

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

291 036

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 1998 - 586

(22) Přihlášeno: 05.09.1996

(30) Právo přednosti:
06.09.1995 US 1995/523894

(40) Zveřejněno: 12.08.1998

(Věstník č. 8/1998)

(47) Uděleno: 03.10.2002

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 11.12.2002
(Věstník č. 12/2002)

(86) PCT číslo: PCT/US96/14324

(87) PCT číslo zveřejnění: WO 97/009351

(13) Druh dokumentu: B6

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 K 16/28

C 12 N 15/00

C 12 N 15/13

A 61 K 39/395

(73) Majitel patentu:

IDEC PHARMACEUTICALS CORPORATION, San
Diego, CA, US;

(72) Původce vynálezu:

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

(74) Zástupce:

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

(54) Název vynálezu:

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

(57) Anotace:

Jsou popsány chimérické protilátky specifické k lidskému antigenu CD4, které obsahují sekvence variabilních oblastí opic Starého světa a sekvence lidské konstantní domény gama 4 nebo jejich mutovaných forem. Tyto nové protilátky, na rozdíl od dosud známých anti-CD4 protilátek, v podstatě nemají depleční aktivitu pro T buňky a mají další žádoucí terapeutické vlastnosti, jako je nízká antigenicita, dobrá afinita k lidskému CD4 a zvýšená stabilita (biologický poločas in vivo). Protilátky podle vynálezu jsou vhodné pro použití jako léčivo při léčení nemocí souvisejících s CD4, jako jsou např. autoimunitní poruchy (revmatoidní artritida, psoriáza, sclerosis multiplex atd.) a jiné nemoci, jako je např. leukemie, astma, infekce HIV a další.

CZ 291036 B6

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

Oblast techniky

5

Vynález se týká rekombinantních protilátek specifických k CD4, které jsou použitelné pro humánní terapii a také způsobů produkce takových protilátek. Chimérické protilátky podle vynálezu obsahují variabilní sekvence opic Starého světa a lidské sekvence lidské konstantní domény gama 4 nebo jejich mutovaných forem. Tyto protilátky mají na rozdíl od dosud známých anti-CD4 protilátek žádoucí terapeutické vlastnosti včetně nízké antigenicity, snížené (nebo chybějící) depleční aktivity pro T buňky, dobrou afinitu k lidskému CD4 a zvýšenou stabilitu (biologický poločas *in vivo*).

10

Dosavadní stav techniky

15

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

20

25

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

30

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

35

40

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

45

Při daném zapojení T buněk do rozvoje a udržování autoimunitních nemocí se důležitou léčebnou strategií stala imunosuprese. Dostupné imunosupresivní léky, jako cyklosporin A, jsou úspěšně používány pro léčbu rejekce transplantátů. Avšak jejich toxické vedlejší účinky je činí nepříjemnými pro chronickou léčbu autoimunitních nemocí.

50

Deplece (vyčerpání) veškeré T buněčné populace, včetně podskupiny CD4⁺, se v klinických podmínkách uskutečnila metodami zahrnujícími drenáž ductus thoracicus, celkovým ozářením lymfoidní tkáně a lymfoforézou, což má u některých pacientů za následek klinické zlepšení. Současná strategie je však zaměřena na selektivnější přípravky, které blokují nežádoucí imunitní odpovědi, aniž by způsobily toxicitu pro solidní orgány nebo jiné větší vedlejší účinky. Jeden způsob, jak toto může být potenciálně dosaženo, je selektivní odstranění nebo inaktivace T buněk

55

zprostředkovávajících nemoc použitím monoklonálních protilátek (mAbs). Jednu takovou strategii představují mAbs k CD4. Ve zvířecích modelech autoimunity a transplantace, když jsou profylakticky nebo terapeuticky podávány mAbs anti-CD4, tyto protilátky ruší nebo zvrátí progresi nemoci. Kromě toho, počáteční výsledky některých klinických zkoušek s mAbs anti-CD4 u RA, psoriázy, zánětlivé střevní nemoci a systémové vaskulitidy poskytly určitý
5 předběžný důkaz potenciální terapeutické účinnosti.

Cílem léčby mAbs anti-CD4 je v podstatě zrušit autodestruktivní aktivitu buněk CD4⁺, zejména během akutních fází autoimunitní poruchy. Konečný léčebný cíl je navodit stav imunologické neodpovídacnosti (anergii) nebo dlouhodobou toleranci na škodlivé antigeny (nebo specifické tkáně), které udržují vlastní nemoc, aniž by se ohrozila normální obrana hostitele proti oportunním infekcím. Nehledě na RA, mAbs CD4 mohou být také prospěšné pro léčbu dalších autoimunitních nemocí, např. diabetu mellitu závislého na inzulinu, systémového lupus erytematosus, psoriázy, zánětlivé střevní nemoci a sclerosis multiplex.
10

Vzhledem k potenciální důležitosti mAbs anti-CD4 jako imunoterapeutika publikovali již četné společnosti a výzkumné skupiny mAbs anti-CD4 jako potenciální léčebné přípravky. Například Centocor publikoval mAbs anti-CD4 nazývané Centara, což je chimérická myší monoklonální protilátka (mAb) k CD4. Dále Johnson & Johnson/Ortho publikovali OKT-4a, mAb anti-CD4, která je humanizovaná myší mAb. Dále publikovali Burroughs Wellcome mAb anti-CD4, která je humanizovaná potkaní mAb k CD4. Jak Sandoz, tak i MedImmune (ve spolupráci s firmou Merck) vyvinuli anti-CD4 myší humanizované mAbs specifické k CD4. Dále vyvinuli mAbs anti-CD4 také Becton Dickinson, Immunotech a Boehringer Mannheim.
15 20

Nehledě na mAbs anti-CD4, byly objeveny různé imunomodulátory a léky potenciálně použitelné pro léčbu RA. Takové imunomodulátory a léky zahrnují např. blokátory buněčné adheze, blokátory cytokinových receptorů, imunotoxiny a antagonisty T buněčných receptorů. Specifické příklady zahrnují interferon gama, anti-ICAM-1 (myší mAb anti-CD54, která blokuje leukocytární transport, adhezi), Compath-1H (potkaní humanizovaná mAb anti-CDw52) receptor IL-1, cA2 (TNF-alfa chimérická mAb), CDP 571 (mAb anti-TNF), anti-IL-2R (humanizovaná myší mAb anti-CD25), SDZ CHH 380 (myší lidská mAb anti-CD7), DAB486 IL-2 (IL-2 fúzní toxin, nespecifický pro buňky CD4 a CD8), Anril (IL-1RA), anti-TCR (mAbs a proteiny, jejichž cílem jsou podskupiny T buněčného receptoru) a Xoma-Zyme-CD5 (myší konjugát anti-CD5 toxinu).
25 30 35

Další imunomodulátory a imunosupresiva mající potenciální použití pro léčbu autoimunitních nemocí zahrnují Rapamycin (perorální imunosupresivum), Therafectin, Leflunomid (imunosupresivní předléky), Tenidap (cytokinový modulátor/CO- inhibitor), IMM-125 a RS-61443 (perorální imunosupresivum).
40

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

Myší monoklonální protilátky mají potenciální využití pro diagnózu lidských onemocnění stejně jako v klinických zkouškách jako léčivo pro léčbu jak akutních, tak chronických lidských onemocnění, včetně leukemií, lymfomů, solidních nádorů (např. střeva, prsu, jaterní nádory), AIDS a autoimunitních nemocí. Avšak myší protilátky jsou nevýhodné, protože mají často za následek imunitní protilátkovou odpověď hostitele proti myším monoklonálním protilátkám.
45 50

Byly také publikovány chimérické myší/lidské protilátky. Tyto protilátky obsahují vazebné vlastnosti základní myší protilátky a efektorové funkce sdružené s lidskou konstantní oblastí. Viz např. Cabilly et al., patent Spojených Států č. 4 816 567, Shoemaker et al., patent Spojených Států č. 4 978 775, Beavers et al., patent Spojených Států č. 4 975 369 a Boss et al., patent Spojených Států č. 4 816 397, všechny jsou zahrnuty v odkazech. Všeobecně jsou tyto
55

chimérické protilátky získávány pomocí genomové genové knihovny z DNA extrahované z již existujících myších hybridomů (Nishman et al., Cancer Research, 47, 999, 1987). Knihovna se poté testuje na přítomnost genů pro variabilní oblasti jak těžkého tak i lehkého řetězce, které vykazují správné typy přeskupení protilátkových fragmentů. Klonované geny variabilní oblasti se
 5 poté ligují do expresního vektoru, který obsahuje klonované kazety příslušného genu pro lidskou konstantní oblast těžkého nebo lehkého řetězce. Chimérické geny se poté exprimují v buněčné linii dle výběru, obvykle myší myelomové linii.

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

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

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

Jako vylepšení známých chimérických protilátek, které jsou často u lidí antigenní, popisuje se ve
 30 stavu techniky příprava monoklonálních protilátek u opic Starého světa a chimérických protilátek z nich odvozených tvořených rekombinantními metodami, které obsahují variabilní doménu protilátky opice Starého světa (např. pavíán nebo makak), fúzovanou s klonovanou konstantní
 oblastí lidskou, šimpanzí nebo z jiné opice nebo kostrovou oblastí protilátky jiné opice. Konkrétně se popisují přípravy opičích (z opic Starého světa) a chimérických protilátek z nich
 35 odvozených proti lidským antigenům, a také použití těchto chimérických rekombinantních protilátek jako imunoterapeutických přípravků pro léčbu lidských nemocí.

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

Z uvedeného vyplývá, že na rozdíl od některých předchozích protilátek používaných pro lidskou
 terapii, včetně známých chimérických protilátek, nové chimérické protilátky netrpí mnoha
 50 nedostatky, např. a) imunogenicita a indukce lidské proti-protilátkové (HAA) odpovědi při opakovaném podávání nezbytném při léčbě chronických stavů, 2) relativně krátký poločas rozpadu ve srovnání s lidskými protilátkami a 3) nedostatek efektorových funkcí s lidskými buňkami nebo komplementem.

Nepřítomnost těchto nedostatků je významná výhoda pro lidskou terapii. Například v případě
 55 chronické lidské nemoci, včetně autoimunitních nemocí, nebo jakékoliv nemoci, kde je nezbytné

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

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

Některé z těchto podobných aplikací uvádějí jako příklad konkrétně opičí/lidskou chimérickou protilátku se specifitou pro CD4, nazývanou CE9.1, která obsahuje variabilní doménu těžkého a lehkého řetězce monoklonální protilátky anti-CD4 tvořené v opici *Macaca fascicularis* a konstantní oblast lehkého řetězce lambda lidského imunoglobulinu a konstantní oblast těžkého řetězce gama 1 lidského imunoglobulinu. Tato protilátka má určitou depleční aktivitu pro T buňky, ale tato aktivita je nižší ve srovnání s předešlými monoklonálními protilátkami CD4. Avšak je žádoucí produkovat protilátky, které mají menší depleční aktivitu nebo které tuto aktivitu pro T buňky postrádají, protože to může zvyšovat jejich terapeutický potenciál.

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

1) čtyři transkripční kazety v tandemovém uspořádání:

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

b) konstantní oblast těžkého řetězce lidského imunoglobulinu, v obou konstruktech je to konstantní oblast těžkého řetězce gama lidského imunoglobulinu (aminokyseliny 114–478, číslované dle Kabata, alotyp Gm 1a, Gm 12,

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

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

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

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

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

např. delší poločas rozpadu a/nebo které podstatně postrádají nebo jsou zbavené depleční aktivity.

5 Předmět vynálezu

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

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

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

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

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

Popis obrázků

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

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

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

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

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

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

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

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

Obrázky 10a, 10b a 10c ukazují vazebné charakteristiky receptoru Fc CE9.1, kde měření ukazují aglutinaci CD4⁺ průtokovým cytometrickým histogramem vazebných fibroblastů s a) γ IFN indukovanými čerstvými monocyty, kde negativní kontrola využívá fragmenty f(ab')₂ z CE9.1, b) čerstvými monocyty s nebo bez indukce γ IFN, a c) v přítomnosti s CD4 nebo za chybění protilátky.

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

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

Obrázek 13 ukazuje průtokový cytometrický histogram vazby C1q k buňkám SupT1 v přítomnosti a nepřítomnosti CE9.1, kde bylo zaznamenáno 10 000 jevů a výsledky jsou vyjádřeny jako histogram, PRO945 jsou polyklonální protilátky z opice s vysokým titrem anti–CD4 v séru, a negativní kontrola byla C1q a anti–C1q v nepřítomnosti CE9.1.

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

Obrázek 15 ukazuje farmakologickou studii vysoké dávky u šesti šimpanzů, kde hladiny CD4 a CD8 v periferní krvi exprimované po období 150–300 dnů a křivky CD3–CD8 vyznačující počet CD4 modulovaných buněk jsou také ukázány. Horní panel: skupina 1 – počty monitorovaných šimpanzů. Šipky vyznačují dávky CE9.1. 2) kontrolní skupina s fyziologickým roztokem, střední panel: skupina 2 – šimpanzi (2) dostávající 10 mg/kg CE9.1. Dávkování se opakovalo, když se počty CD4 vrátily do rozmezí 30 % od základní linie. Spodní panel: skupina 3 – šimpanzi (2) dostávající 10 mg/kg CE9.1. Dávkování se opakovalo, když se počty CD4 vrátily do rozmezí 70 % od základní linie.

Obrázek 16 zobrazuje vhodné primery pro metodu PCR pro získání konstantní oblasti lidského γ 4.

Obrázek 17 zobrazuje sekvenci těžkého řetězce CE9 γ 4PE.

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

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

Obrázek 20 ukazuje účinek konstruktů CD4 mAb na primární MLR.

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

Obrázek 22 zobrazuje FcR a CD4⁺ zprostředkovanou adhezi CD9.1, CE9 γ 4, CE9 γ 4E a CE9 γ 4 γ K.

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

Obrázek 24 ukazuje plazmatické koncentrace následující bolus 1 mg/kg CE9 γ 4E a CE9 γ 4Pe u laboratorního potkana kmene Sprague–Dawley.

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

Detailní popis vynálezu

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

Způsoby získávání monoklonálních protilátek z opic Starého světa specifických k CD4 a klonů, které produkují monoklonální protilátky z opic Starého světa specifické k CD4, mohou být nalezeny ve známém stavu techniky.

Všeobecně to zahrnuje imunizaci opice Starého světa proti lidskému antigenu CD4 za podmínek, které jsou takové, že opice Starého světa produkuje protilátky anti–CD4, opičí buňky, které jsou zodpovědné za produkci protilátek anti–CD4, se imortalizují, např. hybridomovou fúzí, virovou transformací s *Herpes papio*, jednoduchým B buněčným klonováním (také nazývaným „přechodná imortalizace“), a vytvoření knihovny rekombinantních imunoglobulinů. Ve výhodných provedeních tento způsob zahrnuje výběr opičí B buňky z leukocytů periferní krve, sleziny, kostní dřeně nebo lymfatické uzliny, výběr jádra, které tvoří příslušnou protilátku, získání imunoglobulinových genů kódujících tuto protilátku z imortalizované buněčné linie, a expresi genů v produkční buněčné linii (tj. buněčné linii, která umožňuje dostatečnou produkci protilátky použitelné pro lidskou terapii). Jak je známo, opice Starého světa zahrnují paviány a opice rodu makak (včetně *Macaca rhesus* a *Macaca fascicularis*).

Jak je pojednáno výše, ve výhodném provedení předmětné chimérické protilátky zahrnují variabilní těžké a variabilní lehké sekvence anti-CD4 z opic Starého světa ukázané na obrázku 1 a obrázku 2, fúzované k lidským sekvencím konstantní domény. Prostředky vhodné pro získání těchto specifických sekvencí variabilní těžké a variabilní lehké domény jsou známy z dosavadního stavu techniky. Také odpovídající úplné sekvence nukleové kyseliny a příslušné aminokyselinové sekvence jsou známy.

Tyto sekvence variabilních domén mohou být fúzovány s jakýmkoliv požadovanými sekvencemi lidské konstantní domény. Konkrétní výběr ovlivní efektorovou funkci výsledné chimérické protilátky anti-CD4. Výhodně konstantní domény lidského těžkého řetězce zahrnují konstantní doménu gama 1, gama 4 nebo mutovanou gama 4, zde nazývanou jako gama 4E, nebo mutovanou gama 4, zde nazývanou jako gama 4PEPTID. Výběr gama 4 je výhodný, protože bylo shledáno, že má za následek chimérické protilátky postrádající nebo podstatně postrádající T buněčnou depleční aktivitu (80–100 % relativně ke gama 1). Věří se, že tomu tak je, protože konstantní doména gama 4 není schopná vazby s komplementem. Konstantní doména může být také mutována tak, aby se zesílily vlastnosti výsledné chimérické protilátky, např. stabilita, a/nebo aby se eliminovala depleční aktivita. Konkrétně modifikace P a E domény gama 4, které jsou popsány níže, jsou modifikace gama 4 v ohybové oblasti, které propůjčují aktivitě zvýšenou stabilitu a odstraňují depleční aktivitu. Kromě toho se očekává, že další modifikace by také měly poskytnout chimérické protilátky mající zesílené vlastnosti.

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

Provedení vynálezu doložená příklady zahrnují specifickou chimérickou monoklonální protilátku anti-CD4, nazývanou CE9.1, která obsahuje domény vázající antigen získané z opic *Macaca fascicularis* imunizovaných lidským sCD4 (ukázáno na obrázcích 1 a 2), v kombinaci s konstantními doménami lidského IgG1 a monoklonálními chimérickými protilátkami z nich pocházejícími, např. CE9γ4, CE9γ4λK a CE9γ4E, CE9γ4PE, které mají tytéž domény vázající antigen z CE9.1, ale byly získány metodami genového inženýrství z kostry vazebné domény Fc lidského IgG4. Monoklonální protilátka CE9γ4E obsahuje mutaci, a sice změnu leucinu na kyselinu glutamovou (L236E) blízko ohybové oblasti protilátky (modifikace E). Monoklonální protilátka CE9γ4PE obsahuje tutéž mutaci leucinu na kyselinu glutamovou a mutaci serinu na prolin (S229P) (modifikace „E“ a „P“). Protilátka CE9γ4λK se liší od CE9γ4 nahrazením konstantní oblasti jejího lehkého řetězce z lidského subtypu K na subtyp λ.

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

Požadovaným výsledkem této strategie bylo to, aby výměna izotypů části Fc protilátky nesnížila vazebnou aktivitu oblastí Fab vázajících antigen CD4. Avšak toto nebylo na začátku známo. Bylo možné, že změna konstantní oblasti nebo její modifikace by mohly nepříznivě ovlivnit vazbu CD4. Proto byly výsledné protilátky testovány, aby se určily účinky modifikace na vlastnosti protilátek, zejména vazbu antigenu CD4. Aby se zjistily možné účinky výměny konstantní domény na vazbu antigenu, byly použity známé testovací způsoby. Konkrétně studie interakce mezi CD4 a CE9.1, CE9γ4, CE9γ4λK, CE9γ4E a CE9γ4PE byla provedena

Scatchardovou analýzou a povrchovou plazmonovou rezonancí (SPR). Výsledky těchto analýz dokázaly, že vazby CD4 ke každé z testovaných protilátek byly rovnocenné. Při SPR bylo shledáno, že ekvilibrační disociační konstanty v 25 °C pro vazbu CD4 k protilátkám byly všechny přibližně 1.0 nmol. Měření dále dokázala, že:

5

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

10

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

15

Také, jak popsáno níže, bylo zjištěno, že substituce konstantní domény gama 1 doménou gama 4 podstatně snižuje vazbu receptoru Fc, fixaci komplementu a T buněčnou depleční aktivitu a dále, že modifikace E a P odstraňují vazbu receptoru Fc a T buněčnou depleční aktivitu a zajišťují zvýšenou stabilitu protilátky. Proto je rozumné předpokládat, že další chimérické protilátky tvořené podle vynálezu (konstruované tak, aby obsahovaly lidskou konstantní doménu gama 4

20

nebo její mutované formy) jsou vybrány ty, které mají pozměněnou efektorovou funkci Fc, a které podstatně postrádají nebo jsou úplně zbaveny T buněčné depleční aktivity a/nebo které projevují zvýšenou stabilitu. Způsoby testování T buněčné depleční aktivity, efektorové funkce Fc a stability protilátky jsou v oboru známy.

25

Předkládaný vynález tedy poskytuje specifické rekombinantní protilátky, které jsou chimérické monoklonální protilátky z primátů/člověka a jsou namířeny proti lidskému antigenu CD4, a které projevují zlepšené vlastnosti, např. nízkou T buněčnou depleční aktivitu a větší stabilitu. Při těchto vlastnostech jsou tyto rekombinantní protilátky konkrétně použitelné jako imuno-

30

modulátory a jsou užitečné zejména pro léčbu autoimunitních nemocí, jako je revmatoidní artritida, psoriáza, systémový lupus erythematosus (SLE), a také v imunitních indikacích jiného než autoimunitního původu, jako je nemoc štěp–proti–hostiteli (GVHD) – transplantační rejekce, astma a HIV. Předmětné protilátky jsou také prospěšné jako doplněk genové terapie. Konkrétně mohou být předmětné protilátky podávány před, současně nebo po podávání vektoru (obsahujícího terapeutickou DNA), aby odvrátily nebo redukovaly hostitelskou humorální

35

odpověď na uvedený vektor. Tyto nemoci jsou příklady CD4 příbuzných stavů.

40

Jak je detailněji popsáno v příkladech, rekombinantní protilátka CE9.1 vzniká připojením variabilních domén Fv vázajících antigen z *Macaca fascicularis* k lidským konstantním oblastem, např. konstantním doménám IgG1. Konkrétněji protilátka CE9.1 obsahuje lidskou doménu gama 1 a konstantní doménu lambda. CE9γ4, CE9γ4λK, CE9γ4E a CE9γ4PE obsahují konstantní doménu gama 4 nebo její mutovanou formu a konstantní oblast lambda nebo kappa. Sekvence výsledné rekombinantní protilátky jsou nerozlišitelné od sekvencí lidského imunoglobulinu. Jako

45

výsledek by měly tyto protilátky, a také další protilátky CD4 tvořené podobnými způsoby, projevit při podání *in vivo* u lidí sníženou nebo žádnou imunogenicitu a pomalejší vymizení ze séra (sérovou clearance) ve srovnání s podobnými myšími monoklonálními nebo myšími–lidskými chimérickými protilátkami namířenými proti CD4.

50

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

55

U protilátky CE9.1 byla pozorována silná imunomodulační aktivita jak *in vitro*, tak *in vivo*. Při těchto vlastnostech, tj. snížené imunogenicitě, pomalejší sérové clearanci a silné imunomodulaci, při srovnání s jinými známými protilidskými mAbs CD4, které pocházejí z myši nebo

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

Jak pojednáno výše, revmatoidní artritida (RA) je zánětlivá nemoc synovia, která zahrnuje manifestaci autoimunitního jevu, který má za následek erozi, deformitu a destrukci kloubů. Jak platí pro většinu autoimunitních nemocí, etiologie RA není dobře definována, ale je charakterizována zvýšenými hladinami aktivovaných T lymfocytů CD4⁺ v postižených kloubech. V současnosti neexistuje vyléčení RA a terapie pro léčbu této oslabující nemoci je navržena pouze tak, aby krátkodobě poskytla úlevu od příznaků a zlepšení ve funkčních schopnostech. Kromě toho, imunosupresiva a steroidy druhé a třetí linie, jako je azathioprin, metotrexát a prednisolon, které cílí na základní nemoc, jsou podávány pouze ve vážnějších případech a jsou obvykle mírně účinné nebo projevují nepříjemnou toxicitu pro používání v chronické léčbě. Na rozdíl od toho se očekává, že předmětná protilátka je vhodná pro dlouhotrvající a chronické podávání díky faktu, že projevuje sníženou imunogenicitu, delší poločas rozpadu a silnou imunomodulační aktivitu ve srovnání s jinými známými protilidskými mAbs CD4, které pocházejí od myší nebo hlodavců.

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

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

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

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

Také v experimentálních modelech *in vivo*, byla specifická tolerance aloštěpů navozena nedeplečními protilátkami anti-CD4 podávanými v čase transplantace. Udržení stavu tolerance nevyžaduje depleční protilátku anti-CD4, ale zdá se být závislé na nepřerušovaném výskytu antigenu. Na základě těchto zjištění se očekává, že předmětné rekombinantní protilátky nebo jiné rekombinantní protilátky anti-CD4 tvořené podle vynálezu jsou vhodné pro léčbu autoimunitních nemocí. Krátká léčebná schémata s protilátkami anti-CD4 interferují s odpověďmi pomahačských T buněk proti autoantigenům, což vede k dlouhotrvajícím klinickým zlepšením v nepřítomnosti generalizované imunosuprese.

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

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

Protilátka CE9.1 projevuje reverzibilní T buněčnou depleční aktivitu u šimpanzů. Kromě toho je pravděpodobné, že bude lepší oproti současným myším a myším/chimérickým monoklonálním protilátkám anti-CD4 pro svůj očekávaný delší poločas rozpadu v lidském séru a snížených potenciálních nepříznivých imonogenních účinků. Vzhledem k přítomnosti sekvencí lidské konstantní domény se také očekává, že předmětná protilátka bude při podávání lidem udržovat normální efektorové funkce lidských protilátek. Vskutku byly efektorové funkce protilátky CE9.1, a také dalších zmíněných protilátek, vyhodnoceny v několika odlišných testech. Bylo shledáno, že protilátka CE9.1 projevuje inhibiční aktivitu ve smíšené lymfocytární reakci (MLR), projevuje slabou vazbu C1q, ale neprojevuje buněčnou cytotoxicitu zprostředkovanou komplementem. Bylo také zjištěno, že projevuje buněčnou cytotoxickou aktivitu komplementu závislou na protilátce (ADDC) a váže se k FcR. Protilátka CE9.1 byla také vyhodnocena *in vivo* na šimpanzech, kde bylo zjištěno, že podávání má za následek částečnou depleci buněk CD4 a modulaci receptoru CD4.

Protilátka CE9.1 byla podávána šimpanzům v různých dávkách. Přesněji byly u šimpanze studovány dávky 0,1; 0,3; 1; 5; a 10 mg/kg, které byly podávány v intervalech 7 až 14 dnů. Nebyl pozorován žádný důkaz toxicity. Dávky 1 mg/kg nebo větší způsobily 80–95% redukcí v cirkulaci buněk CD4⁺ 24 hodin po podání dávky. Významné snížení buněk CD4⁺ nebylo

pozorováno sedm dní po dávce 1 mg/kg. Po dávce 5 mg/kg počty cirkulujících buněk CD4⁺ nabyly znovu přibližně 40 % výchozího stavu po sedmi dnech a přibližně 60 % výchozího stavu po čtrnácti dnech. Po dávce 10 mg/kg se počty cirkulujících buněk CD4⁺ po sedmi dnech neobnovily a nabyly znovu pouze 40 % výchozího stavu čtyřicet dva dny po podání dávky.

5 V dalších klinickopatologických parametrech nebyly pozorovány žádné změny.

Protilátka CE9.1 byla také testována na lidech. Například aktivita protilátky CE9.1 byla vyhodnocena u pacientů s revmatoidní artritidou v jednofázových zkouškách stoupající jednotlivé dávky. Výsledky byly velmi slibné. Přesněji, u poloviny pacientů, kterým byla protilátka

10 podávána, se projevilo alespoň 30% zlepšení stavu malých kloubů, a profil nepříznivých příhod byl extrémně benigní. Kromě toho, jak diskutováno výše, zatímco se původně předpokládalo, že CE9.1 je depleční, ve skutečnosti tato protilátka projevila pouze částečnou a přechodnou depleci po jednom podání. Částečně nedepleční povaha této protilátky může být prospěšná, protože v několika studiích provedených na zvířatech bylo publikováno, že deplece T buněk CD4⁺ není

15 zjevně nezbytná pro účinnost monoklonálních protilátek CD4. (Viz Carteron et al., *Induction of Immune Tolerance During Administration of Monoclonal Antibody to L3 T4 Does Not Depend on L3 T4⁺ Cells*, Underlying Journal of Immunology, 140, 713–716, 1988, Carteron et al., *F(ab')₂ Anti-CD4 and Intact Anti-CD4⁺ T Cells, CD8⁺ T Cells a BT T Cells a B Cells in the kidneys of Lupus-Prone NZB/NZW Mice*, *Clinical Immunology Immunopathology*, 20, 56, 373–383, 1990). Tato protilátka může tedy působit jako klasický receptorový antagonist tím, že: i) blokuje interakci CD4 svým opačným receptorem MHC II, nebo ii) způsobuje modulaci CD4 z buněčného povrchu. Za těchto podmínek jsou T buněčné odpovědi CD4⁺, které vyžadují zapojení receptoru CD4, oslabeny nebo blokovány. Fakt, že předmětná protilátka CE9.1 zjevně

25 projevuje málo depleční aktivity u lidí, je výhodný, protože zlepšuje bezpečnost, odstraňuje potřebu častého sledování počtu buněk CD4⁺ a také zlepšuje účinnost.

Protilátka CE9.1 byla navržena tak, aby snižovala počty buněk CD4 *in vivo* prostřednictvím receptoru Fc a mechanismů vázajících komplement. Studie na šimpanzech naznačují, že CE9.1 způsobuje částečnou depleci buněk CD4 a počáteční výsledky naznačují, že buněčná deplece

30 u lidí je velmi snížena při srovnání s jinými mAbs CD4. Avšak je také žádoucí produkovat protilátky, které jsou zbaveny depleční aktivity.

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

- 35 i) pro účinnost mAbs CD4 není vyžadována deplece buněk CD4,
- ii) chybění buněčné deplece CD4 zvyšuje bezpečnost protilátky,
- iii) větší bezpečnost umožňuje, že mAbs jsou použity dříve v průběhu nemoci,
- 40 iv) chybění buněčné deplece CD4 zlepší účinnost, a
- v) chybění buněčné deplece CD4 odstraňuje nebo snižuje potřebu častého monitorování počtu buněk CD4, a tak zvyšuje výhodnost a cenu celkového léčení.
- 45

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

- 50 i) blokují interakci CD4 se svým opačným receptorem MHCII,
- ii) způsobují modulaci CD4 z buněčného povrchu, nebo
- iii) způsobují T buněčnou anergii a/nebo apoptózu.
- 55

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

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

Co se toho týče, byly syntetizovány různé chimérické protilátky, které obsahují lidskou konstantní doménu gama 4. Tato doména byla vybrána, protože podle všeho neváže lidský komplement nebo receptory $FC\gamma 1$. Proto vznikla hypotéza, že chimérické protilátky obsahující tuto konstantní doménu postrádají nebo podstatně postrádají T buněčnou depleční aktivitu. Bylo také vytvořeno několik chimérických protilátek, které obsahovaly známé modifikace konstantní domény gama 4. Konkrétně několik obsahuje modifikaci „E“, která je popsána Duncanem et al., Nature, 332, 563–564, 1988, a Winterem et al., WO 88/07089, 1988, kteréžto modifikace byly vyjeveny jako modifikace redukující vazbu komplementu a receptoru $FC\gamma 1$. Tato modifikace obsahuje změnu leucinu na kyselinu glutamovou v pozici 236 (248 Kabatova číslování), aby se zrušila jakákoliv reziduální vazba receptoru Fc. Také několik chimérických protilátek obsahuje modifikaci „P“, která je popsána Angalem et al., Mol. Immunol., 30, 105–8, 1993. Tato modifikace, která obsahuje změnu serinu v pozici 229 (241 Kabatova číslování) na prolin, zvyšuje stabilitu (biologický poločas v séru) stabilizaci disulfidových vazeb mezi těžkými řetězci a bylo publikováno, že zvyšuje zlepšenou tkáňovou distribuci v porovnání s chimérickým $IgG4$, který postrádá tuto modifikaci.

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

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

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

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

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

Tabulka 1

Srovnání efektorových funkcí CE9.1 a CE9 γ 4PE

Aktivita	CE9.1	CE9 γ 4PE
<i>In vitro</i>		
MLR	ano	ano
Vazba C1q	slabá	ne
CDC	ne	ne
ADCC	ano	ne
Vazba FcR	ano	ne
<i>In vivo (šimpanz)</i>		
Deplece buněk CD4	částečná	ne
Modulace receptoru CD4	ano	ano
<i>In vivo (transgenní myši HuCD4⁺)</i>		
Deplece buněk CD4	částečná	ne
Modulace receptoru CD4	ano	ano
ADCC = buněčná cytotoxicita závislá na protilátce		
CDC = buněčná cytotoxicita zprostředkovaná komplementem		
FcR = receptor Fc		
MLR = smíšená lymfocytární reakce		

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

Při použití chimérických protilátek anti-CD4 doložených v příkladech nebo jiných chimérických protilátek tvořených podle vynálezu jako imunosupresiv nebo modulátorů CD4 pro léčbu autoimunitních nemocí, včetně například revmatoidní artritidy, jsou takové protilátky podávány samotné nebo v kombinaci s dalšími sloučeninami vhodnými pro léčbu konkrétního chorobného stavu. Například předmětná protilátka může být podávána v kombinaci s dalšími proteiny, jako jsou například monoklonální protilátkové rozpustné receptorové proteiny k TNF-alfa, monoklonální protilátky k receptoru IL-2, monoklonální protilátky a receptorové fúzní proteiny, které antagonizují interakci CD40/gp39 a CTLA 4-IgG v monoklonálních protilátkách, které antagonizují interakci B7/CD28. Také, v případě léčby revmatoidní artritidy, mohou být

předmětné protilátky podávány v kombinaci s dalšími léčivy, jako je například Rapamycin, Leflunomid, Tenidep, RS-61443 (mykofenolát mofetil), Surenyl (hyaluronát sodný), peptidová vakcína anti-TCR (V β 17), Anerva X (vakcína anti-MHC) a extrakorporální imunoabsorbenty proteinu A nebo jejich kombinace. Dodatečně může být předmětná protilátka podávána
 5 v kombinaci s dalšími protilátkami tvořenými podle vynálezu nebo v oboru známými, které jsou specifické pro lidský CD4. To má za následek synergické účinky, například jestliže se tyto protilátky váží k odlišným epitopům proteinu CD4.

Následující příklady jsou uvedeny pro další popis vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

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

Následující popis je specifický příklad způsobů a protilátek tohoto vynálezu.

Vytváření immortalizovaných linií opičích B buněk

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

Přibližně 1×10^8 lymfocytů bylo suspendováno v Tris-amonium chloridovém pufru (16 mM, pH 7,5) a zahřáto na 37 °C po dobu 45 minut. Buňky ošetřené LME byly filtrovány přes
 35 nylonový filtr a stočeny. Přidal se 1 ml fetálního telecího séra, buňky se suspendovaly a dvakrát promyty v RPMI bez séra. Buňky byly spočítány a promíchány v jedné 50 mililitrové kónické centrifugační zkumavce se stejným množstvím heteromyelomových buněk K6H6/B5, předem dvakrát promytých v médiu bez séra. Buňky byly jemně suspendovány v 1 ml 50% PEG (polyetylen glykol) přidávaném pomalu s jemným mícháním po dobu 1 minuty. Buňky byly poté
 40 resuspendovány přidáním 20 ml média bez séra po dobu 5 minut za mírného míchání, aby se rozředil PEG. Po dvojím promytí médiem bez séra byly buňky resuspendovány v koncentraci $5 \times 10^5/0,1$ ml v médiu RPMI, obsahujícím 20% fetální telecí sérum a gentamycin a umístěny na 96jamkové mikrodestičky pro tkáňové kultury v množství 0,1 ml na jamku. Do každé jamky byl přidán stejný objem média HAT (0,1 ml) a hybridům bylo umožněno růst po dobu 14–17 dnů
 45 před testováním.

Testování fúzovaných buněčných hybridů na tvorbu anti-CD4

Test na určování specifity anti-CD4 byl proveden, jak je popsáno dále: destičky pro ELISA byly povlečeny rekombinantní sCD4 v koncentraci 100 ng na jamku a blokovány 1% bovinním
 50 sérovým albuminem v PBS. Z každé jamky byly odstraněny poměrně části 50 μ l hybridomového supernatantu a nechaly se inkubovat po dobu 60 minut s destičkami povlečenými sCD4. Vazba byla detekována inkubací s kozím proti-lidským nebo kozím proti-opičím IgG značeným 125 I po dobu 60 minut. Po promytí čtyřikrát destilovanou vodou byly jamky vyhodnoceny počítačem
 55 impulzů gama. Pozitivní jamky byly v duplikátech testovány znovu a hybridomové buňky

z těchto jamek byly třikrát subklonovány, poprvé v 5 buňkách na jamku a poté dvakrát v 1 buňce na jamku. V tomto stadiu byly pozitivní anti-sCD4 testovány na schopnost vázat se k CD4 na buněčném povrchu. To bylo provedeno inhibicí vazby myši monoklonální anti-CD4, nazývané 1F3, k CD4 pozitivní buněčné linii supT1. V krátkosti to bylo provedeno společnou inkubací různých množství opičí anti-CD4 a 10 µg 1F3 značené ^{125}I s 3×10^5 buněk supT1 na 1 jamku v 96jamkové destičce. Po 1 hodině inkubace při teplotě místnosti (20–25 °C) byly buňky pomocí vakua přemístěny na filtry ze skleněných vláken. Po důkladném promytí PBS byly filtry vyhodnoceny počítačem impulzů gama, aby se určila inhibice vazby 1F3 na buňky supT1 supernatanty opičích hybridomů.

Byl vybrán klon, který tvořil protilátku, která vykazovala silnou inhibici proti 1F3. Klon byl izotypizován za použití lidských izotypizujících reagentů a bylo shledáno, že je IgG2 a má lehký řetězec lambda. Tato buněčná linie byla pěstována do velkého množství pro klonování jejich imunoglobulinových genů.

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

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

Klonování dvou genů variabilní oblasti do expresního vektoru TCAE 6 bylo prováděno postupně. Zprvce byly produkt PCR těžkého řetězce a vektor TCAE 6 štěpeny restričními enzymy Sal I a Nhe I, produkty byly poté extrahovány fenolem/chloroformem a přečištěny přes centrifugační kolonu SEPHADEX G-25. Produkt PCR byl ligován do naštěpeného vektoru přes noc ve 14 °C v přítomnosti DNA ligázy T4. Přibližně 500 ng celkové DNA se ligovalo v objemu 10 µl v molárním poměru inzert/vektor 10:1. Ligovaný materiál se použil k transformaci kompetentních buněk XL-1 Blue (Stratagene) a transformované buňky byly vysety na misky s agarem LB obsahujícím ampicilin v koncentraci 50 µg/ml. Kolonie bakterií rezistentních na ampicilin byly sebrány a pěstovány jako 5 mililitrové tkáňové minikultury. Z každé z těchto kultur byla extrahována plazmidová DNA standardní metodou alkalické lýzy, naštěpena restričními enzymy Sal I a Nhe I a produkty byly rozděleny na 1,2% agarózovém gelu. Plazmidy s inzerty o přibližné velikosti 450 bp byly použity jako templáty pro následné klonování variabilních oblastí lehkého řetězce. Produkty reakce PCR pro lehký řetězec, a také plazmid obsahující inzert těžkého řetězce byly naštěpeny restričními enzymy Bgl II a Avr II a ligovány k sobě. Plazmidové minikultury byly testovány štěpením s Bgl II a Avr II. Štěpené produkty, které udávaly inzert přibližné velikosti 400–450 bp byly považovány za pozitivní. Plazmidy obsahující oba inzerty Sal I/Nhe I a Bgl II/Avr II byly pěstovány ve větším množství pro sekvencování DNA.

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

- 5 RLDN10b se liší od vektoru TND v následujícím. Transkripční kazeta (promotor, cDNA a polyadenylační oblast) pro dihydrofolátreduktázu (DHFR) byla umístěna mezi kazetu tkáňového aktivátoru plazminogenu (t-PA expresní kazeta) a kazetu neomycinofosfotransferázy (NEO) tak, že všechny tři kazety jsou zařazené jedna za druhou a v téže transkripční orientaci. Navíc
10 promotor genu DHFR v CLDN byl nahrazen hlavním promotorem myšího beta globinu (Mol. Cell. Biol., 3, 1246–54, 1983) a cDNA t-PA nahrazena mnohočetným klonovacím místem (polylinker). Všechny tři eukaryotické transkripční kazety (expresní, DHFR, NEO) mohou být odděleny od bakteriální plazmidové DNA (derivát pUC9) štěpením s restriční endonukleázou Not I.
- 15 CLDN se liší od RLDN10b, protože LTR z Rousova viru před polylinkerem byl nahrazen promotorovým zesilovačem časného genu lidského cytomegaloviru (Cell, 41, 521, 1985).

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

- 20 1) obsahují čtyři transkripční kazety (místo tří) seřazené za sebou:
- a) konstantní oblast lehkého řetězce lidského imunoglobulinu získaného prostřednictvím amplifikace cDNA polymerázovou řetězovou reakcí. V TCAE 5.2 to je konstantní oblast lehkého řetězce kappa lidského imunoglobulinu (Kabatovo číslování aminokyselin 108–214, alotyp Km3), a v TCAE 6 konstantní oblast lehkého řetězce lambda lidského imunoglobulinu
25 (Kabatovo číslování aminokyselin 108–215, genotyp Oz minus, Mcg minus, alotyp Ke minus),
- b) konstantní oblast těžkého řetězce lidského imunoglobulinu, v obou konstruktech to byla konstantní oblast gama 1 těžkého řetězce lidského imunoglobulinu (Kabatovo číslování aminokyselin 114–748, alotyp Gm1a, Gm1z), která byla odvozena prostřednictvím amplifikace cDNA polymerázovou řetězovou reakcí,
- 30 c) DHFR, obsahující svůj vlastní eukaryotický promotor a polyadenylační oblast,
- d) NEO, také má svůj vlastní eukaryotický promotor a polyadenylační oblast.
- 2) Kazety lehkého a těžkého řetězce lidského imunoglobulinu obsahují syntetické signální sekvence pro sekreci imunoglobulinových řetězců.
- 35 3) Kazety lehkého a těžkého řetězce lidského imunoglobulinu obsahují specifické spojky DNA, které umožňují inzerci variabilních oblastí lehkého a těžkého řetězce imunoglobulinu, které udržují translační čtecí rámec a nepozměňují aminokyseliny normálně nalézané v imunoglobulinových řetězcích. Zavedení popsaných změn vedlo ke konstrukci vektorů TCAE 5.2
40 a TCAE 6. Klonování genů pro variabilní oblasti lehkého a těžkého řetězce imunoglobulinu z buněčné heterohybridomové linie anti-CD4 E9.1 do TCAE 6 vedlo ke konstrukt, který je uložen v ATCC. Konstrukt, který byl uložen, a který kóduje protilátku CE9.1, obsahuje variabilní oblast těžkého řetězce imunoglobulinu *Macaca fascicularis* a variabilní oblast lehkého řetězce imunoglobulinu *Macaca fascicularis*, jejichž sekvence jsou ukázány na obrázcích 1 a 2,
45 klonované z anti-CD4 buněčné hybridomové linie E9.1. Konstantní oblast těžkého řetězce je lidského původu izotypu gama 1 a alotypu Gm1a, Gm1z. Konstantní oblast lehkého řetězce lambda je také lidského původu, genotypu Oz minus, mcg minus a alotypu Ke minus. Imunoglobulinové geny jsou klonovány do savčího expresního vektoru TCAE 6, popsaného ve výše zmíněných aplikacích zahrnutých v odkazech, který, je-li zaveden elektroporací do savčí buněčné
50 linie CHO, tvoří chimérickou opičí/lidskou protilátku anti-CD4. Konstrukt DNA popsaný v tomto textu byl použit pro transformaci bakteriálního kmene XL-1 Blue, vybrán pomocí antibiotika ampicilinu a uložen jako bakteriální buněčná suspenze ve sterilním živném médiu LB obsahujícím 15% glycerol.

Sekvenování DNA

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

Expresce opičí/lidské chimérické anti-CD4

Expresní vektory TCAE 5.2 a TCAE 6 jsou schopné nejen trvalé exprese v buněčných liniích Sp2/0 a CHO, ale protože obsahují počátek SV40, jsou také schopné přechodné exprese v buněčné linii COS. Expresce v buňce COS byla provedena, jak následuje: buňky COS byly vysety den před transfekcí, takže mohly následující den z 50–70 % splývat. Kultivační médium bylo odstraněno a buňky byly dvakrát promyty transfekčním pufrem (TB– 140 mM NaCl, 25 mM Tris, 5 mM KCl, 0,5 mM Na₂HPO₄, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂). 30 µg plazmidu TCAE 6, purifikovaného chloridem cezným a obsahujícího anti-CD4 opičí/lidské chimérické imunoglobulinové těžké a lehké řetězce, se smísilo se 3 ml DEAE dextranu na misku (1 mg/ml v TB). DNA se inkubovala s buňkami po 1 hodinu při 37 °C. Roztok DNA byl odstraněn a nahrazen 3 ml 20% glycerolu po dobu 1,5–2,5 minuty, po které byly buňky dvakrát promyty TB. Buňky se inkubovaly v 5 ml čerstvého média obsahujícího 100 µM chlorochin po 3–5 hodin při 37 °C, a poté byly dvakrát promyty médiem a inkubovaly se 72 hodin s normálním DMEM. Supernatant (100 µl) z transfekovaných buněk COS byl testován v různých ředěních na přítomnosti protilátky technikou založenou na testu ELISA. Koží proti-lidská lambda byla použita k povlečení 96jamkových testovacích destiček a jako detekční protilátka byl použit koží proti-lidský IgG značený peroxidázou, za standardních podmínek pro testy ELISA. Bylo shledáno, že buňky COS tvoří mezi 10 a 40 ng/ml opičí/lidské chimérické protilátky. Větší objemy supernatantu byly 10x koncentrovány a použity pro přímý vazebný test RIA k CD4 pozitivním buňkám SupT1. Jako pozitivní a negativní kontroly byly použity parenterální celá opičí protilátka a irelevantní lidský imunoglobulin. Opičí anti-CD4 a opičí/lidská chimérická anti-CD4 byly také použity pro inhibici vazby vysoce afinitní myší protilátky anti-CD4 (1F3). Tyto výsledky dokázaly, že opičí/lidská rekombinantní protilátka (ATCC č. 69030) se nejenom váže k CD4 pozitivním buňkám, ale je schopná inhibovat vazbu 1F3 k CD4 pozitivním buňkám v přibližně týchž koncentracích celé opičí protilátky nebo samotné 1F3.

Příklad 2

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

Materiál a metody

Molekulární konstrukce a exprese PRIMATIZED™ anti-CD4

- 5 Variabilní oblasti imunoglobulinových genů byly amplifikovány PCR a klonovány z hetero-
hybridomů pocházejících z opice imunizované sCD4, jak bylo dříve popsáno (Newman, R.A., et
al., „Primatization of recombinant antibodies for immunotherapy of human disease: a macaque/
human chimeric antibody against human CD4“, *Biotechnology*, 10, 1455, 1992). Geny
10 variabilních oblastí těžkého a lehkého řetězce byly vloženy do kazetového expresního vektoru,
TCAE 6, zařazené za sebou, a exprimovány jako IgG1 λ po trvalé integraci do buněk
CHO DHFR⁻ (Newman, výše). Tři běhy amplifikace při zvyšujících se množstvích metotrexátu
umožnily vývoj buněčných linií, které exprimovaly více než 750 μ g/ml protilátky po dobu 8 dnů.
Vznikla produktivní buněčná linie, která byla pěstována v suspenzní kultuře a progresivně
15 expandovala před inokulací do bioreaktoru z dutých vláken (Evans et al., „Large-scale
production of murine monoclonal antibodies using hollow fiber bioreactors“, *BioTechniques*,
6(8), 762, 1988).

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

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

- 30 Devadesátišestijamkové mikrotitrační destičky se dnem jamek ve tvaru U (Corning) byly předem
blokovány po 1 hodinu na ledu s PBS obsahujícím 0,2% bovinní sérový albumin a 0,1% azid
sodný. Buňky SupT-18 (1×10^5), předem promyté tímž pufrem, byly 30 minut inkubovány na
ledu s různými koncentracemi CE9.1 (2,4 pg/ml – 10 μ g/ml). Buňky byly dvakrát promyty
35 a inkubovány 30 minut na ledu s protilátkou druhé vrstvy (koží proti-myší Ig značený FITC).
Buňky byly dvakrát promyty, resuspendovány ve fixačním pufru (2% formaldehyd v PBS)
a analyzovány za použití průtokového cytometru FACScan (Becton Dickinson).

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

- 40 Mononukleární buňky byly izolovány z lidské periferní krve za použití standardní centrifugační
techniky s Ficoll/Hypaque (Boyum, A., „Separation of blood leukocytes, granulocytes and
lymphocytes“, *Tissue Antigens*, 4, 269, 1974). Vrstva na rozhraní (interfáze) obsahující mono-
nukleární buňky periferní krve (PMNC) byla odebrána, promyta Hanksovým izotonickým
45 roztokem (HBSS) a buňky byly spočítány. 5×10^6 buněk se inkubovalo s 20 μ l CE9.1
(25 μ g/ml), po 30 minut při 4 °C. Buňky byly poté promyty s HBSS a inkubovány s 20 μ l kožího
proti-lidského IGG-FITC (Fisher Scientific). Po inkubaci na ledu po dalších 30 minut byly
buňky analyzovány na přístroji FACScan firmy Becton Dickinson za použití autokompence
a prekalibrace s kuličkami Calibrite. Živá lymfocytární populace byly rozpoznány rozptylem
50 přímého a pravoúhlého světelného paprsku a byla tak ohraničena celková populace lymfocytů.
Následná měření fluorescence zaznamenávala pouze vymezené lymfocytární jevy. mAbs použité
pro kvantifikaci dvojité značených buněk a následné studie na šimpanzí krvi zahrnovaly
proti-lidský CD3 (Leu-4-FITC, Becton Dickinson), proti-lidský CDS konjugovaný s fluores-
ceinem (Leu-2a-FITC, Becton Dickinson), proti-lidský CD8 konjugovaný s fykoerytrinem

(Leu-2a-PE, Becton Dickinson), proti-lidský CD20 konjugovaný s fykoerytrinem (Leu-16-PE, Becton Dickinson), koží proti-lidský IgG F(ab')₂ konjugovaný s fluoresceinem (Cappel) a myši anti-CD4 konjugovaný s fykoerytrinem (OKT4, Ortho Pharmaceuticals).

5 Zkřížená reaktivita lidské tkáně

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

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

Druhá specifita

20 Periferní krev několika běžných laboratorních primátů a jiných zvířat byla testována s CE9.1 na rozpoznání možné zkřížené reaktivity T buněk CD4 pozitivních. Skupina zahrnovala šimpanze, paviány, *Macaca rhesus*, *Macaca fascicularis* a *Macaca nemestrina*, krysy, myši, králíky a psy. Krevní buňky byly izolovány z 1–5 ml plné krve odstředěním (1500 rpm po 5 min) při 4 °C a promyty resuspendováním ve stejných objemech PBS. Procedura se opakovala ještě jednou a buňky se resuspendovaly ve stejných objemech fetálního bovinního séra. Dvě stě mikrolitrů buněčné suspenze od každého druhu bylo umístěno do 15mililitrové kónické centrifugační zkumavky s 20 µl CE9.1 (25 mg/ml). Protilátka a buňky se smíchaly, umístily na led po 30 minut, a poté se důkladně promyly s HBSS. Pak se přidalo 20 µl kožího proti-lidského IgG-FITC (Fisher Scientific) a vzorky se promíchaly. Po inkubaci na ledu po dalších 30 minut byly vzorky z ledu odstraněny a bylo přidáno 10 ml lyzujícího pufru (0,01 M hydrogenuhličitan draselný, pH 7,4, obsahující 0,16 M chlorid amonný a 0,1 M EDTA sodnou sůl), předeřhřátého na 37 °C. Vzorky se inkubovaly při teplotě místnosti po 15 minut, následovalo odstředění v 1500 rpm po 5 minut. Označené buněčné pelety byly ještě dvakrát promyty v HBSS (pH 7,4) obsahujícím 1% bovinní sérový albumin a 0,05% azid sodný. Označené buňky se fixovaly resuspendováním ve fixačním pufru (0,5 M chlorid sodný obsahující 1,0% formaldehyd, filtrován přes 0,22 µm filtr). Vzorky se analyzovaly na přístroji FACScan firmy Becton Dickinson, jak popsáno výše.

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

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

50 Lidské MLR se prováděly se vzorky od tří nezávislých nepříbuzných dárců, které byly užity jako stimulatorové a odpovídavé směsi. Tento laboratorní protokol byl použit, aby se maximalizovala možnost dobré odpovědi u náhodných, na HLA necharakterizovaných vzorků krve (resp. krevních buněk z „buffy coat“) dárců z Červeného kříže. V tomto protokolu nebyl žádný dárcovský vzorek krve ošetřen mitomycinem C ani ozářen.

55 Adhezivní test buněk THP-1 pro měření vazebné aktivity receptoru Fc pro CD9.1

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

Buňky THP-1 indukované γ IFN byly obarveny kalcinovaným methoxyacetátem, CAM (Molecular Probes), a to následovně: buňky byly promyty plnicím pufrem (OBS dle Dulbeccy s vápníkem a hořčíkem a 0,1% bovinním sérovým albuminem) a resuspendovány v množství 5×10^6 buněk/ml v 10 ml téhož pufru. CAM (1 mg/ml v DMSO) byl naředěn (1:50) plnicím pufrem a přidán k buněčným suspenzím THP-1 v poměru 1:1 (objem/objem). Po inkubaci po 20 minut při teplotě místnosti bylo přidáno ke každým 4 ml směsi buňky/CAM 20 ml čerstvého plnicího pufru a inkubace pokračovala dalších 40 minut při teplotě místnosti. Buňky byly poté dvakrát promyty plnicím pufrem a resuspendovány v množství 8×10^6 buněk/ml. Sériová ředění CE9.1 v PBS (bez vápníku, hořčíku nebo BSA) byla přidána do jamek obsahujících buňky DAP CD4⁺ a inkubována po 5 minut při teplotě místnosti. Poté bylo přidáno 50 μ l buněčné suspenze THP-1 obarvené CAM a destičky se inkubovaly 1 hodinu při teplotě místnosti ve tmě. Testovaly se také kontrolní jamky bez buněk DAP. Po inkubaci byly jamky třikrát promyty s PBS. Po závěrečném promytí se přidalo 100 μ l PBS na jamku, následováno 10 μ l 20% Tritonu X-100. Po umístění na třepače po 10–15 sekund se destičky odečítaly na přístroji Fluoroscanner (MTX Lab systems Inc.).

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

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

Vazba k myším fibroblastům transfekovaným Fc γ RII

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

Test ADCC (lýze buněk SupT1)

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

Buňky SupT1-18 (1×10^6) byly značeny inkubací se $100 \mu\text{Ci } ^{51}\text{Cr}$ po 1 hodinu při 37°C a 5% CO_2 . Buňky byly dvakrát promyty s RPMI/5% FCS a 1×10^4 buněk bylo přidáno do každé jamky. Tři dávky protilátky CE9.1 byly sériově naředěny 1:2 s RPMI/5% FCS a poměrné části
 5 byly přidány ve třech opakováních do jamek obsahujících SupT1-18 po 30 minut při 37°C a 5% CO_2 . Jako kontrola maximálního a spontánního uvolnění bylo použito $100 \mu\text{l}$ 1% Tritonu X-100 a $100 \mu\text{l}$ média. Do jamek se přidaly PBLs stimulované IL-2 (8×10^5 buněk). Destičky se stočily 3 minuty v 900 rpm a inkubovaly 16 hodin při 37°C a 5% CO_2 . Byl odebrán supernatant z každé jamky a množství radioaktivity se odečítalo počítacem impulzů gama. Test byl proveden
 10 v trojnásobném opakování. Procento buněčné lýzy se určilo za použití následujícího vzorce:

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

15

Clq vazebný test

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

Test cytotoxicity zprostředkované komplementem

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

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

45

Studie na šimpanzech *in vivo*

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

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

Výsledky

Vazebná specifita mAb CE9.1

Měření afinity SPR vazby CE9.1 k rozpustnému CD4 ukázalo K_d 1,0 mM (Brigham-Burke et al., North American BIA Symposium 1995, v tisku). Nebyla pozorována žádná vazba k buněčným liniím CD4⁻ a inhibiční studie prokázaly, že vazba k buňkám CD4⁺ je kompletně zrušena rozpustným CD4 způsobem odpovídajícím stechiometrickým poměrům.

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

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

Inhibice lidské MLR CE9.1

Účinek CE9.1 na T buněčné odpovědi byl vyhodnocován lidskou MLR, jako produkce IL-2 nebo proliferací odpovědi. CE9.1 blokovala jak proliferaci, tak produkci IL-2 s IC₅₀ 10–30 ng/ml, s 80% inhibicí v 60 ng/ml (obrázek 10).

Vazebná aktivita receptoru Fc pro CE9.1

Adhezní testy „buňka–buňka“ založené na CD4 a receptoru Fc byly vyvinuty, aby se určila reaktivita CE9.1 s receptory Fc na monocytárních buňkách. V jednom uspořádání testu jsou izolovány monocyty z čerstvých PBMC stočením na perkolovém gradientu, vyraženy na mikrotitrační destičky a stimulovány γIFN po 48 hodin. Po 48 hodinách byly k aktivovaným adherovaným monocytům přidány značené buňky SupT1 CD4⁺ v přítomnosti nebo nepřítomnosti CE9.1. V dalším uspořádání tohoto adhezního testu byla γIFN stimulována monocytární nadherentní buněčná linie THP-1. Po 24 hodinách byly aktivované buňky THP-1 označeny a přidány, v přítomnosti nebo nepřítomnosti CE9.1, k adherovaným CD4⁺ fibroblastovým transfektantům, které byly předtím (o 24 hodin dříve) vysety na mikrotitrační destičky. V obou případech je adheze „buňka–buňka“ závislá na vazbě mAb k CD4 na jedné buňce a k receptorům Fc na buňce druhé.

Data uvedená na obrázcích 10a, 10b a 10c, založená na čerstvých monocytech a T buňkách SupT1 CD4⁺ aktivovaných γIFN, ukazují, že CE9.1 zprostředkovává adhezi „buňka–buňka“ způsobem závislým na dávce, s přibližnou ED₅₀ 20 ng/ml. Adheze byla kompletně blokována sCD4 a nemůže být zprostředkována fragmentem F(ab')₂ z CE9.1. Monocyty neaktivované γIFN nebyly schopné vázat CE9.1 (obrázek 10b). Podobná data byla také získána v testu založeném na

THP-1 a CD4⁺ fibroblastovém testu (data nejsou ukázána). Byla také pozorována přímá vazba CE9.1 k myší fibroblastové linii transfekované lidskými receptory FCγRII (data nejsou ukázána).

Buňkami zprostředkovaná cytotoxicita závislá na protilátce (ADCC)

5

Ukázalo se, že buňky SupT1 značené radioizotopem použité jako cíle v testu ADCC, jsou specificky lyzovány efektorovými buňkami v přítomnosti CE9.1. Maximální cytotoxicity bylo dosaženo při přibližně 6 µg/ml s celkovou specifickou lýzou 50% (obr. 12). Jako pozitivní kontrola byla použita myší anti-CD4 izotypu IgG2a (4D9). Tato protilátka se chovala velmi podobně jako CE9.1 a poskytovala stejný stupeň celkové buněčné lýzy. CE9.1 byla proto velice účinná ve vazbě na receptory Fc na efektorových buňkách a při zprostředkování usmrcování CD4⁺ cílových buněčných linií.

10

Fixace komplementu CE9.1

15

Vazba C1q se měřila průtokovou cytometrií, jak bylo popsáno výše (Materiál a metody). Jak je ukázáno na obrázku 13, navzdory faktu, že CE9.1 obsahuje konstantní oblast lidského těžkého řetězce subtypu gama 1, vykazuje pouze minimální vazbu C1q (obr. 13). Afinitně purifikované opičí sérové protilátky anti-CD4 byly účinné ve zprostředkování vazby C1q, což svědčí pro to, že nepřítomnost vazby C1q CE9.1 je vlastnost specifická pro tuto protilátku. Nepřítomnost vazby C1q CE9.1 se odráží v neschopnosti fixovat komplement (obrázek 14). Afinitně purifikované protilátky anti-CD4 z opičího séra a myší monoklonální IgG2a způsobují obě významnou lýzu ve stejném rozmezí koncentrací.

20

Druhová zkřížená reaktivita CE9.1

25

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

30

Tabulka 2

35

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

Studie *in vivo* na šesti šimpanzech

40

Vzhledem k nepřítomnosti deplece buněk CD4 ve studii při použití stoupající dávky u jednoho šimpanze, byla 4 šimpanzům podána dávka 10 mg/kg (kromě toho 2 zvířata v kontrolní skupině obdržela fyziologický roztok). Jak je popsáno v Materiálu a metodách, dvěma skupinám bylo podáno 10 mg/kg v den 0 studie. Obrázek 15 sumarizuje účinky na počet CD4 a CD8 u těchto zvířat. Je možné pozorovat, že byly sníženy buňky exprimující receptor CD4 okamžitě po podání protilátky. Snížení četnosti CD4 bylo vidět pouze okamžitě po každé dávce podané protilátky.

V kontrolní skupině s fyziologickým roztokem nebyla pozorována žádná podobná změna ve stavu CD4. Počet CD8 zůstal neovlivněn v průběhu ošetření, ačkoliv byla pozorována denní variabilita (obr. 15, panel vlevo, prázdné kroužky). Při vyšetření populace CD3⁺ – CD8⁺ byly pozorovány méně výrazné poklesy v počtu CD4. Data naznačují výskyt CD3⁺ CD8⁺ T buněčných populací, které mohou být výsledek modulace antigenem CD4. Přesný mechanismus modulace je v tomto stadiu nejasný, ale může zahrnovat internalizaci nebo ztrátu molekul CD4 jako výsledek zkřížené vazby receptory Fc exprimovanými na jiných lymfoidních nebo monocytárních buňkách. Srovnání buněčných počtů na obrázku 15 ukazuje, že určitá deplece buněk CD4⁺ může nastat, ačkoliv hlavní účinek je způsobený modulací receptoru CD4. Zdá se, že ve většině případů modulační účinek trvá 7–10 dnů přímo po podávání protilátky, po kterých se exprese CD4 vrátí právě pod výchozí hodnoty.

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

20 Příklad 3

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

25

Konstrukce expresního vektoru DNA

Lidský gen těžkého řetězce gama 4 byl izolován metodou PCR z buněčné linie TPIT10.4 (získané od S. Morrisona, UCLA) za použití 5' IDEC primeru č. 479 a 3' IDEC primeru č. 462 (viz obr. 16), které obsahují místa Nhe I a BamH I. Celý klonovaný fragment lidského gama 4 byl sekvenován a shledán identickým s fragmentem popsáným v Kabat et al., (NIH Publication Fifth Edition No. 91–3242, U.S. Dept. Of Health and Human Services, 1991) (viz obr. 17). Fragment Nhe I/BamH I byl klonován do expresního vektoru Anex 2. Celé geny lehkého a těžkého řetězce imunoglobulinu z tohoto plazmidu byly přesunuty do jiného expresního plazmidu do fragmentu Bgl II až Sac I. Tento plazmid byl nazván anti-CD4 (G4, L, Oz–) v NEOSPLA3F.

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

45 Příklad 4

Expres v buňkách ovaria čínského křečka (CHO)

Integrace plazmidu a výběr klonů produkujících protilátku

50

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

Bylo provedeno 5 elektroporací se 4×10^6 buněk a 5 μg plazmidové DNA (anti-CD4(γ 4(PE), lambda, Oz-) v NEOSPLA3F) za použití elektroporačního zařízení BTX 600 (BTX, San Diego, CA) v kyvetách na jedno použití o objemu 0,4 ml. Před elektroporací byl plazmid naštěpen s Pac I, což oddělilo geny exprimované v savčích buňkách od části plazmidu používané pro růst plazmidu v bakteriích. Podmínky pro elektroporaci byly 230 V, 400 μF , 13 Ω . Buňky z každé elektroporace byly vysety na jednu 96 jamkovou destičku (40 000 buněk/jamka). Destičky byly naplněny médiem CHO + HT obsahujícím G418 (Geneticin, GIBCO), 400 $\mu\text{g/ml}$ aktivní sloučeniny, dva dny po elektroporaci, a poté dle potřeby dokud kolonie rostly. Supernatant ze slévajících se (konfluentních) kolonií byl testován na přítomnost chimérického imunoglobulinu testem ELISA specifickým pro lidskou protilátku. Dvacet osm kolonií rezistentních na G418 rostlo na pěti destičkách (ze 480 jamek). Kolonie rezistentní na G418 exprimující nejvíce protilátky, klon 5C1, byly konfluentní 30 dnů po elektroporaci. Analýza metodou Southernova přenosu ukázala, že klon 5C1 začlenil jednu kopii (data neuvedena). Ve čtyřdenní kultuře vyšetě v koncentraci 10^5 buněk/ml do 125 mililitrové kultivační nádoby se tento klon každých 28 hodin zdvojnásobil a rychlost produkce protilátky byla 0,5 pg/buňka/den (0,9 mg/l).

Amplifikace

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

Buněčné banky fáze I rodičovského zásobního kmene CE9 γ 4PE pro vysévání (PSS, parent seed stock)

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

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

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

Hlavní buněčná banka (MCB)

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

Příklad 5

Stabilita mAbs CD4

Fyzická a chemická stabilita roztoků CE9γ4PE a CE9γ4E se sledovala po dobu 3 měsíců při 5°C , 40°C a rozptýleném světle pomocí SDS–PAGE (redukující a neredukující), IEF, reverzní fázovou HPLC, vylučovací chromatografií (SEC) a testem ELISA. Počáteční testování RP–HPLC a neredukující SDS–PAGE svědčí pro to, že CE9γ4E je složena ze dvou hlavních druhů, a to neredukované celé molekuly a nekovalentně přidružené molekuly, která se v podmínkách analýzy štěpí do dvou stejných jednotek označených jako „polo–mer“ („halfmer“). Je zajímavé, že nebyly pozorovány žádné větší rozdíly v bio–analytických profilech těchto dvou mAbs při použití metod SEC, IEF, SDS–PAGE (redukující) a ELISA. Množství „polo–merů“ v CE9γ4E je méně než 1 % jak při RP–HPLC, tak SDS–PAGE (neredukující). Obrázek 18 ukazuje SDS–PAGE (neredukující) analýzu monomeru a „polo–meru“ v roztocích CE9γ4PE a CE9γ4E. Množství „polo–meru“ v CE9γ4E zůstávalo konstantní vzhledem k počátečnímu testování po dobu tří měsíců v jakýchkoliv testovacích podmínkách. Obsah „polo–meru“ v CE9γ4PE zůstával pod 2 % po celou dobu za všech testovacích podmínek. Žádný větší rozdíl ve stabilitě mezi CE9γ4E a CE9γ4PE nebyl pozorován při 5°C a 40°C . Roztok CE9γ4E skladovaná při rozptýleném světle je poněkud méně stabilní než CE9γ4PE. Data naznačují, že „polo–mer“ CE9γ4E nemá významný účinek na všeobecnou stabilitu celé molekuly. Žádné větší rozdíly ve fyzikální stabilitě roztoků CE9γ4PE a CE9γ4E nebyly pozorovány.

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

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

Tabulka 3

Stechiometrie a afinita vazby měřená povrchovou plazmonovou rezonancí

Protilátka	Stechiometrie dle BIAcore	Afinita (nM 25 °C)
CE9.1	1,56	0,99
CE9 γ 4	1,61	1,34
CE9 γ 4E	1,72	1,43
CE9 γ 4 λ K	1,67	1,08
CE9 γ 4PE		1,09

Příklad 6

Biologické hodnocení CE9 γ 4PE *in vitro*

Shrnutí

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

Účinky mAbs na odpovědi smíšených lymfocytů (MLR)

Test trojsměrné odpovědi smíšených lymfocytů (MLR) se prováděl pro určení účinku konstruktů mAb na T buněčnou proliferaci řízenou alo-antigenem a na produkci IL-2. MLR jsou závislé na přítomnosti T buněk CD4⁺ a velká část odpovědi je závislá na účasti receptoru CD4 prostřednictvím interakce s molekulami MHC II. třídy na buňkách prezentujících antigen. Odpověď MLR je *in vitro* korelát aspektů transplantační rejekce *in vivo*. Co se týče dalších farmakologických přípravků jsou MLR také blokovány imunosupresivními přípravky, jako je cyklosporin A.

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

Tabulka 4

Účinek mAbs na MLR – shrnutí

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

Závěr

Všechny mAbs jsou rovnocenné v inhibici MLR.

5 Vazebné vlastnosti mAbs pro receptor Fc

Ověření testu pro určení vazby receptoru Fc

10 CE9γ4PE byla navržena tak, aby neměla aktivity vázající FcR. Pro měření této aktivity byl vyvinut test založený na vazbě buněk zprostředkované FcR a CD4 při přemostění pomocí mAbs. Tento test měří současně funkce mAbs vázajících FcR, jako *in vitro* korelát deplece buněk CD4 *in vivo* zprostředkované FcR a mAb.

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

20 Určení vazebných aktivit mAbs pro receptor Fc

mAbs CE9.1(IgG1), CE9γ4 (IgG4), CE9γ4λK (hybrid IgG4 λK), CE9γ4E (IgG4, mutant E) a CE9γ4PE (IgG4, mutant PE) byly hodnoceny z hlediska schopnosti současně vázat CD4 buněčného povrchu a FcR.

25 Jak se očekávalo, CE9.1 má v tomto testu dobrou vazebnou aktivitu. Překvapivě konstrukty IgG4 CE9γ4 a CE9γ4λK si podržely dostatečnou afinitu pro FcR, že byly v tomto testu nerozeznatelné od CE9.1. Aktivita v tomto testu se ztratila pouze když byla zavedena substituce „E“, jako v CE9γ4E a CE9γ4PE (viz obr. 22).

30 Vazebné vlastnosti CE9γ4PE pro C1q *in vitro*

35 Komplementový systém zahrnuje, mezi svými různými funkčními složkami, schopnost interagovat s určitými typy protilátek způsobem, který vede k buněčné lýze a destrukci. Lidské protilátky IgG1 jsou normálně schopné vázat C1q a vyčerpat cílové buňky nesoucí povrchové antigeny, pro které jsou specifické. Jiné lidské izotypy, jako IgG4, projevují sníženou schopnost vázat C1q a jsou tedy neschopné deplece cílových buněk. Úprava CE9γ4PE v konstruktu gama 4 může do určité míry dosáhnout takového cíle, že zabrání fixaci komplementu a umožní vazbu protilátky na CD4 cílové buňky při eliminaci potenciálních destruktivních vedlejších účinků.

40 Srovnání CDC efektorových vlastností CE9γ4PE a CE9.1 se provedlo za použití klasické metody komplementem zprostředkované cytolyzy buněk SupT1 CD4⁺ značených chromem v přítomnosti králíčího komplementu. V těchto studiích byl jako pozitivní kontrola použit myší komplement fixující mAb k *Hu*CD4, 4D9 (IgG2a). Jak CE9.1 tak i CE9γ4PE byly neúčinné ve fixaci králíčího komplementu (obr. 23). Jak bylo zmíněno již dříve, CE9.1 váže slabě C1q a je tedy neschopná 45 fixovat lidský komplement. Tyto výsledky ukazují, že oba konstrukty jsou neschopné podpořit buněčnou lýzu prostřednictvím komplementového efektorového mechanismu.

ADCC efektorové vlastnosti CE9γ4PE *in vitro*

50 Buňky s cytotoxickým potenciálem, které mohou vázat mAbs prostřednictvím FcR mohou zprostředkovat ADCC namířenou na cílové buňky pokryté antigenem. Lidské T pomahačské buňky exprimující molekulu CD4 jsou rozpoznávány mAb CE9.1, která spouští cytolytický útok zabíječských buněk nesoucích FcR, granulocytů a/nebo makrofágů. Cílem konstrukce CE9γ4PE

bylo odstranit schopnost mAb vázat se k FcR, což by odstranilo schopnost přídatných buněk zprostředkovat depleci cílových buněk CD4, zatímco by stále umožňovalo mAb, aby zůstala imunosupresivní.

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

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

15

Příklad 7

Komparativní PK analýza CE9γ4E a CE9γ4PE

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

- 30 Po podání intravenózního bolusu 1 mg/kg CD4 mAb se plazmatická koncentrace CE9γ4E snižovala trojfázovým způsobem a plazmatická koncentrace CE9γ4PE se snižovala dvojfázovým způsobem (obr. 24). Za účelem srovnání a kvůli nedostatečnému počtu dat pro adekvátní popis terminální fáze pro CE9γ4E, byly všechny profily plazmatické koncentrace v čase analyzovány za použití dvoufázového modelu. Byla pozorována malá variabilita mezi případy. Převládající sekundární fáze $t_{1/2}$ byla přibližně 4 dny pro CE9γ4E, a 9 dnů pro CE9γ4PE a odpovídala za 67 % a 93 % celkové plochy pod křivkou závislosti plazmatická koncentrace–čas. Zjevná plazmatická clearance pro CE9γ4PE byla nízká (6,4 ml/hod/kg) a byla přibližně polovina clearance CE9γ4E (1,0 ml/hod/kg). Farmakokinetické vlastnosti PE mutanta λ4 mAb, CE9γ4E, jsou tedy podobné jiným humanizovaným λ1 mAbs u laboratorního potkana.

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

40

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

45 Tabulka 5

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

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

Zkratky farmakokinetických parametrů v tab.5 : CL = celková plazmatická clearance, $AUC_{0-\infty}$ = celková plocha pod křivkou závislosti plazmatické koncentrace na čase, MRT = střední rezidenční čas, $T_{1/2}^{-1}$ = zjevný poločas rozpadu v počáteční fázi, $T_{1/2}^{-2}$ = zjevný poločas rozpadu v sekundární fázi, $\%AUC_2$ = procento plochy pod křivkou závislosti plazmatické koncentrace na čase během sekundární fáze, V_{ss} = distribuční objem v rovnovážném stavu.

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

Příklad 8

15 Farmakologické studie na *vivo*

Popis transgenních myších *HuCD4*

Úvod

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

Transgenní myši *HuCD4*⁺

U transgenních myší *HuCD4* vypěstovaných v UCFS (Killeen et al., EMBO J., 12, 1547–53, 1993), byl endogenní gen *MuCD4* porušen homologní rekombinací a lidský minitransgen *CD4* byl zaveden tak, aby podléhal regulaci promotorem *MuCD4*. U těchto myší, které byly kříženy do vzniku homozygotního potomstva, byl *MuCD4* nahrazen *HuCD4*. *HuCD4* obnovuje pozitivní a negativní selekci v thymu, vedoucí k produkci nezávislých pozitivních periferních T buněk $CD4^+$ nebo $CD8^+$, a to v úrovni srovnatelné se stupněm nalezeným u normálních myší. Kromě toho, ve srovnání s rodičovskou generací s vyřazeným genem *MuCD4* („*MuCD4* knockout“), vykazují zralé T buňky *HuCD4* vlastnosti blízké jejich normálním myším protějškům: 1) *in vivo*, sérové hladiny IgG jsou navraceny k normálním hodnotám a 2) tato zvířata vykazují příslušné odpovědi závislé na MHC v *in vitro* NMR.

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

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

Předběžné vyhodnocení CE9γ4PE u transgenních myší *HuCD4*

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

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

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

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

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

Studie na šimpanzech *in vivo*

- 30 U šesti šimpanzů se vyšetřovala deplece T buněk $CD4^+$ a/nebo modulační receptorů $CD4$ buněčného povrchu po infúzích zvyšujících se dávek CE9γ4PE až do 15 mg/kg. Každému šimpanzi se odebíraly vzorky periferní krve tři a dva týdne před začátkem studie, aby se stanovil výchozí stav počtu T buněk $CD4^+$. Kromě buněk $CD4^+$ se průtokovou cytometrií měřily také hladiny buněk $CD3^+$ a $CD8^+$. Jako kontrola byla použita mAb OKT4, která se váže k odlišným částem molekuly $CD4$ a nesoutěží o vazbu s CE9γ4PE. Subtrakcí počtu $CD8^+$ od celkového počtu $CD3^+$ mohla být vypočítána teoretická hodnota pro počet T buněk $CD4^+$. Srovnáním této hodnoty s buňkami $CD4^+$ měřenými pomocí OKT4, mohla být rozlišena modulační receptoru $CD4$ od deplece buněk $CD4$.
- 40 Na začátku studie obdržel každý šimpanz i.v. infúzi fyziologického roztoku. Vzorky krve se odebíraly okamžitě po infúzi a 3 a 14 dnů později. Každému šimpanzi se podala infúze C9γ4PE (0,05 mg/kg) a 3 a pak 14 dnů později se odebíraly krevní vzorky. Sledoval se počet buněk $CD4^+$ a jestliže byl v normálním rozmezí, podala se další dávka CE9γ4PE. Každý šimpanz byl ošetřen podle následujícího schématu: fyziologický roztok, 0,05 mg/kg CE9γ4PE, 1,5 mg/kg CE9γ4PE, 45 fyziologický roztok, 15 mg/kg CE9γ4PE.

- 50 Po infúzích fyziologického roztoku nebo CE9γ4PE v dávce 0,05 mg/kg nebyl pozorován žádný účinek na hladiny $CD4$. Při dávce 1,5 mg/kg nebyl pozorován žádný účinek na hladiny $CD4$. Při dávce 1,5 mg/kg byl pozorován povlak buněk $CD4^+$ a přechodná a částečná modulační receptorů $CD4$ buněčného povrchu, ačkoliv nebyla pozorována žádná buněčná deplece $CD4^+$. Při dávce 15 mg/kg CE9γ4PE nebyla pozorována buněčná deplece $CD4^+$ u žádného zvířete, ačkoliv u všech zvířat byla pozorována významná modulační. Modulační účinek byl přechodný a vrátil se k výchozímu stavu během 14–21 dnů. U žádného zvířete nebyly pozorovány žádné vedlejší

účinky. CE9γ4PE mohla být detekována na buněčném povrchu a v séru do dvou dnů po podávání.

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

Použití

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

- Množství protilátky použitelné k vyvolání terapeutického účinku může být určeno standardními technikami odborníkům dobře známými. Protilátky budou všeobecně poskytovány standardní technickou ve farmaceuticky přijatelném pufru a mohou být podávány jakýmkoliv žádoucím
- 25 způsobem. Vzhledem k činnosti předkládaných nárokovaných protilátek a jejich toleranci člověkem je možné tyto protilátky podávat opakovaně, aby se bojovalo proti různým nemocem nebo chorobným stavům u člověka.

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

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

- Fakt, že protilátky podle tohoto vynálezu jsou užitečné v navození imunosuprese, znamená, že
- 40 jsou použitelné v léčbě nebo prevenci rezistence k transplantovaným orgánům nebo tkáním (např. ledviny, srdce, plíce, kostní dřeň, kůže, rohovka atd.) nebo jejich rejekce, léčbě nebo prevenci autoimunitních, zánětlivých, proliferálních a hyperproliferálních nemocí, a kožních manifestací imunologicky zprostředkovaných nemocí (např. revmatoidní artritida, lupus erytematosus, systémový lupus erytematosus, Hashimotovy tyreoiditidy, sclerosis multiplex, myastenia gravis,
- 45 diabetes I. typu, uveitida, nefrotický syndrom, psoriáza, atopická dermatitida, kontaktní dermatitida a další ekzematózní dermatitidy, seboroická dermatitida, lichen planus, pemfigus, bulózní pemfigus, bulózní epidermolysis, kopřivka, angioedém, vaskulitidy, erytém, kožní eosinofilie, alopecie areata, atd.), léčba reverzibilní obstrukční nemoci dýchacích cest, střevní záněty a alergie (např. celiakie, proktitida, eosinofilní gastroenteritida, mastocytóza, Crohnova
- 50 nemoc a ulcerativní kolitida) a potravinové alergie (např. migréna, rýma a ekzém). Předmětné protilátky jsou také potenciálně použitelné pro léčbu neautoimunitních stavů, kde je žádoucí imunomodulace, jako je kromě jiného např. reakce štěpu proti hostiteli (GVHD), transplantační rejekce, astma, HIV, leukemie, lymfom.

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

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

Protilátky podle vynálezu mohou být podávány člověku nebo zvířeti podle výše zmíněných způsobů léčení v množství dostatečném k vyvolání takového účinku na terapeutickém nebo profylaktickém stupni. Protilátky podle vynálezu mohou být podávány takovému člověku nebo zvířeti v obvyklé dávkovací formě připravené kombinací protilátky podle vynálezu s obvyklým farmaceuticky přijatelným nosičem nebo ředidlem podle známých technik. Odborníkovi bude zřejmé, že forma a charakter farmaceuticky přijatelného nosiče nebo ředidla závisí na množství aktivní složky, se kterou se bude kombinovat, způsobu podávání a dalších známých proměnných.

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

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

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

Protilátka podle vynálezu může být také podávána lokálně. Lokálním podáváním se míní nesystémové podávání a zahrnuje aplikaci protilátkové (nebo jejího fragmentu) sloučeniny podle vynálezu externě na epidermis, buď lokálně a instilaci této protilátky do ucha, oka a nosu, a kde nevstoupí významně do krevního řečiště. Systémovým podáváním se míní perorální, intravenózní, intraperitoneální a intramuskulární podávání. Množství protilátky vyžadované pro terapeutický nebo profylaktický účinek bude ovšem kolísat podle vybrané protilátky, povahy a vážnosti léčeného stavu a zvířete podstupujícího léčení a závisí konečně na úsudku lékaře. Vhodná lokální dávka protilátky podle vynálezu bude všeobecně v rozmezí od 1 do 100 mg/kg tělesné váhy/den.

Přípravky

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

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

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

5 Kapky podle předkládaného vynálezu obsahují sterilní vodné nebo olejnaté roztoky nebo suspenze a jsou připravovány rozpuštěním aktivní složky ve vhodném vodném roztoku baktericidního a/nebo fungicidního přípravku a/nebo jakéhokoliv dalšího vhodného konzervačního prostředku a výhodně zahrnující povrchově aktivní přípravek. Výsledný roztok je
10 poté čištěn filtrací, přenesen do vhodné nádoby, která je poté těsně uzavřena a sterilizována v autoklávu nebo udržováním teploty 90 °C až 100 °C půl hodiny. Alternativně může být roztok sterilizován filtrací a přenesen do nádoby asepticky. Příklady baktericidních a fungicidních přípravků vhodných pro zahrnutí do kapek jsou dusičnan nebo octan fenylrtuťnatý (0,002%), benzalkoniumchlorid (0,01%) a chlorhexidin (0,01%). Vhodná rozpouštědla pro přípravu olejnatého roztoku zahrnují glycerol, naředěný alkohol a propylenglykol.

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

Krémy, masti nebo pasty podle předkládaného vynálezu jsou polotuhé přípravky aktivní složky pro vnější použití. Mohou být tvořeny mísením aktivní složky v jemně oddělené nebo práškové
25 formě, samotné nebo v roztoku nebo suspenzi v tekutině vodné nebo jiné povahy, pomocí vhodného zařízení, v mastném nebo nemastném základu. Základ může obsahovat uhlovodíky, jako je tvrdý, měkký nebo tekutý parafin, glycerol, včelí vosk, kovové mýdlo, arabskou gumu, olej přírodního původu, jako mandlový, kukuřičný, podzemnicový, ricinový nebo olivový olej, tuk z ovčí vlny, nebo jeho deriváty, nebo mastné kyseliny, jako je stearová nebo olejová spolu
30 s alkoholem, jako je propylenglykol nebo makrogol. Přípravek může zahrnout jakékoli vhodné povrchově aktivní činidlo, jako jsou estery sorbitanu nebo jeho polyoxyetylenové deriváty. Mohou být také zahrnuta suspendující činidla, jako jsou přírodní gummy, deriváty celulózy nebo anorganické látky, jako jsou oxidy křemíku, a další složky, jako je lanolin.

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

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

45 Přípravek ve formě tobolky

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

Injekční parenterální přípravek

- 5 Farmaceutický přípravek podle tohoto vynálezu ve formě vhodné pro podávání injekcí se připraví smícháním 1,5 % (hmotnostního) protilátky vynálezu nebo jejího fragmentu v 10% (objemovém) propylenglykolu a vodě. Roztok se sterilizuje filtrací.

Přípravek ve formě masti

- 10 Protilátka vynálezu nebo její fragment 1,0 g.
Měkký bílý parafín do 100,0 g.

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

- 15 Přípravek ve formě krému pro lokální podávání

- Protilátka podle vynálezu nebo její fragment 1,0 g.
Polawax GP 200 20,0 g.
Bezvodý lanolin 2,0 g.
20 Bílý včelí vosk 2,5 g.
Metylhydroxybenzoan 0,1 g.
Destilovaná voda do 100 g.

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

Přípravek ve formě lotionu pro lokální podávání

- 30 Protilátka vynálezu nebo její fragment 1,0 g.
Sorbitan monolaurát 0,6 g. Polysorban 20 0,6 g.
Cetostearylalkohol 1,2 g. Glycerin 6,0 g.
Metylhydroxybenzoan 0,2 g.
35 Purifikovaná voda B.P. do 100,00 ml. (B.P. = britský lékopis)

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

Přípravek ve formě očních kapek

- 45 Protilátka podle vynálezu nebo její fragment 0,5 g.
Metylhydroxybenzoan 0,1 g.
Propylhydroxybenzoan 0,04 g.
Purifikovaná voda B.P. do 100,00 ml.
- 50 Metyl a propylhydroxybenzoany se rozpustí v 70 ml purifikované vody při 75 °C a výsledný roztok se ponechá chladnout. Poté se přidá protilátka vynálezu nebo její fragment a roztok se sterilizuje filtrací přes membránový filtr (velikost pórů 0,022 µm), a asepticky balí do vhodných sterilních nádobek.

Přípravek pro podávání inhalací

Pro aerosolovou nádobku s kapacitou 15–20 ml: smíchej 10 mg protilátky podle vynálezu nebo jejího fragmentu s 0,2–0,5 % lubrikačního činidla, jako je polysorban 85 nebo kyselina olejová, a rozptyl tuto směs v pohonné látce, jako je freon, výhodně v kombinaci (1,2–dichlorotetrafluoroetanu) a difluorochlorometanu a vlož do příslušné aerosolové nádoby upravené buď pro intranazální nebo perorální inhalační podávání. Přípravek pro podávání inhalací pro aerosolovou nádobku s kapacitou 15–20 ml: rozpust' 10 mg protilátky podle vynálezu nebo jejího fragmentu v etanolu (6–8 ml), přidej 0,1–0,2 % lubrikačního činidla, jako je polysorban 85 nebo kyselina olejová, a rozptyl v pohonné látce, jako je freon, výhodně v kombinaci (1,2 dichlorotetrafluoroetanu) a difluorochlorometanu a vlož do příslušné aerosolové nádoby upravené buď pro intranazální nebo perorální inhalační podávání.

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

Farmaceutický přípravek podle vynálezu pro intramuskulární injekci se připraví tak, aby obsahoval 1 ml sterilní pufrované vody a 50 mg protilátky vynálezu nebo jejího fragmentu. Podobně farmaceutický přípravek podle vynálezu pro intravenózní infúzi je vyroben tak, že obsahuje 250 ml sterilního Ringerova roztoku a 150 mg protilátky vynálezu nebo jejího fragmentu. Současné způsoby přípravy parenterálně podavatelných přípravků jsou dobře známy nebo jsou odborníkům zjevné, a jsou detailněji popsány například v Remington's Pharmaceutical Science, 15. vyd., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, zahrnuto v odkazech.

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

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

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

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

Uložení

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

5

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

10

SEZNAM SEKVENCÍ

15

(2) INFORMACE PRO SEKVENCÍ S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 1:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

20

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

25

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

30

- (A) ORGANIZMUS: opice

(viii) POZICE V GENOMU:

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

35

(ix) ZNAKY:

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

40

(ix) ZNAKY:

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

45

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

GAC	ATG	AAA	CAC	CTG	TGG	TTC	TTC	CTC	CTC	CTG	GTG	GCA	GCC	CCC	AGA	48
Met	Lys	His	Leu	Trp	Phe	Phe	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	Ala	Pro	Arg		
-19				-15						-10					-5	
TGG	GTC	TTG	TCC	CAG	GTG	CAG	CTG	CAG	GAG	GCG	GGC	CCA	GGA	CTG	GTG	96
Trp	Val	Leu	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ala	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	
				1				5					10			
AAG	CCT	TCG	GAG	ACC	CTG	TCC	CTC	ACC	TGC	AGT	GTC	TCT	GGT	GGC	TCC	144
Lys	Pro	Ser	Glu	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ser	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	
		15					20					25				
ATC	AGC	GGT	GAC	TAT	TAT	TGG	TTC	TGG	ATC	CGC	CAG	TCC	CCA	GGG	AAG	192
Ile	Ser	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Trp	Phe	Trp	Ile	Arg	Gln	Ser	Pro	Gly	Lys	
30						35				40						
GGA	CTG	GAG	TGG	ATC	GGC	TAC	ATC	TAT	GGC	AGT	GGT	GGG	GGC	ACC	AAT	240
Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Tyr	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Thr	Asn	
45				50						55					60	
TAC	AAT	CCC	TCC	CTC	AAC	AAT	CGA	GTC	TCC	ATT	TCA	ATA	GAC	ACG	TCC	288
Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Asn	Asn	Arg	Val	Ser	Ile	Ser	Ile	Asp	Thr	Ser	
				65				70					75			
AAG	AAC	CTC	TTC	TCC	CTG	AAA	CTG	AGG	TCT	GTG	ACC	GCC	GCG	GAC	ACG	336
Lys	Asn	Leu	Phe	Ser	Leu	Lys	Leu	Arg	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	
			80					85					90			
GCC	GTC	TAT	TAC	TGT	GCG	AGT	AAT	ATA	TTG	AAA	TAT	CTT	CAC	TGG	TTA	384
Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ser	Asn	Ile	Leu	Lys	Tyr	Leu	His	Trp	Leu	
		95					100					105				
TTA	TAC	TGG	GGC	CAG	GGA	GTC	CTG	GTC	ACC	GTC	TCC					420
Leu	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Val	Leu	Val	Thr	Val	Ser					
110						115					120					

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 2:

5 (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 139 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(D) TOPOLOGIE: lineární

10

(ii) TYP MOLEKULY: protein

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

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

15 (2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 3:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 387 párů bází

20

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) TYP VLÁKNA: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

25

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ: opice

(viii) POZICE V GENOMU:

30

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

(ix) ZNAKY:

(A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS

(B) POZICE: 4...387

5

(ix) ZNAKY:

(A) JMÉNO/OZNAČENÍ: hotový peptid

(B) POZICE: 61...387

10

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

ACC	ATG	GCC	TGG	GCT	CTG	CTG	CTC	CTC	GGC	CTC	CTT	GCT	CAC	TTT	ACA	48
Met	Ala	Trp	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Ala	His	Phe	Thr		
-19				-15				-10						-5		
GAC	TCT	GCG	GCC	TCC	TAT	GAG	TTG	AGT	CAG	CCT	CGC	TCA	GTG	TCC	GTG	96
Asp	Ser	Ala	Ala	Ser	Tyr	Glu	Leu	Ser	Gln	Pro	Arg	Ser	Val	Ser	Val	
				1				5					10			
TCC	CCA	GGA	CAG	ACG	GCC	GGG	TTC	ACC	TGT	GGG	GGA	GAC	AAC	GTT	GGA	144
Ser	Pro	Gly	Gln	Thr	Ala	Gly	Phe	Thr	Cys	Gly	Gly	Asp	Asn	Val	Gly	
		15					20					25				
AGG	AAA	AGT	GTA	CAG	TGG	TAC	CAG	CAG	AAG	CCA	CCG	CAG	GCC	CCT	GTG	192
Arg	Lys	Ser	Val	Gln	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Pro	Gln	Ala	Pro	Val	
	30					35					40					
CTG	GTC	ATC	TAT	GCT	GAC	AGC	GAA	CGG	CCC	TCA	GGG	ATC	CCT	GCG	CGA	240
Leu	Val	Ile	Tyr	Ala	Asp	Ser	Glu	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	
45				50				55						60		
TTC	TCT	GGC	TCC	AAC	TCA	GGG	AAC	ACC	GCC	ACC	CTG	ACC	ATC	AGC	GGG	288
Phe	Ser	Gly	Ser	Asn	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	
				65				70						75		
GTC	GAG	GCC	GGG	GAT	GAG	GCT	GAC	TAT	TAC	TGT	CAG	GTG	TGG	GAC	AGT	336
Val	Glu	Ala	Gly	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Val	Trp	Asp	Ser	
			80				85					90				
ACT	GCT	GAT	CAT	TGG	GTC	TTC	GGC	GGA	GGG	ACC	CGG	CTG	ACC	GTC	CTA	384
Thr	Ala	Asp	His	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Arg	Leu	Thr	Val	Leu	
		95					100					105				
GGT																387
Gly																

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 4:

15

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 128 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

20

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

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

25

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

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 5:

5

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

10

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

15

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

- (A) ORGANIZMUS: Homo sapiens

(viii) POZICE V GENOMU:

20

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

(ix) ZNAKY:

25

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

(ix) ZNAKY:

30

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

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

ATG GCC TGG GCT CTG CTG CTC CTC GGC CTC CTT GCT CAC TTT ACA GAC	48
Met Ala Trp Ala Leu Leu Leu Leu Gly Leu Leu Ala His Phe Thr Asp	
1 5 10 15	
TCT GCG GCC TCC TAT GAG TTG AGT CAG CCT CGC TCA GTG TCC GTG TCC	96
Ser Ala Ala Ser Tyr Glu Leu Ser Gln Pro Arg Ser Val Ser Val Ser	
20 25 30	
CCA GGA CAG ACG GCC GGG TTC ACC TGT GGG GGA GAC AAC GTT GGA AGG	144
Pro Gly Gln Thr Ala Gly Phe Thr Cys Gly Gly Asp Asn Val Gly Arg	
35 40 45	
AAA AGT GTA CAG TGG TAC CAG CAG AAG CCA CCG CAG GCC CCT GTG CTG	192
Lys Ser Val Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Pro Gln Ala Pro Val Leu	
50 55 60	
GTC ATC TAT GCT GAC AGC GAA CGG CCC TCA GGG ATC CCT GCG CGA TTC	240
Val Ile Tyr Ala Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe	
65 70 75 80	
TCT GGC TCC AAC TCA GGG AAC ACC GCC ACC CTG ACC ATC AGC GGG GTC	288
Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val	
85 90 95	
GAG GCC GGG GAT GAG GCT GAC TAT TAC TGT CAG GTG TGG GAC AGT ACT	336
Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Thr	
100 105 110	
GCT GAT CAT TGG GTC TTC GGC GGA GGG ACC CGG CTG ACC GTC CTA GGT	384
Ala Asp His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Gly	
115 120 125	
CAG CCC AAG GCT GCC CCC TCG GTC ACT CTG TTC CCG CCC TCC TCT GAG	432
Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu	
130 135 140	
GAG CTT CAA GCC AAC AAG GCC ACA CTG GTG TGT CTC ATA AGT GAC TTC	480
Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe	
145 150 155 160	
TAC CCG GGA GCC GTG ACA GTG GCC TGG AAG GCA GAT AGC AGC CCC GTC	528
Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val	
165 170 175	
AAG GCG GGA GTG GAG ACC ACC ACA CCC TCC AAA CAA AGC AAC AAC AAG	576
Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys	
180 185 190	
TAC GCG GCC AGC AGC TAC CTG AGC CTG ACG CCT GAG CAG TGG AAG TCC	624
Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser	
195 200 205	
CAC AGA AGC TAC AGC TGC CAG GTC ACG CAT GAA GGG AGC ACC GTG GAG	672
His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu	
210 215 220	
AAG ACA GTG GCC CCT ACA GAA TGT TCA TGA	702
Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser *	
225 230	

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 6:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- 5 (A) DÉLKA: 234 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

10

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

```

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

```

(2) INFORMACE PRO SEKVENCII S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 7:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

10 (ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(viii) POZICE V GENOMU:

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

(ix) ZNAKY:

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

(ix) ZNAKY:

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

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

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

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

```

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

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

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

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

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

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

CTG GGT AAA TGA
Leu Gly Lys *
465 1404

```

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 8:

5 (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 468 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(D) TOPOLOGIE:

10

(ii) TYP MOLEKULY: protein

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

```

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
20 25 30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ser Gly Gly Ser Ile
35 40 45

```


Ser Gly Asp Tyr Tyr Trp Phe Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly
 50 55 60
 Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Gly Ser Gly Gly Gly Thr Asn Tyr
 65 70 75 80
 Asn Pro Ser Leu Asn Asn Arg Val Ser Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys
 85 90 95
 Asn Leu Phe Ser Leu Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
 100 105 110
 Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Asn Ile Leu Lys Tyr Leu His Trp Leu Leu
 115 120 125
 Tyr Trp Gly Gln Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 130 135 140
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
 145 150 155 160
 Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 165 170 175
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 180 185 190
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 195 200 205
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn
 210 215 220
 Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser
 225 230 235 240
 Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly
 245 250 255
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 260 265 270
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln
 275 280 285
 Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 290 295 300
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile
 340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 355 360 365
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 385 390 395 400
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 405 410 415
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val
 420 425 430
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 435 440 445
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 450 455 460
 Leu Gly Lys *
 465

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 9:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

5

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

10

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

15

- (A) ORGANISMUS: Homo sapiens

(viii) POZICE V GENOMU:

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

20

(ix) ZNAKY:

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

25

(ix) ZNAKY:

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

30

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

ATG AAA CAC CTG TGG TTC TTC CTC CTC CTG GTG GCA GCC CCC AGA TGG 48
 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15

GTC TTG TCC CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG 96
 Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
 20 25 30

CCT TCG GAG ACC CTG TCC CTC ACC TGC AGT GTC TCT GGT GGC TCC ATC 144
 Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ser Gly Gly Ser Ile
 35 40 45

AGC GGT GAC TAT TAT TGG TTC TGG ATC CGC CAG TCC CCA GGG AAG GGA 192
 Ser Gly Asp Tyr Tyr Trp Phe Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly
 50 55 60

CTG GAG TGG ATC GGC TAC ATC TAT GGC AGT GGT GGG GGC ACC AAT TAC 240
 Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Gly Ser Gly Gly Gly Thr Asn Tyr
 65 70 75 80

AAT CCC TCC CTC AAC AAT CGA GTC TCC ATT TCA ATA GAC ACG TCC AAG 288
 Asn Pro Ser Leu Asn Asn Arg Val Ser Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys
 85 90 95

AAC CTC TTC TCC CTG AAA CTG AGG TCT GTG ACC GCC GCG GAC ACG GCC 336
 Asn Leu Phe Ser Leu Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
 100 105 110

GTC TAT TAC TGT GCG AGT AAT ATA TTG AAA TAT CTT CAC TGG TTA TTA 384
 Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Asn Ile Leu Lys Tyr Leu His Trp Leu Leu
 115 120 125

TAC TGG GGC CAG GGA GTC CTG GTC ACC GTC TCC TCA GCT AGC ACC AAG 432
 Tyr Trp Gly Gln Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 130 135 140

GGG CCA TCC GTC TTC CCC CTG GCG CCC TGC TCC AGG AGC ACC TCC GAG 480
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
 145 150 155 160

AGC ACA GCC GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCG 528
 Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 165 170 175

GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC AGC GGC GTG CAC ACC 576
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 180 185 190

TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC AGC AGC GTG 624
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 195 200 205

GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACG AAG ACC TAC ACC TGC AAC 672
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn
 210 215 220

GTA	GAT	CAC	AAG	CCC	AGC	AAC	ACC	AAG	GTG	GAC	AAG	AGA	GTT	GAG	TCC	720
Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	
225					230				235					240		
AAA	TAT	GGT	CCC	CCA	TGC	CCA	TCA	TGC	CCA	GCA	CCT	GAG	TTC	GAG	GGG	768
Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Ser	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	Gly	
			245						250					255		
GGA	CCA	TCA	GTC	TTC	CTG	TTC	CCC	CCA	AAA	CCC	AAG	GAC	ACT	CTC	ATG	816
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	
			260					265					270			
ATC	TCC	CGG	ACC	CCT	GAG	GTC	ACG	TGC	GTG	GTG	GTG	GAC	GTG	AGC	CAG	864
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	
		275					280					285				
GAA	GAC	CCC	GAG	GTC	CAG	TTC	AAC	TGG	TAC	GTG	GAT	GGC	GTG	GAG	GTG	912
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	
	290				295						300					
CAT	AAT	GCC	AAG	ACA	AAG	CCG	CGG	GAG	GAG	CAG	TTC	AAC	AGC	ACG	TAC	960
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	
305					310					315					320	
CGT	GTG	GTC	AGC	GTC	CTC	ACC	GTC	CTG	CAC	CAG	GAC	TGG	CTG	AAC	GGC	1008
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	
				325					330					335		
AAG	GAG	TAC	AAG	TGC	AAG	GTC	TCC	AAC	AAA	GGC	CTC	CCG	TCC	TCC	ATC	1056
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	
			340					345					350			
GAG	AAA	ACC	ATC	TCC	AAA	GCC	AAA	GGG	CAG	CCC	CGA	GAG	CCA	CAG	GTG	1104
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	
		355					360					365				
TAC	ACC	CTG	CCC	CCA	TCC	CAG	GAG	GAG	ATG	ACC	AAG	AAC	CAG	GTC	AGC	1152
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	
	370					375					380					
CTG	ACC	TGC	CTG	GTC	AAA	GGC	TTC	TAC	CCC	AGC	GAC	ATC	GCC	GTG	GAG	1200
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	
385					390					395				400		
TGG	GAG	AGC	AAT	GGG	CAG	CCG	GAG	AAC	AAC	TAC	AAG	ACC	ACG	CCT	CCC	1248
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	
			405						410					415		
GTG	CTG	GAC	TCC	GAC	GGC	TCC	TTC	TTC	CTC	TAC	AGC	AGG	CTA	ACC	GTG	1296
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	
			420					425					430			
GAC	AAG	AGC	AGG	TGG	CAG	GAG	GGG	AAT	GTC	TTC	TCA	TGC	TCC	GTG	ATG	1344
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	
		435					440					445				
CAT	GAG	GCT	CTG	CAC	AAC	CAC	TAC	ACA	CAG	AAG	AGC	CTC	TCC	CTG	TCT	1392
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	
	450					455					460					
CTG	GGT	AAA	TGA													1404
Leu	Gly	Lys	*													
465																

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 10:

(i) **CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:**

5

(A) DÉLKA: 468 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(D) TOPOLOGIE: lineární

10

(ii) TYP MOLEKULY: protein

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

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

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

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 11:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

10 (ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

- 15 (A) ORGANISMUS: Homo sapiens

(viii) POZICE V GENOMU:

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

20 (ix) ZNAKY:

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

25 (ix) ZNAKY:

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

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

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

GTC	TAT	TAC	TGT	GCG	AGT	AAT	ATA	TTG	AAA	TAT	CTT	CAC	TGG	TTA	TTA	384
Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ser	Asn	Ile	Leu	Lys	Tyr	Leu	His	Trp	Leu	Leu	
		115					120					125				
TAC	TGG	GGC	CAG	GGA	GTC	CTG	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA	GCT	AGC	ACC	AAG	432
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Val	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	
	130					135				140						
GGG	CCA	TCC	GTC	TTC	CCC	CTG	GCG	CCC	TGC	TCC	AGG	AGC	ACC	TCC	GAG	430
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	
145					150				155						160	
AGC	ACA	GCC	GCC	CTG	GGC	TGC	CTG	GTC	AAG	GAC	TAC	TTC	CCC	GAA	CCG	528
Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	
				165				170					175			
GTG	ACG	GTG	TCG	TGG	AAC	TCA	GGC	GCC	CTG	ACC	AGC	GGC	GTG	CAC	ACC	576
Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	
		180					185					190				
TTC	CCG	GCT	GTC	CTA	CAG	TCC	TCA	GGA	CTC	TAC	TCC	CTC	AGC	AGC	GTG	624
Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	
	195					200					205					
GTG	ACC	GTG	CCC	TCC	AGC	AGC	TTG	GGC	ACG	AAG	ACC	TAC	ACC	TGC	AAC	672
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	
	210					215					220					
GTA	GAT	CAC	AAG	CCC	AGC	AAC	ACC	AAG	GTG	GAC	AAG	AGA	GTT	GAG	TCC	720
Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	
225					230				235						240	
AAA	TAT	GGT	CCC	CCA	TGC	CCA	CCA	TGC	CCA	GCA	CCT	GAG	TTC	GAG	GGG	768
Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	Gly	
			245					250					255			
GGA	CCA	TCA	GTC	TTC	CTG	TTC	CCC	CCA	AAA	CCC	AAG	GAC	ACT	CTC	ATG	816
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	
		260					265						270			
ATC	TCC	CGG	ACC	CCT	GAG	GTC	ACG	TGC	GTG	GTG	GTG	GAC	GTG	AGC	CAG	864
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	
	275					280						285				
GAA	GAC	CCC	GAG	GTC	CAG	TTC	AAC	TGG	TAC	GTG	GAT	GGC	GTG	GAG	GTG	912
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	
	290				295					300						
CAT	AAT	GCC	AAG	ACA	AAG	CCG	CGG	GAG	GAG	CAG	TTC	AAC	AGC	ACG	TAC	960
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	
305					310					315					320	
CGT	GTG	GTC	AGC	GTC	CTC	ACC	GTC	CTG	CAC	CAG	GAC	TGG	CTG	AAC	GGC	1008
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	
			325					330					335			

AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GGC CTC CCG TCC TCC ATC	1056
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile	
340 345 350	
GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAG CCA CAG GTG	1104
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val	
355 360 365	
TAC ACC CTG CCC CCA TCC CAG GAG GAG ATG ACC AAG AAC CAG GTC AGC	1152
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser	
370 375 380	
CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAC CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG	1200
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu	
385 390 395 400	
TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC	1248
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro	
405 410 415	
GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AGG CTA ACC GTG	1296
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val	
420 425 430	
GAC AAG AGC AGG TGG CAG GAG GGG AAT GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG	1344
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met	
435 440 445	
CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACA CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT	1392
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser	
450 455 460	
CTG GGT AAA TGA	1404
Leu Gly Lys *	
465	

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 12:

5 (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

10

(ii) TYP MOLEKULY: protein

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

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

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

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 13:

5 (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

15

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANISMUS: člověk nebo opice

20

(viii) POZICE V GENOMU:

(A) CHROMOZOM/SEGMENT: vedoucí sekvence VH1

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

ACTAAGTCGA CATGGACTGG ACCTGG

26

5

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 14:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

10

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

15

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

20

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANISMUS: člověk nebo opice

(viii) POZICE V GENOMU:

25

(A) CHROMOZOM/SEGMENT: vedoucí sekvence VH2

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

30

ACTAAGTCGA CATGGACATA CTTTGTTCCA C

31

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 15:

35

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 29 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

40

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

45

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANISMUS: člověk nebo opice

50

(viii) POZICE V GENOMU:

(A) CHROMOZOM/SEGMENT: vedoucí sekvence VH3

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

ACTAAGTCGA CATGGAGTTT GGGCTGAGC

29

5

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 16:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

10

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

15

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

20

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANISMUS: člověk nebo opice

(viii) POZICE V GENOMU:

25

(A) CHROMOZOM/SEGMENT: vedoucí sekvence VH4

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

30

ACTAAGTCGA CATGAAACAC CTGTGGTTCT T

31

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 17:

35 (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

40

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

45

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANISMUS: člověk nebo opice

50

(viii) POZICE V GENOMU:

(A) CHROMOZOM/SEGMENT: vedoucí sekvence VH5

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

ACTAAGTCGA CATGGGGTCA ACCGCCATCC T

31

5

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 18:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

10

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

15

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

20

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANISMUS: člověk nebo opice

(viii) POZICE V GENOMU:

25

(A) CHROMOZOM/SEGMENT: vedoucí sekvence VH6

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

30

ACTAAGTCGA CATGTCTGTC TCCTTCCTCA T

31

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 19:

35

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

40

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

45

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANISMUS: člověk nebo opice

50

(viii) POZICE V GENOMU:

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

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

GGCAGCAGCY ACGCGTGCCC ACTCCGAGGT

30

5

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 20:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

10

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

15

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

20

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANISMUS: člověk nebo opice

(viii) POZICE V GENOMU:

25

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

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

30

GACCGTCCCG ACGCGTGTYT TGTCCCAGGT

30

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 21:

35

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

40

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

45

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANISMUS: člověk nebo opice

50

(viii) POZICE V GENOMU:

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

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

5

GCTATTTTCACGCGTGTCCA GTGTGAG

27''''

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 22:

10

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

15

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

20

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANISMUS: člověk nebo opice

25

(viii) POZICE V GENOMU:

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

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

30

GCGGCTCCCA CGCGTGTCTT GTCCCAG

27

35 (2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 23:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

40

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

45

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

50

(A) ORGANISMUS: člověk nebo opice

(viii) POZICE V GENOMU:

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

55

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

GGCTGTTCTC ACGCGTGTCT GTGCCGAGGT

30

5

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 24:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

10

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

15

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

20

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANISMUS: člověk nebo opice

(viii) POZICE V GENOMU:

25

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

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

30

CAGGTGCAGC TGCTCGAGTC TGG

23

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 25:

35

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

40

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

45

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANISMUS: člověk nebo opice

50

(viii) POZICE V GENOMU:

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

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

CAGGTCAACT TACTCGAGTC TGG

23

5

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 26:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

10

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

15

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

20

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANISMUS: člověk nebo opice

(viii) POZICE V GENOMU:

25

(A) CHROMOZOM/SEGMENT: VH3b primer s místem XhoI

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

30

GAGGTGCAGC TGCTCGAGTC TGG

23

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 27:

35

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

40

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

45

(viii) POZICE V GENOMU:

(A) CHROMOZOM/SEGMENT: VH4 primer s místem XhoI

50

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

CAGGTGCAGC TGCTCGAGTC GGG

23

55

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 28:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

- (A) ORGANISMUS: člověk nebo opice

(viii) POZICE V GENOMU:

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

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

CAGGTACAGC TGCTCGAGTC AGG

23

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 29:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

- (A) ORGANISMUS: člověk nebo opice

(viii) POZICE V GENOMU:

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

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

GGCGGATGCG CTAGCTGAGG AGACGG

26

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 30:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

10 (ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

- 15 (A) ORGANISMUS: člověk nebo opice

(viii) POZICE V GENOMU:

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

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

25 **ATCACAGATC TCTCACCATG GTGTTGCAGA CCCAGGTC** 38

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 31:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

40 (viii) POZICE V GENOMU:

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

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

ATCACAGATC TCTCACCATG GRGWCCCCWG CKCAGCT 37

50

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 32:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

10 (ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

- 15 (A) ORGANISMUS: člověk nebo opice

(viii) POZICE V GENOMU:

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

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

25 **ATCACAGATC TCTCACCATG GACATGAGGG TCCCCGCTCA G** 41

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 33:

30 (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

40 (vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

- (A) ORGANISMUS: člověk nebo opice

45 (viii) POZICE V GENOMU:

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

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

50 **ATCACAGATC TCTCACCATG GACACVAGGG CCCCCACTCA G** 41

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 34:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

10 (ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

- 15 (A) ORGANISMUS: člověk nebo opice

(viii) POZICE V GENOMU:

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

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

25 **ATCACAGATC TCTCACCATG GCCTGGGCTC TGCTGCTCC** 39

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 35:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

40 (vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

- (A) ORGANISMUS: člověk nebo opice

45 (viii) POZICE V GENOMU:

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

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

50 **ATCACAGATC TCTCACCATG GCCTGGGCTC CACTACTTC** 39

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 36:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

10 (ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

- 15 (A) ORGANISMUS: člověk nebo opice

(viii) POZICE V GENOMU:

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

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

25 **ATCACAGATC TCTCACCATG ACCTGCTCCC CTCTCCTCC** 39

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 37:

30 (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

40 (vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANISMUS: člověk nebo opice

45 (viii) POZICE V GENOMU:

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

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

50 **ATCACAGATC TCTCACCATG GCCTGGACTC CTCTCTTTC** 39

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 38:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

10 (ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

- 15 (A) ORGANISMUS: člověk nebo opice

(viii) POZICE V GENOMU:

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

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

25 **ATCACAGATC TCTCACCATG ACTTGGACCC CACTCCTC** 38

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 39:

30 (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ano

40 (vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

- (A) ORGANISMUS: člověk nebo opice

45 (viii) POZICE V GENOMU:

- (A) CHROMOZOM/SEGMENT: primer pro lehký řetězec kappa s místy KpnI
 a BsiWI

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

CCGTTTGATT TCCAGCTTGG TACCTCCACC GAACGT 36

55

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 40:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

10 (ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ano

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

- 15 (A) ORGANISMUS: člověk nebo opice

(viii) POZICE V GENOMU:

- 20 (A) CHROMOZOM/SEGMENT: primer pro lehký řetězec kappa s místy KpnI
 a BsiWI

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

25

TGCAGCATCC GTACGTTTGA TTTCCAGCTT

30

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 41:

30

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

40 (iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ano

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

- (A) ORGANISMUS: člověk nebo opice

45

(viii) POZICE V GENOMU:

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

50

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

55

ACCTAGGACG GTAAGCTTGG TACCTCCGCC

30

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 42:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ano

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

- (A) ORGANISMUS: člověk nebo opice

(viii) POZICE V GENOMU:

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

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

ACCTAGGACG GTCASSTTGG TACCTCCGCC GAACAC

36

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 43:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ano

(vii) PŮVODNÍ ZDROJ:

- (A) ORGANISMUS: člověk nebo opice

(viii) POZICE V GENOMU:

- (A) CHROMOZOM/SEGMENT: primer pro lehký řetězec lambda s místy AvrII

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

CTTGGGCTGA CCTAGGACGG TCAGCCG

27

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 44:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 17 párů bází
 (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(viii) POZICE V GENOMU:

- (A) CHROMOZOM/SEGMENT: variabilní oblast VH1 těžkého řetězce

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

CCATGGACTG GACCTGG

17

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 45:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(viii) POZICE V GENOMU:

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

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

ATGGACATAC TTTGTTCCAC

20

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 46:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(viii) POZICE V GENOMU:

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

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

CCATGGAGTT TGGGCTGAGC

20

15

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 47:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

20

(A) DÉLKA: 20 párů bází

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) TYP VLÁKNA: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

25

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(viii) POZICE V GENOMU:

30

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

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

35

ATGAAACACC TGTGGTTCTT

20

40

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 48:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 20 párů bází

(B) TYP: nukleová kyselina

45

(C) TYP VLÁKNA: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

50

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(viii) POZICE V GENOMU:

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

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

5 **ATGGGGTCAA CCGCCATCCT** 20

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 49:

10 (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

20

(viii) POZICE V GENOMU:

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

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

ATGTCTGTCT CCTTCCTCAT 20

30

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 50:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- 35 (A) DÉLKA: 16 párů bází
 (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

40 (ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ano

(viii) POZICE V GENOMU:

45

(A) CHROMOZOM/SEGMENT: konstantní oblast těžkého řetězce IgM

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

50

TTGGGGCGGA TGCACT 16

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 51:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- 5 (A) DÉLKA: 17 párů bází
 (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

10 (ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ano

(viii) POZICE V GENOMU:

- 15 (A) CHROMOZOM/SEGMENT: konstantní oblast těžkého řetězce IgG1–4

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

20

GATGGGCCCT TGGTGGA

17

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 52:

25

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

35 (viii) POZICE V GENOMU:

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

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

40

GATGACCCAG TCTCCAKCCT C

21

45 (2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 53:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(viii) POZICE V GENOMU:

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

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

CTCAYTYRCT GCMCAGGGTC C

21

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 54:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 19 párů bází

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) TYP VLÁKNA: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ano

(viii) POZICE V GENOMU:

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

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

AAGACAGATG GTGCAGCCA

19

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 55:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 20 párů bází

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) TYP VLÁKNA: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ano

(viii) POZICE V GENOMU:

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

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

GGAACAGAGT GACCGAGGGG

20

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 56:

5 (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(viii) POZICE V GENOMU:

15

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

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

20

GGGGGGATCC TCATTACCC AGAGACAGGG

30

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 57:

25

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

35

(viii) POZICE V GENOMU:

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

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

40

GGGGGCTAGC ACCAAGGGCC CATCCGTCTT C

31

45 (2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 58:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

55

(viii) POZICE V GENOMU:

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

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

CCGGGAGATC ATGAGAGTGT CCTTGGGTTT TGGGGGGAAC AGGAAGACTG 50
ATGGTCCCCC CTCGA ACTCA GGTGCTGGGC ATGGTGGGCA TGGGGG 96

10 (2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 59:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

20 (ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(viii) POZICE V GENOMU:

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

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

TCCTCAGCTA GCACCAAGGG GCCATCC

27

30

PATENTOVÉ NÁROKY

35

1. Chimérická protilátka lidského izotypu gama 4 specifická k lidskému CD4, která obsahuje sekvence variabilních oblastí těžkého a lehkého řetězce protilátky opice Starého světa vytvořené proti lidskému CD4, a sekvence konstantních oblastí těžkého a lehkého řetězce lidského gama 4.

40

2. Chimérická protilátka podle nároku 1, kde sekvence konstantní domény lidského těžkého řetězce jsou vybrány z (1) nemodifikovaných konstantních domén lidského izotypu gama 4, (2) konstantních domén izotypu gama 4, které byly modifikovány mutagenezí tak, že mají sníženou vazbu komplementu, vazbu receptoru Fcγ1 a/nebo mají vyšší stabilitu, a (3) konstantních domén izotypu gama 4 mutovaných v pozici 236 substitucí kyseliny glutamové leucinem a/nebo v pozici 229 substitucí prolinu serinem.

45

3. Chimérická protilátka podle nároku 1, kde sekvence vázající antigen variabilního těžkého a lehkého řetězce jsou sekvence uvedené jako sekvence id. č. 2 a 4.

50

4. Chimérická protilátka podle nároku 1, která má jednu nebo více z následujících vlastností: ve srovnání s primatizovanou chimérickou anti-CD4 protilátkou obsahující lidské gama 1 domény (i) zcela postrádá nebo má alespoň sníženou vazebnou aktivitu receptoru Fc, (ii) projevuje sníženou nebo chybějící schopnost fixace komplementu, a (iii) projevuje odlišný farmakokinetický profil.

5. Chimérická protilátka podle nároku 1, která pozměňuje nebo reguluje imunitní funkce mající vztah k CD4 včetně navození anergie a apoptózy T buněk.
- 5 6. Chimérická protilátka lidského izotypu gama 4 specifická k lidskému CD4, která obsahuje sekvenci variabilní oblasti těžkého řetězce protilátky opice Starého světa vytvořené proti lidskému CD4 kódovanou DNA sekvencí na obr. 1, sekvenci variabilní oblasti lehkého řetězce protilátky opice Starého světa vytvořené proti lidskému CD4 obsažené v sekvenci id. č. 2, sekvenci konstantní oblasti těžkého řetězce lidského gama 4 kódovanou DNA obsaženou v DNA sekvencích na obr. 4, 5 a 6, a sekvenci konstantní oblasti lehkého řetězce gama 4 kódovanou DNA sekvencí na obr. 3.
- 10 7. Chimérická protilátka anti-CD4, která je vybrána ze skupiny sestávající z CE9γ4, CE9γ4λK, CE9γ4E a CE9γ4PE.
- 15 8. Rekombinantní DNA, která kóduje chimérickou protilátku podle nároku 1.
9. Rekombinantní DNA, která kóduje chimérickou protilátku podle nároku 2.
- 20 10. Rekombinantní DNA, která kóduje chimérickou protilátku podle nároku 3.
11. Rekombinantní DNA, která kóduje chimérickou protilátku podle nároku 4.
12. Rekombinantní DNA, která kóduje a zajišťuje expresi chimérické protilátky podle nároku 7.
- 25 13. Způsob produkce chimérické protilátky specifické k CD4 podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že zahrnuje krok exprese rekombinantní DNA podle nároku 8 v rekombinantní hostitelské buňce.
- 30 14. Způsob produkce chimérické protilátky specifické k CD4 podle nároku 2, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že zahrnuje krok exprese rekombinantní DNA podle nároku 9 v rekombinantní hostitelské buňce.
- 35 15. Způsob produkce chimérické protilátky specifické k CD4 podle nároku 3, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že zahrnuje krok exprese rekombinantní DNA podle nároku 10 v rekombinantní hostitelské buňce.
- 40 16. Způsob produkce chimérické protilátky specifické k CD4 podle nároku 4, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že zahrnuje krok exprese rekombinantní DNA podle nároku 11 v rekombinantní hostitelské buňce.
- 45 17. Způsob produkce chimérické protilátky specifické k CD4 podle nároku 6, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že zahrnuje krok exprese rekombinantní DNA podle nároku 12 v rekombinantní hostitelské buňce.
18. Chimérická protilátka podle nároku 1 pro použití jako léčivo k prevenci nebo léčení stavu majícího vztah k CD4.
19. Chimérická protilátka podle nároku 2 pro použití jako léčivo k prevenci nebo léčení stavu majícího vztah k CD4.
- 50 20. Chimérická protilátka podle nároku 3 pro použití jako léčivo k prevenci nebo léčení stavu majícího vztah k CD4.

21. Chimérická protilátka podle nároku 4 pro použití jako léčivo k prevenci nebo léčení stavu majícího vztah k CD4.
- 5 22. Chimérická protilátka podle nároku 7 pro použití jako léčivo k prevenci nebo léčení stavu majícího vztah k CD4.
23. Chimérická protilátka podle nároku 18, kde stav mající vztah k CD4 je autoimunitní porucha.
- 10 24. Chimérická protilátka podle nároku 19, kde stav mající vztah k CD4 je autoimunitní porucha.
25. Chimérická protilátka podle nároku 20, kde stav mající vztah k CD4 je autoimunitní porucha.
- 15 26. Chimérická protilátka podle nároku 21, kde stav mající vztah k CD4 je autoimunitní porucha.
27. Chimérická protilátka podle nároku 22 kde stav mající vztah k CD4 je autoimunitní porucha.
- 20 28. Chimérická protilátka podle nároku 23, kde autoimunitní porucha je revmatoidní artritida, zánětlivá střevní nemoc, psoriáza, diabetes mellitus závislý na inzulinu, systémový lupus erytematosus, cirhóza a sclerosis multiplex.
- 25 29. Chimérická protilátka podle nároku 24, kde autoimunitní porucha je revmatoidní artritida, zánětlivá střevní nemoc, psoriáza, diabetes mellitus závislý na inzulinu, systémový lupus erytematosus, cirhóza a sclerosis multiplex.
- 30 30. Chimérická protilátka podle nároku 25, kde autoimunitní porucha je revmatoidní artritida, zánětlivá střevní nemoc, psoriáza, diabetes mellitus závislý na inzulinu, systémový lupus erytematosus, cirhóza a sclerosis multiplex.
- 35 31. Chimérická protilátka podle nároku 26, kde autoimunitní porucha je revmatoidní artritida, zánětlivá střevní nemoc, psoriáza, diabetes mellitus závislý na inzulinu, systémový lupus erytematosus, cirhóza a sclerosis multiplex.
- 40 32. Chimérická protilátka podle nároku 27, kde autoimunitní porucha je revmatoidní artritida, zánětlivá střevní nemoc, psoriáza, diabetes mellitus závislý na inzulinu, systémový lupus erytematosus, cirhóza a sclerosis multiplex.
- 45 33. Chimérická protilátka podle nároku 18, kde stav je porucha jiné povahy než autoimunitní, vybraná ze skupiny sestávající z leukemie, lymfomu, reakce štěpu proti hostiteli, astmatu, transplantační rejekce a infekce HIV.
- 50 34. Chimérická protilátka podle nároku 19, kde stav je porucha jiné povahy než autoimunitní, vybraná ze skupiny sestávající z leukemie, lymfomu, reakce štěpu proti hostiteli, astmatu, transplantační rejekce a infekce HIV.
- 55 35. Chimérická protilátka podle nároku 20, kde stav je porucha jiné povahy než autoimunitní, vybraná ze skupiny sestávající z leukemie, lymfomu, reakce štěpu proti hostiteli, astmatu, transplantační rejekce a infekce HIV.
36. Chimérická protilátka podle nároku 21, kde stav je porucha jiné povahy než autoimunitní, vybraná ze skupiny sestávající z leukemie, lymfomu, reakce štěpu proti hostiteli, astmatu, transplantační rejekce a infekce HIV.

37. Chimérická protilátka podle nároku 22, kde stav je porucha jiné povahy než autoimunitní, vybraná ze skupiny sestávající z leukemie, lymfomu, reakce štěpu proti hostiteli, astmatu, transplantační rejekce a infekce HIV.

5

38. Chimérická protilátka podle nároku 18, kde stav je zprostředkován buňkami CD4⁺ nebo se jich týká.

10

32 výkresů

Obr. 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Obr. 2

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

M $\overline{A}$ W A L L L L G L L A H F T
ACC ATG GCC TGG GCT CTG CTG CTC CTC GGC CTC CTT GCT CAC TTT ACA

+1 10
D S A A S Y E L S Q P R S V S V
GAC TCT GCG GCC TCC TAT GAG TTG AGT CAG CCT CGC TCA GTG TCC GTG

20
S P G Q T A G F T C G G D N V G
TCC CCA GGA CAG ACG GCC GGG TTC ACC TGT GGG GGA GAC AAC GTT GGA

30 40
R K S V Q W Y Q Q K P P Q A P V
AGG AAA AGT GTA CAG TGG TAC CAG CAG AAG CCA CCG CAG GCC CCT GTG

50 60
L V I Y A D S E R P S G I P A R
CTG GTC ATC TAT GCT GAC AGC GAA CGG CCC TCA GGG ATC CCT GCG CGA

70
F S G S N S G N T A T L T I S G
TTC TCT GGC TCC AAC TCA GGG AAC ACC GCC ACC CTG ACC ATC AGC GGG

80 90
V E A G D E A D Y Y C Q V W D S
GTC GAG GCC GGG GAT GAG GCT GAC TAT TAC TGT CAG GTG TGG GAC AGT

100
T A D H W V F G G T R L T V L
ACT GCT GAT CAT TGG GTC TTC GGC GGA GGG ACC CGG CTG ACC GTC CTA

109
G
GGT

Obr. 3

Proteinová sekvence lehkého řetězce anti-cd4 L.

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

Met	Ala	Trp	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Ala	His	Phe	Thr	Asp	Ser	Ala	Ala
ATG	GCC	TGG	GCT	CTG	CTG	CTC	CTC	GGC	CTC	CTT	GCT	CAC	TTT	ACA	GAC	TCT	GCG	GCC
		9		18				27			36			45			54	
Ser	Tyr	Glu	Leu	Ser	Gln	Pro	Arg	Ser	Val	Ser	Val	Ser	Pro	Gly	Gln	Thr	Ala	Gly
TCC	TAT	GAG	TTG	AGT	CAG	CCT	CGC	TCA	GTG	TCC	GTG	TCC	CCA	GGA	CAG	ACG	GCC	GGG
		66			75			84			93			102			111	120
Cys	Gly	Gly	Asp	Asn	Val	Gly	Arg	Lys	Ser	Val	Gln	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Pro
TGT	GGG	GGA	GAC	AAC	GTT	GGA	AGG	AAA	AGT	GTA	CAG	TGG	TAC	CAG	CAG	AAG	CCA	CCG
		129			138			147			156			165			174	183
Pro	Val	Leu	Val	Ile	Tyr	Ala	Asp	Ser	Glu	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe
CCT	GTG	CTG	GTC	ATC	TAT	GCT	GAC	AGC	GAA	CGG	CCC	TCA	GGG	ATC	CCT	GCG	CGA	TTC
		192			201			210			219			228			237	246
Ser	Asn	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Val	Glu	Ala	Gly	Asp	Glu
TCC	AAC	TCA	GGG	AAC	ACC	GCC	ACC	CTG	ACC	ATC	AGC	GGG	GTC	GAG	GCC	GGG	GAT	GAG
		255			264			273			282			291			300	309
Tyr	Tyr	Cys	Gln	Val	Trp	Asp	Ser	Thr	Ala	Asp	His	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr
TAT	TAC	TGT	CAG	GTG	TGG	GAC	AGT	ACT	GCT	GAT	CAT	TGG	GTC	TTC	GGC	GGA	GGG	ACC
		318			327			336			345			354			363	372
Thr	Val	Leu	Gly	Gln	Pro	Lys	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Thr	Leu	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser
ACC	GTC	CTA	GGT	CAG	CCC	AAG	GCT	GCC	CCC	TCG	GTC	ACT	CTG	TTC	CCG	CCC	TCC	TCT
		381			390			399			408			417			426	435
Leu	Gln	Ala	Asn	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ile	Ser	Asp	Phe	Tyr	Pro	Gly	Ala
CTT	CAA	GCC	AAC	AAG	GCC	ACA	CTG	GTG	TGT	CTC	ATA	AGT	GAC	FTC	TAC	CCG	GGA	GCC
		444			453			462			471			480			489	498
Val	Ala	Trp	Lys	Ala	Asp	Ser	Ser	Pro	Val	Lys	Ala	Gly	Val	Glu	Thr	Thr	Thr	Pro
GTG	GCC	TGG	AAG	GCA	GAT	AGC	AGC	CCC	GTC	AAG	GCG	GGA	GTG	GAG	ACC	ACC	ACA	CCC
		507			516			525			534			543			552	561
Gln	Ser	Asn	Asn	Lys	Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ser	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Trp
CAA	AGC	AAC	AAC	AAG	TAC	GCG	GCC	AGC	AGC	TAC	CTG	AGC	CTG	ACG	CCT	GAG	CAG	TGG
		570			579			588			597			606			615	624
His	Arg	Ser	Tyr	Ser	Cys	Gln	Val	Thr	His	Glu	Gly	Ser	Thr	Val	Glu	Lys	Thr	Val
CAC	AGA	AGC	TAC	AGC	TGC	CAG	GTC	ACG	CAT	GAA	GGG	AGC	ACC	GTG	GAG	AAG	ACA	GTG
		633			642			651			660			669			678	687
Thr	Glu	Cys	Ser	TER														
ACA	GAA	TGT	TCA	TGA														

Obr. 4

Proteinová sekvence těžkého řetězce anti-cd4 G4.

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

Met	Lys	His	Leu	Trp	Phe	Phe	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	Ala	Pro	Arg	Trp	Val	Leu	Ser
ATG	AAA	CAC	CTG	TGG	TTC	TTC	CTC	CTC	CTG	GTG	GCA	GCC	CCC	AGA	TGG	GTC	TTC	TCC
		9			18			27		36			45			54		
Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu	Thr	Leu	Ser
CAG	GTG	CAG	CTG	CAG	GAG	TGG	GGC	CCA	GGA	CTG	GTG	AAG	CCT	TGG	GAG	ACC	CTG	TCC
		66			75			84		93			102			111		120
Cys	Ser	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Trp	Phe	Trp	Ile	Arg	Gln
TGC	AGT	GTC	TCT	GGT	GGC	TCC	ATC	ACC	GGT	GAC	TAT	TAT	TGG	TTC	TGG	ATC	CGC	CAG
		129			138			147		156			165			174		183
Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Tyr	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr
GGG	AAG	GGA	CTG	GAG	TGG	ATC	GGC	TAC	ATC	TAT	GGC	AGT	GGT	GGG	GGC	ACC	AAT	TAC
		192			201			210		219			228			237		246
Ser	Leu	Asn	Asn	Arg	Val	Ser	Ile	Ser	Ile	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Leu	Phe	Ser	Leu
TCC	CTC	AAC	AAT	CGA	GTC	TCC	ATT	TCA	ATA	GAC	ACG	TCC	AAG	AAC	CTC	TTC	TCC	CTG
		255			264			273		282			291			300		309
Arg	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ser	Asn	Ile	Leu	Lys
AGG	TCT	GTG	ACC	GCC	GCG	GAC	ACG	GCC	GTC	TAT	TAC	TGT	GCG	AGT	AAT	ATA	TTG	AAA
		318			327			336		345			354			363		372
His	Trp	Leu	Leu	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Val	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr
CAC	TGG	TTA	TTA	TAC	TGG	GGC	CAG	GGA	GTC	CTG	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA	GCT	AGC	ACC
		381			390			399		408			417			426		435
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala
CCA	TCC	GTC	TTC	CCC	CTG	GCG	CCC	TGC	TCC	AGG	AGC	ACC	TCC	GAG	AGC	ACA	GCC	GCC
		444			453			462		471			480			489		498
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala
TGC	CTG	GTC	AAG	GAC	TAC	TTC	CCC	GAA	CCG	GTG	ACG	GTG	TGG	TGG	AAC	TCA	GGC	GCC
		507			516			525		534			543			552		561
Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser
AGC	GGC	GTG	CAC	ACC	TTC	CCG	GCT	GTC	CTA	CAG	TCC	TCA	GGA	CTC	TAC	TCC	CTC	AGC
		570			579			588		597			606			615		624
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His
GTG	ACC	GTG	CCC	TCC	AGC	AGC	TTC	GGC	ACG	AAG	ACC	TAC	ACC	TGC	AAC	GTA	GAT	CAC
		633			642			651		660			669			678		687
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Ser

Obr. 4 (pokračování)

Proteinová sekvence těžkého řetězce anti-cd4 G4.

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

Obr. 5

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

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

Met	Lys	His	Leu	Trp	Phe	Phe	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	Ala	Pro	Arg	Trp	Val	Leu	Ser
ATG	AAA	CAC	CTG	TGG	TTC	TTC	CTC	CTC	CTG	GTG	GCA	GCC	CCC	AGA	TGG	GTC	TTC	TCC
		9			18			27			36		45			54		
Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu	Thr	Leu	Ser
CAG	GTG	CAG	CTG	CAG	GAG	TCC	GGC	CCA	GGA	CTG	GTG	AAG	CCT	TCG	GAG	ACC	CTG	TCC
		66			75			84		93			102			111		120
Cys	Ser	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Trp	Phe	Trp	Ile	Arg	Gln
TGC	AGT	GTC	TCT	GGT	GGC	TCC	ATC	AGC	GGT	GAC	TAT	TAT	TGG	TTC	TGG	ATC	CGC	CAG
		129			138			147		156			165			174		183
Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Tyr	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr
GGG	AAG	GGA	CTG	GAG	TGG	ATC	GGC	TAC	ATC	TAT	GGC	AGT	GGT	GGG	GGC	ACC	AAT	TAC
		192			201			210		219			228			237		246
Ser	Leu	Asn	Asn	Arg	Val	Ser	Ile	Ser	Ile	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Leu	Phe	Ser	Leu
TCC	CTC	AAC	AAT	CGA	GTC	TCC	ATT	TCA	ATA	GAC	ACG	TCC	AAG	AAC	CTC	TTC	TCC	CTG
		255			264			273		282			291			300		309
Arg	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ser	Asn	Ile	Leu	Lys
AGG	TCT	GTG	ACC	GCC	GCG	GAC	ACG	GCC	GTC	TAT	TAC	TGT	GCG	AGT	AAT	ATA	TTG	AAA
		318			327			336		345			354			363		372
His	Trp	Leu	Leu	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Val	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr
CAC	TGG	TTA	TTA	TAC	TGG	GGC	CAG	GGA	GTC	CTG	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA	GCT	AGC	ACC
		381			390			399		408			417			426		435
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala
CCA	TCC	GTC	TTC	CCC	CTG	GCG	CCC	TGC	TCC	AGG	AGC	ACC	TCC	GAG	AGC	ACA	GCC	GCC
		444			453			462		471			480			489		498
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala
TGC	CTG	GTC	AAG	GAC	TAC	TTC	CCC	GAA	CCG	GTG	ACG	GTG	TCG	TGG	AAC	TCA	GGC	GCC
		507			516			525		534			543			552		561
Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser
AGC	GGC	GTG	CAC	ACC	TTC	CCG	GCT	GTC	CTA	CAG	TCC	TCA	GGA	CTC	TAC	TCC	CTC	AGC
		570			579			588		597			606			615		624
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His
GTG	ACC	GTG	CCC	TCC	AGC	AGC	TTG	GGC	ACG	AAG	ACC	TAC	ACC	TGC	AAC	GTA	GAT	CAC
		633			642			651		660			669			678		687
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Ser

Obr. 5 (pokračování)

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

AGC AAC ACC AAG GTG GAC AAG AGA GTT GAG TCC AAA TAT GGT CCC CCA TGC CCA TCA TGC CCA	596	705	714	723	732	741	750
Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu	GCA CCT GAG TTC GAG GGG GGA CCA TCA GTC TTC CTG TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACT CTC	759	768	777	786	795	804 813
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu	ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACG TGC GTG GTG GAC GTG AGC CAG GAA GAC CCC GAG	822	831	840	849	858	867 876
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu	GTC CAG TTC AAC TGG TAC GTG GAT GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG	885	894	903	912	921	930 939
Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu	GAG CAG TTC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG	948	957	966	975	984	993 1002
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr	AAC GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GGC CTC CCG TCC TCC ATC GAG AAA ACC	1011	1020	1029	1038	1047	1056 1065
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu	ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAG CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CAG GAG	1074	1083	1092	1101	1110	1119 1128
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile	GAG ATG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAC CCC AGC GAC ATC	1137	1146	1155	1164	1173	1182 1191
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu	GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG	1200	1209	1218	1227	1236	1245 1254
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu	GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AGG CTA ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG GAG	1263	1272	1281	1290	1299	1308 1317
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser	GGG AAT GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACA CAG AAG AGC	1326	1335	1344	1353	1362	1371 1380
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys TER	CTC TCC CTG TCT CTG GGT AAA TGA	1389	1398				

Obr. 6

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

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

Met	Lys	His	Leu	Trp	Phe	Phe	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	Ala	Pro	Arg	Trp	Val	Leu	Ser
ATG	AAA	CAC	CTG	TGG	TTC	TTC	CTC	CTC	CTG	GTG	GCA	GCC	CCC	AGA	TGG	GTC	TTG	TCC
		9			18			27		36			45			54		
Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu	Thr	Leu	Ser
CAG	GTG	CAG	CTG	CAG	GAG	TCG	GGC	CCA	GGA	CTG	GTG	AAG	CCT	TCG	GAG	ACC	CTG	TCC
	66			75			84			93			102			111		120
Cys	Ser	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Trp	Phe	Trp	Ile	Arg	Gln
TGC	AGT	GTC	TCT	GGT	GGC	TCC	ATC	AGC	GGT	GAC	TAT	TAT	TGG	TTC	TGG	ATC	CGC	CAG
	129			138			147			156			165			174		183
Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Tyr	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr
GGG	AAG	GGA	CTG	GAG	TGG	ATC	GGC	TAC	ATC	TAT	GGC	AGT	GGT	GGG	GGC	ACC	AAT	TAC
	192			201			210			219			228			237		246
Ser	Leu	Asn	Asn	Arg	Val	Ser	Ile	Ser	Ile	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Leu	Phe	Ser	Leu
TCC	CTC	AAC	AAT	CGA	GTC	TCC	ATT	TCA	ATA	GAC	ACG	TCC	AAG	AAC	CTC	TTC	TCC	CTG
	255			264			273			282			291			300		309
Arg	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ser	Asn	Ile	Leu	Lys
AGG	TCT	GTG	ACC	GCC	GCG	GAC	ACG	GCC	GTC	TAT	TAC	TGT	GCG	AGT	AAT	ATA	TTG	AAA
	318			327			336			345			354			363		372
His	Trp	Leu	Leu	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Val	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr
CAC	TGG	TTA	TTA	TAC	TGG	GGC	CAG	GGA	GTC	CTG	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA	GCT	AGC	ACC
	381			390			399			408			417			426		435
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala
CCA	TCC	GTC	TTC	CCC	CTG	GCG	CCC	TGC	TCC	AGG	AGC	ACC	TCC	GAG	AGC	ACA	GCC	GCC
	444			453			462			471			480			489		498
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala
TGC	CTG	GTC	AAG	GAC	TAC	TTC	CCC	GAA	CCG	GTG	ACG	GTG	TCG	TGG	AAC	TCA	GGC	GCC
	507			516			525			534			543			552		561
Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser
AGC	GGC	GTG	CAC	ACC	TTC	CCG	GCT	GTC	CTA	CAG	TCC	TCA	GGA	CTC	TAC	TCC	CTC	AGC
	570			579			588			597			606			615		624
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His
GTG	ACC	GTG	CCC	TCC	AGC	AGC	TTG	GGC	ACG	AAG	ACC	TAC	ACC	TGC	AAC	GTA	GAT	CAC
	633			642			651			660			669			678		687
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro

Obr. 6 (pokračování)

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

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

Obr. 7 - 1

Oligonukleotidové primery pro amplifikaci těžkého řetězce variabilních úseků opičího imunoglobulinu

5'souhlasné („sense“) primery

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

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

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

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

Obr. 7 - 1 (pokračování)

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

V _H 1,3a,5	⁺¹ CAGGTGCAGCTGCTCGAGTCTGG
V _H 2	⁺¹ CAGGTCAACTTACTCGAGTCTGG
V _H 3b	⁺¹ GAGGTGCAGCTGCTCGAGTCTGG
V _H 4	⁺¹ CAGGTGCAGCTGCTCGAGTCGGG
V _H 6	⁺¹ CAGGTACAGCTGCTCGAGTCAGG

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

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

	⁺¹¹⁸		⁺¹¹⁰
IgG ₁₋₄	5' GGC GGA TGC GCT AGC TGA GGA GAC GG 3'		
		Nhe I	

Obr. 7 - 2

Oligonukleotidové primery pro amplifikaci variabilních oblastí lehkých řetězců opičího imunoglobulinu

5'souhlasné („sense“) primery

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

5'ATCACAGATCTCTCACCATGGTGTTCAGACCCAGGTC 3'

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

5'ATCACAGATCTCTCACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAG 3'

5'ATCACAGATCTCTCACCATGGACAC(GAC)AGGGCCCCCACTCAG 3'

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

ATCACAGATCTCTCACCATGGCCTGGGCTCTGCTGCTCC 3'

ATCACAGATCTCTCACCATGGCCTGGGCTCCACTACTTC 3'

ATCACAGATCTCTCACCATGACCTGCTCCCCTCTCCTCC 3'

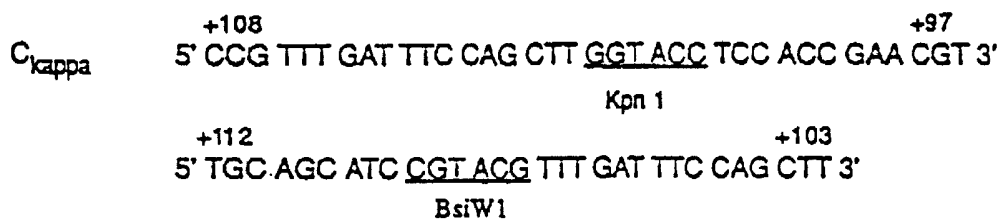
ATCACAGATCTCTCACCATGGCCTGGACTCCTCTCTTTC 3'

ATCACAGATCTCTCACCATGACTTGGACCCCACTCCTC 3'

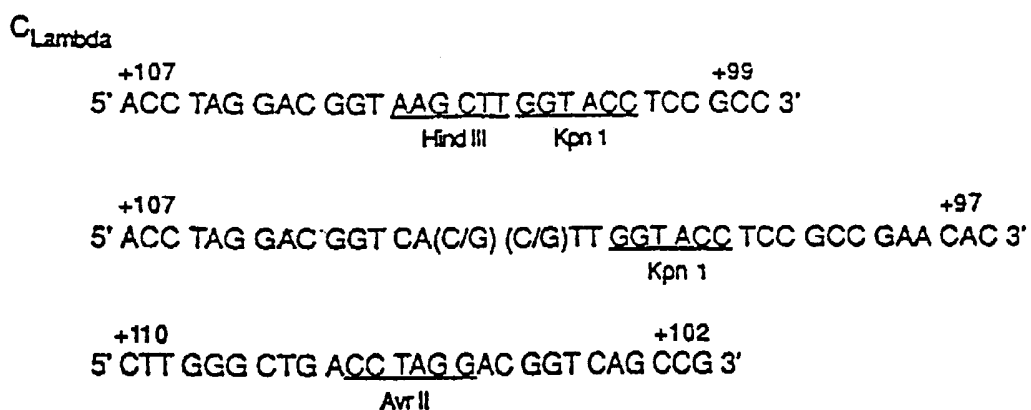
Obr. 7 - 2 (pokračování)

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

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



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



Obr. 8

A. Variabilní oblast těžkého řetězce

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

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

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

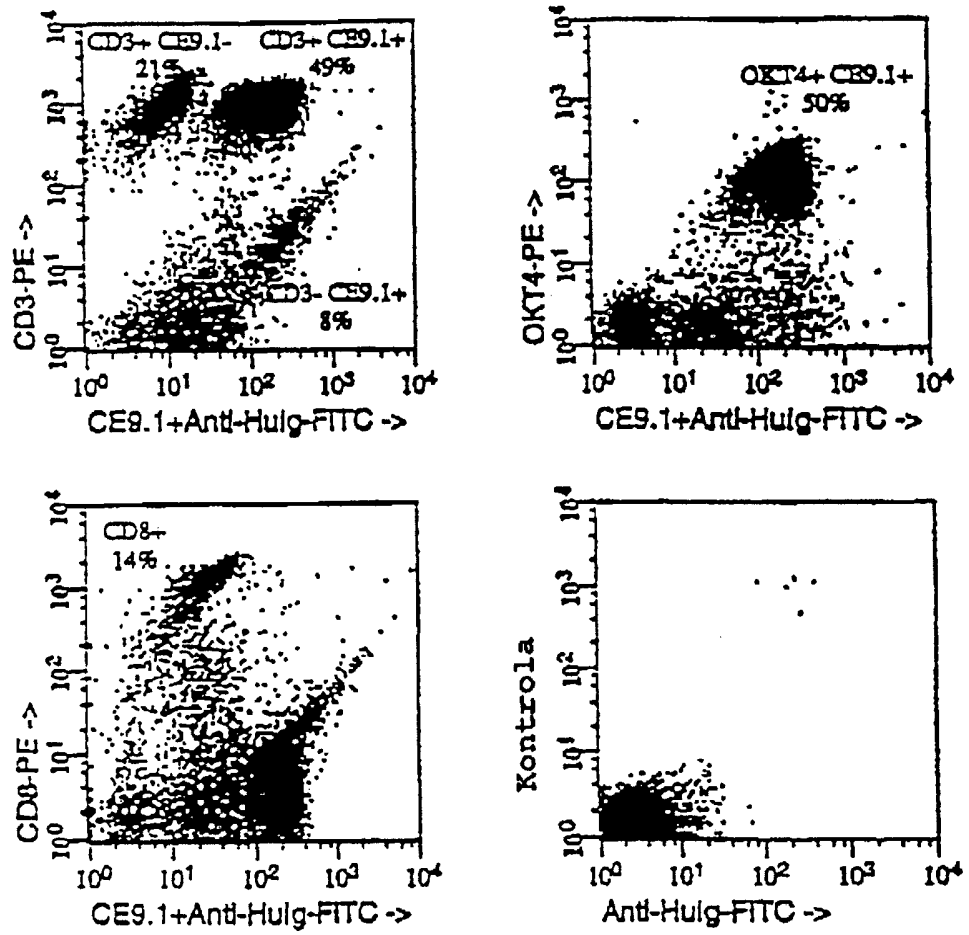
C. Variabilní oblast lehkého řetězce

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

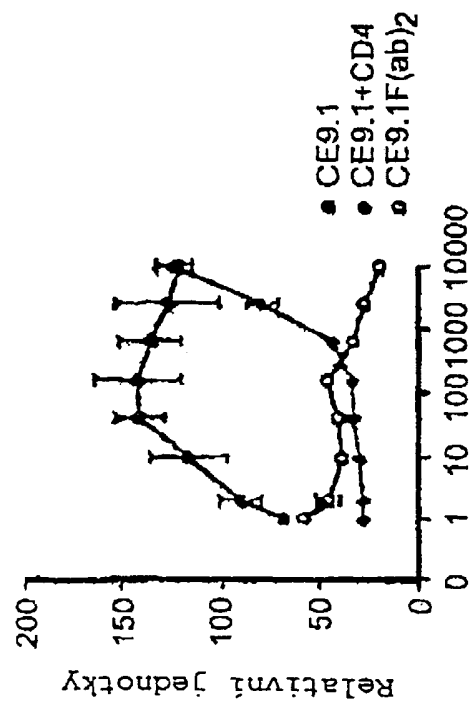
D. Konstantní oblast lehkého řetězce, vlákno opačné orientace („antisense“)

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

Obr. 9

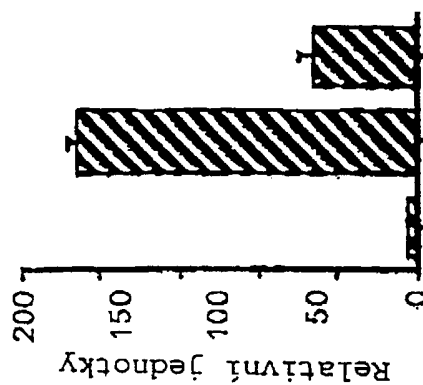


CE9.1 zprostředkovaná
vazba CD4⁺ buněk k monocytem
ošetřeným γ IFN a inhibice CD4



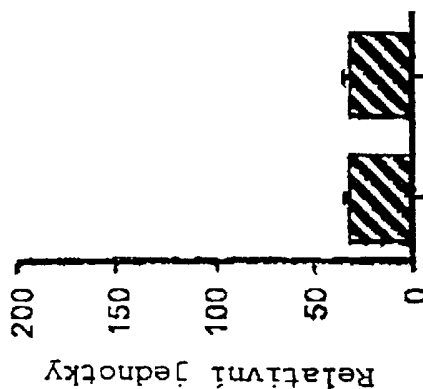
Obr. 10a

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



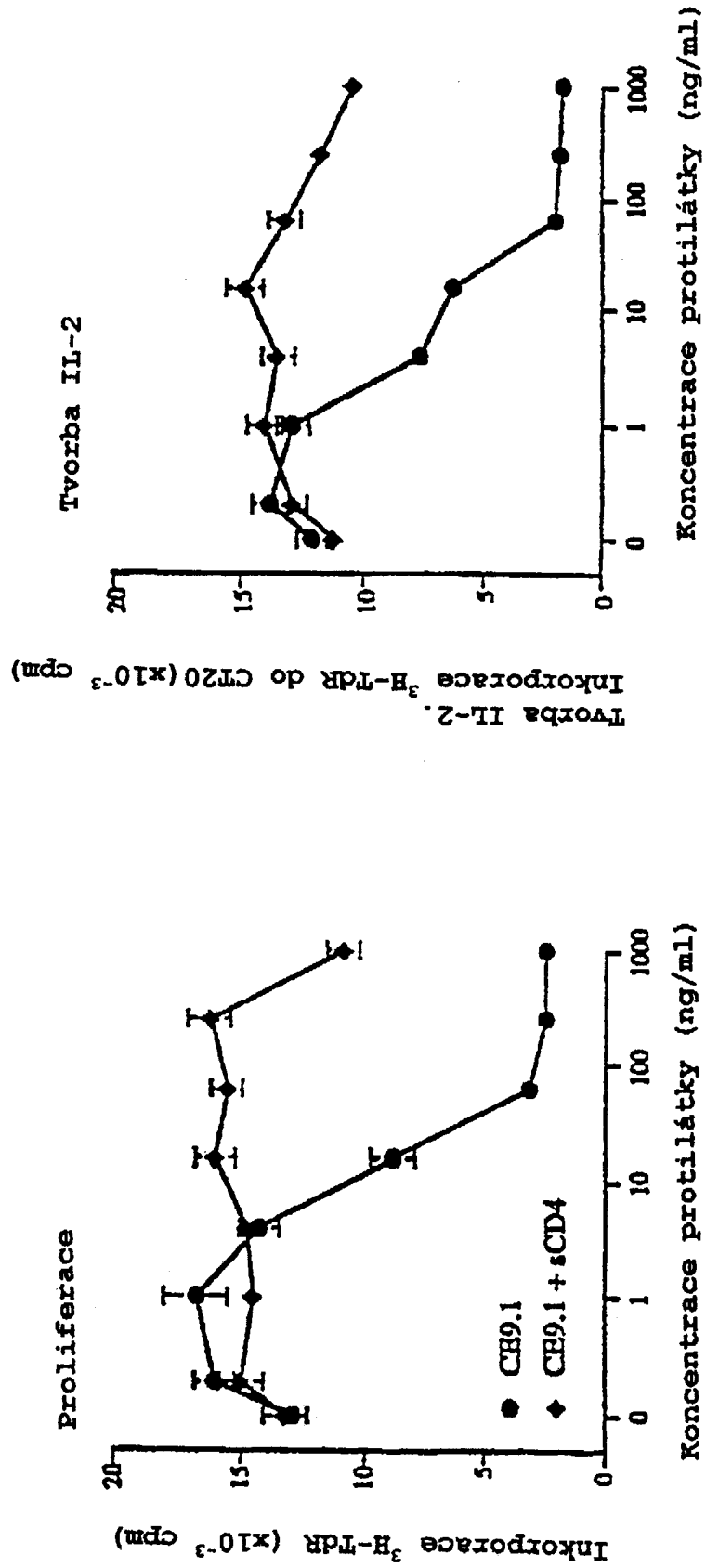
Obr. 10b

Vazba CD4⁺ buněk na
monocyty ošetřené γ IFN



Obr. 10c

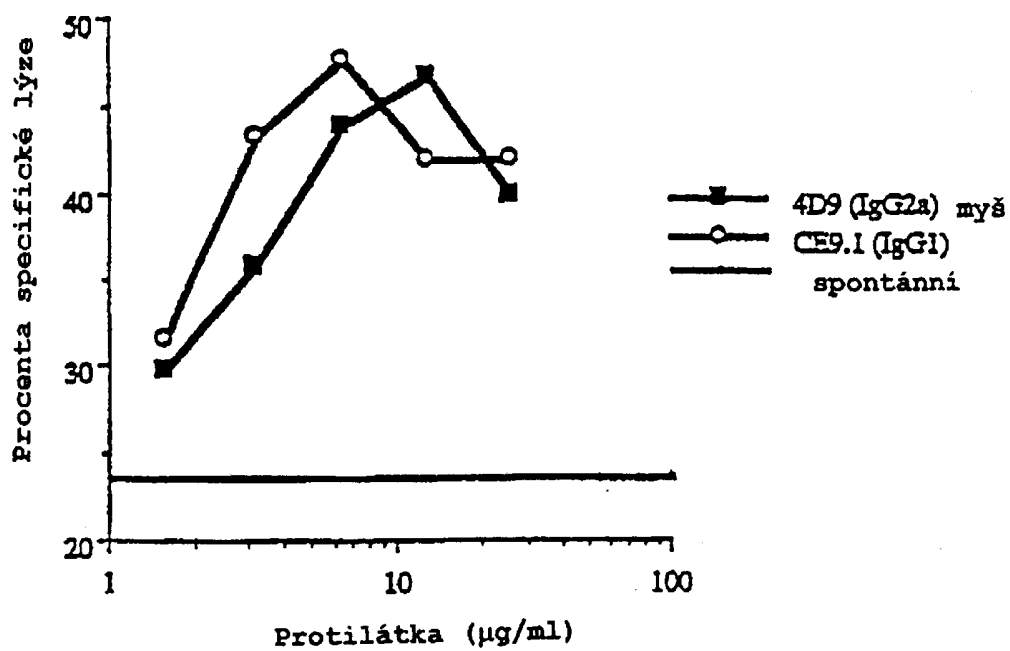
Vliv CE9.1 na proliferaci a IL-2 odpověď v primární MLR



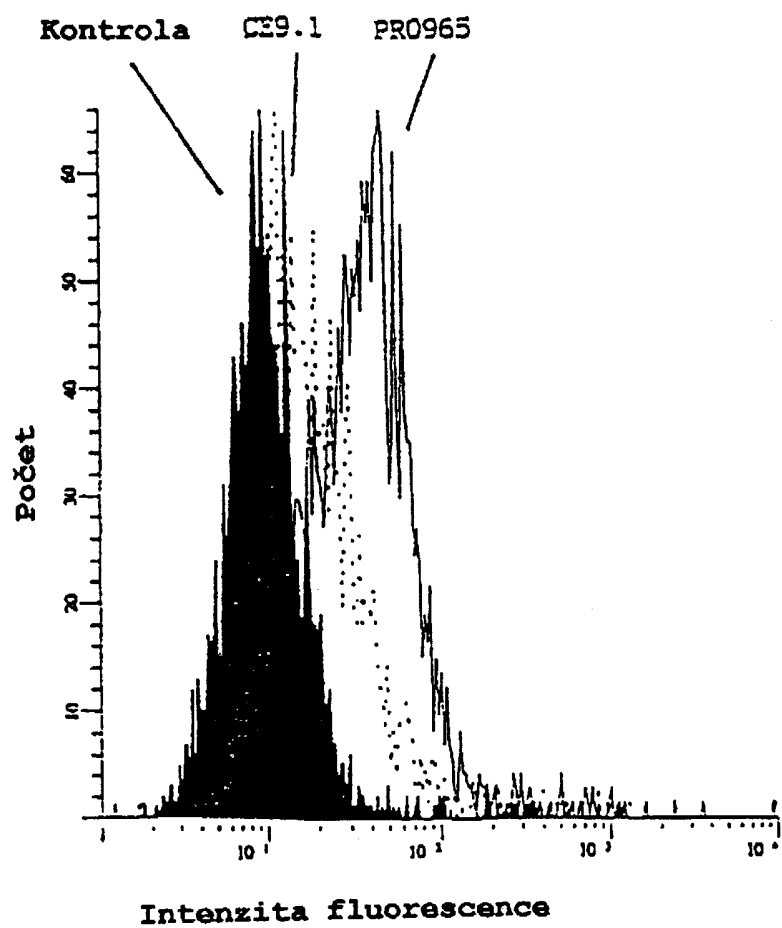
Obr. 11

Obr. 12

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



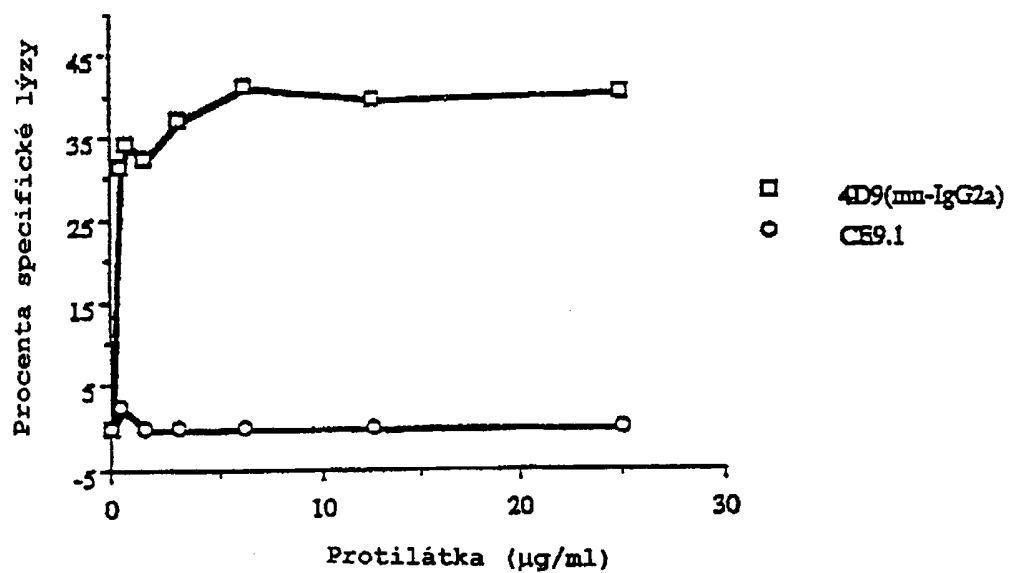
Obr. 13



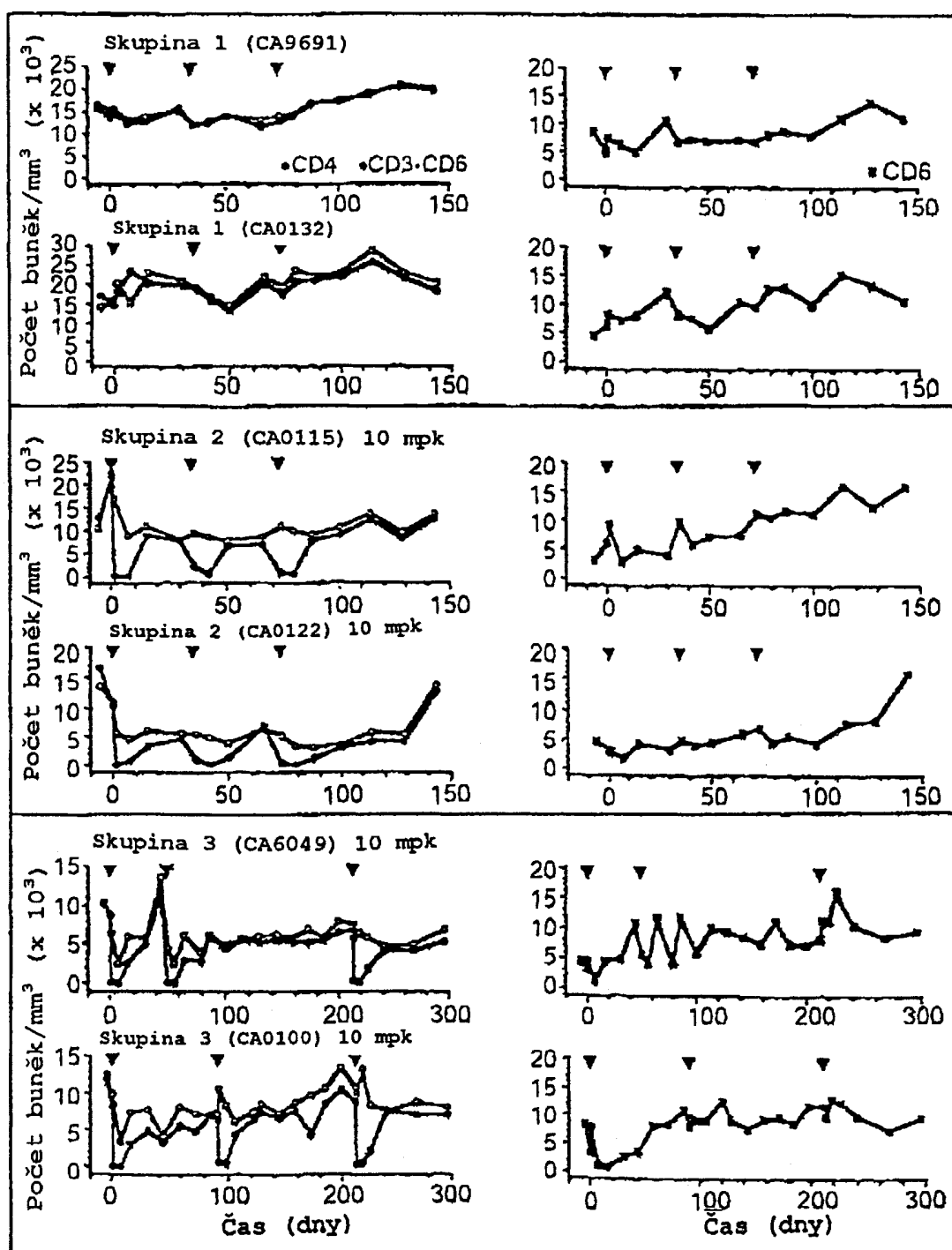
Vazba C1q k CE9.1 na buňky CD4+ Supt1

Obr. 14

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



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



Obr. 15

Obr. 16

PCR primery pro konstantní oblast lidského $\gamma 4$ ~~EXDEC 467 5' PCR Primer~~5' GGGG GGA TCC TCA TTT ACC CAG AGA CAG GG 3'
BamH I~~EXDEC 479 5' PCR Primer~~5' GGGG GCT AGC ACC AAG GGC CCA TCC GTC TTC 3'
Nhe IPCR mutageneze lidského $\gamma 4$ ~~EXDEC 698 5' PCR Primer~~5' CCG GGA GAT CAT GAG AGT GTC CTT GGG TTT TGG GGG GAA CAG GAA GAC
BspH ITGA TGG TCC CCC CTC GAA CTC AGG TGC TGG GCA TGG TGG GCA TGG GGG 3'
Glu Pro~~EXDEC 712 5' PCR Primer~~5' TCC TCA GCT AGC ACC AAG GGG CCA TCC 3'
Nhe I
ruši místo ApaI

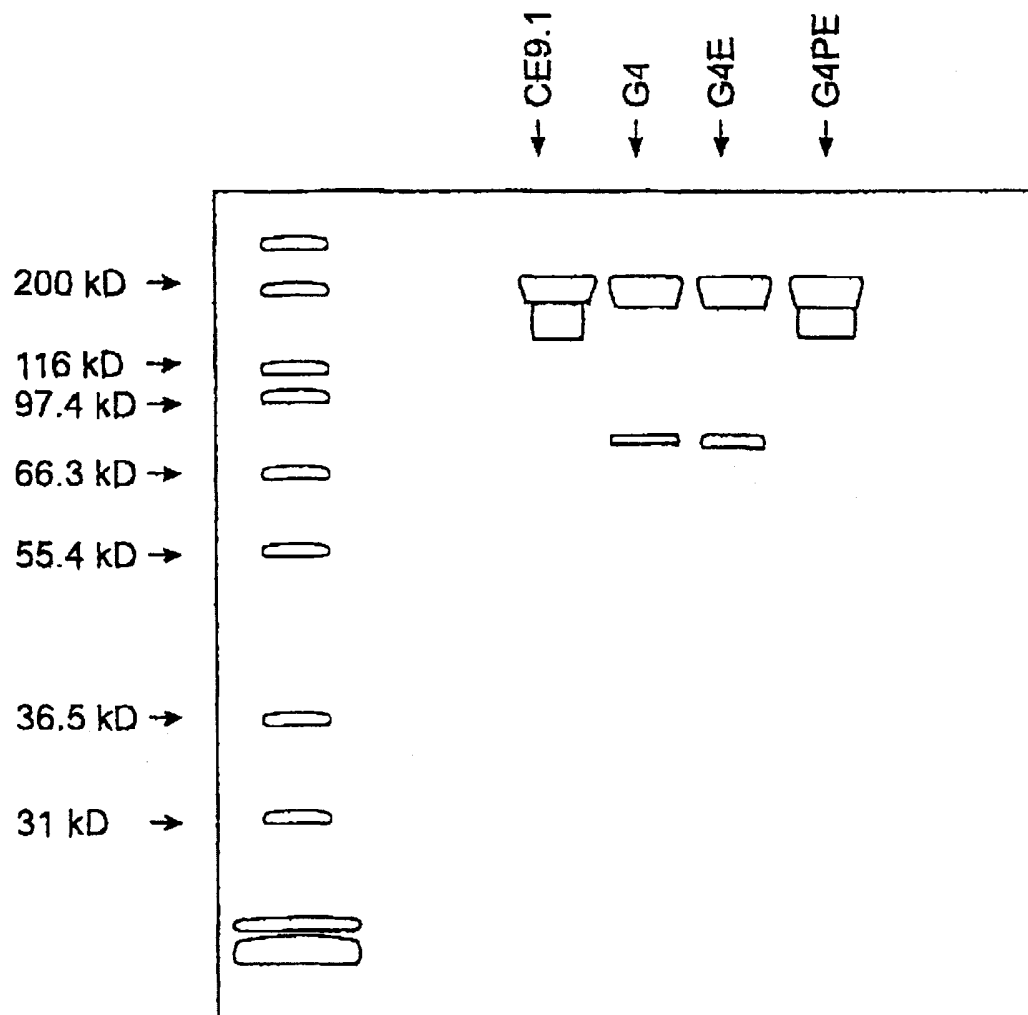
Obr. 17

Sekvence těžkého řetězce CD4 monoklonální protilátky SB
217969 (CE9γ4PE)

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

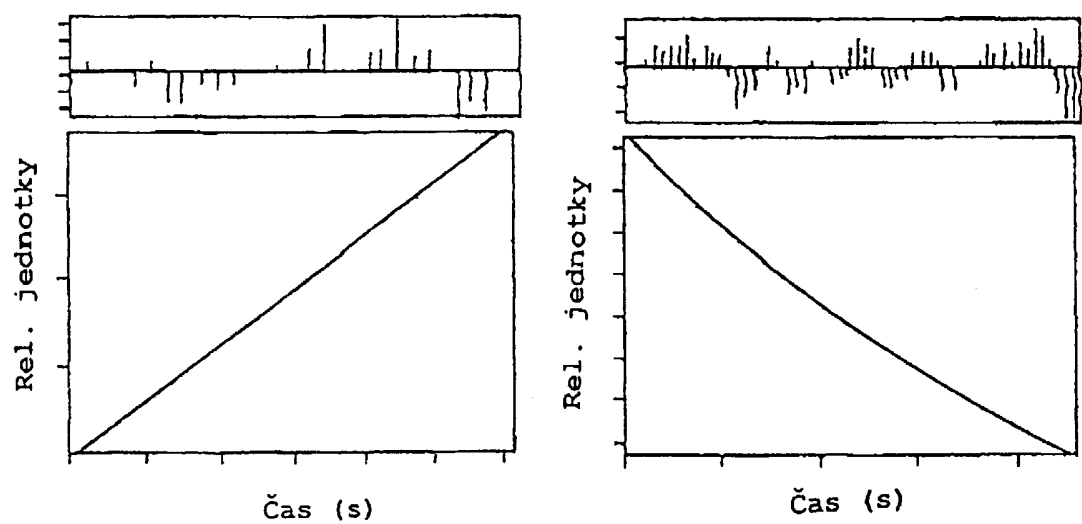
Obr. 17 (pokračování)

Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	
CCA	TCC	GAC	TTC	CCC	CTG	GGC	CCC	TGC	TCC	AGG	AGC	ACC	TCC	GAG	AGC	AC	
	444				453			462			471			480			
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly
TGC	CTG	GTC	AAG	GAC	TAC	TTC	CCC	GAA	CCG	GTC	ACC	GTC	TCC	TGG	AAC	TCA	GGC
	507				516			525			534			543		552	561
Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu
AGC	GGC	GTC	CAC	ACC	TTC	CCG	GCT	GTC	CTA	CAG	TCC	TCA	GGA	CTC	TAC	TCC	CTC
	570				579			588			597			606		615	624
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp
GTC	ACC	GTC	CCC	TCC	AGC	AGC	TTC	GGC	ACC	AAG	ACC	TAC	ACC	TGC	AAC	GTA	GAT
	633				642			651			660			669		678	
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro
AGC	AAC	ACC	AAG	GTC	GAC	AAG	AGA	GTC	GAG	TCC	AAA	TAT	GCT	CCC	CCA	TGC	CCA
	696				705			714			723			732		741	750
Ala	Pro	Glu	Phe	Gln	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys
GCA	CGT	GAG	TTC	GAG	GGG	GGA	CCA	TCA	GTC	TTC	CTG	TTC	CCC	CCA	AAA	CCC	AAG
	759				768			777			786			795		804	
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu
ATG	ATC	TCC	CGG	ACC	CTT	GAG	GTC	ACC	TGC	GTC	GTC	GAC	GTC	AGC	CAG	GAA	GAC
	822				831			840			849			858		867	876
Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys
GTC	CAG	TTC	AAC	TGG	TAC	GTC	GAT	GGC	GTC	GAG	GTC	CAT	AAT	GCC	AAG	ACA	AAG
	885				894			903			912			921		930	
Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln
GAG	CAG	TTC	AAC	AGC	ACC	TAC	CGT	GTC	GTC	AGC	GTC	CTC	ACC	GTC	CTG	CAC	CAG
	948				957			966			975			984		993	1002
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile
AAC	GGC	AAG	GAG	TAC	AAG	TGC	AAG	GTC	TCC	AAC	AAA	GGC	CTC	CCG	TCC	TCC	ATC
	1011				1020			1029			1038			1047		1056	1065
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro
ATC	TCC	AAA	GCC	AAA	GGG	CAG	CCG	CCA	GAG	CCA	CAG	GTC	TAC	ACC	CTG	CCG	CCA
	1074				1083			1092			1101			1110		1119	1128
Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro
GAG	ATG	ACC	AAG	AAC	CAG	GTC	AGC	CTG	ACC	TGC	CTG	GTC	AAA	GGC	TTC	TAC	CCC
	1137				1146			1155			1164			1173		1182	1191
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro
GCC	GTC	GAG	TGG	GAG	AGC	AAT	GGG	CAG	CCG	GAG	AAC	AAC	TAC	AAG	ACC	ACG	CCT
	1200				1209			1218			1227			1236		1245	1254
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg
GAC	TCC	GAC	GGC	TCC	TTC	TTC	CTC	TAC	AGC	AGG	CTA	ACC	GTC	GAC	AAG	AGC	AGG
	1263				1272			1281			1290			1299		1308	1317
Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
GGG	AAT	GTC	TTC	TCA	TGC	TCC	GTC	ATG	CAT	GAG	GCT	CTG	CAC	AAC	CAC	TAC	ACA
	1326				1335			1344			1353			1362		1371	1380
Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys	TER										
CTC	TCC	CTG	TCT	CTG	GCT	AAA	TGA										
	1389				1398												



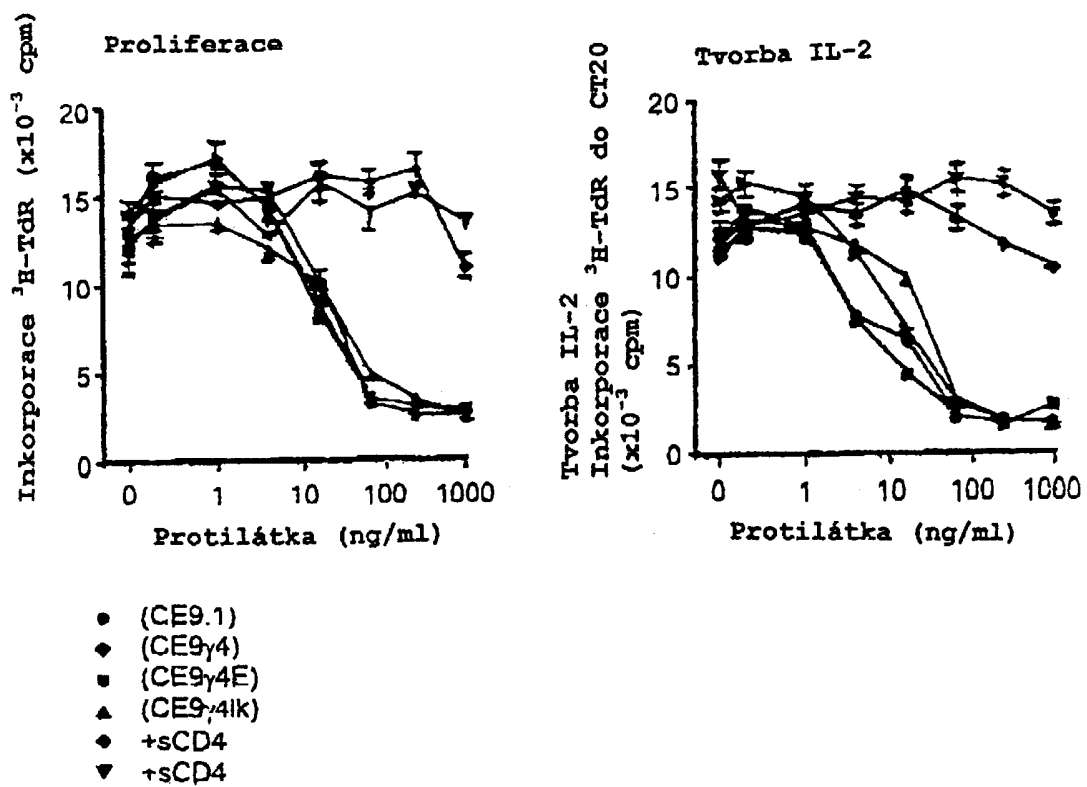
Obr. 18

Obr. 19



Asociační (vlevo) a disociační (vpravo) fáze SPR

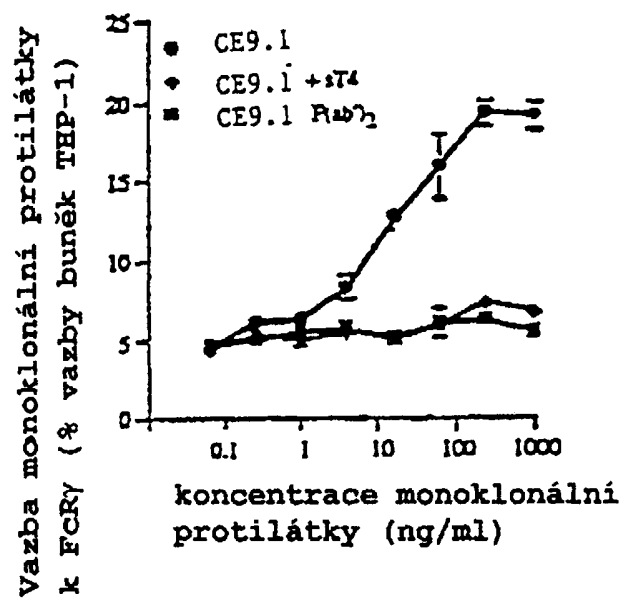
Obr. 20



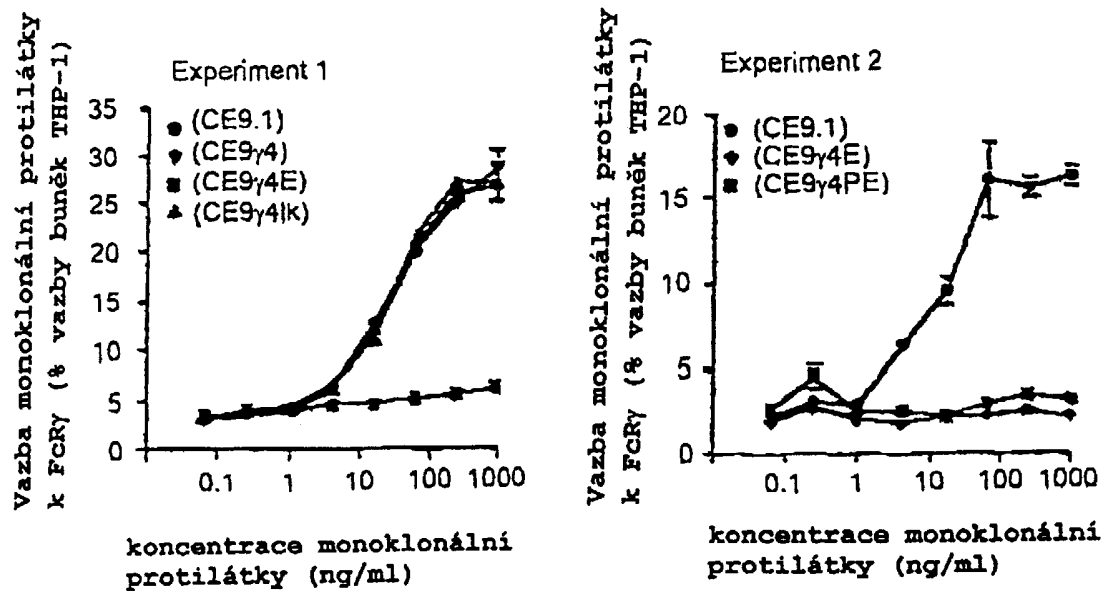
Vliv konstruktů monoklonálních protilátek CD4 na primární MLR

Obr. 21

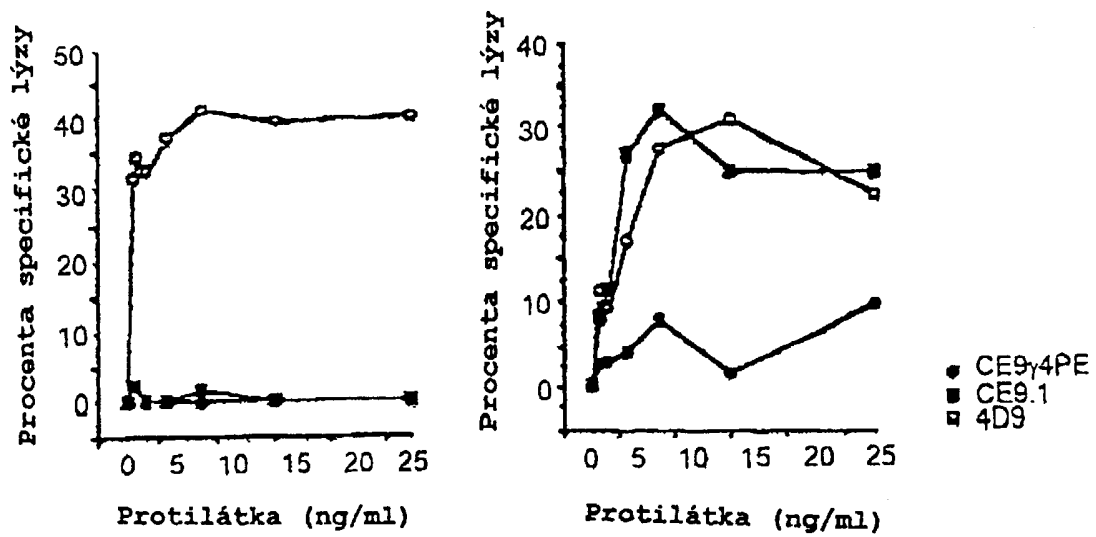
Vazba CE9.1 k FcR γ na buňkách THP-1
v testu mezibuněčné adheze
zprostředkované FcR γ -CD4



Obr. 22

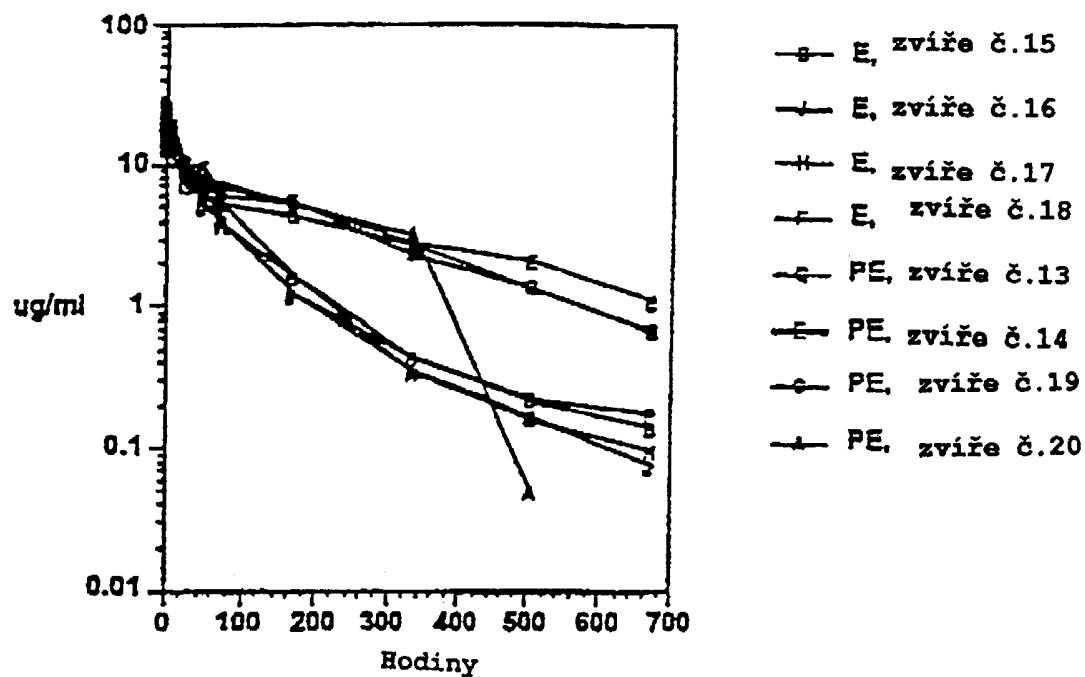


Vazba mutantních CE9γ k FcRγ na buňkách THP-1 v testu mezibuněčné adheze zprostředkované FcRγ-CD4



Obr. 23

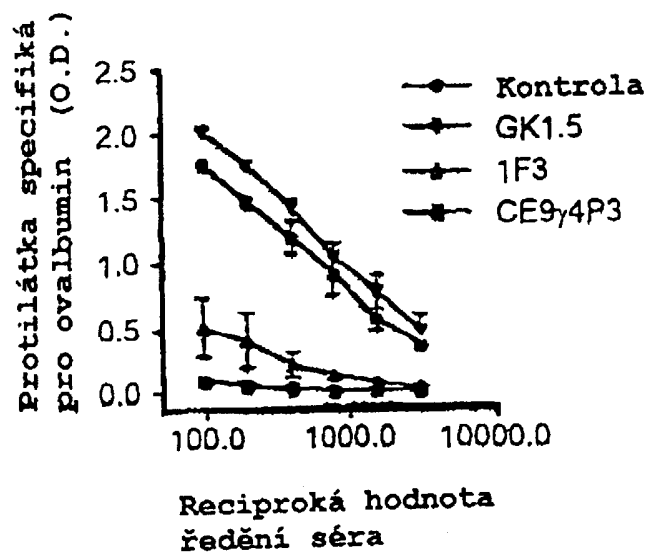
Obr. 24



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

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

Obr. 25



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

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