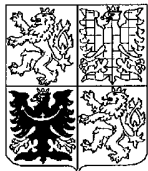


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **14.04.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **14.04.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/97106109**

(33) Země priority: **EP**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.04.2000**
(Věstník č. 4/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/EP98/02180**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO98/46645**

(21) Číslo dokumentu:

1999 - 3614

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 K 16/00

A 61 K 51/10

A 61 P 37/04

(71) Přihlašovatel:

MICROMET GESELLSCHAFT FÜR
BIOMEDIZINISCHE FORSCHUNG MBH,
Planegg-Martinsried, DE;

(72) Původce:

Kufer Peter, Moosburg, DE;
Raum Tobias, München, DE;

(74) Zástupce:

Čermák Karel Dr., Národní třída 32, Praha 1,
110 00;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Nový způsob přípravy antigenních receptorů a
jejich použití**

(57) Anotace:

Způsob přípravy anti-lidského antigenního receptoru, který je slabě imunogenní nebo není imunogenní pro člověka, kterýžto způsob obsahuje kroky selekce a kombinace funkčně přestavěných imunoglobulinových řetězců VH a VL, kde alespoň řetězec VH pochází ze zralých lidských lymfocytů B, které jsou v podstatě nesenzibilizované, nebo z lidských B buněk, které jsou v podstatě anergní, a řetězec VL pochází z repertoáru přirozeně se vyskytujících lidských B buněk, přičemž uvedené řetězce jsou exprimovány pomocí rekombinantního vektoru a používají in vitro prezentační systém pro vazbu k lidskému antigenu. Receptory, které jsou slabě imunogenní nebo nejsou imunogenní pro člověka a jsou namířeny proti lidským antigenům a jejich získání. Receptory jsou výhodně protilátky nebo jejich fragmenty nebo imunokonjugáty obsahující řetězce VH/VL zmíněné protilátky. Jsou popsány zejména receptory namířené proti lidským nádorovým antigenům, výhodně proti lidskému nádorového antigenu 17-1A, známému také jako EpCAM, EGP nebo GA 733-2. Diagnostické soupravy a farmaceutické přípravky, obsahující výše zmíněné receptory.

Nový způsob přípravy antigenních receptorů a jejich použití

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká způsobu produkce anti-lidského antigenního receptoru, který je málo imunogenní nebo není imunogenní pro člověka, kterýžto způsob obsahuje kroky selekce a kombinace funkčně přestavěných imunoglobulinových řetězců VH a VL, kde alespoň uvedený řetězec VH pochází ze zralých lidských lymfocytů B, které jsou v podstatě nesenzibilizované (naivní), nebo z lidských B buněk, které jsou v podstatě anergní, a zmíněný řetězec VL pochází z repertoáru přirozeně se vyskytujících lidských B buněk, přičemž uvedené řetězce jsou exprimovány pomocí rekombinantního vektoru a používají *in vitro* detekční (expoziční) systém na vazbu k lidskému antigenu.

Předkládaný vynález se dále týká receptorů, které jsou jen slabě imunogenní nebo nejsou imunogenní pro člověka a jsou namířeny proti lidským antigenům, přičemž uvedené receptory se dají získat způsobem podle vynálezu. Uvedené receptory jsou výhodně protilátky nebo jejich fragmenty nebo imunokonjugáty obsahující řetězce VH/VL zmíněné protilátky. Receptory podle vynálezu jsou namířeny zejména proti lidským nádorovým antigenům, výhodně proti lidskému nádorovému antigenu 17-1A, známému také jako EpCAM, EGP nebo GA 733-2. A nakonec se předkládaný vynález týká diagnostických souprav (kitů) použitelných pro provádění způsobu podle vynálezu.

Dosavadní stav techniky

Imunitní systémy savců, jako je lidský imunitní systém, rozpoznávají imunokompetentní buňky a molekuly, které jsou specifické pro autoantigeny. Porucha regulace imunitního systému z tohoto hlediska

může mít za následek autoimunitní nemoci, jako je revmatoidní artritida. Obecně je tudíž imunitní dohled vzhledem k autoreaktivním protilátkám nebo T buňkám vysoce prospěšný. Avšak může nastat případ, kdy je výhodné mít autoreaktivní protilátky, které jsou namířeny proti antigenům exprimovaným v savčím a zejména v lidském těle. Takové antigeny jsou například nádorové antigeny. Například bylo ukázáno, že lidský antigen 17-1A nebo EpCAM, povrchový glykoprotein exprimovaný buňkami jednoduchého epitelu a maligními nádory, které z něho vycházejí, je vhodný cíl pro monoklonální protilátku při léčbě rakoviny, zejména u pacientů s minimální reziduální nemocí, kteří mají diseminované nádorové buňky, které mohou později způsobit solidní metastázy, a tak zhoršit pacientovu prognózu. U pacientů s minimální reziduální kolorektální rakovinou snížila myší monoklonální protilátka specifická pro lidský antigen 17-1A pětiletou úmrtnost o 30 % ve srovnání s neléčenými pacienty při systémové aplikaci v pěti dávkách během čtyř měsíců po chirurgickém odstranění primárního nádoru, každý pacient byl léčen celkem 900 mg protilátky (Riethmüller, Lancet, 343, 1177-1183, 1994). Ale v průběhu léčby protilátkou se u pacientů vyvinula silná protilátková reakce proti myšimu imunoglobulinu. Tyto lidské proti-myší protilátky (HAMAs) silně omezují kontinuální podávání protilátkové léčby a stoupající měrou snižují její účinnost. Kromě toho předem vytvořené HAMAs indukované dřívější protilátkovou léčbou nebo jiným kontaktem s myším imunoglobulinem mohou vážně interferovat s pozdější léčbou protilátkou.

Aby se předešlo těmto problémům, jsou výhodnější léčebné protilátky minimálně imunogenní. Pro dosažení tohoto cíle se může například uvažovat o tom, že léčebné protilátky nebo jejich deriváty jsou kompletně lidské svou aminokyselinovou sekvencí a imunogenní profil lidské idiotypové protilátky se minimalizuje použitím variabilních oblastí lidských imunoglobulinů, u kterých je pravděpodobné, že budou tolerovány lidským imunitním systémem.

Ale příprava lidských protilátek proti lidským antigenům čelí dvěma hlavním problémům:

1) ukázalo se, že hybridom nebo jiné techniky buněčné immortalizace jsou zcela neúčinné pro vznik buněčných linií produkujících lidské protilátky ve srovnání s technologií myších hybridomů.

2) autoreaktivní protilátky jsou relativně účinně zbaveny repertoáru přirozeně se vyskytujících protilátek díky mechanismu zprostředkované autotolerance.

Lidské protilátky se všeobecně staly dostupnější díky použitelnosti transgenních myši exprimujících lidské protilátky (Brüggemann, Immunol. Today, 17, 391-397, 1996) a díky technikám kombinační protilátkové knihovny a fágové expozice (tj. technika "phage display" pro kterou není dosud ustálený český termín, umožňuje detekovat gen, např. cDNA, klonovaný do fága, "exponovaný" po expresi v bakteriích, např. pomocí protilátek, a pak izolovat klon exprimující požadovaný gen.), které umožňují *in vitro* kombinaci variabilních oblastí imunoglobulinových těžkých a lehkých řetězců (VH a VL) a *in vitro* selekci podle specifické vazby antigenu (Winter, Annu. Rev. Immunol., 2, 433-455, 1994). Použitím metody fágové expozice mohou být snadno izolovány vzácné jevy, jako je jedna specifická vazebná skupina z 10^7 až 10^9 různých párů VL/VH nebo VH/VL, což je obzvláště spolehlivé, když byl repertoár variabilních oblastí obohacen o specifické vazebné skupiny použitím B lymfocytů z imunizovaných hostitelů jako zdroje pro klonování repertoáru.

Avšak často je v repertoárech přirozeně se vyskytujících protilátek výskyt specifických vazebných skupin podstatně snížen. To je pravdivé zejména u případů protilátek vázajících se na autoantigeny. Náhodné kombinace oblastí VL a VH autotolerantního hostitele mající za následek kombinační protilátkové knihovny obvyklé velikosti (10^7 až 10^9 nezávislých klonů) často nejsou postačující pro úspěšnou *in vitro* selekci autoreaktivních protilátek metodou fágové expozice.

Jednou strategií, jak obejít tento problém, je použití velmi rozsáhlých kombinačních protilátkových knihoven, které svou velikostí kompenzují

malý výskyt autoreaktivních protilátek v přirozeně se vyskytujících repertoárech. Ale je obtížné získat kombinační protilátkové knihovny překračující velikost 10^9 nezávislých klonů díky současnému technickému limitu účinnosti transformace plazmidové DNA do buněk *E. coli*.

Aby se zabránilo systematické chybě vyvolané autotolerancí v repertoárech přirozeně se vyskytujících protilátek, kdy jsou autoreaktivní protilátky zachycovány ve snížené míře a významně se snižují šance na izolaci protilátek specificky rozpoznávajících autoantigeny, byly vyvinuty postupy používající semisyntetické nebo zcela syntetické repertoáry řetězců VH a/nebo VL. Například byl klonován téměř úplný repertoár nepřestavěných segmentů lidského V genu z genomové DNA a použit pro *in vitro* rekombinace funkčních genů variabilní oblasti, připomínající V-J- nebo V-D-J- rekombinace *in vivo* (Hoogenboom, J. Mol. Biol., 227, 381-388, 1992, Nissim, EMBO J., 13, 692-698, 1994, Griffiths, EMBO J., 13, 3245-3260, 1994). Obvykle je diverzita spojení V-D-/D-J- a D-segmentu, která je převážně zodpovědná za neobvyklou délku a sekvenční variabilitu těžkého řetězce CDR3, a také diverzita spojení V-J-, která přispívá k sekvenční variabilitě lehkého řetězce CDR3, imitována náhodnými sekvencemi používajícími degenerované oligonukleotidy v postupech plně syntetických a semisyntetických (Hoogenboom, 1994, viz výše, Nissim, viz výše, Griffiths, viz výše, Barbas, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89, 4457-4461, 1992).

Ale u párů VL/VH nebo VH/VL vybraných pro vazbu k lidskému antigenu z těchto semisyntetických nebo zcela syntetických repertoárů založených na sekvencích lidského V genu je riziko, že mohou tvořit imunogenní epitopy, které mohou u lidí indukovat nežádoucí imunitní reakci (Hoogenboom, TIBTECH, 15, 62-70, 1997), zejména oblasti CDR3 pocházející z repertoárů úplně randomizovaných (náhodných) sekvencí jsou předurčené ke tvorbě potenciálně imunogenních epitopů, protože nikdy nebyly vystaveny imunitnímu dohledu člověka, aniž by byly rozpoznány jako cizorodý antigen a v důsledku toho později eliminovány. Stejně tak to platí pro lidské protilátky z transgenních myší exprimujících

lidské protilátky, protože tyto molekuly imunoglobulinů byly vybrány pro to, že je toleruje myši, ale už ne lidský imunitní systém.

Podstata vynálezu

Technickým problémem, který je řešen předkládaným vynálezem, bylo poskytnout způsob, který umožňuje přípravu receptorů, které jsou slabě imunogenní nebo nejsou imunogenní pro člověka a které mohou být použity pro cílení antigenů v lidském těle. Řešení uvedeného technického problému bylo dosaženo provedeními vynálezu, jejichž význaky jsou popsány v patentových nárocích.

Předkládaný vynález se tudíž týká způsobu přípravy anti-lidského antigenního receptoru, který je slabě imunogenní nebo není imunogenní pro člověka, kterýžto způsob obsahuje kroky selekce a kombinace funkčně přestavěných imunoglobulinových řetězců VH a VL, kde alespoň uvedený řetězec VH pochází ze zralých lidských lymfocytů B, které jsou v podstatě nesenzibilizované (naivní), nebo z lidských B buněk, které jsou v podstatě anergní, a zmíněný řetězec VL pochází z repertoáru přirozeně se vyskytujících lidských B buněk, uvedené řetězce jsou exprimovány pomocí rekombinantního vektoru a používají *in vitro* detekční (expoziční) systém pro vazbu k lidskému antigenu.

Způsob podle předkládaného vynálezu je výhodný pro přípravu receptorů, které mohou být použity pro cílení antigenů u lidí a které samy nejsou imunogenní buď vůbec nebo alespoň ne do významné míry. Tyto receptory mohou být výhodně použity pro léčbu celé řady nemocí jako nádorů nebo autoimunitních chorob, rejekce (odhojení) štěpu po transplantaci a infekčních nemocí, a to tím, že se cílí na buněčné receptory, a nebo k léčení nemocí alergických, zánětlivých, endokrinních a degenerativních tím, že se cílí na klíčové molekuly zapojené do patologického procesu.

Imunoglobulinové řetězce VH/VL receptorů předkládaného vynálezu mohou být ovšem dále zkoumány, co se týče jejich sekvencí nukleových kyselin a aminokyselinových sekvencí s použitím technik v oboru známých, viz např. Sambrook (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. vydání, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989). Jakmile byla jednou určena sekvence nukleové kyseliny nebo aminokyselinová sekvence, mohou být receptory podle vynálezu připraveny také jinými metodami, jako jsou syntetické nebo semisyntetické metody poskytující syntetické nebo semisyntetické receptory, nebo v transgenních myších exprimujících lidské imunoglobulinové receptory, čili receptory nesoucí vlastnosti vyjmenované výše v tomto textu a tvořené takovými syntetickými nebo semisyntetickými metodami nebo v transgenních myších jsou také zahrnuty do rámce předkládaného vynálezu.

Po navázání receptoru na lidský antigen může být receptor dále purifikován. Například nenavázané receptory, které nenesou antigenní specifitu, mohou být odstraněny promýváním. Navázaný receptor může být eluován z lidského antigenu a dále purifikován, mohou být použity další cykly exprese, vazby a selekce požadovaného receptoru, dokud není požadovaný receptor a/nebo odpovídající rekombinantní vektor izolován v čisté formě.

Způsob předkládaného vynálezu tedy používá třídění variabilních oblastí imunoglobulinů lidským imunitním systémem. Receptory pocházejí z repertoáru vybraného *in vitro* z lidských kombinačních protilátkových knihoven výlučně nebo přednostně vytvořených z repertoáru přirozeně se vyskytujících protilátek exprimovaných zralými lidskými lymfocyty B, které jsou v podstatě nesenzibilizované, nebo lidskými B buňkami, které jsou v podstatě anergní.

Ale imunoglobulinové variabilní domény mohou také pocházet z celé řady dalších zdrojů, které představují tyto předem vybrané populace B buněk.

Vědecký podklad pokud se týká původu B buněk fungujících jako zdroj uvedených řetězců VH nebo VL může být vysvětlen následovně:

Zralé nesenzibilizované (naivní) B lymfocyty, které exprimují IgD a IgM jako membránové antigenní receptory, vstupují do primárních folikulů v průběhu své cesty do sekundárních lymfoidních orgánů (a mezi ně), dokud se nepotkají s multivalentním autoantigenem, což má za následek klonální selekci, nebo s rozpustným monovalentním autoantigenem, čímž se stanou anergními, a žijí krátce díky vyloučení z primárních folikulů.

Kontakt nezralých B buněk, které exprimují výlučně IgM, s autoantigenem v kostní dřeni má za následek klonální delecii nebo anergii v závislosti na valenci antigenu. Anergní B buňky, ačkoliv exprimují povrchový IgD, jsou neschopné odpovídat tímto receptorem na antigen; bez přístupu do primárních folikulů a v nepřítomnosti pomocných T buněk tyto buňky mají poločas života krátký pouze několik dnů.

Na rozdíl od toho zralé naivní B lymfocyty, které se nesetkaly s autoantigenem a mají tudíž přístup do primárních folikulů, mají poločas života dlouhý několik týdnů. Navzdory popsaným mechanismům zprostředkovávajícím autotoleranci si tyto populace dlouho žijících zralých naivních B lymfocytů stále udržují potenciálně autoreaktivní B buňky, je ale nepravděpodobné, že naleznou specifickou pomoc T buněk díky T buněčné toleranci, a tak je zadržena jejich proliferace a sekrece protilátek. Ukazuje se, že neodpovídavost B buněk na mnoho autoantigenů, které se vyskytují v nízkých hladinách, je tohoto typu, ovlivňující pomocné T buňky, ale ne B buňky. V předkládaném vynálezu jsou tyto dlouho žijící neodpovídavé potenciálně autoreaktivní zralé naivní B lymfocyty identifikovány jako nejslibnější repertoár přirozeně se vyskytujících lidských protilátek pro konstrukci kombinačních protilátkových knihoven vhodných zejména pro výběr lidských protilátek k lidským antigenům, například metodou fágové expozice.

Lze očekávat, že tento vysoce selektovaný repertoár protilátek použitý jako základ pro předkládaný vynález, pocházející hlavně z B buněk s dlouhým poločasem života *in vivo*, které jsou tudíž vystaveny lidskému imunitnímu systému po delší dobu, je významně ochuzen o protilátkové

molekuly tvořící epitopy, zejména ve vysoce variabilních oblastech CDR3, které jsou imunogenní pro lidský imunitní systém. Proto se očekává, že lidské protilátky vybrané z tohoto repertoáru protilátek mají u člověka nižší imunogenní profil, než lidské protilátky vybírané z semisyntetických nebo plně syntetických knihoven lidských protilátek.

Zralé naivní (nesenzibilizované) B buňky, které jsou aktivovány kontaktem s cizorodým antigenem, zastaví exprese IgD a počnou klonální proliferaci a diferenciaci na plazmatické buňky secernující rozpustný imunoglobulin, časným stadiím protilátkové reakce dominují protilátky IgM, zatímco později jsou převládající izotypy IgG a IgA, přičemž IgE přispívá malou, ale biologicky důležitou částí protilátkové reakce. Na rozdíl od IgD-negativních zralých, antigenem aktivovaných B lymfocytů exprimujících IgM, IgG, IgA nebo IgE, IgD-pozitivní zralé naivní B buňky dosud nepodstoupily klonální proliferaci, takže kombinační IgD knihovny nezachycují nadměrně protilátkové specifity, které jsou v současné době nebo byly dříve zapojeny do imunitních reakcí obvykle řízených cizorodým antigenem, tudíž se snižuje diverzita repertoáru a plýtvá se místem v knihovně pro protilátkové kandidáty, u nichž je nepravděpodobná vazba autoantigenů. To je ve zřetelném kontrastu se stavem techniky, který doporučuje použití lidské IgM kombinační protilátkové knihovny pro *in vitro* selekci lidských protilátek proti lidským antigenům z repertoárů přirozeně se vyskytujících lidských protilátek (Hoogenboom, 1997, výše).

Ve výhodném provedení způsobu podle vynálezu je uvedený antigenní receptor imunoglobulin nebo jeho fragment.

Fragment imunoglobulinu může být každý fragment, který je v oboru znám, jako jsou fragmenty Fab nebo F(ab)₂.

V obzvláště výhodném provedení způsobu vynálezu je uvedený fragment imunoglobulinu fragment Fv.

V dalším výhodném provedení způsobu vynálezu pocházejí alespoň uvedený VH a volitelně uvedený VL imunoglobulinový řetězec z repertoáru lidského IgD.

Byl učiněn závěr, že tento receptor a výhodně repertoár protilátek vybraných pro nízkou imunogeničnost jsou nejlépe reprezentovány v protilátkové knihovně lidského IgD. IgD je exprimován jako membránový antigenní receptor spolu s povrchovým IgM na zralých naivních B lymfocytech, které vstupují do primárních folikulů v průběhu své cesty do sekundárních lymfoidních orgánů (a mezi ně), dokud se nepotkají s multivalentním autoantigenem, což má za následek klonální delecí, nebo s rozpustným monovalentním autoantigenem, čímž se stanou anergními a pak žijí krátce díky vyloučení z primárních folikulů. Kromě repertoáru protilátek zralých naivních B lymfocytů, lidské IgD knihovny pouze dále představují ty krátce žijící B buňky, které se staly anergními při kontaktu s rozpustným monovalentním autoantigenem, ale je nepravděpodobné, že přispějí specifickými vazebnými skupinami k povrchovým molekulám lidské buňky připomínajícím multivalentní autoantigeny, které indukují klonální delecí B buněk namísto anergie.

V dalším výhodném provedení způsobu vynálezu je uvedený *in vitro* detekční systém technika fágové expozice.

Systém fágové expozice byl v minulosti obvykle použit pro selekci celé řady peptidů a proteinů, které se vážou na specifické cíle. Na základě této znalosti mohou být imunoglobulinové řetězce VH a VL pohodlně klonovány do vektorů, které také obsahují molekuly použitelné pro systémy fágové expozice. Takové molekuly a vektory jsou v oboru dobře známy (Winter, výše, Barbas, METHODS: A Companion to Methods in Enzymology, 2, 119-124, 1991) a není třeba je zde detailněji vysvětlovat.

V dalším výhodném provedení způsobu podle vynálezu je uvedená kombinace přestavěných řetězců exprimována v jedné nebo více různých knihovnách.

Toto provedení je zejména výhodné, je-li známo, že řetězec VH nebo VL se váže na specifický cíl a vybere se odpovídající druhý řetězec V, který vytváří nebo zlepšuje vazbu.

V dalším výhodném provedení způsobu podle vynálezu uvedený lidský antigen je nádorový antigen.

Jestliže lidský antigen je nádorový antigen, je uvedený antigen výhodně exprimován na povrchu uvedeného nádoru. V tomto případě jsou řetězce VH a VL výhodně spojeny s toxinem. Vazba může být provedena na úrovni nukleové kyseliny metodami genetického inženýrství nebo na proteinové úrovni pomocí například chemické vazby/kondenzace.

Je zejména výhodné, když uvedený nádorový antigen je antigen 17-1A.

V dalším obzvláště výhodném provedení způsobu vynálezu uvedený řetězec VH obsahuje jednu ze dvou sekvencí ukázaných na obr. 7 (nukleotidy 1 až 381) a obr. 8 (nukleotidy 1 až 339) a/nebo uvedený řetězec VL obsahuje jednu ze dvou následujících sekvencí ukázaných na obr. 6 (nukleotidy 1 až 321) a obr. 9 (nukleotidy 1 až 321). Receptory s těmito specifickými oblastmi VH a VL, kde uvedená oblast VL může být spojena s oběma oblastmi VH, jsou první lidské protilátky, které jsou specifické pro lidský antigen 17-1A.

V dalším výhodném provedení způsobu podle vynálezu uvedený krok selekce zahrnuje

I) vazbu expozičního prostředku (nosiče) exprimujícího antigenní receptor

- a) na imobilizovaný cílový antigen nebo jeho fragmenty,
- b) na volitelně značené buňky exprimující cílový antigen nebo jeho fragmenty, nebo
- c) na rozpustný, výhodně značený cílový antigen nebo jeho fragmenty,

II) odmytí nespecificky navázaného expozičního prostředku (a a b) a následnou eluci specificky vázaného expozičního prostředku nespecifickými (např. pufr s nízkým pH) nebo specifickými prostředky (např. specifická protilátka k cílovému antigenu), nebo

III) pozitivní obohacení expozičního prostředku navázaného na cílový antigen (b a c) z roztoku cílového antigenu nebo ze suspenze buněk exprimujících cílový antigen pomocí například magnetických perliček vázajících značený cílový antigen nebo značených buněk

exprimujících cílový antigen, takto izolované expoziční prostředky s antigenními receptory mohou být dle volby dále množeny replikací a podrobeny dalším kolům *in vitro* selekce, jak se popisuje.

V dalším výhodném provedení způsobu vynálezu se před uvedeným selekčním krokem vybírá buď řetězec VH nebo VL pro vazbu uvedeného antigenu, spolu s náhradním řetězcem V.

Tento dvoustupňový postup může použít templátovou protilátku specifickou pro cílový antigen z různých druhů, například myši monoklonální protilátku proti lidskému cílovému antigenu. Nejdříve se repertoár lidských VH nebo VL spojí s jedním náhradním řetězcem VH nebo VL z myši templátové protilátky, která je exponována prostřednictvím např. vláknitého fága a vybrána *in vitro* vazbou antigenu. Celý rozsah knihovny je tedy přístupný výlučně repertoáru lidských VL nebo VH a mohou být izolovány kandidátní protilátky lidských řetězců VL nebo VH, které jsou schopné přispět ke specifické vazbě lidského cílového antigenu. Ve druhém kroku se náhradní variabilní oblast templátové protilátky zamění odpovídající variabilní oblastí z lidského repertoáru, a pak následuje druhé kolo *in vitro* selekce; celý rozsah knihovny je opět výlučně přístupný jednomu repertoáru oblastí VH nebo VL, a tak dvoustupňový postup umožňuje v podmínkách omezené velikosti knihovny screening mnohem více kandidátů oblastí VL a VH pro vazbu antigenu než jednostupňový.

Tento dvoustupňový selekční postup pro screening lidských IgD kombinačních protilátkových knihoven metodou fágové expozice byl výhodně použit pro klonování sekvencí DNA kódujících variabilní oblasti lidských protilátek, které se specificky vážou na lidský antigen 17-1A. Nejdříve byl spojen Fd segment těžkého řetězce (VH+CH1) myši monoklonální protilátky (Göttlinger, Int. J. Cancer, 38, 47-53, 1986), který se specificky váže na lidský antigen 17-1A, s repertoárem lidských lehkých řetězců kappa a lambda. Výsledné knihovny byly exponovány prostřednictvím vláknitého fága a proběhla selekce *in vitro* několika koly

„rýžování“ (specifického vychytávání) na imobilizovaném rekombinantním lidském antigenu 17-1A. Rozpustné Fab fragmenty byly exprimovány několika klony po každém kole „rýžování“ a testovaly se pomocí ELISA na vazbu antigenu. Ukázalo se, že každá silná vazebná skupina obohacená během „rýžovací“ procedury obsahuje tentýž lidský lehký řetězec kappa, což bylo potvrzeno sekvenční analýzou. Tento lidský lehký řetězec, nadále nazýván K8, byl pak spojen s knihovnou lidského těžkého řetězce IgD, která byla opět exponována prostřednictvím vláknitého fága a proběhla selekce *in vitro* několika koly „rýžování“ na imobilizovaném rekombinantním lidském antigenu 17-1A. Několik Fab fragmentů bylo exprimováno několika klony po každém kole „rýžování“ a opět se testovaly pomocí ELISA na vazbu antigenu. Sekvenční analýza vazebných skupin obohacených během „rýžovací“ procedury odhalila dvě různé variabilní oblasti těžkého řetězce nazvané D4.5 a D7.2, každá z nich se spojuje s lehkým řetězcem K8 za vzniku odlišných lidských antigenních vazebných míst se specifitou pro lidský antigen 17-1A. Repertoáry lidských lehkých a těžkých řetězců se klonovaly z několika preparátů celkové RNA izolované ze vzorků lidské krve a kostní dřeně několika dárců s použitím reakce RT-PCR (reverzní transkriptáza + polymerázová řetězová reakce) specifické pro lehké řetězce kappa nebo lambda, jakož i těžké řetězce IgD. Protože je nemožné selektivně amplifikovat repertoár lehkých řetězců, které jsou spojeny s IgD těžkými řetězci *in vivo*, pokud nejsou pro preparát RNA purifikovány IgD pozitivní B buňky, použité knihovny lehkých řetězců nejsou omezeny na repertoár protilátek zralých naivních nebo anergních B lymfocytů. Ale díky převaze těžkého řetězce v rozpoznávání antigenu tento fakt nijak neubírá výhody IgD repertoáru pro selekci lidských protilátek k autoantigenům. Kromě toho, a to je nejdůležitější, díky vystavení lidskému imunitnímu systému selekce těchto lehkých řetězců stále zaručuje nízký imunogenní profil u člověka.

V dalším zvláště výhodném provedení způsobu vynálezu je uvedený náhradní řetězec myší VH nebo VL řetězec.

V dalším výhodném provedení způsobu vynálezu uvedená selekce vhodných kombinací zahrnuje

a) testování jednoho a téhož VH řetězce v kombinaci s velkým počtem různých VL řetězců na vazbu k uvedenému lidskému antigenu, nebo

b) testování jednoho a téhož VL řetězce v kombinaci s velkým počtem různých VH řetězců na vazbu k uvedenému lidskému antigenu.

Toto provedení se opět výhodně použije, jestliže je známo, že buď VL nebo VH řetězec specificky interaguje s lidskou cílovou molekulou. Poté může být příslušný druhý řetězec vybrán na základě výhodně zlepšené vazby na cílovou molekulu.

V dalším výhodném provedení způsobu podle vynálezu zahrnuje uvedený způsob kroky získávání lidských řetězců VH a VL nebo odpovídajících nukleových kyselin po selekci a fúzování uvedených řetězců ke stejným nebo jiným řetězcům VH nebo VL, k imunoglobulinovým konstantním oblastem těžkých (CH) nebo lehkých (CL) řetězců nebo jejich částem, nebo k dalším biologicky aktivním molekulám, jako jsou peptidy, proteiny, nukleové kyseliny, malé organické sloučeniny, hormony, neurotransmitery, peptidomimetika, PNA (Milner, Nature Medicine, 1, 879-880, 1995, Hupp, Cell, 83, 237-345, 1995, Gibbs a Oliff, Cell, 79, 193-198, 1994). Další funkční molekula může být spojena buď fyzikálně, např. chemickými prostředky k řetězcům VH a VL, nebo může být fúzována technikami rekombinantní DNA v oboru známými.

Toto provedení vynálezu je použitelné obzvláště pro vývoj specifických léků, které mohou být použity pro cílení požadovaných antigenů v lidském těle. Například, jestliže jsou zacíleny nádorové antigeny, mohou být VH a VL řetězce na úrovni nukleové kyseliny nebo aminokyselin fúzovány se skupinou toxinu, výsledkem je imunotoxin; s extracelulární částí buněčného receptoru nebo rozpustného cytokinu či jejich částí, výsledkem jsou konstrukty zesilující imunitní reakci proti nádorům; nebo s protilátkovým Fv fragmentem, výsledkem je protilátkový derivát s dvojitou specifitou.

V dalším obzvláště výhodném provedení způsobu podle vynálezu pocházejí uvedené konstantní oblasti řetězců z lidských IgG1 nebo IgG3.

Konstantní oblasti řetězců z lidských IgG1 nebo IgG3 se používají zejména tehdy, mají-li být buňky exprimující cílový antigen v lidském těle zničeny. V oboru je známo, že tyto podtřídy IgG účinně zprostředkovávají buněčnou cytotoxicitu závislou na protilátkách (ADCC) a přispívají ke zničení buněk rozpoznaných a navázaných těmito podtřídami protilátek.

V dalším výhodném provedení způsobu vynálezu jsou uvedené VH a/nebo VL řetězce spojeny s neproteinovým přípravkem (léčivem) s nízkou molekulovou hmotností, jako jsou radioizotopy nebo látky používané pro chemoterapii, výsledkem je specifitější *in vivo* cílení uvedených přípravků.

V dalším výhodném provedení způsobu podle vynálezu jsou uvedené VH nebo VL řetězce exprimovány ze sekvencí nukleových kyselin, které jsou výsledkem amplifikace metodou RT-PCR mRNA pocházející ze zralých lidských lymfocytů B, které jsou v podstatě nesenzibilizované (naivní), nebo z lidských B buněk, které jsou v podstatě anergní.

Je výhodné amplifikovat VH nebo VL řetězce pomocí RT-PCR, jakmile byl jednou identifikován a izolován vhodný zdroj. Pro amplifikaci VH nebo VL řetězců pomocí RT-PCR se dává přednost použití mRNA z jaderných buněk lidské kostní dřeně nebo výhodněji z lidské krve, protože tyto dva tkáňové kompartmenty jsou nejsnadněji přístupné zdroje B buněk u lidí. Dále se preferuje oddělit před izolací RNA anergní B buňky nebo výhodněji zralé naivní B lymfocyty od jaderných buněk uvedených tkáňových kompartmentů použitím např. magnetických perliček nebo třídění buněk založené na průtokové cytometrii. Tento postup zaručuje, že oba VH a VL řetězce amplifikované pomocí RT-PCR pocházejí z favorizované populace B buněk. Alternativně, je-li pro amplifikaci VH nebo VL řetězců pomocí RT-PCR použita mRNA z celé frakce jaderných buněk z uvedených tkáňových kompartmentů, je výhodné amplifikovat VH oblast jako polovinu Fd segmentu těžkého řetězce (VH-CH1) lidského IgD s použitím 3'-koncového PCR primeru specifického pro IgD, např. ukázaného v tabulce 1, se kterým vzniknou výlučně PCR produkty z lidského IgD

těžkého řetězce, exprimovaného pouze v zralých naivních B lymfocytech a v anergních lidských B buňkách.

V dalším výhodném provedení způsobu vynálezu obsahuje anti-lidský antigenní receptor, který je slabě imunogenní nebo není imunogenní pro člověka, kombinací funkčně přestavěných VH a VL řetězců výhodně ze zralých lidských lymfocytů B, které jsou v podstatě naivní, nebo z lidských B buněk, které jsou v podstatě anergní, a které je možno získat způsobem podle vynálezu popsaného výše.

Výhody protilátky podle vynálezu zde byly nastíněny výše. Je třeba zdůraznit, že odpovídající protilátky namířené proti lidským antigenům a pocházející z lidských zdrojů, které jsou pro člověka slabě imunogenní nebo nejsou imunogenní, nebyly doposud v oboru izolovány. Proto jsou protilátky podle vynálezu výchozí bod pro zcela nový vývoj protilátek, které mohou být použity v různých odvětvích medicíny a farmacie.

V dalším výhodném provedení způsobu podle vynálezu je receptor protilátka nebo její fragment.

V jiném výhodném provedení způsobu podle vynálezu je receptor specifický pro lidský nádorový antigen, nejvýhodněji pro lidský antigen 17-1A.

Vynález se dále týká receptoru, kde uvedený VH řetězec obsahuje jednu ze sekvencí ukázaných na obr. 7 (nukleotidy 1 až 381) a obr. 8 (nukleotidy 1 až 339) a/nebo uvedený VL řetězec obsahuje jednu ze dvou následujících sekvencí ukázaných na obr. 6 (nukleotidy 1 až 321) a obr. 9 (nukleotidy 1 až 321).

Navíc se vynález týká VH řetězce nebo jeho části obsažené v receptoru podle vynálezu.

Vynález se také týká VL řetězce nebo jeho části obsažené v receptoru vynálezu.

V dalším obzvláště výhodném provedení způsobu vynálezu je uvedená část VH řetězce doména CDR3.

Dále se vynález týká soupravy obsahující funkčně přestavěné VH a VL řetězce imunoglobulinu, kde alespoň jeden z VH a VL řetězců pochází

ze zralých lidských lymfocytů B, které jsou v podstatě naivní, nebo z lidských B buněk, které jsou v podstatě anergní, uvedené řetězce jsou schopné exprese rekombinantními vektory *in vitro* detekčního (expozičního) systému.

Souprava podle vynálezu je výhodně použita pro provádění způsobu podle vynálezu a tedy k získání receptorů požadované specifčnosti.

V uvedené soupravě je *in vitro* detekční systém výhodně systémem fágové expozice ("phage display").

Vynález se dále týká protilátky vyznačující se tím, že pochází z lidských sekvencí a je specifická pro lidský antigen 17-1A.

Způsobem podle vynálezu byla poprvé vyvinuta lidská protilátka, která je specifická pro lidský antigen 17-1A. Jak bylo zdůrazněno dříve, tento vývoj nebyl zanedbatelný problém, protože lidské protilátky proti lidským nádorovým antigenům jsou obvykle podrobeny mechanismům zprostředkovávajícím autotoleranci imunitního systému, což má za následek eliminaci B lymfocytů exprimujících autoreaktivní protilátky *in vivo*. Ze známých nádorových antigenů je antigen 17-1A mnohem širěji exprimovaný na značné části normálních epitelových tkání než jiné nádorové antigeny, kromě své exprese na epitelových nádorech.

Antigen 17-1A se proto v současné době považuje spíše za představitele panepitelového antigenu než za nádorový antigen, za který byl pokládán v době svého prvního popisu. Pro srovnání, další takzvané nádorové antigeny nalezené na epitelových nádorech, jako erb-B2 (Her2/neu), Muc-1 (PEM) nebo Thompson-Friedreichův antigen obvykle vykazují na normálních epitelových tkáních mnohem omezenější vzorec exprese. Tudiž se očekává, že selektivní tlak autotolerance proti B lymfocytům, exprimujícím 17-1A reaktivní protilátky třebas jen s malou afinitou, je mimořádně silný, protože se zdá téměř nemožné, aby se tyto B buňky vyhnuly po delší časové období setkání s antigenem 17-1A, díky všudypřítomnosti tohoto antigenu. Bylo překvapivě zjištěno, že z repertoáru protilátek lidských B buněk, jako jsou např. zralé naivní B lymfocyty, mohou být izolovány 17-1A specifické protilátky nebo alespoň

odpovídající těžké řetězce. Je známo, že tyto B buňky mají dlouhý poločas života *in vivo* a už se jim podařilo vyhnout se před svou maturací depleci navzdory přítomnosti antigenu 17-1A dokonce i v místě maturace; anergie B buněk v případě antigenu 17-1A nenastává, protože tento typ B buněčné tolerance je vyvoláván pouze rozpustným autoantigenem. Pouze dlouho žijící B buňky, kterým se podařilo přežít navzdory své potenciální 17-1A reaktivitě, představují repertoár variabilních oblastí lidských imunoglobulinů u něhož je pravděpodobné, že bude lidským imunitním systémem dobře tolerován při použití pro konstrukci lidských protilátek a protilátkových derivátů určených k tomu, aby byly opakovaně systémově podávány lidem, protože již byly buněčným dohledem imunitního systému prověřeny a pak byly z imunogenních sekvencí vyloučeny. Předkládaný vynález se tudíž také týká lidských protilátek specifických pro antigen 17-1A a vhodných pro opakovanou aplikaci *in vivo* nehledě na způsob, kterým jsou získány, protože se s velkou pravděpodobností očekává, že lidské protilátkové sekvence s uvedenou vysokou kompatibilitou *in vivo* budou nalezeny, například způsobem podle vynálezu, také v repertoáru B buněk zdravých lidí. Ve shodě s tím byla nyní poprvé vyvinuta lidská protilátka, která může být výhodně použita pro sledování a/nebo zničení nádorových buněk nesoucích antigen 17-1A.

Protilátka vynálezu je tudíž výhodně slabě imunogenní nebo není imunogenní pro člověka. Ve výhodném provedení lze uvedenou protilátku získat způsobem, jak je popsán výše. V dalším výhodném provedení protilátka vynálezu rozpoznává epitop extracelulární domény antigenu 17-1A, který výhodně obsahuje alespoň jednu aminokyselinovou sekvenci peptidu č. 8, 11, 13, 14, 59, 60 a 79. VH řetězec protilátky vynálezu výhodně zahrnuje alespoň jednu CDR z jedné z následujících dvou sekvencí ukázaných na obr. 7 (nukleotidy 1 až 381) a obr. 8 (nukleotidy 1 až 339) a/nebo VL řetězec obsahuje alespoň jednu CDR z jedné z následujících dvou sekvencí ukázaných na obr. 6 (nukleotidy 1 až 321) a obr. 9 (nukleotidy 1 až 321). Zejména výhodná je protilátka, kde uvedený VH řetězec obsahuje jednu ze dvou následujících sekvencí ukázaných na

obr. 7 (nukleotidy 1 až 381) a obr. 8 (nukleotidy 1 až 339) a/nebo uvedený VL řetězec obsahuje jednu z následujících dvou sekvencí ukázaných na obr. 6 (nukleotidy 1 až 321) a obr. 9 (nukleotidy 1 až 321).

Byl učiněn závěr, že tento receptor a výhodně repertoár protilátek vybraných pro nízkou imunogeničnost jsou nejlépe reprezentovány v protilátkové knihovně lidského IgD. IgD je exprimován jako membránový antigenní receptor spolu s povrchovým IgM na zralých naivních B lymfocytech, které vstupují do primárních folikulů v průběhu své cesty do sekundárních lymfoidních orgánů (a mezi ně), dokud se nepotkají s multivalentním autoantigenem, což má za následek klonální delecí, nebo s rozpustným monovalentním autoantigenem, čímž se stanou anergními a žijí krátce díky vyloučení z primárních folikulů. Kromě zralých naivních B lymfocytů lidské IgD knihovny pouze představují repertoár protilátek krátce žijících B buněk, které se staly anergními při kontaktu s rozpustným monovalentním autoantigenem, ale je nepravděpodobné, že přispějí specifickými vazebnými skupinami k povrchovým molekulám lidské buňky připomínajícím multivalentní autoantigeny, které indukují klonální delecí B buněk namísto anergie.

Kromě toho se předkládaný vynález týká farmaceutického přípravku obsahujícího alespoň jeden z výše uvedených receptorů podle vynálezu nebo jejich částí, buď samotné nebo v kombinaci, a volitelně farmaceuticky přijatelný nosič nebo excipient. Příklady vhodných farmaceutických nosičů jsou v oboru známy a zahrnují fyziologické roztoky pufované fosforečnany, vodu, emulze, jako jsou emulze olej/voda, různé typy smáčedel, sterilní roztoky apod. Přípravky obsahující tyto nosiče mohou být formulovány obvyklými známými způsoby. Tyto farmaceutické přípravky mohou být pacientovi podávány ve vhodné dávce. Podávání vhodných přípravků se může provádět různými způsoby, např. intravenózním, intraperitoneálním, subkutánním, intramuskulárním, lokálním nebo intradermálním podáváním.

Vynález se tedy také týká použití receptoru, nebo jeho části, připraveného způsobem podle vynálezu pro přípravu farmaceutického

přípravku pro léčbu, prevenci a/nebo oddálení nádoru u pacienta, výhodně když je nádor epitelového původu.

Přehled obrázků

Obrázek 1: Klonovací místo pComb3H s důležitými restrikčními místy. Byly použity následující zkratky: P, promotor, VL, variabilní doména lehkého řetězce, CL, konstantní doména lehkého řetězce, VH, variabilní doména těžkého řetězce, CH1, konstantní doména těžkého řetězce, L1/2, prokaryotické vedoucí sekvence. Doména označená jako gen III v pComb3H kóduje neinfekční část produktu genu III vláknitých fágů, jako např. VCSM13.

Obrázek 2: Schéma plazmidu pComb3H a plně exprimovaného fagu M13. Na pComb3H je ukázána organizace vedoucí sekvence (L)*ompA*, lehkého řetězce, vedoucí sekvence (L)*pelB*, těžkého řetězce a genu III. Plně exprimovaný fág M13 exponuje na svém povrchu fenotyp určitého protilátkového Fab fragmentu skládajícího se z lehkého řetězce a Fd segmentu (VH+CH1) těžkého řetězce spojeného s neinfekční částí produktu genu III a obsahuje odpovídající genotyp jako jednovláknovou DNA kódující těžký a lehký řetězec vystaveného Fab fragmentu. Infekční protein genu III je poskytnut pomocným fágem VCSM13.

Obrázek 3: ELISA rozpustných Fab fragmentů. Periplazmatické preparáty rozpustných Fab fragmentů, z nichž každý obsahuje Fd segment chimérického M79 a jeden lidský řetězec kappa na klon. ELISA destičky se inkubovaly přes noc s rozpustným antigenem 17-1A. Detekce navázaných protilátkových Fab fragmentů se prováděla polyklonální proti-lidskou imunoglobulinovou protilátkou konjugovanou s peroxidázou. Test ELISA se nakonec vyvolal přidáním substrátového roztoku ABTS (ABTS = 2,2 azino-bis(3-etylbenzthiazolin-6-sulfonová kyselina)) a změna substrátu se měřila

ve vlnové délce 405 nm (osa y). Klony jsou představovány osou x, první číslo vyznačuje kolo „rýžování“ druhé číslo je číslo klonu. Klony 1.5-9 mají kombinaci chimérického M79 Fd segmentu s jedním náhodným řetězcem kappa a představují negativní kontroly.

Obrázek 4: ELISA rozpustných Fab fragmentů. Periplazmatické preparáty rozpustných Fab fragmentů, z nichž každý obsahuje k8 lehký řetězec a jeden Fd segment lidského Ig delta řetězce. ELISA destičky se inkubovaly přes noc s rozpustným antigenem 17-1A. Detekce navázaných protilátkových Fab fragmentů se prováděla biotinylovanou polyklonální proti-lidskou protilátkou lehkého řetězce kappa, po které následoval streptavidin konjugovaný s peroxidázou. Test ELISA se nakonec vyvolal přidáním substrátového roztoku ABTS (ABTS = 2,2 azino-bis(3-etylbenzthiazolin-6-sulfonová kyselina)) a změna substrátu se měřila ve vlnové délce 405 nm (osa y). Klony jsou představovány osou x, první číslo vyznačuje kolo „rýžování“ druhé číslo je číslo klonu. Klony 1.2-6 mají kombinaci k8 lehkého řetězce s jedním náhodným Fd segmentem Ig delta těžkého řetězce a představují negativní kontroly.

Obrázek 5: ELISA rozpustných Fab fragmentů. Periplazmatické preparáty rozpustných Fab fragmentů, z nichž každý obsahuje Fd segment D4.5 a jeden lidský řetězec kappa na klon. ELISA destičky se inkubovaly přes noc s rozpustným antigenem 17-1A. Detekce navázaných protilátkových Fab fragmentů se prováděla biotinylovanou polyklonální proti-lidskou protilátkou lehkého řetězce kappa, po které následoval streptavidin konjugovaný s peroxidázou. Test ELISA se nakonec vyvolal přidáním substrátového roztoku ABTS (ABTS = 2,2 azino-bis(3-etylbenzthiazolin-6-sulfonová kyselina)) a změna substrátu se měřila ve vlnové délce 405 nm (osa y). Klony jsou představovány osou x, první číslo vyznačuje kolo „rýžování“ druhé číslo je číslo klonu, S. je zkratka pro klony před prvním kolem selekce. Klony S.1-3 mají kombinaci k8 lehkého řetězce

s jedním náhodným Fd segmentem Ig delta těžkého řetězce a představují negativní kontroly.

Obrázek 6: DNA a proteinová sekvence variabilní oblasti lidského lehkého řetězce kappa 8. Čísla vyznačují nukleotidové (nt) pozice, aminokyseliny jsou uvedeny jednopísmenným kódem. CDR1 obsahuje nt 70 až nt 102, CDR2 nt 148 až nt 168, CDR3 nt 265 až nt 294.

Obrázek 7: DNA sekvence variabilní oblasti lidského D4.5 těžkého řetězce. Čísla vyznačují nukleotidové (nt) pozice, aminokyseliny jsou uvedeny jednopísmenným kódem. CDR1 obsahuje nt 91 až nt 105, CDR2 nt 148 až nt 198, CDR3 nt 292 až nt 351. Hranice mezi variabilní oblastí těžkého řetězce a doménou CH1 konstantní oblasti Ig delta je lokalizována mezi nt 382 a nt 383 s tím, že proteinová sekvence konstantní oblasti delta začíná v nt 384.

Obrázek 8: DNA sekvence variabilní oblasti lidského D7.2 těžkého řetězce. Čísla vyznačují nukleotidové (nt) pozice, aminokyseliny jsou uvedeny jednopísmenným kódem. CDR1 obsahuje nt 91 až nt 105, CDR2 nt 148 až nt 198, CDR3 nt 292 až nt 309. Hranice mezi variabilní oblastí těžkého řetězce a doménou CH1 konstantní oblasti Ig delta je lokalizována mezi nt 340 a nt 341 s tím, že proteinová sekvence konstantní oblasti delta začíná v nt 343.

Obrázek 9: DNA a proteinová sekvence variabilní oblasti lidského kappa 5.1 lehkého řetězce. Čísla vyznačují nukleotidové (nt) pozice, aminokyseliny jsou uvedeny jednopísmenným kódem. CDR1 obsahuje nt 70 až nt 102, CDR2 nt 148 až nt 168, CDR3 nt 265 až nt 294.

Obrázek 10: Analýza průtokovou cytometrií protilátkových Fab fragmentů a kontrolních protilátek M79 na 17-1A pozitivních buňkách Kato pro testování vazebné aktivity periplazmatického preparátu

obsahujícího fragment k8-D4.5-Fab. Buňky Kato se inkubovaly I) s irelevantním periplazmatickým preparátem, II) s 10 $\mu\text{g/ml}$ chimérického (bivalentního !) M79, III) s periplazmatickým preparátem k8-D4.5 a IV) s periplazmatickým preparátem k8-D4.5 naředěným v poměru 1:10. Relativní počty buněk jsou ukázány na ose y, relativní intenzita fluorescence je ukázána na ose x.

Obrázek 11: Analýza průtokovou cytometrií protilátkových Fab fragmentů a kompletních protilátek na 17-1A pozitivních buňkách Kato, buňkách CHO transfekovaných a netransfekovaných 17-1A, v uvedeném pořadí, pro testování vazebné aktivity periplazmatických preparátů (pp) obsahujících k8-D4.5-, k5.1-D4.5- nebo irelevantní k-D4.5-Fab fragmenty. Buňky Kato se inkubovaly I) s irelevantním pp (přerušovaná čára) nebo k5.1-D4.5-pp (plná čára) nebo II) s 20 $\mu\text{g/ml}$ protilátky M79 (plná čára) nebo odpovídající myši IgG2a izotypové kontroly (přerušovaná čára). Buňky CHO transfekované 17-1A se inkubovaly III) s irelevantním pp (přerušovaná čára) nebo k5.1-D4.5-pp (plná čára), IV) s irelevantním pp (přerušovaná čára) nebo k8-D4.5-pp (plná čára) nebo V) s 20 $\mu\text{g/ml}$ protilátky M79 (plná čára) nebo odpovídající myši IgG2a izotypové kontroly (přerušovaná čára). V bodech III), IV) a V) se inkubace a detekce relevantních pp (k5.1-D4.5-Fab-pp a k8-D4.5-Fab-pp, v uvedeném pořadí) a myši protilátky M79 prováděla také na netransfekovaných buňkách CHO (tečkované čáry). Relativní počty buněk jsou ukázány na ose y, relativní intenzita fluorescence je ukázána na ose x.

Obrázek 12: Klonovací místo pEF-ADA s důležitými restričními místy. Byly použity následující zkratky: P, promotor, VL, variabilní doména lehkého řetězce, CL, konstantní doména lehkého řetězce, Leuc, eukaryotická vedoucí sekvence.

Obrázek 13: Klonovací místo pEF-DHFR s důležitými restrikčními místy. Byly použity následující zkratky: P, promotor, VH, variabilní doména těžkého řetězce, CH1/2/3, konstantní doména těžkého řetězce 1/2/3, Leuc, eukaryotická vedoucí sekvence.

Obrázek 14: SDS-PAGE preparátů lidské protilátky H79. Na 12,5% polyakrylamidovém gelu v redukujících a neredukujících podmínkách se pouštělo přibližně 10 µg každé protilátky a obarvilo se Coomassie modří.

Dráha 1: standard (MW [kD] pro jednotlivé pásy označené na levé straně gelu)

Dráha 2: varianta H79 lidského IgG1 (neredukční)

Dráha 3: varianta H79 lidského IgG1 v redukčních podmínkách

Dráha 4: varianta H79 myšího IgG1 (neredukční)

Dráha 5: varianta H79 myšího IgG1 v redukčních podmínkách

Obrázek 15: SDS-PAGE preparátů lidských protilátek H79 a HD70. Na 12,5% denaturujícím polyakrylamidovém gelu v neredukčních (gel 1) a redukujících (gel 2) podmínkách se pouštělo 10 µg H79 a 3,5 µg HD70 a obarvily se Coomassie modří.

Gel 1:

Dráha 1: standard (MW [kD] pro jednotlivé pásy označené na levé straně gelu)

Dráha 2: varianta H79 lidského IgG1 (neredukční)

Dráha 3: varianta HD70 lidského IgG1 (neredukční)

Gel 2:

Dráha 4: standard (MW [kD] pro jednotlivé pásy označené na levé straně gelu)

Dráha 5: varianta H79 lidského IgG1 v redukčních podmínkách

Dráha 6: varianta HD70 lidského IgG1 v redukčních podmínkách

Obrázek 16: Analýza průtokovou cytometrií buněk Kato pozitivních na 17-1A pro testování vazebné aktivity purifikovaného H79 lidského IgG1,

jakož i purifikovaného H79 myšího IgG1. Buňky Kato se inkubovaly s IgG izotypovými kontrolami (10 $\mu\text{g/ml}$ lidského IgG1 a myšího IgG1), pozitivními kontrolami (M79 a chimerizovaná M74 v 10 $\mu\text{g/ml}$, obě 17-1A specifické) a s H79 lidským IgG1 nebo H79 myším IgG1 (každý 10 $\mu\text{g/ml}$ a 1 $\mu\text{g/ml}$). Relativní počty buněk jsou ukázány na ose y, relativní intenzita fluorescence je ukázána na ose x.

Obrázek 17: Analýza průtokovou cytometrií protilátek (každá v koncentraci 20 $\mu\text{g/ml}$) na buňkách Kato pozitivních na 17-1A, na buňkách CHO transfekovaných a netransfekovaných s 17-1A, pro testování vazebné aktivity purifikovaných protilátek H79 lidského IgG1, H79 myšího IgG1, HD70, D7.2, M79, Panorex a izotypových kontrol (lidský IgG1, myší IgG1 a 2a). I) H79 lidský IgG1 (plná čára) a lidská IgG1 izotypová kontrola (přerušovaná čára) na buňkách Kato, II) H79 myší IgG1 (plná čára) a myší IgG1 izotypová kontrola (přerušovaná čára) na buňkách Kato, III) HD70 (plná čára) a lidská IgG1 izotypová kontrola (přerušovaná čára) na buňkách Kato, IV) D7.2 (plná čára) a lidská IgG1 izotypová kontrola (přerušovaná čára) na buňkách Kato, V) M79 (plná čára) a myší IgG2a izotypová kontrola (přerušovaná čára) na buňkách Kato, VI) Panorex (plná čára) a myší IgG2a izotypová kontrola (přerušovaná čára) na buňkách Kato, VII) H79 lidský IgG1 (plná čára) a lidská IgG1 izotypová kontrola (přerušovaná čára) na buňkách CHO transfekovaných 17-1A, VIII) H79 myší IgG1 (plná čára) a myší IgG1 izotypová kontrola (přerušovaná čára) na buňkách CHO transfekovaných 17-1A, IX) HD70 (plná čára) a lidská IgG1 izotypová kontrola (přerušovaná čára) na buňkách CHO transfekovaných 17-1A, X) D7.2 (plná čára) a lidská IgG1 izotypová kontrola (přerušovaná čára) na buňkách CHO transfekovaných 17-1A, XI) M79 (plná čára) a myší IgG2a izotypová kontrola (přerušovaná čára) na buňkách CHO transfekovaných 17-1A, XII) Panorex (plná čára) a myší IgG2a izotypová kontrola (přerušovaná čára) na buňkách CHO transfekovaných 17-1A. Obrázky VII-XII také ukazují výsledky inkubace

a detekce relevantních protilátek na netransfekovaných buňkách CHO (tečkovaná čára).

Obrázek 18: Test buněčné toxicity závislé na protilátce značené ^{51}Cr . Pro měření uvolňování ^{51}Cr se inkubovaly nestimulované lidské mononukleární buňky periferní krve (PBMC, 5×10^5 buněk) jako efektorové buňky se značenými cílovými buňkami (buňky Kato značené 2 hodiny s ^{51}Cr) a protilátkami v různých koncentracích 4 nebo 20 hodin při 37 °C. Jako negativní kontroly (H79=H79hulG1) byly použity odpovídající nevázející izotypy (h-IgG = lidský IgG1, m-IgG2a = myší IgG2a). Specifická lýze se vypočítávala jako ((cpm, uvolňování během pokusu) – (cpm, spontánní uvolňování))/((cpm, maximální uvolňování) – (cpm, spontánní uvolňování)). (cpm – counts per minute = impulsy za minutu).

Obrázek 19: Fotografie ze světelného mikroskopu lidské tkáně zdravého tračníku značené M79 (pozitivní kontrola). Zmražené řezy o tloušťce 5 nm z tkáně normální sliznice se inkubovaly s myší M79 protilátkou (IgG2a) jako pozitivní kontrolou (10 µg/ml). Detekce navázaných myších protilátek se prováděla polyklonální anti-myší Ig protilátkou konjugovanou s peroxidázou a značila karbazolem (hnědě). Kontrastní barvení se provádělo hemalaunem (modře).

Obrázek 20: Fotografie ze světelného mikroskopu lidské tkáně zdravého tračníku značené H79 myším IgG1. Zmražené řezy o tloušťce 5 nm tkáně normální sliznice se inkubovaly s myší IgG variantou protilátky H79 (10 µg/ml). Detekce navázaných myších IgG1 protilátek se prováděla polyklonální anti-myší Ig protilátkou konjugovanou s peroxidázou a značila karbazolem (hnědě). Kontrastní barvení se provádělo hemalaunem (modře).

Obrázek 21: Fotografie ze světelného mikroskopu karcinomu tračníku značeného M79 (pozitivní kontrola). Zmražené řezy o tloušťce 5 nm z tkáně karcinomu tračníku se inkubovaly s myší M79 protilátkou (IgG2a) jako pozitivní kontrolou (10 $\mu\text{g/ml}$). Detekce navázaných myších protilátek se prováděla polyklonální anti-myší Ig protilátkou konjugovanou s peroxidázou a značila karbazolem (hnědě). Kontrastní barvení se provádělo hemalaunem (modře).

Obrázek 22: Fotografie ze světelného mikroskopu karcinomu tračníku značeného H79 myším IgG1. Zmražené řezy o tloušťce 5 nm z tkáně karcinomu tračníku se inkubovaly s myší IgG variantou protilátky H79 (10 $\mu\text{g/ml}$). Detekce navázaných myších IgG1 protilátek se prováděla polyklonální proti-myší Ig protilátkou konjugovanou s peroxidázou a značila karbazolem (hnědě). Kontrastní barvení se provádělo hemalaunem (modře).

Obrázek 23: Fotografie ze světelného mikroskopu lidské tkáně zdravého tračníku značené myší izotypovou IgG2a kontrolou. Zmražené řezy o tloušťce 5 nm z tkáně normální sliznice se inkubovaly s irelevantní myší IgG2a protilátkou jako negativní kontrolou (10 $\mu\text{g/ml}$). Detekce navázaných myších protilátek se prováděla polyklonální proti-myší Ig protilátkou konjugovanou s peroxidázou a značila karbazolem (hnědě). Kontrastní barvení se provádělo hemalaunem (modře).

Obrázek 24: Fotografie ze světelného mikroskopu lidské tkáně zdravého tračníku značené izotypovou IgG1 kontrolou. Zmražené řezy o tloušťce 5 nm z tkáně normální sliznice se inkubovaly s irelevantní myší IgG1 protilátkou jako negativní kontrolou (10 $\mu\text{g/ml}$). Detekce navázaných myších protilátek se prováděla polyklonální proti-myší Ig protilátkou konjugovanou s peroxidázou a značila karbazolem (hnědě). Kontrastní barvení se provádělo hemalaunem (modře).

Obrázek 25: Fotografie ze světelného mikroskopu karcinomu tračnicku značeného myší izotypovou IgG2a kontrolou. Zmražené řezy o tloušťce 5 nm z tkáně z karcinomu tračnicku se inkubovaly s irelevantní myší IgG2a protilátkou jako negativní kontrolou (10 µg/ml). Detekce navázaných myších protilátek se prováděla polyklonální proti-myší Ig protilátkou konjugovanou s peroxidázou a značila karbazolem (hnědě). Kontrastní barvení se provádělo hemalaunem (modře).

Obrázek 26: Fotografie ze světelného mikroskopu karcinomu tračnicku značeného izotypovou IgG1 kontrolou. Zmražené řezy o tloušťce 5 nm z tkáně karcinomu tračnicku se inkubovaly s irelevantní myší IgG1 protilátkou jako negativní kontrolou (10 µg/ml). Detekce navázaných myších protilátek se prováděla polyklonální anti-myší Ig protilátkou konjugovanou s peroxidázou a značila karbazolem (hnědě). Kontrastní barvení se provádělo hemalaunem (modře).

Obrázek 27: Analýza epitopů myší protilátky M79 a lidských protilátek H79 a HD70, každá z nich je specifická pro lidský antigen 17-1A. Protilátky se inkubovaly s mřížkou uspořádaných peptidů obsahující 119 polypeptidů ze 13 aminokyselin, vždy posunutých o dvě aminokyseliny a pokrývajících celou extracelulární aminokyselinovou sekvenci lidského antigenu 17-1A. Peptidy byly kovalentně připojeny svými C-koncovými částmi na membránu Pep Spots (Jerini Biotools, Berlin) jako jednotlivé body. Navázaná myší M79 protilátka byla přímo detekována na membráně Pep Spots anti-myší imunoglobulinovou protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou (HRP), po které následovala detekce chemiluminiscencí. Signály, které jsou způsobeny díky reaktivitě sekundární protilátky samotné s jednotlivými peptidovými body, jsou ukázány na odpovídajícím kontrolním značení membrány Pep Spots. Po subtrakci základního pozadí se ukázalo, že značení v peptidovém bodě 87, peptidových bodech 38 a 95 představuje specifickou vazbu myší protilátky

M79. Kvůli vysokému stupni zkřížené reaktivity sekundární anti-lidské imunoglobulinové protilátky konjugované s HRP s několika peptidovými body, byly navázané lidské protilátky H79 a HD70 přeneseny z membrány Pep Spots na blotovací membránu pomocí elektropřenosu a následně detekovány uvedenou anti-lidskou sekundární protilátkou a chemiluminiscencí. Specifická vazba lidské protilátky H79 byla detekována hlavně v peptidových bodech 8, 11, 13, 14, 59-60, 77 a 79, ale v případě lidské protilátky HD70 nebyla detekována žádná vazba.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Konstrukce kombinačních protilátkových knihoven a fágová expozice

Knihovna DNA fragmentů Fd lehkého řetězce lidského imunoglobulinu (Ig) a Ig těžkého řetězce byla konstruována pomocí metody RT-PCR, se sadami primerů specifických pro řetězce kappa, lambda a Fd delta, z celkové RNA izolované z lymfocytů periferní krve (PBL) a vzorků kostní dřeně ze čtyř a deseti lidských dárců, podle Chomczynského (Analytical Biochemistry, 162, 156-159, 1987). Podle standardních metod byla syntetizována cDNA (Sambrook, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 2. vydání).

Byly vybrány následující sady primerů, které dávají vzniknout rozpoznávacím místům pro 5'- XhoI a 3'- SpeI na fragmentech těžkého řetězce a rozpoznávacím místům pro 5'- SacI a 3'- XbaI pro lehké řetězce:

Pro amplifikaci metodou PCR cDNA fragmentů Fd delta se pět různých specifických primerů pro 5'-VH-rodinu kombinovalo s jedním primerem pro 3'-CH1 delta, pro amplifikaci PCR fragmentů kappa (K) lehkého řetězce se pět různých specifických primerů pro 5'-VK-rodinu kombinovalo s jedním primerem 3'-CK a pro amplifikaci fragmentů

lambda (L) lehkého řetězce se pět různých specifických primerů pro 5'-VL-rodinu kombinovalo s jedním primerem 3'-CL.

Sady primerů pro amplifikaci DNA fragmentů Fab (5' až 3') jsou uvedeny v tabulce 1.

Pro amplifikaci byl použit následující program PCR:

Denaturace v 94 °C 15 s, nasedání primerů v 52 °C 50 s a prodloužení v 72 °C 90 s, 40 cyklů, po kterých následovalo konečné prodloužení v 72 °C 10 minut.

Tabulka 1: Sady primerů

Fd fragment těžkého řetězce:

5' primer:

VH1,3,5,7: AGGTGCAGCTGCTCGAGTCTGG

VH2: CAG(AG)TCACCTTGCTCGAGTCTGG

VH4: CAGGTGCAGCTGCTCGAGTCGGG

VH4B: CAGGTGCAGCTACTCGAGTGGGG

VH6: CAGGTACAGCTGCTCGAGTCAGG

3' primer:

CD1: TGCCTTACTAGTCTCTGGCCAGCGGAAGAT

Fragment řetězce kappa:

5' primer:

VK1: GAGCCGCACGAGCCCGAGCTCCAGATGACCCAGTCTCC

VK3: GAGCCGCACGAGCCCGAGCTCGTG(AT)TGAC(AG)CAGTCTCC

VK2/4: GAGCCGCACGAGCCCGAGCTCGTGATGAC(CT)CAGTCTCC

VK5: GAGCCGCACGAGCCCGAGCTCACACTCACGCAGTCTCC

VK6: GAGCCGCACGAGCCCGAGCTCGTGCTGACTCAGTCTCC

3' primer:

CK1D: GCGCCGTCTAGAATTAACACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTTTGTGACG
GGCGAACTCAG

Fragment řetězce lambda:5' primer:

VL1: AATTTTGAGCTCACTCAGCCCCAC
VL2: TCTGCCGAGCTCCAGCCTGCCTCCGTG
VL3: TCTGTGGAGCTCCAGCCGCCCTCAGTG
VL4: TCTGAAGAGCTCCAGGACCCTGTTGTGTCTGTG
VL5: CAGTCTGAGCTCACGCAGCCGCCC
VL6: CAGACTGAGCTCACTCAGGAGCCC
VL7: CAGGTTGAGCTCACTCAACCGCCC
VL8: CAGGCTGAGCTCACTCAGCCGTCTTCC

3' primer:

CL2: CGCCGTCTAGAATTATGAACATTCTGTAGG

450 ng fragmentů lehkého řetězce kappa (štěpených se SacI a XbaI) se ligovalo se 1400 ng fagemidu pComb3H (štěpeného se SacI a XbaI, velký DNA fragment) odvozeného z pComb (Barbas, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 88, 7978-7982, 1991), kde pozice těžkého řetězce již byla obsazena fragmentem Fd chimerizované myši protilátky M79 (obsahující CH1 lidského IgG1) namířenému proti extracelulární části proteinu 17-1A (viz obr. 1 pro klonovací místa pComb3H).

Výsledná kombinační protilátková DNA knihovna pak byla elektroporací transformována do 300 µl elektrokompetentních *Escherichia coli* XL1 Blue (2,5 kV, kyveta s roztečí elektrod 0,2 cm, 25 FD, 200 Ohm,

na přístroji Biorad Gene-Pulser), čímž vznikla knihovna o velikosti 4×10^7 nezávislých klonů. Po jedné hodině fenotypové exprese se vybíraly pozitivní transformanty podle rezistence na karbenicilin kódované vektorem pComb. Po adaptaci byly tyto klony infikovány infekční dávkou 1×10^{12} fágových částic pomocného fága VCSM13, což mělo za následek produkci a sekreci vláknitých fágů M13, z nichž každý obsahoval jednovláknovou pComb3H DNA kódující jeden lidský lehký řetězec a Fd segment chimérického M79 a exponoval na svém povrchu odpovídající Fab fragment jako translační fúzi neinfekční části obalového proteinu III fága (technika fágové expozice, "phage display"), viz obr. 2.

Tato fágová knihovna nesoucí klonovaný Fab repertoár se sklídila z tkáňového supernatantu pomocí precipitace s PEG8000/NaCl a stočením, resuspendovala se v TBS/1% BSA a inkubovala se s rekombinantním s17-1A imobilizovaným na 96 jamkových destičkách pro test ELISA. s17-1A byl připraven, jak je popsáno (Mack, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 92, 7021-7025, 1995). Fab fágy, které se nenavázaly specificky na cílový antigen, se odstranily až deseti promývacími kroky s TBS/0,5% Tween. Ty, co se navázaly, byly eluovány s použitím HCl-glycinu, pH 2,2, a po neutralizaci eluátu s 2 M Tris, pH 12, se použily k infekci kultury nových neinfikovaných *E. coli* XL1 Blue. Buňky úspěšně transdukované kopii fagemida pComb, kódující Fab fragment vázající antigen, byly opět vybírány podle rezistence na karbenicilin a pak infikovány pomocným fágem VCSM13, aby se začalo druhé kolo expozice protilátek a *in vitro* selekce.

Po pěti kolech produkce a selekce Fab fágů vázajících antigen byla izolována plazmidová DNA obsahující vybraný Fab repertoár.

Pro produkci rozpustných Fab proteinů byl z plazmidů vyňat DNA fragment genu III, a tak se zrušila translační fúze Fd segmentu těžkého řetězce s proteinem genu III. Po opětné ligaci se tato skupina plazmidové DNA transformovala do 100 μ l *E. coli* XL1 Blue, které byly učiněny kompetentními tepelným šokem, a byly vysety na LB agar s karbenicilinem (Carb). Jednotlivé kolonie se pěstovaly v 10 ml kulturách LB-Carb /20 mM

MgCl₂ a exprese Fab se indukovala po šesti hodinách přidáním isopropyl- β -D-thiogalaktosidu (IPTG) do konečné koncentrace 1 mM. Tato *in vitro* selekce, jakož i exprese rozpustných fragmentů Fab, se prováděla podle Burtona (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 88, 10134-10137, 1991). Buňky se sklízely po 20 hodinách, periplazmatické izolace se prováděly čtyřmi koly zmrazení (etanol/suchý led) a rozmrazení (37 °C) a testovaly se pomocí testu ELISA na přítomnost Fab fragmentů vázajících se k s17-1A. Vazebnou aktivitu vykazalo 23 klonů z 27. Po sekvencování se ukázalo, že dva klony s nejsilnějším signálem (viz obr. 3) mají totožné řetězce kappa a byly nazvány k8, viz obr. 6.

Tento lidský lehký řetězec kappa k8 byl nyní použit jako vazebný partner pro skupinu těžkého řetězce lidského Ig delta, 2250 ng DNA Fd fragmentů lidského těžkého řetězce delta (štěpených s XhoI a SpeI) se ligovalo se 7000 ng fagemidového vektoru pComb3H (štěpeného s XhoI a SpeI, velký DNA fragment) obsahujícího DNA fragment k8 v pozici lehkého řetězce.

Výběr repertoáru lidského řetězce delta jako zdroje pro variabilní oblasti těžkého řetězce, které se specificky vážou na antigen 17-1A, jsou-li spojeny s lehkým řetězcem k8, se jevílo jako nejvhodnější. Řetězce delta jsou produkovány pouze ve zralých naivních a pro autoantigen specifických anergních B buňkách, které ještě nepodstoupily proliferaci nebo proliferovaly nebudou, proto je diverzita jejich repertoáru těžkých řetězců vyšší a výskyt jedné každé specifity ve srovnání s repertoárem těžkých řetězců jiných imunoglobulinových izotypů je nižší.

Transformace knihovny Fd fragmentů pComb-k8-delta do celkem 1500 μ l E. coli XL1 Blue pěti stejnými elektroporacemi (2,5 kV, 0,2 cm kyveta, 25 FD, 200 Ohm) vedla ke konečnému počtu $1,1 \times 10^9$ nezávislých klonů.

In vitro selekce této kombinační protilátkové knihovny se prováděla, jak je popsáno výše pro repertoár lidských lehkých řetězců. Po čtyřech kolech „rýžování“ byly z osmi klonů připraveny rozpustné Fab fragmenty.

Periplazmatické preparáty se testovaly ELISA. Jeden z klonů vykázal silnou vazbu antigenu (viz. Pbr. 4). Tento klon byl nazván D4.5 a DNA Fd delta fragmentu se sekvencovala s reverzním primerem specifickým pro delta CH1 (viz obr. 7).

Další Fab fragment vázající s17-1A se izoloval po dalších kolech „rýžování“, poprvé se objevil v sedmém kole s výrazně slabším signálem v testu ELISA ve srovnání s D4.5 (viz obr. 4). Klon byl označen D7.2 a opět se určila sekvence DNA s použitím primeru specifického pro delta (viz obr. 8).

Aby se identifikovaly další partneři lehkých řetězců, kteří se spojují s Fd segmentem těžkého řetězce delta za vzniku Fab fragmentu specifického pro 17-1A, prováděl se pokus s přestavbou ("reshuffling"):

450 ng fragmentů lidského lehkého řetězce kappa a 450 ng fragmentů lidského lehkého řetězce lambda (oba štěpené se SacI a XbaI) se zvlášť ligovaly se 1400 ng fagemidu pComb3H (štěpeného se SacI a XbaI, velký DNA fragment), kde pozice těžkého řetězce již byla obsazena D4.5 Fd fragmentem.

Každá z výsledných kombinačních protilátkových knihoven (kappa a lambda) pak byla elektroporací transformována do 300 μ l elektrokompetentních *Escherichia coli* XL1 Blue (2,5 kV, 0,2 cm kyveta, 25 FD, 200 Ohm, na přístroji Biorad gene-pulser), což mělo za následek knihovnu o velikosti $0,5 \times 10^7$ nezávislých klonů pro knihovnu kappa a $1,4 \times 10^7$ nezávislých klonů pro knihovnu lambda. Po jedné hodině fenotypové exprese se vybíraly pozitivní transformanty podle rezistence na karbenicilin kódované vektorem pComb. Po adaptaci byly tyto klony infikovány infekční dávkou 1×10^{12} fágových částic pomocného fága VCSM13, což mělo za následek produkci a sekreci vláknitých fágů M13, z nichž každý obsahoval jednovláknovou pComb3H DNA kódující jeden lidský lehký řetězec a D4.5 Fd segment těžkého řetězce a exponoval na svém povrchu odpovídající Fab fragment jako translační fúzi neinfekční části obalového proteinu III fága.

Obě fágové knihovny nesoucí klonované Fab repertoáry (kappa a lambda) se sklídily z tkáňového supernatantu pomocí precipitace s PEG8000/NaCl a stočením, resuspendovala se v TBS/1% BSA a inkubovala se s rekombinantním s17-1A imobilizovaným na 96jamkových destičkách pro test ELISA. Fab fágy, které se nenavázaly specificky na cílový antigen, se odstranily až deseti promývacími kroky s TBS/0,5% Tween. Ty, co se navázaly, z obou knihoven (kappa a lambda), byly eluovány s použitím HCl-glycinu, pH 2,2, a po neutralizaci eluátu s 2M Tris, pH 12, se použily k infekci kultur nových neinfikovaných *E. coli* XL1 Blue, jedna kultura pro knihovnu kappa a druhá pro knihovnu lambda. Buňky úspěšně transdukované kopii fagemida pComb, kódující Fab fragment vázající antigen, byly opět vybírány podle rezistence na karbenicilin a pak infikovány pomocným fágem VCSM13, aby se začalo druhé kolo expozice protilátek a *in vitro* selekce.

Po pěti kolech produkce a selekce Fab fágů vázajících antigen se izolovala plazmidová DNA obsahující vybraný Fab repertoár z každého kola „rýžování“.

Pro produkci rozpustných Fab proteinů byl z plazmidů vyňat DNA fragment genu III, a tak se zrušila translační fúze Fd segmentu těžkého řetězce s proteinem genu III. Po opětovné ligaci se tato skupina plazmidové DNA transformovala do 100 μ l *E. coli* XL1 Blue, které byly učiněny kompetentními tepelným šokem, a byly vysety na LB agar s karbenicilinem (Carb). Jednotlivé kolonie se pěstovaly v 10 ml kulturách LB-Carb /20 mM $MgCl_2$ a exprese Fab se indukovala po šesti hodinách přidáním isopropyl- β -D-thiogalaktosidu (IPTG) do konečné koncentrace 1 mM. Buňky se sklízely po 20 hodinách, periplazmatické izolace se prováděly zmražením a rozmražením a testovaly se pomocí testu ELISA na přítomnost Fab fragmentů vázajících se k s17-1A.

Celkově se testovalo 45 klonů z knihovny kappa a 45 klonů z knihovny lambda pocházejících hlavně z pátého kola „rýžování“, ale do menší míry také z jiných kol, na vazbu antigenu 17-1A. Pouze jeden klon označený k5.1 (knihovna kappa), který se objevil v 5. Kole, vykazoval

vazebnou aktivitu (viz obr. 5). Určila se sekvence DNA V-oblasti kappa k5.1 (viz obr. 9).

Příklad 2

Bakteriální exprese v *E. coli* XL1 Blue

Jak bylo již dříve uvedeno v příkladu 1, *E. coli* XL1 Blue transformované s pComb3H obsahující jeden lehký řetězec a Fd segment jednoho těžkého řetězce produkují po vynětí fragmentu genu III a indukci s IPTG rozpustnou Fab v dostatečném množství. Fd segment těžkého řetězce a lehký řetězec jsou přesunovány do periplazmy, kde se spojují a tvoří funkční Fab fragmenty.

Pro lepší periplazmatické preparáty se buňky pěstovaly v médiu SB doplněném o 20 mM MgCl₂ a po sklizení se resuspendovaly v BS. Čtyřmi koly zmrazování v -70 °C a rozmrazování v 37 °C se tepelným šokem porušila vnější membrána bakterií a rozpustné periplazmatické proteiny obsahující Fab fragmenty byly uvolněny do supernatantu. Po odstranění neporušených buněk a buněčného detritu stočením se odebraly supernatanty obsahující protilátkové Fab fragmenty a použily se pro další práci.

Nejdříve se testovaly periplazmatické preparáty k8-D4.5-Fab a k5.1-D4.5-Fab na vazbu k imobilizovanému antigenu s17-1A, oba vykazaly silné ELISA signály (viz příklad 1).

Detekce k8-D4.5- a k5.1-D4.5-Fab fragmentů navázaných k imobilizovanému antigenu s17-1A se prováděla s použitím polyklonální biotinylované protilátky proti lidskému lehkému řetězci kappa (1 µg/ml PBS) detekované avidinem s konjugovanou křenovou peroxidázou (1 µg/ml PBS). Signál se vyvolal přidáním substrátového roztoku obsahujícího 2,2' azino-bis(3-etylbenz-thiazolin-6-sulfonovou kyselinu) a peroxoboritan sodný s detekoval se ve vlnové délce 405 nm.

Test vazby dvou 17-1A pozitivních lidských Fab fragmentů (k8-D4.5-Fab a k5.1-D4.5-Fab) na buňky Kato (buněčná linie karcinomu žaludku exprimující 17-1A), buňky CHO transfekované 17-1A (CHO/17-1A) a netransfekované buňky CHO, se opět prováděl na periplazmatických preparátech. Transfekované buněčné linie CHO se tvořily subklonováním DNA fragmentu kódujícího úplnou aminokyselinovou sekvenci antigenu 17-1A, známého také jako GA733-2 (Szala, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87, 3542-3546, 1990), do eukaryotického expresního vektoru pEF-DHFR (Mack, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 92, 7021-7025, 1995) podle standardních postupů (Sambrook, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. vydání, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989). Výsledný plazmid se linearizoval s NdeI a transfekoval do DHFR deficitních CHO buněk pro trvalou expresi. Exprese transmembránového 17-1A se zvýšila postupnou genovou amplifikací vyvolanou posloupným přidáváním stoupajících koncentrací inhibitoru DHFR metotrexátu (MTX) do konečné koncentrace 500 nM, rozdíly mezi jednotlivými koncentracemi byly 20 nM a 100 nM (Kaufmann, Methods Enzymol., 185, 537-566, 1990).

200 000 buněk (buněk Kato, CHO/17-1A nebo CHO) se inkubovalo s jedním z periplazmatických preparátů obsahujících relevantní nebo irelevantní Fab, po které následovala biotinylovaná polyklonální anti-lidská protilátka lehkého řetězce kappa (20 µg/ml PBS) a streptavidin konjugovaný s FITC. Značené buňky se pak analyzovaly průtokovou cytometrií.

Periplazmatické preparáty obsahující k8-D4.5-Fab a k5.1-D4.5-Fab vykazovaly zřetelné signály ve srovnání s irelevantním periplazmatickým preparátem (negativní kontrola), ale netransfekované CHO buňky značeny nebyly, což dokazovalo specifčnost na antigen 17-1A. Jako pozitivní kontrola pro buňky 17-1A pozitivní byla použita protilátka anti-17-1A M79 (Göttlinger, Int. J. Cancer, 38, 47-53, 1986) a myši IgG2a protilátka jako izotypová kontrola (viz obr. 10 a 11).

Příklad 3

Eukaryotická exprese v buňkách CHO

Bakterie obvykle nejsou schopné produkovat kompletní funkční imunoglobuliny, ačkoliv exprimují funkční Fab fragmenty.

Pro produkci kompletních funkčních protilátek se musí použít savčí buňky, a proto byly lehký řetězec k8 a variabilní doména těžkého řetězce D4.5 subklonovány do savčích expresních vektorů.

a) Lehké řetězce (k8 a k5.1):

Aby vznikla vhodná koncová restrikční místa, byly DNA fragmenty k8 a k5.1 znovu amplifikovány pomocí PCR, čímž vznikly fragmenty kappa s místem Bsu36I na 5' konci, a také místa Sall a NotI na 3' konci.

Tyto fragmenty (k8 a k5.1) byly subklonovány do plazmidu BSPOLL pomocí Bsu36I a NotI, tak se přidaly savčí vedoucí sekvence, a pak byly sekvencovány, aby se zabránilo mutacím vyvolaným PCR.

S použitím EcoRI a Sall, k8 a k5.1 byly vyňaty z BSPOLL a subklonovány do eukaryotického expresního vektoru pEF-ADA (viz obr. 12) odvozeného z expresního vektoru pEF-DHFR (Mack, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 92, 7021-7025, 1995) nahrazením cDNA kódující myší dihydrofolátreduktázu (DHFR) cDNA kódující myší adenosindeaminázu (ADA).

Pro každý druh lehkého řetězce (k8 a k5.1) bylo 10^7 buněk CHO transfekováno se 100 μ g linearizované plazmidové DNA a pak pěstováno v podmínkách vybraných dle aktivity adenosindeaminázy (ADA) kódované expresním vektorem.

Přežívající ADA pozitivní buňky se pěstovaly pro další transfekci s těžkými řetězci nesoucími variabilní doménu D4:5 nebo D7.2.

b) Variabilní doména 4.5 těžkého řetězce:

Z Fd fragmentu D4.5 delta se opět amplifikovala variabilní oblast pomocí PCR za vzniku restrikčních míst Bsu36I na obou koncích.

Výsledný DNA fragment V-D4.5 byl pak subklonován s použitím stejných restrikčních míst do eukaryotického expresního vektoru pEF-DHFR již obsahujícího eukaryotickou vedoucí sekvenci, jakož i DNA fragment kódující konstantní oblast těžkého řetězce lidského IgG1 (viz obr. 13). Variabilní oblast D4.5 těžkého řetězce tak byla vložena mezi vedoucí sekvenci a konstantní oblast těžkého řetězce.

Variabilní oblast se sekvencovala a kompletní klon byl označen H79V-D4.5 hu IgG1.

Pro pozdější značení tkání byla konstantní oblast těžkého řetězce lidského IgG1 nahrazena konstantní oblastí těžkého řetězce myšího IgG1 s použitím XbaI pro subklonování. Tento plazmid byl označen H79V-D4.5 MIgG1.

Každá z obou variant D4.5 těžkého řetězce, lidský a myší IgG1, byla transfekována do 10^7 CHO buněk, které již exprimovaly lehký řetězec k8. Varianta lidského IgG1 byla také transfekována do buněk CHO exprimujících lehký řetězec k5.1. Pro transfekci těžkého řetězce bylo použito 100 μ g linearizované plazmidové DNA.

Variabilní oblast Fd fragmentu D7.2 těžkého řetězce byla také subklonována do pEF-DHFR za vzniku plazmidu exprimujícího těžký řetězec lidského IgG1, jak je popsáno pro VD4.5. tento expresní plazmid byl pak transfekován do buněk CHO, které již exprimovaly lehký řetězec k8, jak je popsáno výše pro H79V-D4.5 hu IgG1.

Transfekované buňky byly podrobeny selekci dle aktivity ADA a DHFR, jak bylo popsáno (Kaufmann, Methods Enzymol., 185, 537-566, 1990).

Výsledné buněčné linie byly označeny H79-huIgG1 (VD4.5huIgG1-k8), H79-MIgG1 (VD4.5MIgG1-k8), D7.2 (VD7.2huIgG1-k8) a HD70 (VD4.5huIgG1-k5.1).

Supernatanty ze čtyř různých konfluentních 30 ml tkáňových kultur starých tři dny, z nichž každá produkovala jednu ze čtyř anti-17-1A-protilátek (H79-huIgG1, H79-MIgG1, D7.2 a HD70), se testovaly pomocí ELISA na vazbu k imobilizovanému s17-1A. Kromě D7.2, která vykazovala v testu ELISA slabý signál, tři ostatní protilátky prokázaly silné signály, o nichž se usoudilo, že představují vazebnou afinitu v rozsahu myší protilátky M79.

Produkce protilátek ve velkém měřítku se prováděla v rotačních lahvích s použitím 500 ml média.

Protilátky H79-huIgG1, D7.2 a HD70 se purifikovaly s použitím afinitní kolony proteinu A. Protilátka H79-MIgG1 se purifikovala pomocí afinitní chromatografie s anti-myším IgG.

Čistota a molekulová hmotnost rekombinantních protilátek se určovala pomocí SDS-PAGE v redukčních a neredukčních podmínkách (obr. 14 a 15).

Purifikace proteinů a SDS-PAGE se prováděly podle standardních postupů.

Příklad 4

Funkční analýza protilátek H79 a HD70

IV.1. Test na imobilizovaném antigenu

Supernatant z konfluentní 30 ml tkáňové kultury transfektant lidského a myšího IgG1 staré tři dny, jakož i odpovídající preparáty purifikované protilátky, se testovaly na vazbu na imobilizovaný s17-1A pomocí ELISA a srovnávaly se s myší M79 anti-17-1A protilátkou. Detekce se prováděla, jak je popsáno ve II.

Ukázalo se, že protilátky H79 (varianty huIgG1 a MIgG1) a HD70 mají velmi podobné vazebné afinity v rozsahu myší M79.

IV.2. Určení afinit

Měření povrchovou plazmonovou rezonancí se provádělo za použití zařízení BIACORE 2000 (Biacore AB, Freiburg, Německo). Imobilizace rekombinantního rozpustného antigenu 17-1A v každé průtokové komůrce a analýza interakce se prováděly automatickým způsobem v BIACORE 2000. Antigen se kovalentně navázal k senzorovému čipu CM5 prostřednictvím primárních aminových skupin. Po aktivaci karboxylované dextranové matrix senzorového čipu CM5 jednou injekcí 80 μ l 0.1 M N-hydroxysukcinimidu/0,4 M N-etyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-karbodiimidu (NHS/EDC9) do všech čtyřech průtokových komůrek, byly průtokové komůrky 1, 2, 3 a 4 postupně zapojeny do průtokové dráhy v průběhu vtrikování antigenu s17-1A (60 μ g/ml v 10 mM acetátu sodném, pH 4,7). Různé kontaktní časy 17-1A s aktivovaným povrchem vedly k přibližně 2500 jednotkám odpovědi (RU) (9 RU v průtokové komůrce 1, 1400 RU v průtokové komůrce 2, 780 RU v průtokové komůrce 3 a 290 RU v průtokové komůrce 4). Přebytek aktivovaných esterů se blokoval injekcí 85 μ l 1 M etanolaminu pH 5 do všech čtyřech průtokových komůrek. Vazebné pokusy se prováděly v 25 °C v pufru pH 7,4 obsahujícím 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA a 0,005% surfaktant P20. Vazebná kinetika protilátek k imobilizovanému rekombinantnímu 17-1A se určovala injikováním koncentrací protilátek v rozmezí od 0,5 do 2 μ M. Senzorový čip se regeneroval mezi každým během 100 mM glycinem, 500 mM NaCl, 0,005% Tweenem pH 3. Asociační a disociační rychlostní konstanty, K_{on} a K_{off} se analyzovaly s použitím vyhodnocovacího programu BIA od Biacore AB, jak popsáno (Karlsson, J. Immunol. Meth., 145, 229-240, 1991).

Prováděly se dvě sady afinitních determinant (1. sada: M79, H79, D7.2, Panorex, 2. sada: Panorex, HD70), myši Panorex byl také zahrnut do 2. sady jako vnitřní reference.

Ukázalo se, že K_D D7.2 je pod minimální detekční hodnotou 10^{-4} M a není proto ukázána v tabulce 2.

Tabulka 2

Rychlosti K_D , K_{on} a K_{off} lidských a relevantních myších protilátek 17-1A

Protilátka	K_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	K_{off} (s^{-1})	K_D (M)
1. sada			
myší M79	$6,0 \times 10^4$	$4,5 \times 10^{-2}$	$7,5 \times 10^{-7}$
lidská H79	$2,1 \times 10^4$	$7,2 \times 10^{-3}$	$3,4 \times 10^{-7}$
myší Panorex	$1,1 \times 10^5$	$2,2 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-7}$
2. sada			
lidská HD70	$0,9 \times 10^5$	$3,5 \times 10^{-2}$	$3,9 \times 10^{-7}$
myší Panorex	$1,0 \times 10^5$	$2,7 \times 10^{-2}$	$2,7 \times 10^{-7}$

IV.3. Průtoková cytometrie eukaryotických buněk exprimujících 17-1A

Purifikované protilátkové preparáty H79 (varianta lidského a myšího IgG1), HD70 (lidský IgG1) a D7.2 (lidský IgG1) se testovaly analýzou FACS na buňkách Kato exprimujících 17-1A, buňkách CHO transfekovaných 17-1A a netransfekovaných buňkách CHO.

2×10^5 buněk se inkubovalo s purifikovanými protilátkami H79-huIgG1, H79-MIgG1, HD70, D7.2, M79, Panorex, M74ch (= lidský CHIgG1 lidské C kappa varianty myší anti-17-1A protilátky M74 (Göttlinger, Int. J. Cancer, 38, 47-53, 1986)), myší IgG2a, myší IgG1 nebo lidský IgG1 ($20 \mu g/ml$ každé protilátky). Detekce protilátek navázaných na buňky se

prováděla s protilátkami (každá 20 $\mu\text{g/ml}$) proti-myším IgG nebo proti-lidským IgG značenými FITC. Inkubace se prováděla 45-60 minut na ledu.

H79 lidský IgG1, H79 myši IgG1 a HD70 vykázaly jasnou vazbu na 17-1A pozitivní buňky, jakož i M79 a Panorex. D7.2 ukázal slabou, ale významnou vazbu na 17-1A pozitivní buňky. Žádná protilátka se nenavázala na netransfekované buňky CHO a IgG kontroly byly negativní na buňkách Kato, buňkách CHO/17-1A a netransfekovaných buňkách CHO (viz obr. 16 a 17).

IV.4. Buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (uvolňování ^{51}Cr)

Pro uvolňování ^{51}Cr byly jako efektorové buňky izolovány mononukleární buňky lidské periferní krve (PBMC) zdravých dárců z čerstvě připravené vrstvy sražených buněk. PBMC se oddělily stočením na hustotním gradientu Ficollu s následným stočením ve 100 x g. Nestimulované PBMC (5×10^5 buněk) se přidaly do objemu 100 μl média RPMI 1640 s 10% FCS do každé jamky na mikrotitrační destičce s plochým dnem a inkubovaly přes noc v 37 °C. Cílové buňky se značily 2 hodiny s ^{51}Cr . Značené cílové buňky (100 μl) a protilátky v různých koncentracích (50 μl) se přidaly k PBMC a inkubovaly 18 hodin v 37 °C. Odpovídající nevázející izotypy byly použity jako negativní kontroly. Specifická lýze se počítala jako $((\text{cpm, uvolňování během pokusu}) - (\text{cpm, spontánní uvolňování})) / ((\text{cpm, maximální uvolňování}) - (\text{cpm, spontánní uvolňování}))$. (cpm – "counts per minute" = impulsy za minutu).

V tomto testu uvolňování ^{51}Cr se prokázalo, že lidské anti-17-1A protilátky H79 a HD70 zprostředkovávají vysokou cytotoxicitu pro 17-1A pozitivní buněčnou linii Kato ze žaludečního karcinomu. Ukázalo se, že myši anti-17-1A protilátky M79 a Panorex zprostředkovávají usmrcování buněk na zřetelně nižší úrovni.

IV.5. Test na lidských tkáních

Zmražené řezy o tloušťce 5 nm z tkáně karcinomu tračníku a z tkáně normální sliznice tračníku se inkubovaly s myší IgG variantou protilátky H79 (10 µg/ml). V tomto pokusu byla použita myší IgG1 varianta protilátky H79, aby se zabránilo nespecifickému značení způsobenému přítomností lidského imunoglobulinu v lidské tkáni. Detekce navázané H79MIgG1 se prováděla polyklonální anti-myší Ig protilátkou konjugovanou s peroxidázou a značila karbazolem. Kontrastní barvení se provádělo hemalaunem.

Výsledky se vyhodnocovaly světelným mikroskopem.

H79MIgG1 a také myší monoklonální protilátka M79 (pozitivní kontrola) vykazaly silné značení v normální sliznici tračníku (M79, obr. 19, H79MIgG1, obr. 20) a slabší značení v buňkách karcinomu tračníku (M79, obr. 21, H79MIgG1, obr. 22). Na rozdíl od toho izotypové kontroly nevykazaly žádné značení v tkáních sliznice tračníku a karcinomu tračníku (M79, obr. 23 a 25 a H79MIgG1, obr. 24 a 26).

Příklad 5

Analýza epitopů H79 a HD70

Pro srovnání 17-1A epitopů rozpoznávaných lidskými protilátkami H79 a HD70 a myší templátovou protilátkou M79 byly syntetizovány 13-merní peptidy odvozené z aminokyselinové sekvence extracelulární části antigenu 17-1A jako jednotlivé body na membráně Pep Spots. Tyto peptidy pokrývají veškerou extracelulární aminokyselinovou sekvenci antigenu 17-1A (jak byla definován autorem Szala, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87, 3542-3546, 1990) tak, že se překrývají v 11 aminokyselinách s každým sousedním peptidem, kdy první aminokyselina peptidu 1 je totožná s N-koncovou aminokyselinou antigenu 17-1A a poslední aminokyselina peptidu 119 je totožná s C-koncovou aminokyselinou extracelulární části antigenu 17-1A (tab. 3).

Tabulka 3

Syntetizované peptidy (čísla odpovídají číslům peptidových bodů)

- | | |
|-------------------|-----------------|
| 1. TATFAAAQEECV | 2. TFAAAQEECV |
| 3. AAAQEECV | 4. AQEECV |
| 5. EECV | 6. CV |
| 7. CENYK | 8. NYK |
| 9. KLVNCFV | 10. AVNCFV |
| 11. NCFV | 12. FV |
| 13. NNNRQCQCTSV | 14. NRQCQCTSV |
| 15. QCQCTSVGAQNTV | 16. QCTSVGAQNTV |
| 17. TSVGAQNTVICS | 18. VGAQNTVICS |
| 19. AQNTVICS | 20. NTVICS |
| 21. VICS | 22. CS |
| 23. KLA | 24. AAK |
| 25. KCLVMKAEMNGSK | 26. LVMKAEMNGSK |
| 27. MKAEMNGSKLGR | 28. AEMNGSKLGR |
| 29. MNGSKLGRRAKPE | 30. GSKLGRRAKPE |
| 31. KLGRRAKPE | 32. GRRAKPE |
| 33. RAKPE | 34. KPE |
| 35. EGALQNNDGLYDP | 36. ALQNNDGLYDP |
| 37. QNNDGLYDPDCDE | 38. NDGLYDPDCDE |
| 39. GLYDPDCDESGLF | 40. YDPDCDESGLF |
| 41. PDCDESGLFKAKQ | 42. CDESGLFKAKQ |
| 43. ESGLFKAKQCNGT | 44. GLFKAKQCNGT |
| 45. FKAKQCNGTSTCW | 46. AKQCNGTSTCW |
| 47. QCNGTSTCWC | 48. NGTSTCWC |
| 49. TSTCWC | 50. TCWC |
| 51. WCVNTAGVRR | 52. VNTAGVRR |
| 53. TAGVRR | 54. GVR |
| 55. RRTDKDTEITCSE | 56. TDKDTEITCSE |
| 57. KDTEITCSE | 58. TEITCSE |
| 59. ITCSE | 60. CSE |
| 61. ERV | 62. VRT |
| 63. TYW | 64. W |
| 65. IELKHKAREKPY | 66. ELKHKAREKPY |
| 67. KHKAREKPYDSKS | 68. KAREKPYDSKS |
| 69. REKPYDSKSLRTA | 70. KPYDSKSLRTA |
| 71. YDSKSLRTALQKE | 72. SKSLRTALQKE |
| 73. SLRTALQKEITR | 74. RTALQKEITR |
| 75. ALQKEITTRYQLD | 76. QKEITTRYQLD |
| 77. EITTRYQLDPKFI | 78. TTRYQLDPKFI |

79. RYQLDPKFITSIL
 81. DPKFITSILYENN
 83. ITSILYENNVITI
 85. LYENNVITIDLVQ
 87. NVITIDLVQNSSQ
 89. IDLVQNSSQKTQN
 91. QNSSQKTQNDVDI
 93. QKTQNDVDIADVA
 95. NDVDIADVAYYFE
 97. IADVAYYFEKDVK
 99. AYYFEKDVKGESL
 101. EKDVKGESLFHSHK
 103. KGESLFHSHKKMDL
 105. LFHSHKKMDLTVNG
 107. KKMDLTVNGEQLD
 109. LTVNGEQLDLDPG
 111. GEQLDLDPGQTLI
 113. DLDPGQTLIYYVD
 115. GQTLIYYVDEKAP
 117. IYYVDEKAPEFSM
 119. DEKAPEFSMQGLK

80. QLDPKFITSILYE
 82. KFITSILYENNVII
 84. SILYENNVITIDL
 86. ENNVITIDLVQNS
 88. ITIDLVQNSSQKT
 90. LVQNSSQKTQNDV
 92. SSQKTQNDVDIAD
 94. TQNDVDIADVAYY
 96. VDIADVAYYFEKD
 98. DVAYYFEKDVKGESL
 100. YFEKDVKGESLFH
 102. DVKGESLFHSHKKM
 104. ESFLHSHKKMDLTV
 106. HSHKKMDLTVNGEQ
 108. MDLTVNGEQLDL
 110. VNGEQLDLDPGQT
 112. QLDLDPGQTLIYY
 114. DPGQTLIYYVDEK
 116. TLIYYVDEKAPEF
 118. YVDEKAPEFSMQG

Membrána Pep Spots se syntetizovanými peptidy se třepala 10 minut v metanolu a pak se promývala třikrát po deseti minutách v pufru TBS pH 8. Pak se membrána blokovala jednu hodinu blokovacím roztokem na bázi kaseinu, který obsahoval 0,05 g/ml sacharózy, a pak se znovu třepala v TBS pH 8/0,05% Tween 20 (TBS-T). Každá z protilátek 17-1A se inkubovala při teplotě místnosti spolu s membránou tři hodiny v blokovacím roztoku (1 µg protilátky/ml). Po třech promytích v TBS-T, každé deset minut, se spolu s membránou inkubovala dvě hodiny při teplotě místnosti sekundární protilátka (proti-myší/proti-lidská, 1 µg/ml blokovacího roztoku) konjugovaná s křenuvou peroxidázou (HRP). Pak se membrána promývala třikrát deset minut v TBS-T. Detekce navázaných protilátek se prováděla v případě M79 přímo na membráně Pep Spots podle protokolu výrobce chemiluminiscenčního kitu (Boehringer). Vyvolané filmy jsou ukázány na obr. 27. Membrána se regenerovala po třech promytích

s TBS-T (10 minut) v roztoku obsahujícím 50 mM Tris-HCl pH 6,7, 100 mM 2-merkaptoetanol a 2% (w/v) SDS 30 minut v 50 °C a pak použila znovu pro mapování epitopu další protilátky.

Kvůli vysokému stupni nespecifické vazby proti-lidské imunoglobulinové sekundární protilátky k polypeptidovým bodům na membráně, se v případě HD70 a H79 prováděl frakcionovaný elektropřenos na druhou přenosovou membránu následovaný detekcí s proti-lidskou sekundární protilátkou podle Rüdiger (EMBO, 16, 1501-1507, 1997). Inkubace se sekundární protilátkou a detekce protilátky na membránách se prováděla, jak je popsáno výše. Vyvolané filmy jsou ukázány na obr. 27.

Jak je na tomto obrázku ukázáno (obr. 27), výsledky mapování epitopů založeného na peptidech naznačují, že epitop rozpoznávaný myší templátovou protilátkou M79, představovaný převážně peptidovými body 38 a 95, se pronikavě liší od epitopu rozpoznávaného lidskou protilátkou H79, představovanou převážně peptidovými body 8, 11, 13, 14, 59-60, 77 a 79. Protože lidská protilátka HD70 vůbec neukázala detekovatelnou vazbu, může se dále předpokládat, že se její epitop také liší od epitopu myší protilátky M79 a že epitopy lidských protilátek H79 a HD70 také nejsou totožné.

Nepřítomnost detekovatelných vazebných signálů v případě lidské protilátky HD70 se může vysvětlit jejím možným rozpoznáváním buď konformačního, spojitého nebo nespojitého epitopu nebo epitopu částečně nebo úplně sestávajícího ze sacharidu, v každém případě lze těžko očekávat napodobení takových epitopů krátkými peptidy.

Přehled sekvencí

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 1:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 22 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

- (A) POPIS: /desc = „primer“

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

AGGTGCAGCT GCTCGAGTCT GG

22

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 2:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 24 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

- (A) POPIS: /desc = „primer“

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

CAGAGTCACC TTGCTCGAGT CTGG

24

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 3:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

- (A) POPIS: /desc = „primer“

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

CAGGTGCAGC TGCTCGAGTC GGG

23

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 4:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(A) POPIS: /desc = „primer“

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

CAGGTGCAGC TACTCGAGTG GGG

23

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 5:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(A) POPIS: /desc = „primer“

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

CAGGTACAGC TGCTCGAGTC AGG

23

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 6:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(A) POPIS: /desc = „primer“

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

TGCCTTACTA GTCTCTGGCC AGCGGAAGAT 30

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 7:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(A) POPIS: /desc = „primer“

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

GAGCCGCACG AGCCCGAGCT CCAGATGACC CAGTCTCC 38

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 8:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 40 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(A) POPIS: /desc = „primer“

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

GAGCCGCACG AGCCCGAGCT CGTGATTGAC AGCAGTCTCC 40

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 9:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = „primer“

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

GAGCCGCACG AGCCCGAGCT CGTGATGACC TCAGTCTCC 39

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 10:

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

- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = „primer“

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

GAGCCGCACG AGCCCGAGCT CACACTCAG CAGTCTCC 38

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 11:

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

- (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
 - (A) POPIS: /desc = „primer“

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

GAGCCGCACG AGCCCGAGCT CGTGCTGACT CAGTCTCC 38

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 12:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 58 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina

TCTGCCGAGC TCCAGCCTGC CTCCGTG 27

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 15:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

- (A) POPIS: /desc = „primer“

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

TCTGTGGAGC TCCAGCCGCC CTCAGTG

27

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 16:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 33 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

- (A) POPIS: /desc = „primer“

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

TCTGAAGAGC TCCAGGACCC TGTTGTGTCT GTG

33

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 17:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 24 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

- (A) POPIS: /desc = „primer“

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

CAGTCTGAGC TCACGCAGCC GCCC

24

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 18:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 24 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

- (A) POPIS: /desc = „primer“

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

CAGACTGAGC TCACTCAGGA GCCC

24

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 19:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 24 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

- (A) POPIS: /desc = „primer“

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

CAGGTTGAGC TCACTCAACC GCCC

24

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 20:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

- (A) POPIS: /desc = „primer“

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

CAGGCTGAGC TCACTCAGCC GTCTTCC

27

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 21:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

- (A) POPIS: /desc = „primer“

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

CGCCGTCTAG AATTATGAAC ATTCTGTAGG

30

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 22:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

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

Thr	Ala	Thr	Phe	Ala	Ala	Ala	Gln	Glu	Glu	Cys	Val	Cys
1				5						10		

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 23:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

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

Thr	Phe	Ala	Ala	Ala	Gln	Glu	Glu	Cys	Val	Cys	Glu	Asn
1				5						10		

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 24:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 - (B) TYP: aminokyselina
 - (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

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

Ala	Ala	Ala	Gln	Glu	Glu	Cys	Val	Cys	Glu	Asn	Tyr	Lys
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 25:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 - (B) TYP: aminokyselina
 - (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

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

Ala	Gln	Glu	Glu	Cys	Val	Cys	Glu	Asn	Tyr	Lys	Leu	Ala
1				5				10				

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 26:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 - (B) TYP: aminokyselina
 - (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

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

Glu	Glu	Cys	Val	Cys	Glu	Asn	Tyr	Lys	Leu	Ala	Val	Asn
1				5				10				

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 27:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

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

Cys	Val	Cys	Glu	Asn	Tyr	Lys	Leu	Ala	Val	Asn	Cys	Phe
1				5						10		

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 28:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

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

Cys	Glu	Asn	Tyr	Lys	Leu	Ala	Val	Asn	Cys	Phe	Val	Asn
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 29:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

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

Asn	Tyr	Lys	Leu	Ala	Val	Asn	Cys	Phe	Val	Asn	Asn	Asn
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 30:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

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

Lys Leu Ala Val Asn Cys Phe Val Asn Asn Asn Arg Gln
1 5 10

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 31:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

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

Ala Val Asn Cys Phe Val Asn Asn Asn Arg Gln Cys Gln
1 5 10

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 32:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 (A) DĚLKA: 13 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

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

Asn Cys Phe Val Asn Asn Asn Arg Gln Cys Gln Cys Thr
1 5 10

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 33:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

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

Phe Val Asn Asn Asn Arg Gln Cys Gln Cys Thr Ser Val
1 5 10

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 34:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

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

Asn Asn Asn Arg Gln Cys Gln Cys Thr Ser Val Gly Ala
1 5 10

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 35:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

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

Asn Arg Gln Cys Gln Cys Thr Ser Val Gly Ala Gln Asn
1 5 10

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 36:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 - (B) TYP: aminokyselina
 - (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

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

Gln	Cys	Gln	Cys	Thr	Ser	Val	Gly	Ala	Gln	Asn	Thr	Val
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 37:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 - (B) TYP: aminokyselina
 - (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

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

Gln	Cys	Thr	Ser	Val	Gly	Ala	Gln	Asn	Thr	Val	Ile	Cys
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 38:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 - (B) TYP: aminokyselina
 - (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

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

Thr	Ser	Val	Gly	Ala	Gln	Asn	Thr	Val	Ile	Cys	Ser	Lys
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 39:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

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

Val	Gly	Ala	Gln	Asn	Thr	Val	Ile	Cys	Ser	Lys	Leu	Ala
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 40:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

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

Ala	Gln	Asn	Thr	Val	Ile	Cys	Ser	Lys	Leu	Ala	Ala	Lys
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 41:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

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

Asn	Thr	Val	Ile	Cys	Ser	Lys	Leu	Ala	Ala	Lys	Cys	Leu
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 42:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 13 aminokyselin
(B) TYP: aminokyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

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

Val Ile Cys Ser Lys Leu Ala Ala Lys Cys Leu Val Met
1 5 10

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 43:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 13 aminokyselin
(B) TYP: aminokyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

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

Cys Ser Lys Leu Ala Ala Lys Cys Leu Val Met Lys Ala
1 5 10

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 44:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 13 aminokyselin
(B) TYP: aminokyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

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

Lys Leu Ala Ala Lys Cys Leu Val Met Lys Ala Glu Met
1 5 10

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 45:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 13 aminokyselin
(B) TYP: aminokyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

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

Ala Ala Lys Cys Leu Val Met Lys Ala Glu Met Asn Gly
1 5 10

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 46:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 13 aminokyselin
(B) TYP: aminokyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

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

Lys Cys Leu Val Met Lys Ala Glu Met Asn Gly Ser Lys
1 5 10

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 47:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 13 aminokyselin
(B) TYP: aminokyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

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

Leu Val Met Lys Ala Glu Met Asn Gly Ser Lys Leu Gly
1 5 10

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 48:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 - (B) TYP: aminokyselina
 - (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

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

Met	Lys	Ala	Glu	Met	Asn	Gly	Ser	Lys	Leu	Gly	Arg	Arg
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 49:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 - (B) TYP: aminokyselina
 - (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

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

Ala	Glu	Met	Asn	Gly	Ser	Lys	Leu	Gly	Arg	Arg	Ala	Lys
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 50:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 - (B) TYP: aminokyselina
 - (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

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

Met	Asn	Gly	Ser	Lys	Leu	Gly	Arg	Arg	Ala	Lys	Pro	Glu
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 51:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

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

Gly	Ser	Lys	Leu	Gly	Arg	Arg	Ala	Lys	Pro	Glu	Gly	Ala
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 52:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

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

Lys	Leu	Gly	Arg	Arg	Ala	Lys	Pro	Glu	Gly	Ala	Leu	Gln
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 53:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

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

Gly	Arg	Arg	Ala	Lys	Pro	Glu	Gly	Ala	Leu	Gln	Asn	Asn
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 54:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

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

Arg	Ala	Lys	Pro	Glu	Gly	Ala	Leu	Gln	Asn	Asn	Asp	Gly
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 55:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

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

Lys	Pro	Glu	Gly	Ala	Leu	Gln	Asn	Asn	Asp	Gly	Leu	Tyr
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 56:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

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

Glu	Gly	Ala	Leu	Gln	Asn	Asn	Asp	Gly	Leu	Tyr	Asp	Pro
1				5					10			

Asn Asp Gly Leu Tyr Asp Pro Asp Cys Asp Glu Ser Gly
1 5 10

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 60:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 60:

Gly	Leu	Tyr	Asp	Pro	Asp	Cys	Asp	Glu	Ser	Gly	Leu	Phe
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 61:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 61:

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

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 62:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 62:

Pro	Asp	Cys	Asp	Glu	Ser	Gly	Leu	Phe	Lys	Ala	Lys	Gln
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 63:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 63:

Cys	Asp	Glu	Ser	Gly	Leu	Phe	Lys	Ala	Lys	Gln	Cys	Asn
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 64:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 64:

Glu	Ser	Gly	Leu	Phe	Lys	Ala	Lys	Gln	Cys	Asn	Gly	Thr
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 65:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 65:

Gly	Leu	Phe	Lys	Ala	Lys	Gln	Cys	Asn	Gly	Thr	Ser	Thr
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 66:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 66:

Phe	Lys	Ala	Lys	Gln	Cys	Asn	Gly	Thr	Ser	Thr	Cys	Trp
1				5						10		

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 67:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 67:

Ala	Lys	Gln	Cys	Asn	Gly	Thr	Ser	Thr	Cys	Trp	Cys	Val
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 68:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 68:

Gln	Cys	Asn	Gly	Thr	Ser	Thr	Cys	Trp	Cys	Val	Asn	Thr
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 69:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 69:

Asn	Gly	Thr	Ser	Thr	Cys	Trp	Cys	Val	Asn	Thr	Ala	Gly
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 70:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 70:

Thr	Ser	Thr	Cys	Trp	Cys	Val	Asn	Thr	Ala	Gly	Val	Arg
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 71:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 71:

Thr	Cys	Trp	Cys	Val	Asn	Thr	Ala	Gly	Val	Arg	Arg	Thr
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 72:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 72:

Trp	Cys	Val	Asn	Thr	Ala	Gly	Val	Arg	Arg	Thr	Asp	Lys
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 73:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 73:

Val	Asn	Thr	Ala	Gly	Val	Arg	Arg	Thr	Asp	Lys	Asp	Thr
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 74:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 74:

Thr	Ala	Gly	Val	Arg	Arg	Thr	Asp	Lys	Asp	Thr	Glu	Ile
1				5				10				

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 75:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 75:

Gly Val Arg Arg Thr Asp Lys Asp Thr Glu Ile Thr Cys
1 5 10

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 76:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIŠ SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 76:

Arg Arg Thr Asp Lys Asp Thr Glu Ile Thr Cys Ser Glu
1 5 10

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 77:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIŠ SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 77:

Thr Asp Lys Asp Thr Glu Ile Thr Cys Ser Glu Arg Val
1 5 10

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 78:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 13 aminokyselin
(B) TYP: aminokyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 78:

Lys	Asp	Thr	Glu	Ile	Thr	Cys	Ser	Glu	Arg	Val	Arg	Thr
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 79:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 13 aminokyselin
(B) TYP: aminokyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 79:

Thr	Glu	Ile	Thr	Cys	Ser	Glu	Arg	Val	Arg	Thr	Tyr	Trp
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 80:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 13 aminokyselin
(B) TYP: aminokyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 80:

Ile	Thr	Cys	Ser	Glu	Arg	Val	Arg	Thr	Tyr	Trp	Ile	Ile
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 81:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 81:

Cys Ser Glu Arg Val Arg Thr Tyr Trp Ile Ile Ile Glu
 1 5 10

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 82:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 82:

Glu Arg Val Arg Thr Tyr Trp Ile Ile Ile Glu Leu Lys
 1 5 10

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 83:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 83:

Val Arg Thr Tyr Trp Ile Ile Ile Glu Leu Lys His Lys
 1 5 10

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 84:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 84:

Thr	Tyr	Trp	Ile	Ile	Ile	Glu	Leu	Lys	His	Lys	Ala	Arg
1				5						10		

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 85:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 85:

Trp	Ile	Ile	Ile	Glu	Leu	Lys	His	Lys	Ala	Arg	Glu	Lys
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 86:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 86:

Ile	Ile	Glu	Leu	Lys	His	Lys	Ala	Arg	Glu	Lys	Pro	Tyr
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 87:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 87:

Glu	Leu	Lys	His	Lys	Ala	Arg	Glu	Lys	Pro	Tyr	Asp	Ser
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 88:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 88:

Lys	His	Lys	Ala	Arg	Glu	Lys	Pro	Tyr	Asp	Ser	Lys	Ser
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 89:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 89:

Lys	Ala	Arg	Glu	Lys	Pro	Tyr	Asp	Ser	Lys	Ser	Leu	Arg
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 90:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 90:

Arg	Glu	Lys	Pro	Tyr	Asp	Ser	Lys	Ser	Leu	Arg	Thr	Ala
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 91:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 91:

Lys	Pro	Tyr	Asp	Ser	Lys	Ser	Leu	Arg	Thr	Ala	Leu	Gln
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 92:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 92:

Tyr	Asp	Ser	Lys	Ser	Leu	Arg	Thr	Ala	Leu	Gln	Lys	Glu
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 93:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 - (B) TYP: aminokyselina
 - (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 93:

Ser	Lys	Ser	Leu	Arg	Thr	Ala	Leu	Gln	Lys	Glu	Ile	Thr
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 94:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 - (B) TYP: aminokyselina
 - (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 94:

Ser	Leu	Arg	Thr	Ala	Leu	Gln	Lys	Glu	Ile	Thr	Thr	Arg
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 95:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 - (B) TYP: aminokyselina
 - (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 95:

Arg	Thr	Ala	Leu	Gln	Lys	Glu	Ile	Thr	Thr	Arg	Tyr	Gln
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 96:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 - (B) TYP: aminokyselina
 - (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 96:

Ala	Leu	Gln	Lys	Glu	Ile	Thr	Thr	Arg	Tyr	Gln	Leu	Asp
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 97:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 - (B) TYP: aminokyselina
 - (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 97:

Gln	Lys	Glu	Ile	Thr	Thr	Arg	Tyr	Gln	Leu	Asp	Pro	Lys
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 98:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 - (B) TYP: aminokyselina
 - (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 98:

Glu	Ile	Thr	Thr	Arg	Tyr	Gln	Leu	Asp	Pro	Lys	Phe	Ile
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 99:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 99:

Thr	Thr	Arg	Tyr	Gln	Leu	Asp	Pro	Lys	Phe	Ile	Thr	Ser
1				5						10		

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 100:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 100:

Arg	Tyr	Gln	Leu	Asp	Pro	Lys	Phe	Ile	Thr	Ser	Ile	Leu
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 101:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 101:

Gln	Leu	Asp	Pro	Lys	Phe	Ile	Thr	Ser	Ile	Leu	Tyr	Glu
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 102:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 - (B) TYP: aminokyselina
 - (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 102:

Asp	Pro	Lys	Phe	Ile	Thr	Ser	Ile	Leu	Tyr	Glu	Asn	Asn
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 103:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 - (B) TYP: aminokyselina
 - (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 103:

Lys	Phe	Ile	Thr	Ser	Ile	Leu	Tyr	Glu	Asn	Asn	Val	Ile
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 104:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 - (B) TYP: aminokyselina
 - (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 104:

Ile	Thr	Ser	Ile	Leu	Tyr	Glu	Asn	Asn	Val	Ile	Thr	Ile
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 105:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 13 aminokyselin
(B) TYP: aminokyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 105:

Ser Ile Leu Tyr Glu Asn Asn Val Ile Thr Ile Asp Leu
1 5 10

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 106:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 13 aminokyselin
(B) TYP: aminokyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 106:

Leu Tyr Glu Asn Asn Val Ile Thr Ile Asp Leu Val Gln
1 5 10

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 107:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 13 aminokyselin
(B) TYP: aminokyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 107:

Glu Asn Asn Val Ile Thr Ile Asp Leu Val Gln Asn Ser
1 5 10

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 108:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 108:

Asn	Val	Ile	Thr	Ile	Asp	Leu	Val	Gln	Asn	Ser	Ser	Gln
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 109:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 109:

Ile	Thr	Ile	Asp	Leu	Val	Gln	Asn	Ser	Ser	Gln	Lys	Thr
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 110:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 110:

Ile	Asp	Leu	Val	Gln	Asn	Ser	Ser	Gln	Lys	Thr	Gln	Asn
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 111:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 13 aminokyselin
(B) TYP: aminokyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 111:

Leu	Val	Gln	Asn	Ser	Ser	Gln	Lys	Thr	Gln	Asn	Asp	Val
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 112:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 13 aminokyselin
(B) TYP: aminokyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 112:

Gln	Asn	Ser	Ser	Gln	Lys	Thr	Gln	Asn	Asp	Val	Asp	Ile
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 113:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 13 aminokyselin
(B) TYP: aminokyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 113:

Ser	Ser	Gln	Lys	Thr	Gln	Asn	Asp	Val	Asp	Ile	Ala	Asp
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 114:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 13 aminokyselin
(B) TYP: aminokyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 114:

Gln	Lys	Thr	Gln	Asn	Asp	Val	Asp	Ile	Ala	Asp	Val	Ala
1				5						10		

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 115:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 13 aminokyselin
(B) TYP: aminokyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 115:

Thr	Gln	Asn	Asp	Val	Asp	Ile	Ala	Asp	Val	Ala	Tyr	Tyr
1				5						10		

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 116:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 13 aminokyselin
(B) TYP: aminokyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 116:

Asn	Asp	Val	Asp	Ile	Ala	Asp	Val	Ala	Tyr	Tyr	Phe	Glu
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 117:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 13 aminokyselin
(B) TYP: aminokyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 117:

Val	Asp	Ile	Ala	Asp	Val	Ala	Tyr	Tyr	Phe	Glu	Lys	Asp
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 118:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 13 aminokyselin
(B) TYP: aminokyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 118:

Ile	Ala	Asp	Val	Ala	Tyr	Tyr	Phe	Glu	Lys	Asp	Val	Lys
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 119:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 13 aminokyselin
(B) TYP: aminokyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 119:

Asp	Val	Ala	Tyr	Tyr	Phe	Glu	Lys	Asp	Val	Lys	Gly	Glu
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 120:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 120:

Ala	Tyr	Tyr	Phe	Glu	Lys	Asp	Val	Lys	Gly	Glu	Ser	Leu
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 121:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 121:

Tyr	Phe	Glu	Lys	Asp	Val	Lys	Gly	Glu	Ser	Leu	Phe	His
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 122:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 122:

Glu	Lys	Asp	Val	Lys	Gly	Glu	Ser	Leu	Phe	His	Ser	Lys
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 123:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 123:

Asp	Val	Lys	Gly	Glu	Ser	Leu	Phe	His	Ser	Lys	Lys	Met
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 124:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 124:

Lys	Gly	Glu	Ser	Leu	Phe	His	Ser	Lys	Lys	Met	Asp	Leu
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 125

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 125:

Glu	Ser	Leu	Phe	His	Ser	Lys	Lys	Met	Asp	Leu	Thr	Val
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 126:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 126:

Leu	Phe	His	Ser	Lys	Lys	Met	Asp	Leu	Thr	Val	Asn	Gly
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 127:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 127:

His	Ser	Lys	Lys	Met	Asp	Leu	Thr	Val	Asn	Gly	Glu	Gln
1			5						10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 128:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 128:

Lys	Lys	Met	Asp	Leu	Thr	Val	Asn	Gly	Glu	Gln	Leu	Asp
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 129:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 - (B) TYP: aminokyselina
 - (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 129:

Met	Asp	Leu	Thr	Val	Asn	Gly	Glu	Gln	Leu	Asp	Leu	Asp
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 130:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 - (B) TYP: aminokyselina
 - (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 130:

Leu	Thr	Val	Asn	Gly	Glu	Gln	Leu	Asp	Leu	Asp	Pro	Gly
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 131:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 - (B) TYP: aminokyselina
 - (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 131:

Val	Asn	Gly	Glu	Gln	Leu	Asp	Leu	Asp	Pro	Gly	Gln	Thr
1				5					10			

Asp Leu Asp Pro Gly Gln Thr Leu Ile Tyr Tyr Val Asp
1 5 10

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 135:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 135:

Asp	Pro	Gly	Gln	Thr	Leu	Ile	Tyr	Tyr	Val	Asp	Glu	Lys
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 136:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 136:

Gly	Gln	Thr	Leu	Ile	Tyr	Tyr	Val	Asp	Glu	Lys	Ala	Pro
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 137:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 137:

Thr	Leu	Ile	Tyr	Tyr	Val	Asp	Glu	Lys	Ala	Pro	Glu	Phe
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 138:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 138:

Ile	Tyr	Tyr	Val	Asp	Glu	Lys	Ala	Pro	Glu	Phe	Ser	Met
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 139:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 139:

Tyr	Val	Asp	Glu	Lys	Ala	Pro	Glu	Phe	Ser	Met	Gln	Gly
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 140:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 140:

Asp	Glu	Lys	Ala	Pro	Glu	Phe	Ser	Met	Gln	Gly	Leu	Lys
1				5					10			

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 141:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 321 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: dvojité
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ix) ZNAKY:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS
- (B) POZICE: 1..321

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 141:

GAG CTC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCT TCT GTG GGA	48
Glu Leu Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
1 5 10 15	
GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGT CGG ACA AGT CAG AGC ATT AGC AGC TAT	96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr	
20 25 30	
TTA AAT TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGA CAG CCT CCT AAG CTG CTC ATT	144
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile	
35 40 45	
TAC TGG GCA TCT ACC CGG GAA TCC GGG GTC CCT GAC CGA TTC AGT GGC	192
Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly	
50 55 60	
AGC GGG TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT CTA CAA CCT	240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	
65 70 75 80	
GAA GAT TCT GCA ACT TAC TAC TGT CAG CAG AGT TAC GAC ATC CCG TAC	288
Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Asp Ile Pro Tyr	
85 90 95	
ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA	321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
100 105	

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 142:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 107 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 142:

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

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 143:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 414 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: dvojité
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ix) ZNAKY:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS
- (B) POZICE: 1..414

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 143:

GAG	GTG	CAG	CTG	CTC	GAG	TCT	GGG	GGA	GGC	GTG	GTC	CAG	CCT	GGG	AGG	48
Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	
		110					115					120				
TCC	CTG	AGA	CTC	TCC	TGT	GCA	GCC	TCT	GGA	TTC	ACC	TTC	AGT	AGC	TAT	96
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	
		125				130					135					

GGC ATG CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG	144
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
140 145 150 155	
GCA GTT ATA TCA TAT GAT GGA AGT AAT AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG	192
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
160 165 170	
AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT	240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
175 180 185	
CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCT GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT	288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
190 195 200	
GCG AAA GAT ATG GGG TGG GGC AGT GGC TGG AGA CCC TAC TAC TAC TAC	336
Ala Lys Asp Met Gly Trp Gly Ser Gly Trp Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr	
205 210 215	
GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GCA	384
Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala	
220 225 230 235	
CCC ACC AAG GCT CCG GAT GTG TTC CCT CTA	414
Pro Thr Lys Ala Pro Asp Val Phe Pro Leu	
240 245	

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 144:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 138 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 144:

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Met Gly Trp Gly Ser Gly Trp Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr
100 105 110

Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120 125

Pro Thr Lys Ala Pro Asp Val Phe Pro Leu
130 135

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 145:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 372 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: dvojité
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ix) ZNAKY:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS
- (B) POZICE: 1..372

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 145:

GAG GTG CAG CTG CTC GAG TCT GGG GGA GTC GTG GTA CAG CCT GGG GGG	48
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Val Val Val Gln Pro Gly Gly	
140 145 150	
TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT GAT GAT TAT	96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr	
155 160 165 170	
GCC ATG CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG	144
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
175 180 185	
GCA GTT ATA TCA TAT GAT GGA AGT AAT AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG	192
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
190 195 200	

AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT	240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
205 210 215	
CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCT GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT	288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
220 225 230	
GCG AAA AAG GAA GGC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC	336
Ala Lys Lys Glu Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser	
235 240 245 250	
TCA GCA CCC ACC AAG GCT CCG GAT GTG TTC CCT CTA	372
Ser Ala Pro Thr Lys Ala Pro Asp Val Phe Pro Leu	
255 260	

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 146:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 124 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 146:

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

GAG	CTC	CAG	ATG	ACC	CAG	TCT	CCA	TCC	TCC	CTG	TCT	GCA	TCT	GTA	GGA	48
Glu	Leu	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	
125					130					135					140	
GAC	AGA	GTC	ACC	ATC	ACT	TGC	CGG	GCA	AGT	CAG	AGC	ATT	AGC	AGC	TAT	96
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Ser	Tyr	
				145					150					155		
TTA	AAT	TGG	TAT	CAG	CAG	AAA	CCA	GGA	CAG	CCT	CCT	AAG	CTG	CTC	ATT	144
Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	
			160					165					170			
TAC	TGG	GCA	TCT	ACC	CGG	GAA	TCC	GGG	GTC	CCT	GAC	CGA	TTC	AGC	GGC	192
Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	
		175					180					185				
AGT	GAA	TCT	GGG	ACA	AAT	TAC	ACT	CTC	ACC	ATC	AGC	AGC	CTG	CAG	CCT	240
Ser	Glu	Ser	Gly	Thr	Asn	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	
	190					195				200						
GAA	GAT	TTT	GCT	ACT	TAC	TTT	TGT	CAA	CAG	TCT	GAC	AGT	TTG	CCG	ATC	288
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Ser	Asp	Ser	Leu	Pro	Ile	
205					210					215					220	
ACC	TTC	GGC	CAA	GGG	ACA	CGA	CTG	GAC	ATT	CAA						321
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Arg	Leu	Asp	Ile	Gln						
				225					230							

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 148:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 107 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 148:

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

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob přípravy anti-lidského antigenního receptoru, výhodně imunoglobulinu nebo jeho fragmentu, zvláště fragmentu Fv, který je slabě imunogenní nebo není imunogenní pro člověka, vyznačující se tím, že tento způsob obsahuje kroky, kde se vybere kombinace funkčně přestavěných imunoglobulinových řetězců VH a VL, přičemž alespoň řetězec VH pochází z lidských v podstatě nesenzibilizovaných zralých B lymfocytů a řetězec VL pochází z přirozeně se vyskytujícího repertoáru lidských B buněk, a přičemž oba řetězce jsou exprimovány z rekombinantního vektoru, a kde se použije *in vitro* detekční expoziční systém, zejména systém fágové expozice, na vazbu k lidskému antigenu, zvláště nádorovému antigenu, výhodně k lidskému antigenu 17-1A.

2. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že alespoň řetězec VH a případně i řetězec VL imunoglobulinu pochází z lidského repertoáru imunoglobulinů IgD.

3. Způsob podle nároku 1 nebo 2 vyznačující se tím, že kombinace přestavěných řetězců je exprimována z jedné knihovny nebo z několika různých knihoven.

4. Způsob podle kteréhokoliv z předchozích nároků vyznačující se tím, že řetězec VH obsahuje jednu ze dvou sekvencí uvedených na obr. 7 (nukleotidy 1 až 381) a obr. 8 (nukleotidy 1 až 339) a/nebo řetězec VL obsahuje jednu ze dvou sekvencí uvedených na obr. 6 (nukleotidy 1 až 321) a obr. 9 (nukleotidy 1 až 321).

5. Způsob podle kteréhokoliv z předchozích nároků vyznačující se tím selekční krok obsahuje

1) navázání expozičního nosiče exprimujícího antigenní receptor

- a) na imobilizovaný cílový antigen nebo jeho fragmenty
- b) na volitelně značené buňky exprimující cílový antigen nebo jeho fragmenty,
- c) na rozpustný, výhodně značený cílový antigen nebo jeho fragmenty,

II) odmytí nespecificky navázaného expozičního nosiče (a a b) a následnou eluci specificky navázaného expozičního nosiče, nebo

III) pozitivní obohacení expozičního nosiče vázaného na cílový antigen (b a c) z roztoku cílového antigenu nebo ze suspenze buněk exprimujících cílový antigen,

tedy izolované expoziční nosiče včetně jejich antigenních receptorů se případně zmnoží replikací a pak se podrobí dalším cyklům *in vitro* selekce, jak jsou popsány v krocích I) až III).

6. Způsob podle kteréhokoliv z předchozích nároků vyznačující se tím, že před selekčním krokem buďto řetězec VH nebo řetězec VL je selektován na vazbu k antigenu společně s náhradním řetězcem V, zvláště myším řetězcem VH nebo VL.

7. Způsob podle kteréhokoliv z předchozích nároků vyznačující se tím, že selekce vhodné kombinace zahrnuje

a) testování jednoho a téhož řetězce VH v kombinaci s řadou různých řetězců VL na vazbu k uvedenému lidskému antigenu, nebo

b) testování jednoho a téhož řetězce VL v kombinaci s řadou různých řetězců VH na vazbu k uvedenému lidskému antigenu.

8. Způsob podle kteréhokoliv z předchozích nároků vyznačující se tím, že způsob dále obsahuje kroky, kdy se získají, po selekci, lidské řetězce VH a VL nebo odpovídající nukleové kyseliny a tyto řetězce se fúzí se stejnými nebo jinými řetězci VH nebo

VL, s imunoglobulinovými konstantními úseky těžkých (CH) nebo lehkých řetězců (CL), zvláště s konstantními úseky řetězců pocházejících z lidských IgG1 nebo IgG3, nebo jejich částmi, nebo s řetězcí odlišnými od imunoglobulinů, případně odpovídajícími nukleovými kyselinami, a/nebo způsob dále obsahuje kroky, kdy se získají, po selekci, lidské řetězce VH a VL, a kdy se tyto řetězce fyzicky spojí s farmaceutickými přípravky jinými než proteiny a/nebo jinými biologicky aktivními molekulami, přičemž řetězce VH a VL jsou exprimovány ze sekvencí nukleových kyselin, které jsou výsledkem RT-PCR amplifikace mRNA pocházející z v podstatě nesenzibilizovaných zralých lidských B lymfocytů.

9. Anti-lidský antigenní receptor, výhodně protilátka nebo její fragment, a zvláště receptor specifický pro lidský nádorový antigen, který je slabě imunogenní nebo není imunogenní pro člověka, kterýžto receptor obsahuje kombinaci funkčně přestavěných řetězců VH a VL, přičemž alespoň řetězec VH pochází z lidských v podstatě nesenzibilizovaných zralých B lymfocytů a řetězec VL pochází z přirozeně se vyskytujícího repertoáru lidských B buněk, a přičemž uvedený anti-lidský antigenní receptor je získán způsobem podle kteréhokoliv z nároků 1 až 8.

10. Receptor podle nároku 9, který je specifický pro nativní lidský antigen 17-1A, přičemž zvláště řetězec VH obsahuje jednu ze dvou sekvencí uvedených na obr. 7 (nukleotidy 1 až 381) a obr. 8 (nukleotidy 1 až 339) a/nebo řetězec VL obsahuje jednu ze dvou sekvencí uvedených na obr. 6 (nukleotidy 1 až 321) a obr. 9 (nukleotidy 1 až 321).

11. Řetězec VH nebo VL, nebo alespoň jedna CDR, zvláště CDR3, které jsou obsaženy v receptoru podle nároku 9 nebo 10.

12. Souprava vyznačující se tím, že obsahuje kombinaci funkčně přestavěných imunoglobulinových řetězců VH a VL, přičemž

alespoň jeden z řetězců VH nebo VL pochází z lidských v podstatě nesenzibilizovaných zralých B lymfocytů, a přičemž oba řetězce jsou exprimovány z rekombinantních vektorů *in vitro* expozičního systému, zvláště systému fágové expozice.

13. Protilátka, která je získána z lidských sekvencí a která je specifická pro nativní lidský antigen 17-1A.

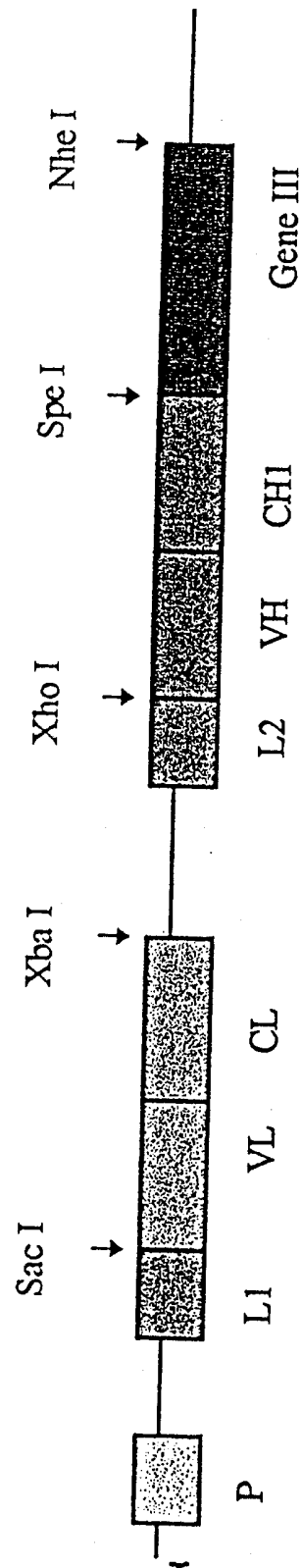
14. Protilátka podle nároku 13, která je slabě imunogenní nebo není imunogenní pro člověka, přičemž tato protilátka je výhodně získána způsobem podle kteréhokoliv z nároků 1 až 8.

15. Protilátka podle nároku 13 nebo 14, která rozpoznává epitop extracelulární domény antigenu 17-1A a výhodně obsahuje alespoň jednu aminokyselinovou sekvenci peptidu č. 8, 11, 13, 14, 59, 60, 77 a 79, zvláště kde řetězec VH obsahuje alespoň jednu CDR jedné ze sekvencí uvedených na obr. 7 (nukleotidy 1 až 381) a obr. 8 (nukleotidy 1 až 339) a/nebo řetězec VL obsahuje alespoň jednu CDR ze sekvencí uvedených na obr. 6 (nukleotidy 1 až 321) a obr. 9 (nukleotidy 1 až 321).

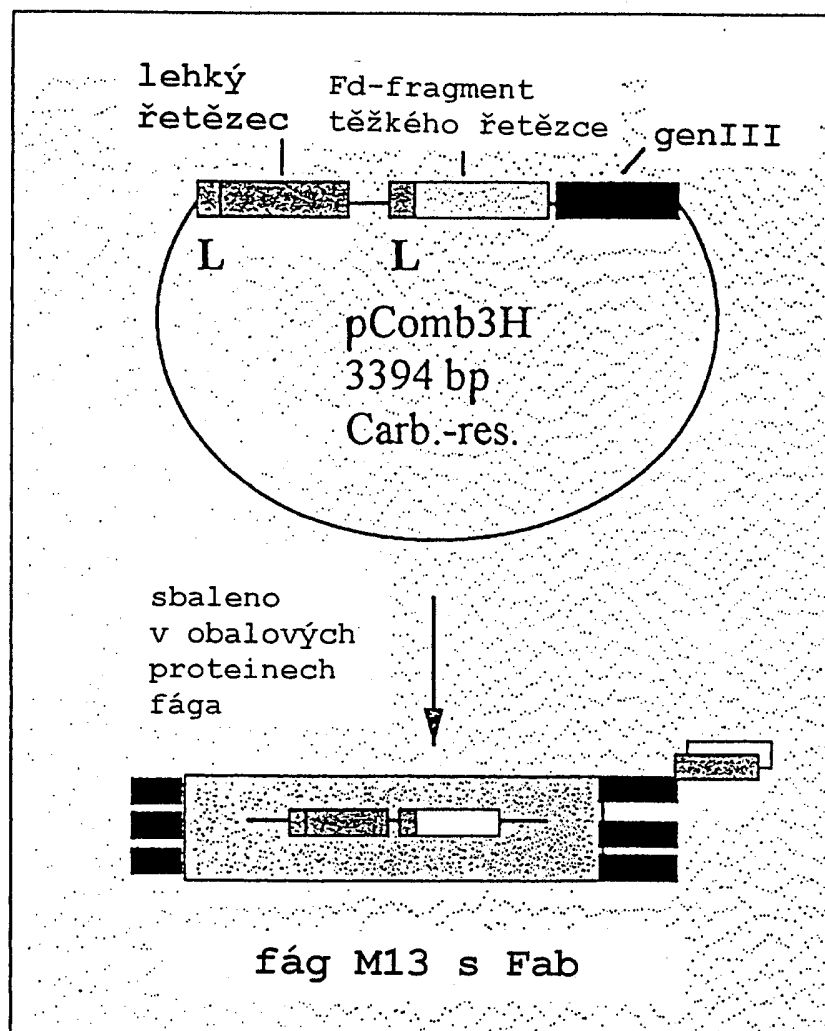
16. Farmaceutický přípravek vyznačující se tím, že obsahuje receptor podle nároku 9 nebo 10, řetězec VH podle nároku 11 a/nebo protilátku podle kteréhokoliv z nároků 13 až 15, a případně farmaceuticky přijatelný nosič.

1/35

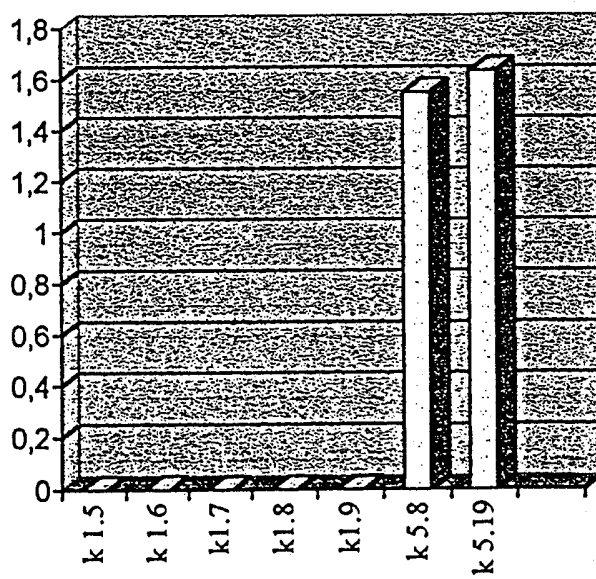
Obr. 1



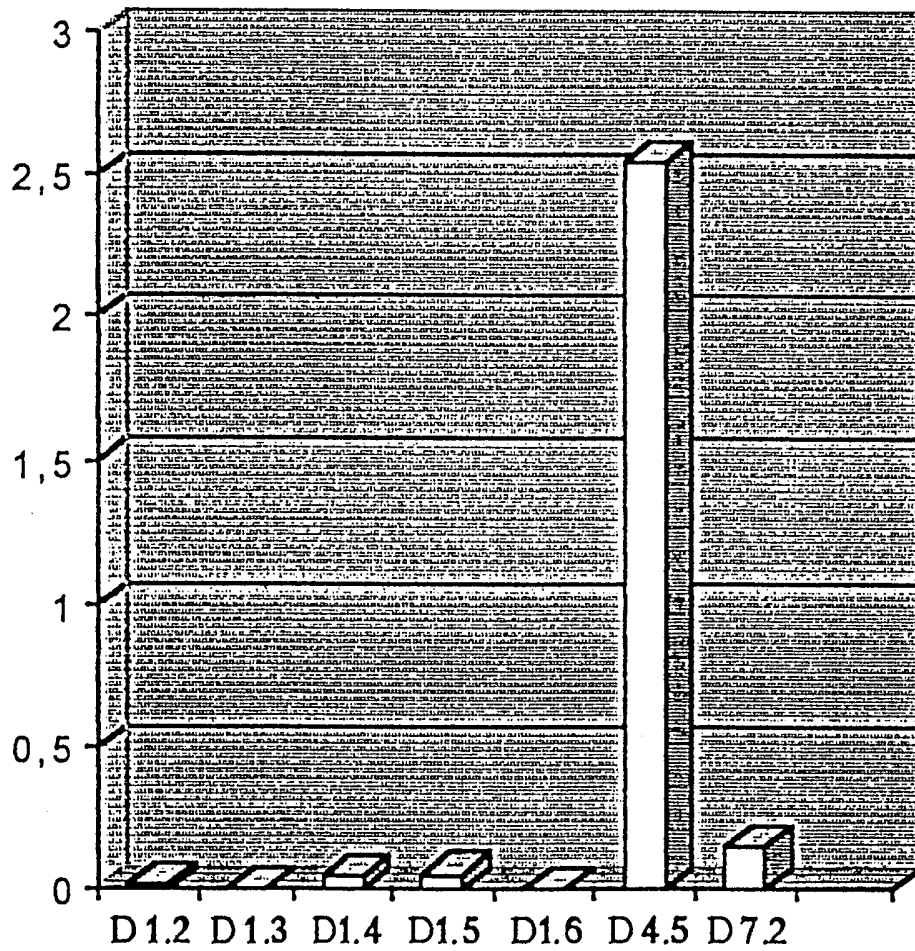
Obr. 2



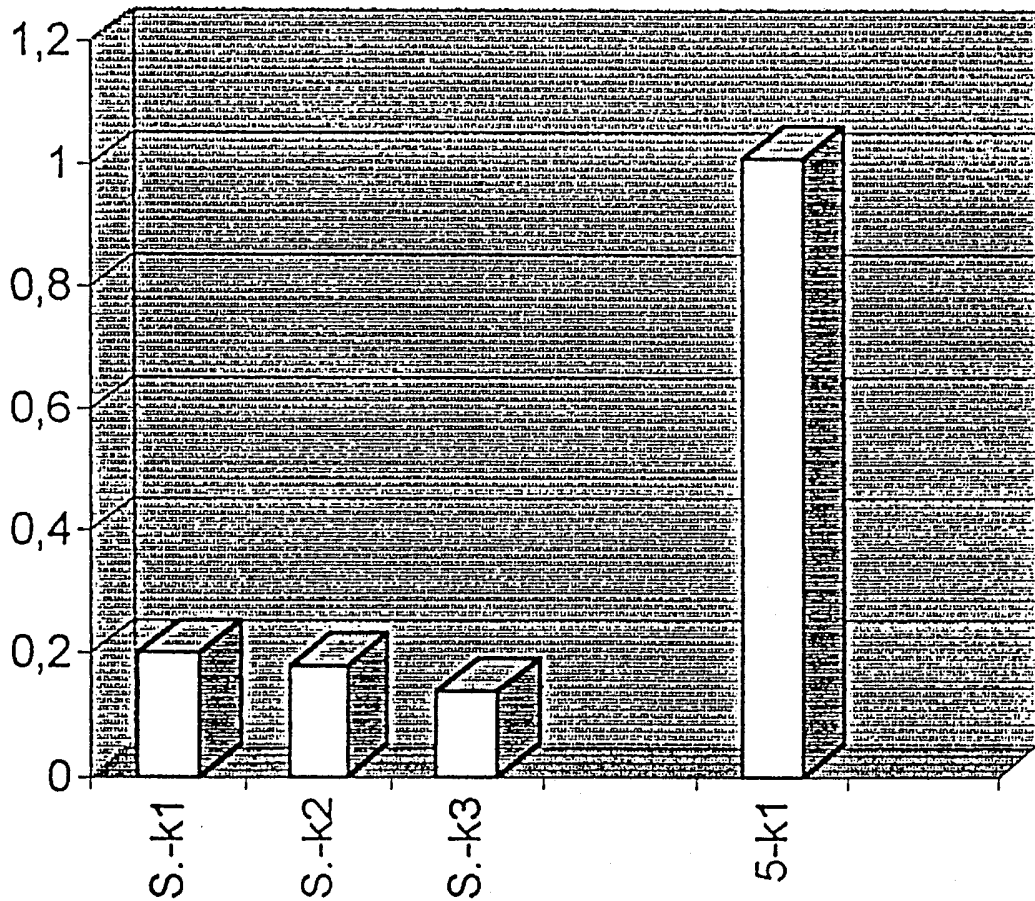
Obr. 3



Obr. 4



Obr. 5



jméno souboru: D4.5-k8-VL

Obr. 6

5'	9					18			27			36			45			54		
	GAG	CTC	CAG	ATG	ACC	CAG	TCT	CCA	TCC	TCC	CTG	TCT	GCT	TCT	GTG	GGA	GAC	AGA		
	E	L	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R		
	63					72			81			90			99			108		
	GTC	ACC	ATC	ACT	TGT	CGG	ACA	AGT	CAG	AGC	ATT	AGC	AGC	TAT	TTA	AAT	TGG	TAT		
	V	T	I	T	C	R	T	S	Q	S	I	S	S	Y	L	N	W	Y		
	117					126			135			144			153			162		
	CAG	CAG	AAA	CCA	GGA	CAG	CCT	CCT	AAG	CTG	CTC	ATT	TAC	TGG	GCA	TCT	ACC	CGG		
	Q	Q	K	P	G	Q	P	P	K	L	L	I	Y	W	A	S	T	R		
	171					180			189			198			207			216		
	GAA	TCC	GGG	GTC	CCT	GAC	CGA	TTC	AGT	GGC	AGC	GGG	TCT	GGG	ACA	GAT	TTC	ACT		
	E	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T		
	225					234			243			252			261			270		
	CTC	ACC	ATC	AGC	AGT	CTA	CAA	CCT	GAA	GAT	TCT	GCA	ACT	TAC	TAC	TGT	CAG	CAG		
	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	S	A	T	Y	Y	C	Q	Q		
	279					288			297			306			315					
	AGT	TAC	GAC	ATC	CCG	TAC	ACT	TTT	GGC	CAG	GGG	ACC	AAG	CTG	GAG	ATC	AAA	3'		
	S	Y	D	I	P	Y	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K			

7/35

D4.5:

jméno souboru: D4.5-k8-VH

Obr. 7

5'	9				18				27				36				45				54	
	GAG	GTG	CAG	CTG	CTC	GAG	TCT	GGG	GGA	GGC	GTG	GTC	CAG	CCT	GGG	AGG	TCC	CTG				
	E	V	Q	L	L	E	S	G	G	G	V	V	Q	P	G	R	S	L				
	63				72				81				90				99				108	
	AGA	CTC	TCC	TGT	GCA	GCC	TCT	GGA	TTC	ACC	TTC	AGT	AGC	TAT	GGC	ATG	CAC	TGG				
	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	G	M	H	W				
	117				126				135				144				153				162	
	GTC	CGC	CAG	GCT	CCA	GGC	AAG	GGG	CTG	GAG	TGG	GTG	GCA	GTT	ATA	TCA	TAT	GAT				
	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	V	I	S	Y	D				
	171				180				189				198				207				216	
	GGA	AGT	AAT	AAA	TAC	TAT	GCA	GAC	TCC	GTG	AAG	GGC	CGA	TTC	ACC	ATC	TCC	AGA				
	G	S	N	K	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R				
	225				234				243				252				261				270	
	GAC	AAT	TCC	AAG	AAC	ACG	CTG	TAT	CTG	CAA	ATG	AAC	AGC	CTG	AGA	GCT	GAG	GAC				
	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D				
	279				288				297				306				315				324	
	ACG	GCT	GTG	TAT	TAC	TGT	GCG	AAA	GAT	ATG	GGG	TGG	GGC	AGT	GGC	TGG	AGA	CCC				
	T	A	V	Y	Y	C	A	K	D	M	G	W	G	S	G	W	R	P				
	333				342				351				360				369				378	
	TAC	TAC	TAC	TAC	GGT	ATG	GAC	GTC	TGG	GGC	CAA	GGG	ACC	ACG	GTC	ACC	GTC	TCC				
	Y	Y	Y	Y	G	M	D	V	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S				
	387				396				405				414									
	TCA	GCA	CCC	ACC	AAG	GCT	CCG	GAT	GTG	TTC	CCT	CTA	3'									
	S	A	P	T	K	A	P	D	V	F	P	L										

jméno souboru: D7.2-k8-VH

Obr. 8

5'	9			18			27			36			45			54		
	GAG	GTG	CAG	CTG	CTC	GAG	TCT	GGG	GGA	GTC	GTG	GTA	CAG	CCT	GGG	GGG	TCC	CTG
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	E	V	Q	L	L	E	S	G	G	V	V	V	Q	P	G	G	S	L
	63			72			81			90			99			108		
	AGA	CTC	TCC	TGT	GCA	GCC	TCT	GGA	TTC	ACC	TTT	GAT	GAT	TAT	GCC	ATG	CAC	TGG
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	D	D	Y	A	M	H	W
	117			126			135			144			153			162		
	GTC	CGC	CAG	GCT	CCA	GGC	AAG	GGG	CTG	GAG	TGG	GTG	GCA	GTT	ATA	TCA	TAT	GAT
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	V	I	S	Y	D
	171			180			189			198			207			216		
	GGA	AGT	AAT	AAA	TAC	TAT	GCA	GAC	TCC	GTG	AAG	GGC	CGA	TTC	ACC	ATC	TCC	AGA
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	G	S	N	K	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R
	225			234			243			252			261			270		
	GAC	AAT	TCC	AAG	AAC	ACG	CTG	TAT	CTG	CAA	ATG	AAC	AGC	CTG	AGA	GCT	GAG	GAC
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D
	279			288			297			306			315			324		
	ACG	GCT	GTG	TAT	TAC	TGT	GCG	AAA	AAG	GAA	GGC	TAC	TGG	GGC	CAG	GGA	ACC	CTG
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	T	A	V	Y	Y	C	A	K	K	E	G	Y	W	G	Q	G	T	L
	333			342			351			360			369					
	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA	GCA	CCC	ACC	AAG	GCT	CCG	GAT	GTG	TTC	CCT	CTA	3'	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
	V	T	V	S	S	A	P	T	K	A	P	D	V	F	P	L		

Obr. 9

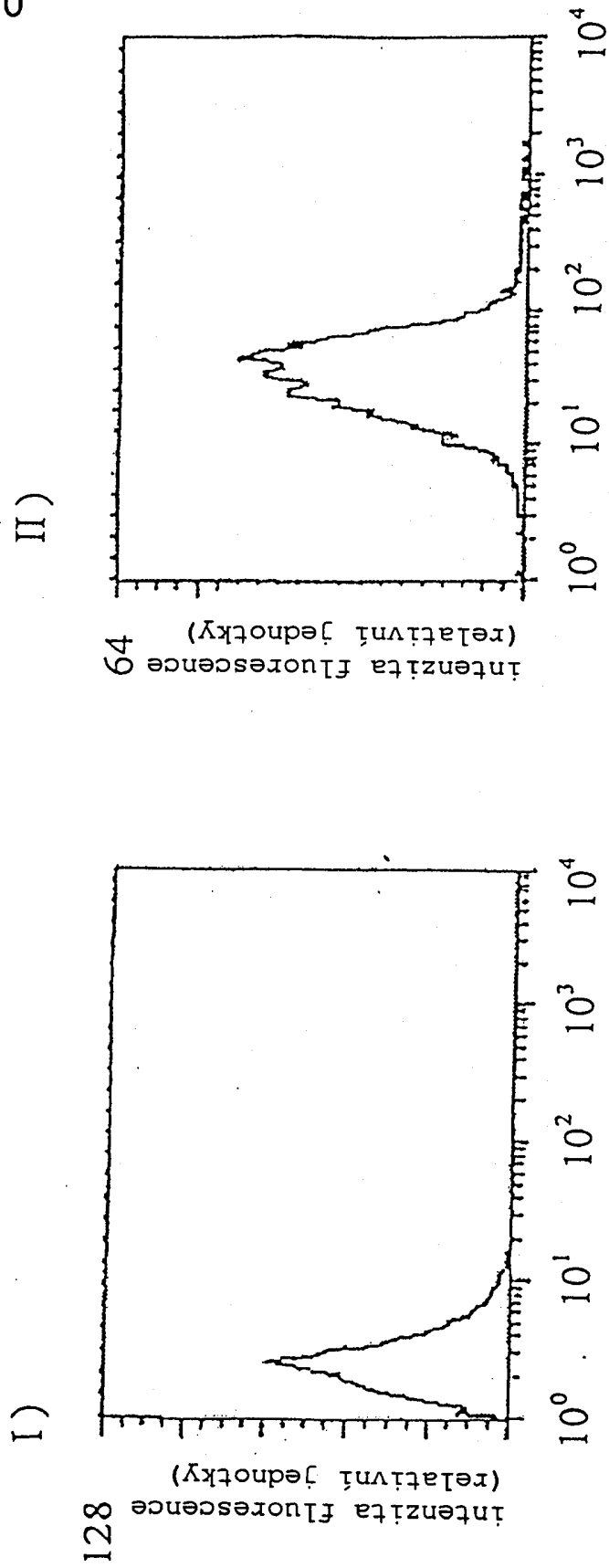
k5.1

jméno souboru: kappa5.1/11.97

5'	GAG	CTC	CAG	ATG	ACC	CAG	TCT	CCA	TCC	TCC	CTG	TCT	GCA	TCT	GTA	GGA	GAC	AGA	54
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	E	L	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	
			63			72			81			90			99			108	
	GTC	ACC	ATC	ACT	TGC	CGG	GCA	AGT	CAG	AGC	ATT	AGC	AGC	TAT	TTA	AAT	TGG	TAT	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	S	I	S	S	Y	L	N	W	Y	
			117			126			135			144			153			162	
	CAG	CAG	AAA	CCA	GGA	CAG	CCT	CCT	AAG	CTG	CTC	ATT	TAC	TGG	GCA	TCT	ACC	CGG	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Q	Q	K	P	G	Q	P	P	K	L	L	I	Y	W	A	S	T	R	
			171			180			189			198			207			216	
	GAA	TCC	GGG	GTC	CCT	GAC	CGA	TTC	AGC	GGC	AGT	GAA	TCT	GGG	ACA	AAT	TAC	ACT	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	E	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	E	S	G	T	N	Y	T	
			225			234			243			252			261			270	
	CTC	ACC	ATC	AGC	AGC	CTG	CAG	CCT	GAA	GAT	TTT	GCT	ACT	TAC	TTT	TGT	CAA	CAG	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	F	C	Q	Q	
			279			288			297			306			315			324	
	TCT	GAC	AGT	TTG	CCG	ATC	ACC	TTC	GGC	CAA	GGG	ACA	CGA	CTG	GAC	ATT	CAA	3'	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	S	D	S	L	F	I	T	F	G	Q	G	T	R	L	D	I	Q		

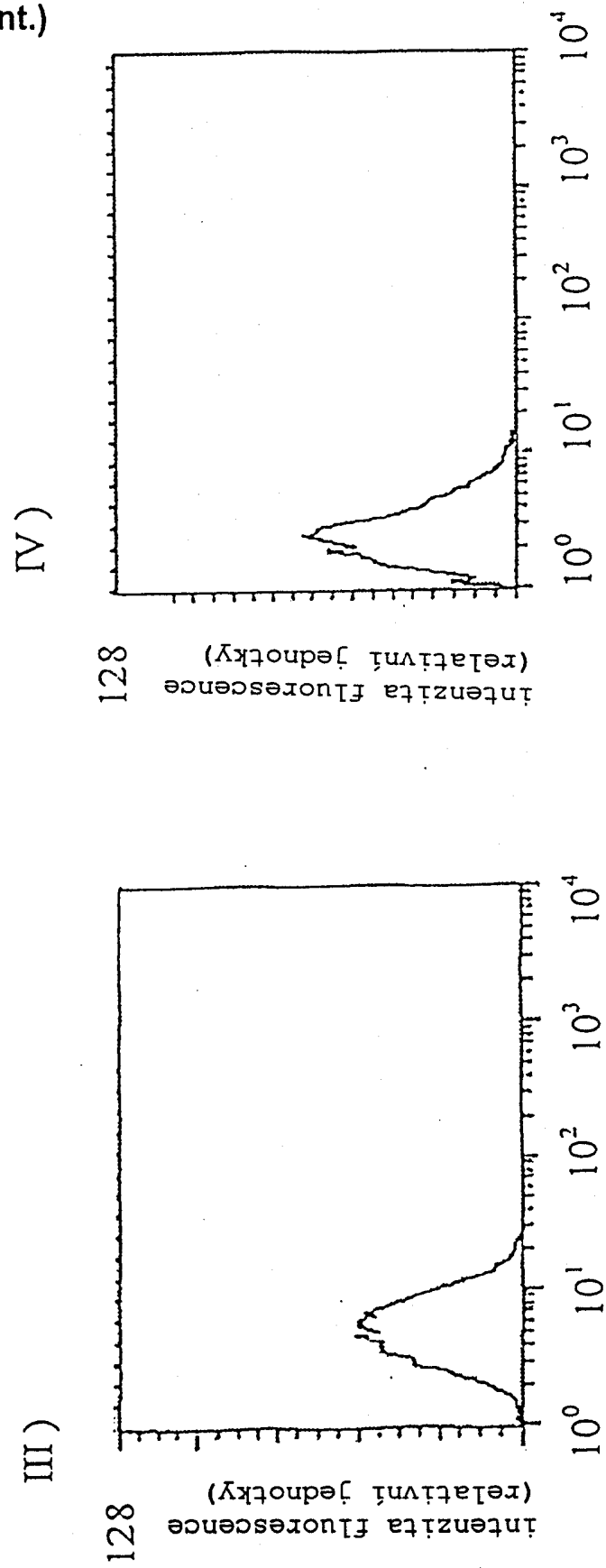
10/35

Obr. 10



11/35

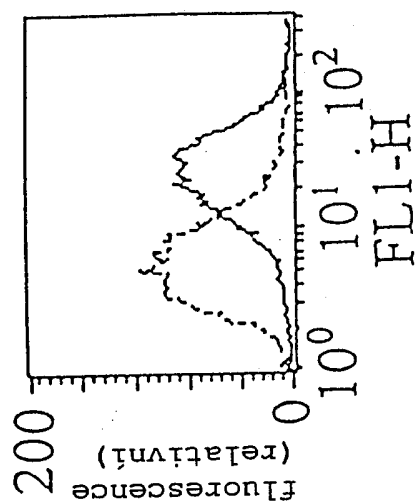
Fig. 10 (cont.)



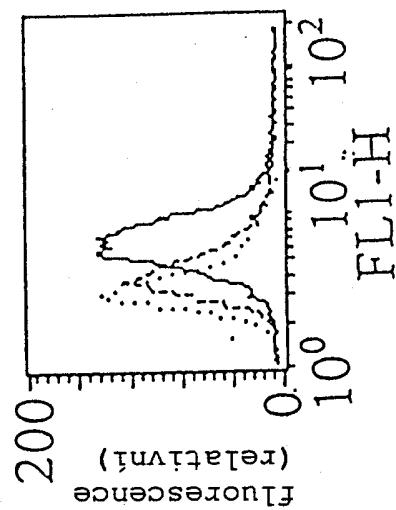
12/35

Obr. 11

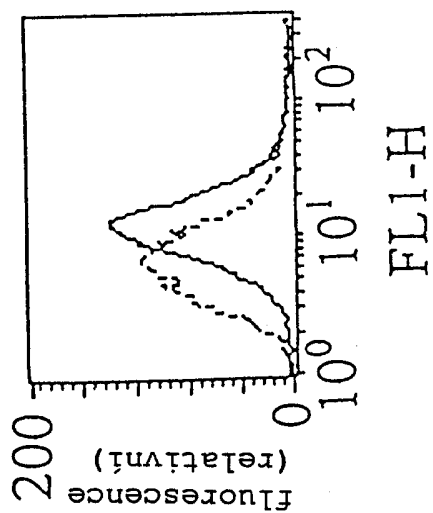
II)



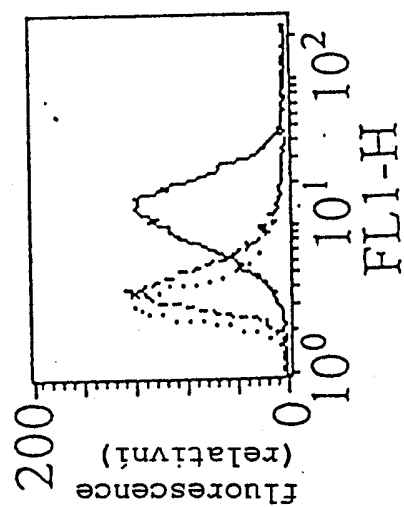
IV)



I)

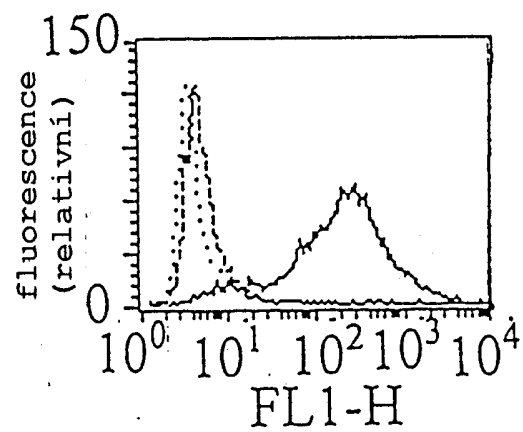


III)

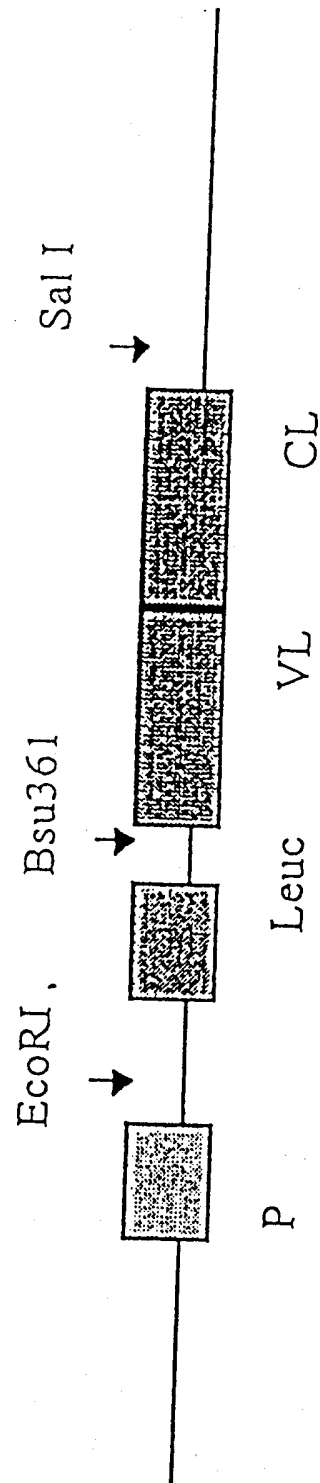


Obr. 11 (pokračování)

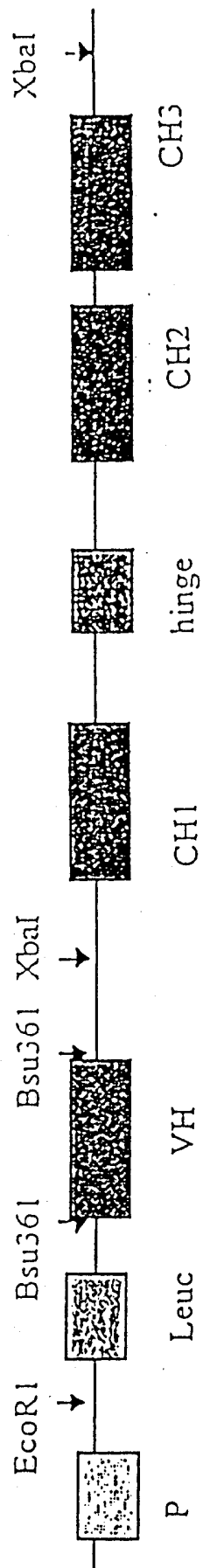
V)



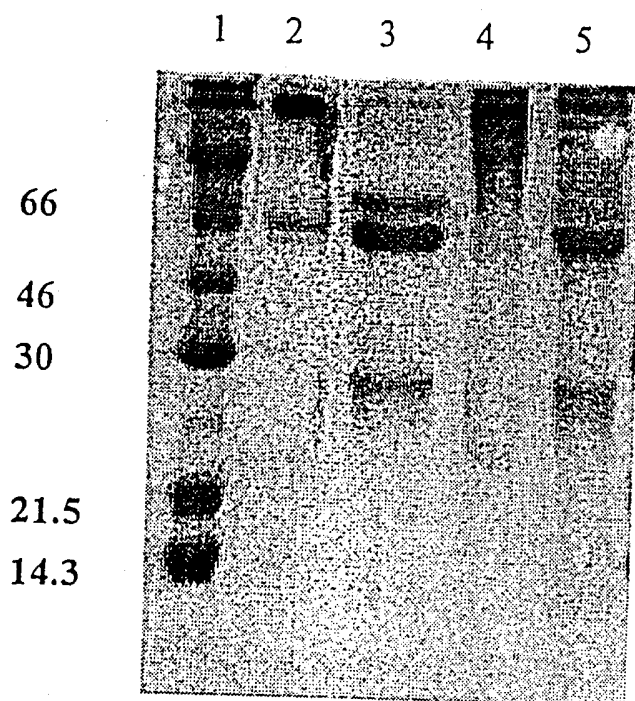
Obr. 12



Obr. 13



Obr. 14



Dráha 1: standard (molekulová hmotnost [kD] pro jednotlivé pásy označené na levé straně gelu)

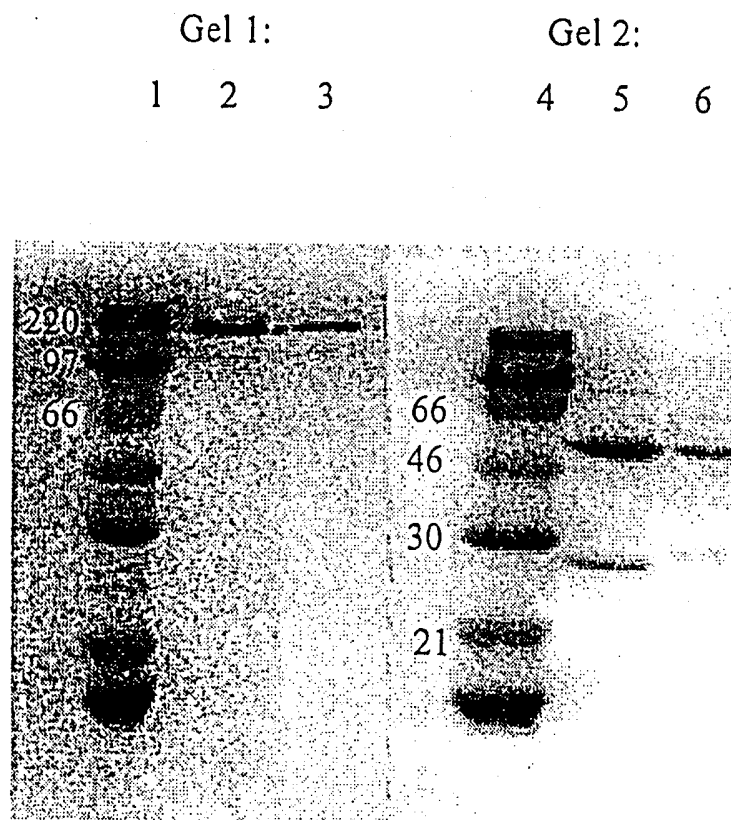
Dráha 2: varianta H79 lidského IgG1 (neredukující)

Dráha 3: varianta H79 lidského IgG1 v redukujících podmínkách

Dráha 4: varianta H79 myšního IgG1 (neredukující)

Dráha 5: varianta H79 myšního IgG1 v redukujících podmínkách

Obr. 15



Gel 1:

Dráha 1: standard (molekulová hmotnost [kD] pro jednotlivé pásy označené na levé straně gelu)

Dráha 2: varianta H79 lidského IgG1 (neredukující)

Dráha 3: varianta HD70 lidského IgG1 (neredukující)

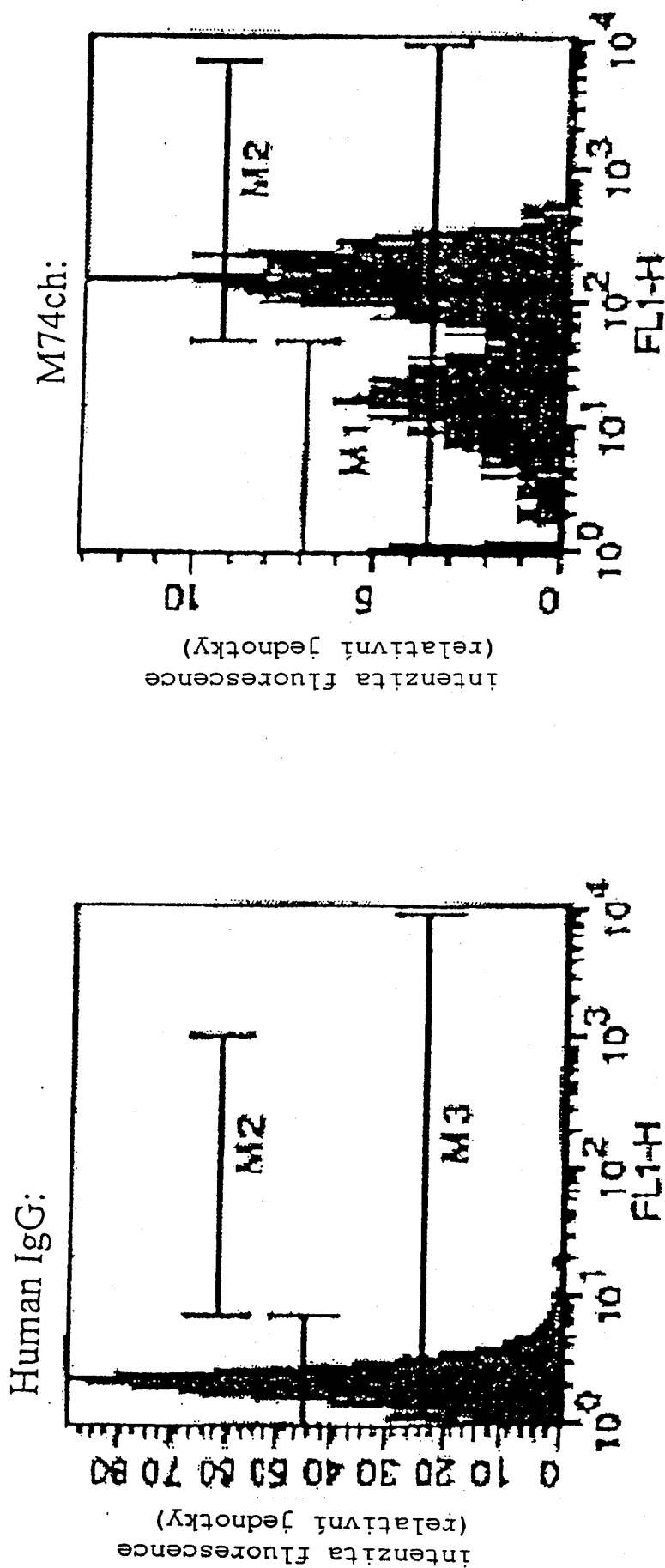
Gel 2:

Dráha 4: standard (molekulová hmotnost [kD] pro jednotlivé pásy označené na levé straně gelu)

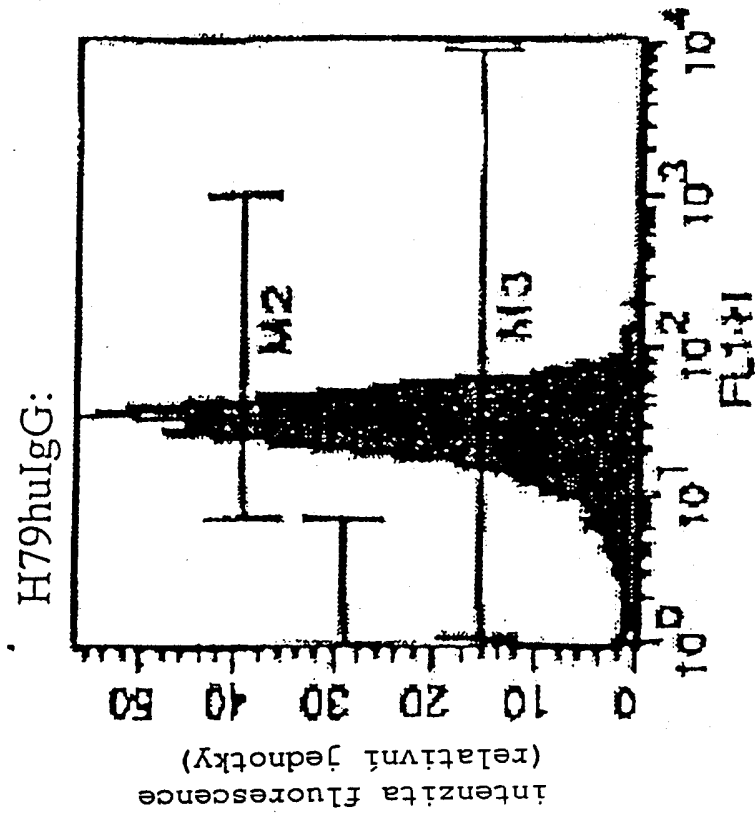
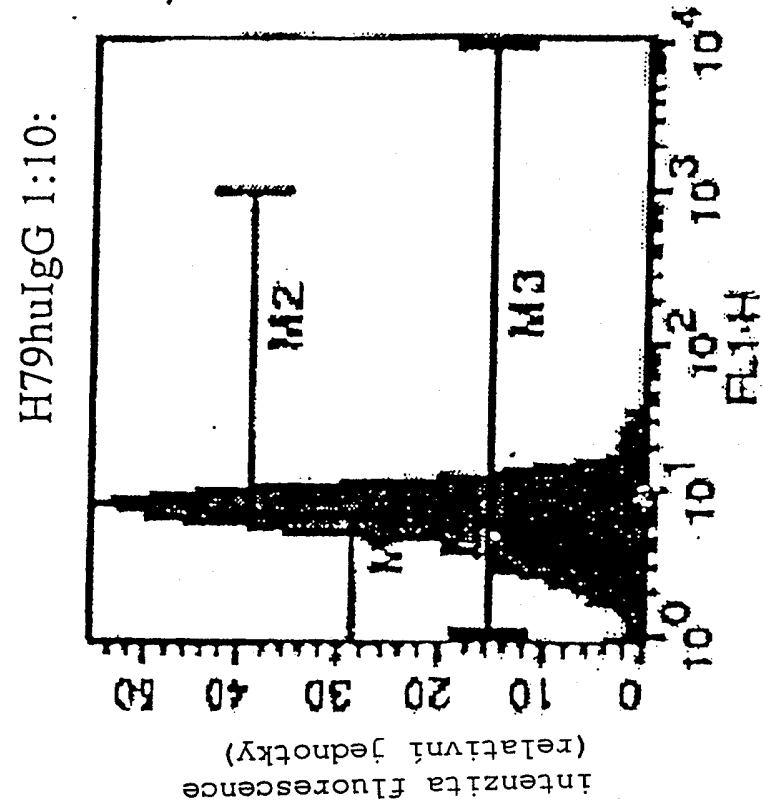
Dráha 5: varianta H79 lidského IgG1 v redukujících podmínkách

Dráha 6: varianta HD70 lidského IgG1 v redukujících podmínkách

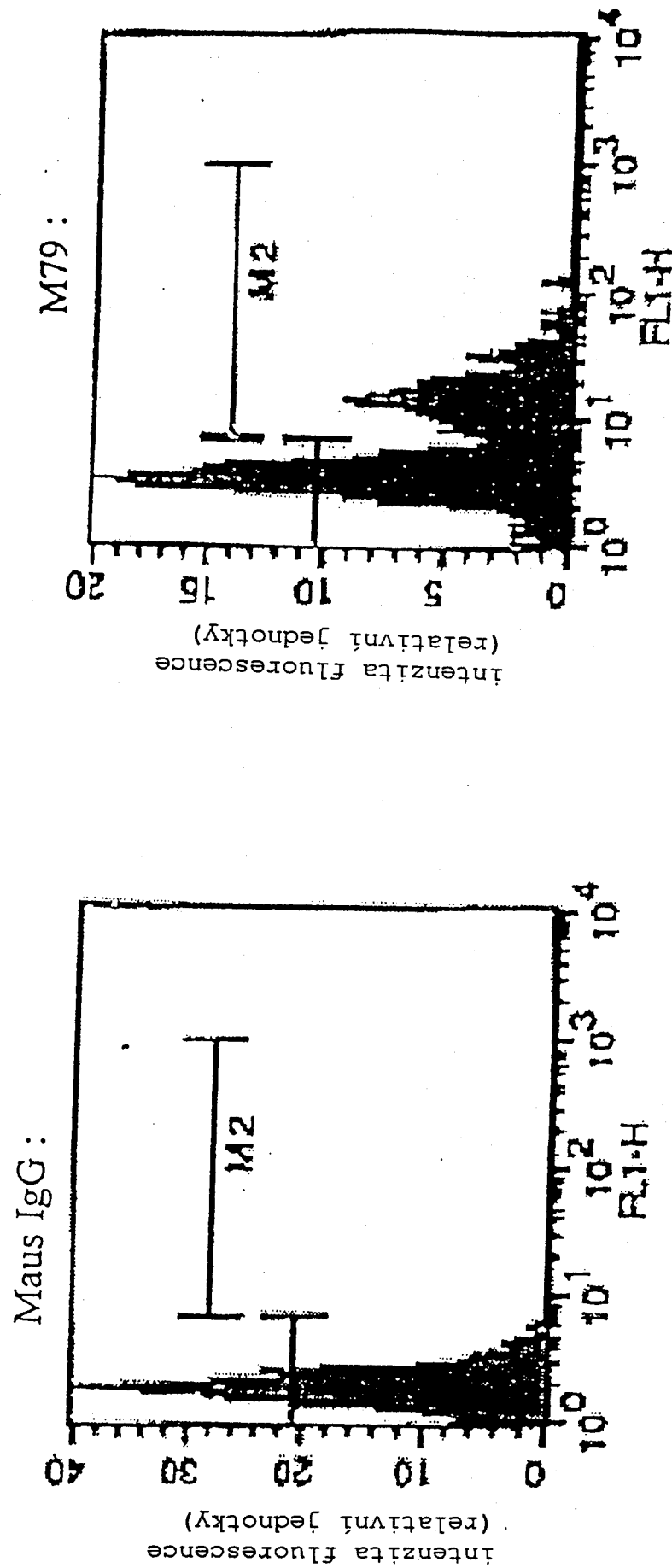
Obr. 16



Obr. 16 (pokrač.)

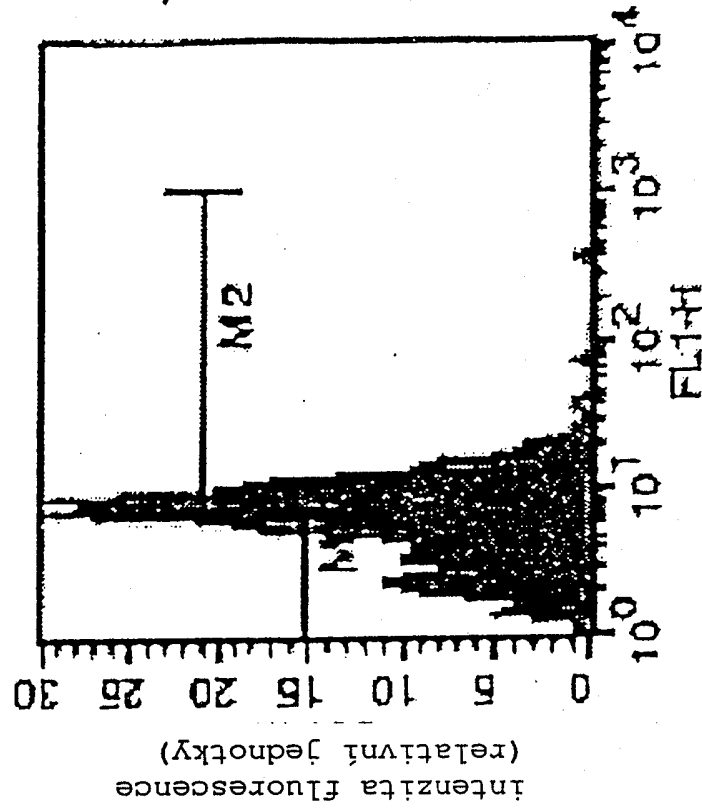


Obr. 16 (pokrač.)

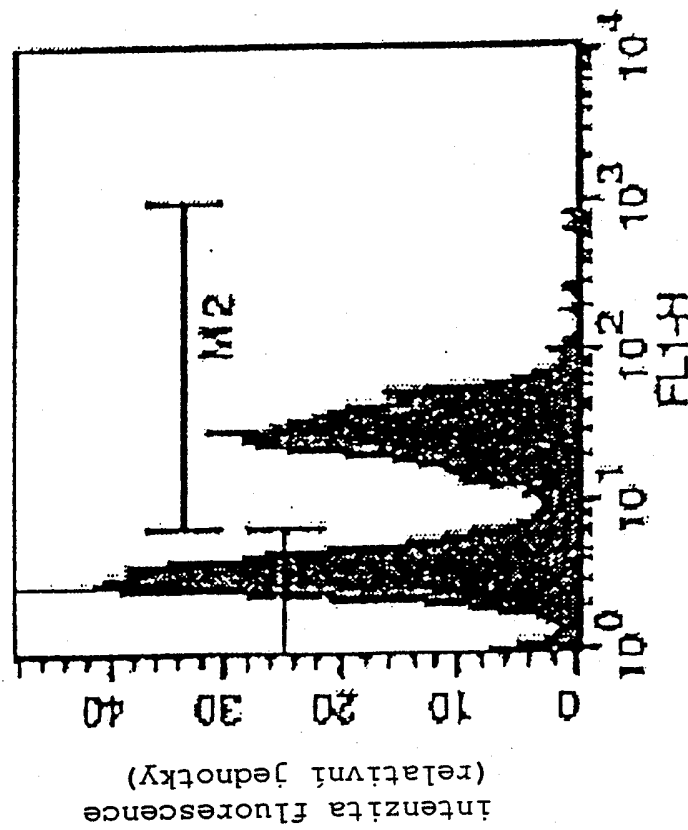


Obr. 16 (pokrač.)

H79IgGIM (1:10):



H79IgGIM:

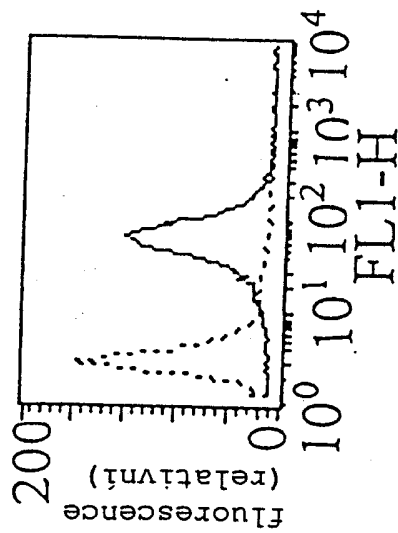


22/35

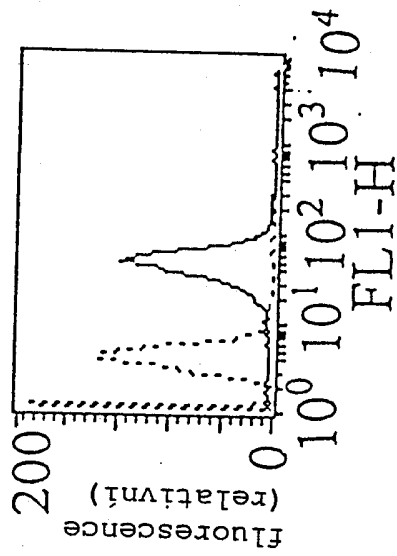
FACS AK

Obr. 17

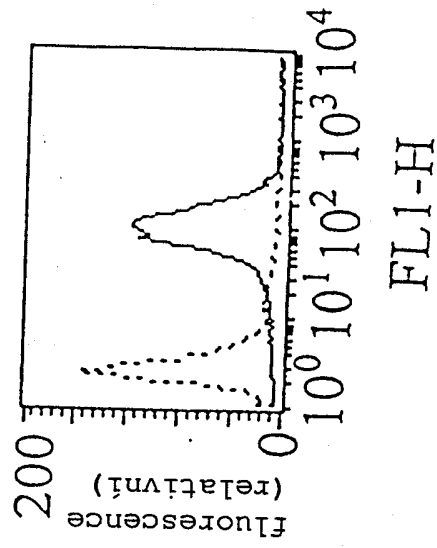
I)



II)



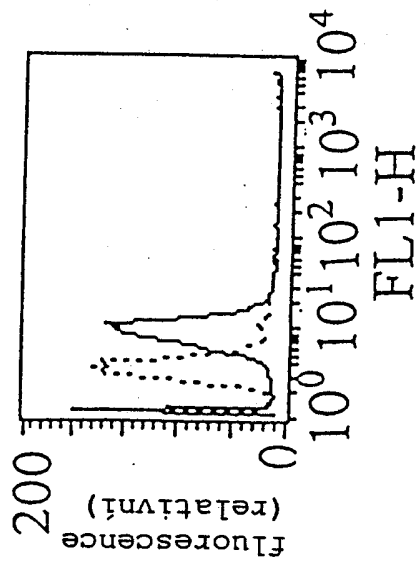
III)



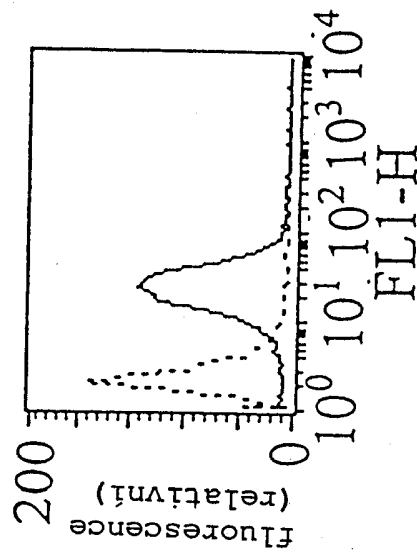
Obr. 17 (pokrač.)

23/35

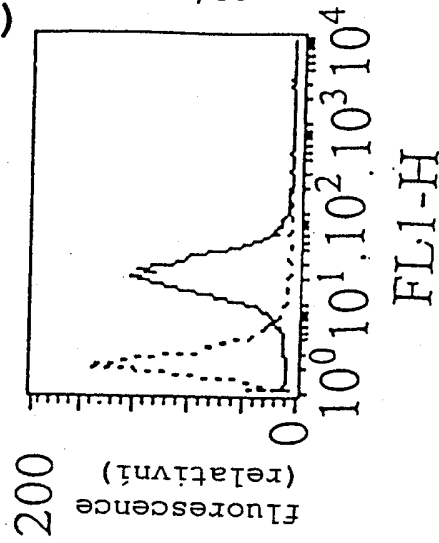
IV)



V)

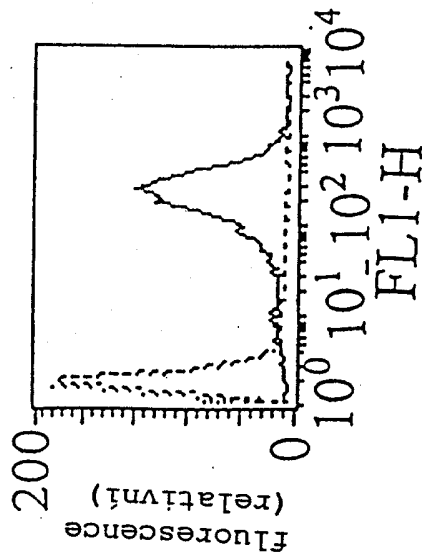


VI)

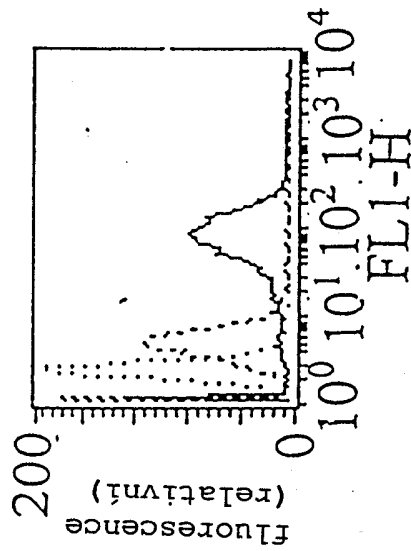


Obr. 17 (pokrač.)

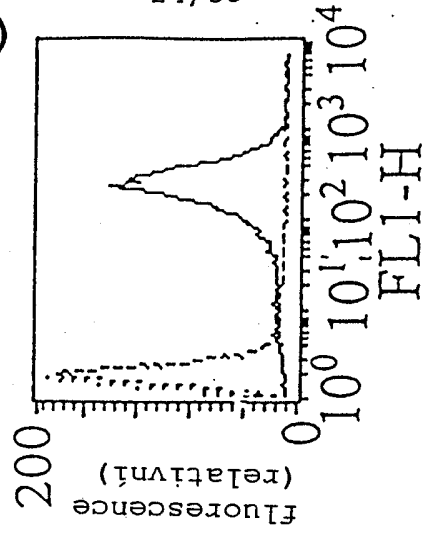
VII)



VIII)

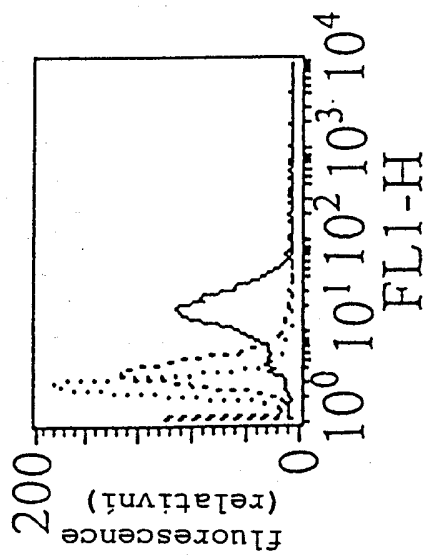


IX)

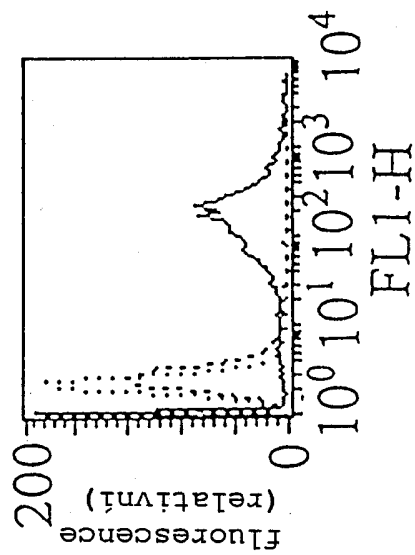


Obr. 17 (pokrač.)

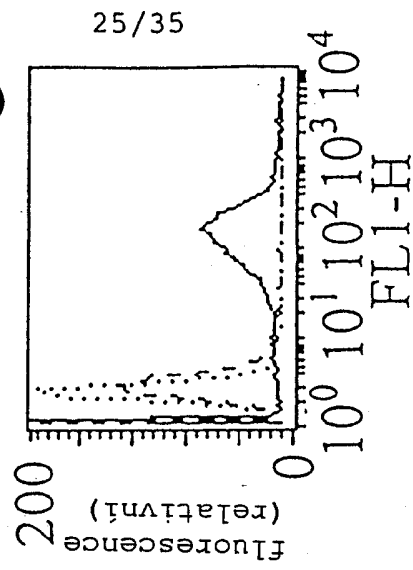
X)



XI)

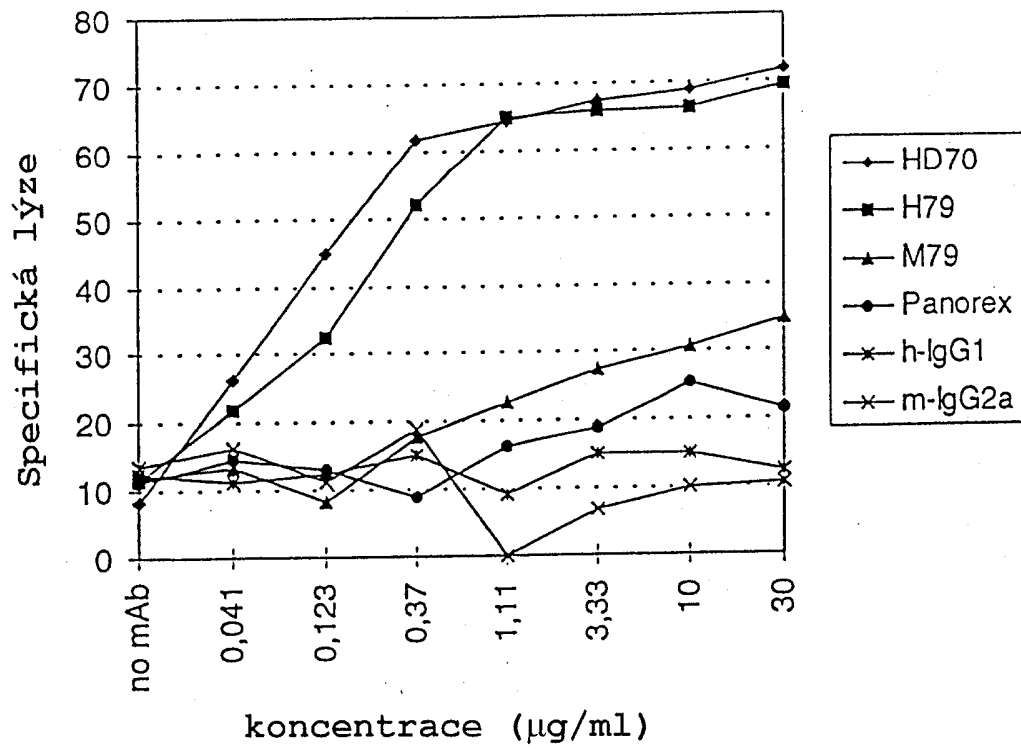


XII)



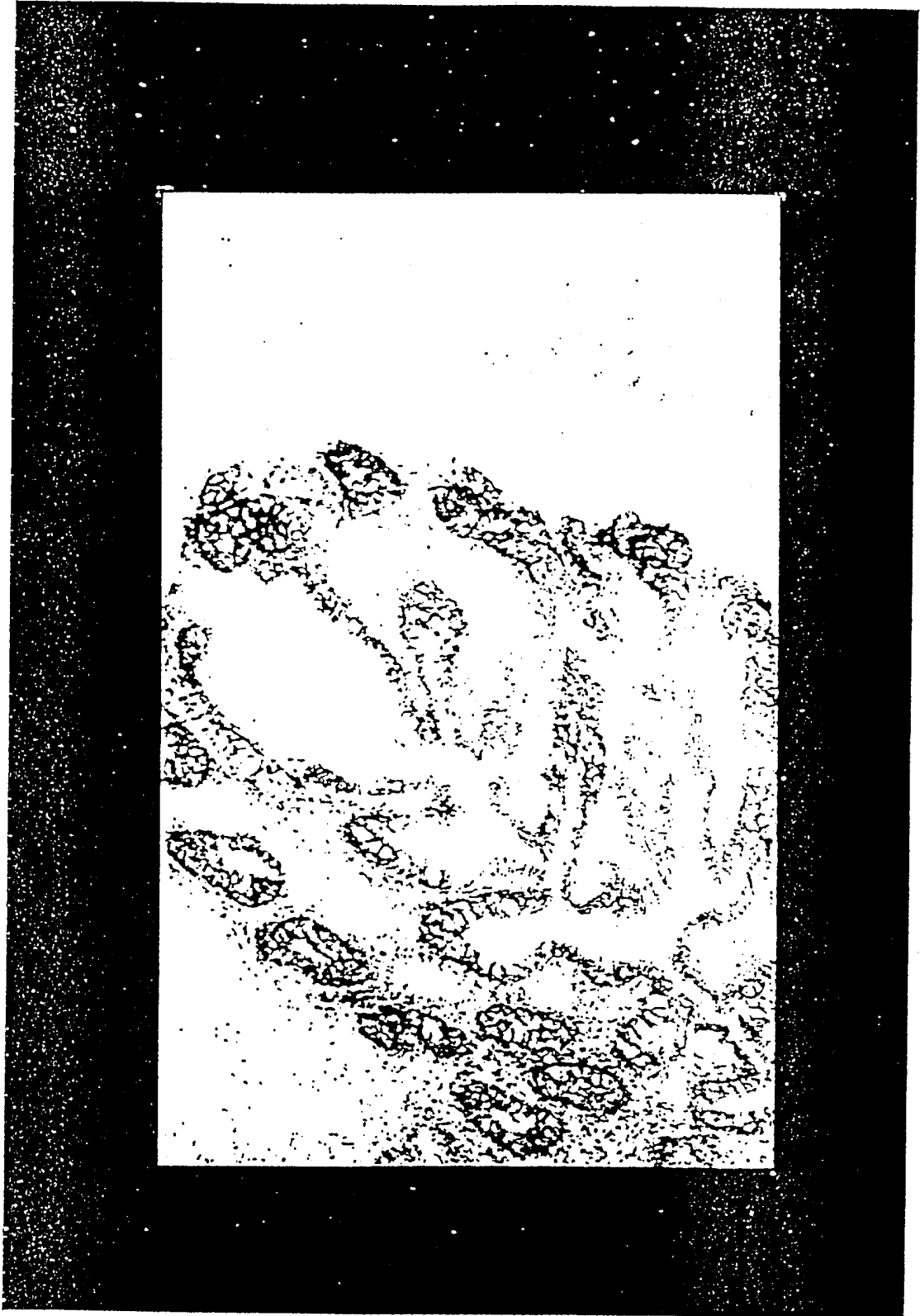
Obr. 18

ADCC



23.11.99

27/35



Obr. 19

23.11.99

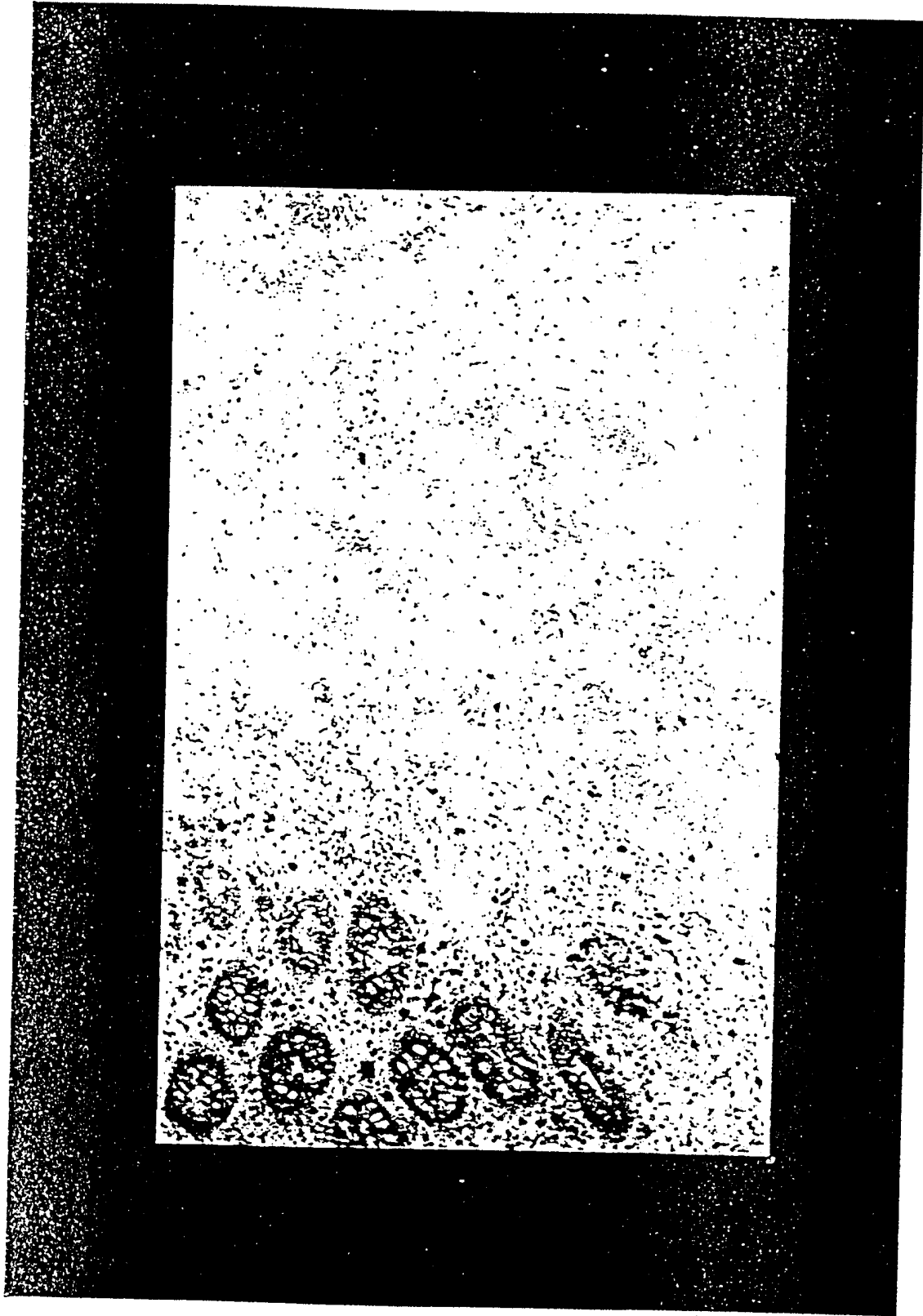
28/35



Obr. 20

23.11.99

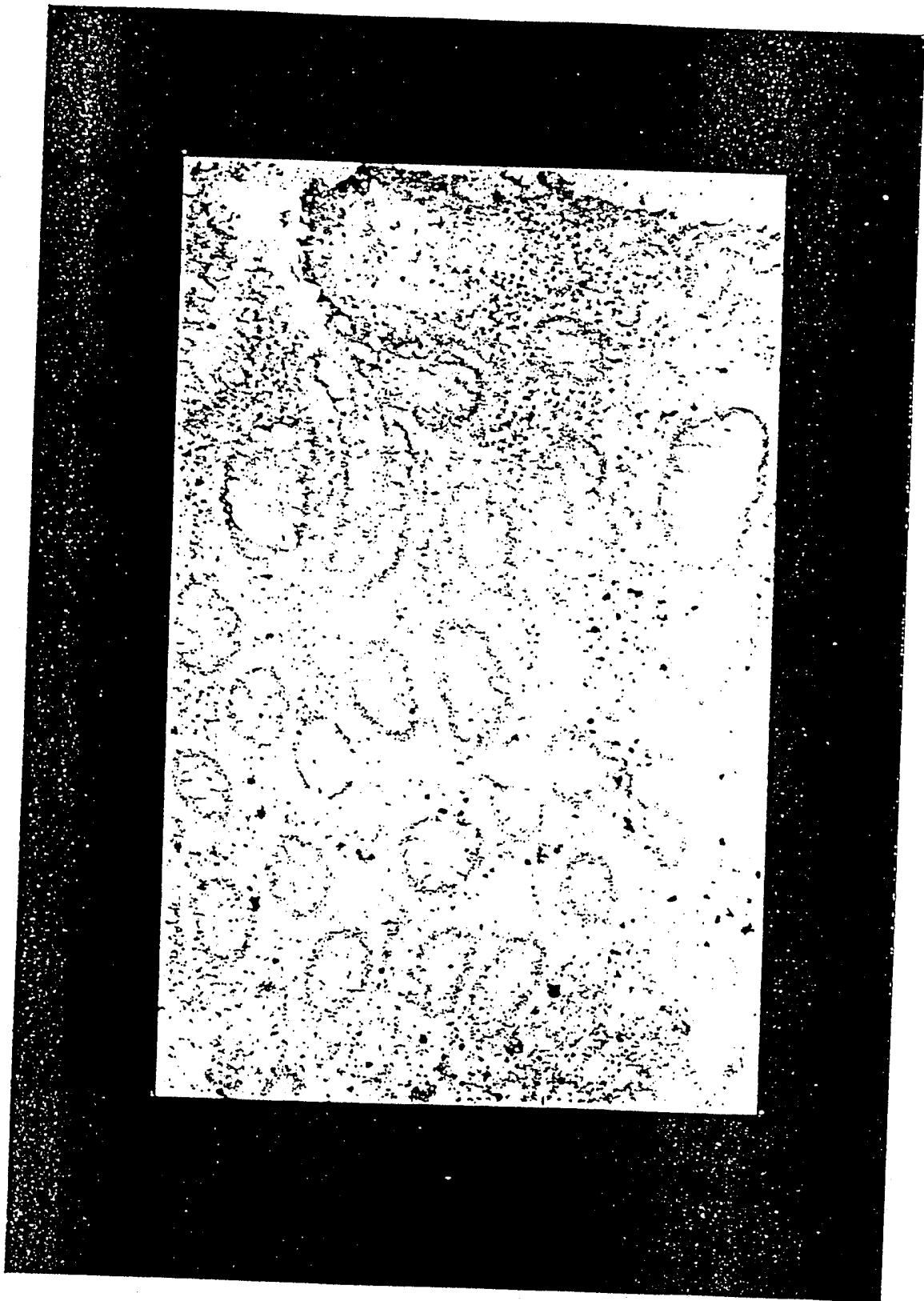
29/35



Obr. 21



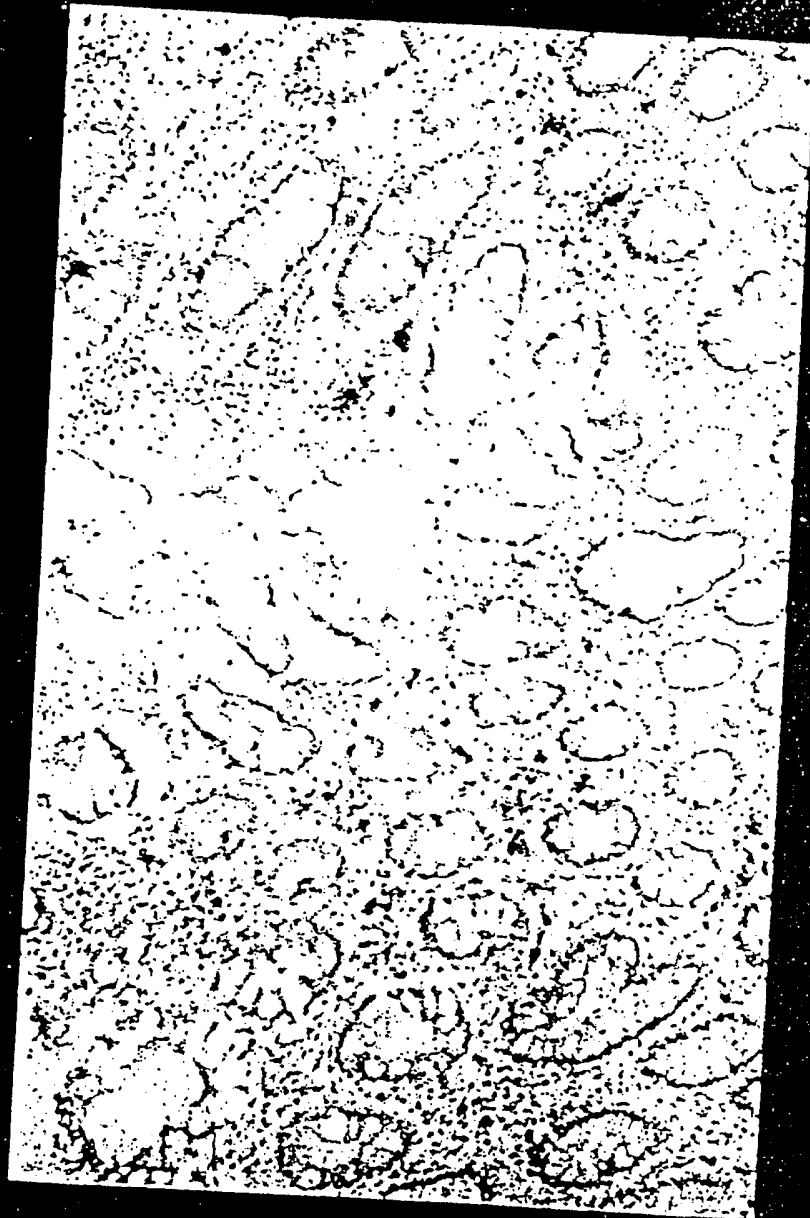
Obr. 22



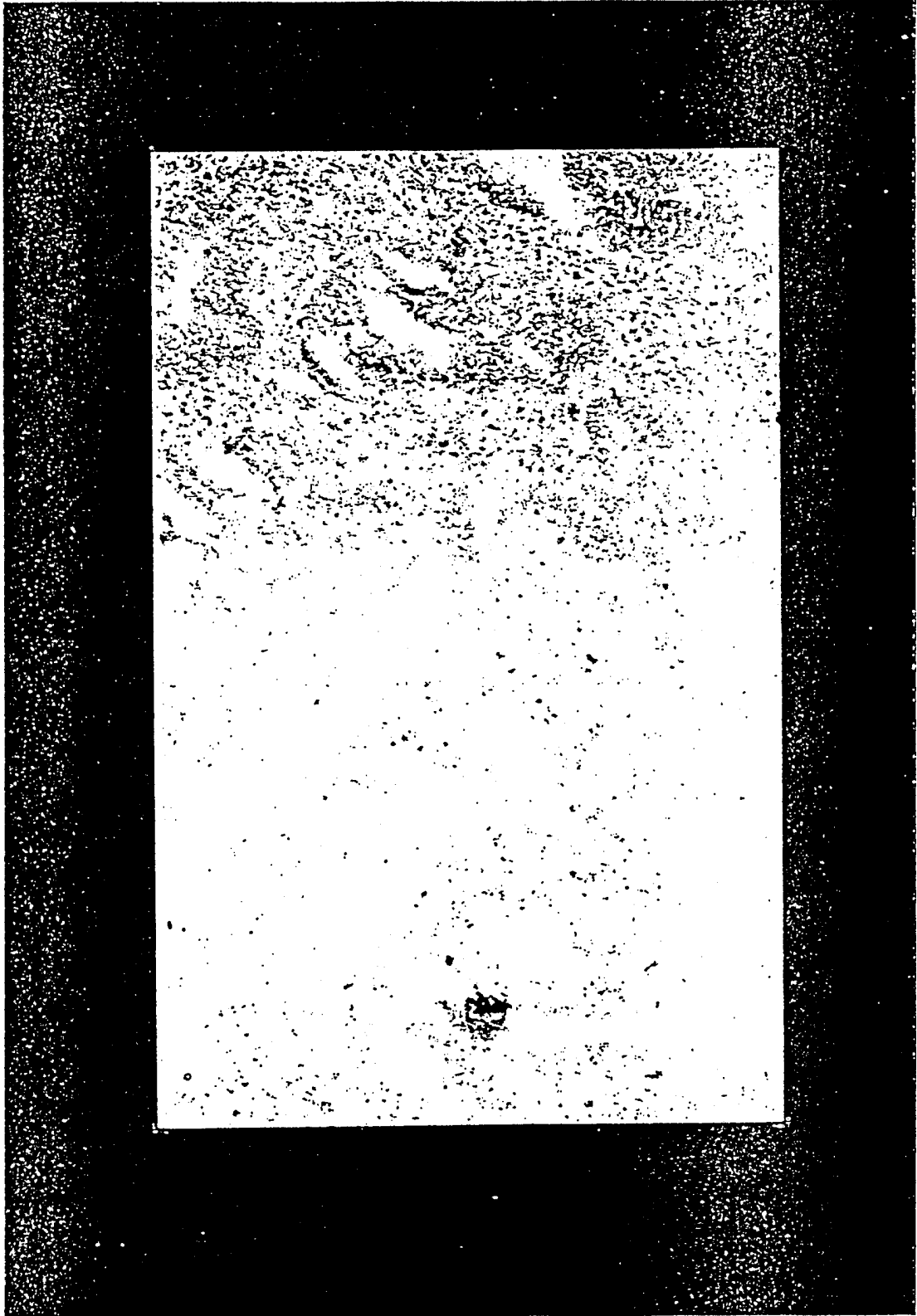
Obr. 23

23.11.99

32/35



Obr. 24



23.11.99

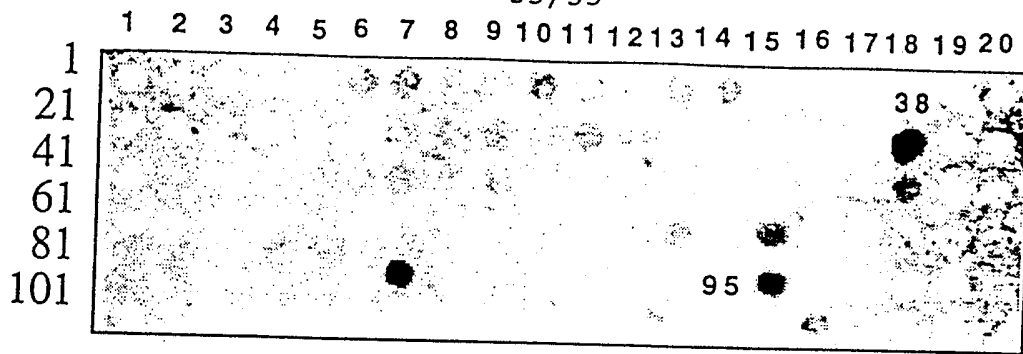
34/35



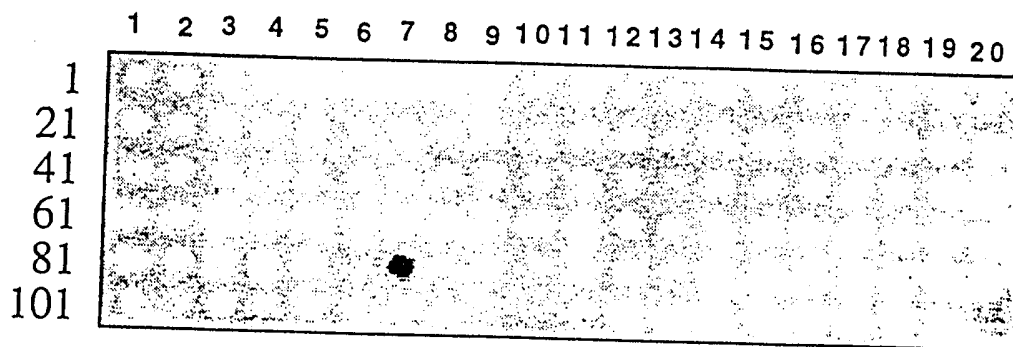
Obr. 26

M79:

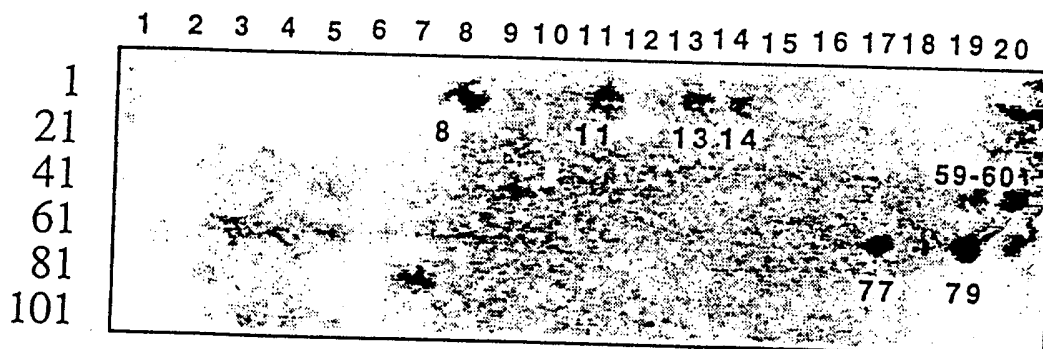
35/35



Anti-myší imunoglobulin konjugovaný s HRP jako sekundární protilátka:



H79:.



HD70:

