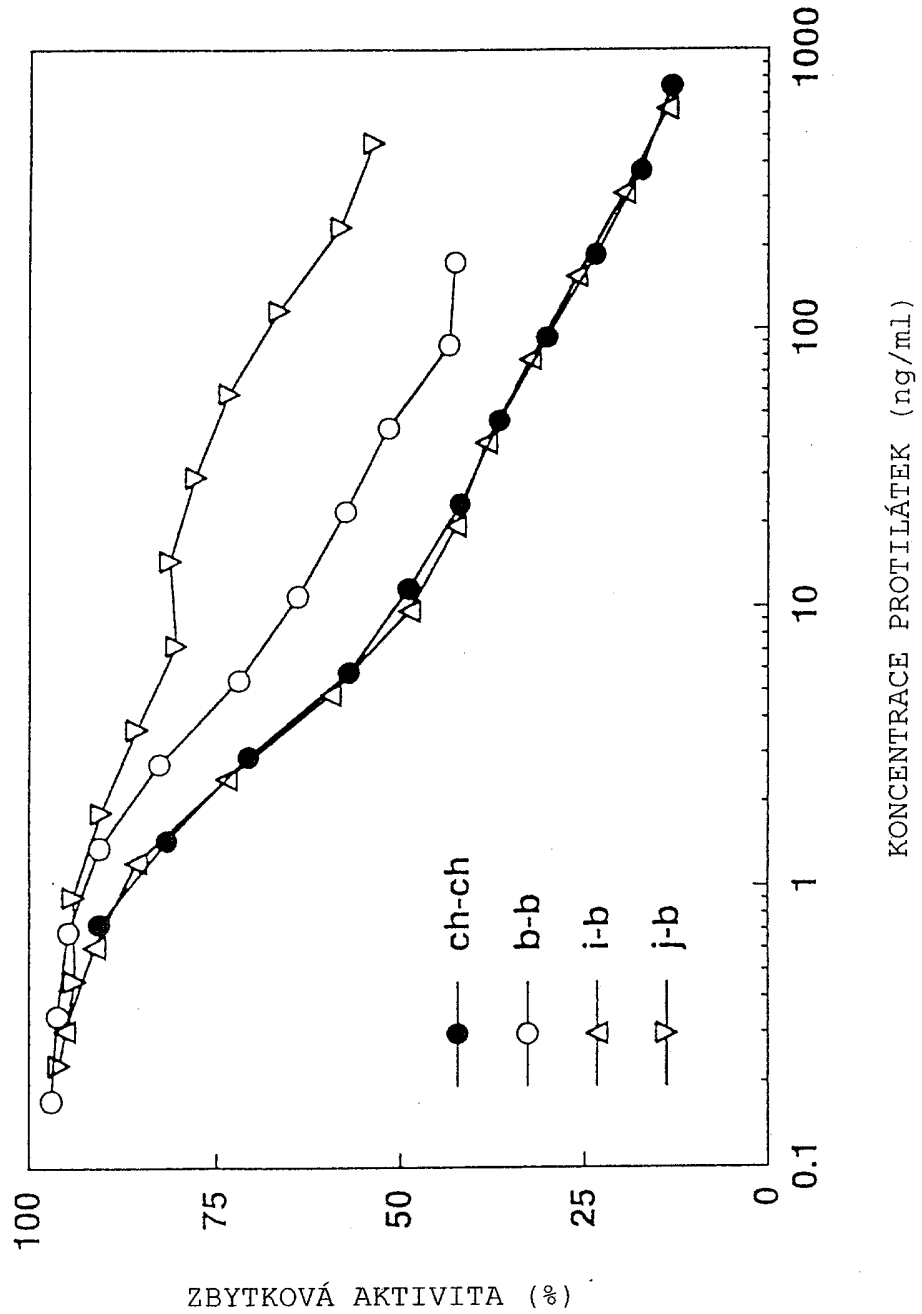
Obr. 22



Obr. 23

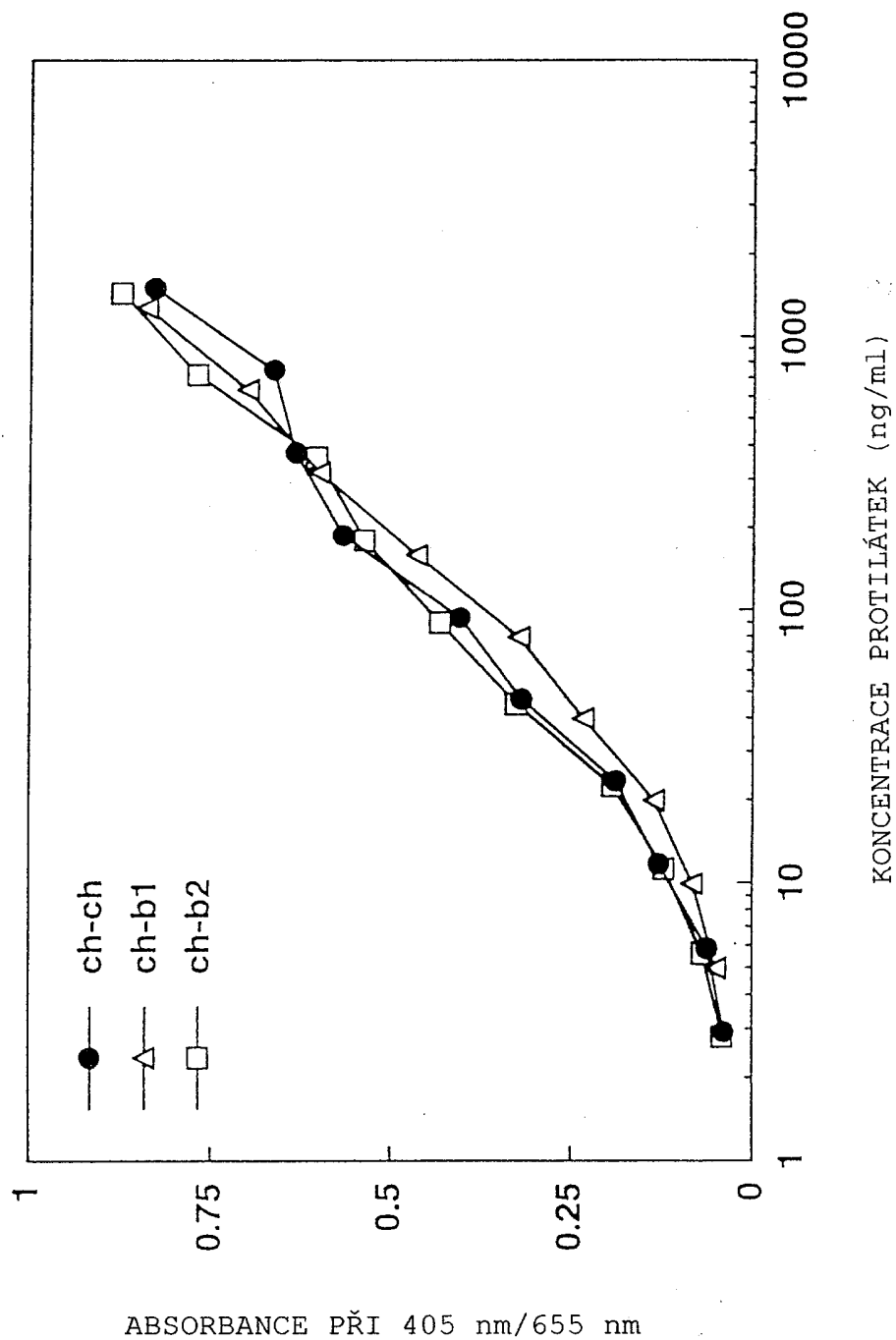


Obr. 24

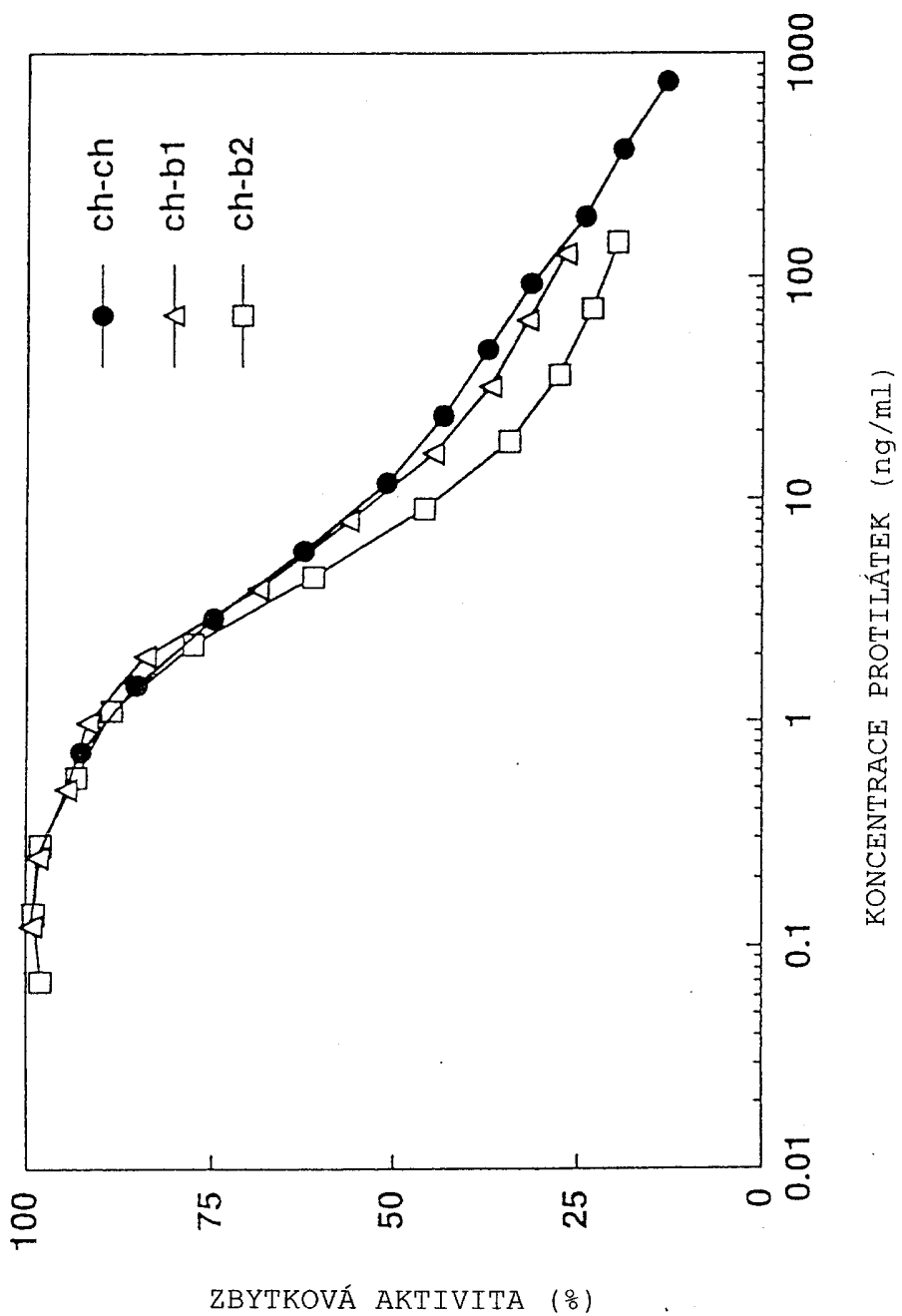




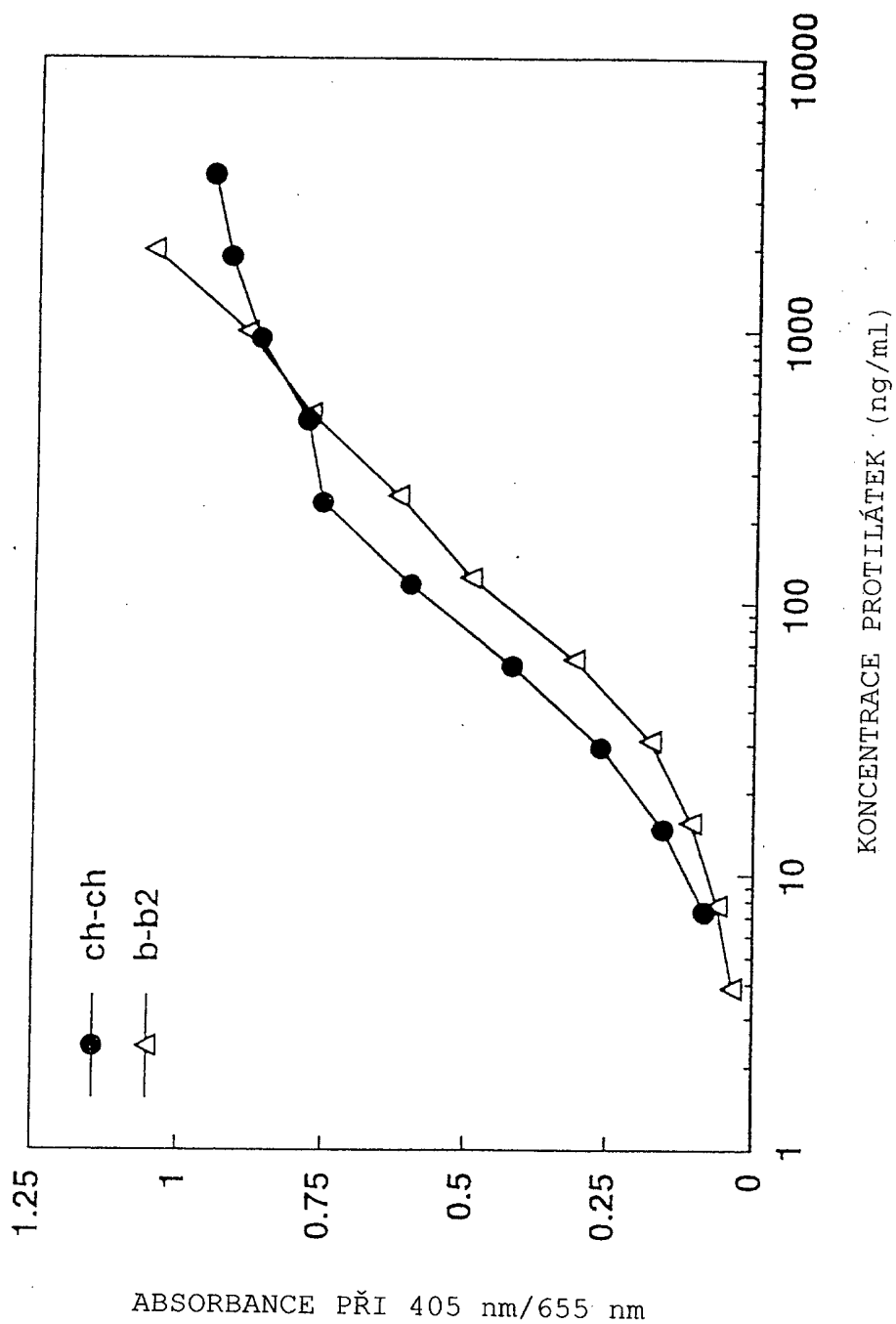
Obr. 25



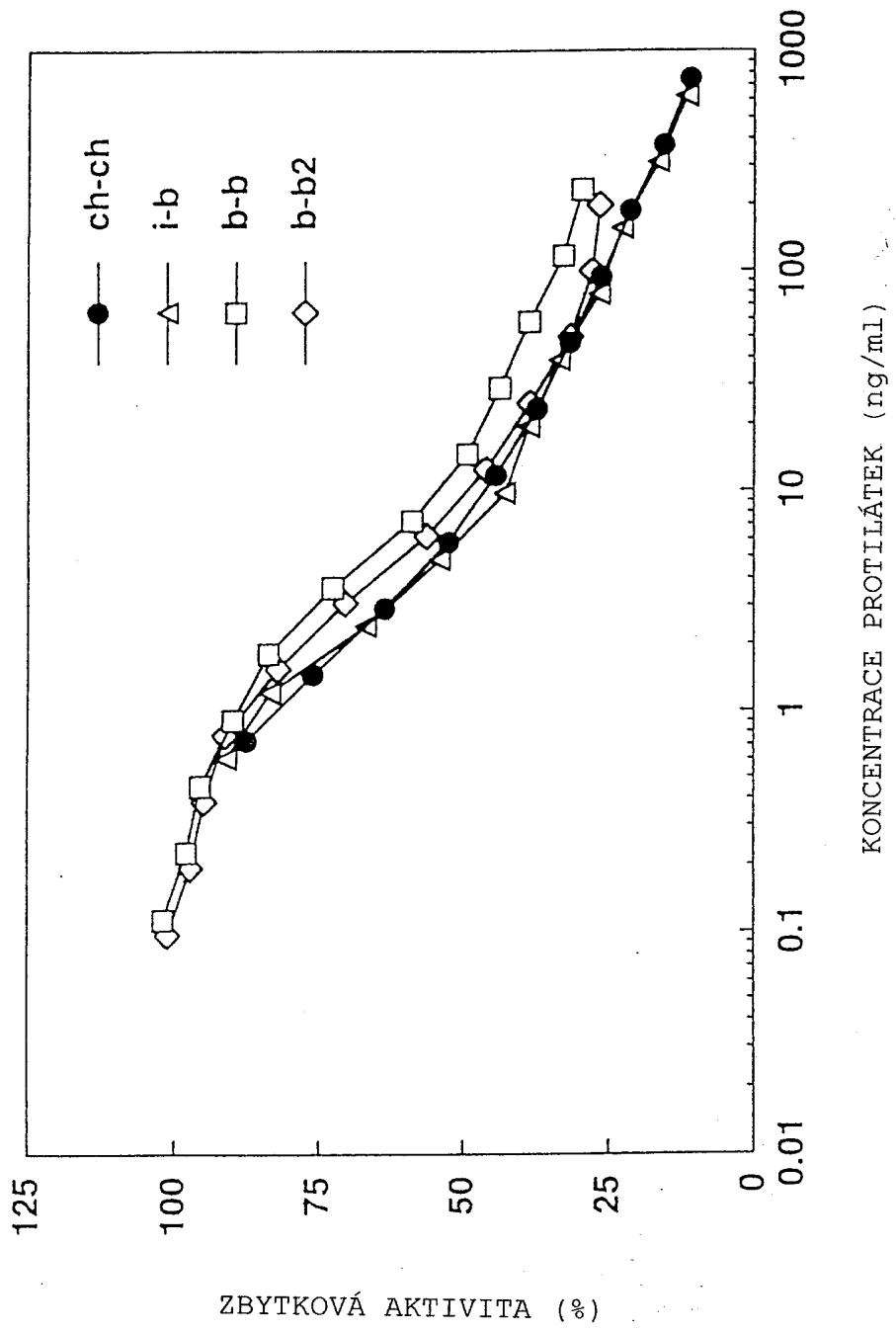
Obr. 26



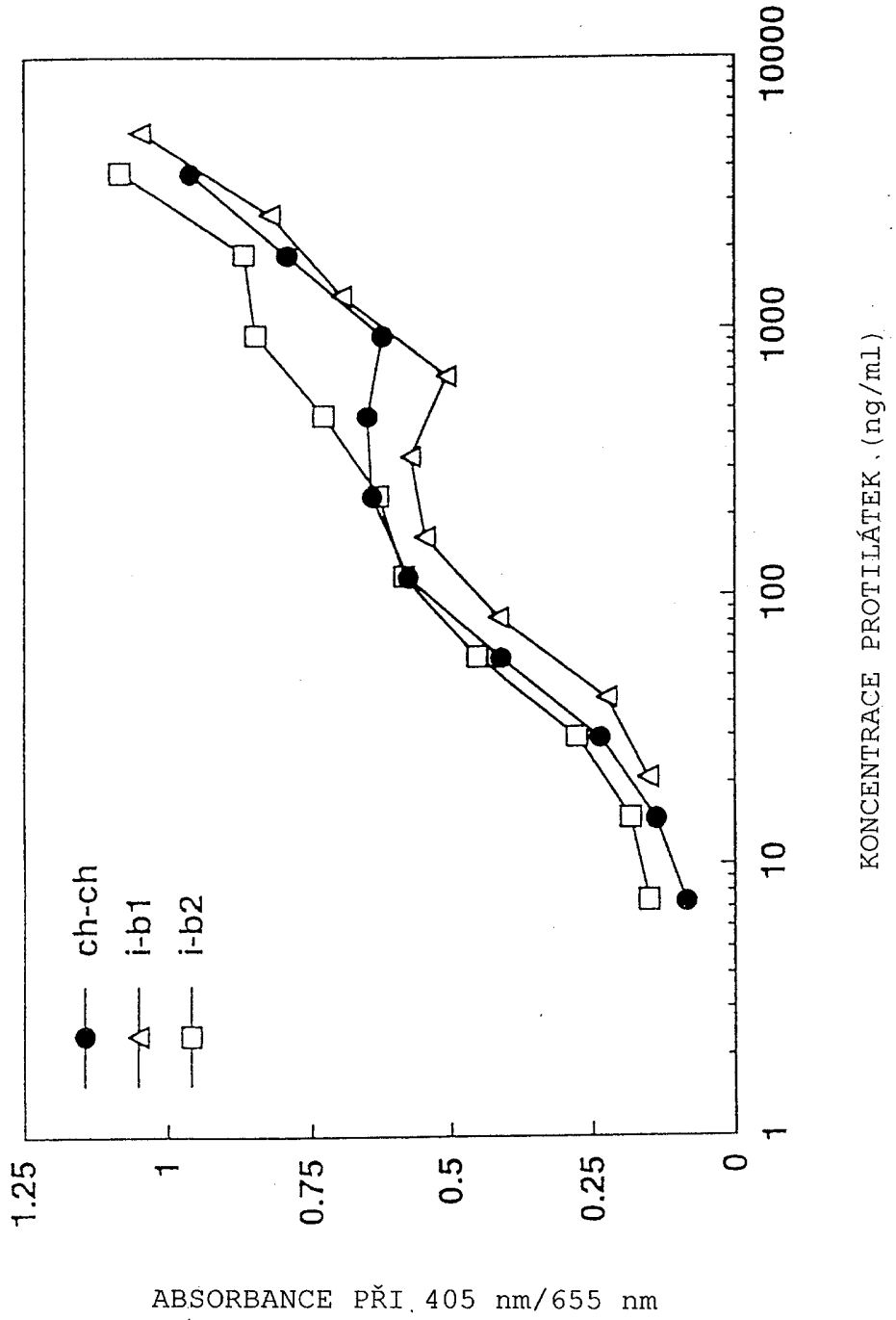
Obr. 27



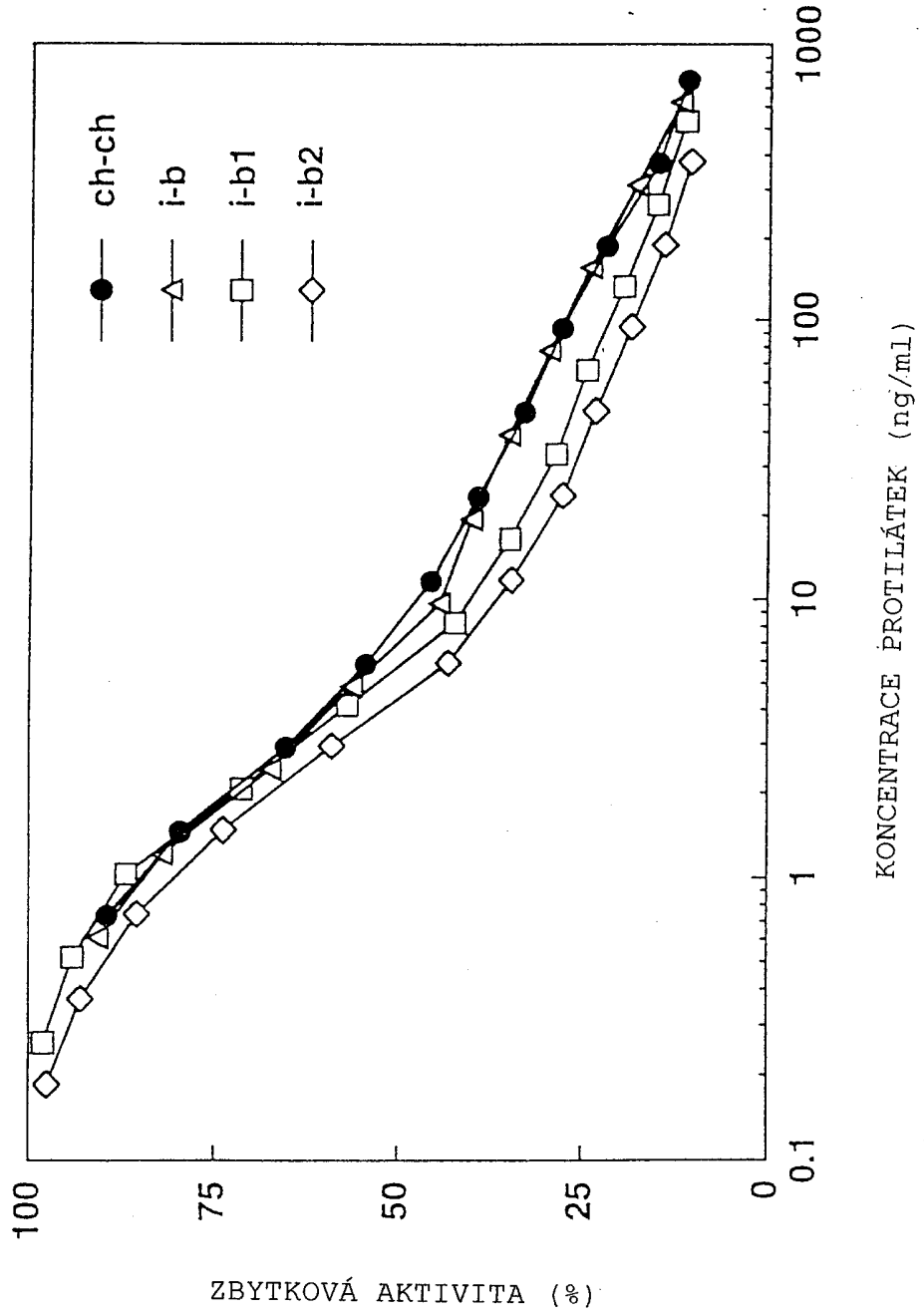
Obr. 28



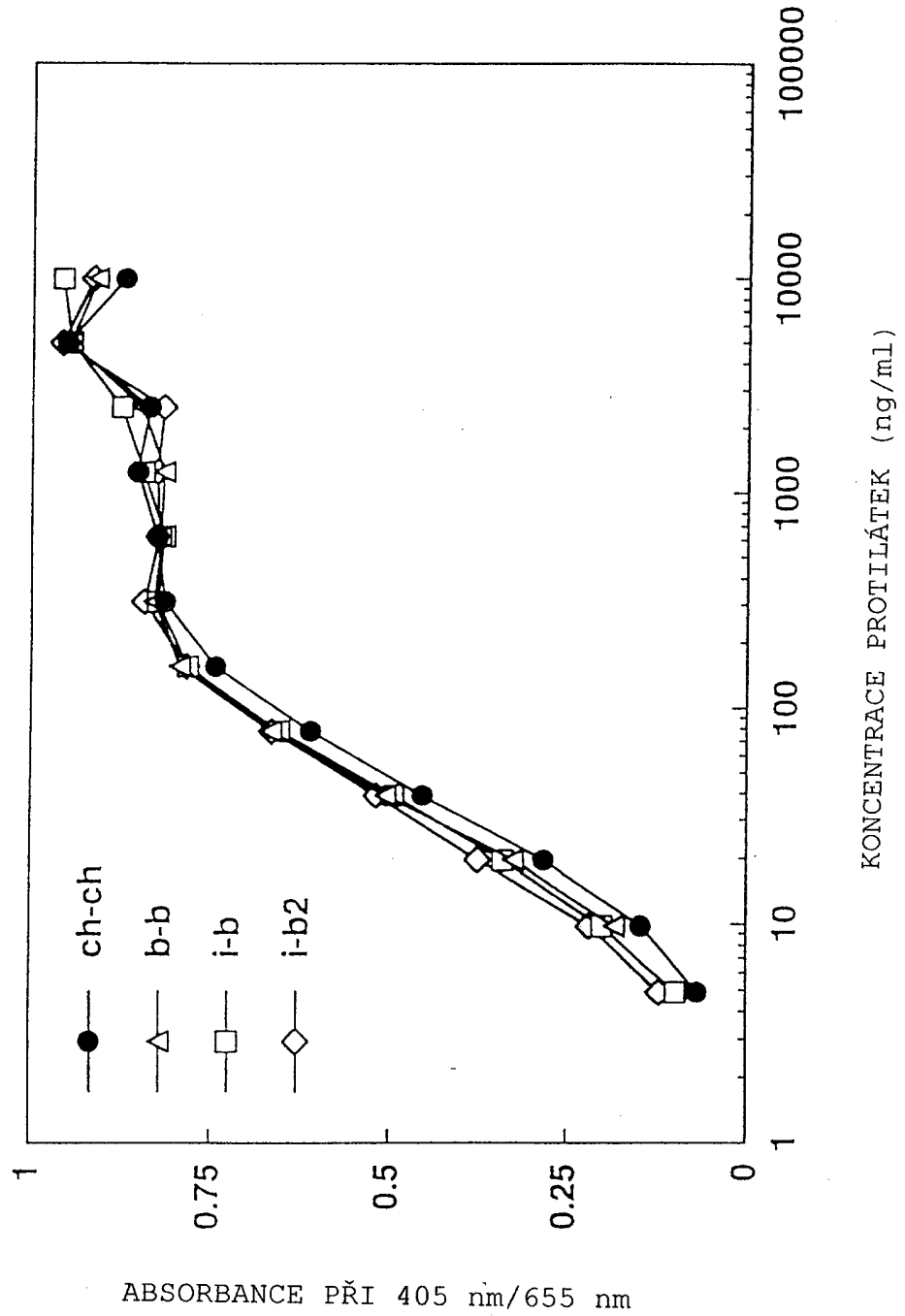
Obr. 29



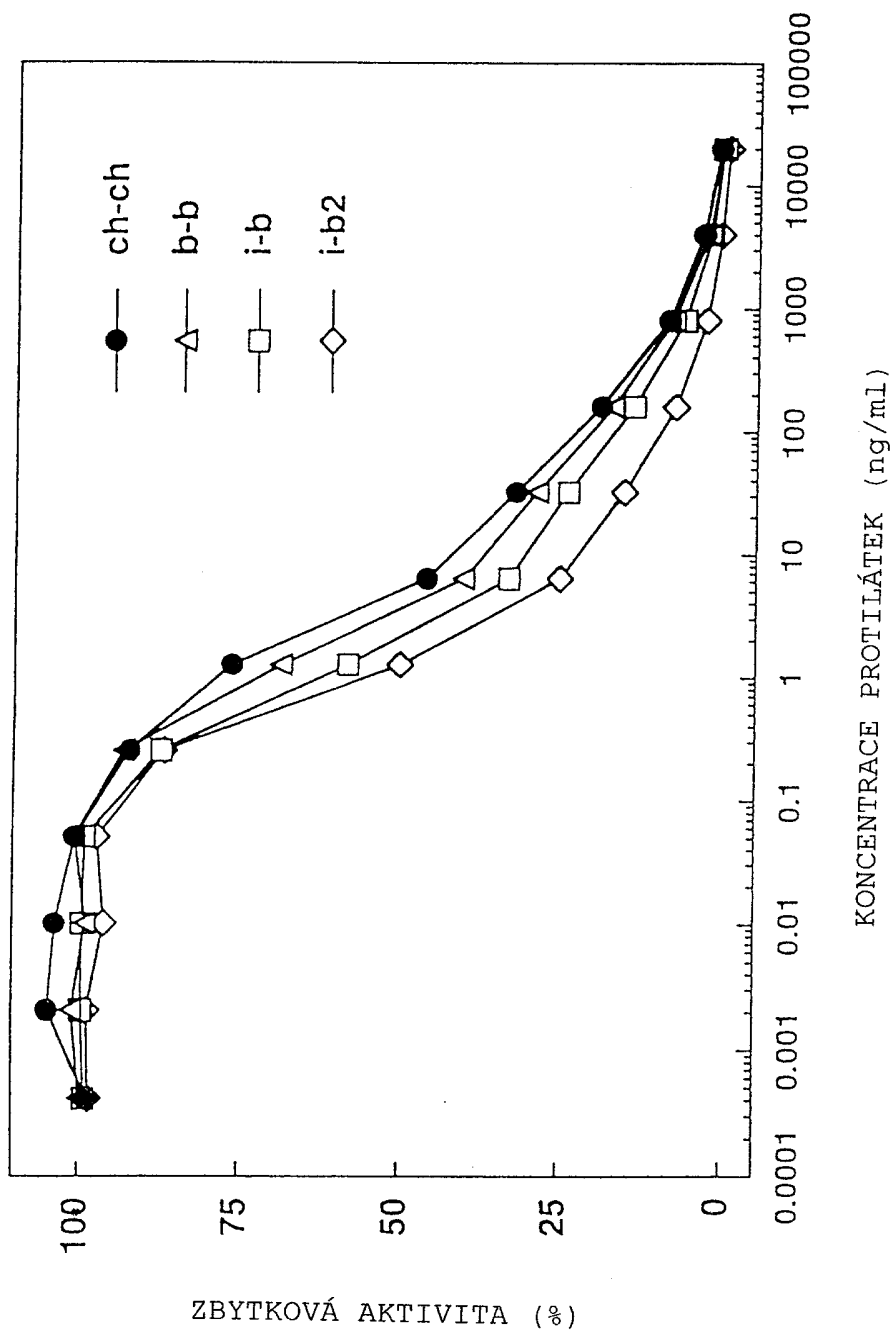
Obr. 30



Obr. 31

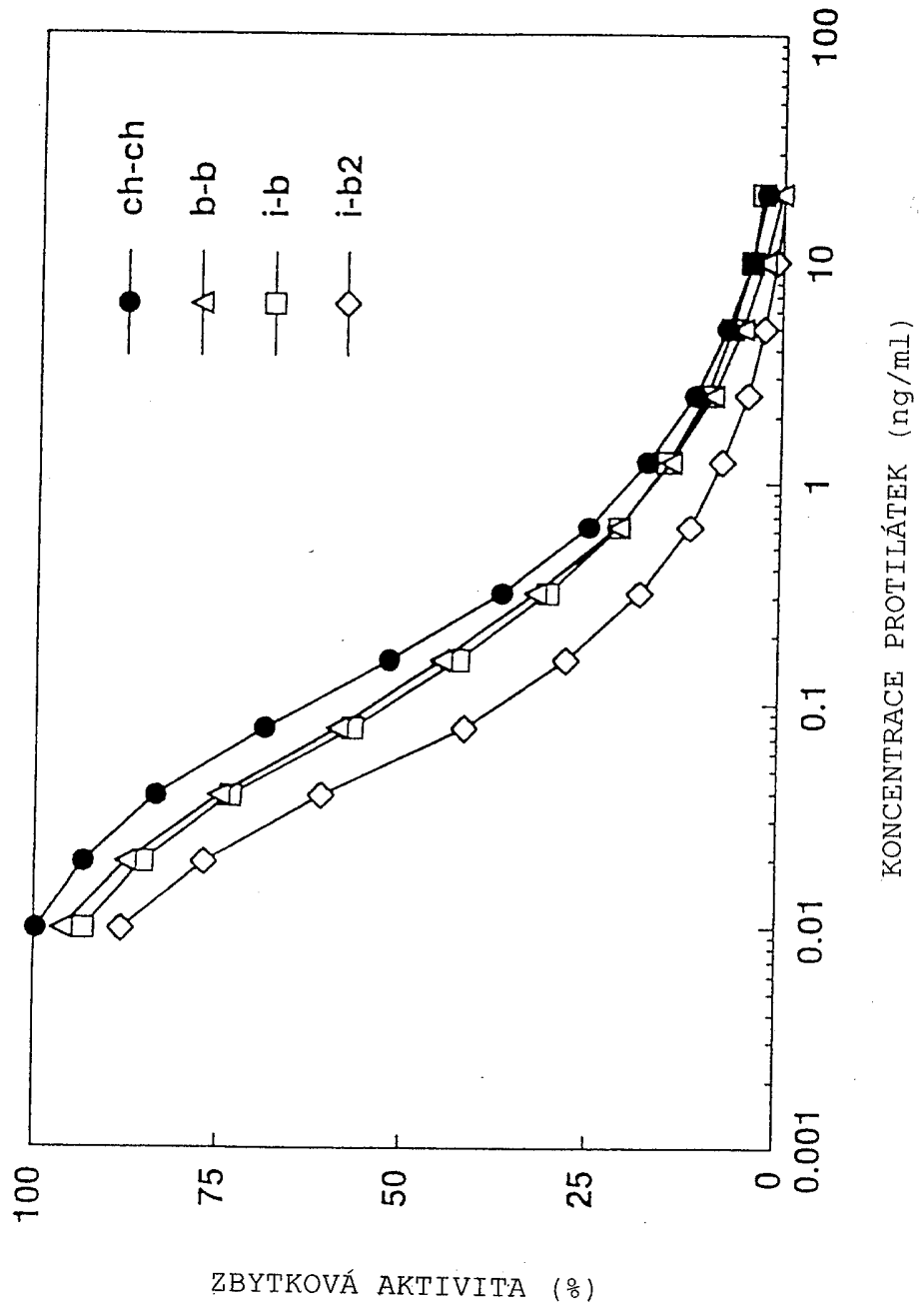


Obr. 32

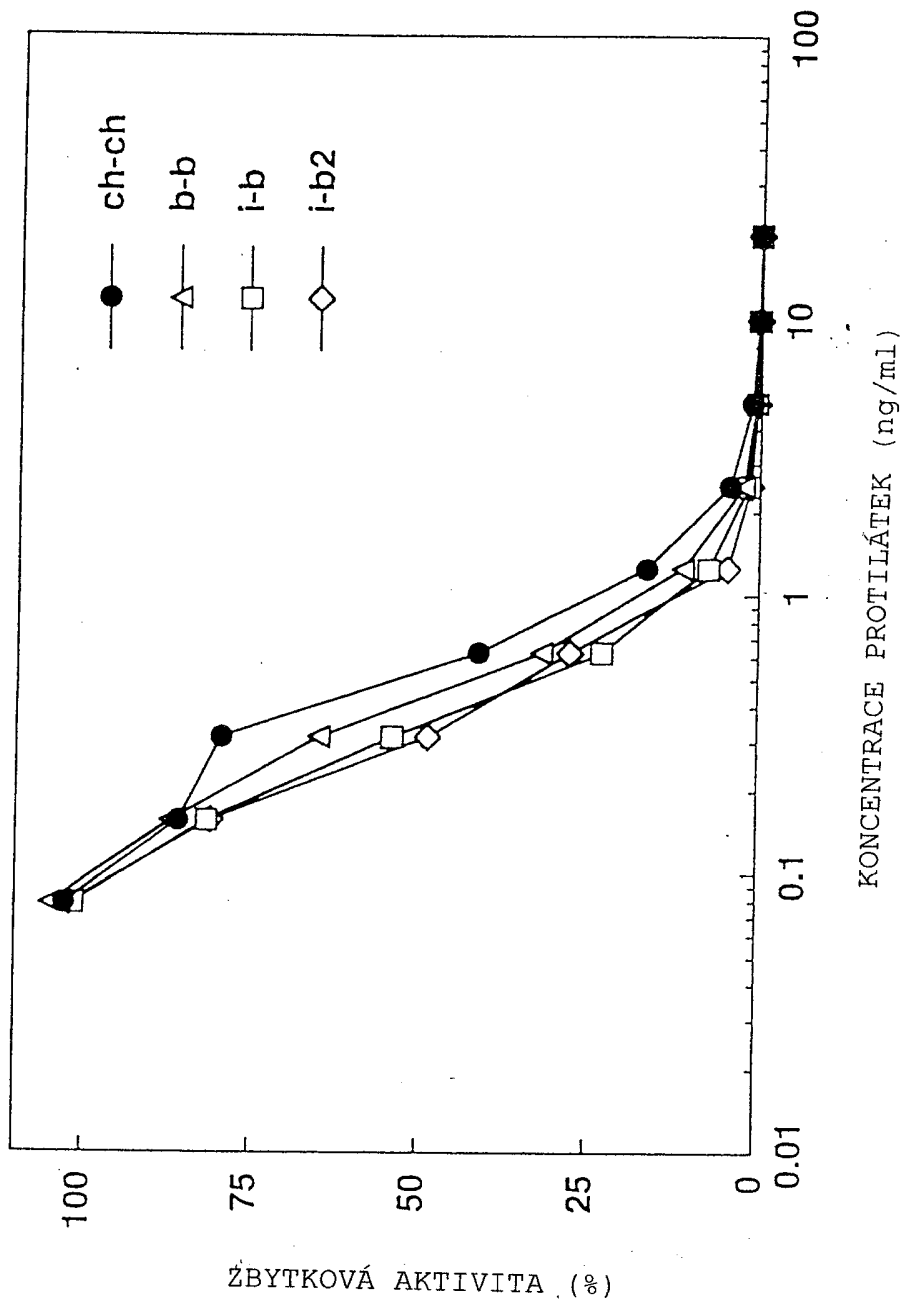




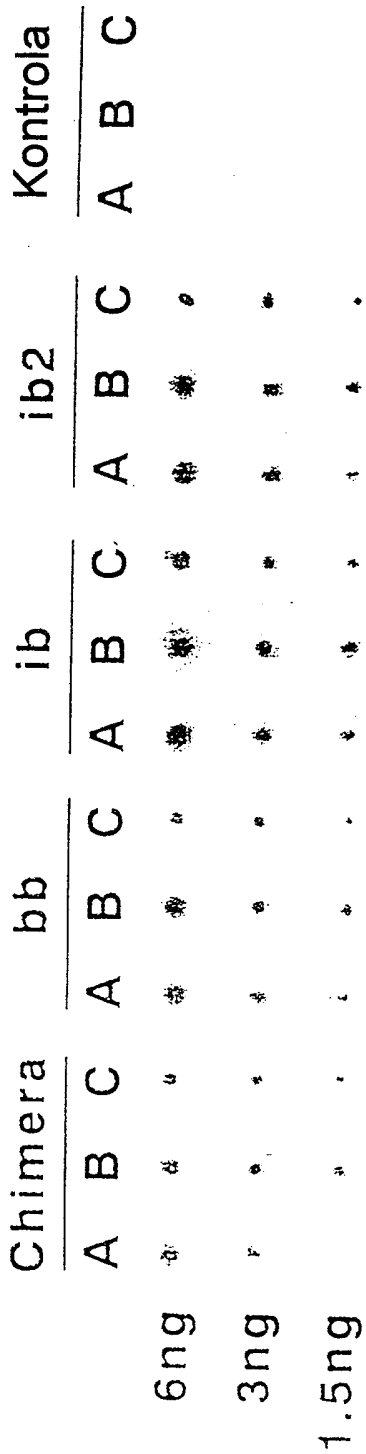
Obr. 33



Obr. 34



Obr. 35



A, NEDENATUROVANÝ TF  
 B, TF DENATUROVANÝ ZA  
 NEREDUKUJÍCÍCH PODMÍNEK  
 C, TF DENATUROVANÝ ZA  
 REDUKUJÍCÍCH PODMÍNEK