

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

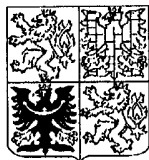
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

963-97

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **28. 03. 97**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **01.04.96**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **96/78570**

(33) Země priority: **JP**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15. 10. 97**
(Věstník č. 10/97)

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. cl.⁶:

C 12 N	15/13
C 12 N	15/74
C 12 N	1/21
C 12 N	15/11
C 12 P	21/08

(71) Přihlášovatel:

SANKYO COMPANY LIMITED, Tokyo, JP;

(72) Původce:

Serizawa Nobufusa, Tokyo, JP;

Ichikawa Kimihisa, Tokyo, JP;

Nakahara Kaori, Tokyo, JP;

Yonehara Shin, Kyoto-fu, JP;

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1273,
Praha 4, 14000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Anti-Fas rekombinantní protilátky a jejich DNA

(57) Anotace:

Rekombinantní protein obsahuje alespoň jeden variabilní region korespondující k variabilnímu regionu imunoglobulinu specifickému pro lidský Fas a nemá v podstatě žádnou další imunogenicitu u lidí ve srovnání s lidskou protilátkou, a je využitelný v léčbě autoimunitních chorob, zejména revmatismu.

CZ 963-97 A3

963-97

č.j.	038866
DOŠLO	
21. V. 97	
URAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ	
PŘÍL.	

1

Anti-Fas rekombinantní protilátky a jejich DNA

Oblast vynálezu

Předkládaný vynález se týká rekombinantních protilátek namířených proti Fas, zejména lidským Fas, a DNA kodující takové protilátky. Předkládaný vynález se dále týká farmaceutických přípravků obsahujících takové protilátky a užitečných pro léčbu autoimunitních chorob jako je revmatoidní artritida, přípravky dále volitelně obsahují inhibitor buněčného růstu. Předkládaný vynález se také týká anti-Fas komplementaritu určujících regionů (CDR) a jejich užití při tvorbě takových protilátek a DNA kodující takové CDR.

Dosavadní stav techniky

Fyziologická smrt buněk v žijících organismech se přirozeně děje událostí známou jako apoptosa, a liší se od patologické smrti buněk, t.j. nekrosy (Kerr et al., (1972), Br.J.Cancer, 26, 239 et seq.). Apoptosa je příkladem programované buněčné smrti, která se děje tehdy, jsou-li jisté buňky předem programovány k přirozené smrti v žijícím organismu, tak jako když zmíněné buňky splnily předem určenou funkci. Apoptosa je charakterizována takovými změnami jako je zakřivení povrchu buněk, kondensace nukleárního chromatinu a fragmentace chromosomální DNA, mimo jiné. Apoptosa má důležitou úlohu v likvidaci buněk, které rozpoznávají autoantigen během procesu diferenciací T a B lymfocytů. Rozvoj takzvaných autoimunitních chorob je obecně zapříčiněn výskytem autoreaktivních lymfocytů vzešlých ze selhání apoptosy během diferenciací lymfocytů (Keiichi Nakayama et al., (1995), Mebio 12(10), 79 - 86).

Fas je molekula buněčné membrány zahrnutá v apoptose imunokompetentních buněk (Yonehara, S., et al., (1989), J. Exp. Med. 169, 1747 a dále,; Trauth, B.C., et al., (1989),

Science 24, 301 a dále,; a Itoh, N., et al., infra). Byly vyvinuty myší monoklonální protilátky proti Fas antigenu (Itoh, N., et al., (1991), Cell 66, 233 - 243 a Yonehara, výše, kteří popsali monoklonální protilátku označenou CH11 specifickou pro lidský Fas). Tyto anti-lidské Fas protilátky mají apoptosu - indukující cytotoxickou aktivitu, a uvažuje se o nich jako o potenciálním terapeutickém agens pro léčbu autoimunitních chorob jako je AIDS, stejně jako nádorů (Japonská patentová publikace nepodrobená průzkumu č. Hei 2-237935 a Japonská nepodrobená průzkumu PCT publikace č. Hei 5-503281). Ogasawara et al. (Nature (1993), 364, 806 - 809) popisuje, že myší anti-Fas protilátky rychle usmrcují divoký typ myší, zřetelně prostřednictvím masivní apoptosy v játrech.

Monoklonální protilátky proti lidskému Fas jsou také známy z následujících publikací: J.Exp. Med. (1989), 169,1747 - 1756; WO 91/10448; Science (1989), 245, 301 - 305; cell (1991), 66, 233 - 243; J.Imm. (1992), 149, 3166 - 3173; a Internat. Immun. (1994), 6, (12) 1849 - 1856.

O revmatismu, zejména o revmatoidní artritidě, se soudí, že je důsledkem proliferace synoviocytů, který je spojen s různými imunologickými abnormalitami. Proliferace synoviocytů je typicky spojena se zánětlivou buněčnou infiltrací a erodí kostí. Eroze tkáně okolo postiženého kloubu u chronické revmatoidní artritidy je jasně způsobena abnormální produkcí cytokinů zánětlivými synoviocyty. Vyšetření kloubů u pacientů s revmatismem ukazuje abnormální proliferaci synoviocytů, hyperplasii synoviálních klků, mnohovrstevné synoviocyty atd. (Daniel J. McCarty (1985), v " Arthritis and allied conditions, A textbook of rheumatology" 10. vydání, Lea & Febiger). Léky pro revmatismus nyní především zahrnují protizánětlivé léky jako jsou steroidy a imunomodulátory. Pokud by bylo možné inhibovat abnormální proliferaci synoviocytů, bylo by jakékoliv agens užitečné v léčbě revmatismu.

Synoviocyty u revmatismu neproliferují neomezeným způsobem ((Daniel J. McCarty (1985), v " Arthritis and allied conditions, A textbook of rheumatology" 10. vydání, Lea & Febiger), a bylo demonstrováno, že u pacientů s revmatismem se vyskytuje apoptosa synoviocytů. Fas antigen je exprimován na membráně synoviocytů a Nakajima et al., (Nakajima, T., et al., (1995), Arthritis Rheum. 38, 485 - 491) a Aono et al., (Abstract of 38th Meeting of Japan Rheumatism Society (1994), str. 487, a články 1994 Meeting of Japan Cancer Society, (1994), str. 388) zkoumají, zda mohou cytotoxické anti-lidské Fas protilátky indukovat apoptosu v abnormálně proliferujících synoviocytech u pacientů s revmatismem. Tyto byly schopné indukovat vysoký stupeň apoptosy u abnormálně proliferujících synoviocytů od pacientů s revmatismem ve srovnání s kontrolou obsahující synoviocyty od pacientů s jinou chorobou než revmatismem.

Tak je anti-lidská Fas protilátka schopná selektivně indukovat apoptosu nejen lymfocytů, ale též abnormálně proliferujících synoviocytů, takže anti-lidská Fas protilátka může být užitečná jako antirevmatické agens.

Nicméně, při podání myší monoklonální protilátky lidem jako farmaceutického přípravku pro chronické podávání je vysoce pravděpodobný výskyt mnoha problémů, které jsou následkem antigenicity vycházející z myšího původu. Výskyt anafylaktického šoku je pravděpodobný, a opakovaná dávka může redukovat účinnost nebo urychlit redukci na úrovni krve atd., což je efekt, který je nežádoucí, má-li být protilátka použita v klinické praxi.

Snahy překlenout problémy spojené s myšími monoklonálními protilátkami vedly k užití rekombinantní DNA technologie tak, aby se získala chimerická protilátka, ve které je konstantní region myší protilátky nahrazen konstantním regionem korespondující lidské protilátky (Morrison, S.L.,

et al., (1984), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6851 - 6855). V alternativním procesu humanizace myší protilátky je myší CDR přítomný ve variabilním regionu myší protilátky (Jones, P.T., et al., (1986), Nature, 321, 522 - 525) insertován do lidské protilátky v podstatě ekvivalentním procesem. Aby se připravila taková genetickým inženýrstvím zpracovaná protilátka je nejprve nezbytné klonovat DNA kodující jak H, tak L podjednotkové řetězce, které tvoří myší protilátku. Tyto řetězce specificky rozpoznávají cílový antigen, takže objasnění jejich sekvence odhaluje primární strukturu variabilního regionu obsahujícího CDR, a tento může pak být použit pro přípravu humanizované protilátky.

Doposud nebyl žádný popis jakékoliv části cytotoxické myší anti-lidské Fas monoklonální protilátky, nebo její DNA sekvence.

Podstata vynálezu

Předmětem předkládaného vynálezu je poskytnutí jedné nebo více nukleotidových sekvencí kodujících variabilní regiony protilátky a dovolujících konstrukci humanizovaných protilátek specifických pro lidský Fas.

V prvním aspektu poskytuje předkládaný vynález rekombinantní protein, kde uvedený protein obsahuje alespoň jeden region korespondující s variabilním regionem imunoglobulinu, kde uvedený alespoň jeden region umožňuje uvedenému proteinu rozpoznat a specificky se navázat na antigen, kde zmíněným antigenem je Fas, a kde zmíněný protein nemá v podstatě žádnou další imunogenicitu u lidí, než má lidská protilátka.

Jiné objekty, cíle, aspekty a provedení předkládaného vynálezu budou objasněny dále.

Popis obrázků na připojených výkresech

Obrázek 1 je schematem konstrukce cDNA knihovny pro umožnění klonování DNA kodující celou délku každé podjednotky CH11; a

Obrázek 2 je diagramem ukazujícím proces klonování a amplifikace DNA kodující celou délku každé podjednotky CH11.

Jak je zde použito, týká se pojem "rekombinantní" jakékoliv substance, která byla získána genetickým inženýrstvím, jako je-li uvedená substance buď modifikována z původní substance, nebo exprimována odlišným způsobem nebo odlišným systemem, než je původní.

Termín "protein" se obecně týká jakékoliv sekvence aminokyselinových zbytků navázaných peptidovými můstky, a může zahrnovat oligopeptidy stejně jako polypeptidy a multimerní peptidy nebo polypeptidová uskupení.

Region korespondující k variabilnímu regionu imunoglobulinu má strukturu charakteristickou pro variabilní region imunoglobulinu, a může korespondovat variabilnímu regionu jak H, tak L řetězce imunoglobulinu. V preferovaném provedení mají proteiny předkládaného vynálezu alespoň dva takové regiony, jeden korespondující variabilnímu řetězci H regionu a druhý korespondující variabilnímu řetězci L regionu, kde jsou oba specifické pro lidský Fas.

Proteiny předkládaného vynálezu nemají v podstatě žádnou další imunogenicitu vzhledem k lidským protilátkám, za což vděčí skutečnosti, že část protilátky korespondující heterolognímu konstantnímu regionu není přítomna. Tak mohou mít proteiny předkládaného vynálezu variabilní region nebo regiony pocházející z myší monoklonální protilátky, ale musí být vyloučen myší konstantní region. Výsledkem je, že

protein předkládaného vynálezu má pouze stejnou úroveň imunogenicity pro pacienta jako, například, lidská protilátka z alternativního zdroje díky skutečnosti, že myší variabilní regiony jsou dostatečně podobné lidským, takže jakákoliv zvýšená úroveň imunogenicity může vzejít pouze z jiné aminokyselinové sekvence, která je součástí variabilního regionu.

Variabilní regiony předkládaného vynálezu mohou být odozeny z jakéhokoliv zdroje, ze kterého je možné generovat protilátku namířené proti lidskému Fas. Ačkoliv je zdrojem nejlépe myš, jsou možné také jiné zdroje jako jsou králíci a krysy, ačkoliv tyto a vyšší zvířata se jeví být méně vhodnými.

Variabilní regiony předkládaného vynálezu mohou být přítomny v proteinu v jakékoliv vhodné konfiguraci. V nejjednodušším provedení se může protein skládat z pouze jednoho variabilního regionu, ačkoliv účinnost takových proteinů bude významně snížena. Částečně je toto způsobeno chyběním stabilizace terciální struktury, ačkoliv vazba může být stále pozorována.

Na vyšší úrovni se mohou proteiny skládat z jednoho variabilního regionu H řetězce a jednoho variabilního regionu L řetězce, které jsou spolu asociovány. Taková asociace může být prostřednictvím přímé vazby, nebo může být tvořena flexibilní peptidovou vazbou zahrnující jeden nebo více extra aminokyselinových zbytků. Takové konstrukty mají výhodu v tom, že neobsahují žádné extra peptidové sekvence, které zvyšují potenciální imunogenicitu.

Ačkoliv je u proteinů předkládaného vynálezu možné, aby měly pouze jeden variabilní region, je preferováno, aby měly alespoň dva. Navíc je preferováno, aby dva byly odvozeny od jedné určité protilátky jako je CH11, každý od H a L řetězce tak, aby přesněji imitovaly přirozenou protilátku. Z

ohledem na to je žádoucí, aby variabilní sekvence byly integrálně vázány s lidskými konstantními regiony, zejména s vhodnými konstantními regiony H a L řetězců.

V předchozím provedení je preferováno, aby dva variabilní regiony byly každý odpovídající částí většího polypeptidu a aby dva polypeptidy byly schopné asociovat za tvorby heterodimeru protilátky.

Vlastnosti protilátky nejsou pro předkládaný vynález rozhodující a mohou být jakéhokoliv vhodného typu, ve kterém protein vynálezu aktuálně koresponduje s typem protilátky. Například mohou typem být IgG, IgM, nebo IgE a typ může úplně záviset na, například, cestě podání. Ačkoliv je CH1 IgM molekula, mohou být variabilní regiony vloženy do IgG konstruktů. Faktem, který jsme objevili, je, že, jestliže je použit IgM typ konstruktů, ale bez J řetězce, který vytváří pentamerickou strukturu protilátky s pěti páry lehkých a těžkých řetězců, vzroste apoptotická aktivita pětkrát nebo vícekrát.

Bude objasněno, že předkládaný vynález dále poskytuje DNA a RNA kodující jakýkoliv z výše identifikovaných proteinů, a zejména DNA. Uvedená DNA může jednoduše kodovat protein, nebo může kodovat určitý polypeptid v tom případě, je-li protein například heterodimerem.

Bude také objasněno, že DNA může být v jakékoliv vhodné formě tak, aby mohla být inkorporována do vektoru, výhodně do expresního vektoru. Může být také asociována s jakoukoliv vhodnou sekvencí, jako je leader sekvence nebo sekvence pro expresi kodovaného proteinu ve formě fuzního proteinu, například.

Předkládaný vynález dále poskytuje hostitelskou buňku transformovanou vektorem jak je definován výše, a systém pro expresi proteinu vynálezu obsahující takovou hostitelskou

buňku transformovanou jedním nebo více vektory obsahujícími výše uvedenou DNA. Protein vynálezu může být získán pomocí takových systémů, po kultivaci systému standartními technikami.

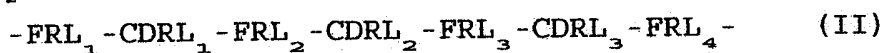
Jisté preferované aspekty a provedení předkládaného vynálezu nyní následují:

Genetickým inženýrstvím zpracovaný imunoglobulinový protein, který specificky váže lidský Fas, kde se imunoglobulinový protein skládá z podjednotky H řetězce a podjednotky L řetězce, kde podjednotka H řetězce obsahuje aminokyselinovou sekvenci representovanou následujícím obecným vzorcem (1):



kde FRH_1 representuje aminokyselinovou sekvenci zahrnující 13 až 30 aminokyselinových residuí, $CDRH_1$ representuje aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO. 1, FRH_2 representuje aminokyselinovou sekvenci zahrnující 14 aminokyselinových residuí, $CDRH_2$ representuje aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO. 2, FRH_3 representuje aminokyselinovou sekvenci zahrnující 32 aminokyselinových residuí, $CDRH_3$ representuje aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO. 3, a FRH_4 representuje aminokyselinovou sekvenci zahrnující 11 aminokyselinových residuí, kde je každá z aminokyselinových sekvencí navázána na další cestou peptidové vazby;

podjednotka L řetězce obsahuje aminokyselinovou sekvenci representovanou následujícím obecným vzorcem (II):



kde FRL_1 representuje aminokyselinovou sekvenci zahrnující 23 aminokyselinových residuí, $CDRL_1$ representuje aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO. 4, FRL_2 representuje aminokyselinovou sekvenci zahrnující 15 aminokyselinových residuí, $CDRL_2$ representuje aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO. 5, FRL_3 representuje aminokyselinovou sekvenci zahrnující 32 aminokyselinových residuí, $CDRL_3$ representuje aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO. 6, a FRL_4 representuje aminokyselinovou

sekvenci zahrnující 10 aminokyselinových residuí, kde je každá z aminokyselinových sekvencí navázána na další cestou peptidové vazby.

Výše uvedený protein je preferován, jestliže podjednotka H řetězce obsahuje aminokyselinovou sekvenci representovanou aminokyselinami č. 1 až 116 v SEQ ID NO. 8, a/nebo podjednotka L řetězce obsahuje aminokyselinovou sekvenci representovanou aminokyselinami č. 1 až 112 v SEQ ID NO. 10.

Výše uvedený protein je preferován, jestliže podjednotka H řetězce obsahuje aminokyselinovou sekvenci representovanou aminokyselinami č. 1 až 571 v SEQ ID NO. 8, a/nebo podjednotka L řetězce obsahuje aminokyselinovou sekvenci representovanou aminokyselinami č. 1 až 219 v SEQ ID NO. 10

Vynález dále poskytuje DNA kodující podjednotku H řetězce obsahující peptid vzorce (I) jak je definován výše. Preferujeme takovou DNA, která obsahuje nukleotidovou sekvenci representovanou nukleotidy č. 58 až 405 v SEQ IN NO. 7.

Také preferovanou je DNA, která hybridizuje s takovou DNA, sense řetězec kodující podjednotku H řetězce imunoglobulinu schopného specificky vázat lidský Fas spolu s podjednotkou L řetězce obsahující aminokyselinovou sekvenci obecného vzorce (II). Je preferováno, aby taková DNA byla schopná hybridizovat při 60 až 70 °C a v 6 x SSC.

DNA kodující podjednotku L řetězce kodující aminokyselinovou sekvenci representovanou obecným vzorcem (II) je také preferována, zejména obsahuje-li nukleotidovou sekvenci representovanou nukleotidy č. 58 až 393 v SEQ IN NO. 9. DNA, která hybridizuje s takovou DNA, a jejíž korespondující sense řetězec kodující podjednotku L řetězce imunoglobulinu, který specificky váže lidský Fas antigen spolu s podjednotkou H řetězce jak je definováno výše, která obsahuje aminokyselinovou sekvenci obecného vzorce (I) je také preferována, zejména je-li

hybridizace při 60 až 70 °C a v 6 x SSC.

Dále je preferován rekombinantní DNA vektor obsahující jakoukoliv DNA popsanou výše, zejména rekombinantní DNA vektorů pCR3-H123 a pCR3-L103, buňky transformované takovými vektory a zejména E.coli pCR3-H123 (FERM BP-5247) a E.coli pCR3-L103 (FERM BP-5248).

Preferovaná metoda pro produkci imunoglobulinového proteinu, který specificky rozpoznává lidský Fas antigen zahrnuje:

kultivaci buněk transfektovaných DNA vektorem popsaným výše za podmínek, které umožní expresi DNA kodující podjednotku L řetězce nebo H řetězce, která je obsažena ve vektoru, a získání imunoglobulinového proteinu z kultury.

Předkládaný vynález dále počítá s použitím CDR, ať vázaný či nikoliv, na regiony "framework" (FR) jak je identifikován výše, a jeho kodující DNA, v konstrukci humanizovaných protilátek a proteinů, které selektivně vážou lidský Fas.

Nyní jsme úspěšně klonovali geny kodující každý z H, L a J řetězců IgM monoklonální protilátky proti lidskému Fas. Byla použita cDNA knihovna připravená z hybridomů produkujících protilátku a bylo možné objasnit celou nukleotidovou sekvenci každého genu a její korespondující aminokyselinovou sekvenci. z těchto bylo možné získat CDR sekvence H a L řetězců. Expresní vektory obsahující H, L a J řetězce byly konstruovány, a bylo shledáno, že ze supernatantu kultury získané ko-transfekcí kultivovaných zvířecích buněk těmito vektory bylo možné získat cytotoxické proteiny mající podobnou aktivitu jako protilátka proti lidskému Fas.

DNA předkládaného vynálezu může být získána nejprve přípravou poly(A)⁺RNA z myších hybridomních buněk produkujících monoklonální protilátku proti lidskému Fas, jako je CH11. Poly(A)⁺RNA může pak být konvertována na cDNA použitím reversní transkriptasy, cDNA kodující H, l a případně J řetězec protilátky

může být purifikována. (Yonehara et al. ((1989), J.Exp. Med. 169, 1747 a dále) monoklonální protilátka proti lidskému Fas, která byla označena CH11, fúsí myších myelomových buněk s myšími lymfocyty po imunizaci myši Fas exprivujícími lidskými diploidními fibroblasty buněčné linie FS-7. CH11 protilátka je komerčně dostupná od Medical Biological Laboratory Co. Ltd. of Japan.

Poly(A)⁺RNA může být získána buď nejprve přípravou celkové RNA a pak purifikací poly(A)⁺RNA z celkové RNA užitím například afinitní kolony plněné oligo(dT) celulosou, oligo(dT) latexových korálek atd., nebo může být získána přímo purifikací poly(A)⁺RNA z buněčných lysátů za použití takových afinitních materiálů, které jsou popsány výše. Celková RNA může být připravena například takovými metodami jako je: ultracentrifugace v hustotním gradientu alkalické sacharosy (Dougherty, W. G. a Hiebert, E., (1980), Virology, 101, 466 - 474); guanidin thiokyanat-fenolovou metodou; guanidin thiokyanat-trifluorocesium metodou; a fenol-SDS metodou. Preferovaná metoda nicméně využívá guanidin thiokyanat a chlorid cesia (Chirgwin, J.M., et al., (1979), Biochemistry, 18, 5294 - 5299).

Jednořetězcová (ss) cDNA získaná užitím reversní transkriptasy jak je popsáno výše, může pak být konvertována na dvouřetězcovou (ds) cDNA. Vhodné metody pro získání ds cDNA zahrnují S1 nukleasovou metodu (Efstratiadis, A., et al. (1976), Cell, 7, 279 - 288) a Gubler - Hoffmanovu metodu (Gubler, U., aq Hoffman, B.J. (1983) Gene, 25, 263 - 269). My nicméně preferujeme využití Okayama - Bergovi metody (Okayama. H. a Berg, P. (1982), Mol. Cell. Biol. 2, 161 - 170).

Ds cDNA získaná výše může pak být integrována do klonujícího vektoru a výsledný rekombinantní vektor pak může být použit pro transformaci vhodných mikroorganismů, jako je E. coli. Transformované buňky budou selektovány použitím standartních metod, jako je selekce podle resistance na tetracyklin nebo

resistence na ampicilin, která je kodovaná rekombinantním vektorem. Při použití *E.coli* může být transformace dosažena metodou podle Hanahana (Hanahan, D. (1983), *J.Mol. Biol.*, 166, 557 - 580). Alternativně může být rekombinantní vektor zaveden do kompetentních buněk připravených vystavením zároveň chloridu vápenatému a buď chloridu hořečnatému nebo chlorid rubidia. Je-li plasmid použit jako vektor je vysoce žádoucí, aby plasmid nesl gen lékové resistance, jak bylo zmíněno výše, aby se usnadnila selekce. Selekce za použití hrubé síly je možná, ale není preferována. Ačkoliv se mluvilo a plasmidech je jasné, že mohou být použity jiné klonovací prostředky, jako jsou lambda fágy.

Metody pro selekci transformantů majících žádoucí DNA zahrnují následující:

(1) Vyšetření použitím syntetické oligonukleotidové proby

Jestliže byla určena část nebo celá aminokyselinová sekvence požadovaného proteinu, pak může být krátká sousedící sekvence, která je také reprezentativní pro požadovaný protein, použita pro konstrukci oligonukleotidové proby. Proba koduje aminokyselinovou sekvenci, ale, díky degeneraci genetického kodu, existuje větší množství prob, které mohou být připraveny. Tak bude aminokyselinová sekvence obvykle vybrána tak, aby mohla být kodována omezeným množstvím oligonukleotidů. Počet oligonukleotidů, které je nezbytné vytvořit, může dále být redukován substitucí inosinu tam, kde mohou být použity jakékoliv čtyři normální base. Proba je pak vhodně značena, například ^{32}P , ^{35}S nebo biotinem, a pak je hybridizována s denaturovanou, transformovanou DNA od transformantů, které byly imobilizovány na nitrocelulosovém filtru. Pozitivní kmeny jsou ukázány detekcí značky na probě.

(2) Polymerasová řetězová reakce

Jestliže byla určena část nebo celá aminokyselinová sekvence požadovaného proteinu, pak mohou být syntetizovány sense a

antisense oligonukleotidové primery korespondující k separátním nesousedícím částím aminokyselinové sekvence, tak jako v metodě popsané v (1) výše. Tyto primery pak mohou být použity v technice polymerasové řetězové reakce (Saiki, R.K., et al., (1988) Science, 239, 487 - 491) za použití templátové DNA. Templátová DNA, která je zde použita, může být cDNA syntetizovaná reversní transkriptázovou reakcí za použití mRNA získané z hybridomů produkujících protilátku proti lidskému Fas, jako je ta exprivovaná CH11. Takto syntetizovaný DNA fragment může být buď přímo integrován do plasmidového vektoru, například použitím komerčního kitu, nebo může být značen například ^{32}P , ^{35}S nebo biotinem, a pak použit jako proba pro hybridizaci kolonie nebo hybridizaci plaku pro získání požadovaného klonu.

Monoklonální protilátka CH11 je molekulou imunoglobulinu M ("IgM"); komplexem obsahujícím pět podjednotek jak H (μ řetězce), tak L řetězce, a jeden J řetězec. Proto aby se určila jednotlivá aminokyselinová sekvence pro podjednotku musí být podjednotka separována, což může být provedeno jakoukoliv vhodnou technikou jako je elektroforesa, chromatografie na koloně, atd., které jsou v oboru dobře známé. Pokud byla podjednotka separována, je sekvencována například použitím automatického sekvencoru proteinů (například PPSQ-10 od Shimadzu), aby se určila aminokyselinová sekvence alespoň N - konce každé podjednotky. Oligonukleotidy/primery mohou pak být produkovány za využití této znalosti.

Získání DNA kodující každou podjednotku monoklonální protilátky proti lidskému Fas z vhodných transformantů získaných výše může být provedeno dobře známou technikou, jako je ta, kterou popisuje Maniatis, T. et al., (v "Molecular Cloning A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY, (1982)). Například, region DNA kodující požadovanou podjednotku může být excidován z plasmidové DNA po separaci frakce korespondující vektorové DNA z transformantu, který byl určen jako nesoucí nezbytný plasmid.

E. coli DH5 α byl transformován plasmidem obsahujícím DNA kodující těžké, lehké a J řetězce CH11, připravené jak je popsáno výše, a vzniklé tři transformanty (označené *E. coli* PCR3-H123, *E. coli* PCR3-L103, *E. coli* PCR3-J1123) byly uskladněny v souladu s podmínkami Budapeštské smlouvy o uložení mikroorganismů v Research Institute of Life Science Technology Agency of Industrial Science and Technology 28. února 1996 a byly jim přiděleny ukládací čísla FERM BP-5427, FERM BP-5428 a FERM BP-5429, v příslušném pořadí. *E. coli* DH5 α obsahující tyto plasmidy může být kultivována srovnatelným způsobem jako *E. coli* DH5 α nenesoucí tyto plasmidy. Všechny uskladněné kmeny mohou být selektovány díky jejich resistenci na ampicilin. Proto může být DNA předkládaného vynálezu získána za použití těchto deposit. Tohoto může být dosaženo například kultivováním deposit a izolováním plasmidů, nebo užitím polymerasové řetězové reakce (PCR) za použití plasmidů jako templátů.

Tam, kde je to vhodné, mohou být DNA sekvence sekvencovány podle mnoha v oboru dobře známých metod, včetně, například, Maxam - Gilbert chemické modifikované techniky (Maxam, A.M. a Gilbert, W. (1980) v "Methods in Enzymology" 65, 499 - 276) a dideoxy řetězovou terminační metodou za užití M13 fágu (Messing, J. a Vieira, J. (1982), Gene, 19, 269 - 276). V posledních letech další metoda sekvencování DNA dosáhla širokého uplatnění, a obsahuje použití fluorogeního barviva místo konvenčního radioizotopu v dideoxy metodě. Celý proces je komputerizován, včetně čtení nukleotidové sekvence po elektroforese. Vhodným přístrojem pro proces je například Perkin - Elmer Sequence robot "CATALYST 800" a Perkin - Elmer model 373A DNA sekvencer. Užití této techniky umožňuje účinné a bezpečné určení DNA nukleotidové sekvence.

V souladu s tím je možné z takto určené nukleotidové sekvence DNA kodující H a L řetězce CH11, v konjunkci s daty sekvence pro N-konec H a L řetězců, určit celou aminokyselinovou sekvenci H a L řetězců CH11.

Regiony pracovních rámečků (FR) jsou přítomny v různých regionech H a L řetězců imunoglobulinů a slouží k obklopení a separování CDR. V souladu s tím je zde o jeden FR více ve srovnání s počtem CDR v každém variabilním regionu. "framework" regiony také přispívají ke trojrozměrné struktuře variabilního regionu, a tak se účastní ve vazbě antigenu stabilizací terciální struktury regionu. Jako ilustrace terminologie aplikované na každý FR a CDR ve variabilním regionu je FRH_1 "framework" region na N-terminálním konci variabilního regionu H řetězce. Postupně směrem k C-terminálnímu konci jsou zde v příslušném pořadí $CDRH_1$, FRH_2 , $CDRH_2$, FRH_3 , $CDRH_3$ a nakonec FRH_4 . Stejná nomenklatura je použita na L řetězec, takže první "framework" region je označen FRL_1 , atd.

Jak H, tak L řetězce imunoglobulinů obsahují variabilní a konstantní region. Variabilní region je složen z CDR a, jak bylo posáno výše, jak H, tak L řetězce mají tři CDR propojené mezi sebou a doprovázené čtyřmi "framework" regiony. Aminokyselinová sekvence konstantních regionů je stejná, bez ohledu na rozpoznání antigenu, a je přesně oddělena pro H a L řetězce a tak poskytuje stejnou třídu imunoglobulinů. Oproti tomu je aminokyselinová sekvence variabilního regionu, zejména CDR, a je typická pro každou protilátku. Nicméně, podle srovnávacích studií aminokyselinových sekvencí velkého počtu protilátek, jak umístění CDR, tak délka "framework" sekvencí, které je spojují, je prakticky konstantní u podjednotek protilátky stejné podskupiny (Kabat, E.A. et al., (1991), v "Sequence of Proteins of Immunological Interest Vol. II": U.S. Department of Health and Human Services). S touto znalostí je proto možné určit umístění CDR, "framework" regionů a konstantních regionů každého z H a L řetězců CH11 srovnáním určené aminokyselinové sekvence se známou aminokyselinovou sekvencí.

Bude zřejmé, že "framework" regiony jsou důležité pro separaci CDR a pro pomoc při sterickém určení struktury variabilních regionů, ale že, pokud jsou tyto požadavky splněny, není aktuální velikost a sekvence každého "framework" regionu významná pro

předkládaný vynález, což je dáno tím, že FR nejsou odpovědné za vazbu antigenu. V souladu s tím může být pro každý FR použita jakákoliv vhodná aminokyselinová sekvence. Nicméně, bylo pozorováno, že "framework" regiony jsou všeobecně přirozeně konzervovány, a z tohoto důvodu obecně preferujeme uchování regionů, které jsou buď identické, nebo těsně korespondující k těm, které jsou nacházeny v CH11 (Yonehara et al., supra).

Ačkoliv je délka řetězce "framework" regionu obecně v podstatě konservovaná, zejména uvnitř imunoglobulinových subtypů, bylo stanoveno, že FRH_1 , umístěný na N-konci H řetězce může být někdy kratší, než je předpokládáno. Tak místo 30 aminokyselin může být FRH_1 zkrácen u myšího IgM na 13 aminokyselin a byla stanovena minimální délka 19 aminokyselin pro μ 2a podtyp pro CH11 (Kabat et al.). V souladu s tím může být délka řetězce "framework" regionu v N-konci H řetězce v rozsahu 13 až 30 aminokyselin. Toto rozmezí je preferovaně mezi 19 a 30 aminokyselinami a nejlépe je 30 aminokyselin.

Obecně bude jasné, že "framework" regiony v každém konci variabilního regionu (FRH_1 a FRH_4 v H řetězci) mají menší význam než vmezeřené "framework" regiony přímo spojující CDR (FRH_2 a FRH_3 v H řetězci). V souladu s tím se mohou připojené "framework" regiony lišit o více než asi 60% od normy dané pro daný typ protilátky, zatímco vmezeřené "framework" regiony se mohou v délce lišit pouze v omezeném rozsahu, který je typicky pouze jedna aminokyselina. V některých případech může vést jakákoliv variace v délce k významnému snížení účinnosti a odborník bude snadno schopen stanovit potřebné parametry pro jakýkoliv konstrukt variabilního regionu.

Je-li žádoucí konstruovat pozměněnou sekvenci, ve které je deletována jakákoliv jedna nebo více aminokyselin v aminokyselinové sekvenci, pak může být použita, například, metoda kazetové mutace (Toshimitsu Kishimoto, "Shin-Seikagaku Jikken Kouza (New Biochemistry Experiment Series) II: Nucleic Acids III, Recombinant DNA technology", str. 242 - 251).

Jakákoliv vhodná aminokyselinová sekvence může být navázána na C-terminální konec obou variabilních regionů, pokud neovlivní nepříznivě schopnost vazby antigenu, pokud to není z důvodu jako je tvorba prekursorové molekuly, například tvorba leader sekvence. Obecně, tam, kde je C-terminální sekvence preferujeme, aby korespondovala s lidským konstantním regionem z vhodného H nebo L řetězce.

DNA předkládaného vynálezu může být připravena jakoukoliv vhodnou metodou, jako je chemická syntesa za použití konvenčních metod, jako je fosfát - triesterová metoda (Hunkapiller, M. et al., (1984), Nature, 310, 105 - 111; a Grantham, R., et al., (1981) Nucleic Acids Res. 9, r43 - r74). Různé kodony pro aminokyseliny jsou dobře známé a jejich selekce může být úplně svévolná, ačkoliv je všeobecně preferováno použít selekci založenou na frekvenci použití kodonů pro vybraného hostitele. Je-li využita jiná technika než přímá chemická syntesa, může být žádoucí částečně modifikovat kodony získané sekvence, a tohoto může být dosaženo například místně řízenou mutagenesí (Mark, D.F., et al., (1984), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5662 - 5666) za použití syntetických oligonukleotidů s inkorporovanou požadovanou modifikací jako primerů.

V předkládaném vynálezu, kde je specifikováno, že DNA může hybridizovat s jinou DNA, může být toto stanoveno technikami v oboru dobře známými. Například pro stanovení, jestli jistá sekvence hybridizuje s nějakou jinou danou sekvencí, může být jedna nebo druhá sekvence označena například (α - 32 P)dCTP za použití metody náhodného primeru (Feinberg A.P. a Vogelstein, B. (1983), Anal. Biochem., 132, 6 - 13) nebo zářezovou (nick) translační metodou (Maniatis, T., et al., (1982) v "Molecular Cloning A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY), například. Jeden DNA řetězec použitý v hybridizačním testu je vhodně adsorbován na, například, nitrocelulosovou membránu nebo nylonovou membránu, a na ní imobilizován zahřátím nebo UV ozářením za použití konvenčních metod. V jednom specifickém

provedení může pak membrána být ponořena v prehybridizačním roztoku obsahujícím 6 x SSC, 5% (objem/ objem) Denhartův roztok a 0.1% (hmotnost/ objem) dodecyl sulfát sodný (SDS) a inkubován při 55 °C po více než 4 hodiny. Druhý, značený řetězec je pak přidán do prehybridizačního roztoku do konečné specifické aktivity 1×10^6 cpm/ml a inkubován přes noc při 60 °C. Potom je membrána promyta v 6 x SSC při pokojové teplotě pětkrát po dobu 5 minut. Po dalším promytí při 57 °C po 20 minut je membrána podrobena autoradiografii pro určení toho, jestli hybridizace proběhla. Tak může být připravena a izolována DNA hybridizující s DNA předkládaného vynálezu (Maniatis, T., et al., (1982) v "Molecular Cloning A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY).

Integrace takto získané DNA předkládaného vynálezu do expresního vektoru umožňuje transformaci prokaryotních a eukaryotních hostitelských buněk. Takové expresní vektory budou typicky obsahovat vhodné promotory, replikační místa a sekvence zahrnuté v genové expresi, které umožní expresi DNA v hostitelské buňce.

Vhodné prokaryotní hostitelské buňky zahrnují, například, E.coli (*Escherichia coli*) a *Bacillus subtilis*. Aby byl exprimován požadovaný gen v takovém hostiteli, musí být hostitelské buňky transformovány plasmidovým vektorem obsahujícím replikon odvozený od druhu kompatibilního s hostitelem, který typicky má zdroj replikace a promotorovou sekvenci jako je lac UV5. Vektory preferovaně mají sekvence schopné udělení selekčního fenotypu transformovaným buňkám.

Vhodným kmenem E.coli je kmen JM109 odvozený od E.coli K12. Vhodné vektory zahrnují pBR322 a pUC serie plasmidů. Vhodné promotory zahrnují laktosový promotor (lac) a tryptofan laktosový promotor (trc). Obecně bude jasné, že předkládaný vynález není omezen na takové hostitele, vektory, promotory atd., jak jsou zde doloženy příklady a že může být použit jakýkoliv vhodný systém podle potřeby.

Vhodným preferovaným kmenem *Bacillus subtilis* je kmen 207-25, a preferovaným vektorem je pTUB (Ohmura, K., et al., (1984), J.Biochem., 95, 87 - 93). Vhodným promotorem je regulační sekvence *Bacillus subtilis* α -amylasového genu. Je-li to žádoucí, může být DNA sekvence kodující signální peptidovou sekvenci α -amylasy navázána na DNA předkládaného vynálezu, aby se usnadnila extracelulární sekrece.

Vhodné eukaryotické hostitelské buňky zahrnují buňky od obratlovců, kvasinek atd. Vhodné buňky od obratlovců zahrnují, například opičí buněčnou linii COS (Gluzman, Y. (1981), Cell, 23, 175 - 182). Vhodné kvasinky zahrnují *Saccharomyces cerevisiae* a *Schizosaccharomyces pombe*.

Obecně jsou požadavky pro vhodné expresní vektory pro buňky obratlovců tyto: promotor obvykle upstream od exprivovaného genu; RNA spojovací místo; polyadenylační místo; a traskripční terminátorovou sekvenci atd. Je-li to žádoucí mohou dále obsahovat zdroj replikace. Vhodným plasmidem je pSV2dhfr obsahující SV40 promotor (Subramani, S. et al., (1981) Mol. Cell Biol., 1, 854 - 884).

Vhodnými eukaryotickými hostiteli jsou kvasinky, jako je *Saccharomyces cerevisiae*, a vhodné expresní vektory pro kvasinky zahrnují pAH301, pAH82 a YEp51. Vhodné vektory obsahují, například, promotor genu pro alkohol dehydrogenasu (Bennetzen, J.L. a Hall B.D. (1982, J.Biol. Chem., 257, 3018 - 3025) nebo karboxypeptidasa Y GAL10 protmotor (Ichikawa, K. et al., (1993), Biosci. Biotech. Biochem, 57,1686 - 1690). Je-li ti žádoucí může být DNA sekvence kodující signální peptidovou sekvenci karboxypeptidasy Y připojena na exprivovanou DNA, aby se usnadnila extracelulární sekrece.

V případě, že hostitelem je COS, zahrnují vhodné vektory SV40 zdroj replikace, umožňující autonomní růst, transkripční promotor, terminační signál transkripce a RNA spojovací místo.

Expresní vektory mohou být použity pro transformaci buněk jakoukoliv vhodnou metodou, jako je DEAE-dextranová metoda (Luthman, H., a Magnusson, G. (1983) *Nucleic Acids Res.*, 11, 1295 - 1308), fosforečan vápenatý-DNA koprecipitační metodou (Graham, F.L. a van der Eb, A.J. (1973) *Virology*, 52, 456 - 457) a metodou elektroporace elektrickými pulsy (Neumann, E. et al., (1982) *EMBO J.* 1, 841 - 845) V preferovaném provedení jsou COS kotransfektovány dvěma separátními expresními vektory - jedním obsahujícím DNA kodující protein obsahující variabilní region H řetězce CH11 a jedním obsahujícím DNA kodující protein obsahující variabilní region L řetězce CH11, a tyto vektory jsou exprivovány simultánně za vzniku rekombinantní protilátky proti lidskému Fas.

Transformanty předkládaného vynálezu mohou být kultivovány za použití konvenčních metod, kde je požadovaný protein exprivován buď intra, nebo extracelulárně. vhodná kultivační media zahrnují různá obecně užívaná media, a budou obecně vybrána podle vybraného hostitele. Například, vhodné medium pro COS buňky zahrnuje RPMI-1640 a Dulbekovo Modifikované Eaglovo Minimální esenciální medium, které může být doplněno, je-li to žádoucí, fetálním hovězím sérem (FBS). Teplota kultivace může být jakákoliv teplota, která nesnižuje významně schopnost buněk syntetizovat proteiny, a preferovaně je v rozmezí od 32 do 42 °C, zejména pro savčí buňky. Je-li to žádoucí, může být kultivace provedena v atmosféře obsahující 1 až 10% (objem/objem) oxidu uhličitého.

Protein exprivovaný transformanty předkládaného vynálezu může být izolován a purifikován různými dobře známými metodami separace podle toho, jestli je protein exprivován intra- nebo extra- celulárně a s ohledem na fyzikální a chemické vlastnosti proteinu. Vhodné specifické metody separace zahrnují: ošetření obecně užívaným precipitačním činidlem pro proteiny; různé metody chromatografie jako je ultrafiltrace, chromatografie na molekulární síťce (gelová filtrace), adsorpční chromatografie, iontová výměnná chromatografie, afinitní chromatografie a vysoko-

tlaková kapalinová chromatografie (HPLC); dialýsu; a jejich kombinace

Užitím metod posaných výše může být požadovaný protein snadno získán ve značném výtěžku a vysoké čistotě. Protilátka produkovaná v preferovaném provedení může postrádat J řetězec, jestliže zde není žádný extra plasmid kodující J řetězec. V takovém případě jsme stanovili, že výsledné heterodimery H a L řetězců mají cytotoxicitu asi pětkrát vyšší než CH11.

Specifická vazebná aktivita proteinů předkládaného vynálezu k Fas antigenu může být určena, například, enzym vázanou imunosorbentní zkouškou (ELISA) V jednom specifickém provedení ELISA je Fas antigen imobilizován na dně jamek 96 jamkového plátu a testovaný protein je zaveden do jamek, kde jsou potom buňky promyty kvůli odstranění nenavázaného proteinu. Po promytí jsou buňky vystaveny enzymem značené protilátce specifické pro protein, například pro jeho konstantní region. Buňky jsou pak promyty znovu, a jakákoliv značka zbývající v jamce je detekována. cDNA kodující pro lidský Fas antigen byla dříve popsána a metoda pro zavedení cDNA do zvířecích buněk pro její expresi je také známa (Itoh, N., et al., (1991) Cell, 66, 233 - 243). Antigen pro použití ve výše uvedené ELISA metodě může být získán ze supernatantu kultury buněk, které byly transformovány expresním vektorem obsahujícím gen kodující fusní protein obsahující extracelulární region lidského Fas antigenu a extracelulární region myšího receptoru pro interleukin 3, jak popisuje itoh (výše).

Cytotoxicita proteinů předkládaného vynálezu může být stanovena například kultivováním buněk exprimujících Fas (například lidských lymfocytů buněčné linie HPB-ALL (Morikawa, S. et al., (1978), Int. J. Cancer, 21, 166 - 170) a Jurkat (American Type Culture č. TIB - 152) v mediu, do kterého byl nebo bude přidán testovací vzorek, a určením stupně přežití MTT zkouškou (Green, L. M., et al., (1984) J. Immunological Methods, 70, 257 - 268).

Za použití DNA předkládaného vynálezu může být konstruována chimerická myší protilátka, kde je konstantní region nahrazen konstantním regionem lidského imunoglobulinu (Morrison, S.L., et al., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851 - 6855).

Podobně je možné konstruovat Fv frakci složenou v podstatě pouze z variabilních regionů H a L řetězců, kde touto je jednotlivý řetězec Fv (scFv) (Huston, J.S. et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5879 a dále), kde jsou H a L řetězec spojeny flexibilním peptidem.

Tak, v souladu s předkládaným vynálezem, může být produkována protilátka proti Fas, která má redukovanou imunogenicitu u lidí, konstrukcí humanizované protilátky obsahující konstantní region lidské protilátky s CDR myší protilátky proti lidskému Fas (Jones, P.T. et al., (1986) Nature, 321, 522 - 525).

Předkládaný vynález také poskytuje metodu a terapeutické kompozice pro léčbu příznaků uvedených výše. Takové kompozice typicky obsahují terapeuticky efektivní množství proteinu předkládaného vynálezu ve směsi s farmaceuticky akceptovatelným nosičem. Kompozice může být podána jakýmkoliv vhodným způsobem, jako je parenterální, intravenosní, subkutánní, nebo lokální podání. Zejména tam, kde jsou léčeny lokální příznaky, je preferováno co nejbližší podání proteinu do tohoto místa. Například, vážná revmatická bolest může být pocíťována na velkých kloubech, a protein může být podán v takovém místě. Systémově podaný protein tohoto vynálezu je výhodné podat ve formě apyrogeního, terapeuticky, zejména parenterálně, akceptovatelného vodného roztoku. Příprava takového farmaceuticky akceptovatelného proteinového roztoku s ohledem na aspekty jako je pH, izotonicita, stabilita a podobně, je odborníkům dobře známa. Navíc, kompozice předkládaného vynálezu mohou zahrnovat další přísady jak je uznáno za vhodné, jako jsou retardanty buněčného růstu nebo jiné medikamenty.

Dávkovací režim pro různé příznaky léčené proteiny předkládaného vynálezu bude odborníkům jasný, s ohledem na různé faktory, jako je celkový stav, tělesná hmotnost, pohlaví a dieta pacienta, závažnost jakýchkoliv příznaků, čas, požadavek opakované léčby, stejně jako jiné vhodné klinické faktory. Všeobecně by denní dávka měla být v rozsahu 1 - 1000 μg proteinu na kilogram tělesné hmotnosti.

Vynález bude nyní vysvětlen detailněji s odkazem na následující Příklady, které jsou ilustrativní, nikoliv omezující, pro předkládaný vynález. Jakékoliv metody, přípravy roztoků a podobně, které nejsou specificky definovány, mohou být nalezeny v "Molecular Cloning - A Laboratory Handbook" (výše). Všechny roztoky jsou vodné a jsou vyrobeny ve sterilní, deionizované vodě, pokud není jinak specifikováno.

Příklad 1

Klonování DNA kodující variabilní region myší monoklonální protilátky CH11 proti lidskému Fas antigenu

(1-1) Příprava poly(A)⁺ RNA

Celková RNA byla připravena z CH11 produkujících hybridomů (získaných od Yonehara, výše) v souladu s metodou popsanou Chirgwinem a spolupracovníky (viz Chirgwin, J.M., et al., (1979) Biochemistry 18, 5294). Specificky byl CH11 produkující hybridom (viz Yonehara, S. et al., (1994) International Immunology 6, 1849 - 1856) kultivován v ASF104 mediu (Ajinomoto) obsahujícím 10% (objem/objem) fetální hovězí sérum (Gibco). Přibližně 6.7×10^6 buněk bylo získáno centrifugací a supernatant byl odložen. Výsledné pelety buněk pak byly okamžitě smíchány s 60 ml 4M roztoku guanidin thiokyanátu (Fluka). Buňky ve vzniklé suspensi byly následně lysovány aspirací buněčné suspense injekční stříkačkou vybavenou jehlou číslo 21 tři krát. Takto získaný buněčný lysát byl navrstven 3 ml 5.7 M chloridu cesia/ 0.1 M roztok EDTA (pH 7.5) v ultracentrifugační tubě (13PA:Hitachi Koki) a tuba pak byla odstředěna na Hitachi RPS-40T Rotor (13PA

tuba, 150000 x g při 20 °C po 18 hodin) pro precipitaci RNA. Precipitovaná RNA byla rozpuštěna ve vodě, extrahována pomocí chloroform/1-butanol (4 : 1, objem/objem) a potom reprecipitována 100% etanolem.

Poly(A)⁺ RNA byla pak purifikována z celkové, výsledné RNA připravené výše, běžnými metodami (Maniatis, T. et al., (1988) "Molecular cloning: A Laboratory Manual", (2.edice), Cold Spring Harbor Lab., 7.26 - 7.28). Přesněji, polyesterová kolona pro jedno použití (průměr 0.7 cm) byla naplněna 100 mg oligo dT celulosy (Pharmacia, Typ 7). Kolona byla ekvilibrována zaváděcím pufrem, obsahujícím 20 mM tris- chlorovodíkové kyseliny (pH 7.6), 0.5 M chloridu sodného, 1 mM ethylendiamin tetraacetátu (EDTA) a 0.1% (hmotnost/ objem) dodecylsulfátu sodného (SDS). Celková RNA (přibližně 1.2 mg) pak byla rozpuštěna v celkovém objemu 400 µl vody zahřátím na 65 °C po 5 minut, a pak bylo do roztoku přidáno 400 µl zaváděcího pufru (vyrobeného ve dvakrát vyšší koncentraci). Výsledná směs byla ochlazená na pokojovou teplotu a pak nalita do kolony. Frakce, která prošla kolonou byla odebrána, zahřáta na 65 °C po dalších 5 minut, a pak nalita zpět do kolony.

Kolona byla poté znovu promyta 10 ml zaváděcího pufru, a pak znovu promyta 5 ml zaváděcího pufru obsahujícího 0.1 M chlorid sodný pro odstranění neadsorbovaných látek a také nespecifických adsorbovaných látek. Následně bylo do kolony nalito 5 ml elučního pufru (10 mM tris-chlorovodíkové kyseliny (pH 7.5), 1 mM EDTA a 0.05% (hmotnost/objem) SDS), aby se vyluhoval adsorbent. Výsledný eluát byl odebrán ve frakcích o 200 µl. Třetí a čtvrtá 200 µl eluční frakce (celkem 400 µl) byly zkombinovány a smíchány s 40 µl 3 M octanu sodného (pH 4.0) a 1 ml ethanolu. Výsledná směs byla uskladněna při - 20 °C přes noc. Další den byla směs odstředěna na centrifuse (10000 x g, 4 °C po 10 minut) pro získání pelet. Tyto pelety byly užity jako poly(A)⁺RNA vzorky a byly uskladněny při -80 °C až do doby použití.

(1 - 2) Klonování DNA kodující variabilní region

cDNA fragmenty pro variabilní regiony H řetězce a L řetězce myšího anti-Fas antigenu (CH11) byla klonována RT-PCR, která kombinuje reversní transkripci (užitím reversní transkriptázy - RT) s polymerasovou řetězovou reakcí (PCR). Kombinace těchto technik umožňuje specifickou amplifikaci požadované sekvence z poly(A)⁺RNA vzorku odvozeného od CH11 prodikujících hybridomů připravených v (1 - 1).

Dva sety primerů pro RT-PCR reakci byly vybrány z Ig-Primer Set (Novagen). MuIgV_H5⁻-B a MuIgMV_H3⁻-1 byly použity pro amplifikaci regionu H řetězce, zatímco MuIgkV_L5⁻ a MuIgMV_L3⁻-1 byly použity pro amplifikaci regionu L řetězce. RT-PCR reakce byly provedeny za použití jak setu primerů pro H řetězec, tak setu primerů pro L řetězec.

a) Reakce s reversní transkriptasou

Reakční roztok reversní transkriptázy (44 μ l) byla provedena následovně. 10 mM tris-kyseliny chlorovodíkové (pH 8.3), 50 mM chloridu draselného, 0.1 mM dATP, 0.1 mM dGTP, 0.1 mM dCTP, 0.1 mM dTTP, 1.5 mM chloridu hořečnatého, 2.5 pmol primeru 3⁻-konce H řetězce nebo L řetězce, 50 ng poly(A)⁺RNA připravené v (1.1) a 20 jednotek reversní transkriptázy (BIOCHEMICAL KOGYO CO., LTD) odvozené od Moloney viru myší leukemie (MMLV) bylo smícháno a výsledná směs byla inkubována při 42 °C po jednu hodinu.

b) Amplifikace pomocí PCR

Reakční roztok reversní transkriptázy připravený v a) byl smíchán s 25 pmol primeru 5⁻-konce H řetězce nebo L řetězce, podle potřeby, s 5 jednotkami Taq DNA polymerasy (ampliTag DNA polymerasa získaná od Perkin Elmer, Japan) do konečného objemu 100 μ l reakčního pufru dodaného s kitem (pufr a roztok pro enzymy je dodán s kitem, není-li jinak uvedeno). Kompletní výsledná reakční směs byla zahřáta na 94 °C po 2 minuty, a pak podrobena tepelnému cyklu 94 °C po jednu minutu, 50 °C po jednu minutu a 72

°C po 2 minuty. Tento cyklus se opakoval 30 krát. Roztok pak byl udržován při 72 °C po dalších 10 minut. Amplifikační genový PCR systém 9600 (Perkin Elmer, Japan) byl použit ke kontrole reakční teploty ve všech PCR reakcích.

c) Zkouška PCR produktu

Část PCR reakční směsy připravené v b) byla analyzována gelovou elektroforesou na 1.5% (hmotnost/objem) agarosovém gelu (FMC Bioproducts). Produkt PCR reakcí každého H a L řetězce byl získán jako proužek okolo 430 bp. Velikost proužku byla hodnocena srovnáním s markery molekulární hmotnosti, které byly také podrobeny elektroforese na stejném gelu.

d) Klonování PCR produktu

Každý PCR produkt získaný v b) byl ligován do jednotlivých plasmidových vektorů za užití originálního TA klonujícího kitu (Invitrogen). Přesněji, 50 ng pCRII vektoru a čtyři jednotky T4 DNA ligasy (oboje obsaženo v kitu) byly přidány do pufru ligasové reakce (6 mM tris-chlorovodíková kyselina (pH 7.5), 6 mM chlorid hořečnatý, 5 mM chlorid sodný, 7 mM β- merkaptoethanol, 0.1 mM ATP, 2 mM dithiothreitol (DDT), 0.1 mM spermidin a 0.1 mg/kg hovězí sérový albumin). Pufir ligasové reakce také obsahoval část PCR reakční směsy, která byla vybrána tak, aby obsahovala přibližně 10 ng požadovaného PCR produktu, jak bylo určeno gelovou elektroforesou v c) výše. Výsledná směs byla inkubována při 14 °C po 15 hodin.

Potom byly 2 μl ligasové reakční směsy smíseny s 50 μl E.coli kmenu TOP10F⁺ (obsaženém v kitu), který byl před tím udělán kompetentním přidáním 2 μl 0.5 M β- merkaptoethanolu. Výsledná transformační směs byla umístěna na ledu po 30 minut, zahřáta při 42 °C po 30 sekund a znovu umístěna na ledu po dobu dalších dvou minut. Po této době bylo do směsi přidáno 500 μl SOC media (2% (hmotnost/ objem) trypton, 0.5% (hmotnost/ objem) extrakt kvasinek, 0.05% (hmotnost/ objem) chlorid sodný, 2.5 mM chlorid

draselný, 1 mM chlorid hořečnatý, 20 mM glukosa) a výsledná směs byla kultivována při rotačním míchání po 1 hodinu (37 °C, 110 rpm). Výsledná kultura byla pak umístěna na pláty L-bujonového agarového media (1% (hmotnost/ objem) trypton, 0.5% (hmotnost/ objem) extrakt kvasinek, 0.5% (hmotnost/ objem) chlorid sodný, 0.1% (hmotnost/ objem) glukosa, 0.6% (hmotnost/ objem) Bacto Agar (Difco)) obsahující 100 µg/ml ampicilinu a pláty byly kultivovány při 37 °C přes noc bez míchání.

Ampicilin resistantní kolonie generované tímto postupem byly selektovány a seškrabány platinovými hroty. Buňky z vybraných kolonií byly separátně kultivovány v 5 ml L-bujonového media obsahujícího 100 µg/ml ampicilinu při 37 °C přes noc. Kultury byly pak centrifugovány při pro peletování buněk a byla připravena plasmidová DNA z buněk za použití metody alkalické lýsy (Maniatis, T. et al., výše). Byl získán plasmid pro H a L sety primerů, a tyto byly označeny pVH4 (plasmid obsahující fragment amplifikovaný užitím setu primerů H řetězce) a pVL8 (plasmid obsahující fragment amplifikovaný užitím setu primerů L řetězce).

Příklad 2

Určení aminokyselinové sekvence a nukleotidové sekvence variabilních regionů CH11

(2 - 1) Určení N terminální aminokyselinové sekvence variabilních regionů H řetězce a L řetězce CH11

a) Příprava CH11

CH11 produkující hybridom (viz příklad 1) byl kultivován do počtu buněk 2×10^8 v ASF 104 mediu (Ajinomoto) obsahujícím 10% (objem/objem) hovězí sérum (Gibco), a tyto připravené buňky pak byly kultivovány v 50 ml sérum prostého ASF 104 media při 37 °C po 5 dní. Po této době byla kultura centrifugována (Tommy Seiko č.4 rotor, 15000 x g, 4 °C po 15 minut) a supernatant byl odebrán. CH11 byl získán ze

supernatantu kultury za použití E-Z-Sep protilátkového purifikačního kitu (Pharmacia Biotech).

b) Část purifikovaného CH11, korespondující 100 μ l supernatantu připraveném v a), byla přidána k 10 μ l 100 mM tris kyselina chlorovodíková pufry (pH 6.8) obsahujícího 10% (objem/objem) β -merkapt ethanol a 4% (hmotnost/objem) SDS. Výsledná směs byla denaturována zahřátím na 95 °C po 5 minut. Denaturovaný vzorek pak byl podroben elektroforese na 12% (hmotnost/objem) polyakrylamidovém gelu. Po elektroforese byl gel ponořen do transferového pufry (25 mM tris kyseliny borité (pH 9.5), 10% methanol (objem/objem) a míchán při pokojové teplotě po 15 minut. Proteinové proužky na gelu byly potom transferovány do polivinylyden difluoridové (PVDF) membrány (Nippon Millipore Ltd.) za použití přístroje pro "semidrive blotting" (Iwaki Glass Co., Ltd) při konstantním proudu 0.2 A při 4 °C po 1 hodinu. Po této době byla PVDF membrána barvena 0.% (hmotnost/objem) Coomassie Brilliant Blue roztokem a odbarvena 100% methanolem. Byla pozorovány pouze dvě hlavní proteinová znamení, která korespondovala H řetězci a L řetězci. Proteinová znamení byla excidována a gel, který je obsahoval, byl sušen při pokojové teplotě.

c) Aminokyselinová sekvence proteinů transferovaných do PVDF membrány v b) byla analyzována za použití sekvenceru proteinů plynné fáze (PPSQ-10, Shimadzu Corporation) za použití automatické Edmanovi metody (viz Edman, P. et al., (1967), Eur. J. Biochem. 1,80 a dále). N-terminální aminokyselinová sekvence variabilního regionu H řetězce CH11 a N-terminální aminokyselinová sekvence L řetězce tak byly určeny a jsou ukázány v SEQ ID NO. 13 a 14 seznamu sekvencí, v příslušném pořadí.

(2-2) Určení DNA nukleotidové sekvence

Celková nukleotidová sekvence cDNA kodující variabilní

regiony H a L řetězce CH11 byla určena sekvencováním insertů v plasmidech pVH4 a pVL8 v příslušném pořadí (připravených v Příkladu 1).

pCRII vektor má SP6 promotorovou sekvenci a T7 promotorovou sekvenci a tyto obklopují insertovanou cDNA a tak umožňují určení sekvence insertů pVH4 a pVL8 pomocí oligonukleotidových primerů (Perkin Elmer, Japan) korespondujících k sekvencím. Vzorke pro sekvenční analýzu byly připraveny za pomoci těchto primerů a barvený primer cyklických-sekvenčních kitů (Perkin Elmer, Japan). Plasmidová DNA z plasmidů pVH4 a pVL8 byla použita jako templát. Sekvence každého cDNA insertu byla určena za použití DNA sekvenceru (Model 373, Perkin Elmer, Japan). cDNA nukleotidová sekvence variabilního regionu H řetězce je ukázána jako SEQ ID NO. 15 a cDNA nukleotidová sekvence variabilního regionu L řetězce je ukázána jako SEQ ID NO. 16.

N-terminální aminokyselinová sekvence H řetězce CH11, representovaná aminokyselinami č. 1 až 15 SEQ ID NO. 13 v seznamu sekvencí koresponduje kompletně s aminokyselinovou sekvencí kodovanou nukleotidy č. 32 až 76 SEQ ID NO. 15. Proto bylo odvozeno, že plasmid pVH4 obsahuje DNA kodující variabilní region H řetězce CH11.

N-terminální aminokyselinová sekvence L řetězce CH11, representovaná aminokyselinami č. 1 až 21 SEQ ID NO. 14 v seznamu sekvencí koresponduje kompletně s aminokyselinovou sekvencí kodovanou nukleotidy č. 29 až 91 SEQ ID NO. 16. Proto bylo odvozeno, že plasmid pVL8 obsahuje DNA kodující variabilní region L řetězce CH11.

Příklad 3

Klonování DNA kodující kompletní H řetězec, L řetězec a J řetězec CH11

(3-1) Příprava cDNA knihovny

cDNA knihovna byla připravena metodou podle Okayama-Berga (Okayama, H. et al., (1987), *Methods in Enzymology* 154, 3 - 28). Přesněji, 5 μg poly(A)⁺RNA jak bylo připraveno v příkladu 1-1 (a) z CH11 produkujících hybridomů bylo přidáno ke 30 μl reakční směsi (50 mM tris kyseliny chlorovodíkové (pH 8.3), 6 mM chloridu hořečnatého, 40 mM chloridu draselného, 2 mM dATP, 2 mM dGTP, 2 mM dCTP, 2 mM dTTP, 2 μg vektorového primeru (3'-oligo(dT)-vázaný.pcDV-1) (Pharmacia) obsahující 75 jednotek reversní transkriptázy (Seikagaku Kogyo, Co. Ltd.) odvozené od viru ptačí meylblastosy (AMV). Výsledná směs byla inkubována při 37 °C po 30 minut.

Po této době byl do reakční směsi přidán ekvivalentní objem fenol - chloroformu (1 :1, (objem/objem)) a směs byla důkladně promíchána. Výsledná směs byla centrifugována (10000 x g, pokojová teplota, 5 minut) a byla odebrána vodná vrstva (tento postup extrakce fenol - chloroformem a odebrání vodného supernatantu je zde dále označována jako "fenol - chloroformová extrakce"). Do vzniklé vodné vrstvy bylo přidáno 35 μl 4 M octanu amonného a 140 μl ethanolu, a výsledná směs byla ochlazená na -70 °C po 15 minut, a pak centrifugována (1000 x g, 4 °C, 15 minut). Pelety byly promyty 75% (objem/objem) roztokem ethanolu a pak sušeny za redukováného tlaku.

Sušený precipitát byla pak rozpuštěn ve 13 μl destilované vody a bylo přidáno 5.6 μl reakční směsi terminální transferasy (140 mM kakodylát sodný, 30 mM tris - kyseliny chlorovodíkové, (pH 6.8), 1 mM chlorid kobaltu, 0.5 mM Dtt, 0.3 μg polyadenylové kyseliny (polyA, Pharmacia), 0.2 mM dCTP) a výsledná reakční směs byla inkubována při 37 °C po 5 minut. Potom byla přidána terminální deoxynukleotidyl transferasa (21 jednotek, Pharmacia) v souladu s instrukcemi dodavatele, a reakci bylo umožněno probíhat 5 minut. Reakční směs pak byla podrobena fenol - chloroformové extrakci.

Potom bylo do odebrané vodné vrstvy přidáno 20 μ l octanu amoného a 80 μ l ethanolu a směs byla ochlazena na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ po 15 minut, pak centrifugována (10000 x g při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ po 15 minut). Pelety byly promyty 75% (objem/objem) roztokem ethanolu a sušeny za redukováného tlaku.

DNA precipitát získaný tímto způsobem byl rozpuštěn ve 30 μ l reakční směsi (10 mM tris - kyseliny chlorovodíkové (pH 7.5), 60 mM chloridu sodného, 7 mM chloridu hořečnatého) a k výslednému roztoku bylo přidáno 30 jednotek restričního enzymu HindIII. Obecně, tam, kde je použit restriční enzym, ale není specifikován pufr, pak je použitým pufr pufr dodaný s enzymem. V případě, že je DNA trávena dvěma enzymy, je trávení provedeno dvěma enzymy sekvenčně. Po prvním trávení je DNA precipitována, resuspendována a trávena druhým enzymem. Precipitační techniky a techniky resuspendace jsou v oboru dobře známé (Maniatis et al., výše). Všechny restriční enzymy a pufr v předložených příkladech byly dodány Takara Schuzo.

DNA byla trávena při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ přes noc ve trávicím roztoku. Následně byla reakční směs podrobena fenol - chloroformové extrakci. Potom bylo do odebrané vodné vrstvy přidáno 35 μ l 4 M octanu amoného a 140 μ l ethanolu a směs byla ochlazena na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ po 15 minut. Pak byla směs centrifugována (10000 x g při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ po 15 minut) pro precipitaci DNA a vzniklé pelety byly promyty 75% (objem/objem) roztokem ethanolu a sušeny za redukováného tlaku. Takto připravená precipitovaná DNA byla použita jako cDNA vzorek v následujících procedurách.

Paralelně byla trávena plasmidová DNA vektoru pcDL-SR α 296 (Takebe, Y. et al., (1989), "JIKKEN IGAKU (Experimental medicine)" 7, str. 95 - 99) restričním enzymem PstI. Produkt trávení byl ošetřen dGTP terminální deoxynukleotidyl transferasou (Pharmacia), aby byl přidán oligo dG na 3' terminální konec, jak je popsáno dále:

pcDL-SR α 296 DNA (100 μ g, v 50 μ l) byla přidána do 10 μ l 10x pufru terminální deoxynukleotidyl transferasy (1x pufr: 1.4 M kakodylát sodný, 0.3 M Tris-HCl, (pH 7.6), 10 μ l DTT (1 mM), 20 μ l 0.1 mM 3 H-dGTP (Dupont) a 10 μ l terminální transferasa (210 IU, Pharmacia)). Směs byla inkubována po 40 minut při 37 °C a pak smíšena se stejným objemem fenolu saturevaného TE pufrém. Po ustátí byla odebrána vodná vrstva a byla podrobena fenol - chloroformové extrakci. Poté, co proběhla jak fenolová, tak fenol - chloroformová extrakce byla DNA precipitována za použití ethanolu a resuspendována v 50 μ l TE pufru.

Celková precipitovaná DNA byla trávena restričním enzymem HindIII a produkty trávení byly separovány gelovou elektroforesou na 1.8% (hmotnost/objem) agarosovém gelu. Z gelu byl excidován proužek 800 bp, a byl extrahován z gelu za použití GENE CLEAN kitu (Funakoshi) podle instrukcí výrobce. Výsledná DNA byla rozpuštěna v 100 μ l TE pufru a bylo přidáno 100 μ l ethanolu. Konečná koncentrace DNA byla 0.09 μ g/ μ l.

Výsledný produkt poskytl linker-DNA, ve které byl oligo (dG) připojen na SR α promotor (Obr.1).

Precipitovaný, sušený cDNA vzorek, připravený výše, byl rozpuštěn ve 10 μ l TE pufru (10 mM tris - kyseliny chlorovodíkové (pH 7.5), 1 mM EDTA). Část vzniklého roztoku (1 μ l) byla přidána do reakčního pufru (10 mM tris - kyseliny chlorovodíkové (pH 7.5), 1 mM EDTA, 100 mM chloridu sodného) obsahujícího 0.08 pmol linker-DNA připravené výše. Výsledná směs byla zahřáta na 65 °C po 5 minut a pak inkubována při 42 °C po 30 minut. Potom bylo přičteno do reakční směsi 10 μ l 10x ligasového pufru (10 mM ATP, 660 mM tris - kyseliny chlorovodíkové (pH 7.5), 66 mM chloridu hořečnatého, 100 mM DTT), 76 μ l destilované vody a 1 μ l 10 mM β -nikotinamid adenin dinukleotidu (NAD, Boehringer

Mannheim) a výsledná směs byla ochlazená na ledu po 10 minut. E.coli DNA ligasa (8.4 μ g ekvivalent, Pharmacia) pak byla přidána do ochlazené reakční směsi, a tato byla potom inkubována při 12 °C přes noc.

Po této inkubaci bylo do reakční směsi přidáno 2 μ l roztoku nukleotidů (2 mM dATP, 2 mM dCTP, 2 mM dGTP, 2 mM dTTP), 0.5 μ l 10 mM NAD, 42 μ g ekvivalentu E.coli DNA ligasy (Pharmacia), 4.1 jednotek DNA polymerasy I (Pharmacia), a 5.5 jednotek ribonukleasy H (Pharmacia). Výsledná směs pak byla inkubována při 12 °C po jednu hodinu a pak při 22 °C po další hodinu. cDNA knihovna připravená tímto způsobem byla uskladněna při -20 °C až do okamžiku potřeby.

(3 - 2) Klonování prostřednictvím PCR

a) Příprava primeru

V případě H řetězce byla aminokyselinová sekvence variabilního regionu H řetězce CH11, jak je určena v Příkladu 2, srovnána s databází aminokyselinových sekvencí protilátek připravenou Kabatem et al., (viz Kabat, E.A., et al., (1991) v "Sequences of Proteins of Immunological Interest Vol, II", U.S. Department of Health and Human Services). Bylo stanoveno, že H řetězec (μ řetězec) CH11 byl podtřídou třídy 2A. Proto byl oligonukleotidový primer syntetizován tak, aby mohl hybridizovat s částí 5'-non. translatovaného regionu DNA kodující myší H řetězec, podtřídou 2a. Vybraný oligonukleotidový primer měl sekvenci: 5'-CTAAGGGAATTCGCTCTC CTCAGACACT GAA-3' (H5-1; SEQ ID NO17 seznamu sekvencí).

Oligonukleotidový primer byl také projektován tak, aby mohl hybridizovat s částí 3'-non-translatovaného regionu CH11 H řetězce. Projektování oligonukleotidu bylo založeno na nukleotidové sekvenci DNA kodující M řetězec konstantního regionu myšího imunoglobulinu popsané Goldbergem et al. (viz. Goldberg, I.G. et al., (1981), Gene 15, 33 - 42) a

vybraná sekvence byla: 5`- TTTTACTCTA GAGACCCAAG
GCCTGCCTGGTTGA-3` (H3-1; SEQ ID NO. 18 seznamu sekvencí).

Pro L řetězec byla aminokyselinová sekvence variabilního regionu L řetězce CH11, jak je určena v Příkladu 2, srovnána s databází aminokyselinových sekvencí protilátek připravenou Kabatem a spolupracovníky, výše. Bylo stanoveno, že L řetězec CH11 byl podtřídou k2. Proto byl oligonukleotidový primer projektován tak, aby mohl hybridizovat s částí 5`-terminálního, non-translatovaného regionu DNA kodující myší L řetězec, podtřídou k2. Vybraný oligonukleotidový primer měl sekvenci: 5`- AAATAGGAAT TCCAGTCTCC TCAGGCTGTC TCC-3` (L5-1; SEQ ID NO.19 seznamu sekvencí).

Oligonukleotidový primer byl také projektován tak, aby mohl hybridizovat s částí 3` non-translatovaného regionu. Projektování oligonukleotidu bylo založeno na nukleotidové sekvenci DNA kodující k řetězec konstantního regionu registrovaného pod registračním jménem MUSIGB1L1 (přírůstek č. D14630). Sekvence byla: 5`- ATGATCTCTA GAGTGGTGGCATCTCAGGAC CT-3` (L3-1; SEQ ID NO. 20 seznamu sekvencí).

V případě J řetězce není žádný variabilní region a jak sekvence DNA kodující J řetězec, tak aminokyselinová sekvence J řetězce jsou známy (Cann, G.M. et al., (1982), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6656 - 6660). S ohledem na tuto znalost byly oligonukleotidové primery syntetizovány tak, aby mohly hybridizovat část 5` a 3` non-translatovaných regionů DNA kodující pro J řetězec. Tyto oligonukleotidy měly sekvence: 5`-TTGCGGAATT CCTCACCTGT CCTGGGGTTA TT-3` (J5-1; SEQ ID NO.21 seznamu sekvencí) a 5`-ATTGCCTCTA GAGCCTCTAA GGACCACGAC CT-3` (J3-1; SEQ ID NO.22 seznamu sekvencí).

Tyto oligonukleotidové primery byly syntetizovány za použití automatického DNA syntetizera 380 B (Perkin Elmer, Japan) fosfoamiditovou metodou (viz Mattrucci, M.D. a Caruthers, M.H.

(1981), J. Am. Chem. Soc., 103, 3185 - 3191). Po dokončení syntesy byl každý primer odštěpen z nosiče a zbaven chránících skupin, a pak sušen za zmrazeného stavu. Výsledný produkt byl rozpuštěn v destilované vodě a uskladněn při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do okamžiku potřeby.

b) Amplifikace cílového genu PCR

PCR reakční roztok (10 mM tris - kyseliny chlorovodíkové (pH 8.3), 50 mM chloridu draselného, 1.5 mM chloridu hořečnatého, 2.5 mM dATP, 2.5 mM dCTP, 2.5 mM dGTP, 2.5 mM dTTP) byl připraven a bylo přidáno 0.1 μl cDNA knihovny popsané v příkladu 4-1, 1 jednotka Taq DNA polymerasy (Perkin Elmer, Japan) a 15 pmol oligonukleotidového primeru (připraveného v 3 - 2) ke 100 μl PCR reakčního roztoku a ten byl zahříván při $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ po 2 minuty. Výsledná směs pak byla podrobena tepelným cyklům $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ po 1 minutu, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ po jednu minutu a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ po 2 minuty. Tento cyklus se opakoval 30 krát. Po posledním cyklu byl roztok ponechán při $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dalších 10 minut.

Kombinace primerů, které byly použity v příslušných reakcích jsou následující:

- H5-1 a H3-1 (pro H řetězec)
- L5-1 a L3-1 (pro L řetězec), a
- J5-1 a J3-1 (pro J řetězec).

c) Zkouška PCR produktů

Po provedení PCR reakce v b) byla část reakční směsi analyzována gelovou elektroforesou na 0.8% (hmotnost/objem) agarosovém gelu v případě H řetězce. Pro L a J řetězce byl použit 1.5% (hmotnost/objem) agarosový gel (agarosa byla získána od FMC Bioproducts). Produktem PCR reakce byl proužek přibližně 1900 bp pro H řetězec, 800 bp pro L řetězec a 650 bp pro J řetězec. Velikost proužků byla stanovena srovnáním s molekulární hmotností markerů, které proběhly stejným gelem.

d) Klonování PCR produktů

Každý PCR produkt získaný v b) byl ligován do plasmidového

vektoru za užití originálního TA klonujícího kitu (Invitrogen). Přesněji, 60 ng pCRII vektoru (obsaženého v kitu) a čtyři jednotky T4 DNA ligasy byly přidány do ligasového reakčního pufru (6 mM tris-chlorovodíková kyselina (pH 7.5), 6 mM chlorid hořečnatý, 5 mM chlorid sodný, 7 mM β -merkaptoethanol, 0.1 mM ATP, 2 mM DDT, 1 mM spermidin a 0.1 mg/kg hovězí sérový albumin) obsahujícího část PCR reakční směsi. Objem PCR reakční směsi byl vybrán tak, aby obsahoval přibližně 10 ng požadovaného PCR produktu, jak bylo určeno gelovou elektroforesou. Výsledná směs byla inkubována při 14 °C po 15 hodin.

Potom byla část ligasové reakční směsi (2 μ l) smísená s 50 μ l E.coli buněk kmenu TOP10F⁻ (obsaženém v kitu), který byl před tím udělán kompetentním přidáním 2 μ l 0.5 M β -merkaptoethanolu. Výsledná transformační směs byla umístěna na ledu po 30 minut, zahřáta při 42 °C po 30 sekund a znovu umístěna na ledu po dobu dalších dvou minut. SOC medium (500 μ l, jak je popsáno výše) bylo přidáno do této směsi a výsledná směs byla kultivována při rotačním míchání po 1 hodinu (37 °C, 110 rpm). Kultivační tekutina byla pak umístěna na pláty L-bujonového agarového media obsahující 100 μ g/ml ampicilinu a pláty byly kultivovány při 37 °C přes noc. Ampicilin resistantní kolonie které se objevily byly seškrabány platinovými hroty a kultivovány v 5 ml L-bujonového media obsahujícího 100 μ g/ml ampicilinu při 37 °C přes noc. Kultury byly pak centrifugovány při pro precipitaci buněk, které byly použity k přípravě plasmidové DNA za použití metody alkalické lýsy.

Tři ze vzniklých plasmidů byly označeny pCR3-H123 (plasmid obsahující cDNA kodující H řetězec), pCR3-L103 (plasmid obsahující cDNA kodující L řetězec) a pCR3-J1123 (plasmid obsahující cDNA kodující J řetězec). Kompetentní buňky E.coli kmene DH5 α (Gibco) byly transformovány jedním z plasmidů pCR3-H123, pCR3-L103 nebo pCR3-J1123 a výsledné transformanty byly deponovány v Research Institute of Life Science and Technology of Agency Industrial Science and Tehchnology 28.února 1996 pod depositními čísly FERM BP-5427, FERM BP-5428, FERM

BP-5429 v příslušném pořadí. DNA kodující H, L a J řetězce CH11 je možné z těchto kmenů snadno připravit za použití známých metod.

Příklad 4

Určení celkové nukleotidové sekvence cDNA kodující CH11 H řetězec, L řetězec a J řetězec

(4 - 1) Určení nukleotidové sekvence DNA

M řetězec myšního imunoglobulinu se skládá z N-terminálního variabilního regionu obsahujícího asi 110 residuí a konstantního regionu obsahujícího asi 470 residuí připojeného na variabilní region. K řetězec myšního imunoglobulinu se skládá z N-terminálního variabilního regionu obsahujícího asi 110 residuí a konstantního regionu obsahujícího asi 107 residuí připojeného na variabilní region. Bylo předpokládáno, že kompletní nukleotidová sekvence cDNA kodující CH11 H řetězec a L řetězec by se měla skládat z nukleotidových sekvencí kodujících známé konstantní regiony řetězců, jak je uvedeno v příkladu 2 (Kabat, E.A. et al., (1991), v "Sequences of Proteins of Immunological Interest Vol.II" U.S. Department of Health and Human Services).

O nukleotidová sekvence kodující J řetězec CH11 bylo předpokládáno, že je stejná jako známé sekvence J řetězce.

Na podkladě těchto předpokládaných nukleotidových sekvencí byly syntetizovány oligonukleotidové primery délky 20 nukleotidů korespondující sekvencím H, L a J řetězců, separované kodujícími intervaly 60 až 200 bp. Tyto primery byly použity pro sekvenční analýzu.

Sekvence syntetizovaných oligonukleotidových primerů byly následující:

Pro H řetězec:

- 5'-TGGGGCCTCA GTGAAGATAT -3' (SHF-2; SEQ ID NO. 23)
5'-CAATGGTGGT ACTGGCTACA -3' (SHF-3; SEQ ID NO. 24)
5'-TGACATCTGA GGA CTCTGCA -3' (SHF-4; SEQ ID NO. 25)
5'-TCCTCAGAGA GTCAGTCCTT -3' (SHF-6; SEQ ID NO. 26)
5'-TCCTTCACCT GGA ACTACCA -3' (SHF-7; SEQ ID NO. 27)
5'-TCCCAAGAGC ATCCTTGAAG -3' (SHF-8; SEQ ID NO. 28)
5'-AGATCTGCAT GTGCCATTC -3' (SHF-9; SEQ ID NO. 29)
5'-TCTAAACTCA TCTGCGAGGC -3' (SHF-10; SEQ ID NO. 30)
5'-GGTGACCATC GAGA ACAAAG -3' (SHF-11; SEQ ID NO. 31)
5'-AGGGGTCTCA CCTTCTTGAA -3' (SHF-12; SEQ ID NO. 32)
5'-TCCTTTGCCG ACATCTTCCT -3' (SHF-13; SEQ ID NO. 33)
5'-GTGTGTACTG TGA CTACAG -3' (SHF-15; SEQ ID NO. 34)
5'-AACTGAACCT GAGGGAGTCA -3' (SHF-16; SEQ ID NO. 35)
5'-AACTCTTGCC CCAAGAGAAG -3' (SHF-17; SEQ ID NO. 36)
5'-ATCCTGACTG TGACAGAGGA -3' (SHF-18; SEQ ID NO. 37)
5'-ACAAGTCCAC TGGTAAACCC -3' (SHF-19; SEQ ID NO. 38)
5'-AGGATATCTT CACTGAGGCC -3' (SHR-1; SEQ ID NO. 39)
5'-ATCCACTCAA GGCTCTTTCC -3' (SHR-2; SEQ ID NO. 40)
5'-ACTGCAGAGT CCTCAGATGT -3' (SHR-3; SEQ ID NO. 41)
5'-AGACGGTGAC TGAGGTTCTT -3' (SHR-4; SEQ ID NO. 42)
5'-CAGGTGAAGG AAATGGTGCT -3' (SHR-5; SEQ ID NO. 43)
5'-ATGCTCTTGG GAGACAGCAA -3' (SHR-6; SEQ ID NO. 44)
5'-CTCTGTTTTT GCCTCCGTAG -3' (SHR-7; SEQ ID NO. 45)
5'-TGGCCTCGCA GATGAGTTTA -3' (SHR-8; SEQ ID NO. 46)
5'-CCTTTGTTCT CGATGGTCAC -3' (SHR-9; SEQ ID NO. 47)
5'-TGTGGAGGAC ACGTTCTTCA -3' (SHR-10; SEQ ID NO. 48)
5'-ACTTTGAGAA GCCCAGGAGA -3' (SHR-12; SEQ ID NO. 49)
5'-AGATCCCTGT GAGTCACAGT -3' (SHR-13; SEQ ID NO. 50)
5'-AGCAGGTGGA TGTTTGTGCA -3' (SHR-14; SEQ ID NO. 51)
5'-TGAAGCCACT GCACACTGAT -3' (SHR-15; SEQ ID NO. 52)
5'-AGTTCCATTC CTCCTCTGTC -3' (SHR-16; SEQ ID NO. 53)
5'-TGTGTCAGAC ATGATCAGGG -3' (SHR-18; SEQ ID NO. 54)

pro L řetězec

5'-TGAAGTTGCC TGTTAGGCTG -3' (SLF-1; SEQ ID NO. 55)
5'-CTTGGAGATC AAGCCTCCAT -3' (SLF-2; SEQ ID NO. 56)
5'-GCTGAGGATC TGGGAGTTTA -3' (SLF-3; SEQ ID NO. 57)
5'-GATGCTGCAC CAACTGTATC -3' (SLF-4; SEQ ID NO. 58)
5'-CGACAAAATG GCGTCCTGAA -3' (SLF-5; SEQ ID NO. 59)
5'-ACGTTGACCA AGGACGAGTA -3' (SLF-6; SEQ ID NO. 60)
5'-ATCTGCAAGA GATGGAGGCT -3' (SLR-2; SEQ ID NO. 61)
5'-ACCCAGAAA ATCGGTTGGA -3' (SLR-3; SEQ ID NO. 62)
5'-CCGGAGGAAC ATGTGTA CTT -3' (SLR-4; SEQ ID NO. 63)
5'-TCGTTCATA C TCGTCCTTGG -3' (SLR-6; SEQ ID NO. 64)
5'-CATCTCAGGA CCTTTGTCTC -3' (SLR-7; SEQ ID NO. 65)

pro J řetězec

5'-CACCTGTCCT GGGGTTATTT -3' (SJF-1; SEQ ID NO. 66)
5'-AGACAAGATG AAGACCCACC -3' (SJF-2; SEQ ID NO. 67)
5'-AAGCGACCAT TCTTGCTGAC -3' (SJF-3; SEQ ID NO. 68)
5'-ATATCTCTGA TCCCACCTCC -3' (SJF-8; SEQ ID NO. 69)
5'-GAAATGCGAT CCTGTGGAAG -3' (SJF-5; SEQ ID NO. 70)
5'-CTATA CCACT ATGGTCCCAC -3' (SJF-6; SEQ ID NO. 71)
5'-AGAAGCAGGT GGGTCTTCAT -3' (SJR-2; SEQ ID NO. 72)
5'-TAGAGGTAAC TCGGGTACAC -3' (SJR-3; SEQ ID NO. 73)
5'-AAGTTCCTTC TCAGTGGGGA -3' (SJR-8; SEQ ID NO. 74)
5'-GGTGGCAGTA ACAACCTGAT -3' (SJR-5; SEQ ID NO. 75)
5'-CATGATACCT AAGTGGGACC -3' (SJR-6; SEQ ID NO. 76)

uváděná čísla sekvencí se vztahují k seznamu sekvencí

Každý oligonukleotidový primer byl syntetizován fosfoamiditovou metodou za použití automatického DNA syntezátoru (Model 380B: Perkin Elmer, Japan). Vzorke pro sekvenční analýzu H řetězce byly připraveny za použití DNA z plasmidu pCR3-H123. Vzorke pro sekvenční analýzu L řetězce byly připraveny za použití DNA z plasmidu pCR3-L103. Vzorke pro sekvenční analýzu J řetězce byly připraveny za použití DNA z plasmidu pCR3-J1123. PCR reakce byla provedena za použití Prism Ready Reaction Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer, Japan) následovně:

pCR3-H123 (1.5 μ g) a 4.8 pmol primeru (SHF-2) bylo smícháno do konečného objemu 16 μ l v destilované vodě. Část této pCR3-H123/primer směsi (9.5 μ l) byla smíchána s 10.5 μ l připravené směsi obsahující Taq DNA polymerasu. Všechny tyto postupy byly podle instrukcí v kitu. Výsledná směs byla umístěna v automatickém reaktoru (Catalyst: Perkin Elmer, Japan). Použitý reakční cyklus byl následující: 95 °C po 30 minut, 50 °C po 15 sekund a 60 °C po 4 minuty, opakováno 25 krát.

Po dokončení reakčního cyklu bylo 80 μ l sterilizované vody přidáno do výsledného roztoku a DNA ve výsledné směsi byla extrahována dvakrát fenol-chloroformovou metodou. Odebraná vodná vrstva byla smíšena s 15 μ l 2M octanu sodného a 300 μ l ethanolu, potom následovala centrifugace pro získání precipitátu. Precipitát byl promyt v 70% (objem/objem) roztoku ethanolu a sušen za redukovaného tlaku, a pak rozpuštěn v 3 μ l vzorkového roztoku (4 μ l 0.25 M EDTA, 100 μ l formamidu a 15 μ l sterilizované vody).

Sekvenční reakce byly provedeny a analyzovány na DNA sekvenceru (Model 373A: Perkin Elmer, Japan) pro 32 primerů H řetězce, 11 primerů L řetězce a 11 primerů J řetězce.

Data sekvencí získaná pro každý primer byla kombinována a integrována tak, aby se určila kompletní nukleotidová sekvence H, L a J řetězců CH11. cDNA nukleotidové sekvence každého plasmidového insertu jsou ukázány v SEQ ID NO. 7, 9 a 11 seznamu

sekvencí. Aminokyselinové sekvence korespondující těmto nukleotidovým sekvencím jsou ukázány SEQ ID NO. 8, 10 a 12 seznamu sekvencí v příslušném pořadí.

(4 - 2) Primární struktura H řetězce CH11

Nukleotidová sekvence varibilního regionu H řetězce, ukázaná jako nukleotidy č. 32 až 379 SEQ ID NO. 15 seznamu sekvencí, byla shledána identickou s nukleotidovou sekvencí nukleotidů č. 58 až 405 SEQ ID NO. 7.

Aminokyselinová sekvence ukázaná jako aminokyseliny č. 117 až 571 SEQ ID NO. 8 byla shledána identickou s aminokyselinovou sekvencí konstantního regionu H řetězce odvozeného od myšího IgM při srovnání s databasí aminokyselinových sekvencí protilátek (Kabat E.A. et al., výše).

Aminokyselinová sekvence ukázaná aminokyselinami č. -19 až -1 SEQ ID NO. 8 byla považována za signální sekvenci H řetězce CH11.

Nukleotidová sekvence ukázaná jako nukleotidy č. 406 až 1770 SEQ ID NO. 7 byla shledána identickou se sekvencí konstantního regionu H řetězce myšího IgM.

Vzhledem k těmto výsledkům byla stanovena celková nukleotidová sekvence spolu s celkovou aminokyselinovou sekvencí.

(4 - 3) Primární struktura L řetězce CH11

Nukleotidová sekvence varibilního regionu L řetězce, ukázaná jako nukleotidy č. 29 až 364 SEQ ID NO. 16 seznamu sekvencí, byla shledána identickou s nukleotidovou sekvencí nukleotidů č. 58 až 393 SEQ ID NO. 9.

Aminokyselinová sekvence ukázaná jako aminokyseliny č. 113 až 219 SEQ ID NO. 10 byla shledána identickou s aminokyselinovou sekvencí konstantního regionu myšího kL řetězce při srovnání

s Kabatovou databází aminokyselinových sekvencí protilátek

Aminokyselinová sekvence ukázaná aminokyselinami č. -19 až -1 SEQ ID NO. 10 byla považována za signální sekvenci pro L řetězec.

Nukleotidová sekvence ukázaná jako nukleotidy č. 394 až 714 SEQ ID NO. 9 byla shledána kompletně identickou se sekvencí konstantního regionu myšího kL řetězce.

Vzhledem k těmto výsledkům byla stanovena celková nukleotidová sekvence spolu s celkovou aminokyselinovou sekvencí.

(4 - 4) Primární struktura J řetězce CH11

Aminokyselinová sekvence ukázaná jako aminokyseliny č. 1 až 137 SEQ ID NO. 12 byla srovnána s databází aminokyselinové sekvence protilátek a byla shledána identickou s známým myším J řetězcem.

Nukleotidová sekvence ukázaná jako nukleotidy č. 67 až 477 SEQ ID NO. 11 byla shledána identickou se sekvencí známého myšího J řetězce.

Aminokyselinová sekvence ukázaná jako aminokyseliny č. -22 až -1 SEQ ID NO. 12 byla považována za signální sekvenci pro J řetězec CH11.

Vzhledem k těmto výsledkům byla stanovena celková nukleotidová sekvence spolu s celkovou aminokyselinovou sekvencí.

(4 - 5) Určení komplementaritu určujících regionů (CDR)

Byla identifikována jak poloha, tak aminokyselinová sekvence každého CDR ve variabilních regionech H řetězce a L řetězce CH11, určených jak je popsáno výše, srovnáním s Kabatovou databází aminokyselinových sekvencí protilátek (výše). Tato databáze

ukazuje, že délka aminokyselinového řetězce "framework" oblasti variabilního regionu je v podstatě konstantní u různých protilátek, za předpokladu, že je podtyp stejný a za předpokladu, že aminokyselinové sekvence mají některé společné charakteristiky. Nicméně, CDR, přítomný mezi takovými dvěma "framework" regiony, má sekvenci specifickou pro každou protilátku.

Při srovnání aminokyselinové sekvence variabilního regionu H řetězce CH11 se sekvencí myšího $\mu 2a$ podtypu bylo ukázáno, že CDR v H řetězci CH 11 je reprezentován aminokyselinami č. 31 až 35 SEQ ID NO. 8 (CDRH₁, korespondující SEQ ID NO. 1 seznamu sekvencí), 50 až 66 SEQ ID NO. 8 (CDRH₂, korespondující SEQ ID NO. 2 seznamu sekvencí), a 99 až 105 SEQ ID NO. 8 (CDRH₃, korespondující SEQ ID NO. 3 seznamu sekvencí).

Když byla aminokyselinová sekvence variabilního regionu L řetězce CH 11 srovnána se sekvencí myšího k2 podtypu bylo ukázáno, že CDR v L řetězci CH 11 je reprezentován aminokyselinami č. 24 až 39 SEQ ID NO. 10 (CDRL₁, korespondující SEQ ID NO. 4 seznamu sekvencí), 55 až 61 SEQ ID NO. 10 (CDRL₂, korespondující SEQ ID NO. 5 seznamu sekvencí) a 94 až 102 SEQ ID NO. 10 (CDRL₃, korespondující SEQ ID NO. 6 seznamu sekvencí).

Když byla aminokyselinová sekvence variabilního regionu L řetězce CH 11 srovnána se sekvencí myšího k2 podtypu bylo ukázáno, že CDR v L řetězci CH 11 je reprezentován aminokyselinami č. 24 až 39 (CDRL₁, korespondující SEQ ID NO. 4 seznamu sekvencí), 55 až 61 (CDRL₂, korespondující SEQ ID NO. 5 seznamu sekvencí) a 94 až 102 (CDRL₃, korespondující SEQ ID NO. 6 seznamu sekvencí) SEQ ID NO. 10 seznamu sekvencí.

Příklad 5

Expres genů kodujících každou podjednotku CH11 v COS-1 buňkách

(5 - 1) Konstrukce expresního vektoru

DNA z vysoce expresního vektoru pME18S (viz Hara, T., et al., (1992) EMBO J., 11, 1875 a dále) byla trávena restričními enzymy EcoRI a XbaI. Výsledné produkty trávení byly separovány agarosovou gelovou elektroforesou na 0.8% agarosovém gelu. Po elektroforesi byl gel barven ethidium bromid (0.25 µg/ml) kvůli barvení DNA. Z gelu byl excidován proužek přibližně 3000 bp a byl transferován do dialyzační tuby (mez propustnosti: 12000 až 14000 Da, Gibco) spolu s 250 µl TBE pufru agarosové gelové elektroforesy (TBE pufr: Tris 0.089M, boritan 0.089M, EDTA (pH 8.0) 0.002 M) a tuba byla uzavřena. Uzavřená tuba byla umístěna do ponorného typu nádrže pro elektroforesu obsahujícího pufru agarosové gelové elektroforesy a DNA byla elektroforeticky eluována z gelu (150 V, 15 minut). Potom byla dialyzační tuba vyjmuta a byl odebrán DNA eluát z tuby a podroben fenol-chloroformové extrakci

Současně byl plasmid PCR3-H123, který byl připraven v příkladu 3 d), a který obsahoval DNA kodující pro H řetězec CH11, tráven restričními enzymy EcoRI a XbaI. 1900 bp EcoRI-XbaI fragment byl izolován a purifikován agarosovou gelovou elektroforesou na 0.8% gelu, jak je popsáno v 5 - 1 výše. Tento cDNA fragment byl ligován do 3 kb EcoRI-XbaI fragmentu pME18S, jak byl izolován výše, za použití DNA ligačního kitu verze 1 (TakaraShuzo Co., Ltd.).

Plasmid PCR3-L103, který byl připraven v příkladu 3, a který obsahoval DNA kodující pro L řetězec CH11, byl tráven restričními enzymy EcoRI a XbaI. 840 bp EcoRI-XbaI fragment obsahující cDNA plasmidového insertu byl izolován a purifikován agarosovou gelovou elektroforesou na 0.8% gelu, jak je popsáno v 5 - 1 výše. Tento cDNA fragment byl ligován do 3 kb EcoRI-XbaI fragmentu pME18S, jak byl izolován výše, za použití DNA ligačního kitu verze 1 (TakaraShuzo Co., Ltd.).

Plasmid PCR3-J1123, který byl připraven v příkladu 3, a který obsahoval DNA kodující pro J řetězec CH11, byl tráven restričními enzymy EcoRI a XbaI. 640 bp EcoRI-XbaI fragment

obsahující cDNA plasmidového insertu byl izolován a purifikován agarosovou gelovou elektroforesou na 0.8% gelu, jak je popsáno v 5 - 1 výše. Tento cDNA fragment byl ligován do 3 kb EcoRI-XbaI fragmentu pME18S získaného výše, za použití DNA ligačního kitu verse 1 (TakaraShuzo Co., Ltd.).

Po dokončení ligačních reakcí byly JM109 E.coli kompetentní buňky (Takara Shuzo) transformovány za použití jednotlivých reakčních směsí a byly selektovány kolonie ampicilin-resistentních kmenů. Byla připravena plasmidová DNA z transformovaných kmenů za užití alkalické lýsy (Maniatis, výše). Výsledná plasmidová DNA byla trávena EcoRI a XbaI, po čemž následovala agarosová gelová elektroforesa na 0.8% gelu pro potvrzení toho, že byla klonována DNA požadované velikosti.

Expresní vektor obsahující DNA kodující H řetězec CH11 byl označen pHEX126. Expresní vektor obsahující DNA kodující L řetězec CH11 byl označen pLEX004. Expresní vektor obsahující DNA kodující J řetězec CH11 byl označen pJEX004.

(5 - 2) Exprese v COS-1 buňkách

COS-1 buňky byly transformovány pHEX126, pLEX004 a pJEX004 elektrokorporací za použití GTE-1 přístroje (Shimadzu Corporation). Přesněji, COS-1 buňky (American Type Culture Collection č. CRL-1650) byly byly kultivovány ve 225 cm² kultivačních lahvích (Sumitomo Bakelite). Buňky byly kultivovány v semikonfluentním stavu v Dulbecco modifikovaném Eaglevu minimálním esenciálním mediu ("DMEM", Nissui Pharmaceutical) obsahujícím 10% (objem/objem) fetálního hovězího séra (CSL). Medium bylo odstraněno a buňky byly ošetřeny dvakrát 3 ml trypsin-EDTA roztokem (Sigma) při 37 °C po 3 minuty. Buňky byly shromážděny, pak promyty dvakrát fosfátem pufovaným salinickým (PBS, pH 8.0) puforem (Nissui Pharmaceutical). Promyté COS-1 buňky byly upraveny na hustotu 6×10^7 buněk/ml PBS (-) puforem (8g NaCl, 0.2g KCl, 1.15g Na₂HPO₄, 0.2g KH₂PO₄ na litr, Nissui Seiyaku Co.).

Byla připravena DNA z jednotlivých pHEX126, pLEX004 a pJEX004 kodujících všechny tři podjednotky CH11, za použití maxiprep kitu (Maxiprep DNA purifikační systém; Promega). Část (20 μ g) každého plasmidového "maxiprepu" byla precipitována za použití ethanolu a precipitát byl rozpuštěn ve 20 μ l PBS (-) pufru. DNA připravená tímto způsobem byla použita pro transfekci COS-1 buněk. Jakákoliv transfekce, která byla provedena více než jedním plasmidem, užívala 20 μ g každého plasmidu.

Suspense COS-1 buněk (20 μ l; 1.2×10^6 buněk) připravená tímto způsobem byla smíšena s 20 μ l každého vzorku, a výsledná směs byla umístěna do elektroporační kyvety (Shimadzu Corporation) mající interval elektrod 2 mm. Kyveta byla umístěna do elektroporačního přístroje a byly aplikovány dva 600V - 30 μ s pulsy, s jednosekundovým intervalem mezi pulsy. Směs buněk a DNA byla přidána k 10 ml DMEM obsahujícím 10% (objem/objem) fetální hovězí sérum, pak transferována do buněčných kultivačních plastických ploten (průměr: 90 mm; Sumitomo Bakelite) a kultivována při 37 °C za 7.5% CO₂ po 24 hodin. Po této době byl odstraněn supernatant kultury a buňky byly promyty DMEM médiem bez séra. Bylo přidáno čerstvé sérum prosté DMEM medium (10 ml), a pokračovala kultivace při 37 °C za 7.5% CO₂ po 24 hodin. Potom byl odebrán supernatant kultury.

COS-1 buňky byly transfektovány za použití buď jednoho plasmidu, nebo jejich kombinace, jak je uvedeno na seznamu níže. V každém případě byl odebrán supernatant kultury.

- (A): pME18S pouze
- (B): pHEX126 pouze
- (C): pLEX004 pouze
- (D): pJEX004 pouze
- (E): pHEX126 a pLEX004
- (F): pHEX126, pLEX004 a pJEX004

Příklad 6

Detekce anti-Fas protilátky

Anti-Fas protilátka, která byla připravena podle předkládaného vynálezu, byla detekována separátně dvěma metodami.

(1) První metodou byl Western Blotting. Proteinový vzorek prošel SDS-polyakrylamidovým gelem za podmínek ukázaných níže, a proteiny vzorku byly separovány elektroforesou (celý proces je znám jako SDS polyakrylamidová gelová elektroforesa neboli "SDS-PAGE"). Proteiny byly transferovány do nitrocelulosové membrány a byly podrobeny reakci s protilátkou specifickou k anti-Fas protilátce. Zkřížená reakce protilátky s anti-Fas proteinem je detekovatelná, za přítomnosti vhodných substrátů. emise světla na fotografický film.

(2) Druhá metoda měří vazebnou afinitu k Fas antigenu

(6 - 1) Western Blotting

Testovaný vzorek supernatantu kultury (1ml) byl dialyzován proti 5 litrům čisté vody, pak sušen za redukovaného tlaku za použití centrifugačního koncentrátoru (CC-101; Tomy Seiko). Vzniklý produkt byl přidán ke 10 μ l vzorkového pufru (2% (hmotnost/objem) SDS (elektroforesová síla; Bio-Rad), 5% (objem/objem) β -merkptoethanol (Sigma), 10% (objem/objem) glycerol, 0.1% (hmotnost/objem) bromfenolová modř) a pečlivě promíchán. Výsledná suspence byla zahřáta na 100 °C po 5 minut, aby se poskytl vzorek vhodný pro elektroforesu. Celý vzorek pro elektroforesu byl zaveden do jamky SDS-polyakrylamidového gelu (4 až 20% gradientový gel, složení pufru na litr: Tris 3.0g, Glycin 14.4g, SDS 10g, pH 8.3), a gel byl podroben konstantnímu proudu 20 mA (pokojová teplota, jedna hodina).

Jakmile byla provedena elektroforesa, byly proteiny transferovány z gelu do nitrocelulosové membrány za použití semi-suché "blotting" metody (viz Towbin, H. et al., (1979),

proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350 a dále). Jednotlivé použité přístroje a podmínky byly následující:

Transferový pufr: 20 mM Tris, 150 mM glycinu,
10% (objem/objem) methanol
Blotting vybavení: vyrobené Iwaki Glass
Operační podmínky: 4 °C, 0.2 A (konstantní proud), 1 hodina

Byly připraveny dvě nitrocelulosové membrány pro Western Blotting, jak je popsáno výše. Po Western transferu byly gely barveny za použití "Silver Best Kit" (Nakarai Tesuku Kabushiki-Kaisha).

Jedna ze dvou Western blotting nitrocelulosových membrán připravených výše byla využita pro detekci H řetězce (μ řetězce) a druhá pro detekci L řetězce (k řetězce). Byly použity následující postupy.

Po Western transferu byly nitrocelulosové membrány ponořeny do vodného roztoku obsahujícího 3% (hmotnost/objem) želatínu (Bio-Rad), 20 mM Tris kyselinu chlorovodíkovou (pH 7.5) a 500 mM chloridu sodného. Membrány pak byly mírně třepány při pokojové teplotě jednu hodinu (postup popsáný po "po Western transferu" je zde označen jako "blokování"). Takto blokové nitrocelulosové membrány byly ponořeny do roztoku rozpuštěných protilátek a mírně třepány při pokojové teplotě 2 hodiny. Vzniklý roztok protilátek byl připraven rozpuštěním buď 2.5 μ l peroxidasou značené koží anti-myší IgM protilátky (μ řetězec specifické: Jackson Immuno Research Laboratories) nebo 25 μ l peroxidasou značené krysí anti-myší k řetězec monoklonální protilátky (Zymed Laboratories) v 10 ml pufru (20 mM tris-kyselina chlorovodíková (pH 7.5), 500 mM chlorid sodný) zde označeného jako "TBS".

Každá nitrocelulosová membrána pak byla ponořena do 20 ml TTBS, což je TBS obsahující 2% (objem/objem) Tween 20 (Bio-Rad) a byla mírně třepána při pokojové teplotě po 15 minut. Ošetřené membrány byly promyty 20 ml TTBS, který byl poté odstraněn. Byla

detekována residuální peroxidasová aktivita na nitroceluloseové membráně za použití ECL Western Blotting Detection systému (Amersham). Přesněji, substrát v tomto systému emituje světlo během chemické reakce za katalytického účinku peroxidasy. Emise světla může být zachycena na fotografickém filmu za použití ECL mini kamery (Amersham) a instantního filmu (Typ 667; Polaroid). Snímky byly srovnány se stříbrem barvenými gely pro identifikaci proteinových proužků, které specificky vážou protilátky.

Prottilátky k myššímu M řetězci zkříženě reagovaly s proteinovým proužkem přibližně 78000 Da. Proužek této velikosti byl přítomen v supernatantu COS-1 vzorků buněk, které byly transfektovány pHEX126, buď samotným nebo v kombinaci s jiným plasmidem. Tyto vzorky korespondují (B), (E) a (F) Příkladu 5.

Prottilátky k myššímu k řetězci zkříženě reagovaly s proteinovým proužkem přibližně 26000 Da. Proužek této velikosti byl přítomen v supernatantu COS-1 vzorků buněk, které byly transfektovány pLEX004, buď samotným nebo v kombinaci s jiným plasmidem. Tyto vzorky korespondují (C), (E) a (F) Příkladu 5.

Prottilátky produkované hybridomem byly analyzovány pomocí Western blotting za použití stejné metodologie. U proužků od hybridomů korespondujících H a L řetězci CH11 bylo pozorováno, že jsou stejné velikosti jako jsou ty, které byly získány od transfektovaných COS-1 buněk.

(6 - 2) Potvrzení Fas vazebné schopnosti pomocí ELISA

(a) Příprava antigenu

Expresní vektor pME18S-mFas-AIC (viz Nishimura, Y. et al., (1995), Mol. Immunol., 154, 4395 - 4403) kodující fusní protein, který se skládá z extracelulárního regionu myššího Fas antigenu a extracelulárního regionu myššího receptoru interleukinu 3. Část vektoru kodující extracelulární region myššího Fas antigenu byla nahrazena DNA fragmentem kodující extracelulární region lidského Fas antigenu. Tento nový expresní vektor, pFas-AIC2, kodující

fusní protein, který se skládá z extracelulárního regionu lidského Fas antigenu a extracelulárního regionu myšního receptoru interleukinu 3, byl připraven jak je popsáno níže.

Oligonukleotidové primery byly projektovány a syntetizovány tak, aby umožnily PCR amplifikaci DNA kodující extracelulární region Fas antigenu. Použitým DNA templátem byl vektor pCEV4 (Itoh, N., et al., (1991), Cell, 66, 233 - 243), který obsahuje cDNA kodující pro lidský Fas antigen. Sekvence vybraných oligonukleotidů byly následující:

5'- GGGGAATTCC AGTACGGAGT TGGGGAAGCT CTTT-3' (N1; SEQ ID NO. 77 seznamu sekvencí), a

5'- GTTTCTTCTG CCTCTGTCAC CAAGTTAGAT CTGGA-3' (C3N; SEQ ID NO. 78 seznamu sekvencí).

Oligonukleotidové primery byly projektovány a syntetizovány tak, aby umožnily PCR amplifikaci DNA kodující extracelulární region myšního receptoru pro interleukin 3. Použitým DNA templátem byl vektor pME18S-mFas-AIC (Nishimara, Y., et al., 1995, Mol. Immunology, 154, 4395 - 4403). Sekvence vybraných oligonukleotidů byly následující:

5'- TCCAGATCTA ACTTGGTGAC AGAGGCAGAA GAAAC-3' (N3N; SEQ ID NO. 79 seznamu sekvencí); a

5'- CCCTCTAGAC GCGTCACGTG GGCATCAC-3' (CTN2; SEQ ID NO. 80 seznamu sekvencí).

PCR reakce byla provedena za použití výše uvedených plasmidů, oligonukleotidových primerů a LA PCR kitu (Takara Shuzo Co., Ltd.) za následujících podmínek.

Složení reakční směsi:

Plasmidová DNA	20 ng
Oligonukleotidové primery	0.5 µg (každý)

10-krát koncentrace LA PCR pufru	25 μ l
dNTP směs	25 μ l
Taq polymerasa	12.5 jednotek

Byla přidána destilovaná voda, aby byl vytvořen konečný objem 250 μ l; pufr, dNTP směs a Taq polymerasa byly obsaženy v kitu.

Teplotní podmínky:

Vzorek byl nejprve zahřátý na 94 °C po 2 minuty. Reakční směs byla potom podrobena teplotnímu cyklu 94 °C po jednu minutu, 55 °C po jednu minutu a 72 °C po dvě minuty a tento cyklus byl opakován 30-krát, po čemž následovalo zahřátí na 72 °C po dalších 10 minut.

Produkty každé PCR reakce byly separovány elektroforesou na 8% polyakrylamidovém gelu (běh v TBE pufru, při 100 V po 2 hodiny). Z gelu byl excidován proužek přibližně 460 bp, korespondující DNA fragmentu obsahujícímu gen kodující extracelulární region lidského Fas antigenu. Z gelu byl také excidován proužek přibližně 1300 bp, korespondující DNA fragmentu obsahujícímu gen kodující extracelulární region myšího receptoru pro interleukin 3. DNA fragmenty byly eluovány z gelu jak je popsáno v Příkladu 5.

Dva DNA fragmenty získané po první PCR reakci byly dohromady použity ve druhé PCR reakci, spolu s oligonukleotidovými primery C3N a N3N. Každý primer hybridizoval na jeden z původních fragmentů. Při použití v PCR reakci primery amplifikují fragment DNA, va kterém jsou dva polypeptidy kodující geny ligovány na stejný čtecí rámeček. Druhá PCR reakce byla provedena za následujících podmínek:

Složení reakční směsi:

Produkty prvního kola PCR	plný objem od každého
Oligonukleotidové primery	0.1 μ g (každý)
10-krát koncentrace LA PCR pufru	25 μ l
dNTP směs	25 μ l

Taq polymerasa

12.5 jednotek

Byla přidána destilovaná voda, aby byl vytvořen konečný objem 250 μ l.

Teplotní podmínky cyklu byly shodné s podmínkami použitými v předcházející PCR reakci.

Část reakční směsi druhé PCR reakce byla zavedena a proběhla agarosovým gelem, což potvrdilo, že byl amplifikován požadovaný PCR produkt o přibližně 1700 bp. Zbytek reakční směsi byl pak precipitován za použití ethanolu. Precipitovaná DNA byla trávena restričními enzymy EcoRI a XbaI a produkty trávení byly separovány agarosovou gelovou elektroforesou na 1% (hmotnost/objem) agarosovém gelu. Z gelu byl excidován proužek o přibližně 1700 bp, a DNA byla purifikována z gelu stejným způsobem jako v Příkladu 5.

Současně byly 2 μ g pME18S-mFas-AIC DNA tráveny restričními enzymy EcoRI a XbaI. Produkty trávení byly separovány gelovou elektroforesou na 0.8% (hmotnost/objem) agarosovém gelu a z gelu byl excidován proužek o přibližně 3000 bp. DNA byla izolována a ligována na 1700 bp PCR produkt (připravený výše) za použití DNA ligačního kitu verze 2 (Takara Shuzo Co., Ltd.). Celková reakční směs (10 μ l) byla použita k transformaci JM109 E.coli kompetentních buněk (Takara Shuzo) a byla provedena selekce ampicilin resistantních kolonií. Jeden takový ampicilin resistantní transformant byl kultivován konvenčními postupy a byla připravena plasmidová DNA z buněk za užití alkalické lýsy (Maniatis, výše). Vzniklý plasmid byl označen pFas-AIC2.

pFAS-AIC2 DNA byla transfektována do COS-1 buněk elektroporací, za použití GTE-1 přístroje. Přesněji, COS-1 buňky byly kultivovány ve čtyřech 225 cm² kultivačních lahvích (Sumitomo Bakelite). Buňky byly kultivovány v semikonfluentním stavu v DMEM obsahujícím 10% (objem/objem) fetální hovězí sérum (CSL). Medium bylo odstraněno a buňky byly dvakrát ošetřeny 3 ml

roztoku trypsin-EDTA (Sigma) při 37 °C po 3 minuty. Potom byly buňky odebrány, dvakrát promyty PBS (-) pufrem (Nissui Pharmaceutical). Promyté COS-1 buňky byly upraveny PBS(-) pufrem na hustotu 6×10^7 buněk/ml.

phFas-AIC2 plasmidová DNA byla připravena za použití "plasmid mass preparation" kitu (Maxiprep DNA Purification System; Promega) a 200 μ g této plasmidové DNA bylo precipitováno ethanolem a potom rozpuštěno v 200 μ l PBS(-) pufrem.

Část suspence buněk (20 μ l; 1.2×10^6 buněk) a 20 μ l plasmidového roztoku bylo promícháno a výsledná směs byla zavedena do elektroporační kyvety mající elektrodový interval 2 mm. Kyveta byla umístěna do elektroporačního přístroje a byly aplikovány dva 600V-30 μ s pulsy, s intervalem 1 sekundy mezi pulsy. Tento postup byl proveden u 10 vzorků.

Směsi buněk-DNA 10 vzorků byly kombinovány a přidány do 50 ml DMEM obsahujícího 10% (objem/objem) fetální hovězí sérum a vzniklá směs byla transferována do 225 cm² kultivačních lahví (Sumitomo Bakelite). Buňky byly kultivovány při 37 °C za 7.5% CO₂ po 24 hodin. Po této době byl odstraněn supernatant kultury a buňky byly promyty v serum-prostém DMEM mediu. Čerstvé DMEM medium bez séra (50 ml) bylo potom přidáno ke kultuře, a buňky byly kultivovány při 37 °C za 7.5% CO₂ po dalších 24 hodin. Po této době byl odebrán supernatant kultury.

(b) ELISA

Aliquoty supernatantů kultury COS-1 (100 μ l) byly pipetovány do jamek 96-jamkové imunoplotny (Maxisorb, Nunk) a uskladněny při 4 °C přes noc. Toto vedlo k vytvoření pevné fáze proteinu, který obsahoval extracelulární region lidského Fas antigenu na vnitřním povrchu jamek. Každá jamka byla promyta PBS obsahujícím 0.05% (objem/objem) Tween-20 (EIA grade, Bio-Rad), pak bylo přidáno 100 μ l PBS obsahujícím 0.5% (hmotnost/objem) hovězí sérový albumin (BSA). Plotna byla ponechána při pokojové teplotě po jednu hodinu pro blokující efekt.

Každá jamka byla promyta PBS obsahujícím 0.05% (objem/objem) Tween-20 a pak byly CH11 (standart) připravený v Příkladu 2, spolu s 100 μ l ředěného roztoku testovaného vzorku připraveného v Příkladu 5 pipetovány do jamek. Reakce probíhala při pokojové teplotě po 4 hodiny.

Jamky byly pak promyty PBS obsahujícím 0.05% (objem/objem) Tween-20. Část (100 μ l) peroxidasou značené krysí anti myší IgM monoklonální protilátky (ředění 1/2000, Zymed Laboratories) byla pipetována do každé jamky a reakce probíhala při pokojové teplotě po 2 hodiny.

Jamky byly dále promyty PBS obsahujícím 0.05% (objem/objem) Tween-20. Část (100 μ l) substrátového roztoku (Peroxidase substrate kit ABTS; Bio-Rad) byla pipetována do každé jamky pro iniciaci barvicí reakce. Byly měřeny hodnoty absorbance každé jamky při 405 nm a 492 nm za použití čtečky mikroplotny a absorbance získaná při 492 nm byla odčítána od absorbance získané při 405 nm. Takto získané hodnoty byly srovnány s hodnotami pro CH11 standarty, aby se zhodnotila schopnost testovaného vzorku vázat protein obsahující extracelulární region lidského Fas antigenu.

Výsledky jsou ukázány v Tabulce 1 níže. Jak je zřejmé, byla pozorována vazba při použití supernatantů (E) (pHEX126 a pLEX004) a (F) (pHEX126, pLEX004 a pJEX004) připravených v Příkladu 5.

Tabulka 1

Vzorek	$OD_{405} - OD_{492}$
CH11 standard	0.445
PBS	0.104
pHEX126	0.109
pLEX004	0.135
pJEX004	0.107

pHEX126 + pLEX004	0.330
pHEX126 + pLEX004 + pJEX004	0.202

Příklad 7

Zkouška cytotoxicity

Cytotoxicita každého supernatantu kultury COS-1 buněk připraveného v Příkladu 5 byla určena metodou MTT (3-(4,5-dimethylthiazon-2-yl)-2,5-diphenyl 2H-tetrazolium-bromid) zkoušky, jak je popsána níže.

Buňky lidských lymfocytů kmene HPB-ALL (viz Morikawa, S., et al., (1978) Int.J.Cancer, 21, 166 - 170) byly kultivovány na RPMI1640 mediu (Nissui Pharmaceutical) obsahujícím 20 mM HEPES (HEPES: N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina), 50 μ M 2-mercapthoethanolu a 10% (objem/objem) fetální hovězí sérum (Equitec Bio) při 5% CO₂ při 37 °C po 3 dny. Část (75 μ l) supernatantů kultury COS-1 buněk připravených v Příkladu 5 byla pipetována do jamek 96-jamkové kultivační plotny a potom bylo přidáno 25 μ l HPB-ALL buněk (upravených na 2 x 10⁵ buněk/ml). Buňky byly kultivovány při 37 °C za přítomnosti 5% CO₂ po 12 hodin. Do každé jamky plotny bylo přidáno 10 μ l 5 mg/ml vodného roztoku MTT (Sigma) a plotna byla inkubována při 37 °C po 4 hodiny. Po inkubaci bylo do každé jamky přidáno 100 μ l roztoku obsahujícího 50% (objem/objem) N,N-dimethylfarmamid a 20% (hmotnost/objem) SDS. Hodnoty absorbance pro každou jamku byly odečítány při 590 nm a 620 nm za použití čtečky mikroplotny (Nippon Intermed Ltd.). Absorbance při 620 nm byla odečítána od absorbance při 590 nm. Při vyšších hodnotách zbývalo větší množství živých buněk v jamce. Výsledné hodnoty jsou ukázány v Tabulce 2, níže.

Tabulka 2

Vzorek

OD₅₉₀ - OD₆₂₀

PBS	0.864
pME 18S	0.881
pHEX126 (H řetězec)	0.876
pLEX004 (L řetězec)	0.887
pJEX004 (J řetězec)	0.883
pHEX126 + pLEX004	0.176
pHEX126 + pLEX004 + pJEX004	0.242

Tyto kultury COS-1 buněk, které byly transfektovány jedním plasmidem v Příkladu 5 ((A), (B), (C), a (D)) všechny vykazovaly vysoké hodnoty, srovnatelné s hodnotami netransfektovaných buněk. Buňky kotransfektované pHEX126 a pLEX004 ((E) a (F)) vykazovaly nízké hodnoty srovnatelné s hodnotami prázdných, ve kterých nebyly přítomny žádné buňky. Z těchto výsledků vyplývá, že cytotoxická substance je produkována koexpresí DNA kodující CH11 H řetězec a CH11 L řetězec.

Příklad 8

Srovnání cytotoxicity protilátek (ED_{50} test)

Cytotoxicita protilátek předkládaného vynálezu byla hodnocena ED_{50} testem. Jak je zde použito je ED_{50} koncentrací protilátky, při které je 50% vzorku buněk exprivujících Fas antigen usmrceno. Před měřením ED_{50} bylo nezbytné přesně spočítat koncentraci testovaných protilátek.

(8 - 1) Určení koncentrace protilátek

Do každé jamky 96 jamkové ELISA plotny (NUNC) bylo pipetováno 100 μ l roztoku anti-myší IgM protilátky (0.5 μ g/ml v 50 mM Na_2HCO_3 , pH 9.6, zakoupených u BIOSYS), a plotna byla inkubována přes noc při 4 °C. Roztok protilátek byl pak odstraněn a každá jamka byla promyta čtyři-krát PBS obsahujícím 0.5% Tween 20 (zde označeno jako "PBS-T").

"Super Block" blokující pufr (Pierce) byl připraven v PBS, podle instrukcí výrobce a 100 μ l tohoto pufru bylo pipetováno do každé jamky. Plotna pak byla dále inkubována po čtyři hodiny při 37 °C. Po této době byl blokující roztok odstraněn a každá jamka byla promyta čtyřikrát PBS-T.

100 μ l každého testovaného přípravku protilátky bylo přidáno do každé jamky plotny. Testované vzorky obsahovaly CH11, a supernatanty (E) a (F) Příkladu 5. Byly použity různé standartní přípravky obsahující myší IgM (Zymed) ředěné na různé koncentrace. Po přidání vzorků do jamek byly plotny inkubovány při 37 °C po 4 hodiny. Po této době byly testované a standartní vzorky odstraněny a každá jamka byla promyta čtyřikrát PBS-T.

Vzorek křenová peroxidasa-konjugovaného anti-myšího IgM (100 μ l ředění 1/1000 v PBS) byl přidán do každé jamky. Tento roztok byl odstraněn a každá jamka byla promyta čtyřikrát PBS-T.

100 μ l vzorku připraveného z Horseradish Peroxidase Substrate Kit (Bioered) byly přidány do každé jamky a plotna byla inkubována při pokojové teplotě po 30 minut. Po této době byla měřena absorbance při 405 a 492 nm za použití čtečky mikroplotny. Absorbance při 492 nm byla pak odečtena od absorbance při 405 nm.

Při použití hodnot absorbance pro standartní vzorky bylo možné konstruovat standartní křivku, ze které může být určena koncentrace každé testované protilátky.

Pak bylo možné hodnotit ED_{50} .

(8 - 2) Kalkulace ED_{50}

Tři roztoky protilátek, CH11, supernatant (E) (obsahující H a L řetězec) a supernatant (F) (obsahující H,L a J řetězec) příkladu 5, v příslušném pořadí, byly inkubovány HBP-ALL bučkami. MTT zkouška, popsaná v Příkladu 7, byla použita k hodnocení toho,

jak mnoho buněk bylo usmrceno každým roztokem protilátek.

MTT výsledky pro každou protilátku byly kalkulovány jako funkce koncentrace proteinu, jak byla získaná v (8 - 1) výše, pro určení ED_{50} hodnoty, kdy MTT byla brána jako negativní kontrola a výsledky pro HBP-ALL kultivované v nepřítomnosti protilátek byly brány jako pozitivní kontrola. Výsledky jsou ukázány v Tabulce 3.

Tabulka 3

protilátka	ED_{50} (ng/ml)
CH11	21.2
Supernatant (E) (pHEX126 a pLEX004)	4.5
Supernatant (F) (pHEX126, pLEX004 a pJEX004)	22.9

Výše uvedené výsledky jasně ukazují, že produkt obsahující supernatant (E) překvapivě vykazuje přibližně 5 krát vyšší aktivitu než CH11 nebo produkt obsažený v supernatantu (F). Zdá se pravděpodobné, že IgM struktura je tvořena produktem obsaženým v supernatantu (F), zatímco produkt obsažený v supernatantu (E) tvoří jednoduché páry a že, za těchto okolností, je ED_{50} signifikantně zvýšena.

Seznam sekvencí

(1) Obecné informace

(i) Přihlašovatel

- (A) Jméno: Sankyo Company, Limited
- (B) Ulice: 5 - 1, Nihonbashi Honcho 3-chome, Chuo - ku
- (C) Město: Tokyo
- (E) Země: Japonsko
- (F) Poštovní kod (ZIP): 103
- (G) Telefon: 81-3-5255-7111

(ii) Název vynálezu: Rekombinantní protilátka proti lidskému Fas

(iii) Počet sekvencí: 80

(iv) Počítačová čtecí forma:

- (A) Typ media: Floppy disk
- (B) Počítač: IBM PC kompatibilní
- (C) Operační system: PC-DOS/MS-DOS
- (D) Software: PatentIn Release #1.0, verse #1.30 (EPO)

(2) informace pro sekvenci č.1:

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 5 aminokyselin
- (B) typ: aminokyselinová
- (C) typ řetězce: jednoduchý
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 1:

Asp Tyr Asn Met His

1 5

(2) informace pro sekvenci č.2:

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 17 aminokyselin
- (B) typ: aminokyselinová
- (C) typ řetězce: jednoduchý
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 2:

Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys

1 5 10

Phe Lys Ser

15

(2) informace pro sekvenci č.3:

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 7 aminokyselin
- (B) typ: aminokyselinová
- (C) typ řetězce: jednoduchý
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 3:

Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5

(2) informace pro sekvenci č.4:

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 16 aminokyselin
- (B) typ: aminokyselinová
- (C) typ řetězce: jednoduchý
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 4:

Arg	Ser	Ser	Lys	Ser	Leu	Val	His	Ser	Asn	Gly	Asn	Thr
1				5					10			
	Tyr	Leu	His									
				15								

(2) informace pro sekvenci č.5:

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 7 aminokyselin
- (B) typ: aminokyselinová
- (C) typ řetězce: jednoduchý
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 5:

Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser
1				5		

(2) informace pro sekvenci č.6:

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 9 aminokyselin
- (B) typ: aminokyselinová
- (C) typ řetězce: jednoduchý
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 6:

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Ala

1

5

(2) informace pro sekvenci č.7:

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 1773 párů basí
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) typ řetězce: dvojitý
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA k mRNA

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(v) Původní zdroj:

- (A) Organismus: Mus musculus
- (B) Typ buněk: Hybridomy
- (C) Buněčná linie: CH11

(ix) Vlastnosti:

- (A) Jmeno/klíč: CDS
- (B) Umístění: 1...1770

(ix) Vlastnosti:

- (A) Jmeno/klíč: mat peptid
- (B) Umístění: 58...1770

(ix) Vlastnosti:

(A) Jmeno/klíč: sig peptid

(B) Umístění: 1....57

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 7:

ATG GGA TGG AGC TGG ATC TTT CTC TTC CTC CTG TCA GGA ACT GCA GGC	48
Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly	
-19 -15 -10 -5	
GTC CAC TCT GAG GTC CAG CTT CAG CAG TCA GGA CCT GAG CTG GTG AAA	96
Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys	
1 5 10	
CCT GGG GCC TCA GTG AAG ATA TCC TGC AAG GCT TCT GGA TAC ACA TTC	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	
15 20 25	
ACT GAC TAC AAC ATG CAC TGG GTG AAG CAG AGC CAT GGA AAG AGC CTT	192
Thr Asp Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu	
30 35 40 45	
GAG TGG ATT GGA TAT ATT TAT CCT TAC AAT GGT GGT ACT GGC TAC AAC	240
Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn	
50 55 60	
CAG AAG TTC AAG AGC AAG GCC ACA TTG ACT GTT GAC AAT TCC TCC AGC	288
Gln Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Asn Ser Ser Ser	
65 70 75	
ACA GCC TAC ATG GAG CTC CGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCA GTC	336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val	
80 85 90	
TAT TAC TGT GCA AGA AGT TAC TAT GCT ATG GAC TAC TGG GGT CAA GGA	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly	
95 100 105	
ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA GAG AGT CAG TCC TTC CCA AAT GTC TTC	432
Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Glu Ser Gln Ser Phe Pro Asn Val Phe	
110 115 120 125	
CCC CTC GTC TCC TGC GAG AGC CCC CTG TCT GAT AAG AAT CTG GTG GCC	480
Pro Leu Val Ser Cys Glu Ser Pro Leu Ser Asp Lys Asn Leu Val Ala	
130 135 140	
ATG GGC TGC CTA GCC CGG GAC TTC CTG CCC AGC ACC ATT TCC TTC ACC	528
Met Gly Cys Leu Ala Arg Asp Phe Leu Pro Ser Thr Ile Ser Phe Thr	
145 150 155	
TGG AAC TAC CAG AAC AAC ACT GAA GTC ATC CAG GGT ATC AGA ACC TTC	576
Trp Asn Tyr Gln Asn Asn Thr Glu Val Ile Gln Gly Ile Arg Thr Phe	

160	165	170	
CCA ACA CTG AGG ACA GGG GGC AAG TAC CTA GCC ACC TCG CAG GTG TTG			624
Pro Thr Leu Arg Thr Gly Gly Lys Tyr Leu Ala Thr Ser Gln Val Leu			
175	180	185	
CTG TCT CCC AAG AGC ATC CTT GAA GGT TCA GAT GAA TAC CTG GTA TGC			672
Leu Ser Pro Lys Ser Ile Leu Glu Gly Ser Asp Glu Tyr Leu Val Cys			
190	195	200	205
AAA ATC CAC TAC GGA GGC AAA AAC AGA GAT CTG CAT GTG CCC ATT CCA			720
Lys Ile His Tyr Gly Gly Lys Asn Arg Asp Leu His Val Pro Ile Pro			
210	215	220	
GCT GTC GCA GAG ATG AAC CCC AAT GTA AAT GTG TTC GTC CCA CCA CGG			768
Ala Val Ala Glu Met Asn Pro Asn Val Asn Val Phe Val Pro Pro Arg			
225	230	235	
GAT GGC TTC TCT GGC CCT GCA CCA CGC AAG TCT AAA CTC ATC TGC GAG			816
Asp Gly Phe Ser Gly Pro Ala Pro Arg Lys Ser Lys Leu Ile Cys Glu			
240	245	250	
GCC ACG AAC TTC ACT CCA AAA CCG ATC ACA GTA TCC TGG CTA AAG GAT			864
Ala Thr Asn Phe Thr Pro Lys Pro Ile Thr Val Ser Trp Leu Lys Asp			
255	260	265	
GGG AAG CTC GTG GAA TCT GGC TTC ACC ACA GAT CCG GTG ACC ATC GAG			912
Gly Lys Leu Val Glu Ser Gly Phe Thr Thr Asp Pro Val Thr Ile Glu			
270	275	280	285
AAC AAA GGA TCC ACA CCC CAA ACC TAC AAG GTC ATA AGC ACA CTT ACC			960
Asn Lys Gly Ser Thr Pro Gln Thr Tyr Lys Val Ile Ser Thr Leu Thr			
290	295	300	
ATC TCT GAA ATC GAC TGG CTG AAC CTG AAT GTG TAC ACC TGC CGT GTG			1008
Ile Ser Glu Ile Asp Trp Leu Asn Leu Asn Val Tyr Thr Cys Arg Val			
305	310	315	
GAT CAC AGG GGT CTC ACC TTC TTG AAG AAC GTG TCC TCC ACA TGT GCT			1056
Asp His Arg Gly Leu Thr Phe Leu Lys Asn Val Ser Ser Thr Cys Ala			
320	325	330	
GCC AGT CCC TCC ACA GAC ATC CTA ACC TTC ACC ATC CCC CCC TCC TTT			1104
Ala Ser Pro Ser Thr Asp Ile Leu Thr Phe Thr Ile Pro Pro Ser Phe			
335	340	345	
GCC GAC ATC TTC CTC AGC AAG TCC GCT AAC CTG ACC TGT CTG GTC TCA			1152
Ala Asp Ile Phe Leu Ser Lys Ser Ala Asn Leu Thr Cys Leu Val Ser			
350	355	360	365
AAC CTG GCA ACC TAT GAA ACC CTG AAT ATC TCC TGG GCT TCT CAA AGT			1200
Asn Leu Ala Thr Tyr Glu Thr Leu Asn Ile Ser Trp Ala Ser Gln Ser			
370	375	380	
GGT GAA CCA CTG GAA ACC AAA ATT AAA ATC ATG GAA AGC CAT CCC AAT			1248
Gly Glu Pro Leu Glu Thr Lys Ile Lys Ile Met Glu Ser His Pro Asn			
385	390	395	

GGC ACC TTC AGT GCT AAG GGT GTG GCT AGT GTT TGT GTG GAA GAC TGG	1296
Gly Thr Phe Ser Ala Lys Gly Val Ala Ser Val Cys Val Glu Asp Trp	
400 405 410	
AAT AAC AGG AAG GAA TTT GTG TGT ACT GTG ACT CAC AGG GAT CTG CCT	1344
Asn Asn Arg Lys Glu Phe Val Cys Thr Val Thr His Arg Asp Leu Pro	
415 420 425	
TCA CCA CAG AAG AAA TTC ATC TCA AAA CCC AAT GAG GTG CAC AAA CAT	1392
Ser Pro Gln Lys Lys Phe Ile Ser Lys Pro Asn Glu Val His Lys His	
430 435 440 445	
CCA CCT GCT GTG TAC CTG CTG CCA CCA GCT CGT GAG CAA CTG AAC CTG	1440
Pro Pro Ala Val Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu	
450 455 460	
AGG GAG TCA GCC ACA GTC ACC TGC TTG GTG AAG GGC TTC TCT CCT GCA	1488
Arg Glu Ser Ala Thr Val Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Ser Pro Ala	
465 470 475	
GAC ATC AGT GTG CAG TGG CTT CAG AGA GGG CAA CTC TTG CCC CAA GAG	1536
Asp Ile Ser Val Gln Trp Leu Gln Arg Gly Gln Leu Leu Pro Gln Glu	
480 485 490	
AAG TAT GTG ACC AGT GCC CCG ATG CCA GAG CCT GGG GCC CCA GGC TTC	1584
Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro Gly Ala Pro Gly Phe	
495 500 505	
TAC TTT ACC CAC AGC ATC CTG ACT GTG ACA GAG GAG GAA TGG AAC TCC	1632
Tyr Phe Thr His Ser Ile Leu Thr Val Thr Glu Glu Glu Trp Asn Ser	
510 515 520 525	
GGA GAG ACC TAT ACC TGT GTT GTA GGC CAC GAG GCC CTG CCA CAC CTG	1680
Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Gly His Glu Ala Leu Pro His Leu	
530 535 540	
GTG ACC GAG AGG ACC GTG GAC AAG TCC ACT GGT AAA CCC ACA CTG TAC	1728
Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly Lys Pro Thr Leu Tyr	
545 550 555	
AAT GTC TCC CTG ATC ATG TCT GAC ACA GGC GGC ACC TGC TAT	1770
Asn Val Ser Leu Ile Met Ser Asp Thr Gly Gly Thr Cys Tyr	
560 565 570	
TGA	1773

(2) informace pro sekvenci č.8:

(i) Sekvenční charakteristiky:

(A) délka: 590 aminokyselin

(B) typ: aminokyselina

(D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 8:

Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly

Ile Ser Glu Ile Asp Trp Leu Asn Leu Asn Val Tyr Thr Cys Arg Val
 305 310 315
 Asp His Arg Gly Leu Thr Phe Leu Lys Asn Val Ser Ser Thr Cys Ala
 320 325 330
 Ala Ser Pro Ser Thr Asp Ile Leu Thr Phe Thr Ile Pro Pro Ser Phe
 335 340 345
 Ala Asp Ile Phe Leu Ser Lys Ser Ala Asn Leu Thr Cys Leu Val Ser
 350 355 360 365
 Asn Leu Ala Thr Tyr Glu Thr Leu Asn Ile Ser Trp Ala Ser Gln Ser
 370 375 380
 Gly Glu Pro Leu Glu Thr Lys Ile Lys Ile Met Glu Ser His Pro Asn
 385 390 395
 Gly Thr Phe Ser Ala Lys Gly Val Ala Ser Val Cys Val Glu Asp Trp
 400 405 410
 Asn Asn Arg Lys Glu Phe Val Cys Thr Val Thr His Arg Asp Leu Pro
 415 420 425
 Ser Pro Gln Lys Lys Phe Ile Ser Lys Pro Asn Glu Val His Lys His
 430 435 440 445
 Pro Pro Ala Val Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu
 450 455 460 465
 Arg Glu Ser Ala Thr Val Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Ser Pro Ala
 465 470 475
 Asp Ile Ser Val Gln Trp Leu Gln Arg Gly Gln Leu Leu Pro Gln Glu
 480 485 490
 Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro Gly Ala Pro Gly Phe
 495 500 505
 Tyr Phe Thr His Ser Ile Leu Thr Val Thr Glu Glu Glu Trp Asn Ser
 510 515 520 525
 Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Gly His Glu Ala Leu Pro His Leu
 530 535 540
 Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly Lys Pro Thr Leu Tyr
 545 550 555
 Asn Val Ser Leu Ile Met Ser Asp Thr Gly Gly Thr Cys Tyr
 560 565 570

(2) informace pro sekvenci č.9:

(i) Sekvenční charakteristiky:

(A) délka: 717 párů basí

- (B) typ: nukleová kyselina
 (C) typ řetězce: dvojitý
 (D) topologie: lineární
- (ii) Typ molekuly: cDNA k mRNA
 (iii) Hypotetická: ne
 (iv) anti-sense: ne
 (v) Původní zdroj:
 (A) Organismus: Mus musculus
 (B) Typ buněk: Hybridomy
 (C) Buněčná linie: CH11
- (ix) Vlastnosti:
 (A) Jmeno/klíč: CDS
 (B) Umístění: 1...714
- (ix) Vlastnosti:
 (A) Jmeno/klíč: mat peptid
 (B) Umístění: 58...714
- (ix) Vlastnosti:
 (A) Jmeno/klíč: sig peptid
 (B) Umístění: 1...57
- (xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 9:

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

95	100	105	
GAA ATC AAA CGG GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA TCC ATC TTC CCA CCA			432
Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro			
110	115	120	125
TCC AGT GAG CAG TTA ACA TCT GGA GGT GCC TCA GTC GTG TGC TTC TTG			480
Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu			
	130	135	140
AAC AAC TTC TAC CCC AAA GAC ATC AAT GTC AAG TGG AAG ATT GAT GGC			528
Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly			
	145	150	155
AGT GAA CGA CAA AAT GGC GTC CTG AAC AGT TGG ACT GAT CAG GAC AGC			576
Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser			
	160	165	170
AAA GAC AGC ACC TAC AGC ATG AGC AGC ACC CTC ACG TTG ACC AAG GAC			624
Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp			
	175	180	185
GAG TAT GAA CGA CAT AAC AGC TAT ACC TGT GAG GCC ACT CAC AAG ACA			672
Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr			
190	195	200	205
TCA ACT TCA CCC ATT GTC AAG AGC TTC AAC AGG AAT GAG TGT			714
Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys			
	210	215	
TAG			717

(2) informace pro sekvenci č.10:

(i) Sekvenční charakteristiky:

(A) délka: 238 aminokyselin

(B) typ: aminokyselina

(D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 10:

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
-19 -15 -10 -5

Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
1 5 10

Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu
15 20 25

Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
30 35 40 45

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 65 70 75
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys
 80 85 90
 Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 95 100 105
 Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro
 110 115 120 125
 Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu
 130 135 140
 Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly
 145 150 155
 Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser
 160 165 170
 Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp
 175 180 185
 Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr
 190 195 200 205
 Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 210 215

(2) informace pro sekvenci č.11:

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 480 párů basí
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) typ řetězce: dvojitý
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA k mRNA

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(v) Původní zdroj:

- (A) Organismus: *Mus musculus*
- (B) Typ buněk: Hybridomy
- (C) Buněčná linie: CH11

(ix) Vlastnosti:

(A) Jmeno/klíč: CDS

(B) Umístění: 1...447

(ix) Vlastnosti:

(A) Jmeno/klíč: mat peptid

(B) Umístění: 67...477

(ix) Vlastnosti:

(A) Jmeno/klíč: sig peptid

(B) Umístění: 1...66

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 11:

ATG AAG ACC CAC CTG CTT CTC TGG GGA GTC CTC GCC ATT TTT GTT AAG Met Lys Thr His Leu Leu Leu Trp Gly Val Leu Ala Ile Phe Val Lys -22 -20 -15 -10	48
GCT GTC CTT GTA ACA GGT GAC GAC GAA GCG ACC ATT CTT GCT GAC AAC Ala Val Leu Val Thr Gly Asp Asp Glu Ala Thr Ile Leu Ala Asp Asn -5 1 5 10	96
AAA TGC ATG TGT ACC CGA GTT ACC TCT AGG ATC ATC CCT TCC ACC GAG Lys Cys Met Cys Thr Arg Val Thr Ser Arg Ile Ile Pro Ser Thr Glu 15 20 25	144
GAT CCT AAT GAG GAC ATT GTG GAG AGA AAT ATC CGA ATT GTT GTC CCT Asp Pro Asn Glu Asp Ile Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Val Val Pro 30 35 40	192
TTG AAC AAC AGG GAG AAT ATC TCT GAT CCC ACC TCC CCA CTG AGA AGG Leu Asn Asn Arg Glu Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Arg 45 50 55	240
AAC TTT GTA TAC CAT TTG TCA GAC GTC TGT AAG AAA TGC GAT CCT GTG Asn Phe Val Tyr His Leu Ser Asp Val Cys Lys Lys Cys Asp Pro Val 60 65 70	288
GAA GTG GAG CTG GAA GAT CAG GTT GTT ACT GCC ACC CAG AGC AAC ATC Glu Val Glu Leu Glu Asp Gln Val Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Ile 75 80 85 90	336
TGC AAT GAG GAC GAT GGT GTT CCT GAG ACC TGC TAC ATG TAT GAC AGA Cys Asn Glu Asp Asp Gly Val Pro Glu Thr Cys Tyr Met Tyr Asp Arg 95 100 105	384
AAC AAG TGC TAT ACC ACT ATG GTC CCA CTT AGG TAT CAT GGT GAG ACC Asn Lys Cys Tyr Thr Thr Met Val Pro Leu Arg Tyr His Gly Glu Thr 110 115 120	432
AAA ATG GTG CAA GCA GCC TTG ACC CCC GAT TCT TGC TAC CCT GAC Lys Met Val Gln Ala Ala Leu Thr Pro Asp Ser Cys Tyr Pro Asp 125 130 135	477
TAG	480

(2) informace pro sekvenci č.12:

(i) Sekvenční charakteristiky:

(A) délka: 159 aminokyselin

(B) typ: aminokyselina

(D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 12:

```

Met Lys Thr His Leu Leu Leu Trp Gly Val Leu Ala Ile Phe Val Lys
-22      -20                      -15                      -10

Ala Val Leu Val Thr Gly Asp Asp Glu Ala Thr Ile Leu Ala Asp Asn
      -5                      1                      5                      10

Lys Cys Met Cys Thr Arg Val Thr Ser Arg Ile Ile Pro Ser Thr Glu
                      15                      20                      25

Asp Pro Asn Glu Asp Ile Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Val Val Pro
                      30                      35                      40

Leu Asn Asn Arg Glu Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Arg
                      45                      50                      55

Asn Phe Val Tyr His Leu Ser Asp Val Cys Lys Lys Cys Asp Pro Val
                      60                      65                      70

Glu Val Glu Leu Glu Asp Gln Val Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Ile
75                      80                      85                      90

Cys Asn Glu Asp Asp Gly Val Pro Glu Thr Cys Tyr Met Tyr Asp Arg
                      95                      100                      105

Asn Lys Cys Tyr Thr Thr Met Val Pro Leu Arg Tyr His Gly Glu Thr
                      110                      115                      120

Lys Met Val Gln Ala Ala Leu Thr Pro Asp Ser Cys Tyr Pro Asp
                      125                      130                      135

```

(2) informace pro sekvenci č.13:

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 15 aminokyselin
- (B) typ: aminokyselina
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(v) Typ fragmentu: N-terminální

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 13:

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro
 1 5 10

Gly

15

(2) informace pro sekvenci č.14:

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 21 aminokyselin
- (B) typ: aminokyselina
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 14:

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser
 1 5 10

Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile

15

20

(2) informace pro sekvenci č.15:

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 391 párů basí
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) typ řetězce: dvojitý
- (D) topologie: lineární

CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCA GTC TAT TAC TGT GCA AGA AGT TAC TAT	334
Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Tyr Tyr	
90 95 100	
GCT ATG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA GAG	382
Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Glu	
105 110 115	
AGT CAG TCC	391
Ser Gln Ser	
120	

(2) informace pro sekvenci č.16:

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 388 párů basí
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) typ řetězce: dvojitý
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA k mRNA

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(v) Původní zdroj:

- (A) Organismus: *Mus musculus*
- (B) Typ buněk: Hybridomy
- (C) Buněčná linie: CH11

(ix) Vlastnosti:

- (A) Jmeno/klíč: CDS
 (B) Umístění: 2....388

- (ix) Vlastnosti:
 (A) Jmeno/klíč: mat peptid
 (B) Umístění: 29...388

- (ix) Vlastnosti:
 (A) Jmeno/klíč: sig peptid
 (B) Umístění: 2....28

- (xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 16:

G ATG TTC TGG ATT CCT GCT TCC AGC AGT GAT GTT GTG ATG ACC CAA	46
Met Phe Trp Ile Pro Ala Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln	
-9 -5 1 5	
AGT CCA CTC TCC CTG CCT GTC AGT CTT GGA GAT CAA GCC TCC ATC TCT	94
Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser	
10 15 20	
TGC AGA TCT AGT AAG AGC CTT GTA CAC AGT AAT GGA AAC ACC TAT TTA	142
Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu	
25 30 35	
CAT TGG TAC CTG CAG AAG CCA GGC CAG TCT CCA AAG CTC CTG ATC TAC	190
His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr	
40 45 50	
AAA GTT TCC AAC CGA TTT TCT GGG GTC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT	238
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser	
55 60 65 70	
GGA TCA GGG ACA GAT TTC ACA CTC AAG ATC AGC AGA GTG GAG GCT GAG	286
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu	
75 80 85	
GAT CTG GGA GTT TAT TTC TGC TCT CAA AGT ACA CAT GTT CCT CCG GCG	334
Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Ala	
90 95 100	
TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA CGG GCT GAT GCT GCA CCA	382
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro	
105 110 115	
ACT GTA	388
Thr Val	
120	

(2) informace pro sekvenci č.17:

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 33 párů basí
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) typ řetězce: jednoduchý
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) Popis: /desc = "syntetická DNA"

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(ix) Popis sekvence: SEQ ID No: 17:

CTAAGGGAAT TCCGCCTCTC CTCAGACACT GAA 33

(2) informace pro sekvenci č.18 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 34 párů basí
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) typ řetězce: jednoduchý
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) Popis: /desc = "syntetická DNA"

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(ix) Popis sekvence: SEQ ID No: 18:

TTTTACTCTA GAGACCCAAG GCCTGCCTGG TTGA 34

(2) informace pro sekvenci č.19 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 33 párů basí
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) typ řetězce: jednoduchý
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) Popis: /desc = "syntetická DNA"

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(ix) Popis sekvence: SEQ ID No: 19:

AAATAGGAAT TCCAGTCTCC TCAGGCTGTC TCC 33

(2) informace pro sekvenci č.20 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 32 párů basí
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) typ řetězce: jednoduchý
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) Popis: /desc = "syntetická DNA"

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 20:

ATGATCTCTA GAGTGGTGGC ATCTCAGGAC CT 32

(2) informace pro sekvenci č.21 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 32 párů basí

- (B) typ: nukleová kyselina
 - (C) typ řetězce: jednoduchý
 - (D) topologie: lineární
- (ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina
- (A) Popis: /desc = "syntetická DNA"
- (iii) Hypotetická: ne
- (iv) anti-sense: ne
- (xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 21:
- TTGCGGAATT CCTCACCTGT CCTGGGGTTA TT 32

(2) informace pro sekvenci č.22 :

- (i) Sekvenční charakteristiky:
- (A) délka: 32 párů basí
 - (B) typ: nukleová kyselina
 - (C) typ řetězce: jednoduchý
 - (D) topologie: lineární
- (ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina
- (A) Popis: /desc = "syntetická DNA"
- (iii) Hypotetická: ne
- (iv) anti-sense: ne
- (xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 22:
- ATTGCCTCTA GAGCCTCTAA GGACAACGAG CT 32

(2) informace pro sekvenci č.23 :

- (i) Sekvenční charakteristiky:
- (A) délka: 20 párů basí
 - (B) typ: nukleová kyselina
 - (C) typ řetězce: jednoduchý
 - (D) topologie: lineární
- (ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) Popis: /desc = "syntetická DNA"
- (iii) Hypotetická: ne
- (iv) anti-sense: ne

- (xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 23:
TGGGGCCTCA GTGAAGATAT

20

(2) informace pro sekvenci č.24 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 20 párů basí
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) typ řetězce: jednoduchý
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) Popis: /desc = "syntetická DNA"
- (iii) Hypotetická: ne
- (iv) anti-sense: ne

- (xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 24:
CAATGGTGGT ACTGGCTACA

20

(2) informace pro sekvenci č.25 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 20 párů basí
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) typ řetězce: jednoduchý
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) Popis: /desc = "syntetická DNA"
- (iii) Hypotetická: ne
- (iv) anti-sense: ne

- (xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 25:

TGACATCTGA GGACTCTGCA

20

(2) informace pro sekvenci č.26 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 20 párů basí
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) typ řetězce: jednoduchý
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) Popis: /desc = "syntetická DNA"

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 26:

TCCTCAGAGA GTCAGTCCTT

20

(2) informace pro sekvenci č.27 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 20 párů basí
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) typ řetězce: jednoduchý
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) Popis: /desc = "syntetická DNA"

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 27:

TCCTTCACCT GGAACCTACCA

20

(2) informace pro sekvenci č.28 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 20 párů basí
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) typ řetězce: jednoduchý
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) Popis: /desc = "syntetická DNA"

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 28:

TCCAAGAGC ATCCTTGAAG

20

(2) informace pro sekvenci č.29 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

(A) délka: 20 párů basí

(B) typ: nukleová kyselina

(C) typ řetězce: jednoduchý

(D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) Popis: /desc = "syntetická DNA"

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 29:

AGATCTGCAT GTGCCATTC

20

(2) informace pro sekvenci č.30 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

(A) délka: 20 párů basí

(B) typ: nukleová kyselina

(C) typ řetězce: jednoduchý

(D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) Popis: /desc = "syntetická DNA"

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 30:

TCTAAACTCA TCTGCGAGGC

20

(2) informace pro sekvenci č.31 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

(A) délka: 20 párů basí

(B) typ: nukleová kyselina

(C) typ řetězce: jednoduchý

(D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) Popis: /desc = "syntetická DNA"

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 31:

GGTGACCATC GAGAACAAAG

20

(2) informace pro sekvenci č.32 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

(A) délka: 20 párů basí

(B) typ: nukleová kyselina

(C) typ řetězce: jednoduchý

(D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) Popis: /desc = "syntetická DNA"

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 32:
AGGGGTCTCA CCTTCTTGAA

20

(2) informace pro sekvenci č.33 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 20 párů basí
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) typ řetězce: jednoduchý
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) Popis: /desc = "syntetická DNA"

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 33:
TCCTTTGCCG ACATCTTCCT

20

(2) informace pro sekvenci č.34 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 20 párů basí
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) typ řetězce: jednoduchý
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) Popis: /desc = "syntetická DNA"

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 34:
GTGTGTACTG TGA CTCACAG

20

(2) informace pro sekvenci č.35 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 20 párů basí
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) typ řetězce: jednoduchý
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) Popis: /desc = "syntetická DNA"

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 35:

AACTGAACCT GAGGGAGTCA

20

(2) informace pro sekvenci č.36 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 20 párů basí
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) typ řetězce: jednoduchý
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) Popis: /desc = "syntetická DNA"

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 36:

AACTCTTGCC CCAAGAGAAG

20

(2) informace pro sekvenci č.37 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 20 párů basí
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) typ řetězce: jednoduchý
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) Popis: /desc = "syntetická DNA"

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 37:

ATCCTGACTG TGACAGAGGA

20

(2) informace pro sekvenci č.38 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

(A) délka: 20 párů basí

(B) typ: nukleová kyselina

(C) typ řetězce: jednoduchý

(D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) Popis: /desc = "syntetická DNA"

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 38:

ACAAGTCCAC TGGTAAACCC

20

(2) informace pro sekvenci č.39 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

(A) délka: 20 párů basí

(B) typ: nukleová kyselina

(C) typ řetězce: jednoduchý

(D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) Popis: /desc = "syntetická DNA"

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 39:
AGGATATCTT CACTGAGGCC 20

(2) informace pro sekvenci č.40 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 20 párů basí
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) typ řetězce: jednoduchý
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) Popis: /desc = "syntetická DNA"

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 40:
ATCCACTCAA GGCTCTTTCC 20

(2) informace pro sekvenci č.41 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 20 párů basí
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) typ řetězce: jednoduchý
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) Popis: /desc = "syntetická DNA"

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 41:
ACTGCAGAGT CCTCAGATGT 20

(2) informace pro sekvenci č.42 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 20 párů basí
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) typ řetězce: jednoduchý
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) Popis: /desc = "syntetická DNA"

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 42:

AGACGGTGAC TGAGGTTCTT

20

(2) informace pro sekvenci č.43 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 20 párů basí
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) typ řetězce: jednoduchý
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) Popis: /desc = "syntetická DNA"

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 43:

CAGGTGAAGG AAATGGTGCT

20

(2) informace pro sekvenci č.44 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 20 párů basí
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) typ řetězce: jednoduchý

(D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) Popis: /desc = "syntetická DNA"

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 44:

ATGCTCTTGG GAGACAGCAA

20

(2) informace pro sekvenci č.45 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

(A) délka: 20 párů basí

(B) typ: nukleová kyselina

(C) typ řetězce: jednoduchý

(D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) Popis: /desc = "syntetická DNA"

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 45:

CTCTGTTTTT GCCTCCGTAG

20

(2) informace pro sekvenci č.46 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

(A) délka: 20 párů basí

(B) typ: nukleová kyselina

(C) typ řetězce: jednoduchý

(D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) Popis: /desc = "syntetická DNA"

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 46:

TGGCCTCGCA GATGAGTTTA

20

(2) informace pro sekvenci č.47 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

(A) délka: 20 párů basí

(B) typ: nukleová kyselina

(C) typ řetězce: jednoduchý

(D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) Popis: /desc = "syntetická DNA"

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 47:

CCTTIGTTCT CGATGGTCAC

20

(2) informace pro sekvenci č.48 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

(A) délka: 20 párů basí

(B) typ: nukleová kyselina

(C) typ řetězce: jednoduchý

(D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) Popis: /desc = "syntetická DNA"

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 48:

TGTGGAGGAC ACGTTCTTCA

20

(2) informace pro sekvenci č.49 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 20 párů basí
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) typ řetězce: jednoduchý
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) Popis: /desc = "syntetická DNA"

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 49:

ACTTTGAGAA GCCCAGGAGA

20

(2) informace pro sekvenci č.50 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 20 párů basí
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) typ řetězce: jednoduchý
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) Popis: /desc = "syntetická DNA"

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 50:

AGATCCCTGT GAGTCACAGT

20

(2) informace pro sekvenci č.51 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 20 párů basí
- (B) typ: nukleová kyselina

- (C) typ řetězce: jednoduchý
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) Popis: /desc = "syntetická DNA"

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 51:

AGCAGGTGGA TGTTTGTGCA

20

(2) informace pro sekvenci č.52 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

(A) délka: 20 párů basí

(B) typ: nukleová kyselina

(C) typ řetězce: jednoduchý

(D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) Popis: /desc = "syntetická DNA"

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 52:

TGAAGCCACT GCACACTGAT

20

(2) informace pro sekvenci č.53 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

(A) délka: 20 párů basí

(B) typ: nukleová kyselina

(C) typ řetězce: jednoduchý

(D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) Popis: /desc = "syntetická DNA"

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 53:

AGTTCCATTC CTCCTCTGTC

20

(2) informace pro sekvenci č.54 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

(A) délka: 20 párů basí

(B) typ: nukleová kyselina

(C) typ řetězce: jednoduchý

(D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) Popis: /desc = "syntetická DNA"

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 54:

TGTGTCAGAC ATGATCAGGG

20

(2) informace pro sekvenci č.55 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

(A) délka: 20 párů basí

(B) typ: nukleová kyselina

(C) typ řetězce: jednoduchý

(D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) Popis: /desc = "syntetická DNA"

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 55:

TGAAGTTGCC TGTTAGGCTG

20

(2) informace pro sekvenci č.56 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 20 párů basí
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) typ řetězce: jednoduchý
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) Popis: /desc = "syntetická DNA"

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 56:

CTTGGAGATC AAGCCTCCAT

20

(2) informace pro sekvenci č.57 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 20 párů basí
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) typ řetězce: jednoduchý
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) Popis: /desc = "syntetická DNA"

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 57:

GCTGAGGATC TGGGAGTTTA

20

(2) informace pro sekvenci č.58 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 20 párů basí

- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) typ řetězce: jednoduchý
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) Popis: /desc = "syntetická DNA"

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 58:

GATGCTGCAC CAACTGTATC

20

(2) informace pro sekvenci č.59 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

(A) délka: 20 párů basí

(B) typ: nukleová kyselina

(C) typ řetězce: jednoduchý

(D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) Popis: /desc = "syntetická DNA"

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 59:

CGACAAAATG GCGTCCTGAA

20

(2) informace pro sekvenci č.60 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

(A) délka: 20 párů basí

(B) typ: nukleová kyselina

(C) typ řetězce: jednoduchý

(D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) Popis: /desc = "syntetická DNA"
- (iii) Hypotetická: ne
- (iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 60:
ACGTTGACCA AGGACGAGTA 20

(2) informace pro sekvenci č.61 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 20 párů basí
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) typ řetězce: jednoduchý
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) Popis: /desc = "syntetická DNA"
- (iii) Hypotetická: ne
- (iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 61:
ATCTGCAAGA GATGGAGGCT 20

(2) informace pro sekvenci č.62 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 20 párů basí
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) typ řetězce: jednoduchý
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) Popis: /desc = "syntetická DNA"
- (iii) Hypotetická: ne
- (iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 62:

ACCCCAGAAA ATCGGTTGGA

20

(2) informace pro sekvenci č.63 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 20 párů basí
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) typ řetězce: jednoduchý
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) Popis: /desc = "syntetická DNA"
- (iii) Hypotetická: ne
- (iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 63:

CCGGAGGAAC ATGTGTACTT

20

(2) informace pro sekvenci č.64 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 20 párů basí
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) typ řetězce: jednoduchý
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) Popis: /desc = "syntetická DNA"
- (iii) Hypotetická: ne
- (iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 64:

TCGTCATAC TCGTCCTTGG

20

(2) informace pro sekvenci č.65 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 20 párů basí
 - (B) typ: nukleová kyselina
 - (C) typ řetězce: jednoduchý
 - (D) topologie: lineární
- (ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina
- (A) Popis: /desc = "syntetická DNA"
- (iii) Hypotetická: ne
- (iv) anti-sense: ne
- (xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 65:
CATCTCAGGA CCTTTGTCTC 20

(2) informace pro sekvenci č.66 :

- (i) Sekvenční charakteristiky:
- (A) délka: 20 párů basí
 - (B) typ: nukleová kyselina
 - (C) typ řetězce: jednoduchý
 - (D) topologie: lineární
- (ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina
- (A) Popis: /desc = "syntetická DNA"
- (iii) Hypotetická: ne
- (iv) anti-sense: ne
- (xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 66:
CACCTGTCCT GGGGTTATTT 20

(2) informace pro sekvenci č.67 :

- (i) Sekvenční charakteristiky:
- (A) délka: 20 párů basí
 - (B) typ: nukleová kyselina
 - (C) typ řetězce: jednoduchý
 - (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) Popis: /desc = "syntetická DNA"

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 67:

AGACAAGATG AAGACCCACC

20

(2) informace pro sekvenci č.68 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

(A) délka: 20 párů basí

(B) typ: nukleová kyselina

(C) typ řetězce: jednoduchý

(D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) Popis: /desc = "syntetická DNA"

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 68:

AAGCGACCAT TCTTGCTGAC

20

(2) informace pro sekvenci č.69 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

(A) délka: 20 párů basí

(B) typ: nukleová kyselina

(C) typ řetězce: jednoduchý

(D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) Popis: /desc = "syntetická DNA"

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 69:
ATATCTCTGA TCCCACCTCC

20

(2) informace pro sekvenci č.70 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 20 párů basí
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) typ řetězce: jednoduchý
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) Popis: /desc = "syntetická DNA"

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 70:
GAAATGCGAT CCTGTGGAAG

20

(2) informace pro sekvenci č.71 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 20 párů basí
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) typ řetězce: jednoduchý
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) Popis: /desc = "syntetická DNA"

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 71:
CTATACCACT ATGGTCCCAC

20

(2) informace pro sekvenci č.72 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 20 párů basí
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) typ řetězce: jednoduchý
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) Popis: /desc = "syntetická DNA"
- (iii) Hypotetická: ne
- (iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 72:

AGAAGCAGGT GGGTCTTCAT

20

(2) informace pro sekvenci č.73 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 20 párů basí
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) typ řetězce: jednoduchý
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) Popis: /desc = "syntetická DNA"
- (iii) Hypotetická: ne
- (iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 73:

TAGAGGTAAC TCGGGTACAC

20

(2) informace pro sekvenci č.74 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 20 párů basí
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) typ řetězce: jednoduchý
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) Popis: /desc = "syntetická DNA"

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 74:

AAGTTCCTTC TCAGTGGGGA 20

20

(2) informace pro sekvenci č.75 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

(A) délka: 20 párů basí

(B) typ: nukleová kyselina

(C) typ řetězce: jednoduchý

(D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) Popis: /desc = "syntetická DNA"

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 75:

GGTGGCAGTA ACAACCTGAT

20

(2) informace pro sekvenci č.76 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

(A) délka: 20 párů basí

(B) typ: nukleová kyselina

(C) typ řetězce: jednoduchý

(D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) Popis: /desc = "syntetická DNA"

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 76:
 CATGATACCT AAGTGGGACC 20

(2) informace pro sekvenci č.77 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 37 párů basí
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) typ řetězce: jednoduchý
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) Popis: /desc = "syntetická DNA"
- (iii) Hypotetická: ne
- (iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 77:
 GGGGAATTCC AGTACGGAGT TGGGGAAGCT CTT 37

(2) informace pro sekvenci č.78 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 35 párů basí
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) typ řetězce: jednoduchý
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) Popis: /desc = "syntetická DNA"
- (iii) Hypotetická: ne
- (iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 78:
 GTTCTTCTG CCTCTGTCAC CAAGTTAGAT CTGGA 35

(2) informace pro sekvenci č.79 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 35 párů basí
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) typ řetězce: jednoduchý
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) Popis: /desc = "syntetická DNA"

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 79:

TCCAGATCTA ACTTGGTGAC AGAGGCAGAA GAAAC

35

(2) informace pro sekvenci č.80 :

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 28 párů basí
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) typ řetězce: jednoduchý
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) Popis: /desc = "syntetická DNA"

(iii) Hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence: SEQ ID No: 80:

CCCTCTAGAC GCGTCACGTG GGCATCAC

28

FIG 1.

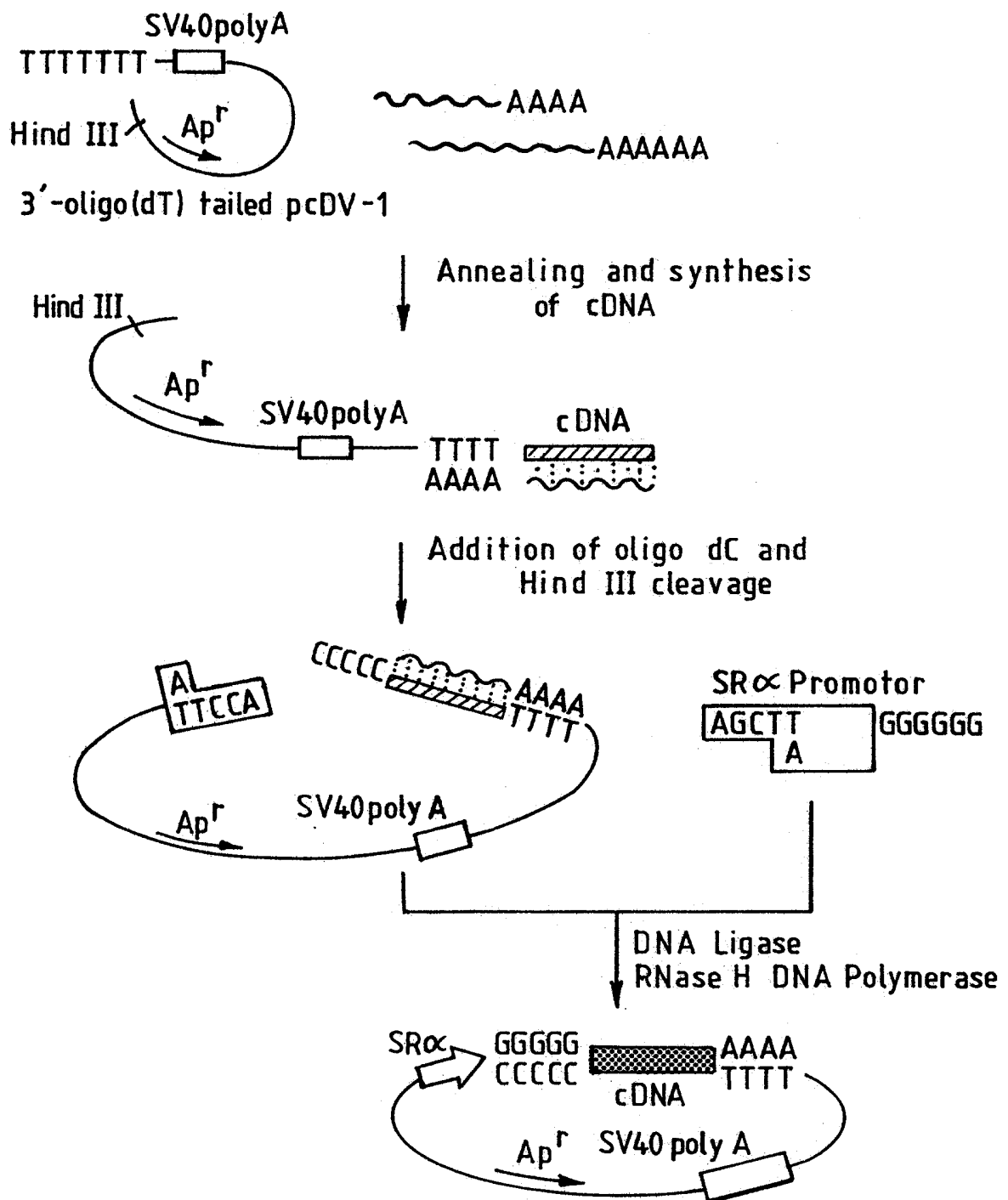
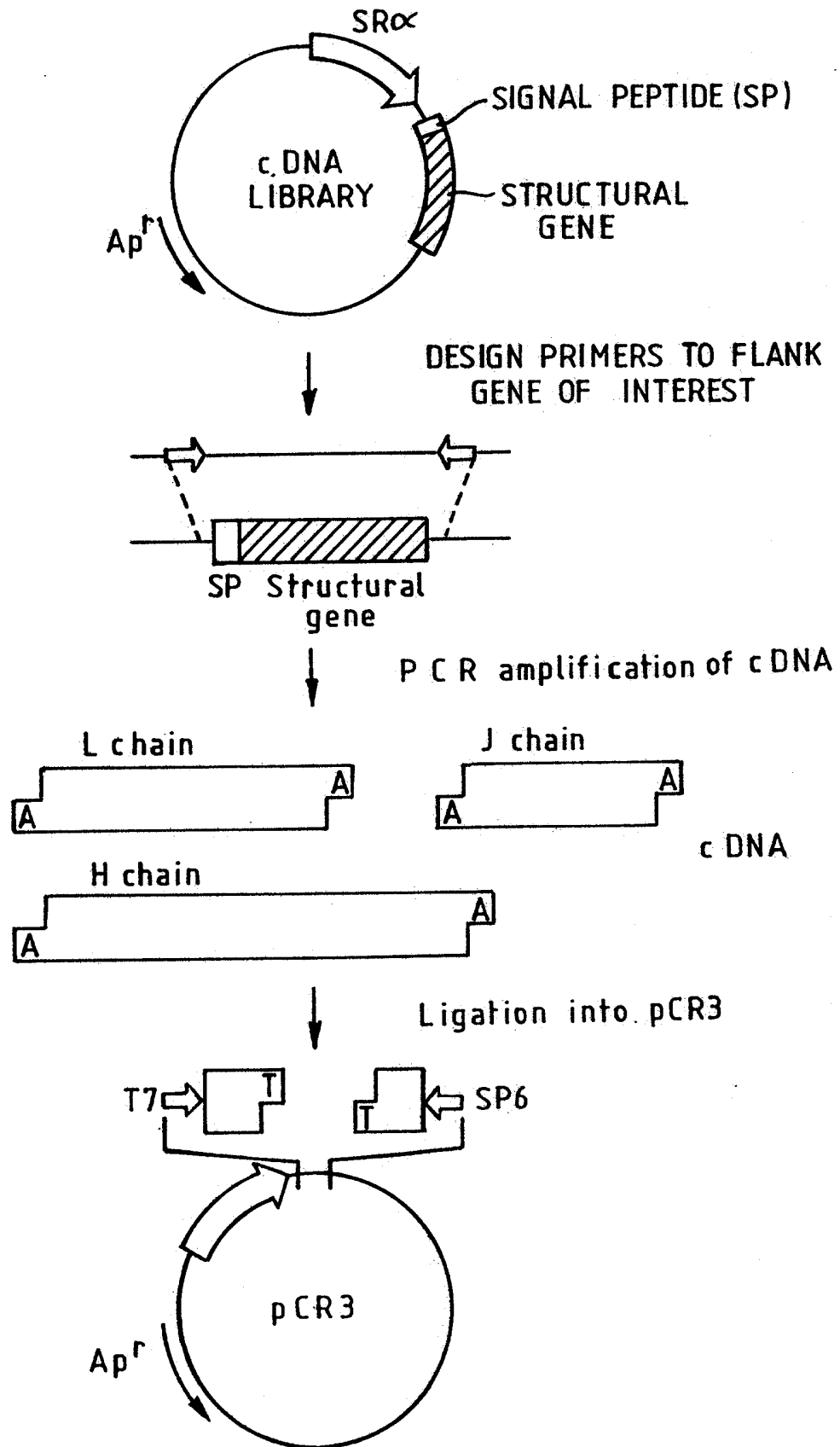


FIG. 2.



P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Rekombinantní protein obsahující alespoň jeden region korespondující variabilnímu regionu imunoglobulinu, kde tento alespoň jeden region umožňuje proteinu rozpoznat a specificky vázat antigen, kde antigenem je lidský Fas, a kde protein nemá v podstatě vyšší imunogenicitu u lidských pacientů než lidská protilátka.
2. Protein podle nároku 1, který se skládá v podstatě z pouze jednoho variabilního regionu.
3. Protein podle nároku 1, který se skládá v podstatě ze dvou variabilních regionů, jednoho variabilního regionu korespondujícího s variabilním regionem H řetězce a druhého s variabilním regionem L řetězce.
4. Protein podle nároku 1 nebo 3, kde jsou variabilní regiony spojeny flexibilní peptidovou vazbou.
5. Protein podle nároků 1,3 nebo 4, který má alespoň dva variabilní regiony, kde jsou variabilní regiony odvozeny od jedné monoklonální protilátky.
6. Protein podle nároku 5, kde jsou variabilní regiony integrálně navázány na lidské konstantní regiony.
7. Protein podle nároku 5 nebo 6, ve kterém variabilní regiony korespondují buď variabilnímu regionu H řetězce, nebo variabilnímu regionu L řetězce, a jsou jednotlivě vázány na konstantní region H řetězce nebo konstantní region L řetězce, podle příslušnosti.

8. Protein podle jakéhokoliv z nároků 5 až 7, ve kterém jsou variabilní regiony každý příslušnou částí většího polypeptidu a dva polypeptidy asociují za tvorby heterodimeru protilátky.

9. Protein podle jakéhokoliv z nároků 5 až 8, kde jsou variabilní regiony buď identické, nebo těsně korespondují s variabilními regiony CH11.

10. Genetickým inženýrstvím zpracovaný imunoglobulinový protein, který se specificky váže na lidský Fas, kde se imunoglobulinový protein skládá z podjednotky H řetězce a podjednotky L řetězce, kde se podjednotka H řetězce skládá z aminokyselinové sekvence representované následujícím obecným vzorcem (I):



kde FRH_1 representuje aminokyselinovou sekvenci obsahující 13 až 30 aminokyselinových residuí, $CDRH_1$ representuje aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO.1, FRH_2 representuje aminokyselinovou sekvenci obsahující 14 aminokyselinových residuí, $CDRH_2$ representuje aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO.2, FRH_3 representuje aminokyselinovou sekvenci obsahující 32 aminokyselinových residuí, $CDRH_3$ representuje aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO.3, a FRH_4 representuje aminokyselinovou sekvenci obsahující 11 aminokyselinových residuí, kde každá aminokyselinová sekvence je navázána na druhou prostřednictvím peptidové vazby.

kde se uvedená podjednotka L řetězce skládá z aminokyselinové sekvence representované následujícím obecným vzorcem (II):



kde FRL_1 representuje aminokyselinovou sekvenci obsahující 23 aminokyselinových residuí, $CDRL_1$ representuje aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO.4, FRL_2 representuje aminokyselinovou sekvenci obsahující 15 aminokyselinových residuí, $CDRL_2$ representuje

aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO.5, FRL₃ reprezentuje aminokyselinovou sekvenci obsahující 32 aminokyselinových residuí, CDRL₃ reprezentuje aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO.6, a FRL₄ reprezentuje aminokyselinovou sekvenci obsahující 10 aminokyselinových residuí, kde každá aminokyselinová sekvence je navázána na druhou prostřednictvím peptidové vazby.

11. Protein podle nároku 10, kde podjednotka H řetězce obsahuje aminokyselinovou sekvenci reprezentovanou aminokyselinami č.1 až 116 SEQ ID NO. 8.

12. Protein podle nároku 10 nebo 11, kde podjednotka L řetězce obsahuje aminokyselinovou sekvenci reprezentovanou aminokyselinami č.1 až 112 SEQ ID NO. 10.

13. Protein podle nároku 11 nebo 12, kde podjednotka H řetězce obsahuje aminokyselinovou sekvenci reprezentovanou aminokyselinami č.1 až 571 SEQ ID NO. 8.

14. Protein podle nároku 11, 12 nebo 13, kde podjednotka L řetězce obsahuje aminokyselinovou sekvenci reprezentovanou aminokyselinami č.1 až 219 SEQ ID NO. 10.

15. RNA kodující protein podle jakéhokoliv z předchozích nároků.

16. DNA kodující protein podle jakéhokoliv z nároků 1 až 14.

17. DNA kodující peptid vzorce (I) jak je definován v nároku 10.

18. DNA podle nároku 17, která obsahuje nukleotidovou sekvenci reprezentovanou nukleotidy č. 58 až 405 SEQ ID NO.7.

19. DNA, která hybridizuje s DNA podle nároku 18, kde sense řetězec koresponduje k hybridizující DNA kodující podjednotku H řetězce imunoglobulinu ^{sch}spojnou specifické vazby na lidský Fas spolu s podjednotkou L řetězce, obsahující aminokyselinovou sekvenci obecného vzorce (II), jak je definována v nároku 10.

20. Hybridizující DNA podle nároku 19, která hybridizuje při 60 až 70 °C a v 6 x SSC.
21. DNA kodující pro podjednotku L řetězce, která obsahuje aminokyselinovou sekvenci reprezentovanou obecným vzorcem (II), jak je definován v nároku 10.
22. DNA podle nároku 21, která obsahuje nukleotidovou sekvenci reprezentovanou nukleotidy č. 58 až 393 SEQ ID NO.9.
23. DNA, která hybridizuje s DNA podle nároku 22, kde sense řetězec koresponduje k hybridizující DNA kodující podjednotku L řetězce imunoglobulinu schopnou specifické vazby na lidský Fas spolu s podjednotkou H řetězce, obsahující aminokyselinovou sekvenci obecného vzorce (I), jak je definována v nároku 10.
24. Hybridizující DNA podle nároku 23, která hybridizuje při 60 až 70 °C a v 6 x SSC.
25. Vektor obsahující DNA podle jakéhokoliv z nároků 16 až 24.
26. Vektor podle nároku 25, který je expresním vektorem.
27. Vektor vybraný z pCR3-H123 a pCR3-L103.
28. Hostitelská buňka transformovaná expresním vektorem podle jakéhokoliv z nároků 25 až 27.
29. E.coli pCR3-H123 (FERM BP-5247).
30. E.coli pCR3-L103 (FERM BP-5248).
31. Způsob produkce imunoglobulinového proteinu který specificky rozpoznává lidský Fas antigen, který obsahuje kultivaci buněk podle jakéhokoliv z nároků 28 až 30 za podmínek, které umožňují expresi DNA kodující podjednotku H řetězce nebo L řetězce

obsaženou ve vektoru, a odběr imunoglobulinového proteinu z kultury.

32. Použití CDR vybraných ze CDRH₁, CDRH₂, CDRH₃ a CDRL₁, CDRL₂, CDRL₃, jak je definováno v nároku 10, a jejich kombinací, v konstrukci humanizovaných protilátek.

33. Použití DNA kodující CDR vybrané z CDRH₁, CDRH₂, CDRH₃ a CDRL₁, CDRL₂, CDRL₃, jak je definováno v nároku 10, a jejich kombinací, v konstrukci DNA kodující humanizované protilátky.

34. Použití proteinu podle jakéhokoliv z nároků 1 až 14 v přípravě léčiva pro léčbu autoimunitních chorob.

35. Použití podle nároku 34, ve kterém je autoimunitní chorobou revmatismus.