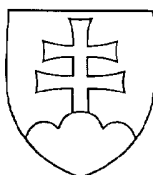


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

- (21) Číslo prihlášky: **2816-92**
(22) Dátum podania: **14.09.92**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **P 41 30 786.0**
(32) Dátum priority: **16.09.91**
(33) Krajina priority: **DE**
(40) Dátum zverejnenia: **08.02.95**
(45) Dátum zverejnenia udelenia vo Vestníku: **10.09.99**
(86) Číslo PCT:

(11) Číslo dokumentu:

280 176

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶

C 07K 14/00
C 12P 21/08
G 01N 33/577
G 01N 33/68
A 61K 39/395

(73) Majiteľ patentu: Symbiotec Gesellschaft zur Forschung und Entwicklung auf dem Gebiet der Biotechnologie mbH, Herborn, DE;

(72) Pôvodca vynálezu: Zepezauer Michael, prof. Dr., Scheidt, DE;
Schönberger Arno, Dr., Hamburg, DE;
Cebeauer Ladislav, Dr., Piešťany, SK;

(54) Názov vynálezu: **Monoklonálne protilátky na výrobu prípravkov na diagnostikovanie a terapiu systémového Lupus erythematoses**

(57) Anotácia:

Monoklonálne protilátky, ktoré rozoznávajú C-koniec-(terminus) H1 so sekvenčným úsekom 187 až 211 a N-koniec H2B so sekvenčnými úsekmi 1 až 35 a 36 až 76, t. j. peptidové sekvencie, ktoré vytvárajú krížové reakcie s autoprotílátkami (antihistónovými protilátkami). Monoklonálne protilátky na výrobu antiidiotypových protilátok so schopnosťou rozpoznať v telesných tekutinách pacientov so SLE autoprotílátky. Stanovenie diagnózy SLE je uskutočniteľné so zvýšenou istotou a monoklonálne protilátky proti autoprotílátkam sú tiež vhodné na výrobu prostriedkov na terapiu SLE.

Oblasť techniky

Vynález sa týka monoklonálnych protilátok s antigénymi alebo imunogénnymi determinantmi, ktoré sú rozpoznávané protilátkami v telesných tekutinách pacientov, ktorí ochoreli na systémový Lupus erythematoses (SLE).

Doterajší stav techniky

Choroby z okruhu „reumatických foriem“ sú charakterizované množstvom klinických prejavov a širokým spektrom autoprotilátok. Tieto protilátky sú namierené proti rôznym súčasťam normálnych buniek. Medzi uvedené ochorenia patrí systémový Lupus erythematoses (SLE), ktorý sa môže vyskytovať spontánne alebo môže byť vyvolaný liekmi. Pri SLE sa obzvlášť vyskytujú protilátky proti súčasťam bunkového jadra (antinuclear antibodies, ANA-s), ku ktorým patrí okrem iných dvojzvitová deoxyribonukleová kyselina (DS-DNA) a histónové bielkoviny (históny), ribonukleová kyselina (RNA), komplexy DNA a histónov a enzýmy. Históny pozostávajú z viacerých druhov proteínov (bielkovín), tzv. core-histónov H2A, H2B, H3 a H4, ktoré je možné nájsť v nukleozómoch, a linker-histónov H1 a H5, ktorým sa pripisujú spojovacie funkcie pri výstavbe chromatinu. Mnohokrát sa skúšalo korelovať početnosť autoprotilátok proti špeciálnym antigénom s určitými obrazmi reumatických ochorení.

Zistilo sa, že pri SLE sa hromadne vyskytujú autoprotilátky proti histónom (AHA-s, antihistónové autoprotilátky). Ako preukazná metóda slúži obvykle „enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA), pri ktorej sa testujú séra pacientov a zdravých porovnávacích osôb proti prečisteným bunkovým časťam (t. j. antigénom). Ako antigény sa pri teste použili pri SLE-sérach medzi inými čisté históny.

Doplnkovo sa ako antigény použili tiež syntetické peptidy alebo peptidy získané odbúraním prírodných histónov, pričom tieto peptidy boli tvorené čiastočnými sekvenciami spomenutých histónov.

Pritom sa ukázalo, že pri použití jednotlivých histónov a histónových peptidov nie je početnosť pozitívnej reakcie pri ELISA teste vyššia ako cca 50 %, a že početnosť pozitívnej reakcie pri sérach pacientov s inými reumatickými ochoreniami je veľká (falošne pozitívne výsledky).

Tak bolo nedávno v jednej štúdií o prediktívnej hodnote identifikácie AHA-s pri pacientoch s SLE (pomocou LE-bunkového testu), Smeenk at al, Scand. J. Rheumatol. Suppl. 56, 78 - 92 (1985) konštatované, že hoci 95 % pacientov so SLE bolo v LE-teste pozitívnych, pravdepodobnosť, že pacient s pozitívnym LE-testom má skutočne SLE, je len 27 %.

Podstata vynálezu

Uvedené nedostatky do značnej miery odstraňujú monoklonálne protilátky na výrobu preparátov na diagnostikovanie a terapiu systémového lupusu, ktorých podstata spočíva v tom, že majú schopnosť pri sekvenciách aminokyselín

1. K P K A A K P K A A K P K A A
K P K K A A P K K K
2. P E P A K S A P A P K K G S K
K A V T K A Q K K D G K K R K
R S E K E
3. S Y S V Y V Y K V L K Q V H P

D T G I S S K A M G I M N S F
V N D I F E R I A G E

rozpoznať tak sekvenciu 1. ako aj sekvenciu 2. alebo tak sekvenciu 1. ako aj sekvenciu 3. Takto sa zlepši prediktívna hodnota diagnostických testov pre SLE, t. j. zvýši sa pomer percent skutočne pozitívnych proti falošne pozitívnym a takisto aj schopnosť vedieť produkovať monoklonálne protilátky s antiidiotypovými protilátkami, ktoré svojou špecificitou presne odpovedajú autoprotilátkam pacientov so SLE. Rovnako existuje ďalšia úloha - produkovať antiidiotypové protilátky (monoklonálne protilátky), ktoré účinkujú proti týmto monoklonálnym protilátkam, prípadne proti autoprotilátkam pacientov so SLE.

Vo výhodnom riešení sú sekvencie aminokyselín modifikované inzerciou a/alebo deléciou, a/alebo substitúciou, pričom ich antigénne alebo imunogénne vlastnosti zostávajú zachované.

V ďalšom výhodnom riešení sú sekvencie aminokyselín modifikované peptidickými väzbami, ako
-CON(CH₃)-, -CH₂-CH₂-, -CO-CH₂-.

V ešte ďalších výhodných riešeniach aminokyselínová sekvencia 1. obsahuje úsek sekvencie 187 - 211 histónu H1 (C-koniec) alebo jeho časti s aspoň jedným antigénnym alebo imunogénnym determinantom (epitopom); aminokyselínová sekvencia 2. obsahuje úsek sekvencie 1 - 35 histónu H2B (N-koniec) alebo jeho časti s aspoň jedným antigénnym alebo imunogénnym determinantom (epitopom) alebo aminokyselínová sekvencia 3. obsahuje úsek sekvencie 36 - 76 histónu H2B alebo jeho časti s aspoň jedným antigénnym alebo imunogénnym determinantom (epitopom).

Testovali sa nasledujúce prírodné a umelé peptidy:

Aminokyseliny boli označené skratkami podľa jednopísmenového kódu (one-letter-code): GLY=G, ALA=A, VAL=V, LEU=L, ILE=I, PHE=F, PRO=P, SER=S, THR=T, CYS=C, MET=M, TRP=W, TYR=Y, ASN=N, GLN=Q, ASP=D, GLU=E, LYS=K, ARG=R, HIS=H.

Histónové H1 peptidy

H1-N-koniec (terminus): 3 - 31

APAAP AAAPP AEKTP VKKKA AKKPA
GA

H1: 55 - 75
R SGVSL AALKK ALAAA GYDVE

H1: 97 - 116
TKGTG ASGSF KLNKK AASGE

H1: 76 - 116
KNNSR IKLGL KSLVS KGTLV ETKGT
GASGS FKLNK KAASG E

H1: 66 - 116
ALAAA GYDVE KNNSR IKLGL KSLVS
KGTLV ETKGT GASGS FKLNK
KAASG E

H1: 55 - 166
R SGVSL AALKK ALAAA GYDVE
KNNSR IKLGL KSLVS KGTLV ETKGT
GASGS FKLNK KAASG E

H1-C-terminus: 187 - 211
 KPKA AKPKA AKPKA AKPKA APKK
 K

Histónové H2B-peptidy

H2B: 1 - 35
 PEPAK SAPAP KKGSK KAVTK
 AQKKD GKRRK RSEKE

H2B: 36 - 76
 SYSVY VYKVL KQVHP DTGIS
 SKAMG IMNSF VNDIF ERLAG E

H2: 77 - 93
 ASRL AHYNK RSTIT SRE

H2B: 94 - 105
 IQ TAVRL LLPGE

H2B: 106 - 113
 LAKHA VSE

H2B: 113 - 125
 GTK AVTKY TSSK

H2B: N-term.1-21
 PEPAK SAPAP KKGSK KAVTK A

H2B: N-term.4-11
 AK SAPAP K

Histónový H2A-peptid
 H2A-N-terminus
 SGRGK QGGKA RAKAK TRSSR AG

Histónové sekvencie:

H2A:
 SGRGK QGGKA RAKAK TRSSR AGLQF
 PVGRV
 HRLLR KGNYA ERVGA GAPVY LAAVL
 EYLTA
 ELLEL AGNAA RDNKK TRIIP RHLQL
 AIRND
 EELNK LLGKV TIAQG GVLPN IQAVL
 LPKKT
 ESHHK AKGK.

Testom ELISA sa mapovali epitopy autoprotilátok zo 122 reumatických a SLE-sér s peptidmi H1, H2B a H2A. 80 % sér so SLE a 68 % všetkých sér reagovalo pozitívne tak proti C-koncu H1 ako aj proti N-koncu H2B. Kombináciu oboch oblastí je týmto možné považovať za markérovú sekvenciu a preto ako rozlišovacie kritérium pre pacientov so SLE. Tak štruktúrne dáta, ako výpočty antigénity a homologické epitopy autoprotilátok, produkovaných in vivo a in vitro, podčiarkujú dominantný antigénny charakter N-konca H2B a C-konca H1.

Pre ELISA test (Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay) sa použili moduly F16 firmy Nunc so špeciálne vysoko aktivovaným povrchom. Podľa usporiadania testu boli na povrch mikrotitračnej doštičky viazané alebo testované protilátky (priamy test ELISA, prípadne sendvičový test) alebo antigén (nepriamy test ELISA). Antigény sa rozpustili v koncentrácii 50 µl/ml v 0,05 M karbonátovom pufrí, pH 9,7. Roztoky protilátok, bunkové suspenzie a vzorky moču sa zriedili v pomere 1 : 3 v rovnakom pufrí a po 100 µl pipetovali na mikrotitračné doštičky. K naviazaniu

došlo za 24 hodín pri 4 °C. Po vyprázdnení jamiek nasledovalo budúci deň zablokovanie reaktívnych skupín mikrotitračnej doštičky pri 36 °C 250 µl roztoku blokátora na 1 jamku. Použili sa rôzne roztoky blokátora: 0,5 % (hmotn./obj.) želatina v PBS/azide, 1 % (hmotn./obj.) BSA v PBS/azide, 5 % (hmotn./obj.) BSA v PBS/azide, 10 % (obj./obj.) konské sérum v PBS/azide. Potom nasledovalo pridanie 100 µl suspenzie bunkovej kultúry (primárne protilátky), prípadne sér zriedených 1 : 250 a jednodňová inkubácia pri izbovej teplote v tme. Po jednorazovom opláchnutí mikrotitračnej doštičky roztokom Tweenu (pozostávajúceho z 0,1 % obj. Tweenu 20 a 150 mM NaCl) sa pripipetovalo 100 µl konjugátu (0, 3 % obj. králičí-anti(myši-IgG) IgG-HRP, prípadne králičí-anti(ludský-IgG)IgG-HRP) a inkubovalo 1 hodinu pri izbovej teplote. Nenaviazané protilátky sa odstránili päťnásobným opláchnutím roztokom Tweenu. Chrenová peroxidáza, naviazaná na králičie, prípadne ovčie protilátky, katalyzovala po pridaní 100 µl McIlvainovho pufru (116 mM dihydrát dihydrogenfosforečnan sodný, 42 mM kyselina citrónová a 1,5 mM ortofenyldiamína 0,9 mM peroxid vodíka) za tmý farebnú reakciu, zastavenú pridaním 100 µl 2 M kyseliny sírovej. Extinkcia v rôznych jamkách bola po kalibrácii proti slepému pokusu stanovená fotometricky pri 490 nm na prístroji Minireader II a vyjadrené boli takto získané hodnoty.

Testom ELISA sa na protilátky testovalo 122 sér so SLE. Testovacie pokusy ELISA ukázali, že N-terminálna oblasť (1 - 35) H2B a C-terminálna oblasť (187 - 211) H1 prednostne predstavovali epitopy protilátok SLE. Práve tak sa ukázalo ako zvlášť výhodné zriedenie 1 : 250 na obsiahnutie širokého spektra sér s vysokým alebo nízkym titrom v ELISA teste. Hlavný zreteľ sa pri tom bral na IgG-autoprotilátky.

Výsledky boli vyhodnotené nasledovne: pacientov ELISA test bol len vtedy pozitívny, ak obidve extinkcie boli väčšie ako 0,2 (cutt off = 0,2 z merania slepeho pokusu a korekčný faktor pri prekročení väčšom ako 0,2) a boli zreteľne vyššie oproti všetkým ostatným peptidom.

Zo 122 sér bolo 68 % pozitívnych vzhľadom na peptidovú kombináciu. Týchto 122 sér sa rozdelilo na 80 SLE-sér a 42 reumatických sér. Z 80 pacientov s lupusom bolo 80 % pozitívnych na H1-CT a E1, zatiaľ čo zo 42 reumatických pacientov bolo ešte 45 % pozitívnych na H1-CT a E1. Preto N-terminálna oblasť H2B (1 - 31) a C-terminálna oblasť H1 (187 - 211) predstavujú hlavne zachytené antigénne determinanty autoprotilátok pacientov s lupusom. Kombinácia oboch týchto peptidov takto môže slúžiť ako rozlišovacie kritérium na klasifikáciu pacientov so SLE proti reumatickým pacientom.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Aby sa podľa tohto vynálezu pripravili monoklonálne protilátky (antihistónové protilátky), účinkujúce proti autoprotilátkam v telesných tekutinách pacientov so SLE, postupovalo sa v tomto vynáleze nasledovne (schéma I):

1. Analýza histónových sekvencií (matem. model).
2. Predpovedanie antigénnych oblastí.
3. Syntéza peptidov zodpovedajúcich antigénnym oblastiam.

Peptidy boli pripravené čiastočne voľné, čiastočne viazané na nosič (TentaGel).

- 4a. Imunizácia zvierat (myši) syntetickými peptidmi, zodpovedajúcimi bodu 3; tieto peptidy sa musia použiť vo forme viazanej na nosič (napr. TentaGely).

4b. Imunizácia buniek sleziny in vitro syntetickými peptidmi, zodpovedajúcimi bodu 3. Tu sa môžu použiť voľné alebo viazané peptidy.

5. Izolácia buniek sleziny a fúzovanie s rakovinovými bunkami na hybridómové bunky, selekcia jednotlivých (pozitívnych) klonov.

6. Izolácia vylučovaných antihistónových protilátok (AHA).

7. Skúšky špecificity a aktivity umelých AHA ELISA metódou so syntetickými peptidmi z bodu 3 ako antigénmi.

Aby sa pripravili antiidiotypové protilátky pre tento vynález, postupovalo sa podľa tohto vynálezu nasledovne (schéma II):

1.1. Výber antigénu:

Antigénom je napr. epitop na autoprotilátkach v sére pacientov so SLE protihistónovým peptidom H1 (187 - 211) a H2B (1 - 35) alebo

1.2. zodpovedajúci epitop na monoklonálnych protilátkach, ktoré boli vyprodukované proti tejto peptid/peptidovej kombinácii.

2. Získanie antigénu/antigénov.

2.1. Frakcia protilátok zo SLE séra je zahustená obvyklými postupmi.

2.2.1. Autoprotilátky, ktoré obsahujú epitopy definované podľa bodu 1, sa zo zahustených protilátkových frakcií selektívne izolujú afinitnochromatografickými postupmi. Na tento účel sú peptidy, definované v bode 1, chemicky alebo adsorpcne naviazané vhodnými postupmi na vhodné nosiče.

Alternatívne je tiež možné tieto peptidy na vhodných materiáloch, napr. TentaGeloch, syntetizovať. Je tiež možné najskôr nasadiť zahustenú frakciu protilátok SLE-séra na kolónu s konjugátom nosič-H1(187 - 211), premyť a protilátky naviazané na konjugát eluovať vhodnou metódou. Táto autoprotilátková frakcia sa potom v druhom kroku vedie cez kolónu s konjugátom nosič-H2B(1 - 35). Sledované protilátky s dvojakou špecificitou (alebo križnou špecificitou) sú potom zadržané a môžu sa po premytí eluovať vhodnými metódami. Poradie afinitných krokov je tiež možné zameniť, teda najskôr nasadiť nosič-H2B (1 - 35) a potom nosič-H1C.

2.2.2. Monoklonálne protilátky, ktoré obsahujú dvojšpecifický epitop, zodpovedajúci bodu 1.2, sú izolované podľa schémy 1 6. a prečistené.

3. Imunizačný postup

3.1. Imunizácia in vivo

Autoprotilátky, získané podľa bodu 2, prípadne monoklonálne protilátky, sú použité obvyklým spôsobom na imunizáciu vhodných pokusných zvierat. Môžu sa použiť voľné alebo naviazané na vhodných nosičoch, napr. TentaGeloch.

3.2. Imunizácia in vitro

Autoprotilátky, získané podľa bodu 2, sa môžu použiť na imunizáciu buniek sleziny vhodných pokusných zvierat in vitro podľa známych postupov.

4. Izolácia buniek sleziny, ktoré produkujú protilátky a ich fúzia s vhodnými rakovinovými bunkami za vzniku hybridómových buniek.

5. Selekcia a vypestovanie jednotlivých klonov.

6. Izolácia a čistenie monoklonálnych antiidiotypových protilátok.

Je tiež možné izolovať namiesto bodu 3 B-lymfocyty z krvi pacientov so SLE (alebo zvierat s autoimunitnou chorobou), fúzovať ich s nádorovými bunkami a zo získaných hybridómových buniek izolovať tie klony, ktoré majú špecificitu definovanú v bode 1. Identifikácia týchto klonov sa

robí obvyklými testami, napr. technikou ELISA, s použitím podľa tohto patentu vhodnej kombinácie peptid/peptid.

Je jasné, že určenie koncentrácie autoprotilátok (antihistónových protilátok) pacientov so SLE nie je ohraničené len na techniku ELISA.

Koncentrácia AHA môže byť stanovená tiež technikou RIA (Radio-immuno-assay) s použitím rádioaktívne značených N-terminálnych peptidov z H1 alebo fluorescenčným inuostanovením s použitím fluorescenčne značených N-terminálnych peptidov z H2B a C-terminálnych peptidov z H1. Odborníkovi je zrejmé, že dôkazy a stanovenie koncentrácie AHA je možné uskutočniť nielen v sérach, ale aj v ďalších telesných tekutinách a súčastiach, napr. v moči.

Podľa tohto vynálezu sa ukazuje, že antigénne determinanty histónov H1 a H2 môžu byť charakterizované tak umelo pripravenými monoklonálnymi protilátkami, ako aj ľudskými patogénnymi autoprotilátkami. Aby sa zlepšila antigenita veľmi konzervatívnych a slabogénnych histónov, naviazali sa prečistené triedy histónov, prípadne vybrané syntetické peptidy, na rozličné nosiče.

Z in vivo imunizácie histónovým komplexom, ktorý bol zosieťovaný glutaraldehydom, vznikla IgM-protilátka (1/A8/B1) proti konformačnému antigénu. In vivo imunizácia pomocou histónu H1, naviazaného na Eupergit C, poskytla tri ďalšie monoklonálne IgM-protilátky 1/H4/C3 (IgG2a), 1/H4/C6 (IgG2a) a 1/H4/C10 (IgG2a), všetky s kappa-špecificitou ľahkého reťazca. Epitop týchto troch monoklonálnych protilátok ležal na C-konci H1 (187-211). Križová reakcia protilátok s T-koncom H2B (22-35) má ukázať sekvenčnú a nábojovú homológiu obidvoch terminálnych histónových oblastí. Na in vivo imunizáciu sa použili dva N-terminálne peptidy z H2B, naviazané na Eupergit.

Ako antigény boli použité voľné históny, voľné peptidy a peptidy naviazané na nosiči. In vitro imunizácia poskytla jednu IgG2a-protilátku s reťazcom kappa, ktorej epitopom je tiež C-koniec od H1.

Podľa tohto vynálezu sa mohli TentaGely úspešne použiť ako nový syntetický nosič na in vitro imunizáciu. TentaGely predstavujú novú triedu naočkovaných kopolymérnych častíc, ktorých polystyrénové jadro je obklopené „kefkovitým“ lemom z polyoxyetylénu. Tieto nosiče sa môžu použiť v jednokrokovom postupe ihneď po peptidovej syntéze na in vitro imunizáciu. TentaGely sa vyznačujú veľmi dobrou biokompatibilitou, chemickou inertnosťou, zlepšenou hydrofilnosťou a nie na poslednom mieste optimálnou expozíciou uniformných hapténových štruktúr na kontakt s imunokompetentnými bunkami.

Priemyselná využiteľnosť

Získané monoklonálne protilátky sa použili jednak v rôznych imunologických testovacích systémoch, ako je imunodifúzia, hemoaglutinácia, Dot Blot a rôzne varianty ELISA, jednak po naviazaní s fluoreskujúcim izotokyánatom (FITC) a chrenovou peroxidázou (HRP) v prietokovej cytometrii a Western blottingu.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Monoklonálne protilátky na výrobu prípravkov na diagnostikovanie a terapiu systémového Lupus erythematoses SLE so schopnosťou pri sekvenciách aminokyselín

1. KPKAA KPKAA KPKAA KPKKA APKKK
2. PEPAA SAPAA KKGSK KAVTK

AQKKD GKKRK RSEKE
3. SYSVY VYKVL KQVHP DTGIS
SKAMG IMNSF VNDIF ERIAGE

rozpoznať tak sekvenciu 1. ako aj sekvenciu 2. alebo tak sekvenciu 1. ako aj sekvenciu 3.

2. Monoklonálne protilátky podľa nároku 1 na výrobu antiidiotypových protilátok so schopnosťou rozpoznať v telových tekutinách pacientov so SLE autoprotiľátky.

3. Monoklonálne protilátky podľa nároku 1 na výrobu antiidiotypových protilátok na diagnostikovanie a/alebo terapiu SLE.

4. Monoklonálne protilátky podľa nároku 1 na výrobu antiidiotypových protilátok na elúciu alebo určenie koncentrácie autoprotiľátok pacientov so SLE.

5. Monoklonálne protilátky podľa nároku 1, **v y z n a ě u j ú c e s a t ý m**, že sekvencie aminokyselín sú modifikované inzerciou a/alebo deléciou a/alebo substitúciou, pričom ich antigénne alebo imunogénne vlastnosti zostávajú zachované.

6. Monoklonálne protilátky podľa nároku 5, **v y z n a ě u j ú c e s a t ý m**, že sekvencie aminokyselín sú modifikované peptidickými väzbami, ako -CON(CH₃)-, -CH₂-CH₂-, -CO-Cl₂-.

7. Monoklonálne protilátky podľa nároku 1, **v y z n a ě u j ú c e s a t ý m**, že aminokyselinová sekvencia 1. obsahuje úsek sekvencie 187 - 211 histónu H1 (C-koniec) alebo jeho časti s aspoň jedným antigénnym alebo imunogénnym determinantom (epitopom).

8. Monoklonálne protilátky podľa nároku 1, **v y z n a ě u j ú c e s a t ý m**, že aminokyselinová sekvencia 2. obsahuje úsek sekvencie 1-35 histónu H2B (N-koniec) alebo jeho časti s aspoň jedným antigénnym alebo imunogénnym determinantom (epitopom).

9. Monoklonálne protilátky podľa nároku 1, **v y z n a ě u j ú c e s a t ý m**, že aminokyselinová sekvencia 3. obsahuje úsek sekvencie 36 - 76 histónu H2B alebo jeho časti s aspoň jedným antigénnym alebo imunogénnym determinantom (epitopom).

Koniec dokumentu
