

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1998-2225**
(22) Přihlášeno: **17.01.1997**
(30) Právo přednosti: **17.01.1996 US 1996/010108**
24.10.1996 US 1996/29119
(40) Zveřejněno: **12.01.2000**
(Věstník č. 1/2000)
(47) Uděleno: **20.06.2008**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **30.07.2008**
(Věstník č. 31/2008)
(86) PCT číslo: **PCT/US1997/000759**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1997/026010**

(11) Číslo dokumentu:

299 452

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
C12N 5/12 (2006.01)
A61P 7/02 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

WO 9405692 A.

Bessos et. al.: The Characterization of a panel of monoclonal antibodies to human coagulation Factor IX; Thrombosis Research; 1985, vol. 40. No. 6 str. 863-867.

(73) Majitel patentu:

SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION,
Philadelphia, PA, US
UNIVERSITY OF VERMONT AND STATE
AGRICULTURAL COLLEGE, Burlington, VT, US

(72) Původce:

Blackburn Michael Neal, Phoenixville, PA, US
Church William Robert, Burlington, VT, US
Feuerstein Giora Zeev, Wynnewood, PA, US
Gross Mitchell Stuart, Wynnewood, PA, US
Nichols Andrew John, Chester Springs, PA, US
Padlan Eduardo Agustin, Kensington, MD, US
Patel Arunbhai Haribhai, Phoenixville, PA, US
Sylvester Daniel Robert, Phoenixville, PA, US

(74) Zástupce:

JUDr. Pavel Zelený, Hálkova 2, Praha 2, 12000

(54) Název vynálezu:

**Monoklonální, pozměněná, humanizovaná a
chimerická protilátka a farmaceutický
prostředek obsahující pozměněnou protilátku**

(57) Anotace:

Jsou popsány monoklonální protilátky, pozměněné protilátky, humanizované protilátky, chimerické protilátky a farmaceutický prostředek, který obsahuje pozměněnou protilátku. Tyto monoklonální protilátky jsou účinné proti koagulačním faktorům a nacházejí použití pro inhibici trombózy.

CZ 299452 B6

Monoklonální, pozměněná, humanizovaná a chimerická protilátka a farmaceutický prostředek obsahující pozměněnou protilátku

5 Oblast techniky

Tento vynález se týká monoklonálních protilátek (mAb), které se váží na lidský koagulační faktor neboli kofaktor a jejich použití jako inhibitorů trombózy s vlastním vymezením. Tento vynález se konkrétně týká monoklonální protilátky, pozměněné protilátky, humanizované protilátky, chimerické protilátky a farmaceutického prostředku obsahujícího pozměněnou protilátku.

Dosavadní stav techniky

15 Za normálních okolností spouští poškození, ať malé, nebo velké, cévních endotelových buněk v cévách hemostatickou odpověď zprostředkovanou sekvencí dějů obecně označovaných jako koagulační „kaskáda“. Kaskáda vrcholí konverzí rozpustného fibrinogenu na nerozpustný fibrin, který spolu s destičkami tvoří lokalizovanou sraženinu neboli trombus, který brání extravasaci složek krve. Potom může proběhnout hojení a po něm rozpuštění sraženiny a obnovení integrity

20 cév a průtoku.

Děje, které probíhají v době od poškození do tvorby sraženiny jsou důkladně regulovány a jsou spojeny sérií reakcí. Stručně uvedeno, mnoho plasmatických koagulačních proteinů v inaktivních proenzymových formách a kofaktorů cirkuluje v plasmě. V místě poškození jsou tvořeny aktivní

25 enzymové komplexy a jsou sekvenčně aktivovány na serinové proteasy, kdy každá následující serinová proteasa katalyzuje následující proteasovou aktivaci proenzymu. Tato enzymatická kaskáda vede v každém dalším kroku k zvýšení účinku v následujícím kroku. Pro přehled o koagulační kaskádě viz první kapitola publikace „Thrombosis and Hemorrhagic“, J. Loscalzo a A. Schafer, vyd., Blackwell Scientific Publications, Oxford, Anglie (1994)).

30 I když účinné srážení limituje ztrátu krve v místě poškození, nevhodná tvorba trombů v žilách a v tepnách je často příčinou chorobného stavu a smrti. Abnormální srážecí aktivita může vést k patologickým stavům jako je infarkt myokardu, nestabilní angina pectoris, fibrilace síní, mrtvice, renální poškození, a/nebo může vznikat v důsledku léčby jako je perkutánní transluminální

35 koronární angioplastika nebo stavů jako je disseminovaná intravaskulární koagulace, sepse, plicní embolie a trombóza hlubokého žilního systému. Tvorba sraženina na povrchu cizích těles arteficiálních orgánů, zkratů a protéz, jako jsou umělé srdeční chlopně, je také problematická.

Osvědčená antikoagulancia používaná v současné době v léčbě těchto patologií a jiných trombotických a embolických onemocnění zahrnují sulfatovaný heteropolysacharidová heparin a nízko-

40 molekulární (LMW) heparin. Tato činidla jsou podávána parenterálně a mohou způsobit rychlou a úplnou inhibici srážení aktivací inhibitoru trombinu, antitrombinu III a inaktivaci všech srážlivých faktorů.

45 Nicméně, díky jejich silné účinnosti mají heparin a LMW nevýhody. Nekonrolovatelné krvácení v důsledku prostých stresových pohybů a souvisejícího kontaktu s fyzikálními objekty nebo místy chirurgického zákroku je hlavní komplikací a je pozorováno u 1 až 7 % pacientů léčených kontinuální infusí a u 8 až 14 % pacientů léčených intermitentními bolusovými dávkami. Pro minimalizaci rizika jsou kontinuálně odebírány vzorky krve pro kontinuální testování ex vivo

50 srážecích časů, což způsobuje nákladnost terapie a nepohodlí pro pacienta.

Dále, terapeutické rozmezí pro dosažení požadované účinnosti bez rizika krvácení je úzké. Terapeutický rozsah je od přibližně 1 do méně než 3 mikrogramů heparinu na ml plasmy, což vede k aktivovanému parciálnímu tromboplastinovému času (APTT) od asi 35 až do asi 100

55 sekund. Zvýšení koncentrace heparinu nad 3 mikrogramy na ml vyvolá překročení požadovaného

rozmezí a při zvýšení nad 4 mikrogramy na ml není srážlivost detekovatelná. Tak musí být největší pozornost věnována udržení plasmatických koncentrací u pacienta v terapeutickém rozmezí.

5 Dalším osvědčeným antikoagulačním činidlem s pomalejším a dlouhodobějším účinkem je warfarin, kumarinový derivát. Warfarin působí kompeticí s vitamin K–dependentní posttranslační modifikací protrombinu a dalších srážecích faktorů závislých na vitaminu K.

10 Společný rys antikoagulačního účinku, při kterém je krev učiněna nesrážlivou při koncentracích pouze o málo vyšších než je terapeutický rozsah, je možné pozorovat jak pro warfarin, tak pro heparin a LMW heparin. Je jasné, že existuje potřeba antikoagulačního činidla, které by bylo účinné při léčbě trombotických a embolických onemocnění, ale které by nezpůsobovalo nekontrolovatelné krvácení nebo jeho možnost.

15 Podstata vynálezu

Předmětem tohoto vynálezu je monoklonální protilátka, jejíž těžký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 31 a lehký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 44, jejíž těžký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 52 a lehký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 57, jejíž těžký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 52 a lehký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 62, jejíž těžký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 52 a lehký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 74, jejíž těžký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 52 a lehký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 78 nebo jejíž těžký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 89 a lehký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 99.

30 Předmětem tohoto vynálezu je také pozměněná protilátka obsahující těžký řetězec a lehký řetězec, kde úseky základní struktury uvedeného těžkého a lehkého řetězce jsou odvozeny od alespoň jedné protilátky vybrané z monoklonálních protilátek vymezených svrchu a aminokyselinové sekvence komplementaritu určujících úseků (CDRs) těžkého řetězce jsou dány v SEQ ID NO: 8, 9 a 10 a aminokyselinové sekvence CDRs lehkého řetězce jsou dány v SEQ ID NO: 12, 13 a 14.

35 Výhodným provedením tohoto vynálezu je pozměněná protilátka uvedená svrchu, která je humanizovaná.

Dalším výhodným provedením tohoto vynálezu je humanizovaná protilátka zmíněná svrchu,

- jejíž těžký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 31, 52 nebo 89,
- 40 – jejíž lehký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 44, 57, 62, 74, 78 nebo 99,
- jejíž těžký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 31 a lehký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 44,
- jejíž těžký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 52 a lehký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 57,
- 45 – jejíž těžký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 52 a lehký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 62,
- jejíž těžký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 52 a lehký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 74,
- 50 – jejíž těžký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 52 a lehký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 78, a

– jejíž těžký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 89 a lehký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 99.

5 Předmětem tohoto vynálezu je též chimerická protilátka obsahující těžký řetězec a lehký řetězec, ve které jsou konstantní úseky uvedeného těžkého a lehkého řetězce odvozeny od některé z humanizovaných protilátek uvedených svrchu a aminokyselinové sekvence variabilních úseků těžkého řetězce jsou dané v SEQ ID NO: 7 a aminokyselinové sekvence variabilních úseků lehkého řetězce jsou dané v SEQ ID NO: 11.

10 Výhodným provedením tohoto vynálezu je humanizovaná protilátka popsáná svrchu, ve které jsou konstantní úseky vybrány z lidských imunoglobulinů.

Předmětem tohoto vynálezu je rovněž farmaceutický prostředek obsahující pozměněnou protilátku popsanou svrchu a farmaceuticky přijatelný nosič.

15 Výhodným provedením tohoto vynálezu je farmaceutický prostředek charakterizovaný výše, který dále obsahuje kyselinu acetylsalicylovou.

20 Dále se uvádějí podrobnější údaje související s celou šíří předmětného vynálezu. Pro dokreslení a ke srovnávacím účelům jsou uvedeny také další informace, které souvisejí s předmětným vynálezem. Tyto informace jsou charakterizovány formou jednotlivých aspektů.

25 Jedním aspektem je způsob pro inhibici trombózy u zvířat, který spočívá v podávání účinné dávky monoklonální protilátky proti koagulačnímu faktoru, která má neutralizační účinnost s vlastním omezením.

Jiným aspektem vynálezu je monoklonální protilátka proti koagulačnímu faktoru, mající neutralizační aktivitu s vlastním omezením proti koagulačnímu faktoru.

30 Jiným aspektem vynálezu je monoklonální protilátka, mající identifikační charakteristiky SB 249413, SB 249415, SB 249416, SB 249417, SB 257731, SB 257732, 9E4(2)F4 nebo 11G4(1)B9.

35 Jiným aspektem je hybridomní buněčná linie mající identifikační charakteristiky 9E4(2)F4 nebo 11G4(1)B9).

Jiným aspektem je neutralizační Fab fragment nebo jeho $F(ab')_2$ fragment, který je produkován delecí Fc regionu monoklonální protilátky podle předkládaného vynálezu.

40 Jiným aspektem je neutralizační Fab fragment nebo jeho $F(ab')_2$ fragment, který je produkován výměnou řetězců, kdy je Fd těžký řetězec monoklonálních protilátek exprimován v myší filamentosní fágové Fab zobrazovací knihovně lehkého řetězce.

45 Jiným aspektem je neutralizační Fab fragment nebo jeho $F(ab')_2$ fragment, který je produkován výměnou řetězců, kdy je lehký řetězec monoklonálních protilátek exprimován v myší filamentosní fágové Fab zobrazovací knihovně těžkého řetězce.

50 Jiným aspektem je komplementaritu určující region těžkého řetězce imunoglobulinu, mající aminokyselinovou sekvenci vybranou ze skupiny skládající se z SEQ ID NO: 8, 9 a 10.

Jiným aspektem je komplementaritu určující region lehkého řetězce imunoglobulinu, mající aminokyselinovou sekvenci vybranou ze skupiny skládající se z SEQ ID NO: 12, 13 a 14.

55 Jiným aspektem vynálezu je alterovaná protilátka obsahující těžký řetězec a lehký řetězec, kde regiony pracovních rámečků uvedených těžkých a lehkých řetězců jsou odvozeny od alespoň

jedné vybrané protilátky a aminokyselinové sekvence komplementaritu určujících regionů uvedených řetězců jsou odvozeny od monoklonální protilátky proti koagulačnímu faktoru, mající neutralizační aktivitu s vlastním omezením proti koagulačnímu faktoru.

- 5 Jiným aspektem vynálezu je chimerická protilátka obsahující těžký řetězec a lehký řetězec, kde uvedená protilátka je charakterizována inhibicí funkce vnitřní nebo společné dráhy koagulačních faktorů s omezenou účinností, kde protilátka inhibuje trombózu a produkuje limitovanou modulaci koagulace, kde konstantní regiony uvedených těžkých a lehkých řetězců jsou odvozeny od alespoň jedné vybrané protilátky a aminokyselinové sekvence variabilních regionů uvedených řetězců jsou odvozeny od monoklonální protilátky proti koagulačnímu faktoru mající neutralizační aktivitu s vlastním omezením proti koagulačnímu faktoru.

- 10 Ještě jiným aspektem vynálezu je farmaceutický prostředek (dále též přípravek), obsahující humanizované protilátky nebo chimerické protilátky popsané výše a farmaceuticky přijatelný nosič.

Přehled obrázků na výkresech

- 20 Obrázek 1 je graf experimentálních výsledků demonstrujících titraci normální lidské plasmy myšími mAb BC1 a BC2 proti faktoru IX.

Obrázek 2 je graf experimentálních výsledků demonstrujících titraci normální lidské plasmy myšími mAb 9E4(2)F4 a 11G4(1)B9 proti faktoru IX.

Obrázek 3 je graf experimentálních výsledků demonstrujících titraci normální lidské plasmy myšími mAb HFXHC a HFXLC proti faktoru X a myší mAb HFXI proti faktoru IX.

- 25 Obrázek 4 je histogram experimentálních výsledků demonstrujících účinnost heparinu, kyseliny acetylsalicylové a myších mAb proti faktoru IX na aktivovaný parciální tromboplastinový čas (APTT) v 60. minutě v krysím modelu trombózy karotidy.

- 30 Obrázek 5 je histogram experimentálních výsledků demonstrujících účinnost heparinu, kyseliny acetylsalicylové a myších mAb proti faktoru IX na protrombinový čas v 60. minutě v krysím modelu trombózy karotidy.

Obrázek 6 je histogram experimentálních výsledků demonstrujících účinnost heparinu, kyseliny acetylsalicylové a myších mAb proti faktoru IX na uzávěr průtoku arteria carotis v krysím modelu trombózy karotidy.

- 35 Obrázek 7 je histogram experimentálních výsledků demonstrujících účinnost heparinu, kyseliny acetylsalicylové a myších mAb proti faktoru IX na hmotnost trombu v krysím modelu trombózy karotidy.

Obrázek 8 je histogram experimentálních výsledků demonstrujících účinnost heparinu, myší mAb BC2 proti faktoru IX, chimerické mAb proti faktoru IX a humanizované mAb proti faktoru IX na APTT v 60 minutě v krysím modelu trombózy karotidy.

- 40 Obrázek 9 je histogram experimentálních výsledků demonstrujících účinnost heparinu, myší mAb BC2 proti faktoru IX, chimerické mAb proti faktoru IX a humanizované mAb proti faktoru IX na hmotnost trombu v krysím modelu trombózy karotidy.

- 45 Předkládaný vynález poskytuje různé protilátky, pozměněné protilátky a jejich fragmenty proti koagulačním faktorům, které jsou charakterizované neutralizační aktivitou s vlastním omezením. Výhodně je koagulační faktor z vnitřní nebo ze společné dráhy. Nejvýhodněji jsou protilátky proti koagulačnímu faktoru anti-faktor IX, anti-faktor IXa, anti-faktor X, anti-faktor Xa, anti-faktor XI, anti-faktor XIa, anti-faktor VIII, anti-faktor VIIa, anti-faktor V, anti-faktor Va, anti-faktor VII, anti-faktor VIIa nebo anti-trombinové. Zejména výhodné jsou protilátky proti faktoru IX. Příklady protilátek proti koagulačním faktorům jsou humanizované monoklonální
- 50

protilátky SB 249413, SB 249415, SB 249416, SB 249417, SB 257731 a SB 257732 namířené proti lidskému faktoru IX, chimerická monoklonální protilátka ch α FIX namířená proti lidskému faktoru IX, myší monoklonální protilátky BC1, BC2, 9E4(2)F4 a 11G4(1)B9, které jsou namířené proti lidskému faktoru IX a/nebo IXa nebo myší monoklonální protilátky HFXLC a HFXI, které jsou namířené proti lidskému faktoru X a XI, v příslušném pořadí. Nejvýhodnější je monoklonální protilátka SB 249417 proti lidskému faktoru IX.

Protilátky podle předkládaného vynálezu mohou být připraveny konvenčními hybridomními technikami, fágovými zobrazovacími kombinatoriálními knihovnami, přeskupováním imunoglobulinových řetězců a humanizačními technika pro vývoj nových neutralizačních protilátek s vlastním omezením. Také jsou zde obsaženy plně lidské mAb mající neutralizační aktivitu s vlastním omezením. Tyto produkty jsou použitelné v terapeutických a farmaceutických přípravcích pro léčbu trombotických a embolických onemocnění asociovaných s infarktem myokardu, nestabilní anginou pectoris, plicní embolií, trombózou hlubokých žil, perkutánní transluminální koronární angioplastikou, disseminovanou intravaskulární koagulací, sepsí, umělými orgány, zkraty nebo protesami.

Jak je zde použit označuje termín „neutralizační aktivita s vlastním omezením“ aktivitu protilátky, která se váže na lidský koagulační faktor, výhodně z vnitřní nebo společné dráhy, včetně faktoru IX/IXa, X/Xa, XI/XIa, VIII/VIIIa a V/Va, VII/VIIa a trombin, a inhibuje trombózu takovým způsobem, že koagulace je modulována omezeným způsobem. „Omezená modulace koagulace“ je definována jako zvýšení času srážení, jak je měřeno prodloužením aktivovaného parciálního tromboplastinového času (APTT), kdy plasma je stále schopná srážení, s APTT dosahujícím maximálních hodnot i přes zvýšení koncentrací monoklonální protilátky. Tato omezená modulace koagulace kontrastuje s nesrážlivostí plasmy a nekonečně dlouhým APTT, jak je způsobeno vyššími koncentracemi heparinu. Výhodně jsou maximální hodnoty APTT způsobů podle předkládaného vynálezu v terapeutickém rozmezí pro heparin. Nejvýhodněji je maximální APTT v rozmezí od asi 35 sekund do asi 100 sekund, což odpovídá asi 1,5–násobku až 3,5 násobku normální kontrolní hodnoty APTT. V jednom provedení vynálezu je APTT prodlouženo bez významného prodloužení protrombinového času (PT).

„Pozměněná protilátka“ označuje protein kodovaný pozměněným imunoglobulin kodujícím regionem, který může být získán expresí ve vybrané hostitelské buňce. Takové pozměněné protilátky jsou zpracované protilátky (např. chimerické nebo humanizované protilátky) nebo fragmenty protilátek bez celého nebo bez části konstantního regionu imunoglobulinu (například Fv, Fab, Fab' nebo F(ab')₂ a podobně).

„Pozměněný imunoglobulinový kodující region“ označuje sekvenci nukleové kyseliny kodující pozměněnou protilátku podle předkládaného vynálezu. Pokud je pozměněná protilátka CDR–přenesená nebo humanizovaná protilátka, pak jsou sekvence kodující komplementaritu určující regiony (CDR) z non–lidského imunoglobulinu insertovány na první imunoglobulinový partner skládající se ze sekvencí lidských variabilních pracovních rámečků. Volitelně je první imunoglobulinový partner navázán na druhý imunoglobulinový partner.

„První imunoglobulinový partner“ označuje sekvenci nukleové kyseliny kodující lidský pracovní rámeček nebo variabilní region lidského imunoglobulinu, ve kterém jsou nativní (nebo přirozené) CDR–kodující regiony nahrazeny CDR kodujícími regiony dárcovské protilátky. Lidský variabilní region může být z imunoglobulinového těžkého řetězce, lehkého řetězce (nebo z obou), nebo jejich analog nebo funkční fragment. Takové CDR regiony, umístěné ve variabilním regionu protilátek (imunoglobulinů) mohou být určeny metodami známými v oboru. Například Kabat et al., v „Sequences of Proteins of Immunological Interest“, 4. vydání, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987), popisuje pravidla pro lokalizaci CDR. Kromě toho, jsou známy počítačové programy, které jsou použitelné pro identifikaci CDR regionů/struktur.

„Druhý imunoglobulinový partner“ označuje jinou nukleotidovou sekvenci kodující protein nebo peptid, se kterým je první imunoglobulinový partner fúsován v rámečku nebo pomocí volitelné běžné linkerové sekvence (tj. operativně navázán). Výhodně to je imunoglobulinový gen. Druhý imunoglobulinový partner může obsahovat sekvenci nukleové kyseliny kodující celý konstantní region pro stejnou (tj. homologní, kde první a druhá pozměněná protilátka jsou odvozeny ze stejného zdroje), nebo jinou (tj. heterologní) požadovanou protilátku. Může to být těžký nebo lehký řetězec imunoglobulinu (nebo oba řetězce jako součást jednoho polypeptidu). Druhý imunoglobulinový partner není omezen určitou třídou nebo izotypem imunoglobulinu. Kromě toho, druhý imunoglobulinový partner může obsahovat část konstantního regionu imunoglobulinu, jak je tomu u Fab nebo $F(ab')_2$ (tj. určitou část vhodného lidského konstantního regionu nebo regionu pracovního rámečku). Takový druhý imunoglobulinový partner může také obsahovat sekvence kodující integrační membránový protein přítomný na zevním povrchu hostitelské buňky, například jako část fágové zobrazovací knihovny, nebo sekvenci kodující protein pro analytickou nebo diagnostickou detekci, například křenovou peroxidasu, β -galaktosidasu, atd.

Termíny Fv, Fc, Fd, Fab, Fab' nebo $F(ab')_2$ jsou použity ve standardních významech. Viz například Harlow et al., v „Antibodies A Laboratory Manual“, Cold Spring Harbor Laboratory (1988).

Jak je zde použito popisuje „zpracovaná protilátka“ typ pozměněné protilátky, tj. kompletní syntetickou protilátku (například chimerickou nebo humanizovanou protilátku v protikladu k fragmentu protilátky), ve které je část variabilních domén lehkého a/nebo těžkého řetězce vybrané akceptorové protilátky nahrazena analogickou částí z jedné nebo z více dárcovských protilátek, které mají specifitu pro vybraný epitop. Například, takové molekuly mohou zahrnovat protilátky charakterizované humanizovaným těžkým řetězcem asociovaným s nemodifikovaným lehkým řetězcem (nebo chimerickým lehkým řetězcem), nebo naopak. Zpracované protilátky mohou být také charakterizovány alterací sekvencí nukleových kyselin kodujících pracovní regiony variabilních domén lehkých a/nebo těžkých řetězců akceptorové protilátky, která uchovává vazebnou specifitu dárcovské protilátky. Tyto protilátky mohou obsahovat nahrazení jednoho nebo více CDR (výhodně všech) akceptorové protilátky CDR z dárcovské protilátky zde popsané.

„Chimerická protilátka“ označuje zpracovanou protilátku, která obsahuje přirozené variabilní regiony (lehkého řetězce a těžkého řetězce) odvozené od dárcovské protilátky ve spojení s konstantními regiony lehkého řetězce a těžkého řetězce odvozenými z akceptorové protilátky.

„Humanizovaná protilátka“ označuje typ zpracované protilátky mající své CDR odvozené z non-lidského dárcovského imunoglobulinu a zbývající imunoglobulinové části molekuly jsou odvozeny od jednoho nebo více imunoglobulinů. Kromě toho, zbytky pracovního rámečku mohou být pozměněny tak, aby byla zachována vazebná afinita. Viz například Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10029 – 10032 (1989), Hodgson et al., Bio/Technology 9: 421 (1991).

Termín „dárcovská protilátka“ označuje monoklonální nebo rekombinantní protilátku, která je kodována sekvencemi nukleové kyseliny pro své variabilní regiony, CDR nebo jejich jiné funkční fragmenty nebo analogy prvního imunoglobulinového partnera, takže je poskytnut pozměněný imunoglobulinový kodující region a výsledná exprimovaná pozměněná protilátka s antigenní specifitou a neutralizační aktivitou charakteristickou pro dárcovskou protilátku. Jednou dárcovskou protilátkou vhodnou pro použití v předkládaném vynálezu je myší monoklonální protilátka s vlastní neutralizační aktivitou označená BC2. Jinými vhodnými dárcovskými protilátkami jsou myší monoklonální protilátky s vlastní neutralizační aktivitou označené BC1, 9E4(2)F4, 11G4(1)B9, HFXLC a HFXI.

Termín „akceptorová protilátka“ označuje monoklonální nebo rekombinantní protilátku heterologní k dárcovské protilátce, která má všechny, nebo části sekvencí nukleových kyselin kodujících její regiony pracovních rámečků lehkého řetězce a/nebo těžkého řetězce a nebo

konstantní regiony lehkého řetězce a/nebo těžkého řetězce prvního imunoglobulinového partnera. Výhodně je akceptorovou protilátkou lidská protilátka.

5 „CDR“ jsou definovány jako aminokyselinové sekvence komplementaritu určujících regionů protilátky, které jsou hypervariabilními regiony lehkých a těžkých řetězců imunoglobulinu. Viz, například Kabat et al., v „Sequences of Proteins of Immunological Interest“, 4. vydání, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987). Ve variabilní části imunoglobulinu jsou tři CDR nebo CDR regiony v těžkém řetězci a tři v lehkém řetězci. Proto, „CDR“, jak je zde použito, označuje všechny tři CDR těžkého řetězce, nebo všechny tři 10 CDR lehkého řetězce, nebo všechny CDR lehkého a těžkého řetězce, jak je to vhodné.

CDR obsahuje většinu kontaktních zbytků pro vazbu protilátky na antigen nebo epitop. Požadované CDR v tomto vynálezu jsou odvozeny z variabilních sekvencí lehkých a těžkých řetězců dárcovské protilátky a zahrnují analogy přirozených CDR, kde tyto analogy také mají nebo si 15 uchovávají stejnou antigenní vazebnou specifitu a/nebo neutralizační schopnost jako dárcovská protilátka, ze které jsou odvozeny.

„Vlastnit stejnou antigenní vazebnou specifitu a/nebo neutralizační schopnost“ znamená, například, že ačkoliv mAb BC2 může být charakterizována určitou hladinou neutralizační aktivity s vlastním omezením, může mít CDR kodovaný sekvencí nukleové kyseliny BC2 ve vhodném prostředí nižší nebo vyšší aktivitu. Předpokládá se, že CDR BC2 v takovém prostředí budou 20 nicméně rozpoznávat stejný epitop jako BC2.

„Funkční fragment“ je část variabilní sekvence lehkého nebo těžkého řetězce (např. drobné delece na amino nebo na karboxy konci variabilního regionu imunoglobulinu), která si uchovává 25 stejnou antigenní vazebnou specifitu a/nebo neutralizační schopnost jako protilátka, ze které byl fragment odvozen.

„Analog“ je aminokyselinová sekvence modifikovaná alespoň jednou aminokyselinou, kde uvedená modifikace může být chemická nebo substituce nebo přeskupení několika aminokyselin (tj. 30 na více než 10), kde tato modifikace umožňuje zachování biologických charakteristik aminokyselinové sekvence, například antigenní specifity a vysoké afinity, stejných jako u nemodifikované sekvence. Příklady analogů zahrnují silentní mutace, které mohou být konstruovány substitucí, pro vytvoření určitých restričních míst pro endonukleasy v nebo v okolí CDR–kodujících regionů. 35

Analogy mohou také vznikat v důsledku alelických variací. „Alelická variace nebo modifikace“ je alterace v sekvenci nukleové kyseliny kodující aminokyselinové nebo peptidové sekvence podle předkládaného vynálezu. Takové variace nebo modifikace mohou být způsobeny degenerací genetického kodu nebo mohou být záměrně vytvořeny pro vznik požadovaných 40 charakteristik. Tyto variace nebo modifikace mohou, ale nemusí vést k alteraci v jakémkoliv kodované aminokyselinové sekvenci.

Termín „efektorové činidlo“ označuje neproteinové molekulové nosiče, se kterými mohou být 45 pozměněné protilátky a/nebo přirozené nebo syntetické lehké nebo těžké řetězce dárcovské protilátky nebo jiné fragmenty dárcovské protilátky asociovány běžnými prostředky. Takové neproteinové nosiče mohou zahrnovat konvenční nosiče používané v oblasti diagnostiky, například polystyrenové nebo jiné plastové korálky, polysacharidy, například jak jsou použity v BIAcore (Pharmacia) systému, nebo jiné neproteinové substance použitelné v oblasti medicíny a bezpečné pro podání lidem a zvířatům. Jiná efektorová činidla mohou obsahovat makrocycly, pro chelaci 50 atomů těžkých kovů nebo radioizotopů. Taková efektorová činidla mohou být také užitečná pro zvýšení poločasu pozměněných protilátek, například jako tomu je u polyetylenglykolu.

Pro použití při konstrukci protilátek, pozměněných protilátek a fragmentů podle předkládaného vynálezu mohou být použity jiné než lidské druhy, jako je hovězí dobytek, ovce, opice, kuřata,

hlodavci (například myši a krysy) pro generování požadované imunoglobulinu za imunizace s lidským koagulačním faktorem, výhodně faktorem IX/IXa, X/Xa, XI/XIa, VIII/VIIIa a V/Va, VII/VIIa nebo trombinem nebo peptidovým epitopem z nich odvozeným. Pro získání hybridních buněčných linií secernujících non-lidské mAb k příslušnému koagulačnímu faktoru jsou použity běžné hybridomní techniky. Takové hybridomy jsou potom vyšetřovány na vazbu za použití faktorem IX/IXa, X/Xa, XI/XIa, VIII/VIIIa, a V/Va, VII/VIIa nebo trombinem potažených 96-jamkových ploten, jak je popsáno v části Příkladů, nebo alternativně biotinylovaným faktorem IX/IXa, X/Xa, XI/XIa, VIII/VIIIa a V/Va, VII/VIIa nebo trombinem navázaným na plotnu potaženou streptavidinem. Alternativně může být vytvořena plně lidská mAb za použití technik dobře známých v oboru a použitých v tomto vynálezu.

Jedním příkladem mAb s vlastní omezenou neutralizační aktivitou podle předkládaného vynálezu je mAb BC25, myší protilátka, která může být použita pro vývoj chimerické nebo humanizované molekuly. BC2 mAb je charakterizována inhibiční aktivitou s vlastním omezením na srážecí čas. Jak je měřeno APTT testem způsobuje účinek BC2 mAb na čas srážení maximální hodnoty okolo 100 sekund. BC2 mAb se také váže na faktor IXa, inhibuje konversi faktoru IX na IXa a inhibuje aktivitu faktoru XIa. Kofaktory ve formě dvojmocných kovů jsou nutné pro aktivitu, kdy mAb vykazuje vyšší preferenci pro Ca^{2+} než pro Mn^{2+} . Pozorovaná IC_{50} v APTT testu je přibližně 50 nM. BC2 mAb vykazuje mezidruhovou zkříženou reaktivitu s krysami a její izotyp je IgG2a.

Dalšími vhodnými dárcovskými protilátkami jsou myší mAb BC1, 9E4(2)F4 a 11G4(1)B9. Tyto mAb jsou charakterizovány inhibiční aktivitou s vlastním omezením na srážecí čas. Jak je měřeno APTT testem způsobuje účinek těchto mAb na čas srážení maximální hodnoty okolo 90 až 100 sekund pro 9E4(2)F4 a okolo 80 sekund pro 11G4(1)B9. BC1 mAb se také váže na faktor IXa, inhibuje aktivitu faktoru IXa, ale neinhibuje konversi faktoru IX na IXa. Kofaktory ve formě dvojmocných kovů nejsou nutné pro její aktivitu. Pozorovaná IC_{50} v APTT testu je přibližně 35 nM. BC2 mAb je izotyp IgG1.

Ještě jinou vhodnou dárcovskou protilátkou charakterizovanou inhibiční aktivitou s vlastním omezením na srážecí čas je myší mAb HFXLC. Jak je měřeno APTT testem způsobuje účinek HFXLC mAb na čas srážení maximální hodnoty okolo 50 až 60 sekund. HFXLC mAb se také váže na lehký řetězec faktoru X a inhibuje aktivitu faktoru X/Xa. Pozorovaná IC_{50} v APTT testu je přibližně 20 nM.

Ještě jinou vhodnou dárcovskou protilátkou charakterizovanou inhibiční aktivitou s vlastním omezením na srážecí čas je myší mAb HFXI. Jak je měřeno APTT testem způsobuje účinek HFXI mAb na čas srážení maximální hodnoty okolo 100 sekund. HFXI mAb se také váže na faktor XI a inhibuje aktivitu faktoru XI/XIa. Pozorovaná IC_{50} v APTT testu je přibližně 30 nM.

Ačkoliv není zamýšlena vazba na jakoukoliv jednotlivou teorii týkající se mechanismu účinku, zdá se, že tyto mAb regulují koagulaci nekompetitivním nebo alosterickým mechanismem, čímž je dosaženo pouze částečné inhibice.

Tento vynález není omezen na použití BC1, BC2, 9E4(2)F4, 11G4(1)B9, HFXLC, HFXI nebo jejich hypervariabilních (tj. CDR) sekvencí. Jakákoliv jiná vhodná vysokoafinitní protilátka charakterizovaná neutralizační aktivitou s vlastním omezením a odpovídajícími CDR může za ně být substituována. Identifikace dárcovské protilátky v následujícím popisu jako BC1, BC2, 9E4(2)F4, 11G4(1)B9, HFXLC nebo HFXI je provedena pouze pro ilustraci a zjednodušení popisu.

Předkládaný vynález také obsahuje použití Fab fragmentů nebo F(ab')_2 fragmentů odvozených od protilátek proti určitým lidským koagulačním faktorům nebo kofaktorům. Tyto fragmenty jsou použitelné jako činidla mající vlastní omezenou neutralizační aktivitu proti koagulačním faktorům, výhodně proti faktorům IX/IXa, X/Xa, XI/XIa, VIII/VIIIa, a V/Va, VII/VIIa nebo trombinu. Fab fragment obsahuje celý lehký řetězec a amino koncovou část těžkého řetězce. F(ab')_2 je

fragment tvořený Fab fragmenty spojenými disulfidovými vazbami. mAb BC1, BC2, 9E4(2)F4, 11G4(1)B9, HFXLC a HFXI a další podobné protilátky s vysokou afinitou jsou zdroje pro Fab fragmenty a $F(ab')_2$ fragmenty, které mohou být získány běžnými prostředky, například štěpením mAb vhodnými proteolytickými enzymy, papainem a/nebo pepsinem, nebo rekombinantními metodami. Tyto Fab a $F(ab')_2$ fragmenty jsou použitelné sami o sobě jako terapeutická, profylaktická nebo diagnostická činidla, a jako dárci sekvencí obsahujících variabilní regiony a CDR sekvence použitelné pro tvorbu rekombinantních nebo humanizovaných protilátek jak je zde popsáno.

Fab a $F(ab')_2$ fragmenty mohou být konstruovány pomocí kombinatoriálních fágových knihoven (viz například Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433 – 455 (1994)) nebo pomocí přeskupování imunoglobulinových řetězců (viz například Marks et al., Bio/Technology, 10: 779 – 783 (1992)), kde oba odkazy jsou zde uvedeny ve své úplnosti, kde je imunoglobulinový Fd neo v_H z vybrané protilátky (například BC2) asociován s repertoárem imunoglobulinových lehkých řetězců, v_L (nebo v_K) za vzniku nových Fab. Naopak, imunoglobulinový lehký řetězec z vybrané protilátky může být asociován s repertoárem imunoglobulinových těžkých řetězců, v_H (nebo Fd) za vzniku nových Fab. Fab proti faktoru IX s neutralizační aktivitou s vlastním omezením mohou být získány asociací Fd mAb BC2 s repertoárem imunoglobulinových lehkých řetězců. Proto je možné získat neutralizační Fab s jedinečnou sekvencí (nukleotidovou a aminokyselinovou) technikou přeskupování řetězců.

mAb BC2 a další protilátky popsané výše mohou mít sekvence, jako jsou variabilní peptidové sekvence těžkých a/nebo lehkých řetězců, sekvence pracovních rámečků, CDR sekvence, funkční fragmenty a jejich analogy, a nukleotidové sekvence, které je kodují, použitelné při vývoji a získání různých pozměněných protilátek, které jsou charakterizovány antigenní vazebnou specifitou dárcovské protilátky.

Sekvence nukleových kyselin podle předkládaného vynálezu, nebo jejich fragmenty, kodující variabilní peptidové sekvence lehkého řetězce a těžkého řetězce, jsou také užitečné pro mutagenní vložení specifických změn do sekvence nukleových kyselin kodujících CDR nebo regiony pracovního rámečku a pro inkorporaci výsledných modifikovaných nebo fúsních sekvencí nukleové kyseliny do plasmidu pro expresi. Například, silentní substituce v nukleotidové sekvenci pracovního rámečku a CDR kodujících regionů může být použita pro vytvoření míst pro restriční enzymy, která usnadní inserci mutovaných CDR a/nebo regionů pracovních rámečků. Tyto CDR kodující regiony mohou být použity při konstrukci humanizovaných protilátek podle předkládaného vynálezu.

Sekvence nukleových kyselin a aminokyselin pro variabilní region těžkého řetězce BC2 jsou uvedeny v SEQ ID NO: 5 a SEQ ID NO: 7. CDR sekvence z tohoto regionu jsou uvedeny v SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 a SEQ ID NO: 10.

Sekvence nukleových kyselin a aminokyselin pro variabilní region lehkého řetězce BC2 jsou uvedeny v SEQ ID NO: 6 a SEQ ID NO: 11. CDR sekvence z tohoto regionu jsou uvedeny v SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 a SEQ ID NO: 14.

Vzhledem k degeneraci genetického kodu mohou být konstruovány různé kodující sekvence, které kodují variabilní aminokyselinové sekvence lehkého a těžkého řetězce a CDR sekvence podle předkládaného vynálezu, stejně jako jejich funkční fragmenty a analogy, které mají antigenní specifitu dárcovské protilátky. Izolované sekvence nukleových kyselin podle předkládaného vynálezu, nebo jejich fragmenty, kodující variabilní peptidové sekvence řetězců nebo CDR mohou být použity pro produkci pozměněných protilátek, například chimerických nebo humanizovaných protilátek, nebo jinak zpracovaných protilátek podle předkládaného vynálezu, pokud jsou operativně navázány s druhým imunoglobulinovým partnerem.

Mělo by být uvedeno, že kromě izolovaných sekvencí nukleových kyselin kodujících částí pozměněné protilátky a protilátek jak jsou zde popsány obsahuje předkládaný vynález také další

takové sekvenční nukleových kyselin, jako jsou sekvenční komplementární k přirozeným CDR-kodujícím sekvencím nebo sekvenční komplementární k modifikovaným lidským regionům pracovních rámečků sousedících s CDR-kodujícími regiony. Použitelné DNA sekvenční zahrnují ty sekvenční, které hybridizují s DNA sekvencemi za přísných hybridizačních podmínek. Viz T. Maniatis et al., Molecular Cloning (A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory (1982), str. 387 – 389. Příkladem takových přísných hybridizačních podmínek je hybridizace při 4xSSC při 65 °C, následovaná promytím v 0,1xSSC při 65 °C po dobu jedné hodiny. Alternativně, přísnými hybridizačními podmínkami je 50% formamid, 4xSSC při 42 °C. Výhodně mají tyto hybridizující DNA sekvenční délku alespoň 18 nukleotidů, tj. přibližně délku CDR.

Pozměněné imunoglobulinové molekuly mohou kodovat pozměněné protilátky, kam patří zpracované protilátky jako jsou chimerické protilátky a humanizované protilátky. Požadovaný pozměněný imunoglobulinový kodující region obsahuje CDR-kodující regiony, které kodují peptidy mající antigenní specifitu protilátky proti faktoru IX/IXa, X/Xa, XI/XIa, VIII/VIIIa a V/Va, VII/VIIa nebo trombinu, výhodně protilátky s vysokou afinitou, jako jsou ty, které poskytuje předkládaný vynález, insertované do prvního imunoglobulinového partnera, jako je region lidského pracovního rámečku nebo lidský variabilní imunoglobulinový region.

Výhodně je první imunoglobulinový partner operativně navázán na druhý imunoglobulinový partner. Druhý imunoglobulinový partner je definován výše a může obsahovat sekvenční kodující druhý požadovaný region protilátky, například Fc region. Druhý imunoglobulinový partner může také obsahovat sekvenční kodující jiný imunoglobulin, se kterým je konstantní region lehkého nebo těžkého řetězce fúsován v rámečku nebo pomocí linkerové sekvenční. Zpracované protilátky proti funkčním fragmentům nebo analogům koagulačních faktorů mohou být vyvinuty tak, aby vyvolávaly zvýšenou vazbu se stejnou protilátkou.

Druhý imunoglobulinový partner může být také asociován s efektorovým činidlem definovaným výše, včetně neproteinových nosičových molekul, na které může být druhý imunoglobulinový partner operativně navázán běžnými prostředky.

Fúze nebo vazba mezi druhým imunoglobulinovým partnerem, například protilátkovou sekvencí, a efektorovým činidlem, může být zprostředkována jakýmkoliv vhodnými prostředky, například běžnými kovalentními nebo iontovými vazbami, proteinovou fúzí nebo hetero-bifunkčními zesilovacími činidly, například karboimidem, glutaraldehydem a podobně. Takové techniky jsou v oboru známy a jsou popsány v běžných chemických a biochemických textech.

Dále, běžné linkerové sekvenční, které jednoduše dodávají dostatečný prostor mezi druhým imunoglobulinovým partnerem a efektorovým činidlem mohou také být konstruovány do pozměněného imunoglobulinového kodujícího regionu. Vývoj takových linkerů je v oboru dobře znám.

Kromě toho, pro zvýšení exprese mohou být signální sekvenční pro molekuly podle předkládaného vynálezu modifikovány technikami v oboru známými.

Výhodná pozměněná protilátka obsahuje peptidové nebo proteinové sekvenční variabilního lehkého a/nebo těžkého řetězce mající antigenní specifitu mAb CB2, například v_H a v_L řetězce. Ještě další výhodná protilátka podle předkládaného vynálezu je charakterizována aminokyselinovou sekvencí obsahující alespoň jeden, a výhodně všechny, CDR variabilního regionu těžkého a/nebo lehkého řetězce molekuly myši protilátky BC2 a zbývající sekvenční odvozené z lidského zdroje, nebo jeho funkčního fragmentu nebo analogu.

V ještě dalším provedení může být pozměněná protilátka podle předkládaného vynálezu připojena na další činidlo, například, rekombinantní DNA technologie může být použita pro produkci pozměněné protilátky podle předkládaného vynálezu, ve které je Fc fragment nebo CH2 CH3 doména kompletní molekuly protilátky nahrazena enzymem nebo jinou detekovatelnou molekulou (tj. polypeptidovým efektem nebo reporterovou molekulou).

Druhý imunoglobulinový partner může být také operativně navázán na neimunoglobulinový peptid, protein nebo jeho fragment heterologní k CDR obsahující sekvenci mající antigenní specifitu pro koagulační faktor, výhodně pro faktor IX/IXa, X/Xa, XI/XIa, VIII/VIIIa, a V/Va, VII/VIIa nebo trombin. Vzniklý protein může po expresi vykazovat jak antigenní specifitu, tak charakteristiky non–imunoglobulinu. Tyto charakteristiky fúsního partnera mohou být, například, funkční charakteristiky jako je jiná vazba nebo receptorová doména nebo terapeutické charakteristiky, pokud je fúsní partner sám o sobě terapeutickým proteinem nebo další antigenní charakteristiky.

Další výhodný protein podle předkládaného vynálezu může obsahovat kompletní molekulu protilátky, mající kompletní lehký a těžký řetězec nebo jakýkoliv jejich fragment, jako je Fab nebo F(ab')₂ fragment, dimer těžkých řetězců nebo jejich jakýkoliv minimální rekombinantní fragment, jako je F_v nebo jednořetězcová protilátka (SCA) nebo jakoukoliv jinou molekulu se stejnou specifikou jako má vybraná dárcovská mAb BC1, BC2, 9E4(2)F4, 11G4(1)B9, HFXLC nebo HFXI. Takový protein může být použit ve formě pozměněné protilátky nebo může být použit ve své nefúsované formě.

Pokud je druhý imunoglobulinový partner odvozen od protilátky jiné než od dárcovské protilátky, například od pracovního rámečku nebo konstantních regionů jakéhokoliv izotypu nebo třídy imunoglobulinu, vzniklá zpracovaná protilátka. Zpracované protilátky mohou obsahovat imunoglobulinové (Ig) konstantní regiony a variabilní regiony pracovního rámečku z jednoho zdroje, například z akceptorové protilátky, a jeden nebo více (výhodně všechny) CDR z dárcovské protilátky, například z protilátek proti faktoru IX/IXa, X/Xa, XI/XIa, VIII/VIIIa a V/VA, VII/VIIa nebo trombinu, které jsou zde popsány. Kromě toho, mohou být provedeny takové alterace, například delece, substituce nebo adice, variabilních domén pracovního rámečku lehkého a/nebo těžkého řetězce akceptorové protilátky, nebo CDR regionů dárcovské protilátky, které zachovávají antigenní vazebnou specifitu dárcovské protilátky.

Takové zpracované protilátky jsou navrženy tak, aby využívaly jeden (nebo oba) variabilní lehké a/nebo těžké řetězce mAb proti koagulačnímu faktoru (volitelně modifikované jak je zde popsáno) nebo jeden nebo více CDR lehkého nebo těžkého řetězce. Zpracované protilátky podle předkládaného vynálezu vykazují neutralizační aktivitu s vlastním omezením.

Takové zpracované protilátky mohou obsahovat humanizované protilátky obsahující regiony pracovního rámečku vybraného lidského imunoglobulinu nebo subtypu nebo chimerické protilátky obsahující konstantní region lidských lehkých a těžkých řetězců fúsované s funkčními fragmenty protilátky proti koagulačnímu faktoru. Vhodné lidské (nebo jiné zvířecí) akceptorové protilátky mohou být vybrány z konvenční databáze, jako je například KABAT[®] databáze, Los Alamos databáze, a Swiss Protein databáze, podle homologie s nukleotidovými a aminokyselinovými sekvencemi dárcovské protilátky. Lidská protilátka charakterizovaná homologií s regiony pracovních rámečků dárcovské protilátky (na úrovni aminokyselin) může být vhodná pro dodání variabilního regionu pracovního rámečku těžkého řetězce pro inserci CDR z dárcovské protilátky. Vhodná akceptorová protilátka schopná dodání variabilního regionu pracovního rámečku lehkého řetězce může být vybrána podobným způsobem. Mělo by být uvedeno, že není nutné, aby těžké a lehké řetězce akceptorové protilátky pocházely ze stejné akceptorové protilátky.

Výhodně jsou heterologní pracovní rámečky a konstantní regiony vybrány ze tříd a izotypů lidských protilátek, jako jsou IgG (subtypy 1 až 4), IgM, IgA a IgE. Nicméně, akceptorová protilátka nemusí obsahovat pouze lidské imunoglobulinové proteinové sekvence. Například, může být konstruován gen, ve kterém je DNA sekvence kodující část lidského imunoglobulinového řetězce fúsována na DNA sekvenci kodující neimunoglobulinovou aminokyselinovou sekvenci jako je polypeptidový efektor nebo reporterová molekula.

Zejména výhodná humanizovaná protilátka obsahuje CDR BC2 insertované do regionů pracovního rámečku vybrané lidské protilátkové sekvence. Pro neutralizační lidské protilátky jsou jeden, dva nebo výhodně tři CDR z variabilních regionů těžkého a/nebo lehkého řetězce protilátky proti faktoru IX insertovány do regionů pracovního rámečku vybrané lidské protilátkové sekvence, takže nahrazují přirozené CDR této druhé uvedené protilátky.

Výhodně, u humanizované protilátky, byla variabilní doména v obou lidských těžkých a lehkých řetězcích upravena nahrazením jednoho nebo více CDR. Je možné použít všech šest CDR, nebo je možné použít různé kombinace méně než šesti CDR. Výhodně je nahrazeno všech šest CDR. Je možné nahradit CDR pouze v lidském těžkém řetězci a použít jako lehký řetězec nemodifikovaný lehký řetězec z lidské akceptorové protilátky. Ještě jako jiná alternativa může být kompatibilní lehký řetězec vybrán z jiné lidské protilátky za použití konvenční databáze protilátek. Zbytek zpracované protilátky může být odvozen od jakéhokoli vhodného lidského akceptorového imunoglobulinu.

Zpracovaná humanizovaná protilátka tak výhodně má strukturu přirozené lidské protilátky nebo jejího fragmentu a má kombinaci vlastností nutných pro účinné terapeutické použití, například pro léčbu trombotických nebo embolických onemocnění u lidí.

Nejvýhodněji mají humanizované protilátky aminokyselinové sekvence těžkého řetězce uvedené v SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 52 nebo SEQ ID NO: 89. Také nejvýhodnější mají humanizované protilátky aminokyselinové sekvence lehkého řetězce uvedené v SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 78 nebo SEQ ID NO: 99. Zejména výhodná je humanizovaná protilátka SB 249413, kde těžký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 31 a lehký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 44. Také zejména výhodná je humanizovaná protilátka SB 249415, kde těžký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 52 a lehký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 57. Také zejména výhodná je humanizovaná protilátka SB 249416, kde těžký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 52 a lehký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 62. Také zejména výhodná je humanizovaná protilátka SB 249417, kde těžký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 52 a lehký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 74. Také zejména výhodná je humanizovaná protilátka SB 257731, kde těžký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 52 a lehký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 78. Také zejména výhodná je humanizovaná protilátka SB 257732, kde těžký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 89 a lehký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 99.

Odborníkům v oboru bude jasné, že zpracovaná protilátka může být dále modifikována změnami v aminokyselinových variabilní domény bez nezbytného ovlivnění specifity a vysoké afinity dárcovské protilátky (tj. analog). Předpokládá se, že aminokyseliny těžkého a lehkého řetězce mohou být substituovány jinými aminokyselinami v pracovním rámečku variabilní domény nebo v CDR nebo v obou. Tyto substituce mohou být dodány dárcovskou protilátkou nebo konsensuálními sekvencemi z určité podskupiny.

Kromě toho, konstantní region může být pozměněn tak, aby se zvýšily nebo snížily selektivní vlastnosti molekul podle předkládaného vynálezu. Například, dimerizace, vazba na Fc receptory nebo schopnost vazby a aktivace komplementu (viz například Angal et al., Mol. Immunol. 30: 105 – 108 (1993), Xu et al., J. Biol. Chem. 269: 3469 – 3474 (1994), Winter et al., EP-307434-B).

Pozměněná protilátka, která je chimerická protilátka, se liší od humanizovaných protilátek popsanych výše tím, že obsahuje úplné variabilní regiony těžkého a lehkého řetězce non-lidské dárcovské protilátky, včetně regionů pracovního rámečku, v asociaci s konstantními regiony lidského imunoglobulinu pro oba řetězce. Předpokládá se, že chimerické protilátky, které mají

další non-lidské sekvence vzhledem k humanizovaným protilátkám podle předkládaného vynálezu, mohou vyvolávat signifikantní imunitní odpověď u lidí.

5 Takové protilátky jsou použitelné pro prevenci a léčbu trombotických a embolických onemocnění, jak je popsáno dále.

Výhodně jsou sekvence variabilních lehkých a/nebo těžkých řetězců a CDR mAb BC2 nebo jiné vhodné dárcovské protilátky, např. BC1, BC2, 9E4(2)F4, 11G4(1)B9, HFXCL, HFXI a jejich kodující nukleotidové sekvence, použity při konstrukci pozměněných protilátek, výhodně humanizovaných protilátek, podle předkládaného vynálezu v následujícím procesu. Stejně nebo podobné techniky mohou být také použity pro vývoj jiných provedení předkládaného vynálezu.

Hybridom produkující vybranou dárcovskou protilátku, například myší protilátku BC2, je konvenčně klonován a DNA jejích variabilních regionů lehkých a těžkých řetězců je získána technikami známými odborníkům v oboru, například technikami popsanými v Sambrook et al., „Molecular Cloning: A Laboratory Manual“, 2. vydání, Cold Spring Harbor Laboratory (1989). Variabilní regiony těžkého a lehkého řetězce BC2 obsahující alespoň CDR kodující regiony a ty části regionů pracovního rámečku variabilní domény lehkého a/nebo těžkého řetězce akceptorové mAb, které jsou nutné pro zachování vazebné specifity dárcovské mAb, stejně jako zbylé od imunoglobulinu—odvozené části protilátkového řetězce odvozené od lidského imunoglobulinu jsou získány za použití polynukleotidového primeru a reversní transkriptasy. CDR kodující regiony jsou identifikovány za použití známé databaze a srovnáním s ostatními protilátkami.

25 Myší/lidská chimerická protilátka může být potom připravena a může být testována na vazebnou schopnost. Taková chimerická protilátka obsahuje úplné V_H a V_L regiony non-lidské protilátky v asociaci s konstantními regiony lidského Ig pro oba řetězce.

Homologní regiony pracovního rámečku variabilního regionu těžkého řetězce z lidské protilátky jsou identifikovány za použití počítačové databáze, například KABAT® a lidská protilátka mající homologii s BC2 je vybrána jako akceptorová protilátka. Sekvence syntetických variabilních regionů těžkého řetězce obsahující BC2 CDR—kodující regiony v pracovních rámečkách lidské protilátky jsou navrženy s volitelnou nukleotidovou náhradou v regionech pracovního rámečku pro vložení restričních míst. Tato navržená sekvence je potom syntetizována za použití dlouhých syntetických oligomerů. Alternativně může být navržená sekvence syntetizována pomocí přesahujících oligonukleotidů, amplifikovaných polymerasovou řetězovou reakcí (PCR) a s opravenými chybami. Vhodný variabilní region pracovního rámečku lehkého řetězce může být navržen stejným způsobem.

Humanizovaná protilátka může být odvozena od chimerické protilátky, nebo výhodně, může být vyrobena synteticky insercí CDR regionů z lehkých a těžkých řetězců dárcovské mAb do vybraných pracovních rámečků lehkého a těžkého řetězce. Alternativně může být humanizovaná protilátka podle předkládaného vynálezu připravena za použití standardních technik mutagenese. Tak vzniklá humanizovaná protilátka obsahuje lidské regiony pracovního rámečku a CDR kodující regiony dárcovské mAb. Potom může proběhnout následná manipulace se zbytky pracovního rámečku. Vzniklá humanizovaná protilátka může být exprimována v rekombinantní hostitelské buňce, například COS, CHO nebo myelomové buňce. Jiné humanizované protilátky mohou být připraveny za použití této techniky na jiných vhodných non-lidských protilátkách specifických pro faktor IX nebo pro jiný koagulační faktor, s neutralizační aktivitou s vlastním omezením a vysokou afinitou.

50 Konvenční expresní vektor nebo rekombinantní plasmid je produkován umístěním těchto kodujících sekvencí pro pozměněnou protilátku v operativním spojení s konvenčními regulačními kontrolními sekvencemi schopnými kontroly replikace a exprese v, a/nebo sekrece z, hostitelské buňky. Regulační sekvence zahrnují promotorové sekvence, například CMV promotor, a signální sekvence, které mohou být odvozeny od známých protilátek. Podobně může být produkován

druhý expresní vektor mající DNA sekvenci, která koduje lehký a těžký řetězec komplementární protilátky. Výhodně je tento druhý expresní vektor identický jako ten první, kromě kodujících sekvencí a selektovatelných markerů, aby se co možná nejlépe zajistila funkční exprese každého polypeptidového řetězce. Alternativně mohou být kodující sekvence pro těžký a lehký řetězec pozměněné protilátky umístěny v jednom vektoru.

Vybraná hostitelská buňka je ko-transfektována běžnými technikami první a druhým vektorem (nebo je jednoduše transfektována jediným vektorem) za vzniku transfektované hostitelské buňky podle předkládaného vynálezu obsahující buď rekombinantní, nebo syntetické lehké a těžké řetězce. Transfektovaná buňka je potom kultivována běžnými technikami za produkce zpracované protilátky podle předkládaného vynálezu. Humanizovaná protilátka, která obsahuje asociaci rekombinantního těžkého a/nebo lehkého řetězce je vyšetřována v kultuře vhodným testem jako je ELISA nebo RIA. Podobné konvenční techniky mohou být použity pro konstrukci jiných pozměněných protilátek a molekul podle předkládaného vynálezu.

Vhodné vektory pro kroky klonování a subklonování použité ve způsobech a v konstrukci přípravků podle předkládaného vynálezu mohou být vybrány odborníkem. Například, může být použita pUC série klonovacích vektorů, jako je pUC19, který je komerčně dostupný od dodavatelských firem, jako je Amersham nebo Pharmacia. Kromě toho, pro klonování může být použit jakýkoliv vektor, který je schopen snadné replikace, má dostatek klonovacích míst a selektovatelných genů (např. pro antibiotickou resistenci) a umožňuje snadnou manipulaci. Proto není výběr klonovacího vektoru limitujícím faktorem v tomto vynálezu.

Podobně, vektory použité pro expresi zpracovaných protilátek podle předkládaného vynálezu mohou být vybrány odborníkem z jakýchkoliv běžných vektorů. Vektory také obsahují vybrané regulační sekvence (jako jsou CMV promotory), které řídí replikaci a expresi heterologních DNA sekvencí ve vybrané hostitelské buňce. Tyto vektory obsahují výše popsané DNA sekvence, které kodují zpracovanou protilátku nebo pozměněný imunoglobulinový kodující region. Kromě toho, vektory mohou obsahovat vybrané imunoglobulinové sekvence modifikované insercí požadovaných restrikčních míst pro snadnou manipulaci.

Expresní vektory mohou také být charakterizovány geny vhodnými pro amplifikační expresi heterologních DNA sekvencí, například savčího genu pro dihydrofolat reduktasu (DHFR). Další výhodné vektorové sekvence obsahují poly A signální sekvence, jako je sekvence z hovězího růstového hormonu (BGH) a promotorová sekvence pro betaglobin (betaglopro). Expresní vektory zde použitelné mohou být syntetizovány technikami, které jsou odborníkům v oboru dobře známe.

Složky takových vektorů, například replikony, selekční geny, enhancery, promotory, signální sekvence a podobně, mohou být získány z komerčních nebo přírodních zdrojů nebo mohou být syntetizovány známými postupy pro použití v řízení exprese a/nebo sekrece produktu rekombinantní DNA ve vybraném hostiteli. Jiné vhodné expresní vektory, kterých je mnoho známo v oboru pro expresi v savcích, hmyzích, bakteriálních, kvasinkových buňkách a houbách, mohou být také vybrány pro tento účel.

Předkládaný vynález také obsahuje buněčné linie transfektované rekombinantním plasmidem obsahujícím kodující sekvence zpracovaných protilátek nebo jejich pozměněných imunoglobulinových molekul. Hostitelské buňky užitečné pro klonování a jiné manipulace s těmito klonovacími vektory jsou také běžné. Nicméně, nejvýhodněji jsou buňky kmenů *E. coli* použity pro replikaci klonovacích vektorů a v dalších krocích v konstrukci pozměněných protilátek podle předkládaného vynálezu.

Vhodné hostitelské buňky nebo buněčné linie pro expresi zpracovaných protilátek nebo pozměněných protilátek podle předkládaného vynálezu jsou výhodně savčí buňky jako je CHO, COS, fibroblasty (například 3T3) a myleoidní buňky. Mohou být použity lidské buňky, což umožňuje

lidský charakter glykosylace. Alternativně mohou být použity jiné eukaryotické buněčné linie. Výběr vhodných savčích hostitelských buněk a způsoby pro transformaci, kultivaci, amplifikaci, vyšetřování a produkci produktu a přečištění jsou v oboru dobře známé. Viz například Sambrook et al., výše.

5

Bakteriální buňky mohou sloužit jako hostitelské buňky vhodné pro expresi rekombinantních Fab podle předkládaného vynálezu (viz například Pluckthun, A. Immunol. Rev. 130: 151 – 188 (1992)). Nicméně, vzhledem k tendenci proteinů exprimovaných v bakteriálních buňkách být v neskládané nebo nesprávně skládané formě nebo v neglukosylované formě by měl být jakýkoliv rekombinantní Fab produkovaný v bakteriálních buňkách vyšetřován na zachování své antigenní vazebné schopnosti. Pokud bude molekula exprimovaná v bakteriální buňce produkována ve správně složené formě, pak bude bakteriální buňka vhodným hostitelem. Například, různé kmeny *E. coli* použité pro expresi jsou dobře známé jako hostitelské buňky v oblasti biotechnologie. Mohou být také použity různé kmeny *B. subtilis*, *Streptomyces* nebo jiných bacilů a podobně.

15

Pokud je to žádoucí, mohou být také kvasinky použity jako hostitelské buňky, jako je odborníkům známo, stejně jako hmyzí buňky, např. *Drosophilové* a *Lepidopterové* a virové expresní systémy. Viz například Miller et al., Genetic Engineering 8: 277 – 298, Plenum Press (1986) a odkazy zde citované.

20

Obecné metody, kterými mohou být konstruovány vektory podle předkládaného vynálezu, transfekční metody nutné pro produkci hostitelských buněk podle předkládaného vynálezu a kultivační metody nezbytné pro produkci pozměněné protilátky podle předkládaného vynálezu z takových hostitelských buněk jsou všechno běžné techniky. Podobně, po produkci může být pozměněná protilátka podle předkládaného vynálezu přečištěna z obsahu buněčné kultury standardními technikami, včetně srážení síranem amonným, afinitních kolon, chromatografie na koloně, gelové elektroforesy a podobně. Takové techniky jsou v oboru známé a neomezují tento vynález.

25

Ještě jiná metoda pro produkci humanizovaných protilátek může využívat expresi v transgenním zvířeti, jak je popsáno v patentu US 4 873 316. Tento patent se týká expresního systému využívajícího zvířecího kaseinového promotoru který, pokud je transgenně inkorporován do savce, umožňuje samicím produkovat požadovaný rekombinantní protein v jejich mléce.

30

Po expresi vhodnou metodou je zpracovaná protilátka potom vyšetřována na svou in vitro aktivitu za použití vhodného testu. V současnosti jsou běžné ELISA testované formáty použity k hodnocení kvalitativní a kvantitativní vazby zpracované protilátky na faktor IX nebo na jiný vhodný koagulační faktor. Kromě toho, mohou být použity také jiné in vitro testy pro ověření neutralizační účinnosti před následnými klinickými studiemi na lidech, které jsou provedeny pro hodnocení přetrvávání zpracované protilátky v těle při obvyklých mechanismech klírens protilátky.

35

40

Podle postupů popsanych pro humanizované protilátky připravené z BC2 může odborník v oboru také konstruovat humanizované protilátky z jiných dárcovských protilátek, sekvencí variabilních regionů a CDR peptidů, které jsou zde popsány. Zpracované protilátky mohou být produkovány s pracovními rámečky variabilních regionů potenciálně rozpoznávanými jako „vlastní“ příjemcem zpracované protilátky. Mohou být provedeny drobné modifikace pracovních rámečků variabilního regionu, které způsobí velké zvýšení vazby antigenu bez významného zvýšení imunogenicity pro příjemce. Takové zpracované protilátky mohou být účinně použity při léčbě lidí s nemocemi způsobenými koagulačními faktory. Takové protilátky mohou být také užitečné v diagnostice takových stavů.

45

50

Tento vynález se také týká způsobů pro inhibici trombózy u zvířat, zejména u lidí, které obsahují podání účinné dávky monoklonální protilátky proti koagulačnímu faktoru mající neutralizační aktivitu s vlastním omezením. Výhodně je koagulační faktor z vnitřní nebo ze společné koagulační dráhy. Nejvýhodněji je monoklonální protilátka proti koagulačnímu faktoru anti-faktor IX,

anti-faktor IXa, anti-faktor X, anti-faktor Xa, anti-faktor XI, anti-faktor XIa, anti-faktor VIII, anti-faktor VIIIa, anti-faktor V, anti-faktor Va, anti-faktor VII, anti-faktor VIIa nebo anti trombinová protilátka. mAb může zahrnovat jednu nebo více zpracovaných protilátek nebo pozměněných protilátek zde popsanych nebo jejich fragmentů.

5

Alternativně může být kyselina acetylsalicylová podána v kombinaci s monoklonální protilátkou proti koagulačnímu faktoru. V některých případech snižuje kombinovaná terapie terapeuticky účinnou dávku monoklonální protilátky proti koagulačnímu faktoru.

10

Terapeutická odpověď produkovaná použitím molekul podle předkládaného vynálezu je produkována vazbou na příslušný koagulační faktor a následnou inhibicí koagulační kaskády, která má vlastní omezení. Proto jsou molekuly podle předkládaného vynálezu, v přípravcích a formulacích vhodných pro terapeutické použití, vysoce žádoucí pro osoby náchylné k abnormální srážlivá aktivita asociovaná s, ale bez omezení, infarktem myokardu, nestabilní anginou pectoris, fibrilací síní, mrtvicí, poškozením ledvin, plicní embolií, trombózou hlubokých žil a arteficiálními orgány a protesami.

15

20

Pozměněné protilátky, protilátky a jejich fragmenty podle předkládaného vynálezu mohou být také použity spolu s jinými protilátkami, zejména s lidskými mAb reaktivními s jinými markery (epitopy) odpovědnými za stavy, pro které je zpracovaná protilátka podle předkládaného vynálezu určena.

25

Terapeutická činidla podle předkládaného vynálezu by měla být vhodná pro léčbu abnormálních stavů srážení krve od 1 dne do asi 3 týdnů, nebo podle potřeby. Toto představuje významnou výhodu oproti v současnosti používaným antikoagulantům heparinu a warfarinu. Dávka a trvání léčby souvisí s relativním přetrváváním molekul podle předkládaného vynálezu v lidské cirkulaci a může být upravena odborníkem na základě určitého léčeného stavu a celkového stavu pacienta.

30

Způsob podání terapeutického činidla podle předkládaného vynálezu může být jakýkoliv způsob vhodný pro podání činidla pacientovi. Pozměněné protilátky, protilátky, zpracované protilátky a jejich fragmenty a farmaceutické přípravky podle předkládaného vynálezu jsou zejména vhodné pro parenterální podání, tj. subkutánní, intramuskulární, intravenosní nebo intranasální podání.

35

40

45

50

Terapeutická činidla podle předkládaného vynálezu mohou být připravena jako farmaceutické přípravky obsahující účinné množství zpracované (například humanizované) protilátky podle předkládaného vynálezu jako aktivní složky ve farmaceuticky přijatelném nosiči. Alternativně může farmaceutický přípravek podle předkládaného vynálezu také obsahovat kyselinu acetylsalicylovou. V profylaktickém činidle podle předkládaného vynálezu je preferována vodná suspenze nebo roztok obsahující zpracovanou protilátku, výhodně pufrovaný na fyziologické pH, ve formě připravené pro injekci. Přípravky pro parenterální budou obvykle obsahovat zpracovanou protilátku podle předkládaného vynálezu nebo jejich směs rozpuštěnou ve farmaceuticky přijatelném nosiči, výhodně ve vodném nosiči. Mohou být použity různé vodné nosiče, například 0,4% salinický roztok, 0,3% glycin a podobně. Tyto roztoky musí být sterilní a prosté jakýchkoliv příměsí. Tyto roztoky mohou být sterilizovány jakýmkoliv běžnými, dobře známými sterilizačními technikami (například filtrací). Přípravky mohou obsahovat farmaceuticky přijatelné pomocné substance, které jsou nutné pro přiblížení se fyziologickým podmínkám, jako jsou činidla upravující pH a pufrovací činidla atd. Koncentrace protilátky podle předkládaného vynálezu v takové farmaceutické formulaci se může velmi lišit, tj. od méně než asi 0,5 %, obvykle alespoň 1 %, až do 15 % nebo 20 % hmotnosti a bude určena hlavně na základě objemů kapaliny, viskozity atd., podle určitého vybraného způsobu podání.

55

Proto, farmaceutický přípravek podle předkládaného vynálezu pro intramuskulární injekci bude připraven tak, aby obsahoval 1 ml sterilní pufrované vody a okolo 1 ng až asi 100 mg, například od asi 50 ng do asi 30 mg nebo, výhodně, od 5 do 25 mg, zpracované protilátky podle předkládaného vynálezu. Podobně, farmaceutický přípravek podle předkládaného vynálezu pro intra-

venosní infusi bude připraven tak, aby obsahoval asi 250 ml sterilního Ringerova roztoku a okolo 1 do asi 30 mg a, výhodně, od 5 do 25 mg, zpracované protilátky podle předkládaného vynálezu. Současné způsoby pro přípravu přípravků pro parenterální podání jsou dobře známé nebo budou
5 známé odborníkům v oboru a jsou podrobněji popsány, například, v „Remington's Pharmaceutical Science“, 15. vydání, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania.

Je výhodné, aby terapeutické činidlo podle předkládaného vynálezu, pokud je ve farmaceutickém přípravku, bylo v jednotkové dávkové formě. Vhodná terapeuticky účinná dávka může být odborníkem v oboru snadno určena. Pro účinnou léčbu trombotických nebo embolických onemocnění
10 u lidí nebo u jiných zvířat by měla být jedna dávka asi 0,1 až asi 20 mg na kg tělesné hmotnosti proteinu nebo protilátky podle předkládaného vynálezu podána parenterálně, výhodně i.v. nebo i.m. Taková dávka může být, pokud je to nutné, opakována ve vhodných časových intervalech určených ošetřujícím lékařem v průběhu odpovědi na terapii.

Protilátky, pozměněné protilátky nebo jejich fragmenty zde popsané mohou být lyofilizované pro uskladnění a rekonstituované ve vhodném nosiči před použitím. Tato technika byla ukázána jako účinná pro běžné imunoglobuliny a mohou být použity v oboru známé techniky pro lyofilizaci a rekonstituci.

Předkládaný vynález bude nyní popsán s ohledem na následující specifické, nelimitující příklady.
20

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Příprava a vyšetřování monoklonálních protilátek proti faktoru IX

25 Samičím Balb/c myši byl injekčně podán lidský faktor IX přečištěný jak je popsáno v Jenny, R. et al., Prep. Biochem. 16: 227 – 245 (1986). Typicky dostala každá myš počáteční injekci 100 µg proteinu rozpuštěného v 0,15 ml fosfátem pufrovaného salinického roztoku (PBS) ve směsi s 0,15 ml kompletního Freundova adjuvans. Dosycovací imunizace 50 µg proteinu v 0,15 ml PBS
30 s 0,15 ml inkompletního Freundova adjuvans byly podávány přibližně dvakrát týdně v průběhu 2 až 3 měsíců. Po konečné dosycovací dávce bylo myšim podáno 50 µg faktoru IX v PBS tři dny před fúzí buněk sleziny/myelomových buněk. Buňky sleziny byly izolovány z imunizovaných myši a fúsovány s NS-1 myelomovými buňkami (Kohler, G. et al., Eur. J. Immunol. 6: 292 – 295, (1976)), za použití polyethylenglykolu jak popisuje Oi, V.T. et al., v „Selected Methods in
35 Cellular Immunology“, Mishell, B. B. a Shigii, S. M. vyd., Freeman Press, San Francisco. Po fúzi byly buňky resuspendovány v RPMI 1640 médiu obsahujícím 10% fetální telecí sérum a aliquoty byly umístěny do každé jamky 24-jamkové plotny obsahující 0,5 ml kondicionovaného média pro buňky peritoneální laváže. Následující den bylo do každé jamky dodáno 1,0 ml 2×10^{-4} M hypoxantinu, 8×10^{-7} M aminopterinu a $3,2 \times 10^{-5}$ M thymidinu v RPMI 1640 médiu obsahu-
40 jícím 10% fetální telecí sérum. Buňky byly vyživovány po dobu 3 až 4 dní odstraněním poloviny média a nahrazením této poloviny čerstvým médiem obsahujícím 1×10^{-4} M hypoxantinu a $1,6 \times 10^{-5}$ M thymidinu.

Přibližně o dva týdny později byl 1,0 ml hybridomního média odebrán z každé jamky a byl testován na protilátky proti faktoru IX za použití ELISA testu jak je popsán v Jenny, R. J. et al.,
45 v Meth. Enzymol. 222: 400 – 416 (1993). Stručně, faktor IX je imobilizován v plastových jamkách 96-jamkových mikrotitračních ploten. Hybridomní supernatanty nebo ředění přečištěné protilátky jsou potom inkubovány v jamkách. Jamky jsou potom promyty a přítomnost komplexů protilátka/antigen je potom detekována koží anti-myši imunoglobulinovou druhou protilátkou
50 konjugovanou s křenovou peroxidasou a chromogenním substrátem o-dianisidinem.

Jamky obsahující protilátky proti faktoru IX byly subklonovány limitujícím ředěním a byly kultivovány v 96-jamkových plotnách. Supernatant z klonovaných hybridomních buněčných kultur

byl potom vyšetřován na protilátku k faktoru IX ELISA testem popsaným výše a buňky z pozitivních hybridomů byly expandovány, zmrazeny, uskladněny v kapalném dusíku a potom kultivovány v ascitických tumorech na myších.

5

Příklad 2

Omezený účinek protilátek proti koagulačním faktorům v koagulaci

Účinek zvyšujících se koncentrací protilátek proti koagulačním faktorům na aktivovaný parciální tromboplastinový čas (APTT) lidské plasmy byl určen fibrometrem (Becton–Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, Maryland) za použití Baxterova referenčního postupu LIB0293–J, revise 3/93 (Baxter Scientific, Edison, New Jersey).

Před začátkem pokusu byly 2 až 3 ml 0,02–M CaCl_2 v 5 ml tubě umístěny do zahřívací komůrky fibrometru. Vzorky lidské plasmy byly buď čerstvě odebrány a uchovávány na ledu, nebo byly rekonstituovány podle návodu výrobce z Homeostasis Reference Plasma (American Diagnostics, Greenwich, Connecticut).

Nefrakcionovaný heparin z prasečí střevní sliznice (Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri), nízkomolekulární heparin z prasečí střevní sliznice (Lovenox[®], enoxaparin sodný, Rhone–Poulac Rorer Pharmaceuticals, Collegeville, Pennsylvania) nebo mAb antikoagulancia byla připravena jako přibližně 50 μM zásobní roztok a byla sériově ředěna přímo do testované plasmy. Prázdná plasma bez antikoagulancia byla vzata jako referenční vzorek.

Dvě fibroTube[®] fibrometrové zkumavky byly naplněny 100 μl testované plasmy nebo 100 μl testované plasmy s antikoagulanciem a 125 μl aktinem aktivovaného cefaloplastinového činidla (Actin reagents, z králíčího mozkového cefalinu v kyselině ellagové, dostupné od Baxter Scientifics), v příslušném pořadí a byly umístěny do jamek fibrometru při 37 °C.

Po jedné minutě bylo 100 μl aktinového činidla přeneseno do zkumavky obsahující plasmu a obsah byl několikrát promíchán pipetou. Po třech minutách inkubace bylo přidáno 100 μl CaCl_2 , předehřátého na 37 °C, do směsi plasma – aktinové činidlo za použití Automatic Pipette/Timer–trigger (Becton–Dickinson). Byly zaznamenávány časy srážení a výsledky na obrázku 1 jsou presentovány jako časy srážení jako funkce konečné koncentrace antikoagulancia v celkovém testovaném objemu 300 μl . Nominální koncentrace faktoru IX v testu je 30 až 40 nM.

Výsledky na obrázku 1 ukazují účinek zvyšujících se koncentrací myších mAb BC1 a BC2 proti faktoru IX na APTT čas. Obě mAb inhibují srážení prodloužením APTT a obě mAb dosahují konečného saturačního účinku na APTT. IC_{50} hodnoty jsou podobné při asi 35 nM a asi 50 nM pro BC1 a BC2, v příslušném pořadí, ale rozdíl v maximální odpovědi na tyto dvě protilátky je značný. Saturační koncentrace BC1 zvyšuje APTT o asi 50 % na asi 40 s. BC2, na druhé straně, zvyšuje APTT na 3,5 – násobek na asi 90 s. Terapeutická cílová zóna použita při antikoagulační terapii heparinem je zvýrazněna. Výsledky naznačují, že dvě mAb mají stejné terapeutické APTT rozmezí jako heparin.

45

Vlastnosti mAb BC1 a BC2 jsou shrnuty v tabulce 1. Obě BC mAb rozpoznávají zymogen, faktor IX, stejně jako aktivní proteasu, faktor IXa, ale pouze BC2 je schopná blokovat aktivaci zymogenu stejně jako aktivitu proteasy. Byla zjištěna zkřížená reaktivita BC1 a BC2 s faktorem IX makaka cynomolgous. Kromě toho, BC2 také zkříženě reaguje s krysím faktorem IX.

50

Tabulka 1: Shrnutí in vitro vlastností mAb proti faktoru IX

	BC1	BC2
Vazba na faktor IX	ano	ano
Vazba na faktor IXa	ano	ano
Inhibice konverse IX na IXa	ne	ano
Inhibice aktivity IXa v Xasovém komplexu	ano	ano
Nutnost kofaktoru	ne	dvojmocné kovy $\text{Ca}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$
APTT max. ----- x 100%	150	350
APTT norm.		
IC_{50} , nM	asi 35	asi 50
Mezidruhov $\acute{\text{a}}$ zkřížen $\acute{\text{a}}$ reaktivita	opice	opice, krysa
Izotyp	IgG1	IgG2a

5 Výsledky na obrázku 2 ukazují účinek zvyšujících se koncentrací mAb 9E4(2)F4 a 11G4(1)B9 proti faktoru IX na APTT čas. Plasma pro test byla ředěna na jednu polovinu normální koncentrace s počátečním APTT 45 sekund. Obě mAb inhibují srážení prodloužením APTT a obě mAb dosahují konečného saturačního účinku na APTT. Saturační koncentrace 9E4(2)F4 a 11G4(1)B9 zvyšují APTT na asi 90 až 100 s pro 9E4(2)F4 a na asi 80 sekund pro 11G4(1)B9. Výsledky ukazují, že dvě mAb jsou na horní hranici terapeutické rozmezí pro heparin.

10 Výsledky na obrázku 3 ukazují účinek zvyšujících se koncentrací mAb HFXLC (proti epitopu lehkého řetězce), HFXHC (proti epitopu těžkého řetězce) proti faktoru X a mAb HFXI proti faktoru XI na APTT čas. Tyto mAb byly získány od Enzyme Research Laboratories (South Bend, IN). mAb HFXLC a HFXI inhibují srážení prodloužením APTT a obě mAb dosahují konečného saturačního účinku na APTT. IC_{50} hodnota pro HFXLC je asi 40 nM; saturační koncentrace zvyšuje APTT na asi 60 sekund. IC_{50} hodnota pro HFXI je asi 20 nM; saturační koncentrace
15 zvyšuje APTT na asi 100 sekund. Výsledky ukazují, že HFXLC je v terapeutickém rozmezí pro heparin, zatímco HFXI je při horní hranici terapeutického rozmezí pro heparin.

20 Omezené prodloužení APTT bylo také pozorováno u protilátek proti faktoru VIII, kofaktoru faktoru IXa. Například, protilátka proti lidskému faktoru VIII, SAF8C-Ig, zakoupená od Affinity Biologicals Inc., zvyšuje APTT na maximum 65 sekund. Polovina maximálního prodloužení APTT byla dosažena při použití asi 100 nM protilátky.

Příklad 3

Účinnost myších mAb proti faktoru IX v krysím modelu trombózy

Pro hodnocení účinnosti protilátek proti faktoru IX v prevenci arteriální trombózy byl adaptován krysí model trombózy arteria carotis, jak jej popisuje Schumacher et al., v J. Cardio Pharm. 22: 526 – 533 (1993). Tento model se skládá ze segmentálního poškození endotelu karotidy kyslíkovými radikály generovanými FeCl_3 roztokem aplikovaným na povrch arteria carotis.

Stručně, krysy jsou uvedeny do anestezie pentobarbitonem sodným, jugulární vena je kanylována pro intravenosní injekci a levá femorální arterie je kanylována pro měření krevního tlaku a pulsu. Arteria carotis je izolována aseptickou technikou chirurgickou incíí na krku a je zde přiložena magnetická průtoková sonda pro měření průtoku krve. Po stabilizaci jsou stanoveny základní hodnoty pro následující proměnné: průtok arterií carotis, arteriální tlak, puls, aktivovaný parciální tromboplastinový čas (APTT) a protrombinový čas (PT). Potom je předem změřený Whatmanův filtrační papír namočený v 50% roztoku FeCl_3 umístěn na arteria carotis na dobu 15 minut pro kompletní poškození spodních endotelových buněk. Po odstranění papíru namočeného v FeCl_3 pokračuje pokus po dobu 60 minut. Na konci pokusu se z arteria carotis extrahuje trombus a zváží se.

Všechna činidla byla podána 15 minut před začátkem poškození karotidy. Byly testovány následující léčby a byly srovnávány s mAb BC2 proti faktoru IX.

1. Heparin: 15, 30, 60 nebo 120 U/kg bolusově, a potom infuse 0,5, 1, 2 nebo 4 U/kg/min, v příslušném pořadí, po dobu 60 minut.
2. Kyselina acetylsalicylová (ASA, aspirin): 5 mg/kg bolus.
3. mAb CB2 proti faktoru IX: 1, 3 nebo 6 mg/kg bolusově, potom infuse 0,3, 1 nebo 2 $\mu\text{g/kg/min}$, v příslušném pořadí, po dobu 60 minut.
4. Heparin: 30 U/kg bolus + 1 U/kg/min + ASA 5 mg/kg.
5. mAb BC2 proti faktoru IX: 1 mg/kg + 0,3 $\mu\text{g/kg/min}$ + ASA 5 mg/kg.

Obrázek 4 a 5 ukazuje srovnávací farmakologii antikoagulačních/trombotických režimů ukázáním účinku heparinu, ASA a mAb BC2 proti faktoru IX na APTT (obrázek 4) a PT (obrázek 5).

Klíčový index pro krvácivou diatesu, APTT, byl použit jako primární kritérium pro hodnocení účinnosti oproti riziku krvácení pro antikoagulační/antitrombotická činidla použitá ve studii. Výsledky na obrázku 4 ukazují na dávce závislé na prodloužení APTT heparinem s maximálním prodloužením srážecího času, nad limity testu, při dvou nejvyšších dávkách. ASA samotná nezvyšuje signifikantně APTT, ale v kombinaci s heparinem je pozorován značný synergistický účinek. mAb proti faktoru IX měly mírný účinek na APTT a i při nejvyšších dávkách nepřesáhlo zvýšení času srážení 3–násobek standardního antikoagulačního klinicky používaného limitu. Nejporozuhodnější je, že nízké dávky mAb BC2 proti faktoru IX v kombinaci s ASA neměnily APTT.

Na obrázku 5 data ukazují, že PT byl také signifikantně prodloužen heparinem, při dvou nejvyšších dávkách, a kombinací ASA + heparinu, ale nikoliv dávkou samotné mAb proti faktoru IX ani její kombinací s ASA.

Účinek heparinu, ASA a mAb proti faktoru IX na oklasy arteria carotis je ukázán na obrázku 6. Výsledky ukazují, že arterie carotis všech myší ošetřených vehikulem se uzavřely v důsledku poškození. Heparin inhiboval oklasy arterie carotis v závislosti na dávce. Při nejvyšší dávce heparin zcela bránil oklasy arterie carotis; nicméně, při této dávce nemohla být žádná koagulace identifikována. ASA samotná měla pouze malý vliv na oklasy karotidy. ASA v kombinaci s heparinem také selhala v úplném zabránění okluse arteria carotis. mAb proti faktoru IX plně blokovala oklasy arteria carotis při dvou nejvyšších dávkách, které neprodlužovaly koagulaci nad

klinicky požadované cílové rozmezí. Nižší dávka mAb proti faktoru IX, která zcela selhávala v zajištění průchodnosti, pokud byla podána samostatně, vykazovala úplnou inhibici okluse arterie carotis při podání v kombinaci s ASA.

- 5 Účinek heparinu, ASA a mAb proti faktoru IX na hmotnost trombu je ukázán na obrázku 7. Heparin redukuje hmotu trombu v arteria carotis způsobem závislým na dávce. Nicméně, určitý residuální trombus byl stále nacházen v arteria carotis i přes kompletní blokádu koagulace. ASA samotná nebo v kombinaci s heparinem (režim 30 U/kg) měla pouze částečný účinek na hmotnost trombu. mAb proti faktoru IX redukovala hmotu trombu způsobem závislým na dávce a vyšší
10 dávky zcela bránily tvorbě trombu. Kromě toho, kombinace nízké dávky mAb proti faktoru IX a ASA, tj. režim, který zcela bránil oklusi arteria carotis bez nežádoucího ovlivnění koagulačních testů, zcela bránila tvorbě trombu.

- Studie provedené na krysím modelu trombózy arteria carotis jasně ukazují účinnost mAb proti
15 faktoru IX v prevenci trombózy v modelu vysoce trombogenního arteriálního poškození. Nejvýznamnější je, že účinnost mAb proti faktoru IX byla prokázána v požadovaném terapeutickém antikoagulačním cílovém rozmezí definovaném APTT. Kromě toho, heparin v současnosti standardní antikoagulans, dosahoval účinnosti srovnatelné s mAb proti faktoru IX pouze v dávkách, které významně narušují koagulaci tím, že produkují nesrážlivou krev. Zajímavé je, že pozorova-
20 ná potenciace a synergie získaná současnou léčbou ASA a heparinem byla také prokázána tehdy, když byla ASA podána s mAb proti faktoru IX. Nicméně, oproti kombinaci heparinu a ASA, která vede k potenciaci antitrombotických a antikoagulačních účinků vede kombinace ASA a mAb proti faktoru IX k potenciaci antitrombotického účinku bez významného ovlivnění koagulačních parametrů krve ex vivo. Dohromady data ukazují vyšší antitrombotickou kapacitu mAb
25 proti faktoru IX ve srovnání s heparinem, ASA nebo s kombinací heparinu a ASA.

Příklad 4

Skenovací elektronové mikroskopie modelu krysí trombózy

- 30 Segmenty krysí arteria carotis byly odebrány od tří skupin (kontrolní, chlorid železitý a chlorid železitý a chlorid železitý + 6 mg/kg protilátky proti faktoru IX), 15 minut po aplikaci chloridu železitého. Arterie byly fixovány perfusí formaldehydem a byla provedena ligace nad a pod poškozenou oblastí. Fixované arterie byly dehydratovány, inkubovány v hexamethyldisilazanu a
35 sušeny v desikátoru. Sušené arterie byly rozříznuty po délce, umístěny do nástavců pro skenovací elektronovou mikroskopii (SEM) potažených zlatem rozprášeným ve vakuu.

- SEM kontrolních arterií ukázala v podstatě normální endotel s rozptýlenými destičkami. Bylo zde několik poškození endotelu, pravděpodobně v důsledku mechanického poškození během chirurgického zákroku a bazální membrána v těchto oblastech byla pokryta vrstvou destiček. Žádné
40 náznaky tvorby trombu nebyly pozorovány u kontrolních krys.

- SEM arterií ošetřených chloridem železitým odhalila rozsáhlé nástěnné tromby, které zabíraly značnou část lumen cévy. Tromby byly složeny z agregovaných destiček, červených krvinek a amorfního a vláknitého proteinového materiálu. Endotel arterií byl téměř zcela pokryt velkými
45 tromby. Tam, kde byl viditelný, byl endotel v oblasti ošetřené chloridem železitým pokryt množstvím adherentních destiček a amorfního proteinového materiálu.

- SEM arterií ošetřených chloridem železitým od krys ošetřených také protilátkou proti faktoru IX ukázala lumen cév v podstatě bez trombu. Endotel v oblasti ošetřené chloridem železitým vyka-
50 zoval rozsáhlé poškození a některé oblasti byly pokryty adherujícími destičkami a agregáty destiček, ale bez nebo s minimálním množstvím proteinového materiálu.

Příklad 5

Analýza sekvence cDNA lehkého a těžkého řetězce mAb BC2 proti faktoru IX

5 Celková RNA byla přečištěna za použití TriReagent (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH) podle návodu výrobce. RNA byla vysrážena isopropanolem a rozpuštěna v 0,5% SDS a upravena na 0,5 M NaCl. Poly A⁺ RNA byla izolována za použití Dynabeads Oligo (dT)₂₅ (Dyna

10 A.S., Lake Success, NY) podle návodu výrobce. Poly A⁺ RNA byla eluována z korálků a resuspendována v TE pufru. Dvanáct aliquot 100 ng RNA bylo reversně transkribováno za použití RC-PCR kitu podle návodu výrobce (Boehringer Mannheim katalogové č. 1483–188) za

15 použití dT oligo pro „priming“. Pro těžký řetězec byla PCR amplifikace 6 RNA/DNA hybridů provedena ve 25 cyklech za použití primeru pantové oblasti myšního IgG2a (SEQ ID NO: 1) a primeru signální sekvence těžkého řetězce (SEQ ID NO: 2). Podobně, pro lehký řetězec byla PCR amplifikace 6 RNA/DNA hybridů provedena ve 25 cyklech za použití myšního kappa

20 primeru (SEQ ID NO: 3) a degenerovaného primeru signální sekvence lehkého řetězce (SEQ ID NO: 4). PCR produkty z každé ze 12 amplifikací byly ligovány do PCR2000 vektoru (TA cloning Kit, Invitrogen, katal. č. K2000–01). Kolonie rekombinantních klonů byly náhodně seškrábnuty a minipřípravky plasmidové DNA byly připraveny za použití postupu alkalické

25 extrakce jak je popisuje Birnboim a Doly v Nucl. Acids Res. 7: 1513 (1979). Izolovaná plasmidová DNA byla trávena EcoRI a byla analyzována na 0,8% agarosovém gelu. Dvouřetězcové DNA inserty vhodné velikosti, tj. okolo 700 bp pro těžký řetězec a okolo 700 bp pro lehký řetě-

30 zec, byly sekvencovány modifikací Sangerovi metody. Sekvence všech 12 těžkých a lehkých řetězců byly srovnávány pro vytvoření konsensuální sekvence variabilního regionu těžkého řetězce BC2 (SEQ ID NO: 5) a konsensuální sekvence variabilního regionu lehkého řetězce BC2 (SEQ ID NO: 6).

Analýza sekvence cDNA variabilního regionu těžkého řetězce BC2 ukázala otevřený čtecí

rámeček o 363 nukleotidech kodující sekvenci 121 aminokyselin (SEQ ID NO: 7). Sekvence CDR 1, 2 a 3 těžkého řetězce jsou uvedeny v SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 a SEQ ID NO: 10, v příslušném pořadí.

Analýza sekvence cDNA variabilního regionu lehkého řetězce BC2 ukázala otevřený čtecí

rámeček o 321 nukleotidech kodující sekvenci 107 aminokyselin (SEQ ID NO: 11). Sekvence CDR 1, 2 a 3 těžkého řetězce jsou uvedeny v SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 a SEQ ID NO: 14, v příslušném pořadí.

35

Příklad 6

Humanizované protilátky

40 Šest humanizovaných protilátek označených SB 249413, SB 249415, SB 249416, SB249417, SB 257731 a SB 257732 bylo navrženo tak, aby obsahovaly myší CDR popsané výše v pracovním rámečku lidské protilátky.

SB 249413

45 SB 249413 obsahuje těžký řetězec F9HZHC 1–0 a lehký řetězec F9HZLC 1–0. Syntetický variabilní region humanizovaného těžkého řetězce F9HZHC 1–0 byl navržen za použití prvních tří regionů pracovních rámečků těžkého řetězce získaného z imunoglobulinu RF-TS3'CL (Capra, J. D. et al., J. Clin. Invest 86: 1320 – 1328 (1990), identifikovaného v Kabat databázi jako Kabpro:Hhc10w) a CDR těžkého řetězce BC2 popsaných dříve. Nebyly provedeny žádné

50 aminokyselinové substituce v pracovním rámečku, které by mohly ovlivňovat prezentaci CDR. Byly generovány čtyři syntetické oligonukleotidy (SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 a SEQ ID NO: 18), které, pokud jsou tepelně zpracovány a extendovány, kodují aminokyseliny představující variabilní region těžkého řetězce včetně CDR (SEQ ID NO: 19 a

SEQ ID NO: 20). Tento syntetický gen byl potom amplifikován za použití PCR primerů (SEQ ID NO: 21 a SEQ ID NO: 22) a byl ligován do vektoru pCR2000 (TA cloning Kit, Invitrogen, katal. č. K2000-01) a byl izolován ze SpeI, KpnI restričního trávení. Druhý DNA fragment kodující „campath“ signální sekvenci obsahující prvních pět aminokyselin variabilního regionu (SEQ ID NO: 23 a SEQ ID NO: 24) byl vyroben PCR amplifikací vhodného regionu konstruktů kodujícího humanizovaný těžký řetězec protilátky proti respiračně syncytiálnímu viru (SEQ ID NO: 25) se dvěma primery (SEQ ID NO: 26 a SEQ ID NO: 27) a trávením restričními enzymy EcoRI a SpeI. Dva generované fragmenty byly ligovány do EcoRI, KpnI tráveného pFHZHC2-6pCD expresního vektoru pro savčí buňky, který obsahoval zbývající lidský konsensuální pracovní rámeček 4 a konstantní region IgG1. Vektor obsahoval jednu aminokyselinovou mutaci vektoru pFHZHC2-3pCD vektoru popsaného v Mezinárodní patentové přihlášce č. WO 94/05690. Konečný zbytek pracovního rámečku 2 (zbytek 49) byl mutován ze Ser na Ala trávením pFHZHC2-3pCD XbaI a EcoR5 a insercí linkeru generovaného ze dvou syntetických oligonukleotidů (SEQ ID NO: 28 a SEQ ID NO: 29). Sekvence F9HZHC 1-0 insertu je ukázána v SEQ ID NO: 30 a SEQ ID NO: 31.

Syntetický variabilní region humanizovaného lehkého řetězce F9HZLC 1-0 byl navržen za použití regionů pracovních rámečků lidského lehkého řetězce získaného z imunoglobulinu LS8'CL (Carmack et al., J. Exp. Med. 169: 1631 – 1643 (1989), identifikovaného v Kabat databázi jako Kabpro:Hk1318) a CDR lehkého řetězce BC2 popsaných dříve. Nebyly provedeny žádné aminokyselinové substituce v pracovním rámečku, které by mohly ovlivňovat prezentaci CDR. Byly generovány dva syntetické přesahující se oligonukleotidy (SEQ ID NO: 32 a SEQ ID NO: 33), které, pokud jsou tepelně zpracovány a extendovány, kodují aminokyseliny představující variabilní region lehkého řetězce (SEQ ID NO: 34 a SEQ ID NO: 35). Tento syntetický gen byl potom amplifikován za použití PCR primerů (SEQ ID NO: 36 a SEQ ID NO: 37) a byl ligován do vektoru pCR2000 (TA cloning Kit, Invitrogen, katal. č. K2000-01) a byl izolován ze ScaI, SacII restričního trávení. Druhý DNA fragment kodující „campath“ signální sekvenci obsahující první dvě aminokyseliny variabilního regionu (SEQ ID NO: 38 a SEQ ID NO: 39) byl vyroben PCR amplifikací vhodného regionu konstruktů kodujícího humanizovaný těžký řetězec protilátky proti respiračně syncytiálnímu viru (SEQ ID NO: 25) se dvěma primery (SEQ ID NO: 26 a SEQ ID NO: 40) a trávením restričními enzymy EcoRI a ScaI. Dva generované fragmenty byly ligovány do EcoRI, SacII tráveného pFHZLC1-2pCN expresního vektoru pro savčí buňky, který obsahoval zbývající lidský konsensuální pracovní rámeček 4 a konstantní region IgG1. Vektor obsahoval jednu aminokyselinovou mutaci vektoru pFHZLC1-1pCN vektoru popsaného v Mezinárodní patentové přihlášce WO 94/05690. Zbytek pracovního rámečku 2 byl mutován ze Ser na Pro trávením pFHZLC1-pCN SmaI a KpnI a insercí linkeru generovaného ze dvou syntetických oligonukleotidů (SEQ ID NO: 41 a SEQ ID NO: 42). Sekvence F9HZLC 1-0 insertu je ukázána v SEQ ID NO: 43 a SEQ ID NO: 44.

40 SB 249415

SB 249415 obsahuje těžký řetězec F9HZHC 1-1 a lehký řetězec F9HZLC 1-1. Tyto konstrukty lehkého a těžkého řetězce jsou založeny na F9HZHC 1-0 a F9HZLC 1-0, v příslušném pořadí, nicméně, mají aminokyselinové substituce v pracovním rámečku, které mohou ovlivňovat prezentaci CDR.

45

F9HZHC 1-1 má tři aminokyselinové substituce v pracovním rámečku, které mohou ovlivňovat prezentaci CDR. Byly generovány dva syntetické přesahující se oligonukleotidy (SEQ ID NO: 45 a SEQ ID NO: 46), které, pokud jsou tepelně zpracovány a extendovány, kodují aminokyseliny představující pozměněnou část variabilního regionu těžkého řetězce (SEQ ID NO: 47 a SEQ ID NO: 48). Tento syntetický gen byl potom amplifikován za použití PCR primerů (SEQ ID NO: 49 a SEQ ID NO: 50) a byl ligován do vektoru pCR2000 (TA cloning Kit, Invitrogen, katal. č. K2000-01) a byl izolován ze EcoNI, KpnI, restričního trávení. Tento fragment byl ligován do EcoNI, KpnI tráveného F9HZHC 1-0 (SEQ ID NO: 30) vektoru. Sekvence F9HZHC 1-1 insertu je ukázána v SEQ ID NO: 51 a SEQ ID NO: 52.

F9HZLHC 1-1 má čtyři aminokyselinové substituce v pracovním rámečku, které mohou ovlivňovat prezentaci CDR. Byly generovány dva syntetické oligonukleotidy (SEQ ID NO: 53 a SEQ ID NO: 54), které, pokud jsou tepelně zpracovány, mají KpnI a BamHI lepivé konce a kodují aminokyseliny představující pozměněnou část variabilního regionu lehkého řetězce (SEQ ID NO: 55). F9HZLC 1-0 (SEQ ID NO: 43) byl tráven restrikčními enzymy KpnI a BamHI a byl ligován do syntetické cDNA. Sekvence F9HZLC 1-1 insertu je ukázána v SEQ ID NO: 56 a SEQ ID NO: 57.

10 SB 249416

SB 249416 obsahuje těžký řetězec F9HZHC 1-1 (popsaný výše) (SEQ ID NO: 52) a lehký řetězec F9HZLC 1-2. Konstrukt lehkého řetězce je založen na F9HZLC 1-1, nicméně, má jednu další aminokyselinovou substituci v pracovním rámečku, která může ovlivňovat prezentaci CDR.

15 Byly generovány dva syntetické přesahující se oligonukleotidy (SEQ ID NO: 58 a SEQ ID NO: 59), které, pokud jsou tepelně zpracovány, mají BamHI a XbaI lepivé konce a kodují aminokyseliny představující pozměněnou část variabilního regionu lehkého řetězce (SEQ ID NO: 60). Vektor F9HZLC 1-1 (SEQ ID NO: 56) byl tráven restrikčními enzymy BamHI a XbaI a byl ligován do syntetické DNA. Sekvence F9HZLC 1-2 insertu je ukázána v SEQ ID NO: 61 a
20 SEQ ID NO: 62.

SB 249417

SB 249417 obsahuje těžký řetězec F9HZHC 1-1 (popsaný výše) (SEQ ID NO: 52) a lehký řetězec F9HZLC 2-0. Syntetický variabilní region humanizovaného lehkého řetězce F9HZLC 2-0 byl navržen za použití regionů pracovních rámečků lehkého řetězce získaného z imunoglobulinu REI (Palm a Hilschmann, Z. Physiol. Chem. 354: 1651 – 1654, (1973), identifikovaného v Kabat databázi jako Kabpro:HKL111) a CDR lehkého řetězce BC2 popsaných dříve. Bylo vloženo pět aminokyselinových substitucí v lidské konsenzuální sekvenci. Bylo provedeno šest substitucí v aminokyselinách myšího pracovního rámečku, které mohou ovlivňovat prezentaci CDR. Byly generovány dva překrývající se syntetické oligonukleotidy (SEQ ID NO: 63 a SEQ ID NO: 64), které, pokud jsou tepelně zpracovány a extendovány, kodují aminokyseliny představující variabilní region lehkého řetězce (SEQ ID NO: 65 a SEQ ID NO: 66). Tento syntetický gen byl potom amplifikován za použití PCR primerů (SEQ ID NO: 67 a SEQ ID NO: 68), ligován do vektoru pCR2000 (TA cloning Kit, Invitrogen, katal. č. K2000-01) a byl izolován ze
35 Scal, SacII restrikčního trávení. Druhý DNA fragment kodující „campath“ signální sekvenci obsahující prvních pět aminokyselin variabilního regionu (SEQ ID NO: 38) byl vyroben PCR amplifikací vhodného regionu konstruktů kodujícího humanizovaný těžký řetězec protilátky proti respiračně syncytiálnímu virus (SEQ ID NO: 25) se dvěma primery (SEQ ID NO: 26 a SEQ ID NO: 27) a trávením restrikčními enzymy EcoRI a Scal. Třetí DNA fragment kodující
40 zbývající lidský pracovní rámeček 4 (SEQ ID NO: 70) a mající SacII a NarI lepivé konce byl generován tepelným zpracováním dvou syntetických oligonukleotidů (SEQ ID NO: 71 a SEQ ID NO: 72). F9HZLC 1-0 (SEQ ID NO: 43) byl tráven restrikčními enzymy EcoRI a NarI a byl ligován do tří DNA fragmentů. Sekvence F9HZLC 2-0 insertu je ukázána v SEQ ID NO: 73 a SEQ ID NO: 74.

45

SB 257731

SB 257731 obsahuje těžký řetězec F9HZHC 1-1 (SEQ ID NO: 52) a lehký řetězec F9HZLC 1-3, F9HZLC 1-2 s jednou mutací aminokyseliny (SEQ ID NO: 62), F9HZLC 1-2 byl amplifikován PCR se dvěma primery (SEQ ID NO: 26 a SEQ ID NO: 69) a byl tráven restrikčními enzymy
50 EcoRI a Scal. Byl izolován 64 bp fragment (SEQ ID NO: 75 a SEQ ID NO: 76). Fragment byl ligován do EcoRI, Scal tráveného vektoru F9 HZLC 1-2 za zisku konstruktů lehkého řetězce označeného F9HZLC 1-3. Sekvence F9HZLC 1-3 insertu je ukázána v SEQ ID NO: 77 a SEQ ID NO: 78.

SB 257732

SB 257732 obsahuje syntetický variabilní region humanizovaného těžkého řetězce F9HZHC 3–0 a lehký řetězec F9HZLC 3–0. Byly generovány čtyři překrývající se syntetické oligonukleotidy (SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81 a SEQ ID NO: 82), které, pokud jsou tepelně zpracovány a extendovány, kodují aminokyseliny představují pozměněný variabilní region těžkého řetězce (SEQ ID NO: 83 a SEQ ID NO: 84). Tento syntetický gen byl potom amplifikován za použití PCR primerů (SEQ ID NO: 85 a SEQ ID NO: 86), ligován do vektoru pCR2000 (TA cloning Kit, Invitrogen, katal. č. K2000–01) a byl izolován ze StuI, KpnI restričního trávení. Izolovaný fragment byl ligován do StuI, KpnI tráveného F9HZHC1–1 (SEQ ID NO: 52) vektoru. Tento vektor byl potom tráven EcoRI, SpeI pro odstranění signální sekvence. DNA fragment kodující „campath“ signální sekvenci (SEQ ID NO: 23) obsahující prvních pět aminokyselin variabilního regionu (SEQ ID NO: 38) byl vyroben PCR amplifikací F9HZHC 1–1 se dvěma primery (SEQ ID NO: 26 a SEQ ID NO: 87) a trávením restričními enzymy EcoRI a SpeI. Generovaný fragment byl ligován do vektoru. Sekvence F9HZHC 3–0 insertu je ukázána v SEQ ID NO: 88 a SEQ ID NO: 89.

Byly generovány čtyři překrývající se syntetické oligonukleotidy (SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92 a SEQ ID NO: 93), které, pokud jsou tepelně zpracovány a extendovány, kodují aminokyseliny představující variabilní region lehkého řetězce (SEQ ID NO: 94 a SEQ ID NO: 95). Tento syntetický gen byl potom amplifikován za použití PCR primerů (SEQ ID NO: 96 a SEQ ID NO: 97) a byl ligován do vektoru pCR2000 (TA cloning Kit, Invitrogen, katal. č. K2000–01) a byl izolován ze ScaI, NarI restričního trávení. Izolovaný fragment byl ligován do ScaI, NarI tráveného F9HZLC 1–3 (SEQ ID NO: 77) vektoru. Sekvence F9HZLC 3–0 insertu je ukázána v SEQ ID NO: 98 a SEQ ID NO: 99.

Humanizované mAb proti faktoru IX byly exprimovány v CHO buňkách. DG–447 buněčná linie adaptovaná pro suspenzní kultivaci v médiu bez séra byla kultivována ve 100 ml bezproteínového média obsahujícího 1x nukleosidů a 0,05% F68 ve 250 ml sterilních erlenmeyerových baňkách na jedno použití (Corning) na Innova 2100 deskové třepačce (New Brunswick Scientific) při 150 rpm při 37 °C ve zvlhčovaném inkubátoru s 5% CO₂, 95% vzduchem. Tyto buňky byly pasážovány při 4 x 10⁵ buněk/ml dvakrát týdně. 15 µg každého pCN–Lc–lehký řetězec a pCD–Hc–těžký řetězec vektorů byl linearizován trávením NotI, byly společně vysráženy za sterilních podmínek a byly resuspendovány v 50 µl 1X TE pufru (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5). DNA byla elektroporována za použití Bio–Rad Gene Pulser (Bio Rad Laboratories) do Acc–098 buněk za použití techniky popsané Hensley et al., v J. Biol. Chem. 269: 23949 – 23958 (1994). 1,2 x 10⁷ buněk bylo promyto jedenkrát v 12,5 ml ledové chladného PBSsacharosa (PBS, 272 mM sacharosy, 7 mM fosforečnanu sodného, pH 7,4, 1 mM MgCl₂), resuspendováno v 0,8 ml PBS, přidáno k 50 µl DNA roztoku a bylo inkubováno na ledu po dobu 15 minut. Buňky byly podrobeny pulsům při 380 V a 25 µF, a potom byly inkubovány na ledu po dobu 10 minut. Buňky byly umístěny do 96–jamkových kultivačních ploten při hustotě 5 x 10⁵ buněk na plotnu v udržovacím médiu na dobu 24 hodin před selekcí. Buňky byly selektovány podle resistance na 400 µg/ml G418 (Geneticin, Life Technologies, Inc.) v udržovacím médiu. 24 hodin před testem byly buňky vyživovány 150 µl udržovacího média.

Kondicionované médium z jednotlivých kolonií bylo testováno za použití elektrochemoluminiscenční (ECL) detekční metody na Origen analyzátoru (IGEN, Inc.) (viz Yang et al., Biotechnology 12: 193 – 194 (1994).

Všechny roztoky nezbytné pro provedení testů (testovací pufr) a pro provoz analyzátoru (čistič buněk) byly získány od IGEN. Protilátky (anti–lidský IgG (specifické pro g řetězec), Sigma Chemicals a F(ab')₂ fragment k lidskému IgG (H+L), Kirkegaard and Perry Laboratories Inc.) byly značeny TAG–NHS–esterem (IGEN, Inc.) v molárním poměru TAG:proteinu 7:1, zatímco protein A (Sigma) byl značen Biotin–LC–Sulfo–NHS–esterem (IGEN, Inc.) v molárním poměru

Biotin:protein 20:1, oboje podle doporučení IGEN. Streptavidinem potažené magnetické korálky (M-280) byly získány od Dynal.

Imunotesty byly provedeny za použití následujícího protokolu: na vzorek bylo 50 µl Streptavidinem potažených korálků (konečná koncentrace 600 µg/ml v PBS, pH 7,8, s 1,25% Tween) smíseno s 50 µl Biotin-Protein A (konečná koncentrace 1 µg/v PBS, pH 7,8 s 1,25% Tween) a byla provedena inkubace při pokojové teplotě s třepáním, bylo přidáno 50 µl TAG protilátek (směsi s konečnou koncentrací 1,25 µg/ml F(ab')₂ fragmentu k lidskému IgG (H+L) a 0,25 µg/ml anti-lidský IgG (specifické ke g-řetězci) v PBS, pH 7,8, s 1,25% Tween), roztok byl potom přidán ke 50 µl kondicionovaného média a byla provedena inkubace s třepáním při pokojové teplotě po dobu 1 hodiny. Do reakční směsi bylo přidáno 200 µl testovaného pufru a reakční směs a vzorek byly analyzovány na Origen I analyzátoru pro měření ECL. Výsledky ukazují, že přibližně 20 až 37 % testovaných kolonií secernuje více než 15 ng/ml protilátky s průměrnou expresí okolo 150 ng/ml.

Humanizované mAb proti faktoru IX byly přečištěny z kondicionovaného média za použití Procep A pro krok zachycení následovaný iontovou výměnou chromatografií pro redukci nadbytečné DNA. Procep A absorbentní materiál (Bioprocessing Ltd., Durham, England) byl použit pro přípravu s poměrem průměru k výšce 1:1. Projasněné kondicionované médium bylo zavedeno do kolony při asi 150 cm/h. Kolona byla sekvenčně promyta fosfátem pufrovaným salinickým roztokem (PBS), PBS obsahujícím 1 M NaCl a nakonec PBS. Navázaný materiál byl získán elucí 0,1 M kyselinou octovou. pH eluatu bylo upraveno na 5,5 a eluat byl ředěn vodou (1:4), naředěný roztok byl zaveden na S-Sepharosovou kolonu (2,5 x 13 cm), která byla předem ekvilibrována 20 mM octanu sodného, pH 5,5 při 80 cm/h. Kolona byla promývána acetatovým pufrem, dokud nebylo dosaženo rovnovážného základního stavu a navázaný protein byl eluován 20 mM fosforečnanu sodného, pH 7,4 při 25 cm/h. Eluovaný materiál byl filtrován přes 0,4 mikronovou membránu a byl uskladněn při 4 °C.

Příklad 7

Myší-lidská chimerická protilátka

100 ng BC2 RNA bylo reversně transkribováno za použití RT-PCR kitu podle návodu výrobce (Boehringer Mannheim katalogové č. 1483-188) za použití dT oligo pro „priming“ a byla provedena PCR amplifikace se syntetickými ScaI (SEQ ID NO: 100) a NarI (SEQ ID NO: 101) primery pro produkci variabilního regionu lehkého řetězce BC2 se ScaI, NarI konci (SEQ ID NO: 102 a SEQ ID NO: 103). Tato DNA byla ligována do ScaI, NarI tráveného F9HZHC 1-3 (SEQ ID NO: 77) a byla trávena ScaI, NarI za produkce myšího-lidského chimerického lehkého řetězce F9CHLC (SEQ ID NO: 104 a SEQ ID NO: 105).

100 ng BC2 RNA bylo reversně transkribováno za použití RT-PCR kitu podle návodu výrobce (Boehringer Mannheim katalogové č. 1483-188) za použití dT oligo pro „priming“ a byla provedena PCR amplifikace se syntetickými SpeI (SEQ ID NO: 106) a NheI (SEQ ID NO: 107) primery pro produkci variabilního regionu těžkého řetězce BC2 se SpeI, NheI konci (SEQ ID NO: 108 a SEQ ID NO: 109). „Campath“ signální sekvence byla amplifikována PCR z těžkého řetězce RSVZH19 (SEQ ID NO: 25) s EcoRI (SEQ ID NO: 26) a SpeI (SEQ ID NO: 87) primery. Tyto dva DNA fragmenty byly ligovány do EcoRI, NheI tráveného IL4CHHCpcd vektoru popsaného v publikované mezinárodní patentové přihlášce WO 95/07301, za nahrazení IL4 variabilního regionu variabilním regionem myší BC2 proti faktoru IX, za produkce myšího-lidského chimerického těžkého řetězce F9CHHC (SEQ ID NO: 110 a SEQ ID NO: 111).

Současná transfekce a přečištění myší-lidské chimerické protilátky chαFIX bylo provedeno stejně jak je popsáno výše pro humanizované konstrukty.

Příklad 8

Účinnost humanizovaných mAb proti faktoru IX v krysím modelu trombu

- 5 Pro hodnocení účinnosti humanizovaných protilátek proti lidskému faktoru IX v prevenci arteriální trombózy byl použit krysí model trombózy arteria carotis jak je popsán výše v příkladu 3. Základní parametry byly stanoveny pro průtok v arteria carotis, arteriální tlak, puls, průchodnost cévy a aktivovaný parciální tromboplastinový čas (APTT). Patnáct minut poté bylo po dobu 10 minut provedeno poškození arteria carotis. Parametry byly určovány 60 minut po začátku poškození arteria carotis. Trombus byl také extrahován z arteria carotis a zvážen.

Všechna činidla byla podána intravenosně 15 minut před začátkem poškozené arteria carotis. Byly testovány následující léčebné protokoly a byly srovnávány s mAb BC2 proti faktoru IX.

- 15 1. Vehikulum
2. ch α FIX: 3 mg/kg bolus
3. SB 249413: 3 mg/kg bolus
4. SB 249415: 3 mg/kg bolus
5. SB 249416: 3 mg/kg bolus
- 20 6. SB 249417: 3 mg/kg bolus
7. SB 257731: 3 mg/kg bolus
8. Heparin: 60 U/kg bolus + 2 U/kg/min infusně

- 25 APTT byl použit jako primární kritérium pro hodnocení účinnosti versus riziku krvácení pro anti-koagulační/antitrombotické činidlo použité ve studii. Výsledky na obrázku 8 ukazují, že humanizované mAb proti faktoru IX SB 249413, SB 249415, SB 249416, SB 249417 a SB 257731 měly mírný účinek na APTT při použití dávky 3,0 mg/kg, kde tento účinek je v klinicky přijatelném rozmezí.

- 30 Účinek mAb proti faktoru IX na hmotnost trombu je ukázán na obrázku 9. Výsledky ukazují, že všechny humanizované protilátky jsou stejně účinné v redukci hmoty trombu.

- 35 Studie provedené na krysím modelu trombózy arteria carotis jasně ukazují účinnost humanizovaných mAb proti faktoru IX v prevenci trombózy v modelu vysoce trombogenního arteriálního poškození. Nejvýznamnější je, že účinnost všech humanizovaných mAb proti faktoru IX byla demonstrována v požadovaném terapeutickém rozsahu pro antikoagulační terapii definovaném APTT.

Příklad 9

Biochemické a biofyzikální vlastnosti protilátek

- 40 Molekulová hmotnost SB 249417 byla určena MALD-MS jako 148000 Da. Analytická ultracentrifugace SB 249417 dávala stejnou hodnotu. Za přítomnosti faktoru IX a Ca²⁺ sedimentovala protilátka odvozená od BC2 s hmotností 248000 Da, což odpovídá společné hmotnosti mAb a dvou molekul faktoru IX. Nebyly pozorovány žádné důkazy agregátů vyššího řádu za přítomnosti nebo za absence faktoru IX.

- 50 Kinetika vazby faktoru IX na SB 249417 byla testována BIAcore analýzou s protilátkou navázanou na povrch s imobilizovaným proteinem A. Byl použit rekombinantní lidský faktor IX (rhFIX, Genetics Institute) při 49 nM a měření bylo provedeno za přítomnosti 5 mM Ca²⁺. Interakce byla charakterizována rychlou asociací, $k_{\text{ass}} = 2,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a relativně pomalou disociací, $k_{\text{diss}} = 4,1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Vypočítaná K_d pro vazbu na faktor IX byla 1,9 nM.

Tabulka 1 shrnuje biofyzikální vlastnosti SB 249417.

Tabulka 1 – Shrnutí biofyzikálních vlastností SB 249417

Izotyp	IgG1, kappa
Čistota podle SDS-PAGE	>95% (za redukčních podmínek)
Molekulová hmotnost	
Hmotností spektrometrie	148000 Da
Analytická ultracentrifugace	148000 Da
Stechiometrie vazby na faktor IX	
Izotermální titrační kalorimetrie	1,5 molů faktoru IX: 1 mol mAb
Vazebná afinita k faktoru IX	
Izotermální titrační kalorimetrie	$K_d = 4 \text{ nM}$ při 25 °C
Biosensor	$K_d = 2 \text{ nM}$
Kinetika vazby na faktor IX	
Biosensor	$k_{\text{ass}} = 2,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ $k_{\text{diss}} = 4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$

Tabulka 2 shrnuje vazebné vlastnosti mAb podle předkládaného vynálezu na faktor IX. Vypočítané disociační konstanty byly v podstatě stejné, v mezích experimentálních chyb.

5

Tabulka 2 – Kinetika vazby faktoru IX na mAb proti faktoru IX

mAb	$k_{\text{ass}} \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$k_{\text{diss}} \text{ (s}^{-1})$	vypočítaná $K_D \text{ (nM)}$
SB 249417	$2,0 \times 10^5$	$4,1 \times 10^{-4}$	1,9
BC2	$4,8 \times 10^5$	$9,1 \times 10^{-4}$	1,9
Chf9	$2,4 \times 10^5$	$3,0 \times 10^{-4}$	1,3
SB 249413	$6,5 \times 10^5$	$2,8 \times 10^{-3}$	3,7 - 5,1
SB 249415	$7,5 \times 10^5$	$1,8 \times 10^{-4}$	1,1 - 2,3
SB 249416	$5,2 \times 10^5$	$4,1 \times 10^{-4}$	0,8
SB 257731	$9,2 \times 10^5$	$9,9 \times 10^{-4}$	1,1
SB 257732	$1,1 \times 10^6$	$1,2 \times 10^{-3}$	1,5

Interakce mezi rhFIX a SB249417, BC2 a jinými humanizovanými konstrukty byly charakterizovány titrační mikrokolorimetrií, která měří vazebné interakce v roztoku z vnitřního tepla vazby. Bylo provedeno devět injekcí 106 μM FIX do kalorimetru obsahujícího 2 μM mAb SB 249417. Vazba byla detekována v prvních čtyřech injekcích jako exotermická tepelná energie. Při posledních 5 injekcích byla vazebná místa mAb saturována FIX a bylo pozorováno pouze základní teplo směsi. Výsledky ukazují, že rovnováha nastává při molárním vazebném poměru okolo 2 FIX na mAb, jak bylo očekáváno. Nelineární analýzou nejmenších čtverců se získá vazebná afinita.

15

rhFIX afinity mAb byly měřeny v rozmezí teplot od 34 do 44 °C v 10 mM HEPES, 10 mM CaCl_2 , 150 mM NaCl, pH 7,4. Tato data umožňují přímé určení afinity při 37 °C a při 25 °C

výpočtem z van't Hoffovi rovnice. Data v tabulce 3 ukazují, že afinity SB 249417, BC2 a jejich dalších humanizovaných konstruktů jsou v mezích stejné chyby (faktor 2).

Tabulka 3 – Výsledky titrační kalorimetrie pro anti-FIX mAb

mAb	Kd, nM při 25 °C	Kd, nM při 37 °C	Molární vazebný poměr FIX/mAb
BC2	10	20	1,4
SB 249413	6	12	1,9
SB 249415	3	7	1,7
SB 249417	4	12	1,5
SB 257732	4	9	1,8

5

mAb SB 249413, SB 249415, SB 249417 a SB 257732 všechny vykazovaly velmi podobné termální stability podle diferenciální scanning kalorimetrie. Jejich rozkladná T_{ms} v rozmezí od 70 do 75 °C naznačují vysokou stabilitu proti termálně indukované denaturaci.

10 Příklad 10

Mechanismus inhibice faktoru IX způsobené protilátkou

Byla konstruována knihovna chimerických konstruktů složených ze sekvencí faktoru IX sestřižených do pracovního rámečku homologního proteinu faktoru VII a byla použita pro mapování epitopu pro mAb BC2 proti faktoru IX. Viz Cheung et al., Thromb. Res. 80: 419 – 427 (1995). Vazba byla měřena za použití BiaCore 2000 přístroje pro povrchovou plasmonovou resonanci. BC2 protilátka byla navázána přímo na čip za použití NHS/EDC reakce. Vazba byla měřena 2 minutovým kontaktním časem při 20 µl/min s 200 nM každého z daných konstruktů v 25 mM MOPS, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 5 mM CaCl₂. Disociace byla monitorována po dobu 3 minut za použití stejného pufru bez proteinu. Žádná vazba nebyla detekována na přirozený konstrukt za přítomnosti 50 mM EDTA. Data jsou předložena v tabulce 4.

20

Tabulka 4 – Shrnutí vazby konstruktů faktoru IX na protilátku BC2

Konstrukt	Stupeň vazby
Plasmatický IXa	vazba
r-IX	vazba
Plasmatický VII	bez vazby
IX LC/VII HC	vazba
IX-A/VII	vazba
VII gla/IX	bez vazby
VII-A/IX	bez vazby
VII gla (IX 3-11)/IX	vazba
VII gla (IX 3-6)/IX	velmi slabá vazba
VII gla (IX 9-11)/IX	velmi slabá vazba
IX K5A	vazba

Tyto data ukazují, že konstrukt obsahující lehký řetězec faktoru IX a těžký řetězec faktoru VII (IX LC/VII HC); gla faktoru IX a aromatické šachtové domény (IX-A/VII); zbytky 3 – 11 gla domény faktoru IX v gla doméně faktoru VII (VII gla (IX 3–11)/IX); a faktor IX mající substituci lysinu na alanin ve zbytku 5 (IX K5A) vykazují vazbu na BC2. VII gla (IX 3–11)/IX konstrukt
 5 vykazoval vazbu s BC2 stejnou jako přirozený faktor IX (plasmatický OXa a r-IX). Proto, BC2 protilátka se váže na epitop obsažený ve zbytkách 3–11 gla domény faktoru IX.

Předkládaný vynález může být prováděn v jiných specifických formách, bez odchýlení se od rozsahu vynálezu nebo od jeho základních rysů, a v souladu s tím by měly být odkazy prováděny
 10 spíše na připojené nároky, než na uvedený popis, protože ty ukazují rozsah vynálezu.

Seznam sekvencí

15 (1) Obecné informace:

(i) Přihlašovatel: Blackburn, Michael
 Church, William
 Gross, Mitchell
 20 Feuerstein, Giora
 Nichols, Andrew
 Padlan, Eduardo
 Patel, Arunbhai
 Sylvester, Daniel

(ii) Název vynálezu: Antikoagulační činidla použitelná pro léčbu trombózy

(iii) Počet sekvencí: 111

(iv) Adresa pro korespondenci
 (A) Adresa: SmithKline Beecham Corporation
 (B) Ulice: 709 Swedeland Road
 (C) Město: King of Prussia
 (D) Stát: PA
 35 (E) Země: USA
 (F) ZIP: 19406

(v) Počítačová čtecí forma:
 (A) Typ média: Disketa
 40 (B) Počítač: IBM kompatibilní
 (C) Operační system: DOS
 (D) Software: FastSEQ verse 1.5

(vi) Údaje o současné přihlášce:
 45 (A) Číslo přihlášky:
 (B) Datum podání: 16. 1. 1997
 (C) Klasifikace:

(vii) Předchozí data přihlášky:
 50 (A) Číslo přihlášky: 60/029119
 (B) Datum podání: 24. 10. 1996

(viii) Zástupce/agent informace
 55 (A) Jméno: Baumeister, Kirk
 (B) Registrační číslo: 33833

(C) Reference/číslo rejstříku: P50438

(ix) Telekomunikační informace:

(A) Telefon: 610-270-5096

(B) Telefax:

(C) Telex:

(2) Informace pro SEQ ID NO: 1:

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 20 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Řetězec: jednoduchý

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu:

(vi) Původní zdroj:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 1:

CATCCTAGAG TCACCGAGGA

20

(2) Informace pro SEQ ID NO: 2:

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 21 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Řetězec: jednoduchý

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu:

(vi) Původní zdroj:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 2:

AGCTGCCCAA AGTGCCCAAG C

21

(2) Informace pro SEQ ID NO: 3:

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 36 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Řetězec: jednoduchý

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetická: ne

5 (iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu:

(vi) Původní zdroj:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 3:

10 CTAACACTCA TTCCTGTTGA AGCTCTTGAC AATGGG

36

(2) Informace pro SEQ ID NO: 4:

(i) Charakteristiky sekvence:

15 (A) Délka: 21 párů bází
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Řetězec: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

20 (ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu:

(vi) Původní zdroj:

25 (xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 4:

GATTTTTCARG TGCAGATTTT C

21

(2) Informace pro SEQ ID NO: 5:

30 (i) Charakteristiky sekvence:
(A) Délka: 363 párů bází
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Řetězec: jednoduchý
35 (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

40 (v) Typ fragmentu:

(vi) Původní zdroj:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 5:

CAGATCCAGT	TGGTGCAGTC	TGGACCTGAG	CTGAAGAAGC	CTGGAGAGAC	AGTCAAGATC	60
TCCTGCAAGG	CTTCTGGGTA	CACCTTCACA	AACTATGGAA	TGAACTGGGT	GAAGCAGGCT	120
CCAGGAAAGG	GTTTAAAGTG	GATGGGCTGG	ATAAACACCA	GAAATGGAAA	GTCAACATAT	180
GTTGATGACT	TCAAGGGACG	GTTTGCCCTC	TCTTTGGAAA	GCTCTGCCAG	CACTGCCAAT	240
TTGCAGATCG	ACAACCTCAA	AGATGAGGAC	ACGGCTACAT	ATTTCTGTAC	AAGAGAAGGG	300
AATATGGATG	GTTACTTCCC	TTTACTTAC	TGGGGCCAAG	GGACTCTGGT	CACTGTCTCT	360
GCA						363

(2) Informace pro SEQ ID NO: 6:

- 5 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 321 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

10

(ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu:

15

(vi) Původní zdroj:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 6:

CAAATTGTTT	TCTCCAGTC	TCCAGCAATC	CTGTCTGCAT	CTCCAGGGGA	GAAGGTCACA	60
ATGACTTGCA	GGGCCAGCTC	AAGTGTAAT	TACATGCACT	GGTACCAGCA	GAAGCCAGGA	120
TCCTCCCCCA	AACCCTGGAT	TTATGCCACA	TCCAACCTGG	CTTCTGGAGT	CCCTGCTCGC	180
TTCACTGGCA	GTGGGTCTGG	GACCTCTTAC	TCTCTCACA	TCAGCAGAGT	GGAGGCTGAA	240
GATGCTGCCA	CTTATTACTG	CCAGCAGTGG	AGTATTAACC	CACGGACGTT	CGGTGGAGGC	300
ACCAAGCTGG	AAATCAAACG	G				321

20 (2) Informace pro SEQ ID NO: 7:

- (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 121 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 25 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(iii) Hypotetická: ne

30

(iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(vi) Původní zdroj:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 7:

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

(2) Informace pro SEQ ID NO: 8:

- 5 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 5 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární
- 10 (ii) Typ molekuly: peptid
 (iii) Hypotetická: ne
 (iv) Antisense: ne
 (v) Typ fragmentu: vnitřní
- 15 (vi) Původní zdroj:
- (xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 8:

Asn	Tyr	Gly	Met	Asn
1				5

20 (2) Informace pro SEQ ID NO: 9:

- (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 17 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 25 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární
- (ii) Typ molekuly: peptid
 (iii) Hypotetická: ne
 30 (iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(vi) Původní zdroj:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 9:

Trp	Ile	Asn	Thr	Arg	Asn	Gly	Lys	Ser	Thr	Tyr	Val	Asp	Asp	Phe	Lys
1				5					10					15	
Gly															

5

(2) Informace pro SEQ ID NO: 10:

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 12 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Řetězec: jednoduchý

(D) Topologie: lineární

10

(ii) Typ molekuly: peptid

(iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(vi) Původní zdroj:

20

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 10:

Glu	Gly	Asn	Met	Asp	Gly	Tyr	Phe	Pro	Phe	Thr	Tyr
1				5					10		

(2) Informace pro SEQ ID NO: 11:

25

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 107 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Řetězec: jednoduchý

(D) Topologie: lineární

30

(ii) Typ molekuly: peptid

(iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(vi) Původní zdroj:

35

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 11:

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

(2) Informace pro SEQ ID NO: 12:

5

- (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 10 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

10

(ii) Typ molekuly: peptid

(iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

15

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(vi) Původní zdroj:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 12:

Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met His
 1 5 10

20

(2) Informace pro SEQ ID NO: 13:

- (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 7 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

25

(ii) Typ molekuly: peptid

30

(iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(vi) Původní zdroj:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 13:

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

5 (2) Informace pro SEQ ID NO: 14:

- (i) Charakteristiky sekvence:
(A) Délka: 9 aminokyselin
(B) Typ: aminokyselina
10 (C) Řetězec: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(iii) Hypotetická: ne

15 (iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(vi) Původní zdroj:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 14:

Gln Gln Trp Ser Ile Asn Pro Arg Thr
20 1 5

(2) Informace pro SEQ ID NO: 15:

- (i) Charakteristiky sekvence:
(A) Délka: 104 párů bází
25 (B) Typ: nukleová kyselina
(C) Řetězec: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

30 (iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu:

(vi) Původní zdroj:

35 (xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 15:

CAACTAGTGC AATCTGGGTC TGAGTTGAAG AAGCCTGGGG CCTCAGTGAA GGTTTCCTGC 60
AAGGCCCTCTG GATACACCTT CACTAACTAT GGAATGAACT GGGT 104

(2) Informace pro SEQ ID NO: 16:

- 40 (i) Charakteristiky sekvence:
(A) Délka: 108 párů bází
(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Řetězec: jednoduchý

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

5 (iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu:

(vi) Původní zdroj:

10 (xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 16:

```

TTGAAGTCAT CAACATATGT TGACTTTCCA TTTCTGGTGT TTATCCATCC CATCCACTCG      60
AGCCCTTGTC CAGGGGCCTG TCGCACCCAG TTCATTCCAT AGTTAGTG      108

```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 17:

15 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 107 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

20

(ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu:

25 (vi) Původní zdroj:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 17:

```

GTCAACATAT GTTGATGACT TCAAGGGGCG GTTTGTCTTC CCTCTGTCAG CACGGCATAT      60
CTACAGATCA GCAGCCTAAA GGCTGACGAC ACTGCAGTGT ATTACTG      107

```

30 (2) Informace pro SEQ ID NO: 18:

35 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 91 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetická: ne

40 (iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu:

(vi) Původní zdroj:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 18:

GGTACCCTGG CCCAGTAAG TAAAAGGGAA GTAACCATCC ATATTCCCTT CTCTCGCACA 60
GTAATACACT GCAGTGTGCT CAGCCTTTAG G 91

(2) Informace pro SEQ ID NO: 19:

5

- (i) Charakteristiky sekvence:
(A) Délka: 377 párů bází
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Řetězec: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

10

(ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

15

(v) Typ fragmentu:

(vi) Původní zdroj:

(ix) Vlastnosti:

20

- (A) Jméno/klíč: kodující sekvence
(B) Umístění: 2...337
(D) Další informace:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 19:

A CTA GTG CAA TCT GGG TCT GAG TTG AAG AAG CCT GGG GCC TCA GTG AAG 49
Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys
1 5 10 15

GTT TCC TGC AAG GCC TCT GGA TAC ACC TTC ACT AAC TAT GGA ATG AAC 97
Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn
20 25 30

TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTC GAG TGG ATG GGA TGG ATA 145
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile
35 40 45

AAC ACC AGA AAT GGA AAG TCA ACA TAT GTT GAT GAC TTC AAG GGG CGG 193
Asn Thr Arg Asn Gly Lys Ser Thr Tyr Val Asp Asp Phe Lys Gly Arg
50 55 60

TTT GTC TTC TCC TTG GAC ACC TCT GTC AGC ACG GCA TAT CTA CAG ATC 241
Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile
65 70 75 80

AGC AGC CTA AAG GCT GAC GAC ACT GCA GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAA 289
 Ser Ser Leu Lys Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu
 85 90 95

GGG AAT ATG GAT GGT TAC TTC CCT TTT ACT TAC TGG GGC CAG GGT ACC 337
 Gly Asn Met Asp Gly Tyr Phe Pro Phe Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

(2) Informace pro SEQ ID NO: 20:

- 5 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 112 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

10

(ii) Typ molekuly: peptid

(iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu: vnitřní

15

(vi) Původní zdroj:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 20:

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

20 (2) Informace pro SEQ ID NO: 21:

- (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 33 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

25

- (ii) Typ molekuly: cDNA
 (iii) Hypotetická: ne
 (iv) Antisense: ne
 (v) Typ fragmentu:
 5 (vi) Původní zdroj:
 (xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 21:
 GCTACTAGTG CAATCTGGGT CTGAGTTGAA GCC

33

10 (2) Informace pro SEQ ID NO: 22:

- (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 30 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 15 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární
 (ii) Typ molekuly: cDNA
 (iii) Hypotetická: ne
 20 (iv) Antisense: ne
 (v) Typ fragmentu:
 (vi) Původní zdroj:
 (xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 22:

30

25 TGGGTACCCCT GGCCCCAGTA AGTAAAAGGG

(2) Informace pro SEQ ID NO: 23:

- (i) Charakteristiky sekvence:
 30 (A) Délka: 97 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární
 35 (ii) Typ molekuly: cDNA
 (iii) Hypotetická: ne
 (iv) Antisense: ne
 (v) Typ fragmentu:
 (vi) Původní zdroj:
 40 (ix) Vlastnosti:
 (A) Jméno/klíč: kodující sekvence
 (B) Umístění: 27...95
 (C) Další informace

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 23:

GAATTCTGAG	CACACAGGAC	CTCACC	ATG	GGA	TGG	AGC	TGT	ATC	ATC	CTC	TTC	53			
	Met	Gly	Trp	Ser	Cys	Ile	Ile	Leu	Phe						
	1				5										
TTG	GTA	GCA	ACA	GCT	ACA	GGT	GTC	CAC	TCC	CAG	GTC	CAA	CTA	GT	97
Leu	Val	Ala	Thr	Ala	Thr	Gly	Val	His	Ser	Gln	Val	Gln	Leu		
10				15				20							

(2) Informace pro SEQ ID NO: 24:

5

- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 23 aminokyselin
 - (B) Typ: aminokyselina
 - (C) Řetězec: jednoduchý
 - (D) Topologie: lineární

10

(ii) Typ molekuly: peptid

(iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

15

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(vi) Původní zdroj:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 24:

Met	Gly	Trp	Ser	Cys	Ile	Ile	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Thr	Ala	Thr	Gly
1				5				10					15		
Val	His	Ser	Gln	Val	Gln	Leu									
				20											

20

(2) Informace pro SEQ ID NO: 25:

- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 110 párů bází
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Řetězec: jednoduchý
 - (D) Topologie: lineární

25

(ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu:

(vi) Původní zdroj:

35

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 25:

GGAGACGCCA TCGAATTCTG AGCACACAGG ACCTCACCAT GGGATGGAGC TGTATCATCC 60
TCTTCTTGGT AGCAACAGCT ACAGGTGTCC ACTCCCAGGT CCAACTGCAG 110

(2) Informace pro SEQ ID NO: 26:

- 5 (i) Charakteristiky sekvence:
(A) Délka: 21 párů bází
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Řetězec: jednoduchý
(D) Topologie: lineární
- 10 (ii) Typ molekuly: cDNA
(iii) Hypotetická: ne
(iv) Antisense: ne
(v) Typ fragmentu:
- 15 (vi) Původní zdroj:
- (xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 26:

GGAGACGCCA TCGAATTCTG A

21

(2) Informace pro SEQ ID NO: 27:

- 20 (i) Charakteristiky sekvence:
(A) Délka: 30 párů bází
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Řetězec: jednoduchý
- 25 (D) Topologie: lineární
- (ii) Typ molekuly: cDNA
(iii) Hypotetická: ne
(iv) Antisense: ne
- 30 (v) Typ fragmentu:
(vi) Původní zdroj:
- (xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 27:

GATTGCACTA GTTGGACCTG GGAGTGGACA

30

35

(2) Informace pro SEQ ID NO: 28:

- 40 (i) Charakteristiky sekvence:
(A) Délka: 77 párů bází
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Řetězec: jednoduchý
(D) Topologie: lineární
- (ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu:

(vi) Původní zdroj:

5

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 28:

CTAGAGTGGG TCGCAGAGAT CTCTGATGGT GGTAAGTTACA CCTACTATCC AGACACTGTG
ACGGGCCCCGT TCACGAT

60

77

(2) Informace pro SEQ ID NO: 29:

10

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 73 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Řetězec: jednoduchý

15

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

20

(v) Typ fragmentu:

(vi) Původní zdroj:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 29:

ATCGTGAACC GGCCCGTCAC AGTGTCTGGA TAGTAGGTGT AACTACCACC ATCAGAGATC
TCTGCGACCC ACT

60

73

25

(2) Informace pro SEQ ID NO: 30:

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 363 párů bází

30

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Řetězec: jednoduchý

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

35

(iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu:

(vi) Původní zdroj:

(ix) Vlastnosti:

40

(A) Jméno/klíč: kodující sekvence

(B) Umístění: 1...363

(C) Další informace: F9HZHC 1-0

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 30:

CAG GTG CAA CTA GTG CAA TCT GGG TCT GAG TTG AAG AAG CCT GGG GCC	48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala	
1 5 10 15	
TCA GTG AAG GTT TCC TGC AAG GCC TCT GGA TAC ACC TTC ACT AAC TAT	96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr	
20 25 30	
GGA ATG AAC TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTC GAG TGG ATG	144
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	
35 40 45	
GGA TGG ATA AAC ACC AGA AAT GGA AAG TCA ACA TAT GTT GAT GAC TTC	192
Gly Trp Ile Asn Thr Arg Asn Gly Lys Ser Thr Tyr Val Asp Asp Phe	
50 55 60	
AAG GGA CGG TTT GTC TTC TCC TTG GAC ACC TCT GTC AGC ACG GCA TAT	240
Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	
CTA CAG ATC AGC AGC CTA AAG GCT GAC GAC ACT GCA GTG TAT TAC TGT	288
Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
GCG AGA GAA GGG AAT ATG GAT GGT TAC TTC CCT TTT ACT TAC TGG GGC	336
Ala Arg Glu Gly Asn Met Asp Gly Tyr Phe Pro Phe Thr Tyr Trp Gly	
100 105 110	
CAG GGT ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA	363
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
115 120	

(2) Informace pro SEQ ID NO: 31:

- 5 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 121 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

- 10 (ii) Typ molekuly: peptid
 (iii) Hypotetická: ne
 (iv) Antisense: ne
 (v) Typ fragmentu: vnitřní

- 15 (vi) Původní zdroj:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 31:

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

(2) Informace pro SEQ ID NO: 32:

- 5 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 165 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

- 10 (ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu:

(vi) Původní zdroj:

15

- (xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 32:

AGTACTGACA	CAGTCTCCAG	CCACCCTGTC	TTTGTCTCCA	GGGGAAAGAG	CCACCCTCTC	60
CTGCAGGGCC	AGCTCAAGTG	TAAATTACAT	GCACTGGTAC	CAACAGAGAC	CTGGCCAGGC	120
TCCCAGGCTC	CTCATCTATG	CCACTAGTAA	CCTGGCTTCT	GGCAT		165

(2) Informace pro SEQ ID NO: 33:

20

- (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 146 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

25

(ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu:

(vi) Původní zdroj:

5 (xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 33:

CCGCGGGTTA ATACTCCACT GCTGACAGTA ATAAACCGCA AAATCTTCAG GCTCTAGACT	60
GCTGATGGTG AGAGTGAAAT CTGTCCCAGA CCCGGATCCA CTGAACCTGG CTGGGATGCC	120
AGAAGCCAGG TTACTAGTGG CATAGA	146

(2) Informace pro SEQ ID NO: 34:

10 (i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 280 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Řetězec: jednoduchý

(D) Topologie: lineární

15

(ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu:

20

(vi) Původní zdroj:

(ix) Vlastnosti:

(A) Jméno/klíč: kodující sekvence

(B) Umístění: 2...280

(D) Další informace:

25

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 34:

A GTA CTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA	49
Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg	
1 5 10 15	
GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGC TCA AGT GTA AAT TAC ATG CAC TGG	97
Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met His Trp	
20 25 30	

TAC CAA CAG AGA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GCC ACT 145
 Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Ala Thr
 35 40 45

AGT AAC CTG GCT TCT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGA TCC GGG TCT 193
 Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 50 55 60

GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT CTA GAG CCT GAA GAT TTT 241
 Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe
 65 70 75 80

GCG GTT TAT TAC TGT CAG CAG TGG AGT ATT AAC CCG CGG 280
 Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ile Asn Pro Arg
 85 90

(2) Informace pro SEQ ID NO: 35:

- 5 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 93 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

- 10 (ii) Typ molekuly: peptid
 (iii) Hypotetická: ne
 (iv) Antisense: ne
 (v) Typ fragmentu: vnitřní
 15 (vi) Původní zdroj:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 35:

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

20 (2) Informace pro SEQ ID NO: 36:

- 5 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 27 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

- (ii) Typ molekuly: cDNA
 (iii) Hypotetická: ne
 10 (iv) Antisense: ne
 (v) Typ fragmentu:
 (vi) Původní zdroj:
 (xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 36:

15 TCGAGTACTG ACACAGTCTC CAGCCAC

27

(2) Informace pro SEQ ID NO: 37:

- 20 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 27 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

- 25 (ii) Typ molekuly: cDNA
 (iii) Hypotetická: ne
 (iv) Antisense: ne
 (v) Typ fragmentu:
 (vi) Původní zdroj:

- 30 (xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 37:

GACCGCGGGT TAATACTCCA CTGCTGA

27

(2) Informace pro SEQ ID NO: 38:

- 35 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 94 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

- 40 (ii) Typ molekuly: cDNA
 (iii) Hypotetická: ne
 (iv) Antisense: ne
 (v) Typ fragmentu:
 45 (vi) Původní zdroj:

(ix) Vlastnosti:

- (A) Jméno/klíč: kodující sekvence
- (B) Umístění: 27...92
- (D) Další informace:

5

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 38:

GAATTCTGAG CACACAGGAC CTCACC ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC 53
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe
 1 5

TTG GTA GCA ACA GCT ACA GGT GTC CAC TCC GAG ATA GTA CT 94
 Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly Val His Ser Glu Ile Val
 10 15 20

(2) Informace pro SEQ ID NO: 39:

10

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 22 aminokyselin
- (B) Typ: aminokyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

15

(ii) Typ molekuly: peptid

(iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

20

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(vi) Původní zdroj:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 39:

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Glu Ile Val
 20

25

(2) Informace pro SEQ ID NO: 40:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 30 párů bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

30

(ii) Typ molekuly: cDNA

35

(iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu:

(vi) Původní zdroj:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 40:

30

3ACTGTGTCA GTACTATCTC GGAGTGGACA

5

(2) Informace pro SEQ ID NO: 41:

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 55 párů bází

10 (B) Typ: nukleová kyselina

(C) Řetězec: jednoduchý

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

15 (iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu:

(vi) Původní zdroj:

20 (xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 41:

GGGCAGCCTC CTAAGTTGCT CATTACTGG GCGTCGACTA GGGAATCTGG GGTAC

55

(2) Informace pro SEQ ID NO: 42:

25 (i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 51 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Řetězec: jednoduchý

30 (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu:

35 (vi) Původní zdroj:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 42:

CCCAGATTCC CTAGTCGACG CCCAGTAAAT GAGCAACTTA GGAGGCTGCC C

51

40 (2) Informace pro SEQ ID NO: 43:

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 321 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Řetězec: jednoduchý

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetická: ne

5 (iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu:

(vi) Původní zdroj:

(ix) Vlastnosti:

10 (A) Jméno/klíč: kodující sekvence

(B) Umístění: 1...321

(C) Další informace: F9HZLC 1-0

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 43:

GAA	ATA	GTA	CTG	ACA	CAG	TCT	CCA	GCC	ACC	CTG	TCT	TTG	TCT	CCA	GGG	48
Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	
1				5					10					15		

GAA	AGA	GCC	ACC	CTC	TCC	TGC	AGG	GCC	AGC	TCA	AGT	GTA	AAT	TAC	ATG	96
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Asn	Tyr	Met	
			20					25					30			

CAC	TGG	TAC	CAA	CAG	AGA	CCT	GGC	CAG	GCT	CCC	AGG	CTC	CTC	ATC	TAT	144
His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	
	35						40					45				

GCC	ACT	AGT	AAC	CTG	GCT	TCT	GGC	ATC	CCA	GCC	AGG	TTC	AGT	GGA	TCC	192
Ala	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	
	50					55					60					

GGG	TCT	GGG	ACA	GAT	TTC	ACT	CTC	ACC	ATC	AGC	AGT	CTA	GAG	CCT	GAA	240
Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	
65					70				75				80			

GAT	TTT	GCG	GTT	TAT	TAC	TGT	CAG	CAG	TGG	AGT	ATT	AAC	CCG	CGG	ACG	288
Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Ser	Ile	Asn	Pro	Arg	Thr	
			85						90				95			

TTC	GGC	GGA	GGG	ACC	AAG	GTG	GAG	ATC	AAA	CGA						321
Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg						
			100					105								

15

(2) Informace pro SEQ ID NO: 44:

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 107 aminokyselin

20 (B) Typ: aminokyselina

(C) Řetězec: jednoduchý

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

5 (v) Typ fragmentu: vnitřní

(vi) Původní zdroj:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 44:

```

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

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ile Asn Pro Arg Thr
          85             90             95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
          100             105

```

10 (2) Informace pro SEQ ID NO: 45:

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 134 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

15 (C) Řetězec: jednoduchý

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

20 (v) Typ fragmentu:

(vi) Původní zdroj:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 45:

```

CCTGGACAAG GGCTCAAGTG GATGGGATGG ATAAACACCA GAAATGGAAA GTCAACATAT      60
GTTGATGACT TCAAGGGACG GTTTGTCTTC TCTCTAGACT CCTCTGTCAG CACGGCATAT      120
CTACAGATCA GCAG                                     134

```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 46:

25

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 134 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Řetězec: jednoduchý

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetická: ne

5 (iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu:

(vi) Původní zdroj:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 46:

```

GGTACCCTGG CCCCAGTAAG TAAAAGGGAA GTAACCATCC ATATTCCCTT CTCTCGTACA      60
GTAATACACT GCAGTGTGCT CAGCCTTTAG GCTGCTGATC TGTAGATATG CCGTGCTGAC      120
AGAGGAGTCT AGAG                                     134

```

10 (2) Informace pro SEQ ID NO: 47:

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 225 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

15 (C) Řetězec: jednoduchý

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

20 (v) Typ fragmentu:

(vi) Původní zdroj:

(ix) Vlastnosti:

(A) Jméno/klíč: kodující sekvence

(B) Umístění: 1...225

25 (D) Další informace:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 47:

```

CCT GGA CAA GGG CTC AAG TGG ATG GGA TGG ATA AAC ACC AGA AAT GGA      48
Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Arg Asn Gly
 1             5             10             15

AAG TCA ACA TAT GTT GAT GAC TTC AAG GGA CGG TTT GTC TTC TCT CTA      96
Lys Ser Thr Tyr Val Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu
 20             25             30

GAC TCC TCT GTC AGC ACG GCA TAT CTA CAG ATC AGC AGC CTA AAG GCT      144
Asp Ser Ser Val Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala
 35             40             45

```

GAC GAC ACT GCA GTG TAT TAC TGT ACG AGA GAA GGG AAT ATG GAT GGT 192
 Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Glu Gly Asn Met Asp Gly
 50 55 60

TAC TTC CCT TTT ACT TAC TGG GGC CAG GGT ACC 225
 Tyr Phe Pro Phe Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 65 70 75

(2) Informace pro SEQ ID NO: 48:

- 5 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 75 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

- 10 (ii) Typ molekuly: peptid
 (iii) Hypotetická: ne
 (iv) Antisense: ne
 (v) Typ fragmentu: vnitřní
 15 (vi) Původní zdroj:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 48:

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

20 (2) Informace pro SEQ ID NO: 49:

- (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 27 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 25 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

- (ii) Typ molekuly: cDNA
 (iii) Hypotetická: ne
 30 (iv) Antisense: ne
 (v) Typ fragmentu:

(vi) Původní zdroj:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 49:

TTTCCTGGAC AAGGGCTCAA GTGGATG

27

5

(2) Informace pro SEQ ID NO: 50:

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 24 párů bází

10 (B) Typ: nukleová kyselina

(C) Řetězec: jednoduchý

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

15 (iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu:

(vi) Původní zdroj:

20 (xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 50:

TTTGGTACCC TGGCCCCAGT AAGT

27

(2) Informace pro SEQ ID NO: 51:

25 (i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 363 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Řetězec: jednoduchý

30 (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu:

35 (vi) Původní zdroj:

(ix) Vlastnosti:

(A) Jméno/klíč: kodující sekvence

(B) Umístění: 1...363

(D) Další informace: F9HZHC 1-1

40

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 51:

CAG GTG CAA CTA GTG CAA TCT GGG TCT GAG TTG AAG AAG CCT GGG GCC	48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala	
1 5 10 15	
TCA GTG AAG GTT TCC TGC AAG GCC TCT GGA TAC ACC TTC ACT AAC TAT	96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr	
20 25 30	
GGA ATG AAC TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTC AAG TGG ATG	144
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met	
35 40 45	
GGA TGG ATA AAC ACC AGA AAT GGA AAG TCA ACA TAT GTT GAT GAC TTC	192
Gly Trp Ile Asn Thr Arg Asn Gly Lys Ser Thr Tyr Val Asp Asp Phe	
50 55 60	
AAG GGA CGG TTT GTC TTC TCT CTA GAC TCC TCT GTC AGC ACG GCA TAT	240
Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Ser Ser Val Ser Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	
CTA CAG ATC AGC AGC CTA AAG GCT GAC GAC ACT GCA GTG TAT TAC TGT	288
Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
ACG AGA GAA GGG AAT ATG GAT GGT TAC TTC CCT TTT ACT TAC TGG GGC	336
Thr Arg Glu Gly Asn Met Asp Gly Tyr Phe Pro Phe Thr Tyr Trp Gly	
100 105 110	
CAG GGT ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA	363
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
115 120	

(2) Informace pro SEQ ID NO: 52:

- 5 (i) Charakteristiky sekvence:
- (A) Délka: 121 aminokyselin
 - (B) Typ: aminokyselina
 - (C) Řetězec: jednoduchý
 - (D) Topologie: lineární
- 10 (ii) Typ molekuly: peptid
- (iii) Hypotetická: ne
- (iv) Antisense: ne
- (v) Typ fragmentu: vnitřní
- 15 (vi) Původní zdroj:
- (xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 52:

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

(2) Informace pro SEQ ID NO: 53:

- 5 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 82 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární
- 10 (ii) Typ molekuly: cDNA
 (iii) Hypotetická: ne
 (iv) Antisense: ne
 (v) Typ fragmentu:
- 15 (vi) Původní zdroj:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 53:

CAACAGAGAC	CTGGCCAGGC	TCCCAAGCCC	TGGATCTATG	CCACGAGTAA	CCTGGCTAGC	60
GGCGTCCCAG	CCAGGTTTCAG	TG				82

20 (2) Informace pro SEQ ID NO: 54:

- (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 90 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární
- 25 (ii) Typ molekuly: cDNA
 (iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu:

(vi) Původní zdroj:

5 (xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 54:

GATCCACTGA	ACCTGGCTGG	GACGCCGCTA	GCCAGGTTAC	TCGTGGCATA	GATCCAGGGC	60
TTGGGAGCCT	GGCCAGGTCT	CTGTTGGTAC				90

(2) Informace pro SEQ ID NO: 55:

10 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 27 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

15 (ii) Typ molekuly: peptid

(iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu: vnitřní

20 (vi) Původní zdroj:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 55:

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

25 (2) Informace pro SEQ ID NO: 56:

(i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 321 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetická: ne

35 (iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu:

(vi) Původní zdroj:

(ix) Vlastnosti:

40 (A) Jméno/klíč: kodující sekvence
 (B) Umístění: 1...321
 (D) Další informace: F9HZLC 1-1

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 56:

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

5

(2) Informace pro SEQ ID NO: 57:

- (i) Charakteristiky sekvence:
- (A) Délka: 107 aminokyselin
 - (B) Typ: aminokyselina
 - (C) Řetězec: jednoduchý
 - (D) Topologie: lineární

10

(ii) Typ molekuly: peptid

15

(iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(vi) Původní zdroj:

20

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 57:

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

(2) Informace pro SEQ ID NO: 58:

- 5 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 41 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární
- 10 (ii) Typ molekuly: cDNA
 (iii) Hypotetická: ne
 (iv) Antisense: ne
 (v) Typ fragmentu:
- 15 (vi) Původní zdroj:
- (xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 58:

GATCCGGGTC TGGGACAGAT TACACTCTCA CGATATCCAG T

41

20 (2) Informace pro SEQ ID NO: 59:

- (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 41 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární
- 25 (ii) Typ molekuly: cDNA
 (iii) Hypotetická: ne
 (iv) Antisense: ne
 (v) Typ fragmentu:
- 30 (vi) Původní zdroj:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 59:

CTAGACTGGA TATCGTGAGA GTGTAATCTG TCCCAGACCC G

41

5 (2) Informace pro SEQ ID NO: 60:

- (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 13 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

10

(ii) Typ molekuly: peptid

(iii) Hypotetická: ne

15

(iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(vi) Původní zdroj:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 60:

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser

1

5

10

20

(2) Informace pro SEQ ID NO: 61:

- (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 321 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

25

(ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu:

(vi) Původní zdroj:

35

(ix) Vlastnosti:

(A) Jméno/klíč: kodující sekvence

(B) Umístění: 1...321

(C) Další informace: F9HZLC 1-2

40

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 61:

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

(2) Informace pro SEQ ID NO: 62:

- 5 (i) Charakteristiky sekvence:
- (A) Délka: 107 aminokyselin
 - (B) Typ: aminokyselina
 - (C) Řetězec: jednoduchý
 - (D) Topologie: lineární
- 10 (ii) Typ molekuly: peptid
- (iii) Hypotetická: ne
- (iv) Antisense: ne
- (v) Typ fragmentu: vnitřní
- 15 (vi) Původní zdroj:
- (xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 62:

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

(2) Informace pro SEQ ID NO: 63:

- 5 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 165 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární
- 10 (ii) Typ molekuly: cDNA
 (iii) Hypotetická: ne
 (iv) Antisense: ne
 (v) Typ fragmentu:
- 15 (vi) Původní zdroj:
- (xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 63:

AGTACTCACC	CAGAGCCCAA	GCAGCCTGAG	CGCCAGCGTG	GGTGACAGAG	TGACCATCAC	60
CTGCAGGGCC	AGCTCAAGTG	TAAATTACAT	GCACTGGTAC	CAGCAGAAGC	CAGGTAAGGC	120
TCCAAAGCCT	TGGATCTACG	CCACTAGTAA	CCTGGCTTCT	GGTGT		165

20 (2) Informace pro SEQ ID NO: 64

- (i) Charakteristiky sekvence
 (A) Délka: 161 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární
- 25 (ii) Typ molekuly: cDNA
 (iii) Hypotetická: ne
 (iv) Antisense: ne
- 30 (v) Typ fragmentu:

(vi) Původní zdroj:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 64:

```

CCGCGGGTTA ATACTCCACT GCTGGCAGTA GTAGGTGGCG ATATCCTCTG GCTGGAGGCT      60
GCTGATGGTG AAGGTGTAGT CTGTACCGCT ACCGGATCCG CTGAATCTGC TTGGCACACC      120
AGAAGCCAGG TTACTAGTGG CGTAGATCCA AGGC'TTTGGA G                          161

```

5 (2) Informace pro SEQ ID NO: 65:

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 280 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

10 (C) Řetězec: jednoduchý

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

15 (v) Typ fragmentu:

(vi) Původní zdroj:

(ix) Vlastnosti:

(A) Jméno/klíč: kodující sekvence

(B) Umístění: 2...280

20 (D) Další informace:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 65:

```

A GTA CTC ACC CAG AGC CCA AGC AGC CTG AGC GCC AGC GTG GGT GAC AGA      49
Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
   1             5             10             15

```

```

GTG ACC ATC ACC TGC AGG GCC AGC TCA AGT GTA AAT TAC ATG CAC TGG      97
Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met His Trp
           20             25             30

```

```

TAC CAG CAG AAG CCA GGT AAG GCT CCA AAG CCT TGG ATC TAC GCC ACT      145
Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr
       35             40             45

```

```

AGT AAC CTG GCT TCT GGT GTG CCA AGC AGA TTC AGC GGA TCC GGT AGC      193
Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
   50             55             60

```

```

GGT ACA GAC TAC ACC TTC ACC ATC AGC AGC CTC CAG CCA GAG GAT ATC      241
Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile
   65             70             75             80

```

```

GCC ACC TAC TAC TGC CAG CAG TGG AGT ATT AAC CCG CGG      280
Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ile Asn Pro Arg
           85             90

```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 66:

- (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 93 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

- (ii) Typ molekuly: peptid
 (iii) Hypotetická: ne
 (iv) Antisense: ne
 (v) Typ fragmentu: vnitřní
 (vi) Původní zdroj:

- (xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 66:

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

(2) Informace pro SEQ ID NO: 67:

- (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 27 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

- (ii) Typ molekuly: cDNA
 (iii) Hypotetická: ne
 (iv) Antisense: ne
 (v) Typ fragmentu:
 (vi) Původní zdroj:

- (xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 67:

TTTAGTACTC ACCCAGAGCC CAAGCAG

27

(2) Informace pro SEQ ID NO: 68:

- 5 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 27 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

10 (ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu:

15 (vi) Původní zdroj:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 68:

TTCCGCGGGT TAATACTCCA CTGCTGG

27

(2) Informace pro SEQ ID NO: 69:

- 20 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 33 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 25 (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

30 (v) Typ fragmentu:

(vi) Původní zdroj:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 69:

CTCGAGCAGT ACTATCTGGG AGTGGACACC TGT

33

35

(2) Informace pro SEQ ID NO: 70:

- 40 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 17 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

45 (iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu: N-koncový

(vi) Původní zdroj:

5 (xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 70:

Arg	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala
1				5					10					15	
Ala															

(2) Informace pro SEQ ID NO: 71:

10 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 48 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

15 (ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu:

20 (vi) Původní zdroj:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 71:

GGACGTTTCGG CCAAGGGACC AAGGTGGAAA TCAAACGGAC TGTGGCGG 48

25 (2) Informace pro SEQ ID NO: 72:

(i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 52 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 30 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetická: ne

35 (iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu:

(vi) Původní zdroj:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 72:

CGCCGCCACA GTCCGTTTGA TTTCACCTT GGTCCCTTGG CCGAACGTCC GC 52

40

(2) Informace pro SEQ ID NO: 73:

- 5 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 321 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární
- 10 (ii) Typ molekuly: cDNA
 (iii) Hypotetická: ne
 (iv) Antisense: ne
 (v) Typ fragmentu:
 (vi) Původní zdroj:
- 15 (ix) Vlastnosti:
 (A) Jméno/klíč: kodující sekvence
 (B) Umístění: 1...321
 (D) Další informace: F9HZLC 2-0
- 20 (xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 73:

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

(2) Informace pro SEQ ID NO: 74:

- 5 (i) Charakteristiky sekvence:
(A) Délka: 107 aminokyselin
(B) Typ: aminokyselina
(C) Řetězec: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

- 10 (ii) Typ molekuly: peptid
(iii) Hypotetická: ne
(iv) Antisense: ne
(v) Typ fragmentu: vnitřní
(vi) Původní zdroj:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 74:

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

(2) Informace pro SEQ ID NO: 75:

- (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 94 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

- (ii) Typ molekuly: cDNA
(iii) Hypotetická: ne
(iv) Antisense: ne
(v) Typ fragmentu:
(vi) Původní zdroj:
(ix) Vlastnosti:

- (A) Jméno/klíč: kodují sekvence
 (B) Umístění: 24...94
 (D) Další informace:

5 (xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 75:

```

GAATTCTGAG CACACAGGAC CTCACC ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC      53
                Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe
                  1                5

TTG GTA GCA ACA GCT ACA GGT GTC CAC TCC CAG ATA GTA CT      94
Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly Val His Ser Gln Ile Val Leu
10                15                20

```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 76:

- 10 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 23 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

- 15 (ii) Typ molekuly: peptid
 (iii) Hypotetická: ne
 (iv) Antisense: ne
 (v) Typ fragmentu: vnitřní
 20 (vi) Původní zdroj:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 76:

```

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
  1                5                10                15
Val His Ser Gln Ile Val Leu
                20

```

25 (2) Informace pro SEQ ID NO: 77:

- (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 401 párů bází
 30 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

- (ii) Typ molekuly: cDNA
 (iii) Hypotetická: ne
 35 (iv) Antisense: ne
 (v) Typ fragmentu:

(vi) Původní zdroj:

(ix) Vlastnosti:

(A) Jméno/klíč: kodující sekvence

(B) Umístění: 27...401

(D) Další informace: F9HZLC 1-3

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 77:

GAATTCTGAG CACACAGGAC CTCACC ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC	53
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe	
1 5	
TTG GTA GCA ACA GCT ACA GGT GTC CAC TCC CAG ATA GTA CTG ACA CAG	101
Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly Val His Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln	
10 15 20 25	
TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA GCC ACC CTC TCC	149
Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser	
30 35 40	
TGC AGG GCC AGC TCA AGT GTA AAT TAC ATG CAC TGG TAC CAA CAG AGA	197
Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Arg	
45 50 55	
CCT GGC CAG GCT CCC AAG CCC TGG ATC TAT GCC ACG AGT AAC CTG GCT	245
Pro Gly Gln Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala	
60 65 70	
AGC GGC GTC CCA GCC AGG TTC AGT GGA TCC GGG TCT GGG ACA GAT TAC	293
Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr	
75 80 85	
ACT CTC ACG ATA TCC AGT CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCG GTT TAT TAC	341
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr	
90 95 100 105	
TGT CAG CAG TGG AGT ATT AAC CCG CGG ACG TTC GGC GGA GGG ACC AAG	389
Cys Gln Gln Trp Ser Ile Asn Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys	
110 115 120	
GTG GAG ATC AAA	401
Val Glu Ile Lys	
125	

10

(2) Informace pro SEQ ID NO: 78:

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 125 aminokyselin

- (B) Typ: aminokyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

- 5 (ii) Typ molekuly: peptid
 (iii) Hypotetická: ne
 (iv) Antisense: ne
 (v) Typ fragmentu: vnitřní

- 10 (vi) Původní zdroj:

- (xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 78:

```

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

```

- 15 (2) Informace pro SEQ ID NO: 79:

- (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 81 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 20 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

- (ii) Typ molekuly: cDNA
 (iii) Hypotetická: ne
 25 (iv) Antisense: ne
 (v) Typ fragmentu:
 (vi) Původní zdroj:

- (xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 79:

AGGCCTCTGG ATACACCTTC ACTAACTATG GAATGAACTG GGTGCGACAG GCCCCTGGAC 60
 AAGGGCTCGA GTGGATGGGA T 81

(2) Informace pro SEQ ID NO: 80:

- 5 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 99 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

10

(ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu:

15

(vi) Původní zdroj:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 80:

TGCTCTAGAGA GAAGACAAAC CGTCCCTTGA AGTCATCAAC ATATGTTGAC TTTCCATTTC 60
 TGGTGTTTTAT CCATCCCATC CACTCGAGCC CTTGTCCAG 99

(2) Informace pro SEQ ID NO: 81:

20

- (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 87 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

25

(ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

30

(v) Typ fragmentu:

(vi) Původní zdroj:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 81:

GGTTTGTCTT CTCTCTAGAC ACCTCTGTCA GCACGGCATA TCTACAGATC AGCAGCCTAA 60
 AGGCTGAGGA CACTGCAGTG TATTTCT 87

35

(2) Informace pro SEQ ID NO: 82:

- (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 86 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

40

(ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu

5 (vi) Původní zdroj:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 82:

GGTACCCTGG CCCAGTAAG TAAAAGGGAA GTAACCATCC ATATTCCCTT CTCTCGTACA 60
GAAATACACT GCAGTGTCTT CAGCCT 86

10 (2) Informace pro SEQ ID NO: 83:

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 278 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

15 (C) Řetězec: jednoduchý

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetická: ne

20 (iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu:

(vi) Původní zdroj:

(ix) Vlastnosti:

(A) Jméno/klíč: kodující sekvence

25 (B) Umístění: 3....278

(D) Další informace:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 83:

AG GCC TCT GGA TAC ACC TTC ACT AAC TAT GGA ATG AAC TGG GTG CGA 47
Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg
1 5 10 15

CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTC GAG TGG ATG GGA TGG ATA AAC ACC AGA 95
Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Arg
20 25 30

30

AAT GGA AAG TCA ACA TAT GTT GAT GAC TTC AAG GGA CGG TTT GTC TTC	143
Asn Gly Lys Ser Thr Tyr Val Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Val Phe	
35 40 45	
TCT CTA GAC ACC TCT GTC AGC ACG GCA TAT CTA CAG ATC AGC AGC CTA	191
Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu	
50 55 60	
AAG GCT GAG GAC ACT GCA GTG TAT TTC TGT ACG AGA GAA GGG AAT ATG	239
Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Thr Arg Glu Gly Asn Met	
65 70 75	
GAT GGT TAC TTC CCT TTT ACT TAC TGG GGC CAG GGT ACC	278
Asp Gly Tyr Phe Pro Phe Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr	
80 85 90	

(2) Informace pro SEQ ID NO: 84:

- 5 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 92 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární
- 10 (ii) Typ molekuly: peptid
 (iii) Hypotetická: ne
 (iv) Antisense: ne
 (v) Typ fragmentu: vnitřní
- 15 (vi) Původní zdroj:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 84:

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

Gly Tyr Phe Pro Phe Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
85 90

(2) Informace pro SEQ ID NO: 85:

- 5 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 30 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

10 (ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu:

(vi) Původní zdroj:

15

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 85:

AGGCCTCTGG ATACACCTTC ACTAACTATG

30

(2) Informace pro SEQ ID NO: 86:

20

- (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 26 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 25 (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

30

(v) Typ fragmentu:

(vi) Původní zdroj:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 86:

GGTACCCTGG CCCAGTAAG TAAAAG

26

35

(2) Informace pro SEQ ID NO: 87:

- (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 37 párů bází
 40 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

45

(iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu:

(vi) Původní zdroj:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 87:

5 CCAGACTCGA CTAGTTGGAT CTGGGAGTGG ACACCTG 37

(2) Informace pro SEQ ID NO: 88:

10 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 446 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

15 (ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu:

(vi) Původní zdroj:

20 (ix) Vlastnosti:
 (A) Jméno/klíč: kodující sekvence
 (B) Umístění: 27...446
 (D) Další informace: F9HZHC 3-0

25 (xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 88:

GAATTCGAG CACACAGGAC CTCACC ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC 53
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe

1 5

TTG GTA GCA ACA GCT ACA GGT GTC CAC TCC CAG ATC CAA CTA GTG CAA 101

Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly Val His Ser Gln Ile Gln Leu Val Gln

10 15 20 25

TCT GGG TCT GAG TTG AAG AAG CCT GGG GCC TCA GTG AAG GTT TCC TGC 149

Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys

30 35 40

AAG GCC TCT GGA TAC ACC TTC ACT AAC TAT GGA ATG AAC TGG GTG CGA 197

Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg

45 50 55

CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTC GAG TGG ATG GGA TGG ATA AAC ACC AGA 245

Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Arg

60 65 70

AAT GGA AAG TCA ACA TAT GTT GAT GAC TTC AAG GGA CGG TTT GTC TTC	293
Asn Gly Lys Ser Thr Tyr Val Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Val Phe	
75 80 85	
TCT CTA GAC ACC TCT GTC AGC ACG GCA TAT CTA CAG ATC AGC AGC CTA	341
Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu	
90 95 100 105	
AAG GCT GAG GAC ACT GCA GTG TAT TTC TGT ACG AGA GAA GGG AAT ATG	389
Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Thr Arg Glu Gly Asn Met	
110 115 120	
GAT GGT TAC TTC CCT TTT ACT TAC TGG GGC CAG GGT ACC CTG GTC ACC	437
Asp Gly Tyr Phe Pro Phe Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr	
125 130 135	
GTC TCC TCT	446
Val Ser Ser	
140	

(2) Informace pro SEQ ID NO: 89:

5

- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 140 aminokyselin
 - (B) Typ: aminokyselina
 - (C) Řetězec: jednoduchý
 - (D) Topologie: lineární

10

(ii) Typ molekuly: peptid

(iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

15

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(vi) Původní zdroj:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 89:

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

```

Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50                      55                      60
Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Arg Asn Gly Lys Ser Thr Tyr Val
65                      70                      75                      80
Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser
                      85                      90                      95
Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val
                      100                      105                      110
Tyr Phe Cys Thr Arg Glu Gly Asn Met Asp Gly Tyr Phe Pro Phe Thr
                      115                      120                      125
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
                      130                      135                      140

```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 90:

- 5 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 90 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární
- 10 (ii) Typ molekuly: cDNA
 (iii) Hypotetická: ne
 (iv) Antisense: ne
 (v) Typ fragmentu:
- 15 (vi) Původní zdroj:
- (xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 90:

```

AGTACTGACA CAGTCTCCAT CCTCCCTGTC TGCATCTGTT GGGGACAGAG TCACCATCAC      60
TTGCAGGGCC AGCTCAAGTG TAAATTACAT                                     90

```

20 (2) Informace pro SEQ ID NO: 91:

- (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 108 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární
- 25 (ii) Typ molekuly: cDNA
 (iii) Hypotetická: ne
 (iv) Antisense: ne
 (v) Typ fragmentu:
- 30 (vi) Původní zdroj:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 91:

```
CTTGATGGGA CGCCGCTAGC CAGGTTACTC GTGGCATAGA TCCAGGGCTT GGGAGCTTTG 60
CCAGGTTTCT GTTGGTACCA GTGCATGTAA TTTACACTTG AGCTGGCC 108
```

5 (2) Informace pro SEQ ID NO: 92:

- (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 108 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 10 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetická: ne

15 (iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu:

(vi) Původní zdroj:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 92:

```
TAACCTGGCT AGCGGCGTCC CATCAAGGTT CAGTGGATCC GGGTCTGGGA CAGATTACAC 60
TCTCACGATA TCCAGTCTAC AACCTGAAGA TTTTGCGACT TATTACTG 108
```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 93:

- (i) Charakteristiky sekvence:
 25 (A) Délka: 102 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

30 (ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu:

35 (vi) Původní zdroj:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 93:

```
GGCGCCGCCA CAGTTCGTTT GATCTCCAGC TTGGTCCCTC CGCCGAACGT CCGCGGGTTA 60
ATACTCCACT GCTGACAGTA ATAAGTCGCA AAATCTTCAG GT 102
```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 94:

- 40 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 330 párů bází

- (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

- 5 (ii) Typ molekuly: cDNA
 (iii) Hypotetická: ne
 (iv) Antisense: ne
 (v) Typ fragmentu:
 (vi) Původní zdroj:
 10 (ix) Vlastnosti:
 (A) Jméno/klíč: kodující sekvence
 (B) Umístění: 2...328
 (D) Další informace:
 15 (xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 94:

A GTA CTG ACA CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTT GGG GAC AGA	49
Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg	
1 5 10 15	
GTC ACC ATC ACT TGC AGG GCC AGC TCA AGT GTA AAT TAC ATG CAC TGG	97
Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met His Trp	
20 25 30	
TAC CAA CAG AAA CCT GGC AAA GCT CCC AAG CCC TGG ATC TAT GCC ACG	145
Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr	
35 40 45	
AGT AAC CTG GCT AGC GGC GTC CCA TCA AGG TTC AGT GGA TCC GGG TCT	193
Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser	
50 55 60	
GGG ACA GAT TAC ACT CTC ACG ATA TCC AGT CTA CAA CCT GAA GAT TTT	241
Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe	
65 70 75 80	
GCG ACT TAT TAC TGT CAG CAG TGG AGT ATT AAC CCG CGG ACG TTC GGC	289
Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ile Asn Pro Arg Thr Phe Gly	
85 90 95	
GGA GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA CGA ACT GTG GCG GCG CC	330
Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala	
100 105	

- 20 (2) Informace pro SEQ ID NO: 95:
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 109 aminokyselin

- (B) Typ: aminokyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

- 5 (ii) Typ molekuly: peptid
 (iii) Hypotetická: ne
 (iv) Antisense: ne
 (v) Typ fragmentu: vnitřní
 (vi) Původní zdroj:

10

- (xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 95:

```

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

```

- (2) Informace pro SEQ ID NO: 96:

15

- (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 26 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

20

- (ii) Typ molekuly: cDNA
 (iii) Hypotetická: ne
 (iv) Antisense: ne
 (v) Typ fragmentu:
 (vi) Původní zdroj:

25

- (xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 96:

CAAGTACTGA CACAGTCTCC ATCCTC

26

30

(2) Informace pro SEQ ID NO: 97:

- (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 26 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární
- (ii) Typ molekuly: cDNA
- (iii) Hypotetická: ne
- (iv) Antisense: ne
- (v) Typ fragmentu:
- (vi) Původní zdroj:
- (xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 97:

AGGGCGCCGC CACAGTTCGT TTGATC

26

(2) Informace pro SEQ ID NO: 98:

- (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 412 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární
- (ii) Typ molekuly: cDNA
- (iii) Hypotetická: ne
- (iv) Antisense: ne
- (v) Typ fragmentu:
- (vi) Původní zdroj:
- (ix) Vlastnosti:
 (A) Jméno/klíč: kodující sekvence
 (B) Umístění: 27...412
 (D) Další informace: F9HZC 3-0
- (xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 98:

GAATTCTGAG CACACAGGAC CTCACC ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC 53
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe

1

5

TTG GTA GCA ACA GCT ACA GGT GTC CAC TCC CAG ATA GTA CTG ACA CAG 101
 Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly Val His Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln

10

15

20

25

TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTT GGG GAC AGA GTC ACC ATC ACT	149
Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr	
30 35 40	
TGC AGG GCC AGC TCA AGT GTA AAT TAC ATG CAC TGG TAC CAA CAG AAA	197
Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys	
45 50 55	
CCT GGC AAA GCT CCC AAG CCC TGG ATC TAT GCC ACG AGT AAC CTG GCT	245
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala	
60 65 70	
AGC GGC GTC CCA TCA AGG TTC AGT GGA TCC GGG TCT GGG ACA GAT TAC	293
Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr	
75 80 85	
ACT CTC ACG ATA TCC AGT CTA CAA CCT GAA GAT TTT GCG ACT TAT TAC	341
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr	
90 95 100 105	
TGT CAG CAG TGG AGT ATT AAC CCG CGG ACG TTC GGC GGA GGG ACC AAG	389
Cys Gln Gln Trp Ser Ile Asn Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys	
110 115 120	
CTG GAG ATC AAA CGA ACT GTG GC	412
Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Val	
125	

(2) Informace pro SEQ ID NO: 99:

- 5 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 129 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární
- 10 (ii) Typ molekuly: peptid
 (iii) Hypotetická: ne
 (iv) Antisense: ne
 (v) Typ fragmentu: vnitřní
 (vi) Původní zdroj:
- 15 (xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 99:

```

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

```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 100:

- 5 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 26 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární
- 10 (ii) Typ molekuly: cDNA
 (iii) Hypotetická: ne
 (iv) Antisense: ne
 (v) Typ fragmentu:
- 15 (vi) Původní zdroj:
- (xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 100:

CAAATAGTAC TCTCCCAGTC TCCAGC

26

20 (2) Informace pro SEQ ID NO: 101:

- 25 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 41 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární
- (ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu:

(vi) Původní zdroj:

5

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 101:

GGATAAGCTT GCGCCGCAA CAGTCGGTTT GATTTCAGC T

41

(2) Informace pro SEQ ID NO: 102:

10

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 335 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Řetězec: jednoduchý

(D) Topologie: lineární

15

(ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetická: ne

(iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu:

20

(vi) Původní zdroj:

(ix) Vlastnosti:

(A) Jméno/klíč: kodující sekvence

(B) Umístění: 1...335

(D) Další informace:

25

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 102:

CAG ATA GTA CTC TCC CAG TCT CCA GCA ATC CTG TCT GCA TCT CCA GGG 48
 Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

GAG AAG GTC ACA ATG ACT TGC AGG GCC AGC TCA AGT GTA AAT TAC ATG 96
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met
 20 25 30

CAC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA TCC TCC CCC AAA CCC TGG ATT TAT 144
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45

GCC ACA TCC AAC CTG GCT TCT GGA GTC CCT GCT CGC TTC AGT GGC AGT 192
 Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

```

GGG TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC ACA ATC AGC AGA GTG GAG GCT GAA      240
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
65                      70                      75                      80

GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAG CAG TGG AGT ATT AAC CCA CGG ACG      288
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ile Asn Pro Arg Thr
                        85                      90                      95

TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA CGG ACT GTT GCG GCG CC      335
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
                100                      105                      110

```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 103:

- 5 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 112 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární
- 10 (ii) Typ molekuly: peptid
 (iii) Hypotetická: ne
 (iv) Antisense: ne
 (v) Typ fragmentu: vnitřní
- 15 (vi) Původní zdroj:
- (xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 103:

```

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

```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 104:

- (i) Charakteristiky sekvence:
- 5 (A) Délka: 318 párů bází
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Řetězec: jednoduchý
(D) Topologie: lineární
- 10 (ii) Typ molekuly: cDNA
(iii) Hypotetická: ne
(iv) Antisense: ne
(v) Typ fragmentu:
(vi) Původní zdroj:
- 15 (ix) Vlastnosti:
(A) Jméno/klíč: kodující sekvence
(B) Umístění: 1...318
(D) Další informace
- 20 (xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 104:
- | | |
|---|-----|
| CAG ATA GTA CTC TCC CAG TCT CCA GCA ATC CTG TCT GCA TCT CCA GGG | 48 |
| Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly | |
| 1 5 10 15 | |
| GAG AAG GTC ACA ATG ACT TGC AGG GCC AGC TCA AGT GTA AAT TAC ATG | 96 |
| Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met | |
| 20 25 30 | |
| CAC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA TCC TCC CCC AAA CCC TGG ATT TAT | 144 |
| His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr | |
| 35 40 45 | |
| GCC ACA TCC AAC CTG GCT TCT GGA GTC CCT GCT CGC TTC AGT GGC AGT | 192 |
| Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser | |
| 50 55 60 | |
| GGG TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC ACA ATC AGC AGA GTG GAG GCT GAA | 240 |
| Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu | |
| 65 70 75 80 | |
| GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAG CAG TGG AGT ATT AAC CCA CGG ACG | 288 |
| Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ile Asn Pro Arg Thr | |
| 85 90 95 | |
| TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA | 318 |
| Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys | |
| 100 105 | |

(2) Informace pro SEQ ID NO: 105:

- (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 106 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

- (ii) Typ molekuly: peptid
 (iii) Hypotetická: ne
 (iv) Antisense: ne
 (v) Typ fragmentu: vnitřní
 (vi) Původní zdroj:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 105:

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

(2) Informace pro SEQ ID NO: 106:

- (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 30 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

- (ii) Typ molekuly: cDNA
 (iii) Hypotetická: ne
 (iv) Antisense: ne
 (v) Typ fragmentu:
 (vi) Původní zdroj:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 106:

CAGATCCAAC TAGTGACAGTC TGGACCTGAG

30

(2) Informace pro SEQ ID NO: 107:

- 5 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 32 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární
- 10 (ii) Typ molekuly: cDNA
 (iii) Hypotetická: ne
 (iv) Antisense: ne
 (v) Typ fragmentu:
- 15 (vi) Původní zdroj:
- (xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 107:

TTAAGCTTGC TAGCTGCAGA GACAGTGACC AG

32

20 (2) Informace pro SEQ ID NO: 108:

- (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 369 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 25 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární
- (ii) Typ molekuly: cDNA
 (iii) Hypotetická: ne
 30 (iv) Antisense: ne
 (v) Typ fragmentu:
 (vi) Původní zdroj:
- (ix) Vlastnosti:
 (A) Jméno/klíč: kodující sekvence
 35 (B) Umístění: 1...369
 (D) Další informace:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 108:

CAG ATC CAA CTA GTG CAG TCT GGA CCT GAG CTG AAG AAG CCT GGA GAG	48
Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu	
1 5 10 15	
ACA GTC AAG ATC TCC TGC AAG GCT TCT GGG TAC ACC TTC ACA AAC TAT	96
Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr	
20 25 30	
GGA ATG AAC TGG GTG AAG CAG GCT CCA GGA AAG GGT TTA AAG TGG ATG	144
Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met	
35 40 45	
GGC TGG ATA AAC ACC AGA AAT GGA AAG TCA ACA TAT GTT GAT GAC TTC	192
Gly Trp Ile Asn Thr Arg Asn Gly Lys Ser Thr Tyr Val Asp Asp Phe	
50 55 60	
AAG GGA CGG TTT GCC TTC TCT TTG GAA AGC TCT GCC AGC ACT GCC AAT	240
Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Ser Ser Ala Ser Thr Ala Asn	
65 70 75 80	
TTG CAG ATC GAC AAC CTC AAA GAT GAG GAC ACG GCT ACA TAT TTC TGT	288
Leu Gln Ile Asp Asn Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys	
85 90 95	
ACA AGA GAA GGG AAT ATG GAT GGT TAC TTC CCT TTT ACT TAC TGG GGC	336
Thr Arg Glu Gly Asn Met Asp Gly Tyr Phe Pro Phe Thr Tyr Trp Gly	
100 105 110	
CAA GGG ACT CTG GTC ACT GTC TCT GCA GCT AGC	369
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser	
115 120	

5 (2) Informace pro SEQ ID NO: 109:

- (i) Charakteristiky sekvence:
- (A) Délka: 123 aminokyselin
- (B) Typ: aminokyselina
- 10 (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární
- (ii) Typ molekuly: peptid
- (iii) Hypotetická: ne
- 15 (iv) Antisense: ne
- (v) Typ fragmentu: vnitřní
- (vi) Původní zdroj:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 109:

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

5 (2) Informace pro SEQ ID NO: 110:

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 363 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

10 (C) Řetězec: jednoduchý

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetická: ne

15 (iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu:

(vi) Původní zdroj:

(ix) Vlastnosti:

(A) Jméno/klíč: kodující sekvence

20 (B) Umístění: 1...363

(D) Další informace:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 110:

CAG ATC CAA CTA GTG CAG TCT GGA CCT GAG CTG AAG AAG CCT GGA GAG	48
Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu	
1 5 10 15	
ACA GTC AAG ATC TCC TGC AAG GCT TCT GGG TAC ACC TTC ACA AAC TAT	96
Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr	
20 25 30	
GGA ATG AAC TGG GTG AAG CAG GCT CCA GGA AAG GGT TTA AAG TGG ATG	144
Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met	
35 40 45	
GGC TGG ATA AAC ACC AGA AAT GGA AAG TCA ACA TAT GTT GAT GAC TTC	192
Gly Trp Ile Asn Thr Arg Asn Gly Lys Ser Thr Tyr Val Asp Asp Phe	
50 55 60	
AAG GGA CGG TTT GCC TTC TCT TTG GAA AGC TCT GCC AGC ACT GCC AAT	240
Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Ser Ser Ala Ser Thr Ala Asn	
65 70 75 80	
TTG CAG ATC GAC AAC CTC AAA GAT GAG GAC ACG GCT ACA TAT TTC TGT	288
Leu Gln Ile Asp Asn Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys	
85 90 95	
ACA AGA GAA GGG AAT ATG GAT GGT TAC TTC CCT TTT ACT TAC TGG GGC	336
Thr Arg Glu Gly Asn Met Asp Gly Tyr Phe Pro Phe Thr Tyr Trp Gly	
100 105 110	
CAA GGG ACT CTG GTC ACT GTC TCT GCA	363
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala	
115 120	

5 (2) Informace pro SEQ ID NO: 111:

- (i) Charakteristiky sekvence:
- (A) Délka: 121 aminokyselin
 - (B) Typ: aminokyselina
 - (C) Řetězec: jednoduchý
 - (D) Topologie: lineární

10

(ii) Typ molekuly: peptid

(iii) Hypotetická: ne

15

(iv) Antisense: ne

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(vi) Původní zdroj:

(xi) Popis frekvence: SEQ ID NO: 111:

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

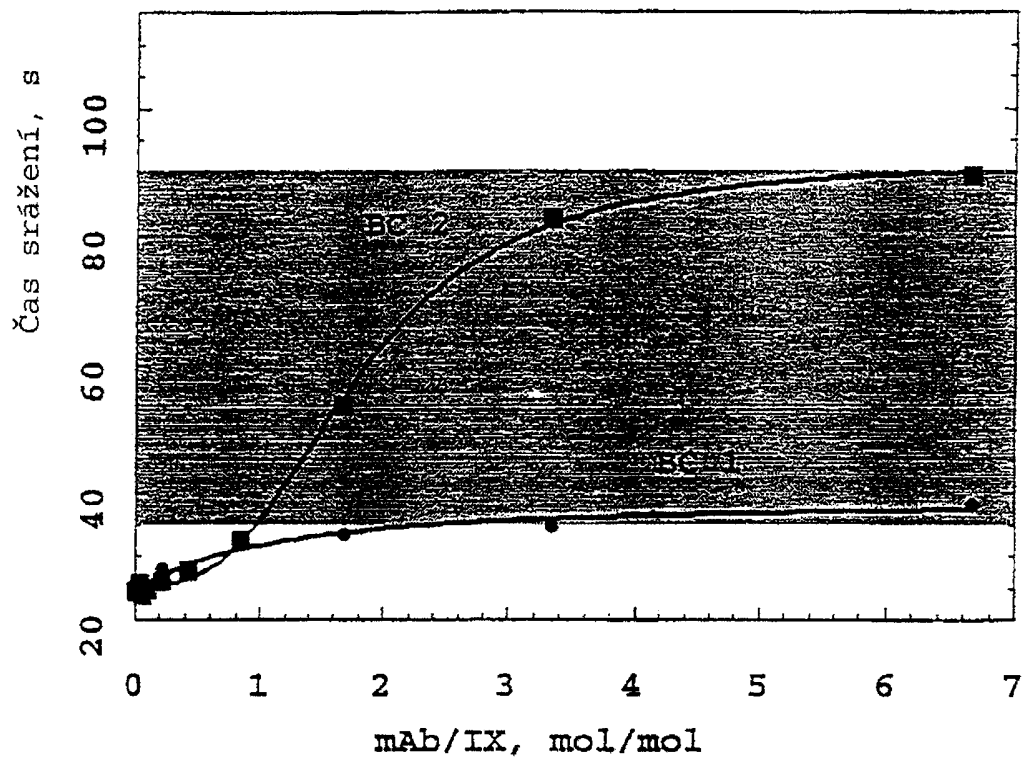
5

PATENTOVÉ NÁROKY

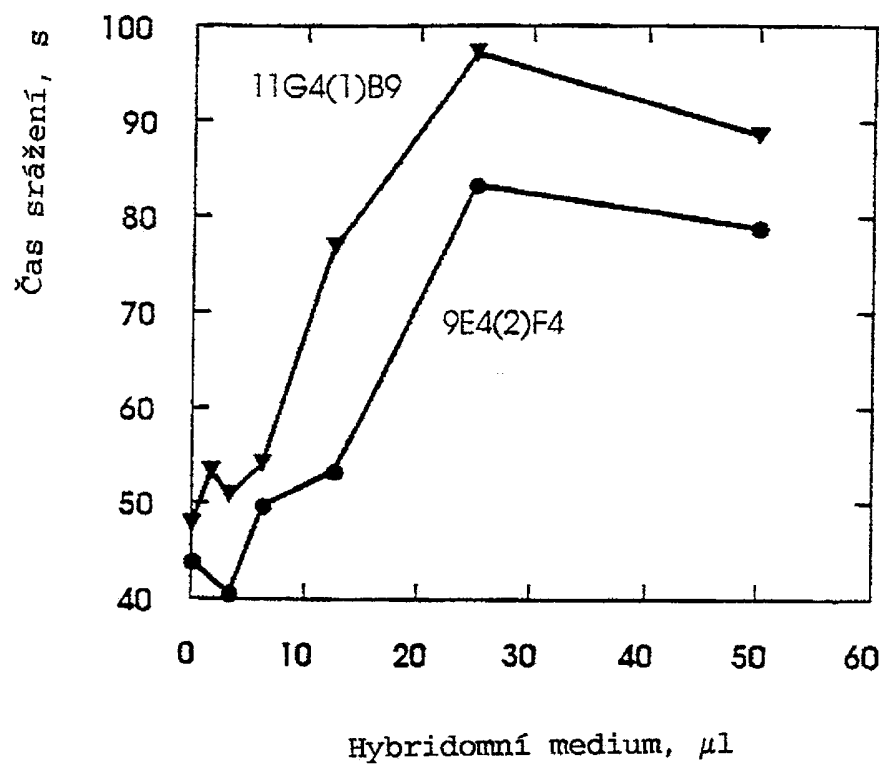
1. Monoklonální protilátka, jejíž těžký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 31 a lehký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 44, jejíž těžký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 52 a lehký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 57, jejíž těžký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 52 a lehký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 62, jejíž těžký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 52 a lehký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 74, jejíž těžký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 52 a lehký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 78 nebo jejíž těžký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 89 a lehký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 99.
2. Pozměněná protilátka obsahující těžký řetězec a lehký řetězec, kde úseky základní struktury uvedeného těžkého a lehkého řetězce jsou odvozeny od alespoň jedné protilátky vybrané z monoklonálních protilátek podle nároku 1 a aminokyselinové sekvence komplementaritu určujících úseků (CDRs) těžkého řetězce jsou dány v SEQ ID NO: 8, 9 a 10 a aminokyselinové sekvence CDRs lehkého řetězce jsou dány v SEQ ID NO: 12, 13 a 14.
3. Pozměněná protilátka podle nároku 2, která je humanizovaná.
4. Humanizovaná protilátka podle nároku 3, jejíž těžký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 31, 52 nebo 89.
5. Humanizovaná protilátka podle nároku 3, jejíž lehký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 44, 57, 62, 74, 78 nebo 99.

6. Humanizovaná protilátka podle nároku 3, jejíž těžký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 31 a lehký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 44.
- 5 7. Humanizovaná protilátka podle nároku 3, jejíž těžký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 52 a lehký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 57.
- 10 8. Humanizovaná protilátka podle nároku 3, jejíž těžký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 52 a lehký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 62.
- 15 9. Humanizovaná protilátka podle nároku 3, jejíž těžký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 52 a lehký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 74.
- 20 10. Humanizovaná protilátka podle nároku 3, jejíž těžký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 52 a lehký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 78.
- 25 11. Humanizovaná protilátka podle nároku 3, jejíž těžký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 89 a lehký řetězec má aminokyselinovou sekvenci danou v SEQ ID NO: 99.
- 30 12. Chimerická protilátka obsahující těžký řetězec a lehký řetězec, ve které jsou konstantní úseky uvedeného těžkého a lehkého řetězce odvozeny od protilátky podle jakéhokoli z nároků 6 až 11 a aminokyselinové sekvence variabilních úseků těžkého řetězce jsou dané v SEQ ID NO: 7 a aminokyselinové sekvence variabilních úseků lehkého řetězce jsou dané v SEQ ID NO: 11.
- 35 13. Protilátka podle nároku 11, ve které jsou konstantní úseky vybrány z lidských imunoglobulinů.
14. Farmaceutický prostředek, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje pozměněnou protilátku podle nároku 3 nebo 12 a farmaceuticky přijatelný nosič.
- 40 15. Farmaceutický prostředek podle nároku 14, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že dále obsahuje kyselinu acetylsalicylovou.

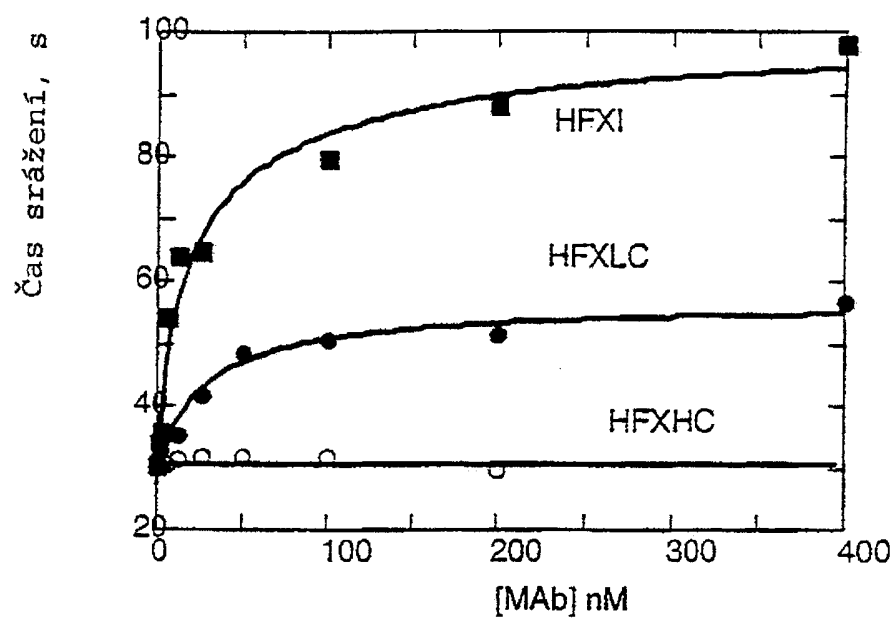
9 výkresů



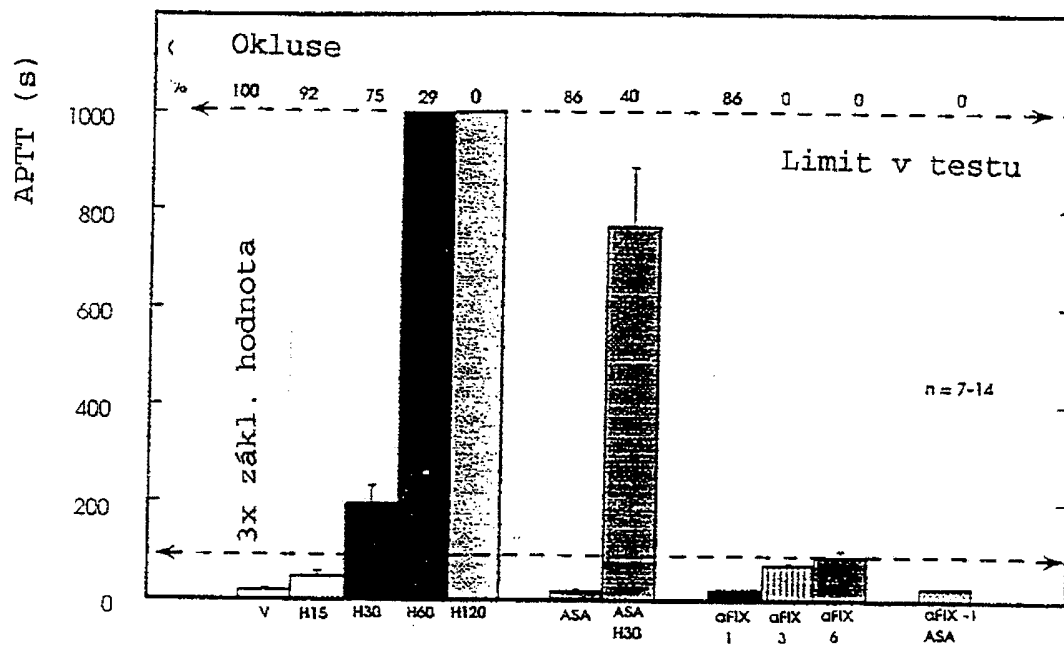
Obr. 1



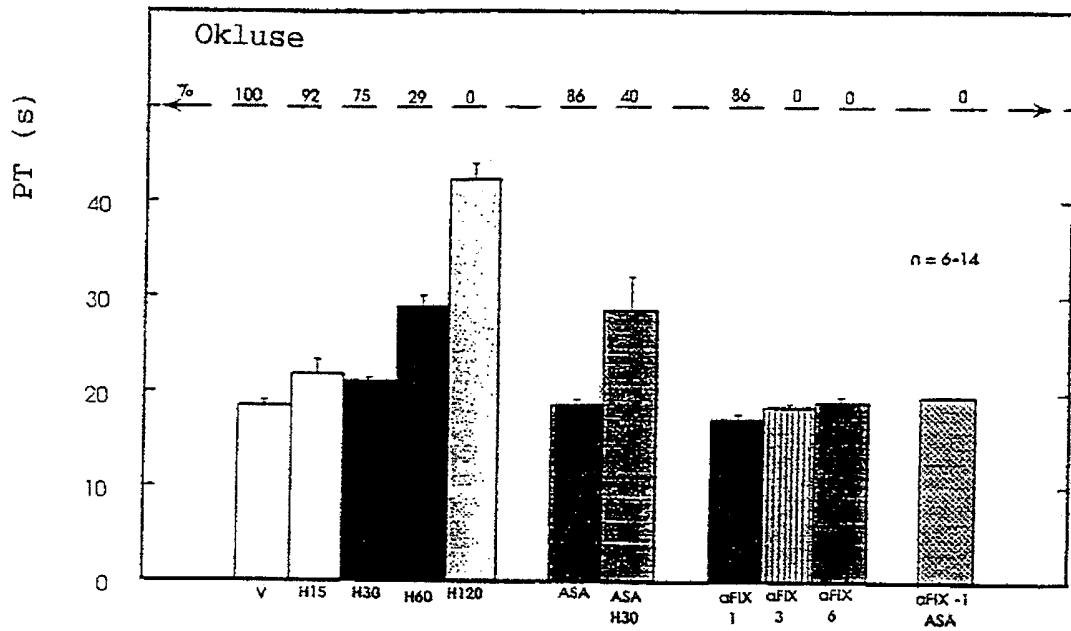
Obr. 2



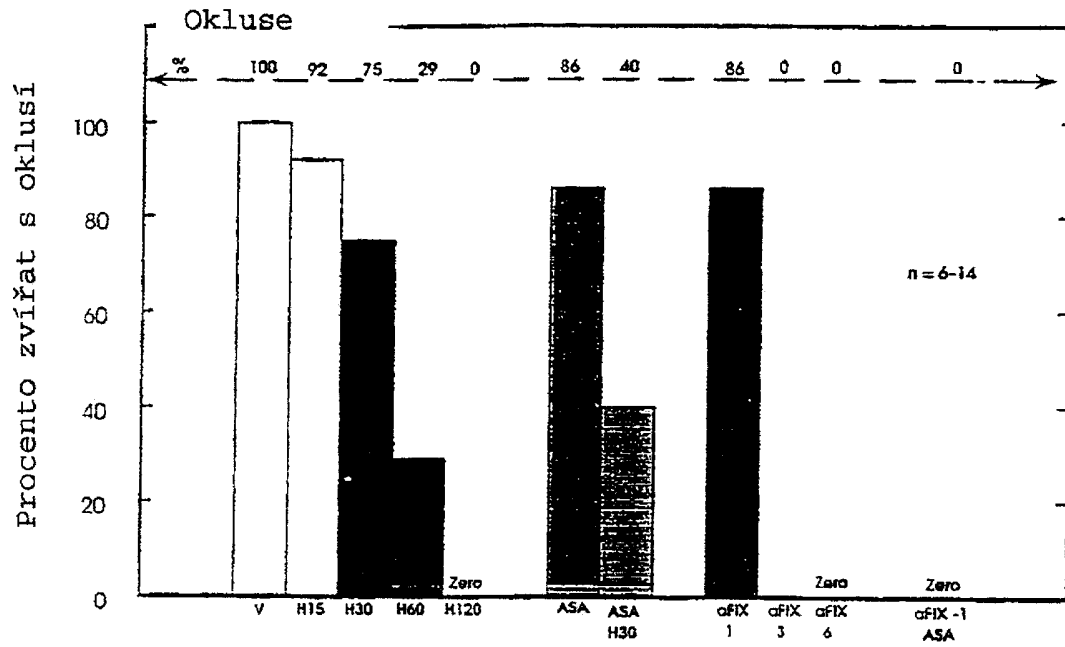
Obr. 3



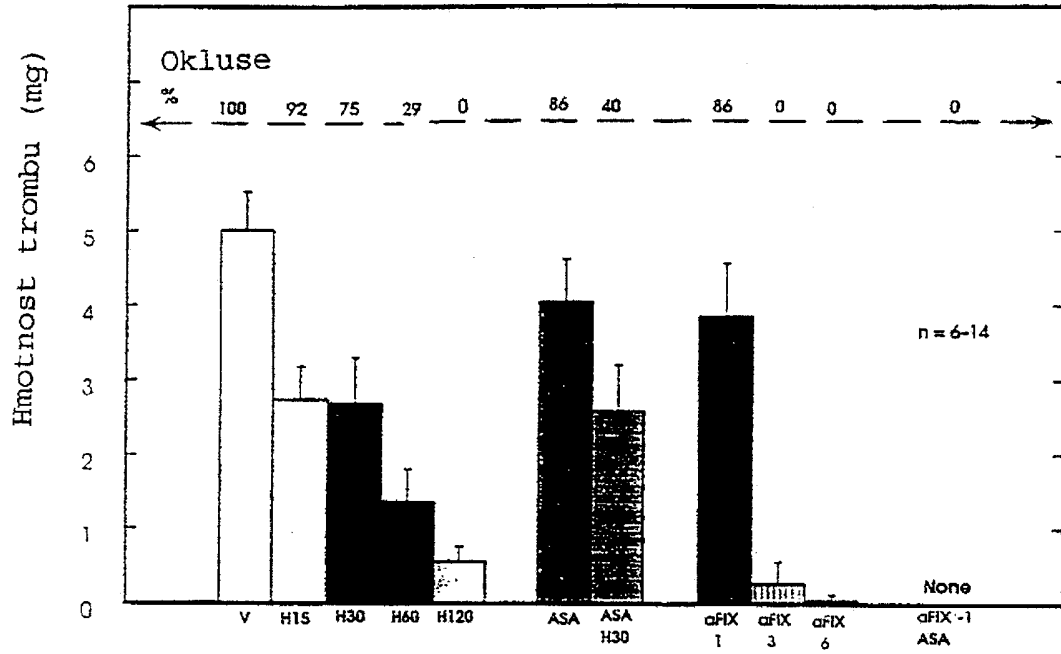
Obr. 4



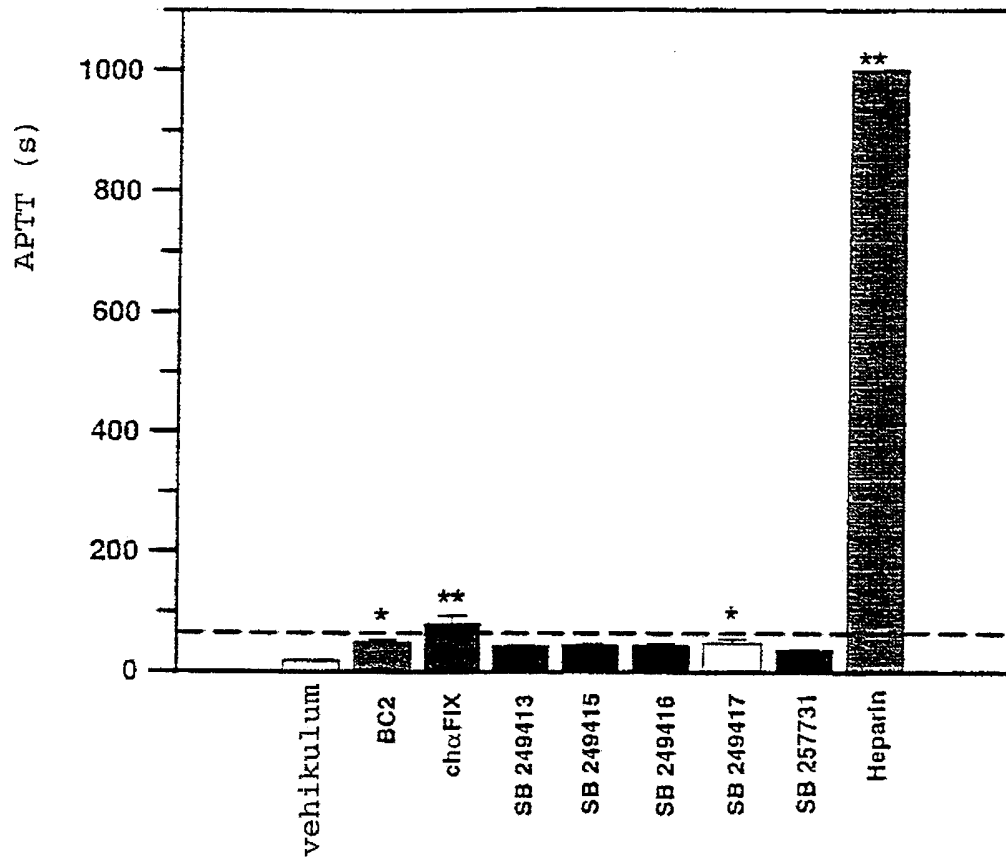
Obr. 5



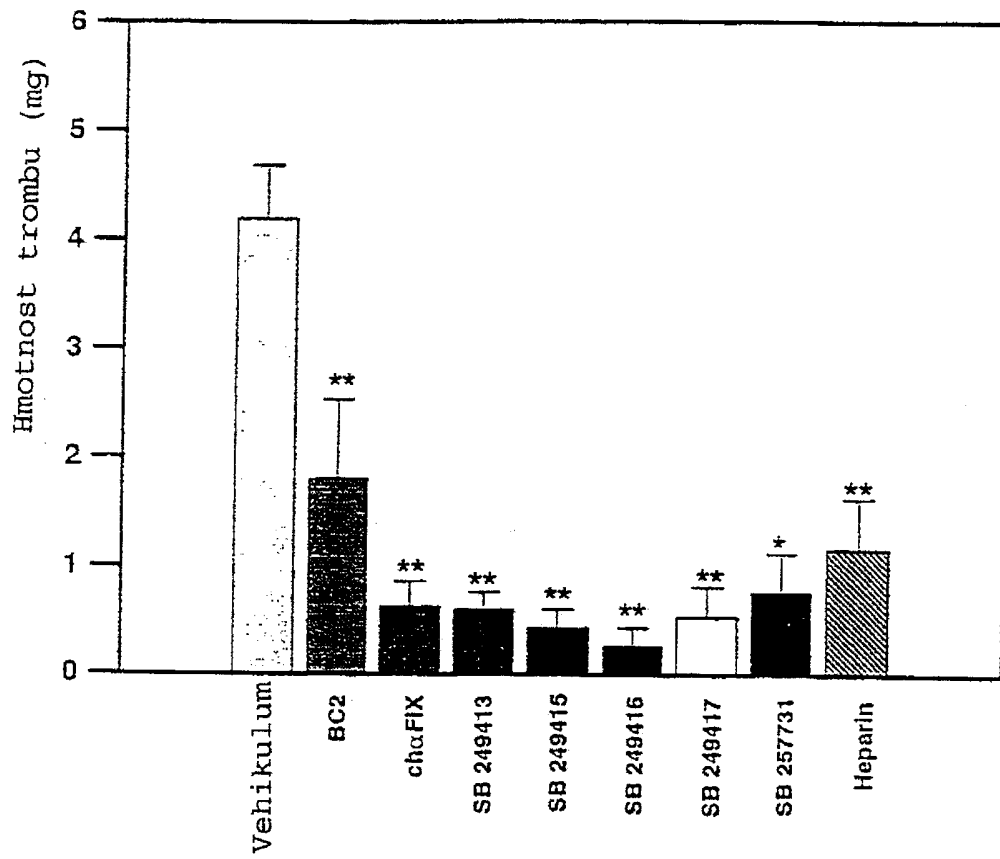
Obr. 6



Obr. 7



Obr. 8



Obr. 9

Konec dokumentu
