

# PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

**295 428**

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLového  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1997-2599**  
(22) Přihlášeno: **25.01.1996**  
(30) Právo přednosti: **24.02.1995 US 1995/394176**  
(40) Zveřejněno: **13.05.1998**  
(Věstník č. 05/1998)  
(47) Uděleno: **06.06.05**  
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **17.08.2005**  
(Věstník č. 8/2005)  
(86) PCT číslo: **PCT/US1996/001056**  
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1996/025953**

(13) Druh dokumentu: **B6**  
(51) Int. Cl. 7

**A 61 K 48/00**  
**C 12 N 5/00**  
**C 07 K 14/705**  
**C 12 N 15/12**

(73) Majitel patentu:

THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION, Boston,  
MA, US

(72) Původce:

Seed Brian, Boston, MA, US  
Romeo Charles, Belmont, MA, US  
Kolanus Waldemar, München, DE

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1273, Praha 4,  
14021

(54) Název vynálezu:

**Terapeutická buňka pro přesměrování buněčné  
imunity receptorovými chimérami**

(57) Anotace:

Terapeutická buňka pro řízení buněčné odpovědi v buňce savců exprimující nejméně dva chimérní receptory spouštějící specifické rozpoznávání a destrukci virové částice, buňky infikované virovou částicí, nádorové nebo rakovinné buňky nebo autoimunitou generované buňky. Jeden z exprimovaných chimérních receptorů obsahuje extracelulární doménu schopnou specifického rozpoznávání a navázání se na cílovou buňku nebo cílovou infekční částici, a intracelulární nebo transmembránovou doménu, schopnou dát signál terapeutické buňce ke zničení cílové buňky navázané na receptor nebo infekční částice navázané na receptor; a druhý chimérní receptor obsahuje extracelulární doménu schopnou specifického rozpoznávání a navázání se na cílovou buňku nebo cílovou infekční částici a intracelulární doménu odvozenou od CD28.

**CZ 295428 B6**

## **Terapeutická buňka pro přesměrování buněčné imunity receptorovými chimérami**

### Oblast techniky

5

Vynález se zabývá funkčními chimérami receptorů T-lymfocytů, Fc-receptorů nebo receptorů B-lymfocytů, schopných přesměrování funkce imunitního systému. Podrobně se zabývá regulací lymfocytů, makrofágů, přirozených zabíječů nebo granulocytů exprimovaných chimérami zmíněných buněk, které vyvolávají v buňkách odpovědi na cílové podněty rozpoznané chimérami.

10 Vynález se také zabývá funkčními chimérami receptorů T-lymfocytů, Fc-receptorů nebo receptorů B-lymfocytů, schopnými řízení terapeutických buněk ke specifickému rozpoznávání a ničení buněk, infikovaných specifickými infekčními částicemi, samotných infekčních částic, nádorových buněk nebo autoimunitou generovaných buněk. Podrobně se vynález vztahuje k expresi chimér receptoru T-lymfocytů, Fc-receptorů nebo receptorů B-lymfocytů, schopných

15 směrování cytotoxických T-lymfocytů ke specifickému rozpoznávání a lýzy buněk, produkujících obálkové proteiny HIV. Vynález proto umožňuje terapii proti chorobám jako AIDS (syndrom získané ztráty imunity), které jsou způsobeny virem HIV."

### 20 Dosavadní stav techniky

Rozpoznání antigenu T-lymfocytem prostřednictvím receptoru T-lymfocytu je základem širokých imunologických jevů. T-lymfocyt řídí tzv. imunitu zprostředkovanou buňkami. To zahrnuje destrukci cizích tkání nebo infikovaných buněk buňkami imunitního systému. Existuje mnoho

25 druhů T-lymfocytů, včetně „pomocných“ a „supresorových“ lymfocytů, které modulují buněčnou odpověď, a cytotoxických („zabíječských“) buněk, které mohou abnormální buňku zničit přímo.

T-lymfocyt, který rozpoznává a váže se na unikátní antigen umístěný na povrchu jiné buňky, se aktivuje, může se množit, a když se jedná o cytotoxický lymfocyt, může navázanou buňku zabít.

30

Autoimunitní choroba je charakterizovaná produkcí buď protilátek, které reagují s hostitelskou tkání, nebo imunitním efektem T-lymfocytů, které jsou autoreaktivní. V některých případech mohou autoprottilátky vzniknout normální odpovědí T-lymfocytů a B-lymfocytů aktivovaných

35 cizí látkou nebo organizmy obsahujícími antigeny, které křížově reagují s podobnými látkami ve vlastní tkáni. Příklady klinicky relevantních autoprottilátek jsou protilátky proti acetylcholinovým receptorům při myasthenia gravis; a protilátky proti DNA, proti erytrocytům a proti krevním destičkám při systemické lupus erythematosus.

40 HIV a imunopatogeneze. V roce 1984 bylo zjištěno, že HIV je etiologická částice AIDS. Od té doby se definice AIDS mnohokrát změnila v závislosti na výběru kritérií zařazených do diagnózy. Avšak, na rozdíl od fluktuace diagnostických parametrů, jednoduchým společným jmenovatelem AIDS je infekce HIV a následné vyvinutí perzistentních konstitucionálních symptomů a AIDS-definujících chorob jako sekundární infekce, neoplazma a neurologické choroby (Harrison's

45 Principles of Internal Medicine, 12. vydání, McGraw Hill (1991)).

HIV je lidský retrovirus ze skupiny lentivirů. Čtyři známé lidské retroviry se dělí na dvě skupiny: lidské T-lymfotropní (nebo leukemické) retroviry, HTLV-1 a HTLV-2, a viry lidské imunodeficiency HIV-1 a HIV-2. První dva jsou transformní viry, druhé dva cytopatické viry. HIV-1

50 byl identifikován jako nejčastější příčina AIDS ve světě. Sekvenční homologie mezi HIV-2 a HIV-1 je 40 %, HIV-2 se více blíží některým členům skupiny virů opicí imunodeficiency (SIV) (Curran et al., Science 329, 1357–1359 (1985); Weist et al., Nature 324, 572–575 (1986)).

HIV obsahuje obvyklé retrovirální geny (env, gag a pol) a šest dalších genů se účastní replikace a dalších biologických aktivit viru. Jak bylo dříve uvedeno, obecný jmenovatel AIDS je silní

55

imunosuprese, převážně imunity zprostředkované buňkami. Tato imunodeficience vede k řadě oportunitních chorob, zejména určitých infekcí a neoplazmy.

5 Jako hlavní příčina imunitního defektu při AIDS byl identifikován kvantitativní a kvalitativní nedostatek v subpopulaci od thymu odvozených T-lymfocytů, T-4 populace. Tato skupina lymfocytů je definována fenotypově přítomností CD4 povrchové molekuly, která se ukázala být buněčným receptorem pro HIV (Dalglish et al., *Nature* 312, 763 (1984)). Ačkoliv T-4-lymfocyt je hlavním typem buněk infikovaných HIV, v podstatě jakákoliv lidská buňka exprimující na svém povrchu CD4 molekuly je schopna navázat a infikovat se virem HIV.

10 Běžně jsou CD4+ T-lymfocyty v roli pomocných indukujících buněk, s funkcí poskytnout aktivizační signál pro B-lymfocyty nebo indukovat přeměnu T-lymfocytů nesoucích reciproční CD8 marker na cytotoxické supresorové buňky (Reinherz a Schlossman, *Cell* 19, 821–827 (1980); Goldstein et al., *Imunol Rev.* 68, 5–42 (1982)).

15 HIV se váže specificky a s vysokou afinitou, prostřednictvím protažení aminokyselin virové obálky (gp 120) k doméně V1-oblasti CD4 molekuly umístěné blízko N-konce. Po navázání virus fúzuje s cílovou buněčnou membránou a je internalizován. Po internalizaci použije virus enzym reverzní transkriptázu pro transkripci své genomové RNA na DNA, která je integrovaná do buněčné DNA, kde přetrvává po dobu života buňky jako „provirus“.

20 Provirus může zůstat latentní, nebo být aktivován k transkripci mRNA a genomové RNA, následně proteosyntéze, složení a vzniku nového virionu a vypuzení viru z povrchu buňky. Ačkoliv není dosud znám přesný mechanismus indukce buněčné smrti virem, jako hlavní mechanismus se předpokládá masivní uvolňování z buněčného povrchu, vedoucí k porušení plazmové membrány a výsledné osmotické nerovnováze.

25 Během průběhu infekce si hostitelský organizmus vytváří protilátky proti virovým proteinům, včetně hlavních obálkových glykoproteinů gp 120 a gp 41. Navzdory humorální imunitě choroba postupuje a výsledkem je letální imunodeficience, charakterizovaná četnými oportunními infekcemi, parazitárními, demencí a smrtí. Nezdary hostitelských protivirových protilátek v zabránění progresu choroby je jedním z nejvíce tíživých a alarmujících aspektů infekce a předpověď pro vakcinační snahy založené na konvenčních přístupech není dobrá.

35 Dva faktory mohou hrát roli při účinnosti humorální odpovědi na viry imunodeficiency. Za prvé, jako ostatní RNA viry (a zejména retroviry), viry imunodeficiency vykazují vysokou rychlost mutace jako odpověď na hostitelský imunitní dozor, za druhé, obálkové glykoproteiny samy o sobě jsou bohatě glykosylované molekuly mající málo epitopů vhodných pro navázání vysoce afinitních protilátek. Špatný antigenový cíl, představovaný virovou obálkou, umožňuje hostiteli malou možnost pro restrikci virové infekce produkcí specifických protilátek.

40 Buňky infikované virem HIV exprimují na svém povrchu glykoprotein gp 120. Gp 120 zprostředkovává fúzi mezi CD4+ buňkami prostřednictvím reakce podobné té, kterou virus napadá neinfikované buňky, vedoucí k vytvoření krátkodobých multinukleových obřích buněk. Vytváření syncytia je závislé na přímé interakci gp 120 obálkového glykoproteinu s proteinem CD4 (Dalglish et al., viz výše; Klatzman et al., *Nature* 312, 763 (1984); McDougal et al., *Science* 231, 382 (1986); Sodrovski et al., *Nature* 332, 470 (1986); Lifson et al., *Nature* 323, 725 (1986); Sodroski et al., *Nature* 321, 412 (1986)).

50 Důkaz, že navázání CD4-gp 120 je odpovědné za virovou infekci buněk nesoucích CD4 antigen, obsahuje zjištění, že mezi gp 120 a CD4 se vytváří specifický komplex. Jiní vědci ukázali, že buněčné linie neinfikované virem HIV se změnily na infikované buněčné linie po transfekci a expresi lidského CD4 cDNA genu.

- Terapeutické programy založené na rozpustném CD4 jako pasivním činidlo pro interferování s virovou adsorpcí a syncytiem – zprostředkované celulární transmise, byly navrženy a úspěšně demonstrovány *in vitro* několika skupinami (Deen et al., Nature 331, 82–84 (1988); Fisher et al., Nature 331, 76–78 (1988); Hussey et al., Nature 331, 78–81 (1988); Smith et al., Science 238, 1704–1707 (1987); Trauneker et al., Nature 331, 84–86 (1988)); a následně byly vyvinuty CD4 imunoglobulinové fúzní proteiny s prodlouženým poločasem a mírnou biologickou aktivitou (Capon et al., Nature 337, 525–531 (1989); Trauneker et al., Nature 339, 68–70 (1989); Byrn et al., Nature 344, 667–670 (1990); Zettlmeissl et al., DNA Cell Biol. 9, 347–353 (1990)). Ačkoliv CD4 imunotoxinové konjugáty nebo fúzní proteiny vykazují potenciální cytotoxicitu pro infikované buňky *in vitro* (Chaudhary et al., Nature 335, 369–372 (1988); Till et al., Science 242, 1166–1168 (1988)), latence syndromu imunodeficiency způsobuje nepravděpodobnost úspěšnosti jednoduché terapie pro eliminaci virové zátěže, a antigenicita cizích fúzních proteinů pravděpodobně limituje jejich přijatelnost při terapiích vyžadujících opakované dávkování. Testy s opicemi nakaženými virem SIV ukázaly, že rozpustný CD4 při podávání zvířatům bez zjevné CD4 cytopenie může redukovat SIV titr a zlepšit *in vitro* měření myeloidního potenciálu (Watanabe et al., Nature 337, 267–270 (1989)). Avšak rychlé znovuoobjevení se viru bylo pozorováno po přerušení terapie, což nasvědčuje, že dlouhodobé podávání může být nezbytné pro zabránění progresivního oslabení imunitního systému.
- 20 T-lymfocytové a Fc receptory. Expresí nejrozšířenější formy T-lymfocytového antigenového receptoru (TCR) na buněčném povrchu vyžaduje koexpresi nejméně šesti odlišných polypeptidových řetězců (Weiss et al., J. Exp. Med. 160, 1284–1299 (1984); Orloffhashi et al., Nature 316, 606–609 (1985); Berkhout et al., J. Biol. Chem. 263, 8528–8536 (1988); Sussman et al., Cell 52, 85–95 (1988)),  $\alpha/\beta$  antigen vázících řetězců, tří polypeptidů CD3 komplexu a  $\zeta$ . Pokud některý z řetězců chybí, nedochází ke stabilní expresi zbývajících členů komplexu.  $\zeta$  je limitující polypeptid pro povrchovou expresi úplného komplexu (Sussman et al., Cell 52, 85–95 (1988)) a předpokládá se, že zprostředkovává alespoň část programu buněčné aktivace spouštěné receptorem rozpoznáním antigenu (Weissman et al., EMBO J. 8, 3651–3656 (1989); Frank et al., Science 249, 174–177 (1990)). Integrovaný membránový homodimer typu I 32 kDa,  $\zeta$  (zeta) má extracelulární doménu s devíti zbytky a žádné místo pro adici N-vázaného glykanu a myši intracelulární doménu se 112 zbytky nebo lidskou intracelulární doménu se 113 zbytky (Weissman et al., Science 238, 1018–1020 (1988); Weissman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 9709–9713 (1988)). Izoforma  $\zeta$ , nazývaná  $\eta$  (eta) (Baniyash et al., J. Biol. Chem. 263, 9874–9878 (1988); Orloff et al., J. Biol. Chem. 264, 14812–14817 (1989)), která vzniká z alternativní cesty splicingu mRNA (Jin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3319–3323 (1990)), je přítomná v omezeném počtu buněk produkujících antigenový receptor.  $\zeta$ - $\eta$  heterodimery se považují za zprostředkovatele tvorby inositolfosfátu a receptorem iniciovanou programovou buněčnou smrti, nazývanou apoptóza (Mercep et al., Science 242, 571–574 (1988); Mercep et al., Science 246, 1162–1165 (1989)).
- 40 Podobně jako  $\zeta$  a  $\eta$ , s Fc receptorem asociovaný  $\gamma$  řetězec je exprimován na buněčném povrchu komplexů s adičními polypeptidy, z nichž některé zprostředkovávají rozpoznání ligandu a další mají nedefinovanou funkci.  $\gamma$  Má homodimerní strukturu a celkovou organizaci velice podobnou té u  $\zeta$  a je součástí jak vysokoafinitního IgE receptoru stěžňové buňky/basofilu, Fc $\epsilon$ RI, skládajícího se nejméně ze tří rozdílných polypeptidových řetězců (Blank et al., Nature 337, 187–189 (1989); Ra et al., Nature 241, 752–754 (1989)), tak jednoho nízkoafinitního IgG receptoru, který je u myši reprezentován Fc $\gamma$ RII $\alpha$  (Ra et al., J. Biol. Chem. 264, 15323–15327 (1989)) a u lidí expresí subtypu CD16 makrofágy a přirozenými zabíječskými buňkami, CD16<sub>TM</sub> (CD16 transmembránový) (Lanier et al., Nature 342, 803–805 (1989); Anderson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 2274–2278 (1990)) a s polypeptidem s nedefinovanou funkcí (Anderson et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 87, 2274–2278 (1990)). Nedávno bylo publikováno, že  $\gamma$  je exprimován myši linií T-lymfocytů, CTL, ve kterých vytváří homodimery a heterodimery  $\gamma$ - $\zeta$  a  $\gamma$ - $\eta$  (Orloff et al., Nature 347, 189–191 (1990)).

Fc receptory zprostředkovávají fagocytózu imunitních komplexů, transcytozu a na protilátkách závislou buněčnou cytotoxicitu (ADCC) (Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* **9**, 457–492 (1991); Unkeless et al., *Annu. Rev. Immunol.* **6**, 251–281 (1988); Mellman, *Curr. Opin Immunol.* **1**, 16–25 (1988)). Nedávno bylo zjištěno, že jedna z izoform kuřecího nízkofinitního Fc receptoru FcR $\gamma$ IIIB1 zprostředkovává internalizaci Ig–pokrytých cílů do klathrinem pokrytých jamek a jiný nízkofinitní receptor, FcR $\gamma$ IIIA zprostředkovává ADCC prostřednictvím asociování se s jedním nebo více členy malé rodiny „spouštěcích molekul“ (Miettinen et al., *Cell* **58**, 317–327 (1989); Hunziker and Mellman, *J. Cell. Biol.* **109**, 3291–3302 (1989)). Tyto spouštěcí molekuly, řetězec  $\zeta$  T–lymfocytového receptoru (TCR), řetězec  $\gamma$  TCR a řetězec  $\gamma$  Fc receptoru interagují s doménami ligandového rozpoznávání receptorů různých imunitních systémů a mohou autonomně iniciovat programy buněčných efektorů, včetně cytolyzy, následující po agregaci (Samelson et al., *Cell* **43**, 223–231 (1985); Weissman et al., *Science* **239**, 1018–1020 (1988); Jin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 3319–3323 (1990); Blank et al., *Nature* **337**, 187–189 (1989); Lanier et al., *Nature* **342**, 803–805 (1989); Kurosaki and Ravetch, *Nature* **342**, 805–807 (1989); Hibbs et al., *Science* **246**, 1608–1611 (1989); Anderson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **87**, 2274–2278 (1990); Irving and Weiss, *Cell*, 891–901 (1991)). V načrtnutých paralelách mezi kuřecími a lidskými rodinami nízkofinitních Fc receptorů se ukazuje zřejmé, že lidské izoformy FcR $\gamma$ IIA a C nemají odpovídající kuřecí protějšek. Částečně kvůli tomu nebyla jejich funkce dosud definována.

Protože humorální činidla, založená pouze na CD4, mají limitované užití *in vivo*, předchozí práce prověřovala možnost augmentace buněčné imunity proti HIV. Byla zjištěna tvorba proteinových chimér, jejich extracelulární CD4 doména je fúzovaná s transmembránovými a/nebo intracelulárními doménami receptoru T–lymfocytů, IgG Fc receptoru nebo elementů, převádějících signál receptoru B–lymfocytů (USSN 07/847, 566 a 07/665, 961, takto začleněn odkazem). Cytolytické T–lymfocyty, exprimující chiméry, které obsahují extracelulární doménu CD4, vykazují silnou destrukci buněčných cílů, exprimujících obálkové proteiny HIV, nezávislou na MHC. Velice důležitá a nová součást tohoto přístupu byla identifikace jednotlivých řetězců receptorů T–lymfocytů, Fc receptorů a receptorů B–lymfocytů, jejichž agregace stačí k inicializaci buněčné odpovědi.

Jedna zejména důležitá aplikace tohoto přístupu je vynález chimér mezi CD4 a  $\zeta$ ,  $\eta$  nebo  $\gamma$ , která řídí cytolytické T–lymfocyty k rozpoznávání a zabíjení buněk, exprimujících HIV gp 120 (USSN 07/847 566 a 07/665 961, takto začleněn odkazem).

#### Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je terapeutická buňka pro řízení buněčné imunitní odpovědi u savců, exprimující nejméně dva bílkovinné chimérní receptory, vázané na membránu, kde první obsahuje (a) extracelulární část, která je schopná specifického rozpoznávání a navázání se na cílovou buňku nebo cílovou infekční částici a (b) intracelulární nebo transmembránovou část schopnou dát signál terapeutické buňce ke zničení cílové buňky, navázané na receptor nebo cílové infekční částice navázané na receptor, a druhý z receptorů obsahuje (a) extracelulární část, která je schopná specifického rozpoznávání a navázání se na cílovou buňku nebo cílovou infekční částici a (b) intracelulární část odvozenou od CD28.

Ačkoliv nativní receptory T–lymfocytů, Fc receptory a receptory B–lymfocytů mají nebo mohou mít komplikovanou multimerní strukturu, neumožňující výhodnou manipulaci s nimi, předkládaný vynález demonstruje proveditelnost vytvoření chimér mezi intracelulární doménou jakéhokoli z řady molekul schopných vyhovět podmínkám cílového rozpoznávání. Zejména tvorba chimér skládajících se z intracelulární domény T–lymfocytového Fc receptoru zeta, eta nebo gama řetězců spojených s extracelulární doménou vhodně manipulované molekuly protilátky skýtá možnost cílového rozpoznávání imunitního systému buňky přesměrovat na antigen rozpoznávaný extracelulární doménou protilátky. Tak doména protilátky schopné rozpoznávání nějakého

determinantu na povrchu patogenu umožní imunitnímu systému buňky vyzbrojenému touto chimérou odpověď na přítomnost patogenu s efektorovým programem odpovídajícím jejich linii, např. pomocné T-lymfocyty odpoví cytotoxickou aktivitou proti cíli a B-lymfocyty se aktivují pro syntézu protilátky. Makrofágy a granulocyty provádějí svůj efektorový program zahrnující 5 uvolnění cytokinů, fagocytózu a reaktivní generování kyslíku. Podobně domény protilátky schopné rozpoznávání nádorových buněk prospěšně povzbudí odpověď imunitního systému na nádor. Protilátky schopné rozpoznávání imunitních buněk s neodpovídající reaktivitou proti vlastním determinantům umožní selektivní destrukci autoreaktivních buněk.

Ačkoliv příklady uváděly použití protilátkových chimér jako vhodné vysvětlující nástroje, vynález není limitován v oboru na protilátkové chiméry, a skutečně, užití specifických neprotilátkových extracelulárních domén má důležité výhody. Např. extracelulární doména receptoru pro virus, bakterii nebo parazita umožní buňkám vyzbrojeným takovými chimérami, specificky cílit na buňky exprimující virové, bakteriální nebo parazitické determinanty. Výhoda tohoto přístup 10 oproti použití protilátek je ta, že nativní receptor pro patogen může mít jedinečně vysokou selektivitu nebo afinitu pro patogen, a umožňuje tak vyšší stupeň přesnosti ve výsledné imunitní odpovědi. Podobně k vyrušení buněk imunitního systému neadekvátně reagujících s vlastním antigenem může stačit spojení antigenu (buď jako intaktního proteinu v případě terapie vyčerpání B-lymfocytů, nebo jako MHC komplex v případě terapie vyčerpání T-lymfocytů) k intracelulárnímu zeta, eta nebo gama řetězci, a tak působit na specifické zaměření buněk neadekvátně odpoví 15 dajících na vlastní determinanty.

Jiné použití chimér spočívá v regulaci buněčné populace *in vivo* následně po dalších formách genového inženýrství. Bylo navrženo například použití lymfocytů infiltrujících nádor nebo přirozených zabíječských buněk k vnesení cytotoxických prvků do místa nádoru. Předkládaný vynález poskytuje vhodný prostředek k regulaci počtu a aktivity lymfocytů a buněk, aniž by se vyjmul 20 y z těla pacienta pro *in vitro* amplifikaci. Protože intracelulární domény chimérních receptorů zprostředkovávají proliferační odpověď buněk, koordinace extracelulárních domén různými agregáčními stimuly specifickými pro extracelulární domény (například protilátka specifická pro extracelulární doménu) bude ústít v proliferaci buněk nesoucích chiméry.

Ačkoliv specifické uspořádání předkládaného vynálezu obsahuje chiméry mezi zeta, eta nebo gama řetězci, nebo jejich aktivními fragmenty (diskutovanými níže), jakýkoliv receptorový řetězec s podobnou funkcí, jako mají tyto molekuly, například v granulocytech nebo B-lymfocytech, 35 může být použit pro účely zde popsané. Významné rysy vhodných imunitních buněk spouštěcí molekuly obsahují schopnost autonomní exprese (tzn. jako jednoduchý řetězec), schopnost fúzovat s extracelulární doménou tak, že výsledná chiméra je přítomná na povrchu terapeutické buňky, a schopnost iniciovat buněčné efektorové programy druhotnou agregací po setkání s cílovým ligandem.

V současnosti nejvhodnější způsob pro dodání chimér buňkám imunitního systému je cesta genové terapie. Avšak rekonstituce buněk imunitního systému s chimérními receptory smícháním buněk s vhodně solubilizovaným čištěným chimérním proteinem také rezultuje v tvorbu manipulo 40 vané buněčné populace, schopné odpovídat na cílové podněty, rozpoznávané extracelulární doménou chimér. Podobné přístupy byly použity například pro zavedení intaktního HIV receptoru, CD4, do erytrocytů pro terapeutické účely. V tomto případě populace manipulovaných buněk není schopna sebeobnovení.

Předkládaný vynález se vztahuje k funkčně zjednodušeným chimérám receptorů T-lymfocytů, B-lymfocytů a Fc receptorů, schopných přesměrování funkcí imunitního systému. Zejména se vztahuje k regulaci lymfocytů, makrofágů, přirozených zabíječských buněk nebo granulocytů expresí chimér uvedených buněk, které způsobují buněčnou odpověď na cílové podněty, rozpoznávané chimérami. Vynález se také vztahuje na způsob řízení buněčné odpovědi na infekční částici, nádorovou nebo rakovinnou buňku, nebo na buňku, generovanou autoimunitou. Způsob 55 řízení buněčné odpovědi u savců zahrnuje administraci efektivního množství terapeutických

buněk do zmíněných savců, uvedené buňky jsou schopny rozpoznávat a ničit zmíněné infekční částice, nádorové nebo rakovinné buňky, nebo buňky, generované autoimunitou. Buněčná odpověď je zprostředkována jednoduchou receptorovou chimérou nebo je výsledkem kooperace mezi multiplítními chimérami (například sada dvou nebo více chimér, z nichž jedna obsahuje CD28 intracelulární doménu). Tomu odpovídá, vynález zahrnuje užití těchto buněk, exprimujících receptorové chiméry, při produkci léčiv pro terapii chorob (jak je zde uvedeno).

V jiném uspořádání, způsob řízení buněčné odpovědi na infekční částici zahrnuje administraci terapeutických buněk, schopných rozpoznávání a ničení zmíněné částice, přičemž částicí je specifický virus, bakterie, protozoa nebo houby. Specifičtěji tato metoda je řízena proti takovým částicím, jako je HIV nebo *Pneumocystis carinii*.

Vynález specificky poskytuje metodu pro řízení buněčné odpovědi na buňky, infikované virem HIV. Metoda zahrnuje administraci pacientovi efektivního množství cytotoxických T-lymfocytů, přičemž uvedené lymfocyty jsou schopny specifického rozpoznávání a lýzy buněk infikovaných HIV stejně jako oběžným virem.

Tak v jednom uspořádání vynález poskytuje metodu řízení buněčné odpovědi na buňky infikované virem HIV, zahrnující administraci pacientovi efektivního množství cytotoxických T-lymfocytů schopných specifického rozpoznávání a lýzy buněk infikovaných HIV.

V ještě dalším uspořádání se poskytují chimérní receptorové proteiny, které řídí cytotoxické T-lymfocyty k rozpoznávání a lýze buněk infikovaných HIV. Ještě další uspořádání vynálezu zahrnuje hostitelské buňky, transformované vektorem zahrnujícím chimérní receptory.

V dalším uspořádání vynález poskytuje protilátku proti chimérním receptorům z vynálezu.

Pokusy vynálezců získat cytotoxické T-lymfocyty, které specificky vážou a lyzují buňky infikované HIV, poskytly receptorové chiméry. Tyto chimérní receptory jsou funkčně aktivní a mají zvláštní schopnost specificky se vázat a lýzovat buňky exprimující gp 120.

Předmětem předkládaného vynálezu je poskytnout způsob terapie jedinců, infikovaných HIV. Předkládaný vynález poskytuje množství důležitých výhod při terapii AIDS.

Tato a další nelimitující uspořádání předkládaného vynálezu budou zřejmá odborníkovi z následujícího detailního popisu vynálezu.

V následujícím detailním popisu se uvádějí odkazy na různé metodologie známé odborníkům z oblasti molekulární biologie a imunologie. Publikace a další materiály, uvádějící takové známé metodologie, na které jsou odkazy, jsou zahrnuty zde v referencích a plně uvedeny v souhrnu.

Standardní odkazové práce, uvádějící obecné principy technologie rekombinantní DNA, zahrnují Watson et al., *Molecular Biology of the Gene*, svazek I a II, the Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., publisher, Menlo Park, CA (1987); Darnell et al., *Molecular Cell Biology*, Scientific American Books, Inc., publisher, New York, N.Y. (1986); Lewin, *Genes II*, John Wiley & Sons, publishers, New York, N.Y. (1985); Old et al., *Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering*, 2. vydání, University of California Press, publisher, Berkeley, CA (1981); Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. vydání, Cold Spring Harbor Laboratory, publisher, Cold Spring Harbor, NY (1989); *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al., Wiley Press, New York, NY (1989).

Definice. „Klonování“ znamená užití *in vitro* rekombinantní techniky k zavedení jednotlivého genu nebo jiné sekvence DNA do vektorové molekuly. Pro úspěšné klonování žádaného genu je nutné použít metodu pro generování DNA fragmentů pro spojení fragmentů s vektorovými mole-

kulami, pro zavedení složité DNA molekuly do hostitelské buňky, ve které může replikovat, a pro výběr klonu, majícího cílový gen mezi recipientními hostitelskými buňkami.

5 „cDNA“ znamená komplementární nebo kopírovanou DNA, vytvořenou z RNA templátu působením RNA-dependentní DNA polymerázy (reverzní transkriptázy). „cDNA klon“ znamená duplexní DNA sekvenci, komplementární k dané RNA molekule, nesené klonovacím vektorem.

10 „cDNA knihovna“ znamená soubor rekombinantních molekul DNA, obsahujících cDNA vloženiny, které zahrnují DNA kopie mRNA, exprimované buňkou ve chvíli vzniku cDNA knihovny. Taková cDNA knihovna se připravuje podle postupů, známých odborníkům a popisovaných například Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, viz výše. Obecně se nejprve izoluje RNA z buněk organismu, z jehož genomu se klonuje žádaný jednotlivý gen. Preferované pro účel předkládaného vynálezu jsou savčí, zejména lidské lymfatické buněčné linie. V současnosti preferovaným vektorem pro tento účel je WR vlákno vaccinia viru.

15 „Vektor“ znamená molekulu DNA, odvozenou například z plazmidu, bakteriofága, savčího nebo hmyzího viru, do kterého se fragmenty DNA začleňují nebo klonují. Vektor obsahuje jedno nebo více unikátních restrikčních míst a je schopen autonomní replikace v definovaném hostitelském nebo nosičovém organismu tak, že klonovaná sekvence je reproduciibilní. „Vektor DNA exprese“ 20 znamená jakýkoliv autonomní element, schopný řízení syntézy rekombinantního peptidu. Takové vektory DNA exprese zahrnují bakteriální plazmidy a fágy a savčí a hmyzí plazmidy a viry.

25 „Substanciálně čistý“ znamená sloučeninu, například protein, polypeptid nebo protilátku, která je substanciálně zbavená komponent, které ji přirozeně doprovázejí. Obecně je sloučenina substanciálně čistá, když nejméně 60 %, ale lépe 75 % a nejlépe 90 % celkové látky ve vzorku je žádaná sloučenina. Čistota se měří jakoukoli vhodnou metodou, například sloupcovou chromatografií, gelovou elektroforézou na polyakrylamidu, nebo HPLC analýzou. V kontextu s nukleovými kyselinami, „substanciálně čistý“ znamená sekvenci nukleové kyseliny, segment nebo fragment, který 30 není bezprostředně sdružen (například kovalentně vázán) s oběma kódovacími sekvencemi, se kterými je bezprostředně sdružen (například s jednou na 5'-konci a jednou na 3'-konci) v přirozeně se vyskytujícím genomu organismu, ze kterého je DNA podle vynálezu odvozena.

35 „Funkční derivát“ znamená „fragmenty“, „varianty“, „analogy“ nebo „chemické deriváty“ molekuly. „Fragment“ molekuly, jako kterákoliv z cDNA sekvencí podle předkládaného vynálezu, odpovídá jakékoliv nukleotidové části molekuly. „Varianta“ takové molekuly odpovídá přirozeně se vyskytující molekule, substanciálně podobné buď celé molekule, nebo jejímu fragmentu. „Analog“ molekuly odpovídá nepřirozené molekule, substanciálně podobné buď celé molekule, nebo jejímu fragmentu. Molekula se považuje za „substanciálně podobnou“ jiné molekule, pokud 40 aminokyselinová sekvence obou molekul je substanciálně shodná. Zejména, „substanciálně podobná“ aminokyselinová sekvence má nejméně 50%, lépe 85% a nejlépe 95% identickou aminokyselinovou sekvenci s přirozenou nebo referenční sekvencí a/nebo je to ta, která se liší od přirozené nebo referenční aminokyselinové sekvence pouze konzervativní aminokyselinovou substitucí. Substanciálně podobné aminokyselinové molekuly mají podobnou biologickou aktivitu. V případě, že dvě molekuly mají podobnou aktivitu, považují se za varianty, neboť tento 45 termín se zde používá, i když jedna z molekul obsahuje více nebo méně aminokyselinových zbytků než ta druhá, nebo když aminokyselinová sekvence zbytků není identická. Jak se zde používá, molekula se považuje za „chemický derivát“ jiné molekuly, když obsahuje navíc chemické skupiny, které nejsou normální částí molekuly. Takové skupiny mohou alternativně snižovat toxicitu molekuly, eliminovat nebo oslabit nežádoucí vedlejší efekty molekuly atd. Skupiny 50 schopné zprostředkovávat takové efekty jsou uvedeny například v Remington's Pharmaceutical Sciences, 16. vydání, Mack Publishing Co, Easton, PA (1980).

Podobně, „funkční derivát“ genu receptorové chiméry podle předkládaného vynálezu znamená, že zahrnuje „fragment“, „variantu“ nebo „analog“ genu, které jsou substanciálně podobné 55 v nukleotidové sekvenci a které kódují molekuly s podobnou aktivitou, například chiméry recep-

torů T-lymfocytů, B-lymfocytů a Fc receptorů. „Substanciálně podobné“ nukleové kyseliny kódují substanciálně podobné aminokyselinové sekvence a také zahrnují jakoukoliv sekvenci nukleové kyseliny schopnou hybridizace s divokým typem sekvence nukleové kyseliny při odpovídajících hybridizačních podmínkách (příslušné hybridizační podmínky viz například Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Press, New York, NY (1989).

Jak se zde používá, chimérní protein receptorů T-lymfocytů, B-lymfocytů nebo Fc receptorů zahrnuje také jakékoliv funkční deriváty, fragmenty, varianty, analogy nebo chemické deriváty, které jsou substanciálně podobné „divokému typu“ chiméry a které mají podobnou aktivitu (tzn. nejlépe 90%, 70%, 40%, ale nejméně 10% aktivitu receptorové chiméry divokého typu). Aktivita funkčního derivátu receptorové chiméry zahrnuje specifickou vazbu (její extracelulární doménou) na cílovou částici nebo buňku a výslednou destrukci (řízenou její intracelulární nebo transmembránovou doménou) této částice nebo buňky; taková aktivita se testuje jakýmkoliv ze zde popsaných testů.

DNA sekvence kódující chiméry receptoru T-lymfocytů, B-lymfocytů nebo Fc receptorů podle předkládaného vynálezu, nebo jejich funkční deriváty, jsou rekombinovány s vektorovou DNA v souladu s konvenčními technikami, včetně blunt-ended nebo staggered-ended konců pro ligaci, štěpení restrikčními enzymy za vzniku příslušných konců, příslušné vyplnění kohezních konců, působení alkalické fosfatázy pro zamezení nežádoucího spojování, a ligace příslušnými ligázami. Postupy pro takovou manipulaci jsou uvedeny v Maniatis et al., viz výše, a jsou známy odborníkům.

Molekula nukleové kyseliny, jako DNA, se považuje za schopnou exprese polypeptidu, když obsahuje nukleotidovou sekvenci, nesoucí transkripční a translační regulační informace, „operativně spojenou“ s nukleotidovou sekvencí, která kóduje polypeptid. Operativní spojení je vazba, kterou je regulační DNA sekvence a DNA sekvence, určená k expresi, spojena takovým způsobem, který umožňuje genovou expresi. Přesná podstata regulačních oblastí, nutných pro genovou expresi, se liší od organismu k organismu, ale obecně zahrnuje promotorovou oblast, která v prokaryotech obsahuje jak promotor (který řídí iniciaci transkripce RNA), tak DNA sekvence, které při transkripci do RNA dávají signál pro iniciaci syntézy proteinu. Takové oblasti normálně zahrnují ty 5'-nekódující sekvence, účastnící se iniciace transkripce a translace, jako TAT box, capping sekvence, CAAT sekvence a tak podobně.

Je-li zapotřebí, z nekódující 3'-oblasti je protein kódující genovou sekvenci získatelný výše popsaným způsobem. Tato oblast se zachovává pro svou regulační sekvenci transkripční terminace, jako terminace a polyadenylace. Zachováním 3'-oblasti přirozeně sdružené s DNA sekvencí kódující protein, se získají signály transkripční terminace. Když signály transkripční terminace nejsou dostatečně funkční pro expresi v hostitelské buňce, pak se substituce 3'-oblast v hostitelské buňce funkční.

Dvě DNA sekvence (jako sekvence promotorové oblasti a sekvence kódující chiméru receptorů T-lymfocytů, B-lymfocytů nebo Fc receptorů) se považují za operativně spojené, když povaha vazby mezi dvěma DNA sekvencemi (1) neustí do zavedení frame-shift mutace, (2) neinterferuje se schopností sekvence promotorové oblasti řídit transkripci genové sekvence receptorové chiméry, nebo (3) neinterferuje se schopností receptorové chiméry genové sekvence být transkribována sekvencí promotorové oblasti. Promotorová oblast je operativně spojena s NA sekvencí, když je promotor schopný ovlivnit transkripci dané DNA sekvence. Pro expresi proteinu jsou nezbytné transkripční a translační signály rozpoznávané příslušným hostitelem.

Předkládaný vynález obsahuje expresi chimérních proteinů receptorů T-lymfocytů, B-lymfocytů nebo Fc receptorů (nebo jejich funkčních derivátů) buď v prokaryotických nebo eukaryotických buňkách, ačkoliv eukaryotická exprese (zejména lidských lymfocytů) je preferována.

Protilátky podle předkládaného vynálezu jsou připravitelné různými postupy. Například buňky exprimující receptorové chimérní proteiny nebo jejich funkční deriváty mohou být administrovány zvířeti za účelem indukce produkce séra obsahujícího polyklonální protilátky schopné vázání chimér.

5

V upřednostňovaném postupu jsou protilátky podle předkládaného vynálezu monoklonální. Takové monoklonální protilátky se připravují za použití hybridomové techniky (Kohler et al., Nature 256, 495 (1975); Kohler et al., Eur. J. Immunol. 6, 511 (1976); Kohler et al., al., Eur. J. Immunol. 6, 292 (1976); Hammerling et al., In: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, Elsevier, N.Y., str. 563–684 (1981). Obecně takové postupy zahrnují imunizaci zvířete chimérním antigenem receptorů T-lymfocytů, B-lymfocytů nebo Fc receptorů. Splenocyty takových zvířat jsou extrahovány a fúzovány s vhodnou myelomovou buněčnou linií. Jakákoli vhodná myelomová buněčná linie se může použít v souladu s předkládaným vynálezem. Po fúzi se výsledné hybridomové buňky selektivně zadrží v HAT médiu a potom klonují mezním ředěním jak popisuje Wands et al., Gastroenterology 80, 225–232 (1981). Takovýmto výběrem získané hybridomové buňky se pak testují pro identifikaci klonů, které sekretují protilátky schopné se navázat na chiméru.

Protilátky podle předkládaného vynálezu jsou také polyklonální, nebo lépe regionálně specifické polyklonální protilátky.

Protilátky proti chimérám receptorů T-lymfocytů, B-lymfocytů nebo Fc receptorů podle předkládaného vynálezu se používají pro monitorování množství chimérních receptorů (nebo buněk nesoucích chimérní receptory) v pacientech. Takové protilátky jsou vhodné pro použití ve standardních imunodiagnostických testech známých v oboru, včetně imunometrických nebo sendvičových testů, jako dopředný sendvičový, zpětný sendvičový nebo simultánní sendvičový test. Protilátky jsou použitelné v množství kombinací, jak určí odborník bez nutnosti experimentování k určení přijatelné specifity, senzitivity a přesnosti imunotestů.

Vydané standardní práce s odkazy na obecné principy imunologie zahrnují Roitt, Essential Immunology, 6. vydání. Blackwell Scientific Publications, publisher, Oxford (1988); Kimball, Introduction to Immunology, 2. vydání, Macmillan Publishing Co., publisher, New York (1986); Roitt et al., Immunology, Gower Medical Publishing Ltd., publisher, London (1985); Campbell, Monoclonal Antibody Technology, in Burdon et al., publisher, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, volume 13, Elsevier, publisher, Amsterdam (1984); Klein, Immunology: The Science of Self-nonsel Discrimination, John Wiley & Sons, publisher, New York (1982); a Kennett et al., publishers, Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension In Biological Analyses, Plenum Press, publisher, New York (1980).

„Detekování“ zahrnuje určení přítomnosti nebo nepřítomnosti látky nebo kvantifikaci množství látky. Termín se tedy vztahuje na použití materiálů, sloučenin a metod podle předkládaného vynálezu pro kvalitativní a kvantitativní stanovení.

Izolace jiných hybridomů sekretujících monoklonální protilátky se stejnou specifitou jako ty zde popsané se provádí technikou anti-idiotypového vyhledávání (Potocmjak et al., Science 215, 1637 (1982)). Stručně řečeno, anti-idiotypová protilátka je protilátka, která rozpoznává jedinečné determinanty přítomné na protilátce produkované daným klonem. Anti-idiotypová protilátka se připraví imunizací zvířete stejného druhu, užitého jako zdroj monoklonální protilátky, danou monoklonální protilátkou. Imunizované zvíře rozezná a odpoví na protilátku produkcí protilátky na tyto idiotypové determinanty (anti-idiotypové protilátky).

Pro replikaci se hybridní buňky kultivují jak *in vitro*, tak *in vivo*. Vysoká produkce *in vivo* upřednostňuje v současnosti tuto metodu kultivace. Stručně řečeno, buňky z individuálních hybridních vláken se intraperitoneálně injekčně dopraví do pristane–primer BALB/c myši, aby se produkovala tekutina ascitu obsahující vysoké koncentrace žádaných monoklonálních protilátek.

Monoklonální protilátky izotypu IgM nebo IgG se čistí od kulturačního supernatantu pomocí sloupcové chromatografie, jak je odborníkům známo.

- 5 Protilátky podle předkládaného vynálezu se hodí zejména pro použití v imunotestech, kde se používají v kapalně fázi nebo navázané na pevný nosič. Navíc se protilátky v těchto imunotestech detekovatelně značí různými způsoby.

- 10 V dané oblasti se používá mnoho různých značení a způsobů značení. Příklady typů značení použitelných v předkládaném vynálezu zahrnují, ale nejsou omezeny na, enzymy, radioizotopy, fluorescenční sloučeniny, chemoluminiscenční sloučeniny, bioluminiscenční sloučeniny a kovové cheláty. Odborníci znají vhodné značení pro navázání na protilátky, nebo jsou schopni totéž zjistit použitím rutinní experimentální činnosti. Navíc navázání těchto značení na protilátky se může uskutečnit standardními technikami odborníkům obecně známými.

- 15 Jeden ze způsobů detekovatelného značení protilátek podle předkládaného vynálezu je navázání protilátky na enzym. Enzym po pozdější expozici se substrátem reaguje se substrátem za produkce chemické sloučeniny, která se detekuje například spektrofotometricky nebo fluorometricky. Příklady enzymů použitelných pro detekovatelné značení protilátek zahrnují malátdehydrogenázu, stafylokokovou nukleázu, delta-V-steroidní izomerázu, kvasničnou alkoholdehydrogenázu, alfa-glycerolfosfátdehydrogenázu, trifosfosátizomerázu, biotinavidinperoxidázu, křenovou peroxidázu, alkalickou fosfatázu, asparaginázu, glukózoxydázou,  $\beta$ -galaktosidázou, ribonukleázu, ureázu, katalázu, glukóz-VI-fosfátdehydrogenázu, glukooamylázu a acetylcholinesterázu.

- 25 Přítomnost detekovatelně značených protilátek se detekuje značením protilátek radioaktivními izotopy, které se stanovují za použití gama počítací nebo scintilačního počítací. Izotopy zejména použitelné pro účely předkládaného vynálezu jsou  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{36}\text{Cl}$ ,  $^{57}\text{Co}$ ,  $^{58}\text{Co}$ ,  $^{59}\text{Fe}$  a  $^{75}\text{Se}$ .

- 30 Je také možno detekovat navázání detekovatelně značených protilátek značením protilátek fluorescenční sloučeninou. Po vystavení fluorescenčně značené protilátky světlu o vhodné vlnové délce se její přítomnost detekuje na základě fluorescence barviva. Mezi nejpoužívanější fluorescenční značící sloučeniny patří fluorescein, izothiokyanát, rhodamin, fykoerythrin, fykokyanin, allofykokyanin, o-ftalaldehyd a fluoreskamin.

- 35 Protilátky podle předkládaného vynálezu se detekovatelně značí také za použití fluorescenčně emitujících kovů jako  $^{152}\text{Eu}$ , nebo dalších z řady lanthanoidů. Tyto kovy se připojují na molekulu protilátky za použití takových kov chelatujících skupin jako diethylenetriaminpentaoctová kyselina (DTPA) nebo ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA).

- 40 Protilátky se také detekovatelně značí spojením s chemoluminiscenčními sloučeninami. Přítomnost protilátky s navázanou chemoluminiscenční sloučeninou se určuje detekcí přítomnosti luminiscence, která vzniká během chemické reakce. Příkladem zejména použitelných chemoluminiscenčně značících sloučenin jsou luminal, izoluminal, theromatický akridiniumester, imidazol, akridinové soli, oxalátester a dioxetan.

- 50 Podobně se ke značení protilátek podle předkládaného vynálezu používají bioluminiscenční sloučeniny. Bioluminiscence je typem chemoluminiscence nacházené u biologických systémů, ve kterých katalytický protein zvyšuje účinnost chemoluminiscenční reakce. Přítomnost bioluminiscenční protilátky se určuje detekcí přítomnosti luminiscence. Mezi důležité bioluminiscenční sloučeniny pro účely značení patří luciferin a luciferázaequorin.

Protilátky a substanciálně čištěný antigen podle předkládaného vynálezu se ideálně hodí pro přípravu kitu. Takový kit zahrnuje kompartmentalizovaný nosičový prostředek a oddělené jedno

nebo více zásobníkových zařízení jako vialky, zkumavky nebo podobně, každé ze zásobníkových zařízení obsahuje oddělené součásti testu.

- 5 Je mnoho typů testů, které tvoří kity, a zahrnují například kompetitivní a nekompetitivní testy. Typické příklady testů, které užívají protilátky podle vynálezu, jsou radioimunotesty (RIA), enzymové imunotesty (EIA), enzym vázící imunisorbentní testy (ELIA) a imunometrické nebo sendvičové imunotesty.

- 10 Termín „imunometrický test“ nebo „sendvičový imunotest“ zahrnuje simultánní sendvičové, dopředné a zpětné sendvičové imunotesty. Těmto termínům odborník rozumí. Odborník také uvítá, že protilátky podle předkládaného vynálezu se užijí v jiných variacích a formách testů, které jsou v současnosti známy nebo které se vyvinou v budoucnu. Ty se zahrnují do obsahu předkládaného vynálezu.

- 15 V preferované formě provádění testů je důležité, že v inkubačním médiu jsou přítomny určité blokátory (většinou přidávané se značenou rozpustnou protilátkou). „Blokátory“ se přidávají po zaručení, že nespecifické proteiny, proteázy nebo lidské protilátky na myší imunoglobuliny, přítomné v experimentálním vzorku, nebudou zesilovat nebo ničit protilátky na pevném nosiči, nebo radioaktivně značené indikační protilátky, k vyloučení chybných pozitivních nebo chybných negativních výsledků. Výběr blokátorů proto přispívá skutečně ke specifitě testů popsaných v předkládaném vynálezu.

- 25 Zjistilo se, že jako „blokátory“ se může použít množství nerelevantních (tzn. nespecifických) protilátek ze stejné třídy nebo podtřídy (izotypu) jako ty použité v testech (například IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgM atd.). Koncentrace „blokátorů“ (běžně 1–100 µg/µl) je důležitá k udržení správné senzitivity a k inhibici jakékoliv nežádoucí interference s vyskytujícími se vzájemně křížově reagujícími proteiny v lidském séru. Pufrovaný systém obsahující „blokátory“ je nutné navíc optimalizovat. Preferované pufrы jsou ty, založené na slabých organických kyselinách, jako imidazol, HEPPS, MOPS, TES, ADA, ACES, HEPES, PIPES, TRIS a podobně, v rozmezí fyziologického pH. Méně preferované jsou anorganické pufrы jako fosfátový, borátový nebo karbonátový. K pufru obsahujícímu „blokátory“ se nakonec přidají známé proteázové inhibitory (běžně 0.01–10 µg/ml).

- 35 Je mnoho imunoabsorbentů na pevné fázi, které se mohou použít v předkládaném vynálezu. Známé imunoabsorbenty zahrnují sklo, polystyren, polypropylen, dextran, nylon a další materiály ve formě trubic, zrn a mikrotitračních místiček, vytvořených nebo obalených daným materiálem a tak podobně. Imobilizované protilátky se buď kovalentně nebo fyzikálně vážou na pevnou fázi imunoabsorbentu technikou kovalentní vazby prostřednictvím amidové nebo esterové vazby, nebo absorpcí. Odborníci znají mnoho dalších vhodných pevných fází s imunoabsorbenty a postupy pro imobilizaci protilátek nebo jsou schopni to zjistit za použití rutinní experimentální činnosti.

- 45 Pro diagnózu *in vivo*, *in vitro* nebo *in situ* se značení jako radionuklidy vážou na protilátky podle předkládaného vynálezu buď přímo, nebo prostřednictvím intermediární funkční skupiny. Intermediární skupina, která se často používá pro navazování radionuklidů vyskytujících se ve formě kovových kationtů, je diethylenetriaminpentaoctová kyselina (DTPA). Typickým příkladem kovových kationtů vázaných tímto způsobem jsou: <sup>99m</sup>Tc, <sup>123</sup>I, <sup>111</sup>In, <sup>131</sup>I, <sup>97</sup>Ru, <sup>67</sup>Cu, <sup>67</sup>Ga a <sup>68</sup>Ga. Protilátky podle vynálezu se značí také neradioaktivními izotopy pro účely diagnózy. Zejména používané prvky jsou <sup>157</sup>Gd, <sup>55</sup>Mn, <sup>162</sup>Dy, <sup>52</sup>Cr a <sup>56</sup>Fe.

- 50 Antigen podle vynálezu se izoluje v substanciálně čisté formě za použití protilátek podle předkládaného vynálezu. Uspořádání předkládaného vynálezu poskytuje substanciálně čisté chiméry receptorů T-lymfocytů B-lymfocytů a Fc receptorů, zmíněný antigen je charakterizovaný tím, že je rozpoznáván a váže se na protilátky podle předkládaného vynálezu. V jiném uspořádání předkládaný vynález poskytuje metodu izolace nebo čištění receptorového chimerního antigenu,

vytváření komplexu zmíněného antigenu s jednou nebo více protilátkami směřovanými proti receptorové chiméře.

5 Substanciálně čisté chimérní antigeny receptorů T-lymfocytů B-lymfocytů a Fc receptorů podle předkládaného vynálezu se zpětně používají k detekování nebo měření protilátky proti chiméře ve vzorku jako sérum nebo moč. Tak jedno uspořádání předkládaného vynálezu zahrnuje metodu detekování přítomnosti nebo množství protilátky proti chiméře antigenu receptorů T-lymfocytů B-lymfocytů a Fc receptorů ve vzorku, zahrnující kontakt vzorku obsahujícího protilátku proti chimérnímu antigenu s detekovatelně značenou receptorovou chimérou a detekci zmíněného  
10 značení. Ocení se, že jsou také použitelné imunoreaktivní frakce a imunoreaktivní analogy chiméry. Termín „imunoreaktivní frakce“ znamená jakoukoli doménu chimérního antigenu, která vykazuje ekvivalentní imunitní odpověď na protilátku směřovanou proti receptorové chiméře. Termín „imunoreaktivní analog“ označuje protein, který se liší od proteinu receptorové chiméry jednou nebo více aminokyselinami, ale který vykazuje ekvivalentní imunitní odpověď na proti-  
15 látku podle vynálezu.

„Specificky rozpoznává a váže se“ znamená, že protilátka rozpoznává a váže se na polypeptid chimérního receptoru, ale substanciálně nerozpoznává a neváže se na odpovídající molekuly ve vzorku, například v biologickém vzorku.

20 „Autoimunitou generovaná buňka“ znamená buňky produkující protilátky, které reagují s hostitelskou tkání nebo imunitním efektem T-lymfocytů, které jsou autoreaktivní; takové buňky obsahují protilátky proti acetylcholinovým receptorům (vedoucí, například k myasthenia gravis) nebo protilátky proti DNA, proti erytrocytům a proti destičkám (vedoucí například k lupus erythematosus).  
25

„Terapeutická buňka“ označuje buňku, která se transformovala chimérou podle vynálezu, takže je schopná rozpoznávání a ničení specifických infekčních částic, buněk infikovaných specifickými částicemi, nádoru nebo rakovinových buněk, nebo autoimunitou generovaných buněk; přednostně jsou takové terapeutické buňky buňkami hematopoietického systému.

„Cílová infekční částice“ označuje jakoukoli infekční částici (například virus, bakterii, protozoa nebo houbu), která je rozpoznávána terapeutickou buňkou nesoucí chimérní receptor; „cílová buňka“ značí jakoukoli hostitelskou buňku, která je rozpoznávána terapeutickou buňkou nesoucí  
35 chimérní receptor; cílové buňky zahrnují, bez omezení, hostitelské buňky infikované virem, bakterií, protozoem nebo houbou, stejně jako nádorové nebo rakovinové buňky a autoimunitou generované buňky.

„Extracelulární“ znamená, že alespoň doména molekuly je umístěna na buněčném povrchu.  
40 „Intracelulární“ znamená, že alespoň doména molekuly je umístěna v cytoplazmě terapeutické buňky. „Transmembránový“ znamená, že alespoň doména molekuly překlenuje plazmatickou membránu. „Extracelulární doména“, „intracelulární doména“ a „transmembránová doména“, jak je zde označena, zahrnuje boční sekvence aminokyselin, které se rozšiřují do sousedních buněčných kompartmentů.  
45

„Oligomerizovat“ označuje komplexovat s jinými proteiny za vytvoření dimerů, trimerů, tetramerů, nebo oligomerů vyššího řádu. Takové oligomery jsou homooligomery nebo heterooligomery. „Oligomerizující doména“ označuje oblast molekuly, která řídí vytváření komplexů (tzn. oligomerů).  
50

„Cytolytický“ znamená být schopný destrukce buňky (například buňky infikované patogenem, nádorové nebo rakovinové buňky, nebo autoimunitou generované buňky) nebo být schopný destrukce infekční částice (například viru).

„Virus imunodeficiency“ označuje retrovirus, který v divoké formě je schopen infikovat T4 buňky hostitele primátu a má virovou morfogenezi a morfologii charakteristickou pro podrodinu lentivirů. Termín bez omezení zahrnuje všechny varianty HIV a SIV, včetně HIV-1, HIV-2, SIVmac, SIVagm, SIVmnd, SIVsmm, SIVman, SIVmand a SIVcpz.

5

„Nezávislý na MHC“ znamená, že buněčná odpověď nevyžaduje přítomnost MHC třídy II antigenu na povrchu cílové buňky.

10

„Funkční derivát převádějící cytolytický signál“ označuje funkční derivát (jak je definován výše), schopný řízení alespoň 10 %, 40 %, 70 %, nejlépe 90 % biologické aktivity divokého typu molekuly. Jak se zde používá, „funkční derivát převádějící cytolytický signál“ signalizuje přímo terapeutické buňce zničit částice nebo buňky navázané na receptor (například v případě intracelulární chimérické receptorové domény), nebo nepřímo podporuje oligomerizaci s proteiny převádějícími cytolytický signál terapeutické buňky (například v případě transmembránové domény). Takové deriváty se testují na účinnost, například s použitím *in vitro* testů zde popsanych.

15

„Funkční derivát vázající HIV-obálku“ označuje funkční derivát (jak je definován výše), schopný vázat obálkový HIV protein. Funkční deriváty se identifikují za použití *in vitro* testů zde popsanych.

20

Terapeutická administrace. Transformované buňky podle předkládaného vynálezu jsou použitelné pro terapii množství chorob. Současné metody administrace transformovaných buněk zahrnují adoptivní imunoterapie nebo terapie buněčného přenosu. Tyto metody umožňují návrat buněk transformovaných imunitním systémem do krevního řečiště (Rosenberg, Sci. Am. 62 (květen 1990); Rosenberg et al., New. Engl. J. Med. 323, 570 (1990)).

25

Farmaceutické přípravky podle vynálezu se administrují jakémukoliv živočichovi, který vyzkouší prospěšné účinky sloučenin podle vynálezu. Nejlepší jsou lidé, ačkoliv vynález tak limitován není.

30

Detailní popis, nejprve jsou popsány obrázky.

35

Stručný popis obrázků. Obr. 1A ukazuje aminokyselinovou sekvenci v místě fúze mezi CD4 (zbytky 1–369) a různými receptorovými řetězci (sekvence ID NOS: 28–31). Podtržená sekvence ukazuje místo aminokyselin kódovaných v BamHI místě používaném pro fúzní konstrukci. Začátek transmembránové domény je označen svislou čarou. Sekvence  $\eta$  je identická se sekvencí  $\zeta$  na amino-konci, ale liší se na karboxylovém konci (Jin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3319–3323 (1990)). Obr. 1B ukazuje průtokovou cytometrickou analýzu povrchové exprese CD4, CD4: $\zeta$ , CD4: $\gamma$  a CD4: $\eta$  v CV1 buňkách. Buňky byly infikovány virem exprimujícím CD4 chiméru nebo CD16<sub>PL</sub>, inkubované 9 hodin při 37 °C a barveny fykoerythrinem konjugovaným anti CD4 Mab Leu3A.

40

Obr. 2 ukazuje povrchovou expresi CD16<sub>TM</sub> následující po koinfekci samotným CD16<sub>TM</sub> (tečkovaně), nebo konfigovaným virem exprimujícím CD4: $\gamma$  (čárkovaně) nebo CD4: $\zeta$  (nepřerušovaně). Řídké tečkování značí buňky infikované samotným CD4: $\zeta$ , barveným 3G8 (Fleit et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 3275–3279 (1982)) (anti-CD16 Mab).

45

Obr. 3 ukazuje povrchovou expresi CD16<sub>TM</sub> následující po koinfekci virem exprimujícím CD16<sub>TM</sub> a následující  $\zeta$  chiméru: CD4: $\zeta$  (silná čára), CD4: $\zeta$  C11G (nepřerušovaně); CD4: $\zeta$  (čárkovaně); CD4: $\zeta$  C11G/D15G (tečkovaně); bez koinfekce (samotné CD16<sub>TM</sub>, řídké tečkování). Buňky byly inkubovány s anti-CD16 Mab 3G8 a fykoerythrinem konjugovaným Fab'<sub>2</sub> kozími protilátkami na myši IgG. Úroveň exprese chimér  $\zeta$  byla v podstatě identická pro různé analyzované mutanty, a koinfekce buněk virem exprimujícím CD16<sub>TM</sub> a  $\zeta$  chiméru nezměnila značně povrchovou expresi chimér.

50

Obr. 4A–D ukazuje zvýšení intracelulárních volných vápenatých iontů po zesíťování mutantních chimér  $\zeta$  v linii T-lymfocytů. Jurkat E6 buňky (Weiss et al., J. Immunol. 133, 123–128 (1984)) byly infikovány rekombinantním vaccinia virem a analyzovány průtokovou cytometrií. Ukázané výsledky jsou pro propuštěnou populaci CD4+, takže analyzovány jsou pouze buňky exprimující relevantní chimérní protein. Střední průměr fialové k modré Indo-1 fluorescenci reflektuje intracelulární koncentraci volného vápníku v populaci jako celek a procenta respondujících buněk reflektující frakci buněk přesahujících předurčený prahový poměr (stanovený tak, že 10 % neupravených buněk je pozitivních). Obr. 4A a Obr. 4B ukazují Jurkat buňky exprimující CD4: $\zeta$  (nepřerušovaně) nebo CD16: $\zeta$  (čárkovaně), které byly vystaveny anti-CD4 Mab Leu3A (fykoerythrinový konjugát), po zesíťování s kozími protilátkami na myši IgG. Tečkovaně je vyznačena odpověď neinfikovaných buněk na anti-CD3 Mab OKT3. Obr. 4C a Obr. 4D ukazují Jurkat buňky exprimující CD4: $\zeta$  D15G (nepřerušovaně); CD4: $\zeta$  C11G/D15G (čárkovaně); nebo CD4: $\zeta$  C11G (tečkovaně), které byly upraveny a analyzovány jako na obr. 4A a 4B.

Obr. 5A–C ukazuje, že CD4: $\zeta$ , CD4: $\eta$  a CD4: $\gamma$  receptory umožní cytolytickým T-lymfocytům (CTL) zabít cíle exprimující HIV-1 gp120/41. Obr. 5A: plné kroužky, CTL exprimující CD4: $\zeta$  inkubované s HeLa buňkami exprimujícími gp120/41; prázdné kroužky, CTL exprimující CD4: $\zeta$  inkubované s neinfikovanými HeLa buňkami; plné čtverce, neinfikované CTL inkubované s HeLa buňkami exprimujícími gp120/41; prázdné čtverce, neinfikované CTL inkubované s neinfikovanými HeLa buňkami. Obr. 5B: plné kroužky, CTL exprimující CD4: $\eta$  inkubované s HeLa buňkami exprimujícími gp120/41; prázdné kroužky, CTL exprimující CD4: $\eta$  inkubované s HeLa buňkami exprimujícími gp120/41; prázdné čtverce, CTL exprimující C11G/D15G dvojité mutantní CD4: $\zeta$  chiméru inkubované s HeLa buňkami exprimujícími gp120/41. Obr. 5C: Průtoková cytometrická analýza CD4 exprese CTL použitými na obr. 5B. Pro korekci poměru mezi cílem a efektem, procenta buněk exprimujících CD4 chiméru se určila odčítáním stupnice negativní (neinfikované) populace histogramovou superpozicí; pro komparativní účely v tomto obrázku neinfikované buňky byly označeny arbitrálním prahem, který dává zhruba stejnou frakci pozitivní pro další buněčné populace jako histogramové odečítání.

Obr. 6A–B ukazuje specifitu CD4-řízené cytolyzy. Obr. 6A: plné kroužky, CTL exprimující CD4: $\zeta$  inkubované s HeLa buňkami exprimujícími CD16<sub>PI</sub>, prázdné kroužky, CTL exprimující CD4 inkubované s HeLa buňkami exprimujícími gp120; plné čtverce, CTL exprimující CD16: $\zeta$  inkubované s HeLa buňkami exprimujícími gp120/41; prázdné čtverce, CTL exprimující CD16<sub>PI</sub> inkubované s HeLa buňkami exprimujícími gp120/41. Obr. 6B: plné kroužky, CTL exprimující CD4: $\zeta$  inkubované s Raji (MHC class II<sup>+</sup>) buňkami; prázdné kroužky, neinfikované CTL buňky inkubované s RJ2.2.5 (MHC class II<sup>-</sup> Raji mutant) buňkami; prázdné čtverce, CTL exprimující CD4: $\zeta$  inkubované s RJ2.2.5 (MHC class II<sup>-</sup>) buňkami. Pořadnicové měřítko je zvětšeno.

Obr. 7A–B ukazuje charakterizaci CD16: $\zeta$  chimérního receptoru. Obr. 7A je schematický diagram CD16: $\zeta$  fúzního proteinu. Extracelulární doména fosfatidylinositolem vázané formy monomerního CD16 byla připojena k dimernímu  $\zeta$  právě externě s transmembránovou doménou. Proteinová sekvence v místě fúzního spojení je uvedena dále (sekvence ID NOS: 32, 33). Obr. 7B ukazuje průtokovou cytometrickou analýzu mobilizace vápníku po zesíťování CD16: $\zeta$  chiméry buď v TCR pozitivní nebo TCR negativní buněčné linii. Je ukázán střední poměr fialové a modré fluorescence (měřítko relativní koncentrace vápenatých iontů) v buněčné populaci vystavené protilátkám v čase 0. Plné čtverce, odpověď Jurkat buněk na anti-CD3 Mab OKT3; plné trojúhelníčky, odpověď CD16: $\zeta$  na anti-CD16 Mab 3G8 zesíťováním v REX33A TCR<sup>-</sup> mutantu; prázdné čtverce, odpověď CD16: $\zeta$  zesíťováním v Jurkat TCR<sup>-</sup> mutantní linii JRT3.T3.5; prázdné trojúhelníčky, odpověď CD16: $\zeta$  zesíťováním v Jurkat buňkách; křížky, odpověď nechimérních CD16 v Jurkat buňkách; tečky, odpověď nechimérních CD16 v REX33A TCR<sup>-</sup> buněčné linii.

Obr. 8A–B ukazuje deleční analýzu cytolytického potenciálu. Obr. 8A ukazuje lokaci konečného bodu  $\zeta$  delece. Zde jako jinde mutace v  $\zeta$  jsou reprezentovány původní zbytkovou konvencí zbytek–lokace–mutant, takže například D66\* označuje nahrazení Asp–66 terminačním kodónem. Obr. 8B ukazuje výsledky cytolytických testů nedeletované CD16: $\zeta$  a vyčnívajících  $\zeta$  delecí.

5 Hybridomové buňky exprimující povrchové protilátky k CD16 byly vystaveny  $^{51}\text{Cr}$  a inkubovány s narůstajícím počtem lidských cytolytických lymfocytů (CTL) infikovaných rekombinanty vakcinia viru exprimujícími CD16: $\zeta$  chiméry. Procenta uvolněného  $^{51}\text{Cr}$  jsou vynesena jako funkce poměru efektoru (CTL) k cílové (hybridomové) buňce (e/t). Plné kroužky, cytolyza zprostředkovaná buňkami exprimujícími CD16: $\zeta$  (mfi 18.7); plné čtverce, cytolyza zprostředkovaná buňkami

10 exprimujícími CD16: $\zeta$  Asp66\* (mfi 940.2); prázdné čtverce, cytolyza zprostředkovaná buňkami exprimujícími CD16: $\zeta$  Glu60\* (mfi 16.0); prázdné kroužky, cytolyza zprostředkovaná buňkami exprimujícími CD16: $\zeta$  Tyr51\* (mfi 17.4); plné trojúhelníčky, cytolyza zprostředkovaná buňkami exprimujícími CD16: $\zeta$  Phe34\* (mfi 17.8); a prázdné trojúhelníčky, cytolyza zprostředkovaná buňkami exprimujícími nechimerní CD16 (mfi 591). Ačkoliv v tomto experimentu exprese

15 CD16: $\zeta$  Asp66\* nebyla srovnatelná s ostatními fúzními proteiny, cytolyza buňkami exprimujícími CD16: $\zeta$  na ekvivalentní úrovni ve stejném experimentu dala výsledky v podstatě identické s těmi ukázanými u buněk exprimujících CD16: $\zeta$  Asp66.

Obr. 9A–D ukazuje, že eliminace potenciálu pro transmembránové interakce odhaluje krátký  $\zeta$  segment schopný zprostředkovat cytolyzu. Obr. 9A je schematický diagram monomerních bipartitních a tripartitních chimér. Nahoře je CD16: $\zeta$  konstrukt ukončený u zbytku 56 a postrádající transmembránové Cys a Asp zbytky. Dole jsou CD16:CD5: $\zeta$  a CD16:CD7: $\zeta$  konstrukty a odpovídající kontroly. Peptidové sekvence intracelulárních domén jsou ukázány níže (sekvence ID NOS: 35–37). Obr. 9B ukazuje cytolytickou aktivitu delečních mutantů monomerní chiméry.

25 Cytolytická aktivita buněk exprimujících CD16: $\zeta$  (plné kroužky; mfi 495) byla porovnána s aktivitou buněk exprimujících CD16: $\zeta$  Asp66\* (plné čtverce; mfi 527) nebo mutanty CD16: $\zeta$ Cys11Gly/Asp15Gly/Asp66\*, (prázdné čtverce; mfi 338) a CD16: $\zeta$ Cys11Gly/Asp15Gly/Glu60\* (plné trojúhelníčky; mfi 259). Obr. 9C ukazuje cytolytickou aktivitu zprostředkovanou tripartitními fúzními proteiny. Plné trojúhelníčky, CD16: $\zeta$  Asp66\*; prázdné čtverce,

30 CD16:5: $\zeta$ (48–65); plné čtverce, CD16:7: $\zeta$ (48–65); prázdné trojúhelníčky, CD16:7: $\zeta$ (48–59); prázdné kroužky, CD16:5; plné kroužky, CD16:7. Obr. 9D ukazuje mobilizaci vápníku mutantními a tripartitními chimérami v TCR negativní Jurkat JRT3.T3.5 mutantní buněčné linii. Prázdné kroužky, odpověď buněk exprimujících dimerní CD16: $\zeta$ Asp66\*; plné čtverce, odpověď buněk exprimujících CD16: $\zeta$ Cys11Gly/Asp15Gly/Asp66\*; prázdné čtverce, odpověď buněk

35 exprimujících CD16: $\zeta$ Cys11Gly/Asp15Gly/Glu60\*; plné trojúhelníčky, odpověď buněk exprimujících CD16:7: $\zeta$ (48–65); a prázdné trojúhelníčky, odpověď buněk exprimujících CD16: $\zeta$ (48–59).

Obr. 10A–F ukazuje příspěvek jednotlivých aminokyselin k aktivitě 18–zbytkového motivu převádějícího cytolytický signál. Obr. 10A a 10B ukazuje cytolytickou aktivitu a Obr. 10C ukazuje mobilizaci vápenatých iontů zprostředkovanou chimérami nesoucími budovou mutaci blízko karboxyl–terminálního tyrosinu (Y62). Obr. 10A a 10B prezentují údaje získané na buňkách exprimujících nízké, respektive vysoké množství CD16: $\zeta$  fúzních proteinů. Pro mobilizaci vápníku a cytolytické testy jsou použity stejné symboly, které jsou ukázány jako jednopísmenný kód

45 vpravo. Plné kroužky, buňky exprimující CD16: $\zeta$  (mfi v A, 21; B, 376); plné čtverce, buňky exprimující CD16:7: $\zeta$ (48–65) (mfi A, 31; B, 82); prázdné čtverce, CD16:7: $\zeta$ (48–65)Glu60Gln (mfi A, 3; B, 92); křížky, CD16:7: $\zeta$ (48–65)Asp63Ans (mfi A, 30; B, 74); plné trojúhelníčky, CD16:7: $\zeta$ (48–65)Tyr62Phe (mfi A, 24; B, 88); prázdné kroužky, CD16:7: $\zeta$ (48–65)Glu61Gln (mfi A, 20; B, 62); a prázdné trojúhelníčky, CD16:7: $\zeta$ (48–65)Tyr62Ser (mfi B, 64). Obr. 10D a

50 10E ukazuje cytolytickou aktivitu a Obr. 10F ukazuje mobilizaci vápenatých iontů zprostředkovanou chimérami nesoucími bodovou mutaci blízko amino–terminálního tyrosinu (Y51). Pro mobilizaci vápníku a cytolytické testy jsou použity stejné symboly, které jsou ukázány vpravo. Plné kroužky, buňky exprimující CD16: $\zeta$  (mfi v D, 21.2; v E, 672); plné čtver-

ce, buňky exprimující CD16:7:ζ(48–65) (mfi D, 31.3; E, 179); plné trojúhelníčky, CD16:7:ζ(48–65)Asn48Ser (mfi D, 22.4; E, 209); prázdné čtverce, CD16:7:ζ(48–65)Leu50Ser (mfi D, 25.0; E, 142); a prázdné trojúhelníčky, CD16:7:ζ(48–65)Tyr51Phe (mfi D, 32.3; E, 294).

- 5 Obr. 11A–B ukazuje seskupení vnitřních opakování ζ a porovnání jejich schopnosti podporovat cytolýzu. Obr. 11A je schematický diagram chimér tvořených rozdělením ζ intracelulární domény na třetiny a přiřazením k transmembránové doméně CD16:7 chiméry. Sekvence intra-
- 10 celulárních domén jsou ukázány níže (sekvence ID NOS: 38–40), se zarámovanými sdílenými zbytky a odpovídajícími zbytky označenými hvězdičkou. Obr. 11B ukazuje cytolytickou sílu tří ζ subdomén. Plné kroužky, buňky exprimující CD16:ζ (mfi 476); plné čtverce, CD16:7:ζ(33–65) (mfi 68); prázdné čtverce, CD16:7:ζ(71–104) (mfi 114); a plné trojúhelníčky, CD16:7:ζ(104–138) (mfi 104).

Obr. 12 je schematický diagram CD16:FcRγII chimér.

- 15 Obr. 13A–B ukazuje mobilizaci vápníku následující po zesíťování CD4:FcRγII a CD16:FcRγII chimér. Obr. 13A ukazuje poměr fialové k modré fluorescenci emitované buňkami vystavenými vůči vápníku senzitivnímu fluofooru Indo-1, vyjádřený jako funkce času po zesíťování CD16 extracelulární domény s protilátkami. Obr. 13B ukazuje podobnou analýzu nárůstu v poměru
- 20 fialové k modré fluorescenci buněk nesoucích CD4:FcRγII chiméry, po zesíťování s protilátkami.

- Obr. 14A–B ukazuje cytolytické testy CD4:FcRγII a CD16:FcRγII chimér. Obr. 14A ukazuje procenta <sup>51</sup>Cr uvolněného z anti-CD16 hybridomových (cílových) buněk po expozici buněk
- 25 vzrůstajícímu množství cytotoxických T-lymfocytů exprimujících CD16:FcRγII chiméry (efektorové buňky). Obr. 14B ukazuje podobnou analýzu cytotoxicity zprostředkované CD4:FcRγII chimérami proti cílovým buňkám exprimujícím HIV obálkové glykoproteiny.

- Obr. 15A–E ukazuje identifikaci zbytků v A okraji FcRγII, které jsou důležité pro cytolýzu. Obr. 15A je schematický diagram delečních konstruktů. Obr. 15B a 15C ukazuje mobilizaci váp-
- 30 níku a cytolýzu u variant s karboxyl–terminálními delecemi CD16:FcRγII A. Obr. 15D a 15E ukazuje mobilizaci vápníku a cytolýzu tripartitními chimérami nesoucími postupně méně od amino–konce z intracelulárního kraje CD16:FcRγII A.

- Obr. 16 (sekvence ID NO: 24) ukazuje aminokyselinovou sekvenci CD3 delta receptorového
- 35 proteinu; orámovaná sekvence představuje preferovanou doménu převádějící cytolytický signál.

Obr. 17 (sekvence ID NO: 25) ukazuje aminokyselinovou sekvenci T3 gama receptorového proteinu; orámovaná sekvence představuje preferovanou doménu převádějící cytolytický signál.

- 40 Obr. 18 (sekvence ID NO: 26) ukazuje aminokyselinovou sekvenci mb 1 receptorového proteinu; orámovaná sekvence představuje preferovanou doménu převádějící cytolytický signál.

- Obr. 19 (sekvence ID NO: 27) ukazuje aminokyselinovou sekvenci B29 receptorového proteinu; orámovaná sekvence představuje preferovanou doménu převádějící cytolytický signál.
- 45

### Příklady provedení vynálezu

- 50 Příklad 1

Konstrukce chimér lidský IgG1:receptor. Sekvence těžkého řetězce lidského IgG byly připraveny spojením sekvencí v C<sub>H</sub>3 doméně s cDNA fragmentem odvozeným od 3'–konce transmembrá-

nové formy mRNA protilátky. 3'-Koncový fragment se získal reakcí řetězové polymerázy s použitím tonsilové cDNA knihovny jako substrátem a oligonukleotidů o sekvencích:

CGC GGG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC (sekvence ID NO: 7) a  
CGC GGG GAT CCG TCG TCC AGA GCC CGT CCA GCT CCC CGT CCT GGG  
CCT CA (sekvence ID NO: 8),

5 odpovídajících 5'–, respektive 3'–koncům žádaných DNA fragmentů. 5'–Oligonukleotid je komplementární k místu C<sub>H</sub>1 domény lidského IgG1 a 3'–oligonukleotid je komplementární k místu 5'–sekvence kódujícímu doménu membránového rozpětí. PCR produkt se štěpil BstXI a BamHI a ligoval mezi BstXI a BamHI místy semisyntetického genu IgG1 protilátky nesoucího variabilní a konstantní oblasti. Po inzerci BstXI k BamHI fragmentu, amplifikované domény konstruktů byly nahrazeny až k SmaI místu C<sub>H</sub>3 restriční záměnou fragmentů, takže pouze 10 doména mezi SmaI místem a 3'–oligonukleotidem byla odvozena z PCR reakce.

K vytvoření lidského IgG1:ζ chimérního receptoru, těžký řetězec genu končící v místě BamHI se spojil s BamHI místem ζ chiméry popsané níže, takže protilátkové sekvence vytvořily extra-  
celulární doménu. Průtoková cytometrie COS buněk transfektovaných s plazmidem kódujícím 15 chiméru ukázala vysokou úroveň exprese protilátkových determinantů, když se lehký řetězec cDNA kódující expresi plazmidu kotransfektoval, a mírnou expresi protilátkových determinantů, když plazmid exprese lehkého řetězce nebyl přítomen.

Podobné chiméry včetně lidských IgG1 fúzující s η nebo γ (viz níže), nebo jakékoli signál převádějící domény proteinu receptoru T–lymfocytů nebo Fc receptoru se obecně konstruuje, jak je 20 popsáno výše, za použití standardních technik molekulární biologie.

K vytvoření jednoduché transkripční jednotky, která by umožnila expresi jak těžkých, tak lehkých řetězců z jednoduchého promotoru, ze sekvencí kódujících těžký a lehký řetězec se vytvořil 25 plazmid kódující bicistronovou mRNA, a 5'–nepřeložená doména mRNA kódující 78kD protein regulovaný glukózou, jinak známý jako grp78, nebo BiP. grp78 sekvence se získaly pomocí PCR z lidské genomové DNA s použitím primerů o sekvencích:

CGC GGG CGG CCG CGA CGC CGG CCA AGA CAG CAC (sekvence ID NO: 9) a  
CGC GTT GAC GAG CAG CCA GTT GGG CAG CAG CAG (sekvence ID NO: 10)

30 na 5'–, respektive 3'–konci. Polymerázové řetězové reakce s těmito oligonukleotidy se prováděly v přítomnosti 10% dimethylsulfoxidu. Fragment získaný PCR se štěpil NotI a HincII a začlenil mezi NotI a HpaI místa po proudu sekvencí kódujících lidský IgG1. Sekvence kódující cDNA lidského IgG1 kapa lehkého řetězce se pak začlenily po proudu od grp78 vodiče, s použitím HincII místa a dalších míst ve vektoru. Plazmid exprese, získaný těmito manipulacemi se skládal ze semisyntetického genu těžkého řetězce, následovaného vodicími grp78 sekvencemi, následovanými 35 cDNA sekvencemi kapa lehkého řetězce a polyadenylačními signály odvozenými od SV40 DNA fragmentu. Ve srovnání s transfekcí plazmidu kódujícího determinanty samotného těžkého řetězce, dala transfekce COS buněk s plazmidem exprese značně zlepšenou expresi determinantů těžkého řetězce.

40 K vytvoření bicistronového genu zahrnujícího chiméru těžký řetězec/receptor a lehký řetězec, sekvence proti proudu těžkého řetězce se nahradí jakýmkoli chimérním těžký řetězec/receptor genem zde popsaným.

## Příklad 2

Konstrukce CD4 receptorových chimér. Lidské  $\zeta$  (Weissman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 9709–9713 (1988b)) a  $\gamma$  (Küstner et al., J. Biol. Chem. 265, 6448–6452 (1990)) cDNA byly izolovány polymerázovou řetězovou reakcí z knihoven připravených z nádorové buněčné linie HPB–ALL (Aruffo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 8573–8577 (1987b)) a z lidských přirozených zabíječských buněk, zatímco  $\eta$  cDNA (Jin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3319–3323 (1990)) byla izolována z kuřecí thymocytové knihovny.  $\zeta$ ,  $\eta$ , a  $\gamma$  cDNA se připojily k extracelulární doméně manipulované formy CD4 obsahující BamHI místo právě po proudu domény překlenující membránu (Aruffo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 8573–8577 (1987b); Zettlmeissl et al., DNA Cell Biol. 9, 347–353 (1990)), která se připojila k BamHI místu přirozeně se vyskytujícímu v  $\zeta$  a  $\eta$  cDNA v podobné lokaci několik zbytků po proudu domény překlenující membránu (sekvence ID NOS: 1, 3, 4 a 6). K vytvoření fúzního proteinu s  $\gamma$ , BamHI místo se vytvořilo v přibližně stejné lokaci (obr. 1; sekvence ID NO: 2 a 5). Genové fúze se začlenily do plazmidu exprese vakcinia viru, nesoucího E. coli. gpt gen jako selektabilní marker, a začleněného do genomu vakcinia WR vlákna homologní rekombinací a selekcí pro růst v kyselině mykofenolové (Falkner et al., J. Viro. 62, 1849–1854 (1988); Boyle et al., Gene 65, 123–128 (1988)). Průtoková cytometrická analýza ukázala, že vakcinia rekombinanty řídí nadbytečnou produkci CD4: $\zeta$  a CD4: $\gamma$  fúzních proteinů na buněčném povrchu, zatímco exprese CD4: $\eta$  je podstatně slabší (Obr. 1B). Druhé zjištění je v souladu s nedávnou zprávou, že transfekce plazmidu exprese  $\eta$  cDNA do kuřecí hybridomové buněčné linie dalo podstatně nižší expresi než transfekce srovnatelného plazmidu  $\zeta$  exprese (Clayton et al., J. Exp. Med. 172, 1243–1253 (1990)). Imunoprecipitace buněk infikovaných vakcinia rekombinanty ukázala, že fúzní proteiny tvoří kovalentní dimery, na rozdíl od přirozeně se vyskytujícího CD4 antigenu. Molekulové hmoty monomerních CD4: $\zeta$  a CD4: $\gamma$  fúzních proteinů a nativní CD4 byly zjištěny 63, 55 a 53 kD. Vyšší hmoty fúzních proteinů jsou přibližně v souladu s větší délkou intracelulární domény, která přesahuje délku nativní CD4 o 75 (CD4: $\zeta$ ) nebo o 5 (CD4: $\gamma$ ) zbytků.

## Příklad 3

CD4 chiméry mohou asociovat s jinými receptorovými řetězci. Exprese na buněčném povrchu lidské formy Fc $\gamma$ RIII (CD16<sup>TM</sup>) makrofágu/přirozené zabíječské buňky na tansfektantech je usnadněna kotransfekcí s kuřecím (Kurosaki et al., Nature 342, 805–807 (1989)) nebo lidským (Hibbs et al., Science 246, 1608–1611 (1989))  $\gamma$ , stejně jako lidským  $\zeta$  (Lanier et al., Nature 342, 803–805 (1989)).

V souladu s touto zprávou, exprese chimér také umožňuje povrchovou expresi CD16<sup>TM</sup>, když je dodán cílovým buňkám buď kotransfekcí nebo koinfekcí rekombinantními vakcinia viry (Obr.2). Podpora CD16<sup>TM</sup> povrchové exprese  $\zeta$  byla výraznější než podpora  $\gamma$  (Obr. 2) ve studovaných buněčných liniích, zatímco nativní CD4 nezlepšila povrchovou expresi CD16<sup>TM</sup>.

## Příklad 4

Asp  $\zeta$  mutanti nekoasociují s Fc receptorem. Pro vytvoření chimér, které neasociují s existujícím antigenem nebo Fc receptorem, se připravily mutantní  $\zeta$  fúzní proteiny, které postrádají buď intramembránový Asp nebo intramembránový Cys zbytek, nebo oba. Průtoková cytometrie ukázala, že intenzita exprese na buněčném povrchu různými mutantními chimérami nebyla značně rozdílná od nemutovaného prekursoru, a imunoprecipitační experimenty ukázaly, že celková exprese chimérami byla podobná. Jak se očekávalo, mutantní chiméry postrádající transmembránový cysteinový zbytek, nevytvářely disulfidicky vázané dimery. Dvě mutantní chiméry postrádající Asp nebyly schopné podpořit povrchovou expresi CD16<sup>TM</sup>, zatímco monomerní chiméry

postrádající Cys ale nesoucí Asp, umožnily koexpresi CD16<sub>TM</sub>, ale s nižší účinností než parenterální dimer (Obr. 3).

#### 5 Příklad 5

Mutantní receptory zachovávají schopnost iniciovat vápníkovou odpověď. Pro určení, zda zesíťování fúzních proteinů umožní akumulaci volného intracelulárního vápníku podobným způsobem jako známý antigenový receptor T-lymfocytů, buňky leukemické linie lidských T-lymfocytů, Jurkat E6 (ATCC Accession Number TIB 152, American Type Culture Collection, Rockville, MD) byly infikovány vakcinia rekombinanty a po zesíťování extracelulární domény s protilátkami se změnila relativní koncentrace cytoplazmového vápníku. Průtoková cytometrická měření se prováděla s buňkami vystavenými na vápník senzitivnímu barvivu Indo-1 (Grynkiewicz et al., J. Biol. Chem. **260**, 3340–3450 (1985); Rabimovitch et al., J. Immunol. **137**, 952–961 (1986)). Obr. 4A–D ukazuje výsledky vápníkových průtokových experimentů s buňkami infikovanými CD4:ζ a Asp<sup>-</sup> a Cys mutanty ζ. Zesíťování chimér reprodukovatelně zdvihlo intracelulární vápník. CD4:η a CD4:γ podobně umožnily akumulaci intracelulárního vápníku v infikovaných buňkách. Jurkat buňky exprimují nižší úroveň CD4 na buněčném povrchu, avšak zesíťování nativní CD4 v přítomnosti nebo nepřítomnosti CD16:ζ nezměnilo úroveň intracelulárního vápníku (Obr. 4A–B).

#### Příklad 6

CD4:ζ, η a γ chiméry zprostředkovávají cytolyzu cílů exprimujících HIV gp120/41. Pro určení, zda chiménní receptory spouští cytolytické efektorové programy, vytvořil se modelový cíl:efektor systém založený na CD4 rozpoznávání HIV obálkového gp120/41 komplexu. HeLa buňky se infikovaly rekombinantními vakcinia viry exprimujícími gp120/gp41 (Chakrabarti et al., Nature **120**, 535–537 (1986); Earl et al., J. Virol. **64**, 2448–2451 (1990)) a značily <sup>51</sup>Cr. Značené buňky se inkubovaly s buňkami lidské allospecifické (CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>) cytotoxické T-lymfocytové linie, která byla infikována vakcinia rekombinanty exprimujícími CD4:ζ, CD4:η nebo CD4:γ chiméry, nebo CD4:ζcys1Gly:Asp15Gly dvojistou mutantní chiméru. Obr. 5A–C ukazuje že HeLa buňky exprimující gp120/41 se specificky lyzovaly cytotoxickými T-lymfocyty (CTL) exprimujícími CD4 chiméry. Neinfikované HeLa buňky nebyly zaměřovány CTL vyzbrojenými CD4:ζ chimérami, a HeLa buňky exprimující gp120/41 nebyly rozpoznávány neinfikovanými CTL. Pro srovnání účinnosti různých chimér, poměry mezi efektozem a cílem se korigovaly na frakci CTL exprimující CD4 chiméry a na frakci HeLa buněk exprimujících gp120/41, jak se měřilo průtokovou cytometrií. Obr. 5C ukazuje cytometrickou analýzu CD4 exprese CTL užitých v experimentu cytolyzy na obr. 5A a 5B. Ačkoli střední hustota povrchové CD4:ζ velmi převažovala střední hustotu CD4:η, cytolytické účinnosti buněk exprimujících obě formy byly podobné. S korekcí na frakci cílů exprimujících gp120, je účinnost cytolyzy zprostředkované CD4:ζ a CD4:η proteiny srovnatelná s nejlepšími účinnostmi uváděnými pro specifické páry T-lymfocytový receptorový cíl:efektor (střední poměr efektor k cíli pro 50% uvolnění T-lymfocytů exprimujících CD4:ζ byl  $1,9 \pm 0,99$ , n = 10). CD4:γ fúze byla méně aktivní, stejně jako CD4:ζ fúze bez transmembránových Asp a Cys zbytků. Nicméně v obou případech byla pozorována signifikantní cytolyza (Obr. 5B–C).

Pro ověření možnosti, že infekce vakcinií může vyvolat artefaktuální rozpoznání CTL, podobné cytolytické experimenty se prováděly s cílovými buňkami infikovanými vakcinia rekombinanty exprimujícími fosfatidylinositolem vázané formy CD16 (CD16<sub>PI</sub>) a značené <sup>51</sup>Cr, a s CTL infikovanými kontrolními rekombinanty exprimujícími buď C16<sub>PI</sub>, nebo CD16:ζ. Obr. 6A ukazuje že T-lymfocyty exprimující non-CD4 chiméry nerozpoznávají nativní HeLa buňky exprimující gp120/41, a T-lymfocyty exprimující CD4 chiméry nerozpoznávají HeLa buňky exprimující jiné

vakcinia-kódované povrchové proteiny. Navíc, CTL exprimující non-chimérní CD4 nelyzují podstatně HeLa buňky exprimující gp120/41 (Obr. 6A).

## 5 Příklad 7

Buňky nesoucí MHC třídy II nejsou cílem pro chiméry. CD4 pravděpodobně interaguje s nepolymorfní sekvencí exprimovanou MHC antigenem II třídy (Gay et al., *Nature* **328**, 626–629 (1987); Sleckman et al., *Nature* **328**, 351–353 (1987)). Ačkoliv specifická interakce mezi CD4 a antigenem třídy II nikdy nebyla dokumentována s čistými proteiny, za určitých podmínek adheze mezi buňkami exprimujícími CD4 a buňkami exprimujícími molekuly třídy II se může demonstrovat (Doyle et al., *Nature* **330**, 256–259 (1987); Clayton et al., *J. Exp. Med.* **172**, 1243–1253 (1990); Lamarre et al., *Science* **245**, 743–746 (1989)). Dále se zkoumalo, zda se může detekovat zabíjení proti buňkám nesoucím antigen třídy II. Obr. 6B ukazuje, že není specifická cytolyza řízená CD4:ζ proti Raji linii B-lymfocytů, které exprimují nadbytečný antigen třídy II. Ačkoliv mírná cytolyza ( $\approx 5\%$ ) se pozoruje, třída II negativní Raji mutant, RJ2.2:5, (Accolla, *J. Exp. Med.* **157**, 1053–1058 (1983)) ukazuje podobnou citlivost jako Raji buňky inkubované s neinfikovanými T-lymfocyty.

20

## Příklad 8

Sekvenční požadavky pro indukci cytolyzy zeta řetězcem antigenu T-lymfocyt/Fc receptor. Ačkoliv chiméry mezi CD4 a ζ mohou vyzbrojit cytotoxické T-lymfocyty (CTL) ke zničení cílových buněk exprimujících HIV gp120, alternativně k CD4 se hledalo srovnání vlastností zeta chimér začleněných do lidské linie T-lymfocytů. Takové linie exprimují CD4 a znesnadňují specifické definování vztahu mezi typem a stupněm mobilizace vápníku a cytolytickým potenciálem různých chimér. Po překonání tohoto, se vytvořily chiméry mezi ζ a CD16, ve kterých extracelulární doména CD16 se váže na transmembránovou a intracelulární sekvenci ζ (Obr. 7A). Genové fúze se začlenily do plazmidu exprese vakcinia viru nesoucího E. coli gpt gen jako selektabilní marker a zavedly do genomu WR vlákna vakcinia homologní rekombinací a selekcí na růst v mykofenolové kyselině (Falkner a Moss, *J. Virol.* **62**, 1849 (1988); Boyle a Coupar, *Gene* **65**, 123 (1988)).

Linie T-lymfocytů se infikovaly vakcinia rekombinanty a po zesíťování extracelulárních domén s protilátkami se měřila relativní koncentrace cytoplazmových volných vápenatých iontů. Jak spektrofotometrické (objemná populace), tak průtokové cytometrické (jednotlivé buňky) měření se prováděla s buňkami vystavenými barvivu Indo-1 (Grynkiewicz et al., *J. Biol. Chem.* **260**, 3440 (1985); Rabinovitch et al., *J. Immunol.* **137**, 952 (1986)). Obr. 7B ukazuje analýzu údajů získaných z buněk Jurkat leukemie lidské T-lymfocytové linie infikované vakcinia rekombinanty exprimujícími CD16:ζ fúzní protein. Zesíťování chimér reprodukcibilně zvyšovalo intracelulární vápník, zatímco podobné manipulování s buňkami exprimujícími nechimérní CD16 mělo malý nebo žádný efekt. Když se chiméra exprimovala v mutantní buněčné linii bez antigenového receptoru, buď REX33A (Bretmeyer et al., *J. Immunol.* **138**, 726 (1987); Sancho et al., *J. Biol. Chem.* **264**, 20760 (1989)), nebo Jurkat mutant JRT3.T3.5 (Wess et al., *J. Immunol.* **135**, 123 (1984)), pozorovala se silná odezva na zesíťování CD16 protilátky. Podobné údaje se získaly na REX20A (Bretmeyer et al., *supra*, 1987; Blumberg et al., *J. Biol. Chem.* **265**, 14036 (1990)) mutantní buněčné linii a CD3/Ti negativní mutantní Jurkat buněčné linii zavedené v této laboratoři. Infekce rekombinanty exprimujícími CD16:ζ neobnovují odpověď na anti-CD3 protilátku, ukazují tak, že fúzní protein nepůsobí uvolnění intracelulárních řetězců CD3 komplexu.

Pro zhodnocení schopnosti chimér přeměňovat buňkami zprostředkovanou imunitu, CTL se infikovaly vakcinia rekombinanty exprimujícími CD16 chiméry a užily ke specifické lýze hybridomových buněk exprimujících na membránu vázané anti-CD16 protilátky. Tento test je rozšíře-

- ním testu hybridomové cytotoxicity původně vyvinutého pro analýzu efektorových mechanismů buněk nesoucích Fc receptory (Graziano a Fanger, J. Immunol. 138, 945 (1987); Graziano a Fanger, J. Immunol. 139, 35–36 (1987); Shen et al., Mol. Immunol. 26, 959 (1989); Fanger et al., Immunol Today 10, 92 (1989)). Obr. 8B ukazuje, že exprese CD16:ζ v cytotoxických T-lymfocytech umožňuje vyzbrojeným CTL zničit 3G8 (anti-CD16; Fleit et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 3275 (1982)) hybridomové buňky, zatímco CTL exprimující fosfatidylinositolem vázanou formu CD16 jsou neaktivní. CTL vyzbrojené CD16:ζ také nezabíjejí hybridomové buňky exprimující irelevantní protilátku.
- Pro identifikaci minimální ζ sekvence nutné pro cytolyzu, se připravily série delečních mutantů, ve kterých se postupně z karboxylového konce odstranilo více z ζ intracelulární domény (Obr. 8A). Většina intracelulární domény zeta se může odstranit s malými důsledky pro cytolytický potenciál; plná délka chiméry CD16:ζ je v podstatě rovna v účinnosti chiméře deletované ke zbytku 65, CD16:ζAsp66\* (Obr. 8B). Podstatný pokles cytotoxicity se pozoroval při deleci ke zbytku 59 (chiméra CD16:ζGlu60\*) a další delece ke zbytku 50 vyústily v ještě menší aktivitu. Nicméně úplná ztráta aktivity se nepozorovala, i když intracelulární doména se redukovala na třízbytkové transmembránové ukotvení (Obr. 8B).
- Protože ζ je disulfidicky vázaný dimer, jedno vysvětlení pro retenci cytolytické aktivity bylo, že endogenní ζ vytvářela heterodimery s chimérní ζ delecí, tak uchovávají aktivitu. Pro ověření této ideje, ζ zbytky 11 a 15 se změnilý z Asp na Cys, respektive Gly (Cys11Gly/Asp15Gly) a imunoprecipitace se provedla podle následujícího. Přibližně  $2 \times 10^6$  CV1 buněk se infikovalo jednu hodinu v séru zbaveném DME médiu rekombinantní vakcínou při multiplicitě infekce (moi) nejméně deset. Šest až osm hodin po infekci se buňky oddělily z místiček působením PBS/1mM EDTA a povrchově značily  $0,2 \text{ mCi } ^{125}\text{I}$ , na  $2 \times 10^6$  buněk s použitím laktoperoxidázy a  $\text{H}_2\text{O}_2$  metodou podle Clarka a Einfelda (Leukocyte Typing II, str. 155–167, Springer-Verlag, NY, 1986). Značené buňky se centrifugovaly a lyzovaly v 1% NP-40, 0,1% SDS, 0,15M NaCl, 0,05M Tris, pH 8,0, 5mM  $\text{MgCl}_2$ , 5mM KCl, 0,2M jodacetamid a 1mM PMSF. Jádra se odstranila centrifugací, CD16 proteiny se imunoprecipitovaly s protilátkou 3G8 (Fleit et al., supra, 1982; Medarex) a anti-myší IgG agarózou (Cappel, Durham, NC). Vzorky se dělily elektroforeticky v 8% polyakrylamidovém SDS gelu za neredukujících podmínek nebo na 10% gelu za redukujících podmínek. Tato imunoprecipitace potvrdila, že CD16:ζ Cys11Gly/Asp15Gly chiméra neasociuje v disulfidicky vázané dimerní struktuře.
- Také se testovala cytolytická aktivita mutantních receptorů. Mutované chiméry deletované ke zbytku 65 (CD16:ζ Cys11Gly/Asp15Gly/Asp66\*) byly, v závislosti na podmínkách testu, dva až osmkrát méně aktivní při cytolytickém testu než srovnatelné nemutované chiméry (CD16:ζAsp66\*), což bylo obvykle v rámci faktoru dvě, nebo nerozlišitelné v aktivitě od CD16:ζ (Obr. 9B). Snížení aktivity mutantních chimér je srovnatelné s poklesem pozorovaným u CD4 chimér podobné struktury (viz výše) a je nejpravděpodobněji způsobeno nižší účinností ζ monomerů ve srovnání s dimery. Oproti tomu Asp<sup>-</sup>, Cys<sup>-</sup> mutované chiméry deletované ke zbytku 59 neměly žádnou cytolytickou aktivitu (Obr. 9B), což potvrzuje hypotézu, že asociace s jinými řetězci zprostředkovaná transmembránovými Cys a/nebo Asp zbytky je zodpovědná za slabou perzistenci cytolytické aktivity při delecích více zbytků aminového konce než 65.
- Studie průtokové cytometrie ukázaly, že deleční mutanty postrádající transmembránové Asp nebo Cys zbytky mohou stále způsobovat nárůst volných intracelulárních vápenatých iontů v odpovědi na zesíťování protilátek v TCR<sup>-</sup> mutantní Jurkat buněčné linii (Obr. 9D). Podobné výsledky se získaly pro chiméry exprimované v rodičovské Jurkat linii. V případě CD16:ζ Cys11Gly/Asp15Gly/Glu60\* tyto údaje demonstrují, že schopnost zprostředkovat vápníkovou odpověď může být mutantně separována od schopnosti podporovat cytolyzu.
- Pro konečnou eliminaci možného přispění ζ transmembránového zbytku, transmembránové a prvních 17 cytoplazmových zbytků ζ se nahradilo sekvencemi kódujícími membránové pnutí

a prvních 14 nebo prvních 17 cytoplazmových zbytků CD5 nebo CD7 antigenů, respektive (Obr. 9A). Výsledné tripartitní fúzní proteiny CD16:5:ζ(48–65) a CD16:7:ζ(48–65) netvořily disulfidicky vázané dimery jako jednodušší CD16:ζ chiméry, protože postrádaly cysteinový zbytek v ζ transmembránové doméně. Obě tripartitní chiméry byly schopné mobilizovat vápník a Jurkat a TCR negativních buněčných liniích (Obr. 9D) a způsobit cytolytickou odpověď v CTL (Obr. 9C a údaje neudávané). Nicméně zkrácení ζ domény na zbytek 59 v chiméře CD16:7:ζ(48–65) ruší schopnost tripartitní fúze řídit vápníkovou odpověď v TCR pozitivních nebo negativních Jurkat buňkách nebo cytolyzu v maturovaných CTL (Obr. 9C a 9D a údaje neudávané).

Pro ověření příspěvku individuálních zbytků v rámci 18–zbytkového motivu, se připravilo množství mutantních variant místně řízenou mutagenezí a hodnotila se jejich schopnost zprostředkovat receptorově řízené zabíjení za podmínek nízké (Obr. 10A a 10D) nebo vysoké (Obr. 10B a 10E) exprese chimérního receptoru. Obr. 10A–F ukazuje, že zatímco množství relativně konzervativních substitucí (tzn. nahrazení kyselinových zbytků jejich amidy, nebo tyrosinu fenylalaninem), které překlenulo zbytky 59 až 63, poskytlo průměrný kompromis cytolytické účinnosti, obecně varianty zachovaly schopnost mobilizovat vápník. Nicméně souborně tyto zbytky zahrnují důležitý submotiv, neboť jejich delece eliminuje cytolytickou aktivitu. Konverze Tyr 62 buď na Phe nebo Ser eliminovala jak cytotoxickou, tak vápníkovou odpověď. Na amino–konci 18–zbytkového segmentu, nahrazení Tyr 51 Phe zrušilo jak mobilizaci vápníku, tak cytolytickou aktivitu, zatímco substituce Leu Ser v poloze 50 eliminovala vápníkovou odpověď s pouze částečným zmenšením cytolyzy. Bez návaznosti na podrobnou hypotézu se předpokládá, že neschopnost Leu50Ser mutantu mobilizovat vápník v krátkém termínu průtokového cytometrického testu neodráží plně jeho schopnost zprostředkovat podstatný nárůst volných intracelulárních vápenatých iontů během delšího času cytolytického testu. Nicméně, na vápník necitlivá cytolytická aktivita byla popsána pro některé linie cytolytických T–lymfocytů a možnost, že podobný jev popisují dosažené výsledky, není vyloučena. Nahrazení Asn48 Ser částečně zmenšuje cytotoxicitu v některých experimentech, zatímco v jiných má pouze malý efekt.

Pro studium potenciální role přebytných sekvenčních elementů, se intracelulární doména ζ rozdělila na tři segmenty, překlenující zbytky 33 až 65, 71 až 104 a 104 až 138. Každý z těchto segmentů se připojil na CD16:CD7 chiméru prostřednictvím MluI místa zavedeného právě distálně k základní membránu kotvící sekvenci intracelulární domény CD7 (viz níže; Obr. 11A). Srovnání cytolytické účinnosti tří elementů ukázalo, že jsou v podstatě rovnocenné (Obr. 11B). Sekvenční srovnání (Obr. 11A) ukazuje, že druhý motiv nese jedenáct zbytků mezi tyrosinem, zatímco první a třetí motiv nesou deset.

Ačkoliv precizní vysvětlení procesu aktivace T–lymfocytů nebylo provedeno, je zřejmé, že agregace antigenového receptoru, nebo receptoru chiméry, která nese ζ intracelulární sekvence, spouští mobilizaci vápníku, uvolnění cytokinu a granulí a objevení se markerů aktivace na buněčném povrchu. Aktivní místo ζ, krátká lineární peptidová sekvence, pravděpodobně příliš malá pro vlastní enzymovou aktivitu, pravděpodobně interaguje s jedním, maximálně několika proteiny za zprostředkování celulární aktivace. Je také zřejmé, že mobilizace volného vápníku není sama o sobě dostačující pro buněčnou aktivaci, neboť schopnost zprostředkovat cytolyzu může být mutačně separována od schopnosti zprostředkovat akumulaci vápníku.

Jak se zde ukazuje, adice 18 zbytků z intracelulární domény ζ na transmembránovou a intracelulární doménou dvou nezávislých proteinů umožňuje výsledným chimérám přeměňovat cytolytickou aktivitu proti cílovým buňkám, které se vážou na extracelulární doménu fúzních proteinů. Ačkoliv chiméry nesoucí 18–zbytkový motiv jsou přibližně osmkrát méně aktivní než chiméry založené na ζ o plné délce, redukováná aktivita se přičítá ztrátě transmembránových interakcí které normálně umožňují divokému typu ζ tvořit disulfidicky vázané dimery. To znamená, že deleční konstrukty, které mají stejný karboxylový konec jako motiv a postrádají transmembrá-

nové Cys a Asp zbytky, typicky vykazují lehce nižší aktivitu než chiméry nesoucí pouze 18 zbytkový motiv.

Element cytolytické kompetence, na který jsme se zaměřili, má dva tyrosiny a žádný serin nebo

- 5 threonin, omezující možný příspěvek fosforylace k aktivitě. Mutace jednotlivého tyrosinu ničí aktivitu, nicméně, ačkoliv předběžné experimenty neukazují na podstatnou tyrosinovou fosforylaci po zesíťování antigenů chimerního povrchu nesoucích 18-zbytkový motiv, možná participace takové fosforylace na nízké úrovni nemůže být vyloučena. Navíc k efektům zaznamenaným u dvou tyrosinových zbytků, množství nahrazení aminokyselin na aminovém a karboxylovém konci motivu oslabuje aktivitu za podmínek nízké hustoty receptorů.

- 15 Sekvence podobné aktivnímu motivu  $\zeta$  jsou nacházeny v cytoplazmových doménách několika dalších transmembránových proteinů, včetně CD3  $\delta$  a  $\gamma$  řetězců vysokoafinitního IgE receptoru Fc $\epsilon$ RI (Reth, Nature 338, 383 (1989)). Ačkoliv funkce těchto sekvencí není jistá, při účinné expresi může každá být schopná autonomní aktivace T-lymfocytů, a taková aktivita vysvětluje reziduální TCR odpověď pozorovanou v mutované buněčné linii zeta-negativní (Sussman et al., Cell 52, 85 (1988)).

- 20  $\zeta$  Sama o sobě nese tři takové sekvence, přibližně rovnoměrně rozložené a hrubá trisekce intracelulární domény ukazuje, že každá je schopná iniciování cytolytické odpovědi.  $\eta$ , spletená izoforma  $\zeta$  (Jin et al., viz výše, 1990; Clayton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 5202 (1991)), postrádá karboxylovou půlku prvního motivu. Protože odstranění karboxylové půlky prvního motivu ničí aktivitu, ukazuje se pravděpodobně, že majorita biologické účinnosti  $\eta$  může být přičtena prvním dvěma motivům. Ačkoliv podle rozdílných měření  $\eta$  je stejně aktivní jako  $\zeta$  při vyvolávání antigenem zprostředkovaného uvolnění cytokinu (Bauer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 38412 (1991)) nebo přesměrované cytolyzy (viz výše),  $\eta$  není fosforylován v odpověď na receptorovou stimulaci (Bauer et al., viz výše, 1991). Tak buď přítomnost všech tří motivů je požadována pro fosforylaci, nebo třetí motiv představuje favorizovaný substrát pro neidentifikovanou tyrosinkinázu.

30

#### Příklad 9

- 35 Transdukce cytolytického signálu lidským Fc receptorem. Pro zhodnocení působení různých subtypů lidských Fc receptorů se vytvořily chimerní molekuly, jejichž extracelulární doména lidského CD4, CD5 nebo CD16 antigenu se spojily s transmembránovými a intracelulárními doménami subtypů FcRII $\gamma$ A, B1, B2 a C (nomenklatura dle Ravetch a Kinet, Ann. Rev. Immunol. 9, 457 (1991)). Specificky, cDNA sekvence odpovídá transmembránovým a cytoplazmovým doménám dříve popsáných FcRII $\gamma$ A, B1 a B2 izoform se amplifikovaly z již existujícího klonu PC23 a z cDNA lidské tonsilové knihovny (konstruované standardními technikami) za použití následujících syntetických oligonukleotidových primerů:

40

CCC GGA TCC CAG CAT GGG CAG CTC TT (sekvence ID NO: 18; FcRII A dopředná);

CGC GGG GCG GCC GCT TTA GTT ATT ACT GTT GAC ATG GTC GTT (sekvence ID NO: 19; FcRII A reverzní);

GCG GGG GGA TCC CAC TGT CCA AGC TCC CAG CTC TTC ACC G (sekvence ID NO: 20; FcRII B1 a FcRII B2 dopředná);

a GCG GGG GCG GCC GCC TAA ATA CGG TTC TGG TC (sekvence ID NO: 21; FcRII B1 a FcRII B2 reverzní).

Tyto primery obsahovaly místa štěpení pro enzymy BamHI respektive NotI, umístěná 6 zbytků od 5'-konce. NotI místo bylo ihned následováno antisenzním stop-kodonem, buď CTA, nebo TTA. Všechny primery obsahovaly 18 nebo více zbytků komplementárních k 5'- a 3'-koncům žádaných fragmentů. Fragment cDNA odpovídající FcR $\gamma$ C cytoplazmové doméně, který se liší od IIA izoformy pouze v jednom aminokyselinovém zbytku (L místo P, zbytek 268), byl generován místně řízenou mutagenezí přesahující PCR s použitím primerů o sekvenci:

TCA GAA AGA GAC AAC CTG AAG AAA CCA ACA A (sekvence ID NO: 22);

a TTG TTG GTT TCT TCA GGT TGT GTC TTT CTG A (sekvence ID NO: 23).

PCR fragmenty se včlenily do vektorů exprese vakcinia viru, které obsahovaly CD16 respektive CD4 extracelulární domény, a následně se zapojily do divokého typu vakcinia rekombinací v místě thymidinkinázy, s použitím sekvence pro kointegraci E. coli gpt k usnadnění identifikace žádaných rekombinantů. Identity všech izoform (viz obr. 12) se ověřily dideoxy sekvencováním.

Produkce proteinů chimérního receptoru se dále potvrdila imunoprecipitačními studiemi. Přibližně  $10^7$  JRT3.T3.5 buněk se infikovalo jednu hodinu v médiu bez séra IMDM rekombinantní vakcíní s multiplicitou infekce nejméně deset. Dvanáct hodin po infekci se buňky sebraly a povrchově značily  $0,5\text{mCi}^{125}\text{I}$  na  $10^7$  buněk s použitím metody laktoperoxidázy/glukozoxidázy (Clark a Einfeld, viz výše). Označené buňky se oddělily centrifugací a CD16 fúzní proteiny imunoprecipitovaly s protilátkami 4G8 a anti-myší IgG agarózy. Vzorky se dělily elektroforeticky za redukujících podmínek. (sekvence ID NO: 21). Všechny imunoprecipitované molekuly chimérního receptoru byly v předkládaných molekulových hmotách.

Pro testování schopnosti chimérních receptorů zprostředkovat nárůst volných cytoplazmových vápenatých iontů se použily rekombinantní viry k infekci TCR $^-$  mutantní Jurkat buněčné linie JRT3.T3.5 (jak je zde popsáno) a volný cytoplazmový vápník se měřil v buňkách (jak je zde popsáno) po zesíťování receptorových extracelulárních domén s monoklonální protilátkou 3G8 nebo Leu-3A (jak je zde popsáno). Tyto experimenty ukázaly, že intracelulární domény FcR $\gamma$ II A a C jsou schopné zprostředkovat nárůst volných cytoplazmových vápenatých iontů, po zesíťovaných extracelulárních domén, zatímco intracelulární domény FcR $\gamma$ II B1 a B2 byly za srovnatelných podmínek neaktivní (Obr. 13A a 13B). CD4, CD5 a CD16 hybridy FcR $\gamma$ II A sdílejí esenciálně rovnou kapacitu k vyvolání vápníkové odpovědi (Obr. 13A–B). Jiné buněčné linie, jak monocytové, tak lymfocytové, byly schopné odpovídat na signály iniciované zesíťováním extracelulárních domén.

Ke studiu zapojení různých FcR $\gamma$ II intracelulárních domén při cytolyze, se lidské cytotoxické lymfocyty (CTL) infikovaly vakcinia rekombinanty exprimujícími CD16:FcR $\gamma$ II A, B1, B2 a C chiméry. Infikované buňky se poté kultivovaly s  $^{51}\text{Cr}$  vystavenými hybridomovými buňkami (tzv. 3G8 10–2 buňky), které exprimovaly povrchové protilátky k CD16. V tomto testu CTL nesoucí CD16 chiméry zničily hybridomové cílové buňky (umožnily uvolnění volného  $^{51}\text{Cr}$ ), když se CD16 extracelulární doména chiméry spojila s intracelulárním segmentem schopným aktivovat lymfocytový efektorový program; tento cytolytický test je detailně popsán níže. Obr. 14A ukazuje, že CTL vyzbrojené CD16:FcR $\gamma$ II A a C, ale ne FcR $\gamma$ II B1 nebo B2, jsou schopny lýzovat cílové buňky exprimující na buněčném povrchu anti-CD16 protilátku.

Pro eliminaci možnosti, že specifická cytolyza je nějakým způsobem svázaná s interakcí s CD16 skupinou, se provedly cytolytické experimenty, ve kterých se FcR $\gamma$ II intracelulární domény připojily k CD4 extracelulární doméně. V tomto případě cílové buňky byly HeLa buňky exprimující HIV-obálkové gp120/41 proteiny (specificky HeLa buňky infikované vektorem vPE16 vakcinie; National Institute of Allergy and Infections Disease AIDS Depository, Bethesda, MD). Jako v CD16 systému, cílové buňky exprimující HIV obálku byly lýzovány T-lymfocyty exprimujícími CD4:FcR $\gamma$ II A chiméru, ale ne FcR $\gamma$ II B1 nebo B2 (Obr. 14B).

Intracelulární domény FcRγII a a C nesdílejí žádnou patrnou sekvenční homologii s jiným proteinem, včetně členů rozsáhlé FcRγ/TCRζ rodiny. Pro definování sekvenčních elementů zodpovědných za indukci cytolyzy, se připravily 5' – a 3'–delece kódujících sekvencí intracelulární domény (popsány níže a ukázaly na Obr. 15A) a v cytolytických testech se hodnotila jejich účinnost mobilizovat vápník (jak se zde popisuje). Při experimentech s odstraněnou terminální amino–koncovou doménou intracelulární domény se transmembránová doména FcRγII nahradila transmembránovou doménou nezávislého CD7 antigenu k eliminaci možného přispění interakcí zprostředkovaných doménou membránového pnutí.

Obr. 15B a 15C ukazují, že odstranění 14 zbytků karboxylového konce, včetně tyrosinu 298 rezultovalo v úplnou ztrátu cytolytické kapacity a podstatnou redukci potenciálu vápníkové mobilizace. Další delece před tyrosin 282 poskytly identický fenotyp (Obr. 15B a 15C). Delece od N–konce intracelulární domény ke zbytku 268 neměla podstatný efekt ani na vápníkový profil, ani na cytolytickou schopnost, zatímco delece ke zbytku 275 značně snížila uvolňování volného vápníku, ale měla malý vliv na cytolyzu (Obr. 15D a 15E). Další delece, ke zbytku 282, poskytla FcRγII konce, které postrádaly schopnost mobilizovat vápník i spouštět cytolyzu (Obr. 15D a 15E). „Aktivní prvek“ definovaný těmito hrubými měřeními je relativně velký (36 aminokyselin) a obsahuje dva tyrosiny oddělené 16 zbytky.

#### Příklad 10

Další spouštěcí proteiny receptoru T–lymfocyty a B–lymfocyty. Další intracelulární a transmembránové signály převádějící domény podle vynálezu jsou odvozeny do proteinů receptoru T–lymfocyty, CD3 delta a T3 gamma a od proteinů receptoru B–lymfocyty, mbl a B29. Aminokyselinové sekvence těchto proteinů jsou ukázány na Obr. 16 (CD3 delta; sekvence ID NO: 24), Obr. 17 (T3 gamma; sekvence ID NO: 25), Obr. 18 (mbl; sekvence ID NO: 26) a Obr. 19 (B29; sekvence ID NO: 27). V závorkách jsou uvedeny domény sekvencí postačujících pro transdukcii cytolytického signálu (a tak přednostně začleněné do chiméřního receptoru podle vynálezu). Chiméřní receptory, které zahrnují tyto proteinové domény, jsou konstruovány a používány při výše obecně popsaných terapeutických metodách podle vynálezu.

#### Příklad 11

CD28 chiméřní receptory. Protože aktivace T–lymfocytů se ukázala být zvýšena účastí CD28, vynález také zahrnuje terapeutické buňky exprimující páry chiméřních receptorů: první chiméra obsahuje extracelulární doménu CD28 a druhá chiméra obsahuje jakoukoli intracelulární nebo transmembránovou signál převádějící doménu zde popsanou. V dané dvojici chiméřních receptorů jsou extracelulární domény identické (například odvozené pd CD4 proteinu, a tak obě rozpoznávají HIV nebo HIV–infikované buňky), nebo každá je navrhovaná pro rozpoznávání jiné cílové molekuly na povrchu buňky nebo patogenu.

Ve zvláštním příkladu dvojice chimér zahrnuje dvě rozdílné extracelulární domény, z nichž každá rozpoznává určitou antigenovou charakteristiku cílového nádoru. Příklady nádorových antigenů zahrnují, bez omezení, jakýkoli z množství cukrů (např. Le<sup>Y</sup>, sialyl–Le<sup>Y</sup>, L<sup>x</sup>e a sialyl–Le<sup>x</sup>), karcinoembryonický antigen, CD40, modifikovaný CD44, α–fetoprotein, T a Tn, antigeny, tenascin a receptory růstového faktoru (např. HER2/neu). Zvyšování počtu markerů nádorového povrchu, které musí být rozpoznány k vyvolání potentní destruktivní odpovědi, tento přístup zvyšuje terapeutickou specifitu snížením podobnosti a frekvence destrukce nekarzinogenních buněk.

Tato metoda kombinatorické kontroly se vztahuje na jakékoli množství kooperujících chiméřních receptorů a používá se pro regulaci jakékoli terapeutické metody podle vynálezu.

CD28 chiméry jsou konstruovány a exprimovány podle metod zde popsanych. CD28 sekvence je uvedena (Aruffo a Seed, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 8573–8577 (1987)). Také jsou v tomto odkaze zahrnuty popisy CD28 intracelulárních a transmembránových domén. Příklad chiméry nesoucí intracelulární CD28 doménu je uveden (Romeo et al., Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biol. LVII, 117–125 (1992)).

#### Příklad 12

Experimentální metody. Vakcinia infekce a radioimunoprecipitace. Přibližně  $5 \times 10^6$  CV1 buněk bylo infikováno jednu hodinu v DME médiu bez séra rekombinantní vakcínou s multiplicitou infekce (moi) nejméně deset (titr měřen na CV1 buňkách). Po infekci se buňky umístily do čerstvého média a značily metabolicky  $200 \mu\text{Ci/ml}$   $^{35}\text{S}$ -methioninem plus cysteinem (Trans $^{35}\text{S}$ -značení, ICN; Costo Mesa, CA) v methioninu a DMEM bez cysteinu (Gibco; Grand Island, NY) šest hodin. Značené buňky se oddělily působením PBS obsahujícím 1mM EDTA jímaly centrifugací a lýzovaly v 1% NP-40, 0,1% SDS, 0,15M NaCl, 0,05M Tris pH 8,0, 5mM EDTA a 1mM PMSF. Jádra se odstranila centrifugací a CD4 proteiny imunoprecipitovaly s OKT4 protilátkou a anti-myší IgG agarózou (Cappel, Durham, NC). Vzorky se čistily elektroforeticky na 8% polyakrylamid/SDS gelech za neredukujících (NR) a redukujících (R) podmínek. Před autoradiografií se gely obsahující  $^{35}\text{S}$ -značené vzorky impregnovaly En<sup>3</sup> Hance (New England Nuclear, Boston, MA). Usnadněná exprese transmembránové formy CD16, CD16<sub>TM</sub>, se měřila porovnáním exprese v CV1 buňkách jednotlivě infikovaných CD16<sub>TM</sub> s expresí v buňkách koinfikovaných viry kódujícími CD16<sub>TM</sub> a  $\zeta$  nebo  $\gamma$  chimérami. Po infekci a inkubaci šest hodin nebo déle se buňky oddělily s místiček působením PBS, 1mM EDTA a exprese CD16<sub>TM</sub> nebo chimér se měřila nepřímou imunofluorescencí a průtokovou cytometrií.

Test toku vápníku. Jurkat podlinie E6 (Weiss et al., J. Immuno. 133, 123–128 (1984)) buňky se infikovaly rekombinantními vakcinia viry jednu hodinu v IMDM bez séra při moi 10 a inkubovaly se tři až devět hodin v IMDM, 10% FSB. Buňky se jímaly centrifugací a resuspendovaly při  $3 \times 10^6$  buněk/ml v kompletním médiu obsahujícím 1mM Indo-1 acetomethoxyester (Grynkiewicz et al., J. Biol. Chem. 260, 3340–3450 (1985)) (Molecular Probes) a inkubovaly při 37 °C 45 minut. Buňky vystavené Indo-1 se peletovaly a resuspendovaly při  $1 \times 10^6$ /ml v IMDM bez séra a skladovaly při teplotě místnosti bez přístupu světla. Buňky se analyzovaly na přítomnost volných vápenatých iontů simultánním měřením fialové a modré fluorescenční emise průtokovou cytometrií (Rabinovitch et al., J. Immunol 137, 952–961 (1986)). Pro iniciaci toku vápníku se k suspenzi buněk přidaly buď fykoerythrinem (PE)-konjugované Leu-3A (anti-CD4) (Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ) (1  $\mu\text{g/ml}$ ) a následně 10  $\mu\text{g/ml}$  nekonjugovaných kozích anti-myších IgG v čase 0, nebo se k suspenzi buněk přidala nekonjugovaná 3G8 (anti-CD16) monoklonální protilátka (1  $\mu\text{g/ml}$ ) a následně 10  $\mu\text{g/ml}$  PE-konjugovaných Fab<sub>2</sub>' kozích anti-myších IgG v čase 0. Histogram poměru fialové/modré emise se jímaly od PE pozitivní (infikované) buněčné populace, která typicky reprezentovala 40–80 % všech buněk. Odpověď receptoru antigenu T-lymfocyty v neinfikovaných buňkách se spouštěla protilátkou OKT3, bez zesíťování. Pro experimenty zahrnující CD16 chimérní receptory, se z analýzy vyloučily vzorky vykazující drift baseliny oproti nižšímu intracelulárnímu vápníku (bez protilátky). Histogramové údaje se následně analyzovaly konverzí binárních údajů do ASCII s pomocí Write Hand Man (Cooper City, FL) softwaru a následovala analýza souborem programů FORTRAN. Pro ustavení normalizovaného počátečního poměru se použily poměr fialové/modré emise před adicí druhých protilátkových činidel, stanovil se roven jednotce a zbývající prahový poměr se stanovil tak, aby 10 % zbývající populace přesahovalo práh.

Cytolytický test. Linie WH3 lidských T-lymfocytů, CD8<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> HLA B44 cytolytická linie se obarvila v IMDM, 10% lidskému séru s 100 U/ml IL-2 a periodicky stimulovala buď nespecificky ozářenými (300 rad) HLA-nesdruženými obvodovými krevními lymfocyty a 1  $\mu\text{g/ml}$  fytohematoglutininem, nebo specificky, ozářenými B44-nesoucími mononukleárními buňkami. Po

jednom dni nespecifické stimulace se PHA zředil na 0,5 µg/ml adicí čerstvého média a po třech dnech se médium měnilo. Buňky rostly nejméně 10 dní po stimulaci před použitím v testech na cytotoxicitu. Buňky se infikovaly rekombinantní vakcínou s multiplicitou infekce nejméně 10 jednu hodinu v médiu bez séra, následovala inkubace v kompletním médiu tři hodiny. Buňky se  
 5 jímaly centrifugací a resuspendovaly při hustotě  $1 \times 10^7$  buněk/ml. Ke každé místičce na U-mikrotitrové destičce obsahující 100 µl/mističku kompletního média se přidalo 100 µl. Buňky se ředily ve dvou násobných sériových krocích. Dvě místičky pro každý vzorek neobsahovaly lymfocyty, aby umožnily spontánní uvolnění chromu a změřil se totální příjem chromu. Cílové buňky z HeLa podlinie S3 se infikovaly na 6,0 a 9,0 destičkách s přibližnou  $10^6$  jednu hodinu  
 10 v médiu bez séra, následovala inkubace v kompletním médiu tři hodiny. Potom se oddělily od násobek působení PBS, 1mM EDTA a počítaly Alikvot  $10^6$  cílových buněk HeLa, Raji, nebo RJ2.2.5 buňky pro experimenty s CD4 chimérickými receptory s 3G8 10–2 buňky; Shen et al., Mol. Immunol. 26, 959 (1989) pro experimenty s CD16 chimérickými receptory) se centrifugoval a resuspendoval v 50 µl sterilního  $^{51}\text{Cr}$ -chromanu sodného (1mCi/ml, Dupont Wilmington, DE)  
 15 jednu hodinu při 37 °C za střídavého míchání, potom se promyl třikrát s PBS. Ke každé místičce se přidalo 100 µl značených buněk resuspendovaných v médiu při  $10^5$  buněk/ml. Raji a RJ2.2.5 cílové buňky se značily stejným způsobem jako HeLa buňky. Mikrotitrová destička se stočila při 750 x g 1 minutu a inkubovala 4 hodiny při 37 °C. Na konci inkubační doby se buňky v každé místičce resuspendovaly jemným pipetováním, odebral se vzorek k určení totálních počtů a mikrotitrová destička se stočila při 750 x g 1 minutu. Odebraly se alikvoty 100 µl supernatantu a spočítaly ve scintilačním gama-ray počítadle. Procenta zabitých se korigovala na frakci infikovaných cílových buněk (obvykle 50–90 %) měřených průtokových cytometrií. Pro infikované efektorové buňky se poměr efektor: cílová buňka korigoval a procenta infikovaných buněk (obvykle 20–50 % pro experimenty s CD4 chimérickými receptory a > 70 % pro experimenty  
 25 s CD16 chimérickými receptory).

In vitro mutagenese ζ sekvence. Pro vytvoření bodových mutací v aminokyselinových zbytcích 11 a/nebo 15 ζ sekvence, se připravily syntetické oligonukleotidové primery, rostoucí od BamHI místa po proudu k ζ transmembránové doméně, konvertující přirozený ζ zbytek 11 od Cys ke Gly (C11G) nebo zbytky 15 od Asp ke Gly (D15G) nebo oba (C11GP/D15G), a použily se v PCR reakcích ke generování mutovaných fragmentů, které se reinsertovaly do konstruktů divokého typu CD4: ζ.  
 30

Pro vytvoření ζ delecí se ζ cDNA sekvence amplifikovaly pomocí PCR s použitím syntetických oligonukleotidových primerů navržených k vytvoření stop-kodonu (UAG) po zbytku 50, 59, nebo 65. Primery obsahovaly místo štěpení pro enzym NotI umístěné 5 nebo 6 zbytků od 5'-konce, obvykle v sekvenci ve formě CGC GGG CGG CCG CTA (sekvence ID NO:11), kde nejméně tři zbytky odpovídají stop-antikodonu. NotI a stop-antikodonové sekvence byly následovány 18 nebo více zbytky komplementárními k žádanému 3'-koncovému fragmentu. Výsledné chiméry byly CD16:ζY51\*, CD16:ζE60\*, respektive CD16:ζD66\*. BamHI místo po proudu od transmembránové domény a NotI místo se použily pro generování fragmentů, které se zpětně začlenily do konstruktů divokého typu CD16:ζ. Monomerní ζ chiméry se vytvořily odštěpením ζ transmembránových a membránových proximálních intracelulárních sekvencí BamHI a SacI štěpením Asp<sup>-</sup> a Cys<sup>-</sup> CD4:ζ konstruktů popsaného výše a inzercí fragmentu do CD16:ζE60\*,  
 45 respektive konstruktů CD16:ζD66\*.

Pro přípravu konstruktů CD16:ζD66\*, se ζ cDNA sekvence odpovídající transmembránové doméně a 17 následujících zbytků cytoplazmové domény nahradily odpovídající transmembránovou a cytoplazmovou doménou získanou z CD5 a CD7 cDN. CD5 a CD7 fragmenty se generovaly PCR reakcí s použitím dopředných oligonukleotidů obsahujících BamHI místo restričního štěpení a odpovídajících oblastí po proudu transmembránové domény, a následujících oligonukleotidů překrývajících CD5, respektive CD7 sekvence a ζ sekvence, obsahující SacI místo restričního štěpení.  
 50

CD5:ζ: CGC GGG CTC GTT ATA GAG CTG GTT CTG GCG CTG CTT CTT CTG  
(sekvence ID NO: 12)

CD7:ζ: CGC GGG GAG CTC GTT ATA GAG CTG GTT TGC CGC CGA ATT CTT  
ATC CCG (sekvence ID NO: 13).

CD5 a CD7 PCR produkty se štěpily BamHI a SacI, ligovaly k BamHI a SacI štěpeným CD16:ζE60\* a nahrazovaly ζ sekvence od BamHI k SacI CD7 fragmenty se získaly PCR s použitím oligonukleotidů obsahujících NotI místo restričního štěpení a kódujícího stop–kodon (UAA) po zbytku Gln416 a Ala193 CD5, respektive CD7. CD5 a CD7 PCR fragmenty se štěpily BamHI a NotI a zapojily do konstruktu CD16:ζAsp66\*.

In vitro mutagenese N–terminálních zbytků v rámci ζ motivu převádějícího cytolytický signál. Syntetické oligonukleotidové primery rostoucí od SacI místa uvnitř ζ motivu a konvertující přirozený zbytek 48 od Asn k Ser (N48S), zbytek 50 od Leu k Ser (L50S) a zbytek 51 od Tyr k Phe (Y51F) se syntetizovaly a užily pro PCR reakci ke generování fragmentů, které se zpětně začlenily do konstruktu divokého typu CD16:7:ζ(48–65).

In vitro mutagenese C–terminálních zbytků v rámci ζ motivu převádějícího cytolytický signál. Syntetické oligonukleotidové primery od NotI místa 3'– ke stop–kodonu a konvertující přirozený zbytek 60 od Glu ke Gln (E60Q), zbytek 61 od Glu ke Gln (E61Q), zbytek 62 od Tyr k Phe nebo Ser (Y62F nebo Y62S) a zbytek 63 od Asp k Asn (D63N) se syntetizovaly a užily pro PCR reakci ke generování fragmentů, které se subklonovaly do konstruktu divokého typu CD16:ζD66\* od BamHI místa k NotI místu.

CD16:7:ζ(33–65), CD16:7:ζ(71–104), CD16:7:ζ(104–137) chimérní konstrukce. CD7 transmembránový fragment nesoucí MluI a NotI místa ve spojení mezi membránovými a intracelulárními doménami se získal PCR s použitím oligonukleotidu s následující sekvencí: CGC GGG GCG GCC ACG CGT CCT CGC CAG CAC ACA (sekvence ID NO: 14). Výsledný PCR fragment se štěpil BamHI a NotI a zpětně začlenil do CD16:7:ζ(48–65) konstruktů. ζ fragmenty kódující zbytky 33 až 65, 71 až 104 a 104 až 137 se získaly PCR reakcí s použitím dvojic primerů obsahujících MluI místa na 5'–konci dopředného primeru a stop–kodony následující po NotI místech na 5'–konci reverzních primerů. V každém případě restriční místa se umístila šest zbytků do 5'–konce primeru pro zajištění štěpení restričním enzymem.

ζ33: CGC GGG ACG CGT TTC AGC CGT CCT CGC CAG CAC ACA (sekvence ID NO: 15);

ζ71: CGC GGG ACG CGT GAC CCT GAG ATG GGG GGA AAG (sekvence ID NO: 16); a

ζ104: CGC GGG ACG CGT ATT GGG ATG AAA GGC GAG CGC (sekvence ID NO: 17).

Konstrukce FcRγIIA delekčních mutantů. Deleční mutanty FcRγIIA karboxylového terminu se konstruovaly PCR stejným způsobem jako konstrukty plné délky, konvertující sekvence kódující Tyr v poloze 282 a 298 na stop–kodony (TAA). N–terminální delece se generovaly amplifikací fragmentů kódujících méně intracelulární domény PCR s použitím oligonukleotidů, které umožní inzerci výsledných fragmentů do předem vytvořeného experimentujícího plazmidu kódujícího CD16 extracelulární doménu fúzovaly k CD7 transmembránové doméně, která terminuje v místě MluI a ve spojení mezi transmembránovou a intracelulární doménou.

Další uspořádání. Příklady popsané výše demonstrují, že agregace  $\zeta$ ,  $\eta$  nebo  $\gamma$  chimér jsou schopny iniciovat odpověď cytolytických efektorových buněk v T-lymfocytech. Známý rozsah exprese  $\zeta$ ,  $\eta$  a  $\gamma$ , zahrnují T-lymfocyty, přirozené zabíječské buňky, basofilní granulocyty, makrofágy a stěžňové buňky předpokládá, že konzervativní sekvenční motivy interagující se senzoro-

5 vým aparátem společným buňkám hematopoietického původu a že důležitá složka hostitelské obrany v imunitním systému je zprostředkovaná receptorovou agregací.

Potence cytolytické odpovědi a nepřítomnosti odpovědi na cílové buňky nesoucí MHC receptory třídy II demonstruje, že chiméry založené na  $\zeta$ ,  $\eta$  nebo  $\gamma$  vytvářejí základ pro genetickou inter-

10 venci proti AIDS prostřednictvím adoptivní imunoterapie. Široká distribuce endogenních  $\zeta$  a  $\gamma$  a důkaz, že asociace Fc receptorů s  $\gamma$  zprostředkuje cytotoxicitu v různých buněčných typech (Fanger et al., Immunol Today 10, 92–99 (1989)) umožňuje použití různých buněk pro tyto účely. Například neutrofilní granulocyty, které mají velmi krátkou životnost ( $\approx 4$  h) v cirkulaci a jsou silně cytolytické, jsou aktivními cílovými buňkami pro expresi chimér. Infekce neutrofilů

15 HIV nemá za následek uvolnění viru, a množství těchto buněk (nejhojnějších z leukocytů) usnadňuje obranu hostitele. Jiná atraktivní možnost pro hostitelské buňky jsou maturované T-lymfocyty, populace v současnosti přístupná retrovirální manipulaci (Rosenberg, Sci. Am. 262, 62–69 (1990)). S pomocí rekombinantní IL-2, populace L-lymfocytů relativně snadno expanduje v kultuře a expandované populace mají typicky limitovanou životnost při reinfuzi (Rosenberg et

20 al., N. Engl. J. Med. 323, 570–578 (1990)).

Za vhodných podmínek, HIV rozpoznávání buňkami exprimujícími CD4 chiméry také umožní mitogenní stimuly, umožňující vyzbrojené populaci odpovědět dynamicky na vzplanutí viru. Ačkoliv jsme se zde zaměřily na chování fúzních proteinů v cytolytických T-lymfocytech,

25 exprese chimér v pomocných lymfocytech poskytuje HIV–mobilizovaný zdroj cytokinů, které překonají kolaps subsetu pomocných buněk při AIDS. Nedávný popis několika schémat pro manipulování s rezistencí vůči infekci v krocích jiných než je penetrace viru (Friedman et al., Nature 335, 452–454 (1989)); Green et al., Cell 58, 215–223 (1989); Malim et al., Cell 58, 205–214 (1989); Trono et al., Cell 59, 113–120 (1989); Buonocore et al., Nature 345, 625–628

30 (1990)) předpokládá, že buňky nesoucí CD4 chiméry mohou být navrženy proti produkci viru expresí příslušných činidel s aktivním intracelulárním místem.

Schopnost transmitovat signály T-lymfocytů prostřednictvím autonomních chimér také poskytuje schopnost regulace retrovirálně manipulovaných lymfocytů *in vivo*. Stimuly zesíťování, zpro-

35 středkované například specifickými IgM protilátkami manipulovanými k odstranění komplement–vážících domén, umožní takovým lymfocytům zvýšit počet *in situ*, zatímco terapie podobnými specifickými IgG protilátkami (například rozeznávajícími aminokyselinové variace vnesené do chimérních řetězců) selektivně vyčerpá manipulovanou populaci. Navíc, anti-CD4 IgM protilátky nevyžadují další zesíťování k mobilizaci vápníku v Jurkat buňkách exprimujících CD4: $\zeta$

40 chiméry. Schopnost regulovat buněčnou populaci bez nutnosti opakovat extrakorporeální amplifikaci podstatně zvyšuje rozsah a účinnost současného použití pro geneticky manipulované T-lymfocyty.

Pro vytvoření dalších chimér skládajících se z  $\zeta$ ,  $\eta$  nebo  $\gamma$  intracelulárních sekvencí, se do cDNA

45 nebo genomové sekvence kódující extracelulární doménu receptoru zavede restriční místo v lokaci těsně předcházející vybranou transmembránovou doménu. Fragment extracelulární domény terminující v restričním místě se spojí s  $\zeta$ ,  $\eta$  nebo  $\gamma$  sekvencí. Typické extracelulární domény se odvozují od receptorů, které rozpoznávají komplement, cukry, virové proteiny, bakterie, protozoa nebo metazoa parazity, nebo proteiny jimi indukované. Podobné ligandy nebo

50 receptory exprimované patogeny nebo nádorovými buňkami se připojí na  $\zeta$ ,  $\eta$  nebo  $\gamma$  sekvenci, k řízení imunitní odpovědi proti buňkám nesoucím receptory rozpoznávající tyto ligandy.

Ačkoliv vynález byl popsán ve spojitosti se specifickým uspořádáním, rozumí se, že je schopen dalších modifikací, a to přihláška je míněna k pokrytí variací použití, nebo adaptací vynálezu

včetně takových rozdílů od přiloženého popisu, jaké se vyskytují v technice, které se vynález týká, a jak může být aplikováno v základních rysech s uveřejněním následujících přiložených nároků.

5

#### Průmyslová využitelnost

Předkládaný vynález se vztahuje k regulaci lymfocytů, makrofágů, přirozených zabíječských buněk nebo granulocytů expresí chimér uvedených buněk, které způsobují buněčnou odpověď na cílové podněty rozpoznávané chimérami; vynález se tak vztahuje na způsob řízení buněčné odpovědi na infekční částici, nádorovou nebo rakovinovou buňku, nebo na buňku generovanou autoimunitou. Tomu odpovídaje, vynález zahrnuje užití těchto buněk exprimujících receptorové chiméry při produkci léčiv pro terapii chorob a poskytuje vhodný prostředek k regulaci počtu a aktivity lymfocytů a buněk, aniž by se vyjmuly z těla pacienta pro *in vitro* amplifikaci. Speci-

10

15

ficky vynález poskytuje metodu pro řízení buněčné odpovědi na buňky infikované virem HIV jako základ pro genetickou intervenci proti AIDS prostřednictvím adoptivní imunoterapie.

Protilátky proti chimérám receptorů T-lymfocytů, B-lymfocytů nebo Fc receptorů podle předkládaného vynálezu se používají pro monitorování množství chimérních receptorů (nebo buněk nesoucích chimérní receptory) v pacientech. tyto protilátky jsou také vhodné pro použití ve standardních imunodiagnostických testech známých v oboru, včetně imunometrických nebo sendvičových testů.

20

#### 25 Seznam sekvencí

##### (2) Sekvence ID NO: 1:

30 (i) sekvenční charakteristika:

- (A) Délka: 1728 párů bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Vláknitost: jednoduchá
- 35 (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

(xi) Popis sekvence: sekvence ID NO:1:

|                                                        |      |
|--------------------------------------------------------|------|
| ATGAACCGGG GAGTCCCTTT TAGGCACTTG CTTCTGGTGC TGCAACTGGC | 50   |
| GCTCCTCCCA GCAGCCACTC AGGGAAACAA AGTGGTGCTG GGCAAAAAG  | 100  |
| GGGATACAGT GGAAGTACC TGTACAGCTT CCCAGAAGAA GAGCATACAA  | 150  |
| TTCCACTGGA AAAACTCCAA CCAGATAAAG ATTCTGGGAA ATCAGGGCTC | 200  |
| CTTCTTAACT AAAGGTCCAT CCAAGCTGAA TGATCGCGCT GACTCAAGAA | 250  |
| GAAGCCTTTG GGACCAAGGA AACTTCCCCC TGATCATCAA GAATCTTAAG | 300  |
| ATAGAAGACT CAGATACTTA CATCTGTGAA GTGGAGGACC AGAAGGAGGA | 350  |
| GGTGCAATTG CTAGTGTTTG GATTGACTGC CAACTCTGAC ACCCACCTGC | 400  |
| TTCAGGGGCA GAGCCTGACC CTGACCTTGG AGAGCCCCC TGGTAGTAGC  | 450  |
| CCCTCAGTGC AATGTAGGAG TCCAAGGGGT AAAACATAC AGGGGGGGAA  | 500  |
| GACCTCTCC GTGTCTCAGC TGGAGCTCCA GGATAGTGGC ACCTGGACAT  | 550  |
| GCACTGTCTT GCAGAACCAG AAGAAGGTGG AGTTCAAAAT AGACATCGTG | 600  |
| GTGCTAGCTT TCCAGAAGGC CTCCAGCATA GTCTATAAGA AAGAGGGGGA | 650  |
| ACAGGTGGAG TTCTCCTTCC CACTCGCCTT TACAGTTGAA AAGCTGACGG | 700  |
| GCAGTGGCGA GCTGTGGTGG CAGGCGGAGA GGGCTTCCTC CTCCAAGTCT | 750  |
| TGGATCACCT TTGACCTGAA GAACAAGGAA GTGCTGTGTA AACGGGTTAC | 800  |
| CCAGGACCCT AAGCTCCAGA TGGGCAAGAA GCTCCCGCTC CACCTCACCC | 850  |
| TGCCCCAGGC CTTGCCTCAG TATGCTGGCT CTGGAAACCT CACCCTGGCC | 900  |
| CTTGAAGCGA AAACAGGAAA GTTGCATCAG GAAGTGAACC TGCTGGTGAT | 950  |
| GAGAGCCACT CAGCTCCAGA AAAATTTGAC CTGTGAGGTG TGGGGACCCA | 1000 |
| CCTCCCCTAA GCTGATGCTG AGCTTGAAAC TGGAGAACAA GGAGGCAAAG | 1050 |
| GTCTCGAAGC GGGAGAAGCC GGTGTGGGTG CTGAACCCTG AGGCGGGGAT | 1100 |
| GTGGCAGTGT CTGCTGAGTG ACTCGGGACA GGTCTTGCTG GAATCCAACA | 1150 |
| TCAAGGTTCT GCCCACATGG TCCACCCCGG TGCAOGCGGA TCCCAAATC  | 1200 |
| TGCTACTTGC TAGATGGAAT CCTCTTCATC TACGGAGTCA TCATCACAGC | 1250 |
| CCTGTACCTG AGAGCAAAAT TCAGCAGGAG TGCAGAGACT GCTGCCAACC | 1300 |
| TGCAGGACCC CAACCAGCTC TACAATGAGC TCAATCTAGG GCGAAGAGAG | 1350 |
| GAATATGACG TCTTGGAGAA GAAGCGGGCT CGGGATCCAG AGATGGGAGG | 1400 |
| CAAACAGCAG AGGAGGAGGA ACCCCCAGGA AGGCGTATAC AATGCACTGC | 1450 |
| AGAAAGACAA GATGCCAGAA GCCTACAGTG AGATCGGCAC AAAAGGCGAG | 1500 |
| AGGCGGAGAG GCAAGGGGCA CGATGGCCTT TACCAGGACA GCCACTTCCA | 1550 |

|            |            |            |            |            |      |
|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| AGCAGTGCAG | TTCGGGAACA | GAAGAGAGAG | AGAAGGTTCA | GAAGTCACAA | 1600 |
| GGACCCCTGG | GTAAAGAGCC | CGCCCCAAG  | GTGAAAGCAC | CCAGCAGAGT | 1650 |
| AGCCAATCCT | GTGCCAGCGT | CTTCAGCATC | CCCCTCTGT  | GGAGTCCATG | 1700 |
| GCCACCCAGT | AGCAGCTCCC | AGCTCTAA   |            |            | 1728 |

(2) Sekvence ID NO: 2:

5 (i) sekvenční charakteristika:

(A) Délka: 1389 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Vlákňitost: dvojité

10 (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

(xi) Popis sekvence: sekvence ID NO:2:

|            |             |            |            |            |      |
|------------|-------------|------------|------------|------------|------|
| ATGAACCGGG | GAGTCCCTTT  | TAGGCACTTG | CTTCTGGTGC | TGCAACTGGC | 50   |
| GCTCCTCCCA | GCAGCCACTC  | AGGGAAACAA | AGTGGTGCTG | GGCAAAAAAG | 100  |
| GGGATACAGT | GGAAGTGACC  | TGTACAGCTT | CCCAGAAGAA | GAGCATACAA | 150  |
| TTCCACTGGA | AAAAGTCCAA  | CCAGATAAAG | ATTCTGGGAA | ATCAGGGCTC | 200  |
| CTTCTTAAGT | AAAGGTCCAT  | CCAAGCTGAA | TGATCGCGCT | GACTCAAGAA | 250  |
| GAAGCCTTTG | GGACCAAGGA  | AACTTCCCCC | TGATCATCAA | GAATCTTAAG | 300  |
| ATAGAAGACT | CAGATACTTA  | CATCTGTGAA | GTGGAGGACC | AGAAGGAGGA | 350  |
| GGTGCAATTG | CTAGTGTTTG  | GATTGACTGC | CAACTCTGAC | ACCCACCTGC | 400  |
| TTCAGGGGCA | GAGCCTGACC  | CTGACCTTGG | AGAGCCCCCC | TGGTAGTAGC | 450  |
| CCCTCAGTGC | AATGTAGGAG  | TCCAAGGGGT | AAAAACATAC | AGGGGGGGAA | 500  |
| GACCCTCTCC | GTGTCTCAGC  | TGGAGCTCCA | GGATAGTGGC | ACCTGGACAT | 550  |
| GCACTGTCTT | GCAGAACCAG  | AAGAAGGTGG | AGTTCAAAAT | AGACATCGTG | 600  |
| GTGCTAGCTT | TCCAGAAGGC  | CTCCAGCATA | GTCTATAAGA | AAGAGGGGGA | 650  |
| ACAGGTGGAG | TTCTCCTTCC  | CACTCGCCTT | TACAGTTGAA | AAGCTGACGG | 700  |
| GCAGTGGCGA | GCTGTGGTGG  | CAGGCGGAGA | GGGCTTCCTC | CTCCAAGTCT | 750  |
| TGGATCACCT | TTGACCTGAA  | GAACAAGGAA | GTGTCTGTAA | AACGGGTAC  | 800  |
| CCAGGACCCT | AAGCTCCAGA  | TGGGCAAGAA | GCTCCCGCTC | CACCTCACCC | 850  |
| TGCCCCAGGC | CTTGCCCTCAG | TATGCTGGCT | CTGGAAACCT | CACCCTGGCC | 900  |
| CTTGAAGCGA | AAACAGGAAA  | GTTGCATCAG | GAAGTGAACC | TGGTGGTGAT | 950  |
| GAGAGCCACT | CAGCTCCAGA  | AAAATTTGAC | CTGTGAGGTG | TGGGGACCCA | 1000 |
| CCTCCCCTAA | GCTGATGCTG  | AGCTTGAAAC | TGGAGAACAA | GGAGGCAAAG | 1050 |

15

|                                                        |      |
|--------------------------------------------------------|------|
| GTCTCGAAGC GGGAGAAGCC GGTGTGGGTG CTGAACCCTG AGGCGGGGAT | 1100 |
| GTGGCAGTGT CTGCTGAGTG ACTCGGGACA GGTCCTGCTG GAATCCAACA | 1150 |
| TCAAGGTTCT GCCCACATGG TCCACCCCGG TGCACGCGGA TCCGCAGCTC | 1200 |
| TGCTATATCC TGGATGCCAT CCTGTTTTTG TATGGTATTG TCCTTACCCT | 1250 |
| GCTCTACTGT CGACTCAAGA TCCAGGTCCG AAAGGCAGAC ATAGCCAGCC | 1300 |
| GTGAGAAATC AGATGCTGTC TACACGGGCC TGAACACCCG GAACCAGGAG | 1350 |
| ACATATGAGA CTCTGAAACA TGAGAAACCA CCCCATTAG             | 1389 |

## (2) Sekvence ID NO: 3:

## 5 (i) sekvenční charakteristika:

- (A) Délka: 1599 párů bází  
 (B) Typ: nukleová kyselina  
 (C) Vláknitost: dvojitá  
 (D) Topologie: lineární

10

## (ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

## (xi) Popis sekvence: sekvence ID NO:3:

|                                                        |     |
|--------------------------------------------------------|-----|
| ATGAACCGGG GAGTCCCTTT TAGGCACTTG CTTCTGGTGC TGCAACTGGC | 50  |
| GCTCCTCCCA GCAGCCACTC AGGGAAACAA AGTGGTGCTG GGCAAAAAG  | 100 |
| GGGATACAGT GGAAGTACC TGTACAGCTT CCCAGAAGAA GAGCATACAA  | 150 |
| TTCCACTGGA AAAACTCCAA CCAGATAAAG ATTCTGGGAA ATCAGGGCTC | 200 |
| CTTCTTAACT AAAGGTCCAT CCAAGCTGAA TGATCGCGCT GACTCAAGAA | 250 |
| GAAGCCTTTG GGACCAAGGA AACTTCCCCC TGATCATCAA GAATCTTAAG | 300 |
| ATAGAAGACT CAGATACTTA CATCTGTGAA GTGGAGGACC AGAAGGAGGA | 350 |
| GGTGCAATTG CTAGTGTTTG GATTGACTGC CAACTCTGAC ACCCACCTGC | 400 |
| TTCAGGGGCA GAGCCTGACC CTGACCTTGG AGAGCCCCC TGGTAGTAGC  | 450 |
| CCCTCAGTGC AATGTAGGAG TCCAAGGGGT AAAAACATAC AGGGGGGGAA | 500 |
| GACCCTCTCC GTGTCTCAGC TGGAGCTCCA GGATAGTGGC ACCTGGACAT | 550 |
| GCACTGTCTT GCAGAACCAG AAGAAGGTGG AGTTCAAAAT AGACATCGTG | 600 |
| GTGCTAGCTT TCCAGAAGGC CTCCAGCATA GTCTATAAGA AAGAGGGGGA | 650 |
| ACAGGTGGAG TTCTCCTTCC CACTCGCCTT TACAGTTGAA AAGCTGACGG | 700 |
| GCAGTGGCGA GCTGTGGTGG CAGGCGGAGA GGGCTTCCTC CTCCAAGTCT | 750 |
| TGGATCACCT TTGACCTGAA GAACAAGGAA GTGTCTGTAA AACGGGTTAC | 800 |
| CCAGGACCCT AAGCTCCAGA TGGGCAAGAA GCTCCCGCTC CACCTCACCC | 850 |
| TGCCCCAGGC CTTGCCTCAG TATGCTGGCT CTGGAAACCT CACCCTGGCC | 900 |

15

```

CTTGAAGCGA AAACAGGAAA GTTGCATCAG GAAGTGAACC TGGTGGTGAT      950
GAGAGCCACT CAGCTCCAGA AAAATTTGAC CTGTGAGGTG TGGGGACCCA      1000
CCTCCCCTAA GCTGATGCTG AGCTTGAAAC TGGAGAACAA GGAGGCRAAG      1050
GTCTCGAAGC GGGAGAAGCC GGTGTGGGTG CTGAACCCCTG AGGCGGGGAT      1100
GTGGCAGTGT CTGCTGAGTG ACTCGGGACA GGTCTTGCTG GAATCCAACA      1150
TCAAGGTTCT GCCCACATGG TCCACCCCGG TGCACGCGGA TCCCAAACCTC      1200
TGCTACCTGC TGGATGGAAT CCTCTTCATC TATGGTGTCA TTCTCACTGC      1250
CTTGTTCCTG AGAGTGAAGT TCAGCAGGAG CGCAGAGCCC CCCGCGTACC      1300
AGCAGGGCCA GAACCAGCTC TATAACGAGC TCAATCTAGG ACGAAGAGAG      1350
GAGTACGATG TTTTGGACAA GAGACGTGGC CGGGACCCCTG AGATGGGGGG      1400
AAAGCCGAGA AGGAAGAACC CTCAGGAAGG CCTGTACAAT GAACTGCAGA      1450
AAGATAAGAT GGC GGAGGCC TACAGTGAGA TTGGGATGAA AGGCGAGCGC      1500
CGGAGGGGCA AGGGGCACGA TGGCCTTTAC CAGGGTCTCA GTACAGCCAC      1550
CAAGGACACC TACGACGCCC TTCACATGCA GGCCCTGCCC CCTCGCTAA      1599

```

## (2) Sekvence ID NO: 4:

5 (i) sekvenční charakteristika:

(A) Délka: 575 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(D) Topologie: lineární

10

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: sekvence ID NO:4:

```

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

```

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Glu | Phe | Lys | Ile | Asp | Ile | Val | Val | Leu | Ala | Phe | Gln | Lys | Ala | Ser |
| 180 | 195 | 200 | 205 | 210 | 215 | 220 | 225 | 230 | 235 | 240 | 245 | 250 | 255 | 260 | 265 |
| Ser | Ile | Val | Tyr | Lys | Lys | Glu | Gly | Glu | Gln | Val | Glu | Phe | Ser | Phe | Pro |
| 185 | 190 | 195 | 200 | 205 | 210 | 215 | 220 | 225 | 230 | 235 | 240 | 245 | 250 | 255 | 260 |
| Leu | Ala | Phe | Thr | Val | Glu | Lys | Leu | Thr | Gly | Ser | Gly | Glu | Leu | Trp | Trp |
| 225 | 230 | 235 | 240 | 245 | 250 | 255 | 260 | 265 | 270 | 275 | 280 | 285 | 290 | 295 | 300 |
| Gln | Ala | Glu | Arg | Ala | Ser | Ser | Ser | Lys | Ser | Trp | Ile | Thr | Phe | Asp | Leu |
| 245 | 250 | 255 | 260 | 265 | 270 | 275 | 280 | 285 | 290 | 295 | 300 | 305 | 310 | 315 | 320 |
| Lys | Asn | Lys | Glu | Val | Ser | Val | Lys | Arg | Val | Thr | Gln | Asp | Pro | Lys | Leu |
| 260 | 265 | 270 | 275 | 280 | 285 | 290 | 295 | 300 | 305 | 310 | 315 | 320 | 325 | 330 | 335 |
| Gln | Met | Gly | Lys | Lys | Leu | Pro | Leu | His | Leu | Thr | Leu | Pro | Gln | Ala | Leu |
| 275 | 280 | 285 | 290 | 295 | 300 | 305 | 310 | 315 | 320 | 325 | 330 | 335 | 340 | 345 | 350 |
| Pro | Gln | Tyr | Ala | Gly | Ser | Gly | Asn | Leu | Thr | Leu | Ala | Leu | Glu | Ala | Lys |
| 290 | 295 | 300 | 305 | 310 | 315 | 320 | 325 | 330 | 335 | 340 | 345 | 350 | 355 | 360 | 365 |
| Thr | Gly | Lys | Leu | His | Gln | Glu | Val | Asn | Leu | Val | Val | Met | Arg | Ala | Thr |
| 305 | 310 | 315 | 320 | 325 | 330 | 335 | 340 | 345 | 350 | 355 | 360 | 365 | 370 | 375 | 380 |
| Gln | Leu | Gln | Lys | Asn | Leu | Thr | Cys | Glu | Val | Trp | Gly | Pro | Thr | Ser | Pro |
| 325 | 330 | 335 | 340 | 345 | 350 | 355 | 360 | 365 | 370 | 375 | 380 | 385 | 390 | 395 | 400 |
| Lys | Leu | Met | Leu | Ser | Leu | Lys | Leu | Glu | Asn | Lys | Glu | Ala | Lys | Val | Ser |
| 340 | 345 | 350 | 355 | 360 | 365 | 370 | 375 | 380 | 385 | 390 | 395 | 400 | 405 | 410 | 415 |
| Lys | Arg | Glu | Lys | Pro | Val | Trp | Val | Leu | Asn | Pro | Glu | Ala | Gly | Met | Trp |
| 355 | 360 | 365 | 370 | 375 | 380 | 385 | 390 | 395 | 400 | 405 | 410 | 415 | 420 | 425 | 430 |
| Gln | Cys | Leu | Leu | Ser | Asp | Ser | Gly | Gln | Val | Leu | Leu | Glu | Ser | Asn | Ile |
| 370 | 375 | 380 | 385 | 390 | 395 | 400 | 405 | 410 | 415 | 420 | 425 | 430 | 435 | 440 | 445 |
| Lys | Val | Leu | Pro | Thr | Trp | Ser | Thr | Pro | Val | His | Ala | Asp | Pro | Lys | Leu |
| 385 | 390 | 395 | 400 | 405 | 410 | 415 | 420 | 425 | 430 | 435 | 440 | 445 | 450 | 455 | 460 |
| Cys | Tyr | Leu | Leu | Asp | Gly | Ile | Leu | Phe | Ile | Tyr | Gly | Val | Ile | Ile | Thr |
| 405 | 410 | 415 | 420 | 425 | 430 | 435 | 440 | 445 | 450 | 455 | 460 | 465 | 470 | 475 | 480 |
| Ala | Leu | Tyr | Leu | Arg | Ala | Lys | Phe | Ser | Arg | Ser | Ala | Glu | Thr | Ala | Ala |
| 420 | 425 | 430 | 435 | 440 | 445 | 450 | 455 | 460 | 465 | 470 | 475 | 480 | 485 | 490 | 495 |
| Asn | Leu | Gln | Asp | Pro | Asn | Gln | Leu | Tyr | Asn | Glu | Leu | Asn | Leu | Gly | Arg |
| 435 | 440 | 445 | 450 | 455 | 460 | 465 | 470 | 475 | 480 | 485 | 490 | 495 | 500 | 505 | 510 |
| Arg | Glu | Gly | Tyr | Asp | Val | Leu | Glu | Lys | Lys | Arg | Ala | Arg | Asp | Pro | Glu |
| 450 | 455 | 460 | 465 | 470 | 475 | 480 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

(2) Sekvence ID NO: 5:

5 (i) sekvenční charakteristika:

- (A) Délka: 462 aminokyselin  
(B) Typ: aminokyselina  
(D) Topologie: lineární

10

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: sekvence ID NO:5:

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Asn | Arg | Gly | Val | Pro | Phe | Arg | His | Leu | Leu | Leu | Val | Leu | Gln | Leu | 1   | 5   | 10  | 15  |
| Ala | Leu | Leu | Pro | Ala | Ala | Thr | Gln | Gly | Asn | Lys | Val | Val | Leu | Gly | Lys | 20  | 25  | 30  |     |
| Lys | Gly | Asp | Thr | Val | Glu | Leu | Thr | Cys | Thr | Ala | Ser | Gln | Lys | Lys | Ser | 35  | 40  | 45  |     |
| Ile | Gln | Phe | His | Trp | Lys | Asn | Ser | Asn | Gln | Ile | Lys | Ile | Leu | Gly | Asn | 50  | 55  | 60  |     |
| Gln | Gly | Ser | Phe | Leu | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Lys | Leu | Asn | Asp | Arg | Ala | 65  | 70  | 75  | 80  |
| Asp | Ser | Arg | Arg | Ser | Leu | Trp | Asp | Gln | Gly | Asn | Phe | Pro | Leu | Ile | Ile | 85  | 90  | 95  |     |
| Lys | Asn | Leu | Lys | Ile | Glu | Asp | Ser | Asp | Thr | Tyr | Ile | Cys | Glu | Val | Glu | 100 | 105 | 110 |     |
| Asp | Gln | Lys | Glu | Glu | Val | Gln | Leu | Leu | Val | Phe | Gly | Leu | Thr | Ala | Asn | 115 | 120 | 125 |     |
| Ser | Asp | Thr | His | Leu | Leu | Gln | Gly | Gln | Ser | Leu | Thr | Leu | Thr | Leu | Glu | 130 | 135 | 140 |     |
| Ser | Pro | Pro | Gly | Ser | Ser | Pro | Ser | Val | Gln | Cys | Arg | Ser | Pro | Arg | Gly | 145 | 150 | 155 | 160 |
| Lys | Asn | Ile | Gln | Gly | Gly | Lys | Thr | Leu | Ser | Val | Ser | Gln | Leu | Glu | Leu | 165 | 170 | 175 |     |
| Gln | Asp | Ser | Gly | Thr | Trp | Thr | Cys | Thr | Val | Leu | Gln | Asn | Gln | Lys | Lys | 180 | 185 | 190 |     |
| Val | Glu | Phe | Lys | Ile | Asp | Ile | Val | Val | Leu | Ala | Phe | Gln | Lys | Ala | Ser | 195 | 200 | 205 |     |
| Ser | Ile | Val | Tyr | Lys | Lys | Glu | Gly | Glu | Gln | Val | Glu | Phe | Ser | Phe | Pro | 210 | 215 | 220 |     |
| Leu | Ala | Phe | Thr | Val | Glu | Lys | Leu | Thr | Gly | Ser | Gly | Glu | Leu | Trp | Trp | 225 | 230 | 235 | 240 |
| Gln | Ala | Glu | Arg | Ala | Ser | Ser | Ser | Lys | Ser | Trp | Ile | Thr | Phe | Asp | Leu | 245 | 250 | 255 |     |
| Lys | Asn | Lys | Glu | Val | Ser | Val | Lys | Arg | Val | Thr | Gln | Asp | Pro | Lys | Leu | 260 | 265 | 270 |     |
| Gln | Met | Gly | Lys | Lys | Leu | Pro | Leu | His | Leu | Thr | Leu | Pro | Gln | Ala | Leu | 275 | 280 | 285 |     |
| Pro | Gln | Tyr | Ala | Gly | Ser | Gly | Asn | Leu | Thr | Leu | Ala | Leu | Glu | Ala | Lys | 290 | 295 | 300 |     |
| Thr | Gly | Lys | Leu | His | Gln | Glu | Val | Asn | Leu | Val | Val | Met | Arg | Ala | Thr | 305 | 310 | 315 | 320 |
| Gln | Leu | Gln | Lys | Asn | Leu | Thr | Cys | Glu | Val | Trp | Gly | Pro | Thr | Ser | Pro | 325 | 330 | 335 |     |
| Lys | Leu | Met | Leu | Ser | Leu | Lys | Leu | Glu | Asn | Lys | Glu | Ala | Lys | Val | Ser | 340 | 345 | 350 |     |
| Lys | Arg | Glu | Lys | Pro | Val | Trp | Val | Leu | Asn | Pro | Glu | Ala | Gly | Met | Trp | 355 | 360 | 365 |     |
| Gln | Cys | Leu | Leu | Ser | Asp | Ser | Gly | Gln | Val | Leu | Leu | Glu | Ser | Asn | Ile | 370 | 375 | 380 |     |
| Lys | Val | Leu | Pro | Thr | Trp | Ser | Thr | Pro | Val | His | Ala | Asp | Pro | Gln | Leu | 385 | 390 | 395 | 400 |
| Cys | Tyr | Ile | Leu | Asp | Ala | Ile | Leu | Phe | Leu | Tyr | Gly | Ile | Val | Leu | Thr | 405 | 410 | 415 |     |
| Leu | Leu | Tyr | Cys | Arg | Leu | Lys | Ile | Gln | Val | Arg | Lys | Ala | Asp | Ile | Ala | 420 | 425 | 430 |     |
| Ser | Arg | Glu | Lys | Ser | Asp | Ala | Val | Tyr | Thr | Gly | Leu | Asn | Thr | Arg | Asn | 435 | 440 | 445 |     |
| Gln | Glu | Thr | Tyr | Glu | Thr | Leu | Lys | His | Glu | Lys | Pro | Pro | Gln |     |     | 450 | 455 | 460 | 462 |

(2) Sekvence ID NO: 6:

(i) sekvenční charakteristika:

- 5 (A) Délka: 532 aminokyselin  
 (B) Typ: aminokyselina  
 (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

10

(xi) Popis sekvence: sekvence ID NO:6:

```

Met Asn Arg Gly Val Pro Phe Arg His Leu Leu Leu Val Leu Gln Leu
 1      5      10      15
Ala Leu Leu Pro Ala Ala Thr Gln Gly Asn Lys Val Val Leu Gly Lys
 20      25      30
Lys Gly Asp Thr Val Glu Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gln Lys Lys Ser
 35      40      45
Ile Gln Phe His Trp Lys Asn Ser Asn Gln Ile Lys Ile Leu Gly Asn
 50      55      60
Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro Ser Lys Leu Asn Asp Arg Ala
 65      70      75      80
Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp Asp Gln Gly Asn Phe Pro Leu Ile Ile
 85      90      95
Lys Asn Leu Lys Ile Glu Asp Ser Asp Thr Tyr Ile Cys Glu Val Glu
 100      105      110
Asp Gln Lys Glu Glu Val Gln Leu Val Phe Gly Leu Thr Ala Asn
 115      120      125
Ser Asp Thr His Leu Leu Gln Gly Gln Ser Leu Thr Leu Thr Leu Glu
 130      135      140
Ser Pro Pro Gly Ser Ser Pro Ser Val Gln Cys Arg Ser Pro Arg Gly
 145      150      155      160
Lys Asn Ile Gln Gly Lys Thr Leu Ser Val Ser Gln Leu Glu Leu
 165      170      175
Gln Asp Ser Gly Thr Trp Thr Cys Thr Val Leu Gln Asn Gln Lys Lys
 180      185      190
Val Glu Phe Lys Ile Asp Ile Val Val Leu Ala Phe Gln Lys Ala Ser
 195      200      205
Ser Ile Val Tyr Lys Lys Glu Gly Glu Gln Val Glu Phe Ser Phe Pro
 210      215      220
Leu Ala Phe Thr Val Glu Lys Leu Thr Gly Ser Gly Glu Leu Trp Trp
 225      230      235      240
Gln Ala Glu Arg Ala Ser Ser Ser Lys Ser Trp Ile Thr Phe Asp Leu
 245      250      255
Lys Asn Lys Glu Val Ser Val Lys Arg Val Thr Gln Asp Pro Lys Leu
 260      265      270
Gln Met Gly Lys Lys Leu Pro Leu His Leu Thr Leu Pro Gln Ala Leu
 275      280      285
Pro Gln Tyr Ala Gly Ser Gly Asn Leu Thr Leu Ala Leu Glu Ala Lys
 290      295      300
Thr Gly Lys Leu His Gln Glu Val Asn Leu Val Val Met Arg Ala Thr
 305      310      315      320
Gln Leu Gln Lys Asn Leu Thr Cys Glu Val Trp Gly Pro Thr Ser Pro
 325      330      335
Lys Leu Met Leu Ser Leu Lys Leu Glu Asn Lys Glu Ala Lys Val Ser
 340      345      350
Lys Arg Glu Lys Pro Val Trp Val Leu Asn Pro Glu Ala Gly Met Trp
 355      360      365
Gln Cys Leu Leu Ser Asp Ser Gly Gln Val Leu Leu Glu Ser Asn Ile
 370      375      380
Lys Val Leu Pro Thr Trp Ser Thr Pro Val His Ala Asp Pro Lys Leu
 385      390      395      400
Cys Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr
 405      410      415
Ala Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Glu Pro Pro Ala
 420      425      430

```

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Tyr | Gln | Gln | Gly | Gln | Asn | Gln | Leu | Tyr | Asn | Glu | Leu | Asn | Leu | Gly | Arg |  |
|     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |  |
| Arg | Glu | Glu | Tyr | Asp | Val | Leu | Asp | Lys | Arg | Arg | Gly | Arg | Asp | Pro | Glu |  |
|     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |  |
| Met | Gly | Gly | Lys | Pro | Arg | Arg | Lys | Asn | Pro | Gln | Glu | Gly | Leu | Tyr | Asn |  |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |  |
| Glu | Leu | Gln | Lys | Asp | Lys | Met | Ala | Glu | Ala | Tyr | Ser | Glu | Ile | Gly | Met |  |
|     |     |     | 485 |     |     |     |     |     | 490 |     |     |     |     | 495 |     |  |
| Lys | Gly | Glu | Arg | Arg | Arg | Gly | Lys | Gly | His | Asp | Gly | Leu | Tyr | Gln | Gly |  |
|     |     | 500 |     |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |     |  |
| Leu | Ser | Thr | Ala | Thr | Lys | Asp | Thr | Tyr | Asp | Ala | Leu | His | Met | Gln | Ala |  |
|     |     | 515 |     |     |     |     | 520 |     |     |     |     | 525 |     |     |     |  |
| Leu | Pro | Pro | Arg |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|     |     | 530 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |

## (2) Sekvence ID NO: 7:

5 (i) sekvenční charakteristika:

- (A) Délka: 33 bází  
 (B) Typ: nukleová kyselina  
 (C) Vlákňitost: jednoduchá  
 (D) Topologie: lineární

10

(ii) Typ molekuly: nukleová kyselina

(xi) Popis sekvence: sekvence ID NO:7:

15 **CGCGGGGTGA CCGTGCCCTC CAGCAGCTTG GGC**

33

## (2) Sekvence ID NO: 8:

20 (i) sekvenční charakteristika:

- (A) Délka: 50 bází  
 (B) Typ: nukleová kyselina  
 (C) Vlákňitost: jednoduchá  
 (D) Topologie: lineární

25

(ii) Typ molekuly: nukleová kyselina

(xi) Popis sekvence: sekvence ID NO:8:

30 **CGCGGGGATC CGTCGTCCAG AGCCCGTCCA GCTCCCCGTC CTGGGCCTCA**

50

30

## (2) Sekvence ID NO: 9:

35 (i) sekvenční charakteristika:

- (A) Délka: 33 bází  
 (B) Typ: nukleová kyselina  
 (C) Vlákňitost: jednoduchá  
 (D) Topologie: lineární

40

(ii) Typ molekuly: nukleová kyselina

(xi) Popis sekvence: sekvence ID NO:9:

CGCGGGCGGC CGCGACGCCG GCCAAGACAG CAC

33

5 (2) Sekvence ID NO: 10:

(i) sekvenční charakteristika:

- 10 (A) Délka: 33 bází  
(B) Typ: nukleová kyselina  
(C) Vlákňitost: jednoduchá  
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: nukleová kyselina

15

(xi) Popis sekvence: sekvence ID NO:10:

CGCGTTGACG AGCAGCCAGT TGGGCAGCAG CAG

33

(2) Sekvence ID NO:11:

20

(i) sekvenční charakteristika:

- 25 (A) Délka: 15 bází  
(B) Typ: nukleová kyselina  
(C) Vlákňitost: jednoduchá  
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: nukleová kyselina

30

(xi) Popis sekvence: sekvence ID NO:11:

CGCGGGCGGC CGCTA

15

(2) Sekvence ID NO: 12:

35

(i) sekvenční charakteristika:

- 40 (A) Délka: 42 bází  
(B) Typ: nukleová kyselina  
(C) Vlákňitost: jednoduchá  
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: nukleová kyselina

(xi) Popis sekvence: sekvence ID NO:12:

45

CGCGGGCTCG TTATAGAGCT GGTTCCTGGCG CTGCTTCTTC TG

42

## (2) Sekvence ID NO: 13:

## (i) sekvenční charakteristika:

5

- (A) Délka: 48 bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Vlákňitost: jednoduchá
- (D) Topologie: lineární

10

## (ii) Typ molekuly: nukleová kyselina

## (xi) Popis sekvence: sekvence ID NO:13:

CGCGGGGAGC TCGTTATAGA GCTGGTTTGC CGCCGAATTC TTATCCCG

48

15

## (2) Sekvence ID NO: 14:

## (i) sekvenční charakteristika:

20

- (A) Délka: 33 bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Vlákňitost: jednoduchá
- (D) Topologie: lineární

25

## (ii) Typ molekuly: nukleová kyselina

## (xi) Popis sekvence: sekvence ID NO:14:

CGCGGGGCGG CCACGCGTCC TCGCCAGCAC ACA

33

## 30 (2) Sekvence ID NO: 15:

## (i) sekvenční charakteristika:

35

- (A) Délka: 36 bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Vlákňitost: jednoduchá
- (D) Topologie: lineární

40

## (ii) Typ molekuly: nukleová kyselina

## (xi) Popis sekvence: sekvence ID NO:15:

CGCGGGACGC GTTTCAGCCG TCCTCGCCAG CACACA

36

(2) Sekvence ID NO: 16:

(i) sekvenční charakteristika:

- 5 (A) Délka: 33 bází  
 (B) Typ: nukleová kyselina  
 (C) Vláknitost: jednoduchá  
 (D) Topologie: lineární

10 (ii) Typ molekuly: nukleová kyselina

(xi) Popis sekvence: sekvence ID NO:16:

**CGCGGGACGC GTGACCCTGA GATGGGGGGA AAG**

**33**

15 (2) Sekvence ID NO: 17:

(i) sekvenční charakteristika:

- 20 (A) Délka: 33 bází  
 (B) Typ: nukleová kyselina  
 (C) Vláknitost: jednoduchá  
 (D) Topologie: lineární

25 (ii) Typ molekuly: nukleová kyselina

(xi) Popis sekvence: sekvence ID NO:17:

**CGCGGGACGC GTATTGGGAT GAAAGGCCAG CGC**

**33**

(2) Sekvence ID NO: 18:

30

(i) sekvenční charakteristika:

- 35 (A) Délka: 26 bází  
 (B) Typ: nukleová kyselina  
 (C) Vláknitost: jednoduchá  
 (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: nukleová kyselina

40 (xi) Popis sekvence: sekvence ID NO:18:

**CCCGGATCCC AGCATGGGCA GCTCTT**

**26**

## (2) Sekvence ID NO: 19:

## (i) sekvenční charakteristika:

- 5 (A) Délka: 42 bází  
 (B) Typ: nukleová kyselina  
 (C) Vlákňitost: jednoduchá  
 (D) Topologie: lineární

## 10 (ii) Typ molekuly: nukleová kyselina

## (xi) Popis sekvence: sekvence ID NO:19:

**CGCGGGGCGG CCGCTTTAGT TATTACTGTT GACATGGTCG TT**

42

## 15 (2) Sekvence ID NO: 20:

## (i) sekvenční charakteristika:

- 20 (A) Délka: 40 bází  
 (B) Typ: nukleová kyselina  
 (C) Vlákňitost: jednoduchá  
 (D) Topologie: lineární

## 25 (ii) Typ molekuly: nukleová kyselina

## (xi) Popis sekvence: sekvence ID NO:20:

**GCGGGGGGAT CCCACTGTCC AAGCTCCCAG CTCTTCACCG**

40

## (2) Sekvence ID NO: 21:

30

## (i) sekvenční charakteristika:

- 35 (A) Délka: 32 bází  
 (B) Typ: nukleová kyselina  
 (C) Vlákňitost: jednoduchá  
 (D) Topologie: lineární

## (ii) Typ molekuly: nukleová kyselina

## 40 (xi) Popis sekvence: sekvence ID NO:21:

**GCGGGGGCGG CCGCCTAAAT ACGGTTCTGG TC**

32

## (2) Sekvence ID NO: 22:

## (i) sekvenční charakteristika:

- 5 (A) Délka: 31 bází  
 (B) Typ: nukleová kyselina  
 (C) Vláknitost: jednoduchá  
 (D) Topologie: lineární

## 10 (ii) Typ molekuly: nukleová kyselina

## (xi) Popis sekvence: sekvence ID NO:22:

**TCAGAAAGAG ACAACCTGAA GAAACCAACA A**

31

## 15 (2) Sekvence ID NO: 23:

## (i) sekvenční charakteristika:

- 20 (A) Délka: 31 bází  
 (B) Typ: nukleová kyselina  
 (C) Vláknitost: jednoduchá  
 (D) Topologie: lineární

## 25 (ii) Typ molekuly: nukleová kyselina

## (xi) Popis sekvence: sekvence ID NO:23:

**TTGTTGGTTT CTCAGGTTG TGTCTTTCTG A**

31

## (2) Sekvence ID NO: 24:

30

## (i) sekvenční charakteristika:

- (A) Délka: 171 aminokyselin  
 (B) Typ: aminokyselina  
 35 (D) Topologie: lineární

## (ii) Typ molekuly: aminokyselina

(xi) Popis sekvence: sekvence ID NO:24:

```

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

```

5 (2) Sekvence ID NO: 25:

(i) sekvenční charakteristika:

- 10 (A) Délka: 182 aminokyselin  
 (B) Typ: aminokyselina  
 (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: aminokyselina

15 (xi) Popis sekvence: sekvence ID NO:25:

```

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

```

(2) Sekvence ID NO: 26:

(i) sekvenční charakteristika:

- 5 (A) Délka: 220 aminokyselin  
(B) Typ: aminokyselina  
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: aminokyselina

10

(xi) Popis sekvence: sekvence ID NO:26:

```

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

```

15 (2) Sekvence ID NO: 27:

(i) sekvenční charakteristika:

- 20 (A) Délka: 228 aminokyselin  
(B) Typ: aminokyselina  
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: aminokyselina

25 (xi) Popis sekvence: sekvence ID NO:27:

```

Met Ala Thr Leu Val Leu Ser Ser Met Pro Cys His Trp Leu Leu Phe
      5      10
Leu Leu Leu Leu Phe Ser Gly Glu Pro Val Pro Ala Met Thr Ser Ser
      20      25
Asp Leu Pro Leu Asn Phe Gln Gly Ser Pro Cys Ser Gln Ile Trp Gln
      35      40
His Pro Arg Phe Ala Ala Lys Lys Arg Ser Ser Met Val Lys Phe His
      50      55
Cys Tyr Thr Asn His Ser Gly Ala Leu Thr Trp Phe Arg Lys Arg Gly
      65      70
Ser Gln Gln Pro Gln Glu Leu Val Ser Glu Glu Gly Arg Ile Val Gln
      85      90
Thr Gln Asn Gly Ser Val Tyr Thr Leu Thr Ile Gln Asn Ile Gln Tyr
      100      105
Glu Asp Asn Gly Ile Tyr Phe Cys Lys Gln Lys Cys Asp Ser Ala Asn
      115      120
His Asn Val Thr Asp Ser Cys Gly Thr Glu Leu Leu Val Leu Gly Phe
      130      135
Ser Thr Leu Asp Gln Leu Lys Arg Arg Asn Thr Leu Lys Asp Gly Ile
      145      150
Ile Leu Ile Gln Thr Leu Leu Ile Ile Leu Phe Ile Ile Val Pro Ile
      165      170
Phe Leu Leu Leu Asp Lys Asp Asp Gly Lys Ala Gly Met Glu Glu Asp
      180      185
His Thr Tyr Glu Gly Leu Asn Ile Asp Gln Thr Ala Thr Tyr Glu Asp
      195      200
Ile Val Thr Leu Arg Thr Gly Glu Val Lys Trp Ser Val Gly Glu His
      210      215
Pro Gly Gln Glu
      225

```

## (2) Sekvence ID NO:28:

5

## (i) sekvenční charakteristika

(A) Délka: 16 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

10

(C) Vlákňitost: nerelevantní

(D) Topologie: lineární

## (ii) Typ molekuly: protein

15

## (xi) Popis sekvence ID NO: 28:

```

Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly
1      5      10      15

```

## (2) Sekvence ID NO: 29:

20

## (i) sekvenční charakteristika:

(A) Délka: 19 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

25

(C) Vlákňitost: nerelevantní

(D) Topologie: lineární

## (ii) Typ molekuly: protein

## (xi) Popis sekvence: sekvence ID NO:29:

Pro Thr Trp Ser Thr Pro Val His Ala Asp Pro Lys Leu Cys Tyr Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Asp Gly

(2) Sekvence ID NO: 30:

5 (i) sekvenční charakteristika:

(A) Délka: 12 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Vlákňitost: nerelevantní

10 (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: sekvence ID NO:30:

15 Leu Gly Glu Pro Gln Leu Cys Tyr Ile Leu Asp Ala  
 1 5 10

(2) Sekvence ID NO: 31:

20 (i) sekvenční charakteristika:

(A) Délka: 19 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Vlákňitost: nerelevantní

25 (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: sekvence ID NO:31:

Pro Thr Trp Ser Thr Pro Val His Ala Asp Pro Gln Leu Cys Tyr Ile  
 1 5 10 15

Leu Asp Ala

30

(2) Sekvence ID NO: 32:

(i) sekvenční charakteristika:

35 (A) Délka: 16 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Vlákňitost: nerelevantní

(D) Topologie: lineární

40 (ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: sekvence ID NO:32:

Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly  
 1 5 10 15

## (2) Sekvence ID NO: 33:

5 (i) sekvenční charakteristika:

(A) Délka: 16 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

10 (C) Vlákňitost: nerelevantní

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: sekvence ID NO:33:

15 Phe Ser Pro Pro Gly Ala Asp Pro Lys Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly  
 1 5 10 15

## (2) Sekvence ID NO: 34:

20 (i) sekvenční charakteristika:

(A) Délka: 142 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Vlákňitost: nerelevantní

25 (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: sekvence ID NO:34:

Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly  
 1 5 10 15

Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala Leu Phe Leu Arg Val  
 20 25 30

Lys Phe Ser Arg Ser Ala Glu Pro Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn  
 35 40 45

Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val  
 50 55 60

Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg  
 65 70 75 80

Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys  
 85 90 95

Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg  
 100 105 110

Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys  
 115 120 125

Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
 130 135 140

## (2) Sekvence ID NO: 35:

## (i) sekvenční charakteristika:

- (A) Délka: 35 aminokyselin  
 (B) Typ: aminokyselina  
 (C) Vlákňitost: nerelevantní  
 (D) Topologie: lineární

## (ii) Typ molekuly: protein

## (xi) Popis sekvence: sekvence ID NO:35:

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Glu Pro Pro Ala Tyr Gln Gln Gly  
 1 5 10 15  
 Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr  
 20 25 30  
 Asp Val Leu  
 35

## (2) Sekvence ID NO: 36:

## (i) sekvenční charakteristika:

- (A) Délka: 32 aminokyselin  
 (B) Typ: aminokyselina  
 (C) Vlákňitost: nerelevantní  
 (D) Topologie: lineární

## (ii) Typ molekuly: protein

## (xi) Popis sekvence: sekvence ID NO:36:

Lys Lys Leu Val Lys Lys Phe Arg Gln Lys Lys Gln Arg Gln Asn Gln  
 1 5 10 15  
 Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu  
 20 25 30

## (2) Sekvence ID NO: 37:

## (i) sekvenční charakteristika:

- (A) Délka: 35 aminokyselin  
 (B) Typ: aminokyselina  
 (C) Vlákňitost: nerelevantní  
 (D) Topologie: lineární

## (ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: sekvence ID NO:37:

```

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

```

(2) Sekvence ID NO: 38:

5

(i) sekvenční charakteristika:

(A) Délka: 35 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

10 (C) Vlákňitost: nerelevantní

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

15

(xi) Popis sekvence: sekvence ID NO:38:

```

Arg Thr Arg Phe Ser Arg Ser Ala Glu Pro Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
1           5           10           15
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
          20           25           30
Asp Val Leu
          35

```

(2) Sekvence ID NO: 39:

20

(i) sekvenční charakteristika:

(A) Délka: 36 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

25 (C) Vlákňitost: nerelevantní

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

30

(xi) Popis sekvence: sekvence ID NO:39:

```

Arg Thr Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro
1           5           10           15
Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala
          20           25           30
Tyr Ser Glu Ile
          35

```

(2) Sekvence ID NO: 40

(i) sekvenční charakteristika:

- 5 (A) Délka: 38 aminokyselin  
 (B) Typ: aminokyselina  
 (C) Vláknotost: nerelevantní  
 (D) Topologie: lineární

10 (ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: sekvence ID NO:40:

```

Arg Thr Arg Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
1          5          10
Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp
          20          25          30
Ala Leu His Met Gln Ala
          35
  
```

15

## PATENTOVÉ NÁROKY

20

1. Terapeutická buňka pro řízení buněčné imunitní odpovědi u savců, exprimující nejméně dva bílkovinné chimérické receptory vázané na membránu, kde první obsahuje (a) extracelulární část, která je schopná specifického rozpoznávání a navázání se na cílovou buňku nebo cílovou infekční částici a (b) intracelulární nebo transmembránovou část, schopnou dát signál terapeutické buňce ke zničení cílové buňky navázané na receptor nebo cílové infekční částice navázané na receptor; a druhý z receptorů obsahuje (a) extracelulární část, která je schopná specifického rozpoznávání a navázání se na cílovou buňku nebo cílovou infekční částici a (b) intracelulární část odvozenou od CD28.

25

30 2. Terapeutická buňka podle nároku 1, kde cílová buňka je hostitelská buňka infikovaná infekční částicí, nádorová nebo rakovinová buňka, nebo autoimunitou generovaná buňka.

3. Terapeutická buňka podle nároku 1, která je schopná zničit cílovou buňku navázanou na receptor nebo cílovou infekční částici navázanou na receptor způsobem nezávislým na MHC.

35

4. Terapeutická buňka podle nároku 1, kde intracelulární nebo transmembránová část prvního receptoru je část převádějící signál proteinu receptoru T-lymfocyty, proteinu receptoru B-lymfocyty nebo proteinu Fc receptoru, nebo jejich funkčního derivátu.

40 5. Terapeutická buňka podle nároku 1, kde transmembránová část je schopná oligomerizovat s proteinem převádějícím cytolytický signál terapeutické buňky.

45 6. Terapeutická buňka podle nároku 4, kde intracelulární nebo transmembránová doména je odvozena od receptorů T-lymfocytů  $\zeta$ ,  $\eta$ , CD3 delta nebo T3 gama proteinu;  $\gamma$  proteinu Fc receptoru; nebo m1b nebo B29 proteinu receptoru B-lymfocyty.

7. Terapeutická buňka podle nároku 6, kde chimérní receptor zahrnuje buď
- aminokyseliny 421–532 sekvence ID No: 6 nebo jejich funkční derivát převádějící cytolytický signál;
  - aminokyseliny (a) 423–455; (c) 461–494; nebo (d) 494–528 sekvence ID No:6;
  - aminokyseliny 400–420 sekvence ID No: 6;
  - aminokyseliny 421–575 sekvence ID No: 4 nebo jejich funkční derivát převádějící cytolytický signál;
  - aminokyselina (a) 423–455; (b) 438–455; (c) 461–494; nebo (d) 494–528 sekvence ID No: 4;
  - aminokyseliny 400–420 sekvence ID No: 4;
  - aminokyseliny 421–462 sekvence ID No: 5 nebo jejich funkční derivát převádějící cytolytický signál;
  - aminokyseliny 402–419 sekvence ID No: 5;
  - aminokyseliny Tyr282–Tyr298 zahrnuty v obr. 15A;
  - aminokyseliny 132–171 z obr. 16, sekvence ID No: 24;
  - aminokyseliny 140–182 z obr. 17, sekvence ID No: 25;
  - aminokyseliny 162–220 z obr. 18, sekvence ID No: 26;
  - aminokyseliny 183–228 z obr. 19, sekvence ID No: 27.
8. Terapeutická buňka podle nároku 4, kde protein Fc receptoru je lidský FcγRIII, lidský FcRIIγA nebo lidský FcRIIγC.
9. Terapeutická buňka podle nároku 4, která je vybrána ze skupiny, skládající se z
- T-lymfocytů;
  - cytotoxických T-lymfocytů;
  - přirozených zabíječských buněk;
  - neutrofilů;
  - granulocytů;
  - makrofágů;
  - stěžňových buněk;
  - HeLa buněk; a
  - embryonálních kmenových buněk ES,
- a kde terapeutická buňka exprimuje chimérické receptory.
10. Terapeutická buňka podle nároku 4, kde cílová infekční částice je virus imunodeficiency.
11. Terapeutická buňka podle nároku 4, kde extracelulární část zahrnuje doménu CD4 vázající obálku HIV, nebo jí funkční derivát vázající obálku HIV.
12. Terapeutická buňka podle nároku 4, kde část CD4 vázající obálku HIV zahrnuje peptid kódovaný nukleotidy 1–369 sekvence ID No:1.
13. Terapeutická buňka podle nároku 4, která je schopná zničit cílovou buňku vázanou na receptor nebo cílovou infekční částici cytolyticky.
14. Terapeutická buňka podle nároku 1, která exprimuje nejméně dva bílkovinné chimérní receptory vázané na membránu, kde první obsahuje (a) extracelulární část, která je schopná specifického rozpoznávání a navázání se na cílovou buňku nebo cílovou infekční částici a (b) intracelulární nebo transmembránovou část odvozenou od receptoru T-lymfocyty, B-lymfocyty

nebo Fc receptoru, schopnou dát signál buňce ke zničení cílové buňky navázané na receptor nebo cílové infekční částice navázané na receptor; a druhý z receptorů obsahuje (a) extracelulární část, která je schopná specifického rozpoznávání a vázání se na cílovou buňku nebo cílovou infekční částici a (b) intracelulární částic odvozenou od CD28.

5

**15.** Terapeutická buňka podle nároku 14, kde cílová buňka je hostitelská buňka infikovaná infekční částicí, nádorová nebo rakovinová buňka, nebo buňka generovaná autoimunitou.

10

**16.** Terapeutická buňka podle nároku 14, která je schopná zničit cílovou buňku navázanou na receptor nebo cílovou infekční částici navázanou na receptor způsobem nezávislým na MHC.

15

**17.** Terapeutická buňka podle nároku 14, kde intracelulární nebo transmembránová doména je odvozena od receptorů T-lymfocytů  $\zeta$ ,  $\eta$ , CD3 delta nebo T3 gama proteinu;  $\gamma$  proteinu FC receptoru; nebo mbl nebo B29 proteinu receptoru B-lymfocytu.

15

**18.** Terapeutická buňka podle nároku 17, kde chimérní receptor zahrnuje buď

20

a) aminokyseliny 421–532 sekvence ID No: 6 nebo jejich funkční derivát převádějící cytolytický signál;

b) aminokyseliny (a) 423–455; (b) 438–455; (c) 461–494; nebo (d) 494–528 sekvence ID No: 6;

c) aminokyseliny 400–420 sekvence ID No: 6;

d) aminokyseliny 421–575 sekvence ID No: 4 nebo jejich funkční derivát převádějící cytolytický signál;

25

e) aminokyseliny (a) 423–455; (b) 438–455; (c) 461–494; nebo (d) 494–528 sekvence II No: 4;

f) aminokyseliny 400–420 sekvence 11) No: 4;

g) aminokyseliny 421–462 sekvence ID No: 5 nebo jejich funkční derivát převádějící cytolytický signál;

h) aminokyseliny 402–419 sekvence II) No: 5;

30

i) aminokyseliny Tyr282–Tyr298 zahrnutý v obr. 15A;

j) aminokyseliny 132–171 z obr. 16, sekvence ID No: 24;

k) aminokyseliny 140–182 z obr. 17, sekvence ID No.: 25;

l) aminokyseliny 162–220 z obr. 18, sekvence ID No: 26;

m) aminokyseliny 183–228 z obr. 19, sekvence ID No: 27.

35

**19.** Terapeutická buňka podle nároku 14, kde protein Fc receptoru je lidský Fc $\gamma$ R2b, lidský FcRII $\gamma$ A nebo lidský FcRII $\gamma$ C.

40

**20.** Terapeutická buňka podle nároku 14, kde extracelulární část zahrnuje část receptoru vázající ligand, část ligandu vázající receptor, část protilátky vázající antigen nebo její funkční derivát.

**21.** Terapeutická buňka podle nároku 20, kde cílová infekční částice je virus imunodeficiency nebo cílová buňka je hostitelská buňka infikovaná virem imunodeficiency.

45

**22.** Terapeutická buňka podle nároku 21, kde extracelulární část zahrnuje doménu CD4 vázající obálku HIV, nebo její funkční derivát.

50

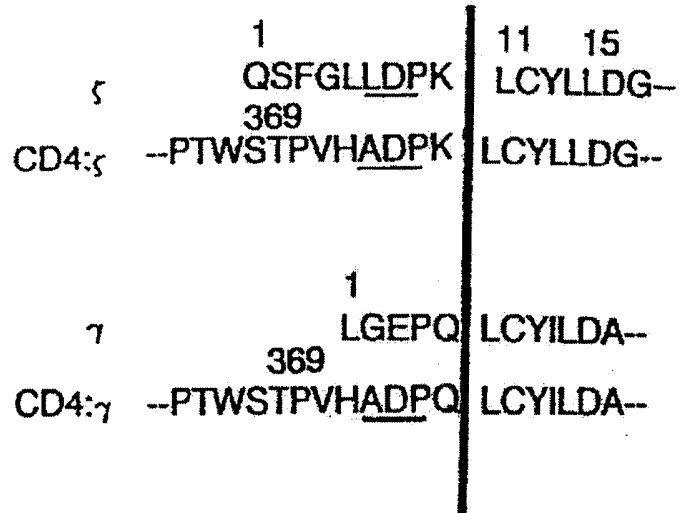
**23.** Terapeutická buňka podle nároku 22, kde doména CD4 vázající HIV obálku zahrnuje peptid kódovaný nukleotidy 1–369 sekvence ID No: 1.

**24.** Terapeutická buňka podle nároku 14, která ničí cílovou buňku vázanou na receptor nebo cílovou infekční částici cytolyticky.

25. Terapeutická buňka podle nároku 4, která exprimuje nejméně dva bílkovinné chimérické receptory vázané na membránu, kde první obsahuje (a) extracelulární doménu, která je schopná specifického rozpoznávání a navázání se na cílovou buňku nebo cílovou infekční částici a (b) intracelulární nebo transmembránovou doménu odvozenou od CD3 receptoru T-lymfocyty, zeta nebo eta polypeptidu, receptoru B-lymfocyty nebo Fc receptoru; a druhý z receptorů obsahuje (a) extracelulární doménu, která je schopná specifického rozpoznávání a vázání se na cílovou buňku nebo cílovou infekční částici a (b) intracelulární doménu odvozenou od CD28.
26. Terapeutická buňka podle nároku 14 nebo 25, kde chimérický receptor obsahuje buď
- a) extracelulární část CD16, CD7 nebo CD5;
  - b) transmembránovou část CD5 nebo CD7; nebo
  - c) intracelulární část CD5.

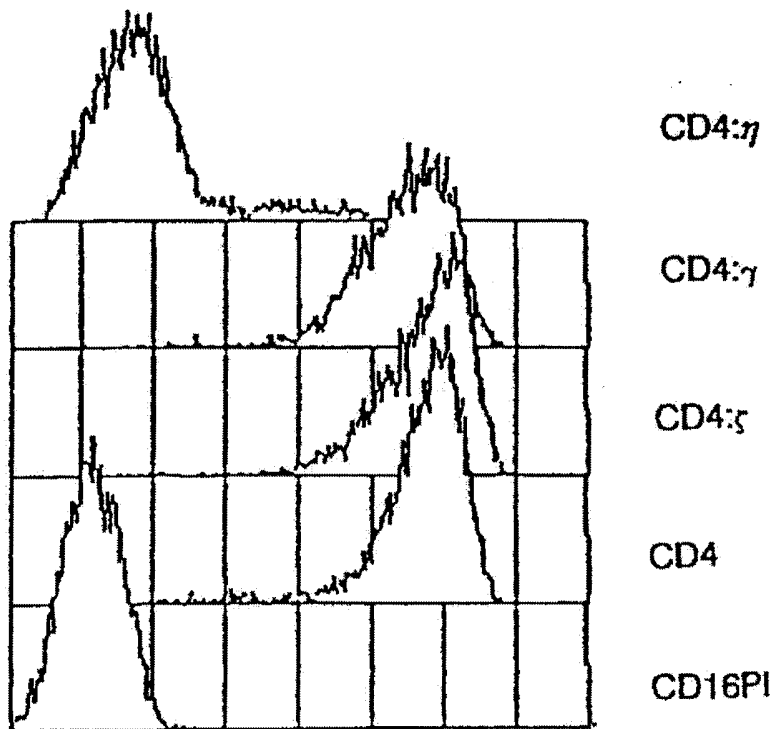
21 výkresů

Obr. 1a



Obr. 1b

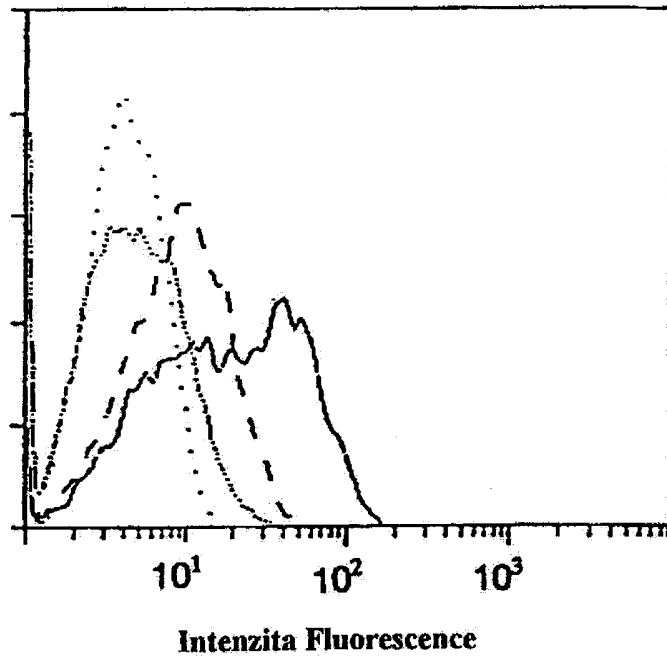
POČET BUNĚK



Intenzita Fluorescence

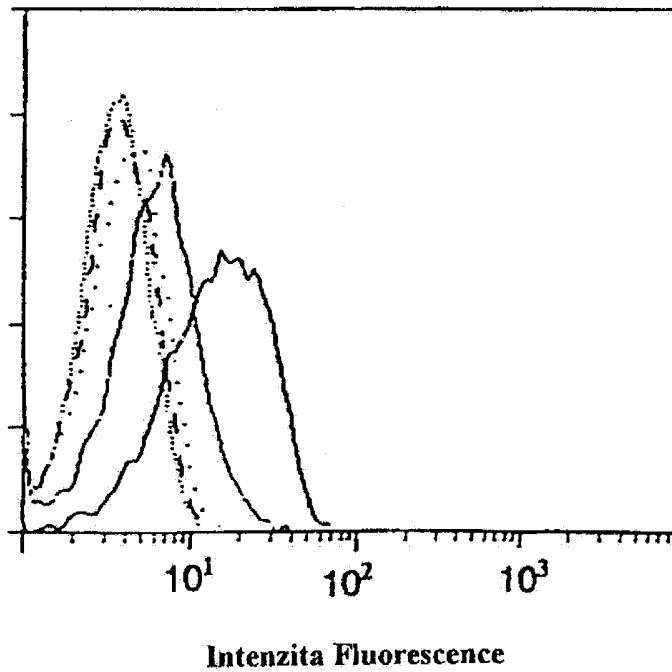
Obr. 2

RELATIVNÍ  
POČET BUNĚK

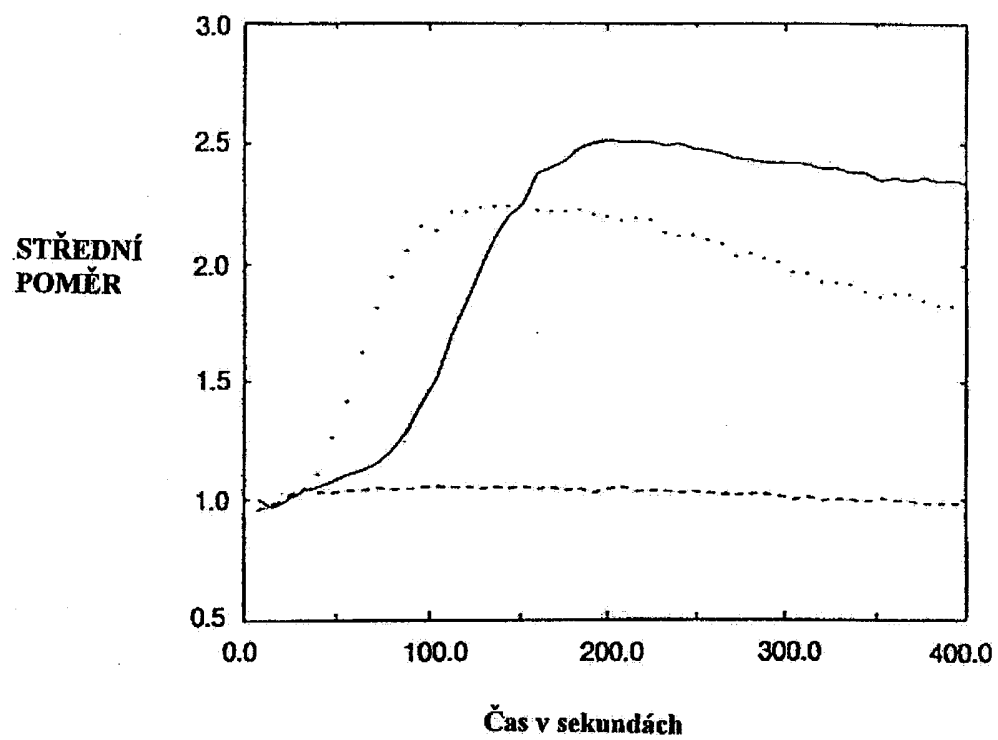


Obr. 3

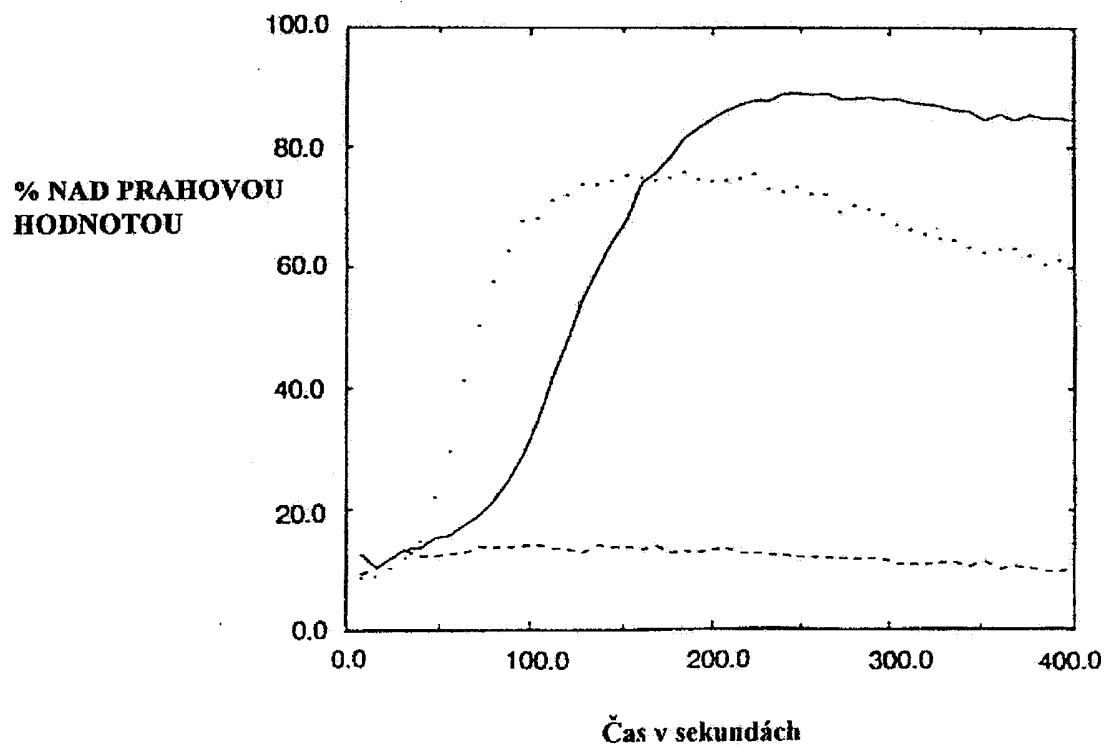
RELATIVNÍ  
POČET BUNĚK



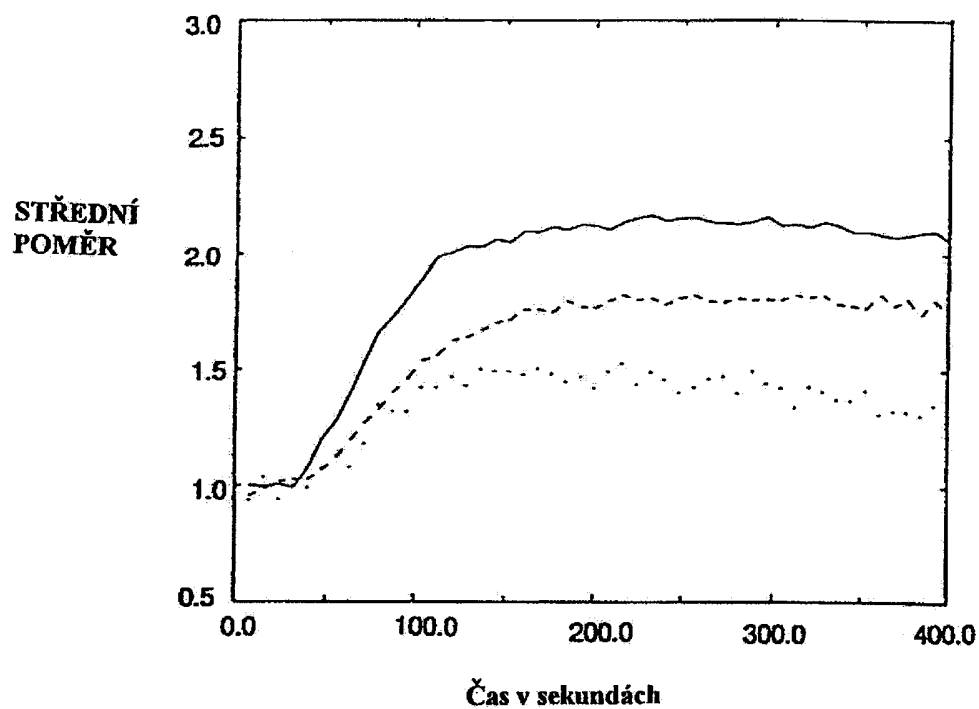
Obr. 4a



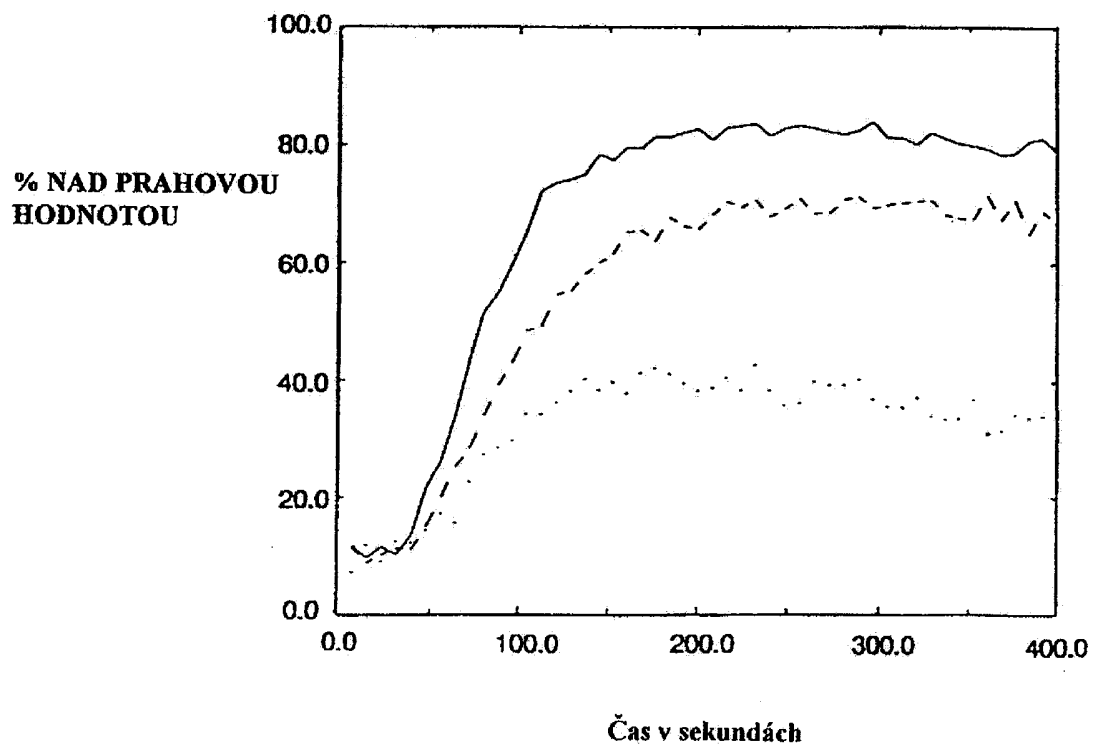
Obr. 4b



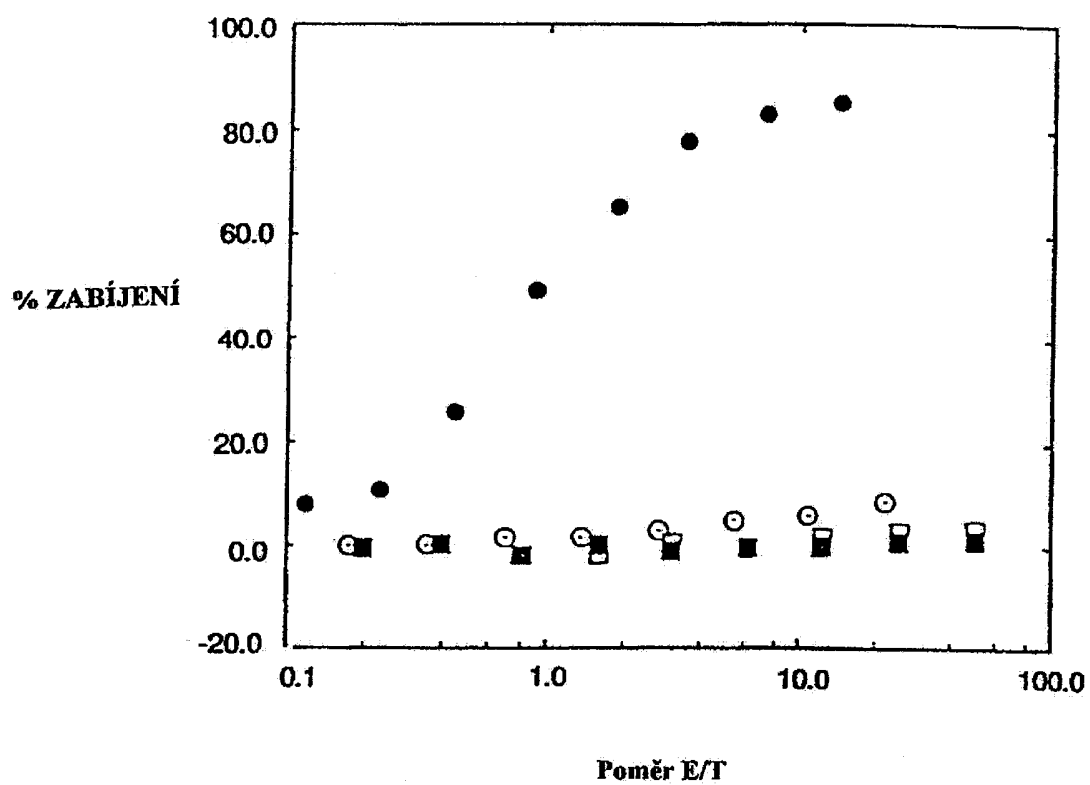
Obr. 4c



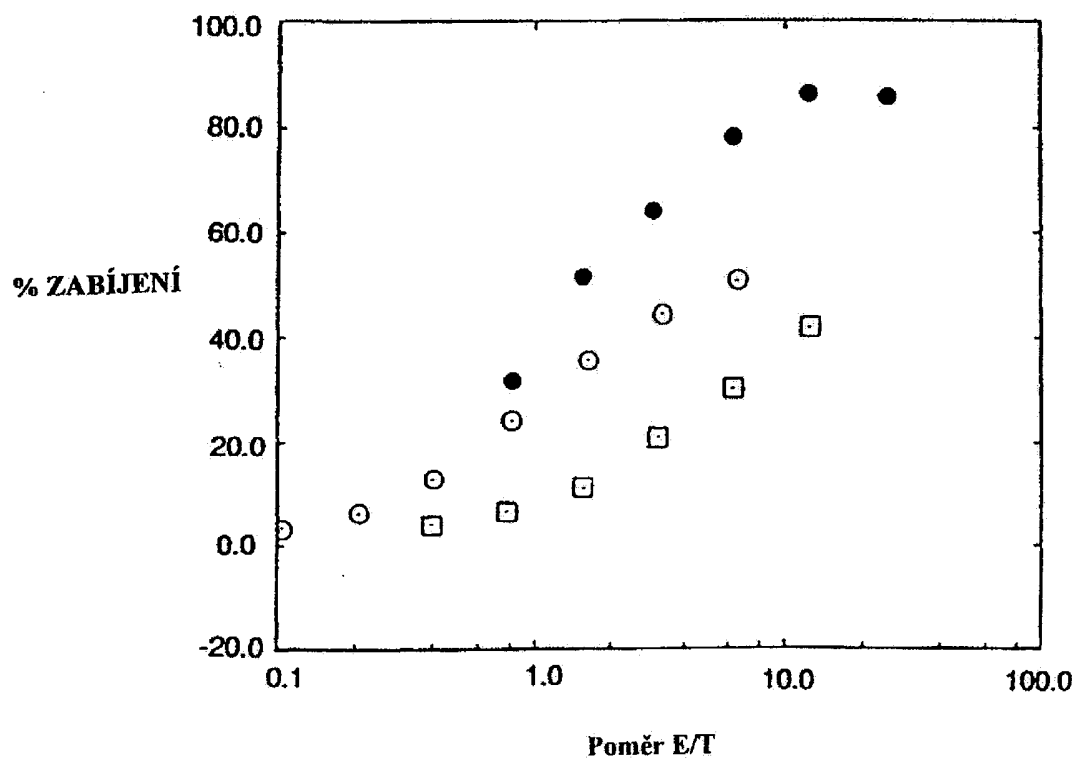
Obr. 4d



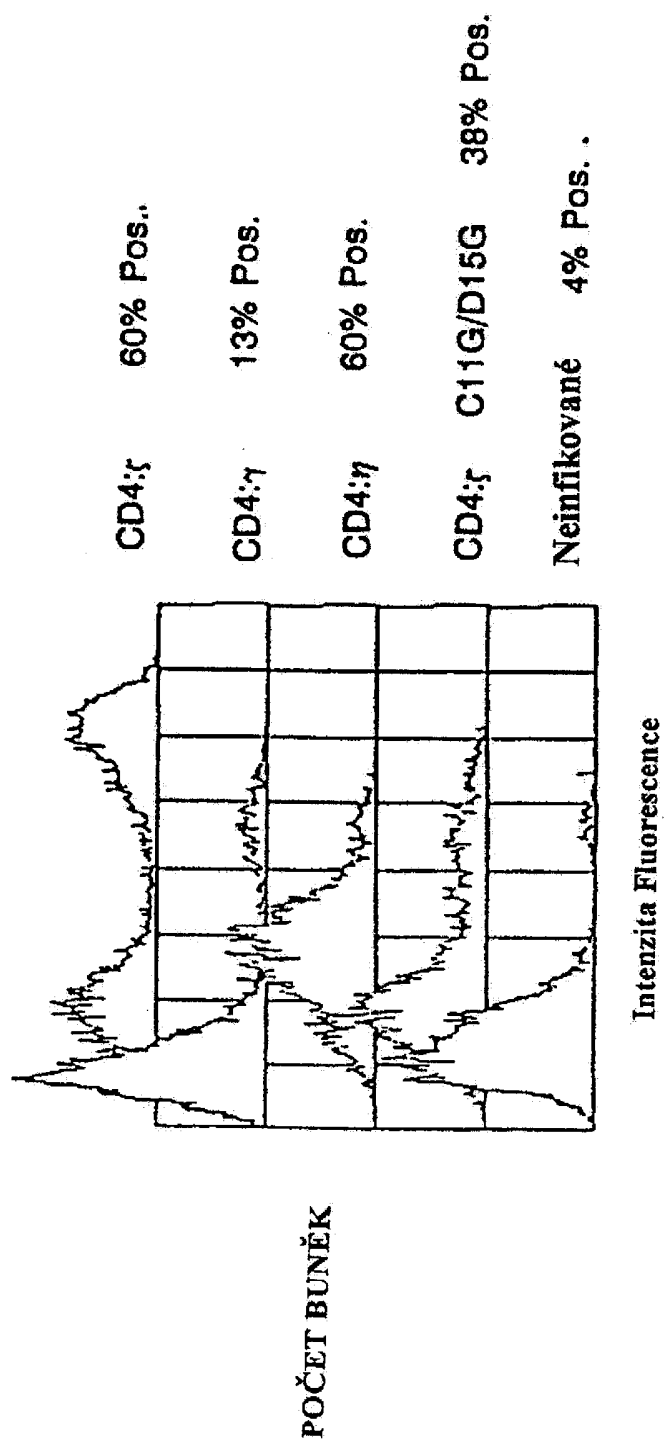
Obr. 5a



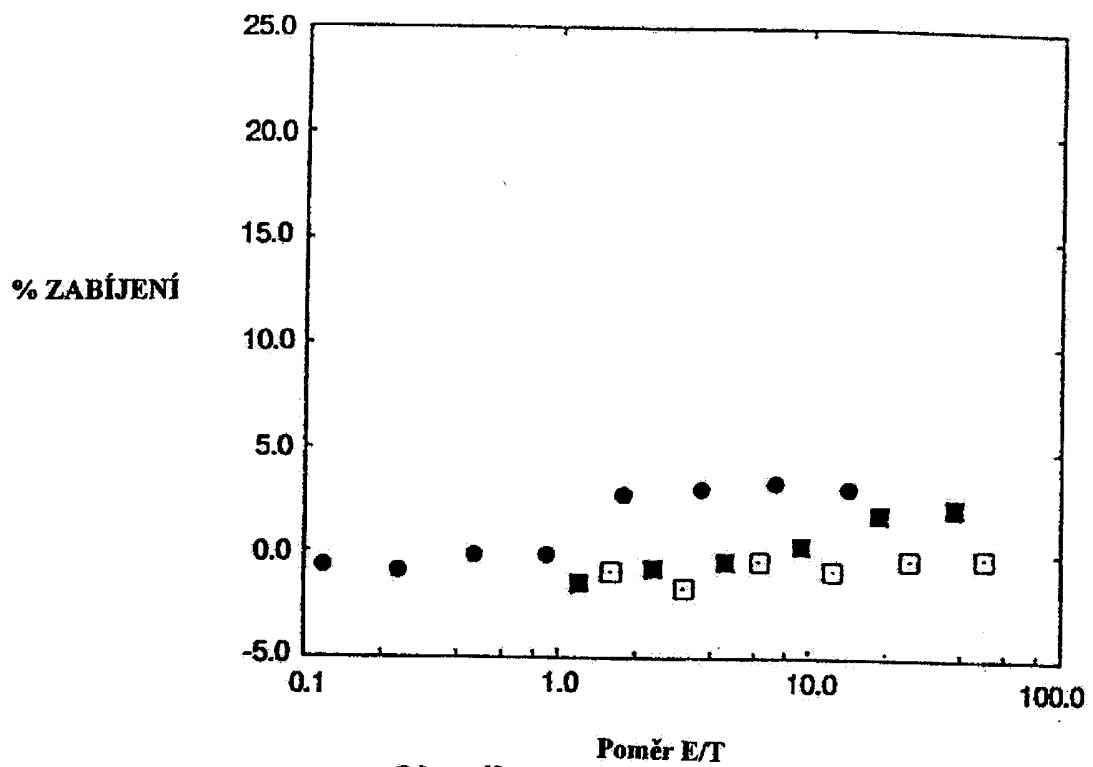
Obr. 5b



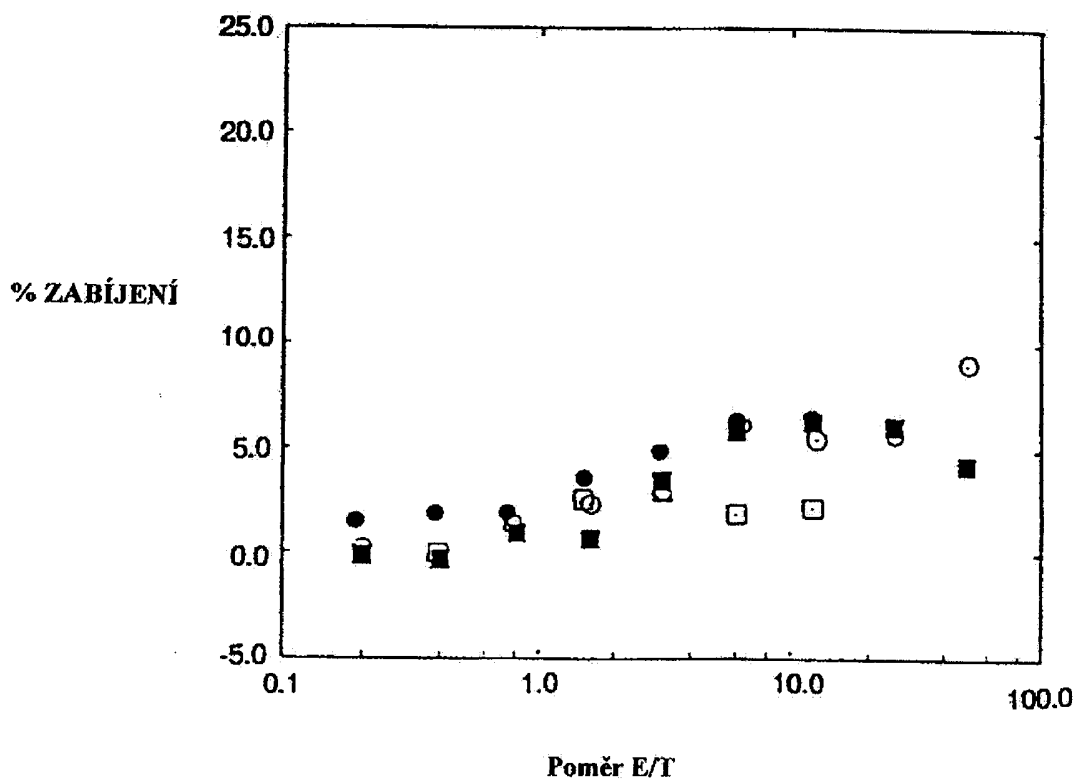
Obr. 5c



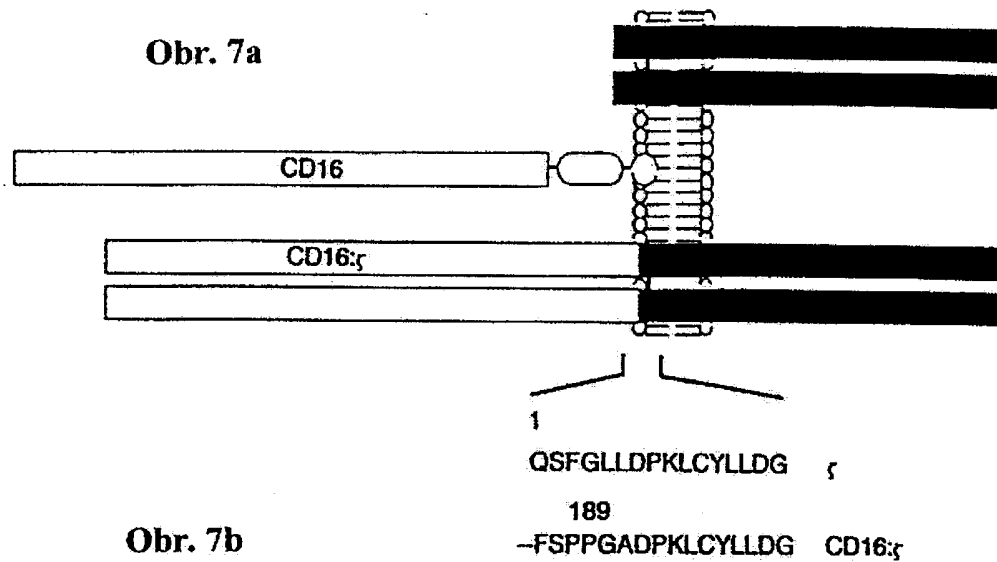
Obr. 6a



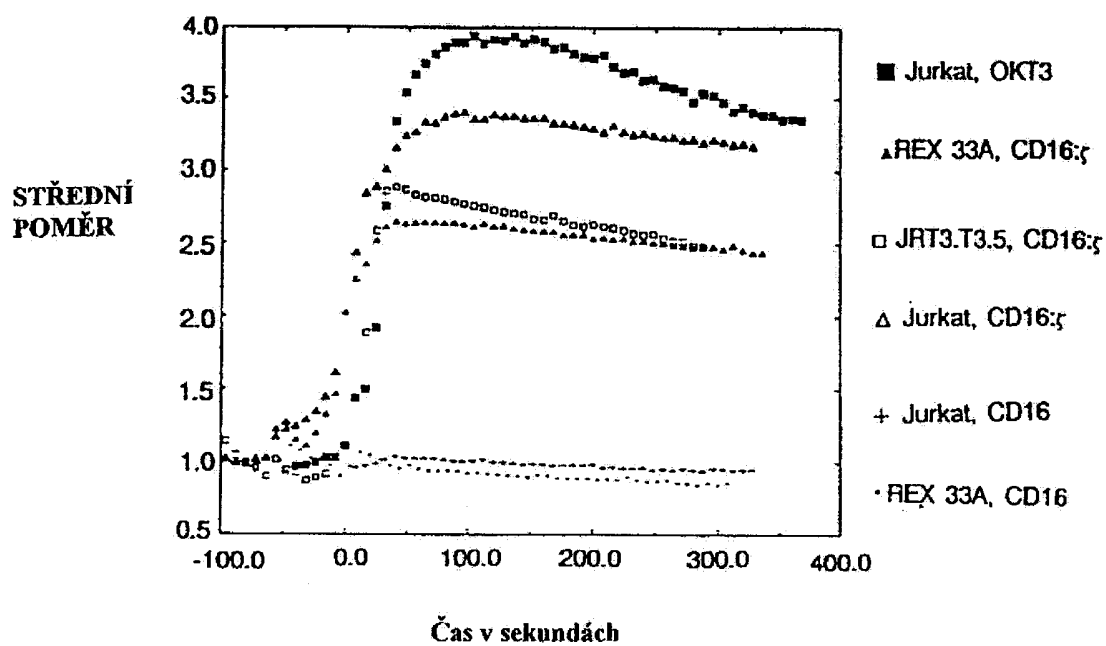
Obr. 6b



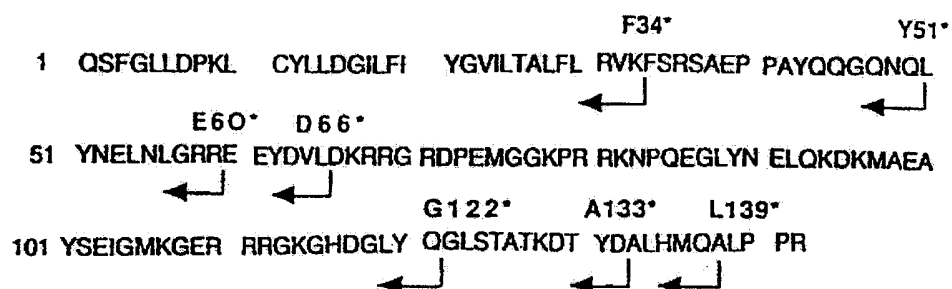
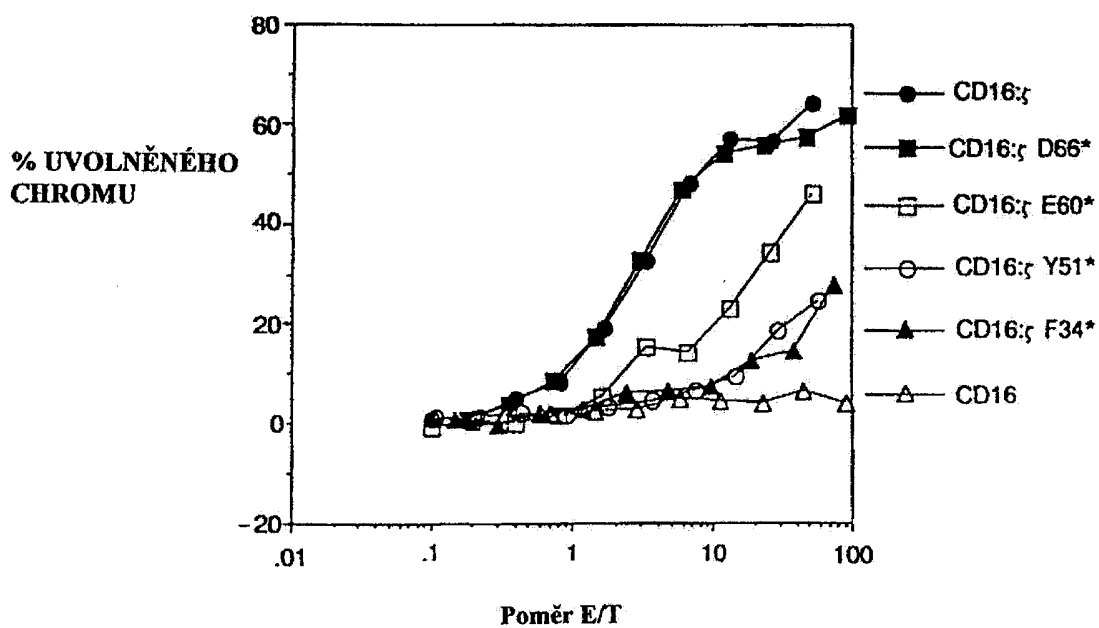
Obr. 7a



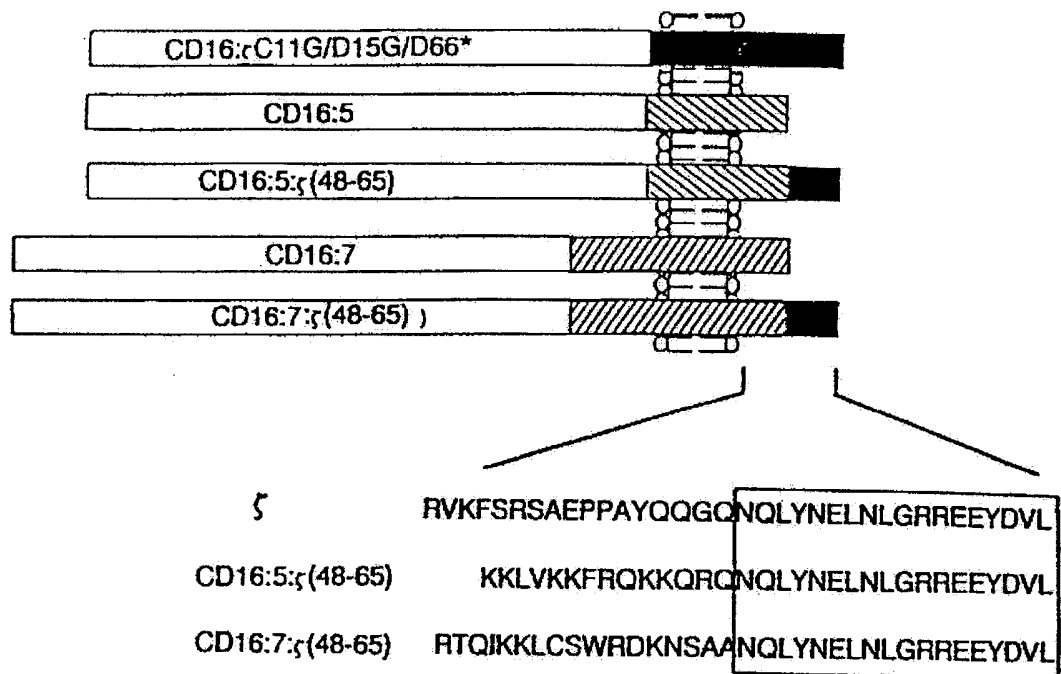
Obr. 7b



**Obr. 8a**

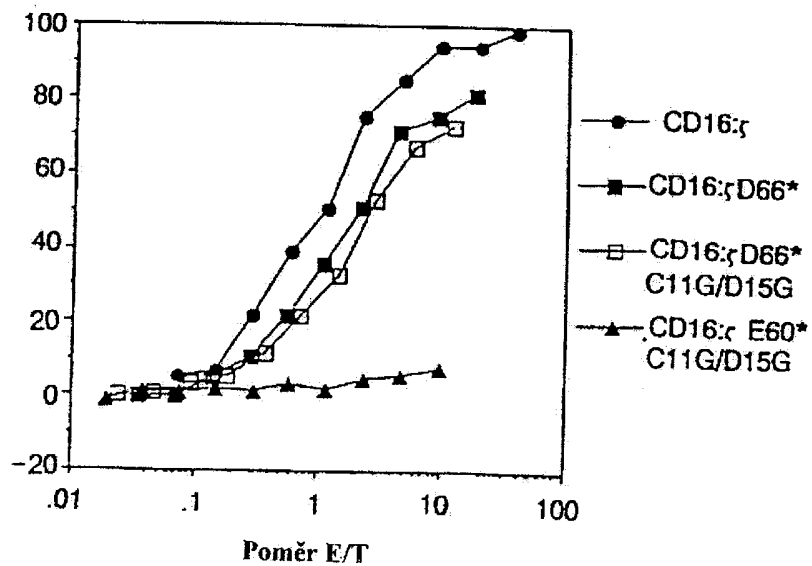
**Obr. 8b**

Obr. 9a

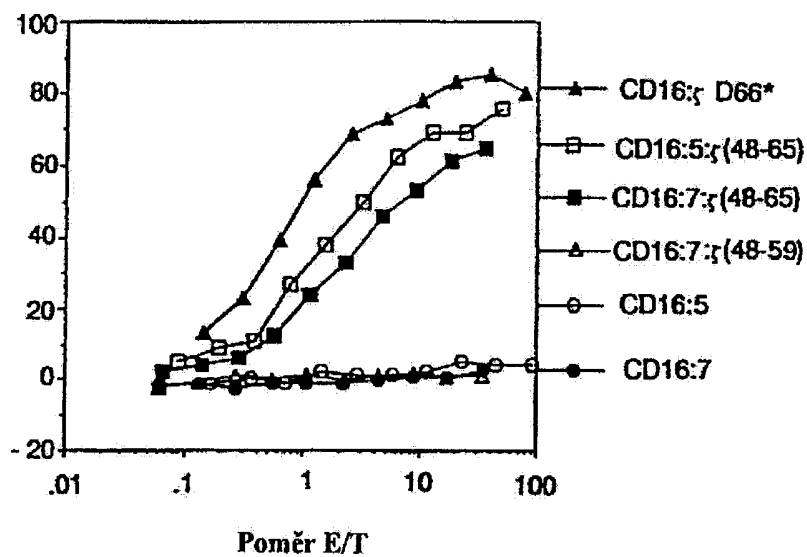


Obr. 9b

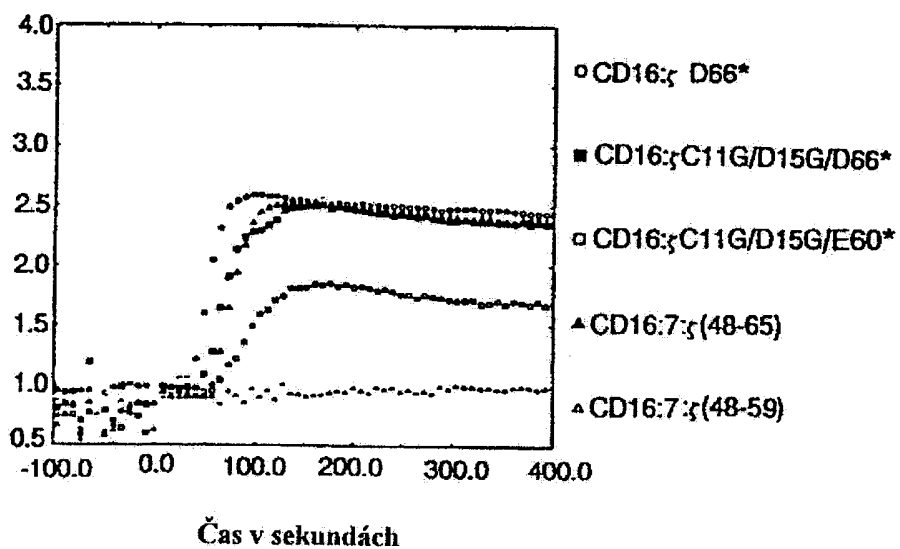
% UVOLNĚNÉHO  
CHROMU



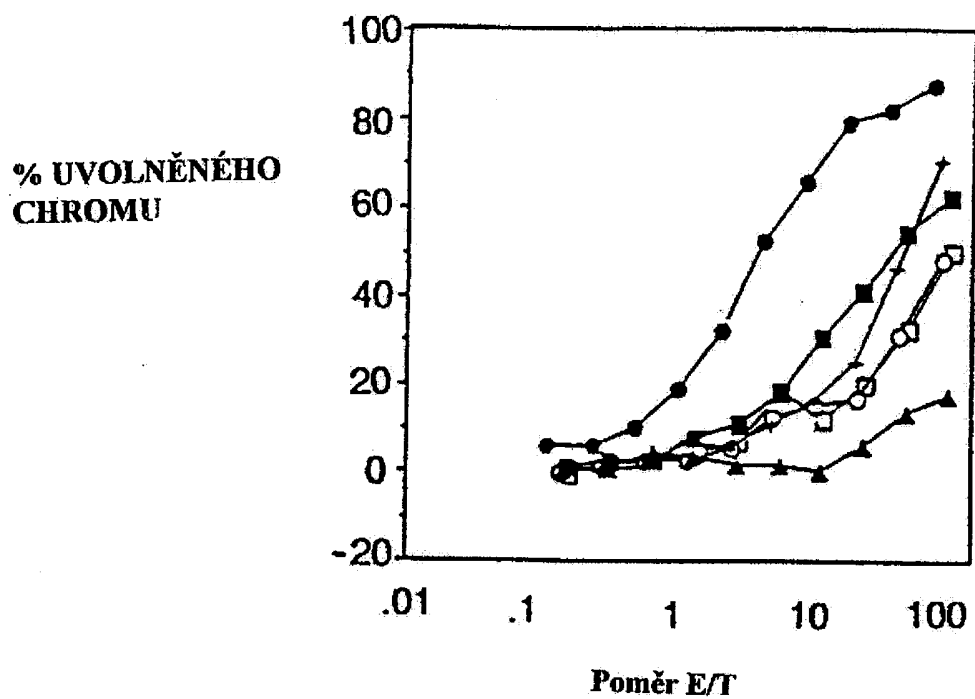
Obr. 9c



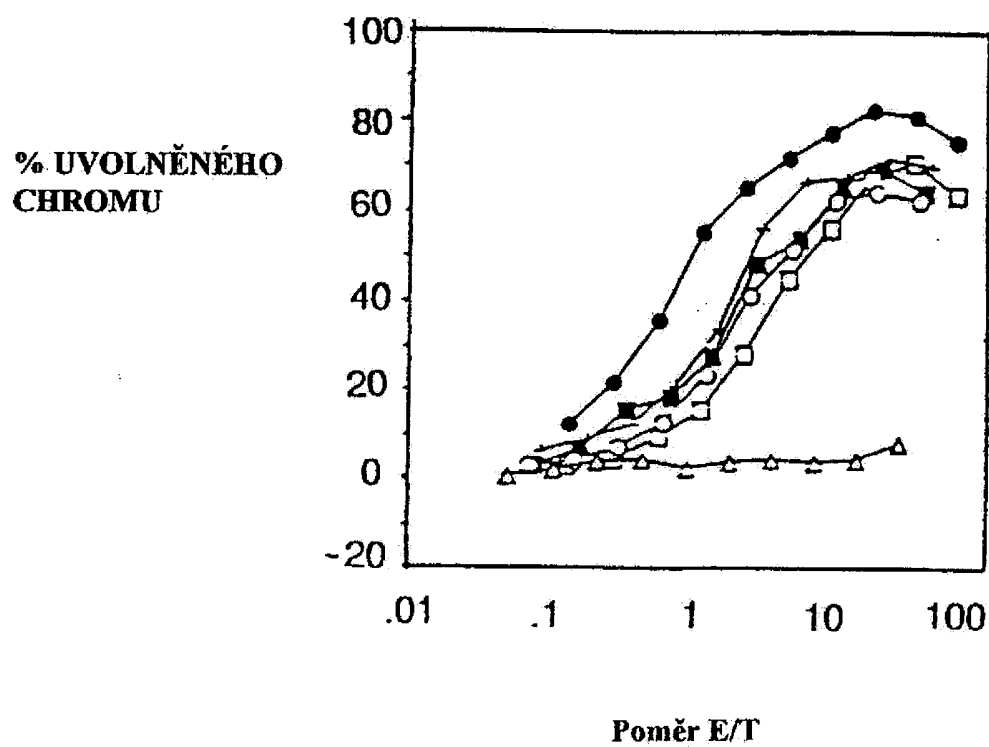
Obr. 9d

STŘEDNÍ  
POMĚR

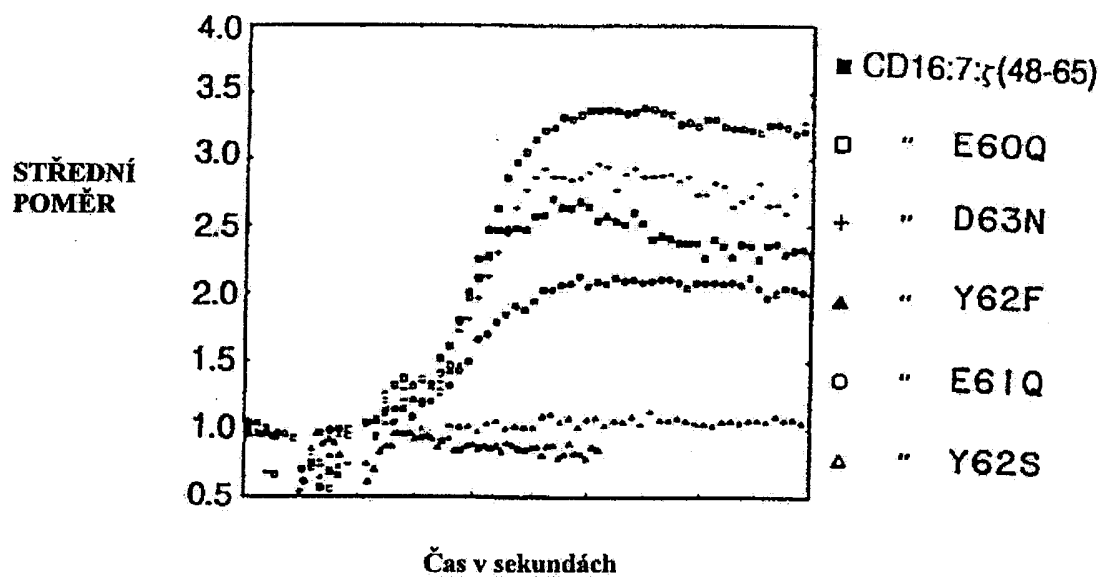
Obr. 10a



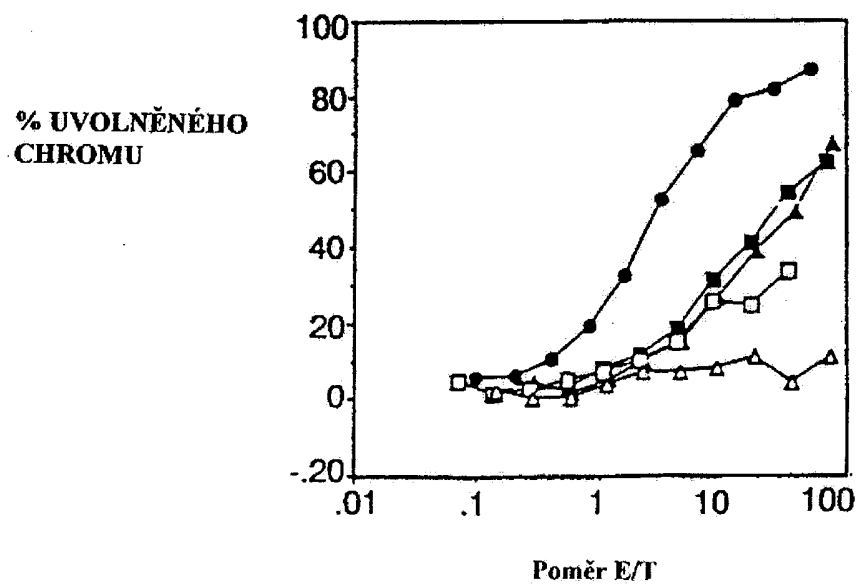
Obr. 10b



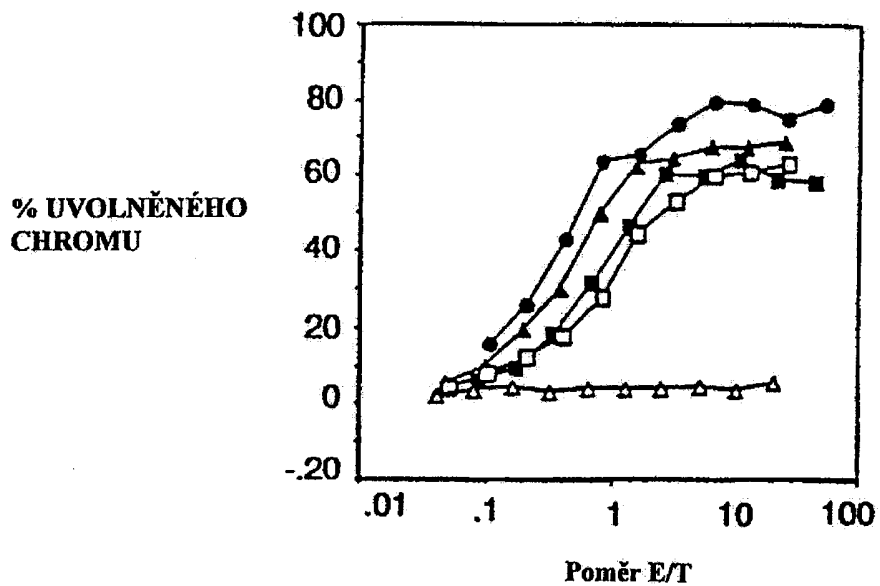
Obr. 10c



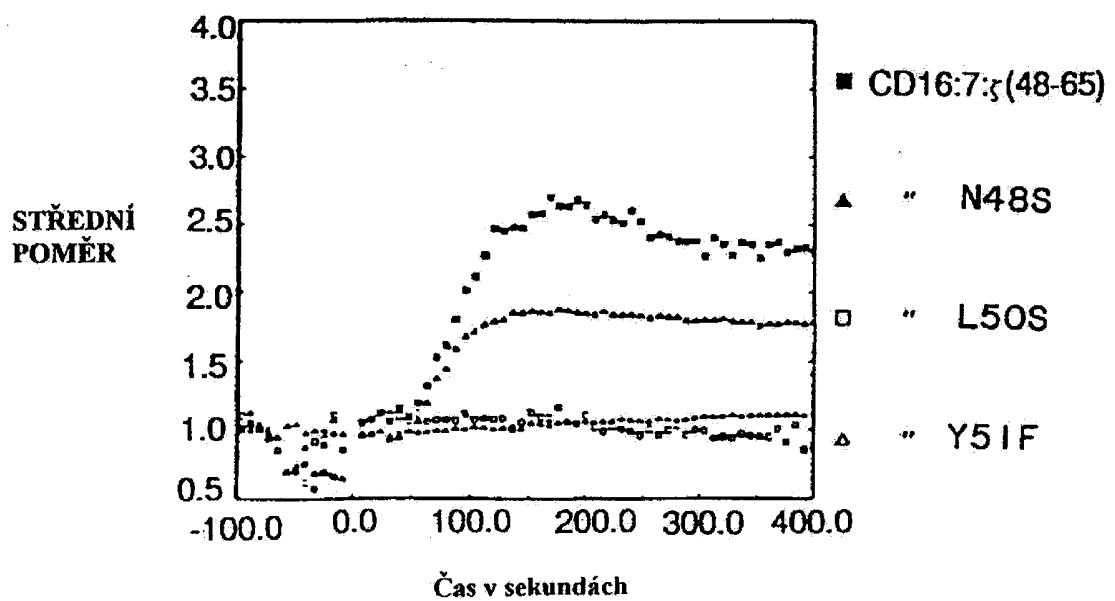
Obr. 10d



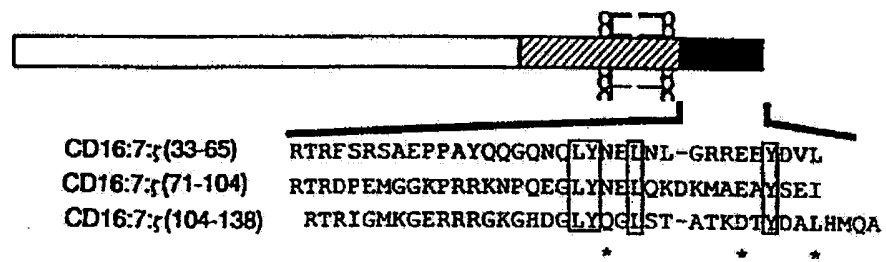
Obr. 10e



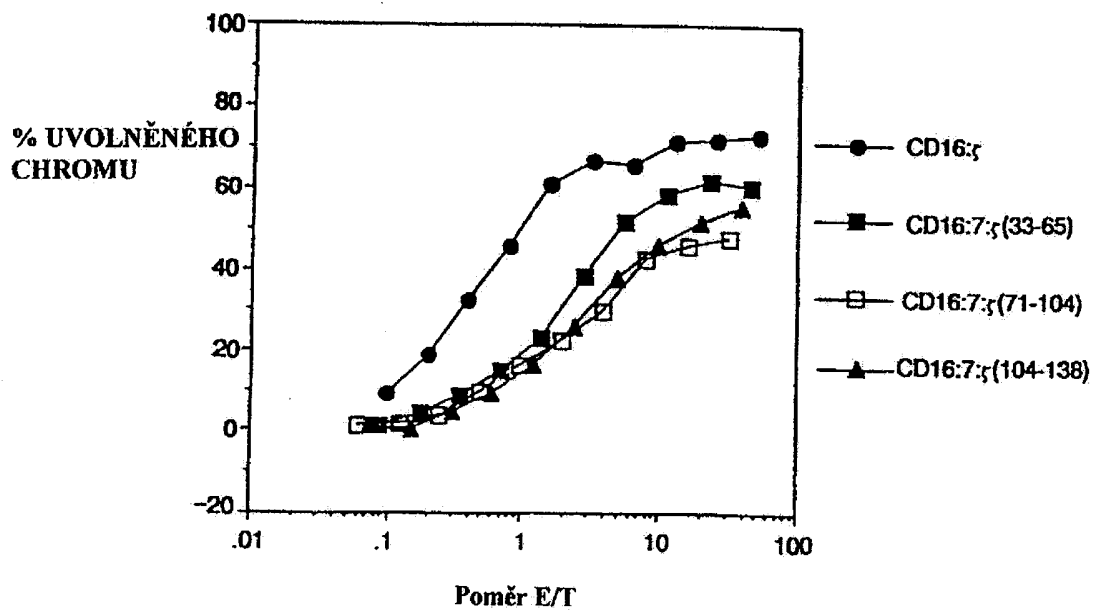
Obr. 10f

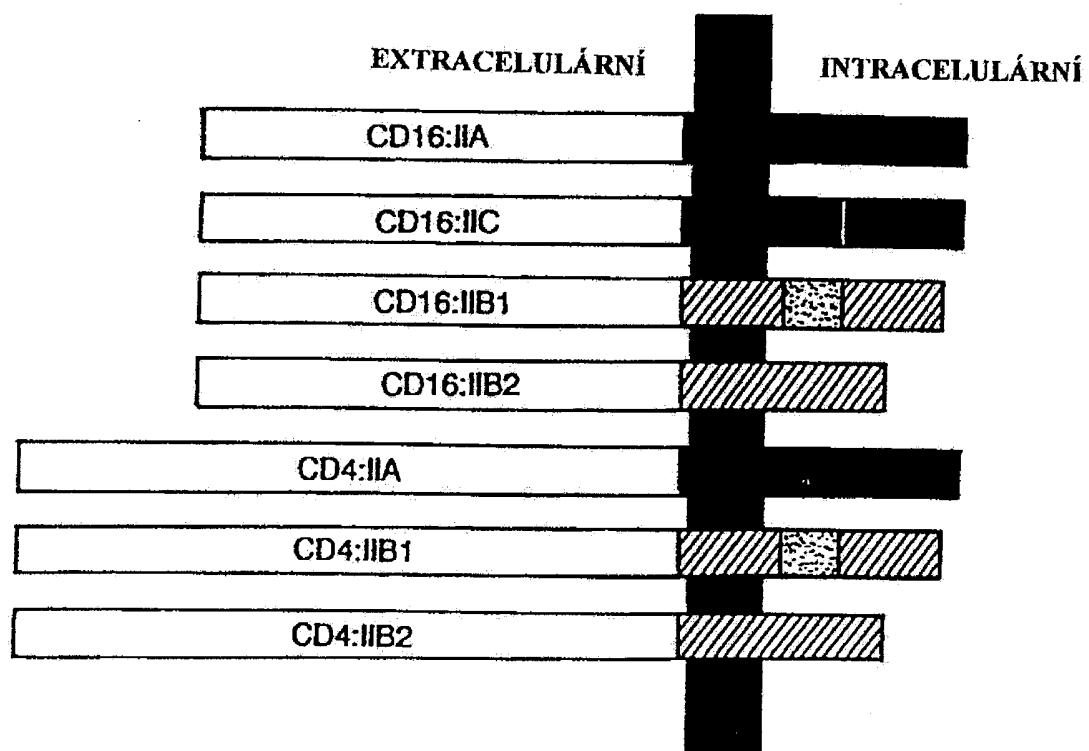


Obr. 11a



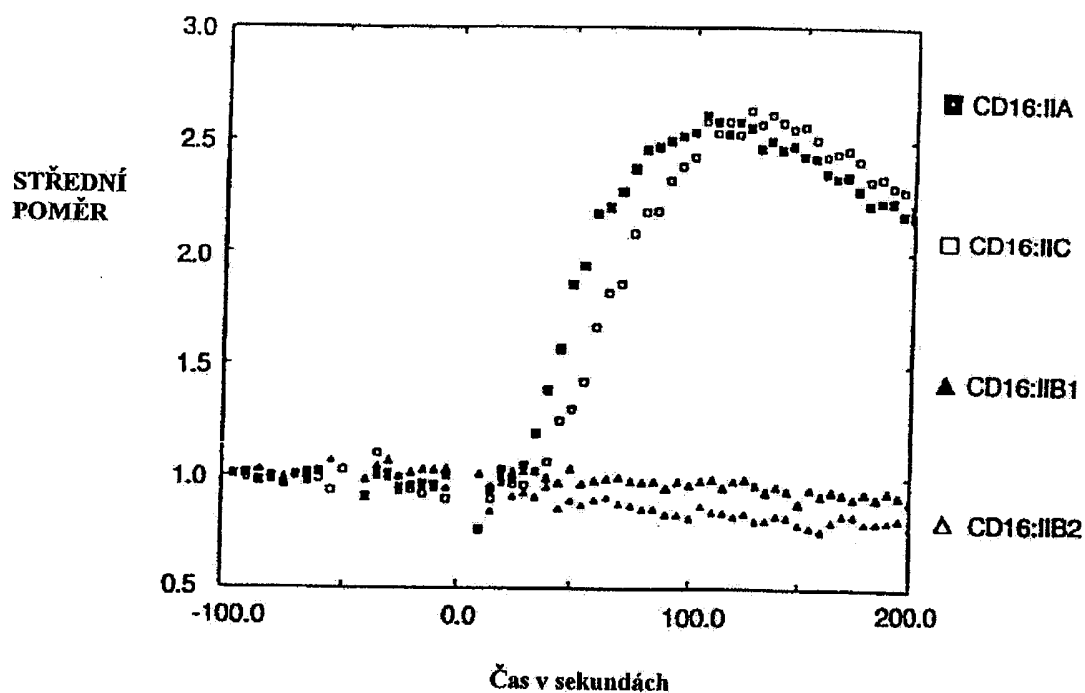
Obr. 11b



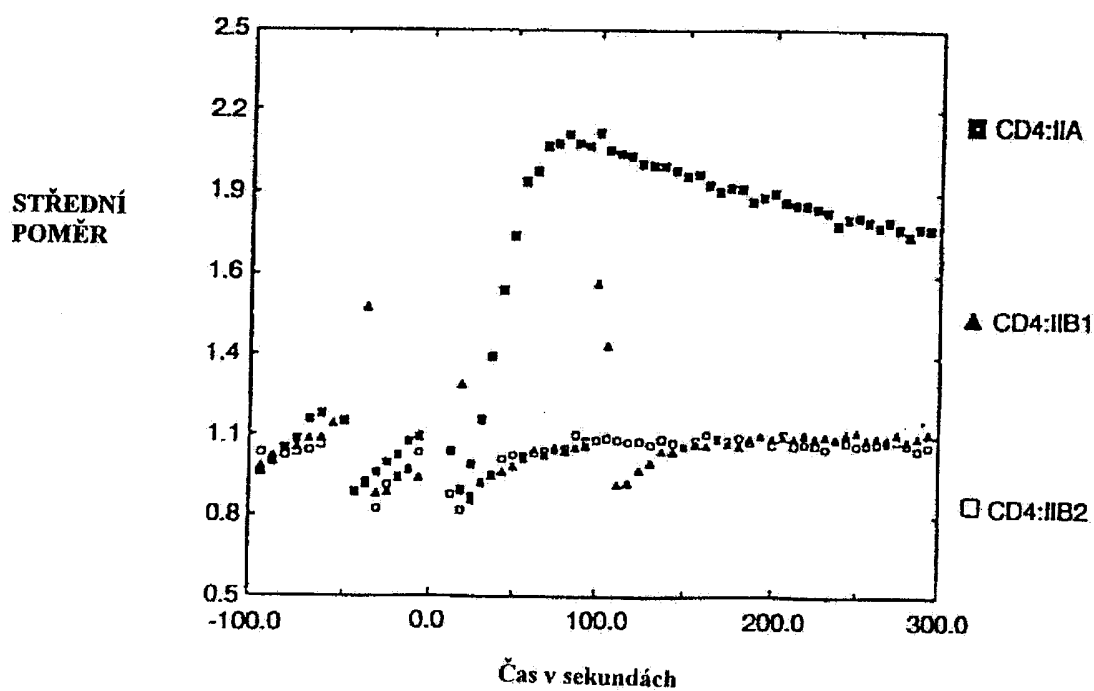


Obr. 12

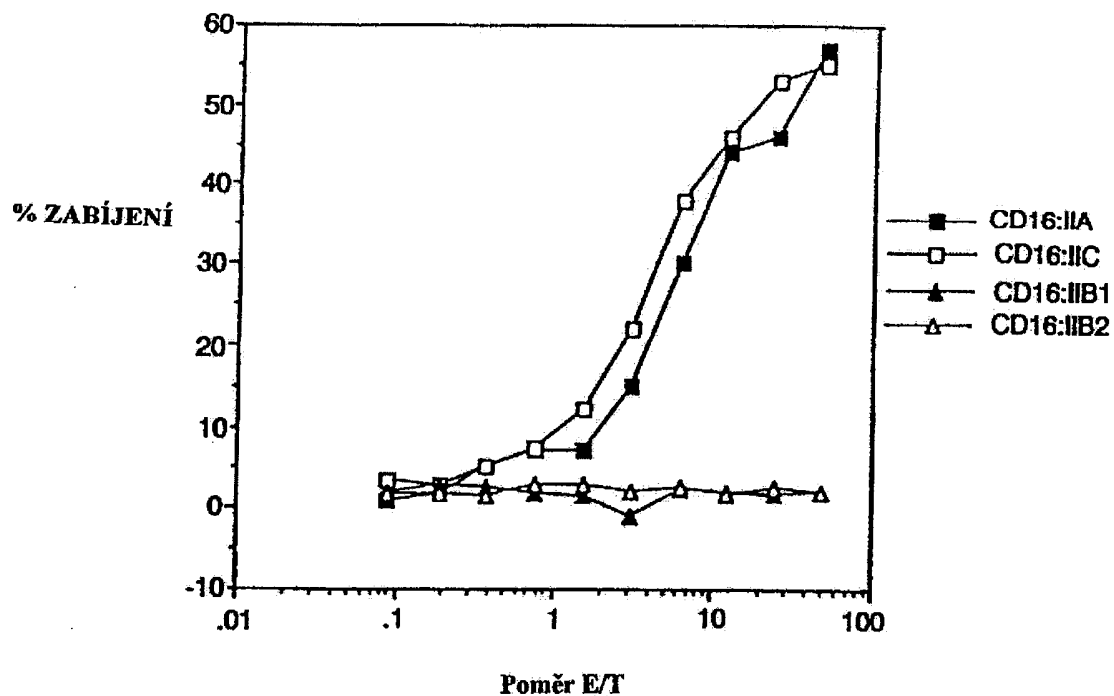
Obr. 13a



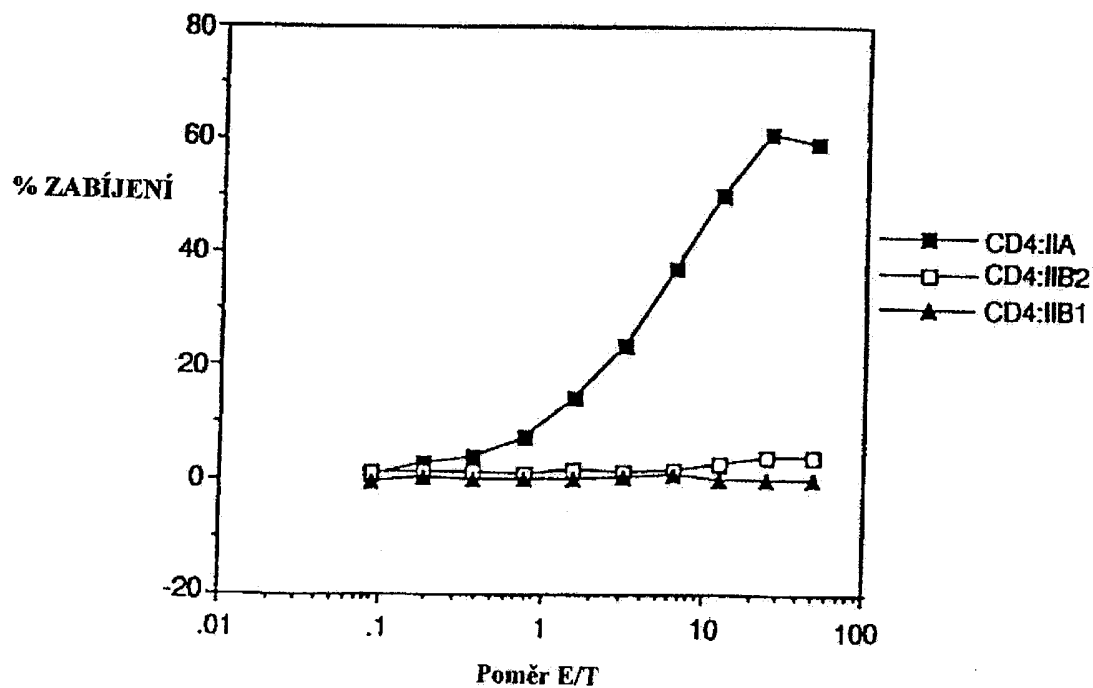
Obr. 13b



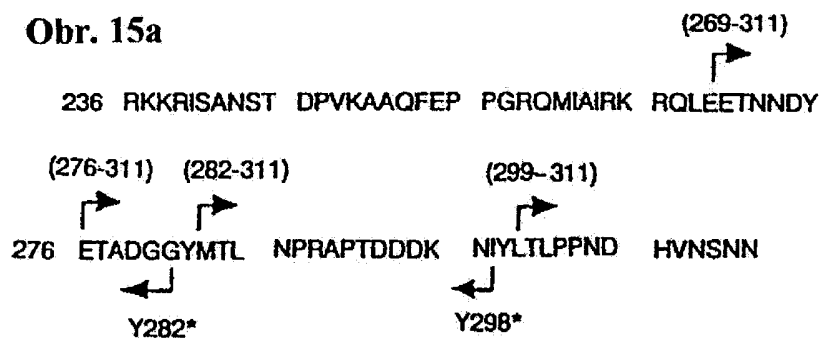
Obr. 14a



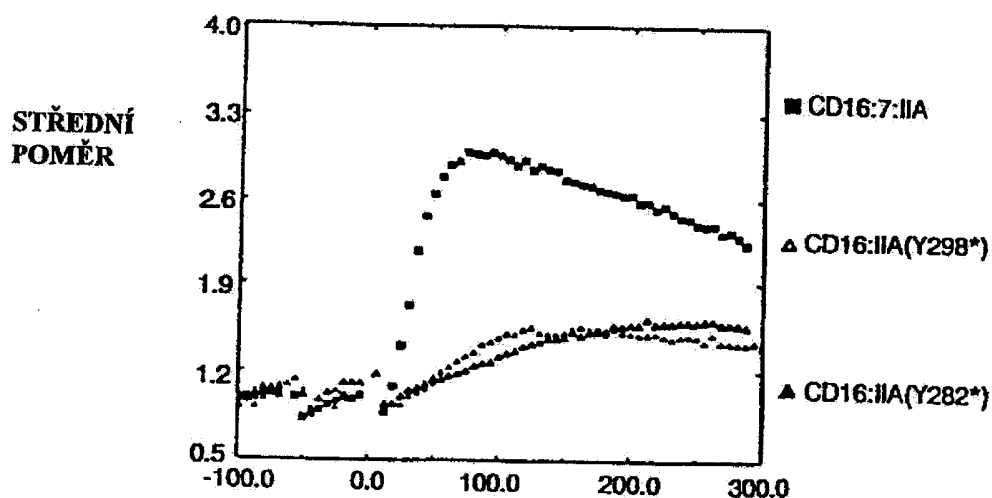
Obr. 14b



Obr. 15a

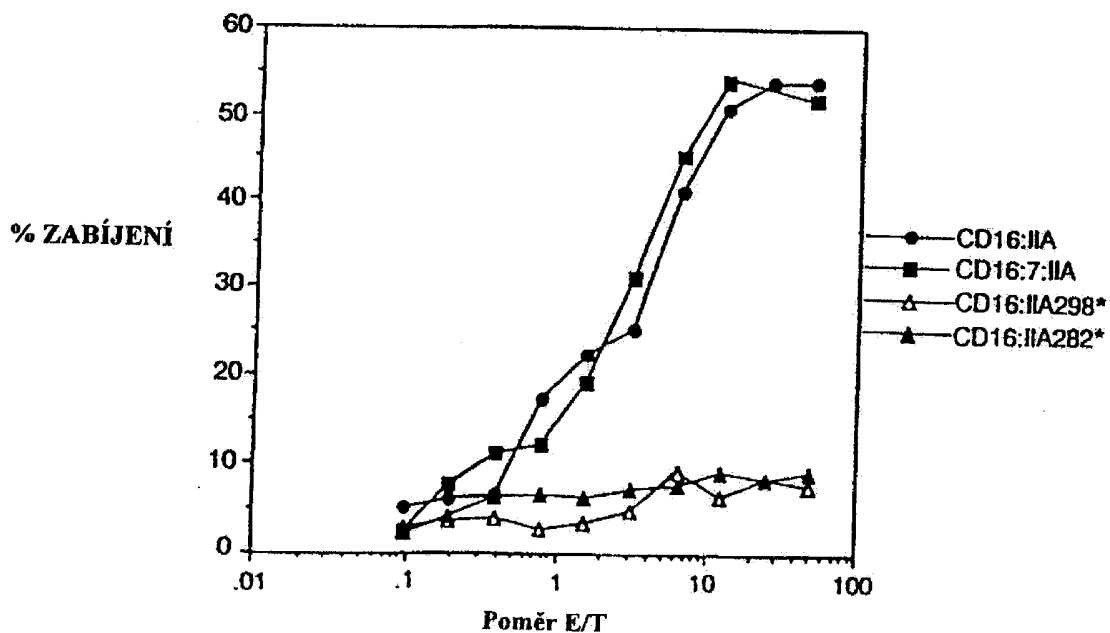


Obr. 15b

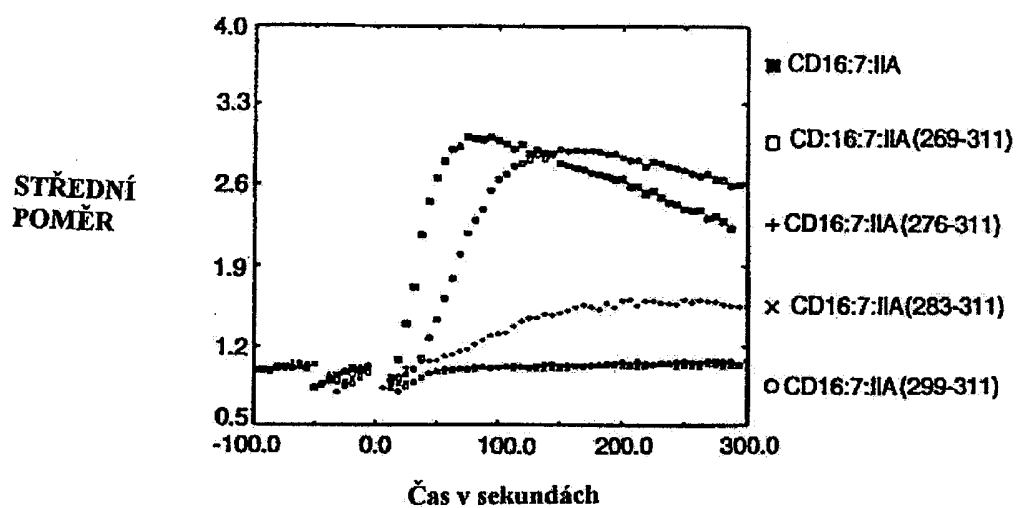


Obr. 15c

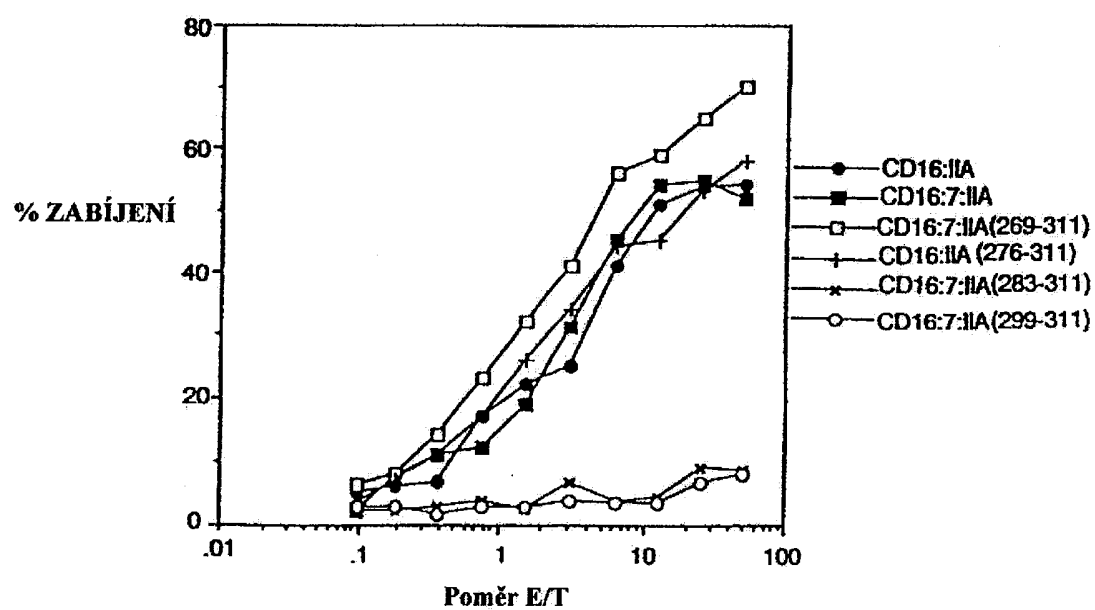
Čas v sekundách



Obr. 15d



Obr. 15e



**Obr. 16** (Sekvence ID NO: 24)

1 MEHSTFLSGL VLATLLSQVS PFKIPIEELE DRVFNVCNTS ITWVEGTVGT  
 51 LLSBITRLDL GKRILDPRGI YRCNGTDIYK DKESTVQVHY RMCQSCVELD  
 101 PATVAGIIVT DVIATLLLLAL GVFCFAGHET GRLSGAADTQ ALLRNDQVYQ  
 151 PLRDRDDAQY SHLGGNWARN K\*

**Obr. 17** (Sekvence ID NO: 25)

1 MEQKGGLAVL ILAIILLQGT LAQSIKGNHL VKVYDYQEDG SVLLTCDAEA  
 51 KNITWFKDGK MIGFLTEDKK KWNLGNAKD PRGMYQCKGS QNKSKPLQVY  
 101 YRMCQNCIEL NAATISGFLF AEIVSIFVLA VGVYFIAGQD GVRQSRASDK  
 151 QTLPLNDQLY QPLKDREDDQ YSHLQGNQLR RN\*

**Obr. 18** (Sekvence ID NO: 26)

1 MPGGLEALRA LPLLLFLSYA CLGPGCQALR VEGGPPSLTV NLGEEARLTC  
 51 ENNGRNPNTT WWFSLQSNIT WPPVPLGPGQ GTTGQLFFPE VNKNCTACTG  
 101 CQVIENNILK RSCGTYLRVR NPVPRPFLOM GEGTKNRIIT AEGIILLFCA  
 151 VVPGTLLLFR KRWQNEKFGV DMPDDYEDEN LYEGLNLDDC SMYEDISRGL  
 201 QGTYYQDVGNL HIGDAQLEKP \*

**Obr. 19** (Sekvence ID NO: 27)

1 MATLVLSMP CHWLLFLLLL FSGEPVPAMT SSDLPLNFQG SPCSQIWQHP  
 51 RFAAKKRSSM VKFHCYTNHS GALTWFRKRG SQQPQELVSE EGRIVQTONG  
 101 SVYTLTIQNI QYEDNGIYFC KQKCDSANHN VTDSCGTELL VLGFTSLDQL  
 151 KRRNTLKDGI ILIQTLIIIL FIIVPIFLLL DRDDGKAGME EDHTYEGLNI  
 201 DQTATYEDIV TLRTGEVKWS VGEHPGQE\*

---

 Konec dokumentu
 

---