

(12) **PŘEKLAD EVROPSKÉHO
PATENTOVÉHO SPISU**

(10)
CZ/EP 1 916 001 T3

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

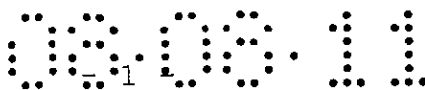
- (96) Datum podání evropské přihlášky: **04.03.2003**
(96) Číslo evropské přihlášky: **EP 07023361.4**
(97) Datum zveřejnění evropské přihlášky: **30.04.2008**
(97) Číslo evropského patentu: **EP 1916001**
(97) Datum oznámení o udělení evropského patentu: **25.05.2011**
(30) Právo přednosti:
04.03.2002 US 361783 P
(47) Datum zveřejnění překladu evropského patentového spisu: **07.09.2011**
(**Věstník č. 36/2011**)

(51) Int. Cl.:

A 61 K 39/395 (2006.01)
A 61 P 35/00 (2006.01)
C 07 K 16/28 (2006.01)

- (73) Majitel patentu:
Imclone LLC, New York, NY 10014, US
- (72) Původce:
Zhu, Zhenping, Oakland, NJ 07436, US
- (74) Zástupce:
Společná advokátní kancelář Všečeka Zelený Švorčík Kalenský a partneři, JUDr. Otakar Švorčík, Hálkova 2, 12000
Praha 2

- (54) Název vynálezu:
Lidské protilátky specifické pro KDR a jejich použití



LIDSKÉ PROTILÁTKY SPECIFICKÉ PRO KDR A JEJICH POUŽITÍ

Popis

[0001] Předmětný vynález popisuje lidské protilátky, které se váží na KDR, blokují navázání KDR k vaskulárnímu endoteliálnímu růstovému faktoru (VEGFR) a neutralizují aktivaci KDR. Protílátky se používají k léčbě neoplastického onemocnění a hyperproliferativní poruchy. Mohou se použít samotné nebo v kombinaci s jinými VEGFR antagonisty a s antagonisty receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR).

Dosavadní stav techniky

[0002] Angiogeneze je vysoce komplexní proces vývoje nových cév, který zahrnuje proliferaci a migraci a tkáňovou infiltraci buněk kapilárního endotelu z už existujících cév, agregaci buněk do tubulárních struktur, napojení nově vytvořených tubulárních struktur do uzavřeného vaskulárního systému a maturaci nově vytvořených kapilár.

[0003] Angiogeneze nachází důležité uplatnění v normálních fyziologických procesech, které zahrnují vývoj embryí, růst folikul a hojení ran, stejně jako u patologických stavů, jako je růst nádoru, a u onemocnění s abnormální neovaskularizací, která nejsou neoplastická, jako je neovaskulární glaukom (Folkman, J. and Klagsbrun, M., Science, 235:442-7 (1987)). Jiná stádia onemocnění zahrnují bez omezení neoplastická onemocnění, jako jsou bez omezení solidní nádory, ateroskleróza a jiná zánětlivá onemocnění, jako je revmatoidní artritida, a oftalmologické stavy, jako je diabetická retinopatie a degenerace makuly spojená se stárnutím. Stavy a onemocnění zahrnující perzistentní nebo neřízenou angiogenezi se nazývají angiogeneze-dependentní nebo angiogeneze-asociovaná onemocnění.

[0004] Jedním způsobem kontroly takových onemocnění a patologických stavů je omezení přívodu krve do buněk, které se podílí na onemocnění nebo způsobují taková onemocnění nebo stavy, na-

příklad okluze cév přivádějících krev do části orgánů, kde se vyskytují nádory. Takové přístupy vyžadují lokalizaci místa výskytu uvedeného nádoru a omezením také je ošetření jediného specifického místa nebo malého počtu těchto míst. Další nevýhodou přímé mechanické restriktce přívodu krve je vývoj kolaterálních cév. Tento vývoj probíhá často tak rychle, že se obnoví prokrvení nádoru.

[0005] Jiné přístupy se zaměřují na modulaci faktorů, které se podílí na regulaci angiogeneze. Vaskulární endoteliální proliferace je silně regulována dokonce i během angiogeneze. VEGF je regulátor angiogeneze *in vivo* (Klagsbrun, M. and D'Amore, P., Annual Rev. Physiol., 53: 217-39 (1991)).

[0006] Endoteliální buněčný specifický mitogen, kterým je VEGF, působí jako induktor angiogeneze. VEGF specificky podporuje proliferaci endoteliálních buněk. Je to homodimerní glykoprotein tvořený ze dvou jednotek o velikosti 23 kD. Při alternativním sestřihu mRNA vznikají čtyři různé identifikované monomerní izoformy VEGF. Zahrnují dvě formy vázané na membránu (VEGF206 a VEGF189) a dvě rozpustné formy (VEGF165 a VEGF121). VEGF165 je nejrozšířenější izoforma v lidské tkáni s výjimkou placenty.

[0007] VEGF se exprimuje v embryonálních tkáních (Breier et al., Development, 114:521-32 (1992)), v makrofágách a proliferujících epidermálních keratinocytech během hojení ran (Brown et al., J. Exp. Med 176:1375-9 (1992)) a může zodpovídat za otok tkáně spojený se zánětem (Ferrara et al., Endocr. Rev., 13:18-32 (1992)). Hybridizační studie *in situ* ukázaly silnou expresi VEGF v řadě lidských nádorových liniích, které zahrnují multifornní glioblastom, hemangioblastom, jiné nádory centrálního nervového systému a Kaposiho sarkom spojený s AIDS (Plate, K. et al., Nature, 359:845-8 (1992); Plate, K. et al., Cancer Res., 53:5822-7 (1993); Berkman, R. et al., J. Clin. Invest., 91:153-9 (1993); Nakamura, S. et al., AIDS Weekly, 13 (1) (1992)). Silná exprese VEGF se zjistila v aterosklerotických lézích, placích a v zánětlivých buňkách.

[0008] VEGF biologicky působí prostřednictvím vysokoafinitních VEGF receptorů. Tyto receptory jsou selektivně exprimovány na endoteliálních buňkách, například při embryogenezi (Millauer, B. et al. *Cell*, 72:835-46 (1993)) a při tvorbě nádorů, a podílejí se na modulaci angiogeneze a růstu nádorů. Uvedené receptory obsahují cytosolickou doménu tyrozinkinázy, která iniciuje signalizační dráhu zahrnutou v procesu růstu buněk.

[0009] Typickými VEGF receptory jsou tyrozinkinázové receptory třídy III charakterizované tím, že obsahují ve svých N-terminálních extracelulárních receptorových doménách vázajících ligand v typickém případě 5 nebo 7 imunoglobulinu-podobných smyček (Kaipainen et al., *J. Exp. Med.*, 178:2077-88 (1993)). Další dvě oblasti zahrnují transmembránovou oblast a C-terminální intracelulární katalytickou doménu přerušenu inzertem různě dlouhých sekvencí hydrofilní interkinázy, která se nazývá kinázová inzerční doména (Terman et al., *Oncogene*, 6:1677-83 (1991)). Receptory VEGF zahrnují fms-podobný tyrozinkinázový receptor (flt-1), také označený VEGFR-1, jehož sekvence se uvádí v publikaci Shibuya et al., *Oncogene*, 5:519-24 (1990). Dále uvedené receptory zahrnují receptor obsahující kinázovou inzerční doménu/fetální jaterní kináza (KDR/flk-1), také označený VEGFR-2, popsany v dokumentu WO 92/14248, podaném 20. února 1992 a v publikaci Terman et al., *Oncogene*, 6:1677-83 (1991). Jeho sekvence se uvádí v publikaci Matthews et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 88:9026-30 (1991). VEGF se váže i na jiné receptory. Jiný tyrozinkinázový receptor VEGFR-3 (flt-4) se váže na homology VEGF, jsou to VEGF-C a VEGF-D, a je důležitý při vývoji lymfatických drah.

[0010] Uvolňování VEGF v nádoru stimuluje angiogenezi v přilehlých endoteliálních buňkách. Pokud se VEGF exprimuje v nádoru, endoteliální buňky sousedící s VEGF+ nádorovými buňkami vykazují silnou expresi VEGF receptorů, například VEGFR-1 a VEGFR-2. Obecně je známo, že KDR/VEGFR-2 je hlavní transduktor signálu VEGF, který vede k proliferaci, migraci, diferenciaci endoteliálních buněk, k tvorbě tubulárních struktur, zvýšení vaskulární permeability a udržování vaskulární integrity.

VEGFR-1 vykazuje daleko slabší kinázovou aktivitu a není schopen generovat mitogenní odezvu, pokud je stimulován VEGF, ačkoli se váže na VEGF s afinitou, která je přibližně desetkrát vyšší než u KDR. VEGFR-1 se také podílí na migraci monocytů a makrofágů vyvolané VEGF a placentárním růstovým faktorem (PlGF) a na produkci tkáňového faktoru.

[0011] Endoteliální buňky infiltrující gliomy například silně exprimují VEGFR-2 (Plate, K. et al. (1992)). Exprese těchto receptorů je zesílena VEGF produkovaným lidskými glioblastomy (Plate, K. et al. (1993)). Silná exprese VEGFR-2 v endoteliálních buňkách asociovaných s glioblastomy (GAEC) naznačuje, že aktivita receptorů je vyvolána během tvorby nádorů, protože transkripty VEGFR-2 jsou v normálních endoteliálních buňkách mozku sotva detekovatelné, což indikuje vytvoření parakrinní smyčky VEGF/VEGFR. Tato zesílená exprese se potvrdila u vaskulárních endoteliálních buněk v blízkosti nádoru. Blokace VEGF aktivity neutralizačními anti-VEGF monoklonálními protilátkami (mAb) vede k inhibici růstu lidských nádorových xenograftů u nahých myši (Kim, K. et al. Nature, 362:841-4 (1993)), což naznačuje přímou úlohu VEGF při angiogenezi spojené s nádorem.

[0012] Antagonisté VEGFR se vyvinuly k léčbě vaskularizovaných nádorů a jiných angiogenních onemocnění. Zahrnují neutralizační protilátky, které blokují signalizaci pomocí VEGF receptorů exprimovaných na vaskulárních endoteliálních buňkách, přičemž dochází k omezení růstu nádorů blokací angiogeneze prostřednictvím endotel-dependentní parakrinní smyčky (popisuje se v dokumentech patent USA č. 6,365,157 (Rockwell et al.), WO 00/44777 (Zhu et al.), WO 01/154723 (Kerbel); WO 01/74296 (Witte et al.), WO 01/90192 (Zhu), WO 03/002144 (Zhu) a WO 03/000183 (Carmeliet et al.).

[0013] Výskyt VEGF receptorů se také potvrdil na některých buňkách, které tvoří endotel, jako jsou nádorové buňky produkující VEGF. Autokrinní smyčky nezávislé na endotelu vznikají, aby podpořily růst nádorů. VEGF se například exprimuje beze změn skoro ve všech vytvořených leukemických buněčných liniích

a v čerstvě izolovaných lidských leukemických malignitách. VEGFR-2 a VEGFR-1 se dále exprimují u určitých lidských leukemiích (popisuje se v publikacích Fielder et al., Blood 89:1870-5 (1997); Bellamy et al., Cancer Res. 59:728-33 (1999)). Ukázalo se, že autokrinní smyčka VEGF/VEGFR-2 zprostředkovává přežití a migraci leukemických buněk *in vivo* (popisuje se v publikaci Dias et al., J. Clin. Invest. 106:511-21 (2000); a v dokumentu WO 01/74296 (Witte et al.). Podobně, produkce VEGF a exprese VEGFR se také zaznamenala v některých buněčných liniích solidních nádorů *in vivo* (popisuje se v publikaci Sato, K. et al., Tohoku J. Exp. Med., 185: 173-84 (1998); Ishii, Y., Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi, :47: 133-40 (1995); a Ferrer, F.A. et al., Urology, 54:567-72 (1999)). Dále se ukázalo, že VEGFR-1 Mab inhibují autokrinní smyčku VEGFR/lidský VEGFR-1 v buňkách karcinomu prsu (popisuje se v publikaci Wu, et al., "Monoclonal antibody against VEGFR1 inhibits flt1-positive DU4475 human breast tumor growth by a dual mechanism involving anti-angiogenic and tumor cell growth inhibitory activities," AACR NCI EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics, Oct. 29-Nov. 2, 2001, Abstract #7.

V publikaci Lu et al (International Journal of Cancer, NY; USA; Vol. 97, Jan 2002, pages 393-399) se popisují izolované vysokoafinitní lidské Fab fragmenty určené proti KDR získané z protilátkové fágové knihovny.

[0014] Je nutné vytvořit činidla, která inhibují VEGF receptorovou aktivitu, k léčbě nebo prevenci VEGFR-dependentních onemocnění nebo stavů inhibicí například patogenní angiogeneze nebo nádorového růstu prostřednictvím inhibice parakrinní a/nebo autokrinní smyčky VEGF/VEGFR.

Souhrn vynálezu

[0015] Předmětný vynález popisuje lidské protilátky a jejich části, které se vážou na KDR, blokují navázání vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF) na KDR a neutralizují aktivaci KDR, jak se definuje v nárocích. Vynález popisuje izolovanou protilátku nebo její fragment, která se selektivně váže

na receptor obsahující lidskou kinázovou inzerční doménu (KDR), přičemž uvedená protilátka nebo její fragment obsahuje oblasti určující komplementaritu reprezentované sekvencemi SEQ ID NO: 81 v CDRL1; SEQ ID NO: 82 v CDRL2; SEQ ID NO: 83 v CDRL3; SEQ ID NO: 13 v CDRH1; SEQ ID NO: 14 v CDRH2 a SEQ ID NO: 15 v CDRH3.

Protilátka nebo její fragment s výhodou obsahují variabilní doménu lehkého řetězce reprezentovanou sekvencí SEQ ID NO: 53 a variabilní doménu těžkého řetězce reprezentovanou sekvencí SEQ ID NO: 24.

Protilátka nebo její fragment podle vynálezu se s výhodou vybrala ze skupiny tvořené jednořetězcovou protilátkou, Fab, jednořetězcovým Fv, diabody a triabody.

Vynález dále popisuje izolovaný polynukleotid, který obsahuje nukleotidovou sekvenci, která kóduje protilátku nebo fragment podle vynálezu, expresivní vektor obsahující polynukleotid SEQ ID NO: 52 a rekombinantní hostitelskou buňku obsahující uvedený expresivní vektor.

Protilátky se používají k léčbě neoplastických onemocnění zahrnujících například solidní nádory a hematologické malignity. Protilátky se mohou také použít k léčbě hyperproliferativních poruch. Vynález popisuje způsoby neutralizace aktivace KDR, způsoby inhibice růstu nádoru zahrnující inhibici angiogeneze spojené s nádorem a metody léčby jiných poruch spojených angiogenezí. Vynález dále popisuje kity, které obsahují lidské protilátky nebo fragmenty protilátek vázající se na VEGFR receptory, jak je definováno v patentových nárocích.

[0016] Protilátky se mohou použít samotné nebo v kombinaci s jinými VEGFR antagonisty a/nebo s inhibitory angiogeneze, jako jsou například antagonisté receptoru epidermálního růstového faktor (EGFR). Vynález také popisuje molekuly nukleové kyseliny, které kódují tyto protilátky.

[0017] Zkratky: VEGF, vaskulární endoteliální růstový faktor; bFGF, bazický fibroblastový růstový faktor; KDR, receptor obsahující kinázovou inzerční doménu (také znám jako VEGFR-2); FLK-1, fetální jaterní kináza; scFv, jednořetězcový fragment

Fv; HUVEC, lidské endoteliální buňky umbilikální vény; PBS, fyziologický roztok pufrovaný 0,01 M fosforečnanem (pH 7,2); PBST, PBS obsahující 0,1 % Tween-20; AP, alkalická fosfatáza; EGF, epidermální růstový faktor; V_E variabilní oblast těžkého řetězce imunoglobulinu a V_L variabilní oblast lehkého řetězce imunoglobulinu.

Popis obrázků na výkrese

[0018] Obrázek 1 zobrazuje identifikaci a expresi lidských anti-KDR Fab fragmentů. Obr. 1A: paterny štěpení restriktivním enzymem *Bst*NI čtyř neutralizačních anti-KDR Fab. Obr. 1B: analýza SDS-PAGE izolovaných Fab fragmentů za neredukčních podmínek. Dráha 1, D1F7; dráha 2, D2C6; dráha 3, D1H4; dráha 4, D2H2.

[0019] Obrázek 2 znázorňuje navázání na KDR, blokace interakce KDR/VEGF a blokace interakce Flk-1/VEGF lidskými anti-KDR Fab fragmenty. Obr. 2A: Na dávce závislé navázání lidského anti-KDR Fab na imobilizovaný KDR. Obr. 2B: inhibice navázání KDR na imobilizovaný VEGF pomocí anti-KDR Fab. Obr. 2C: Inhibice navázání Flk-1 na imobilizovaný VEGF pomocí anti-KDR Fab. Různá množství proteinů Fab se inkubovala s pevným množstvím KDR-AP (2B) nebo Flk-1-AP (2C) v roztoku při teplotě místnosti jednu hodinu.

[0020] Obrázek 3 znázorňuje mapování epitopu anti-KDR Fab fragmentů. KDR-AP, jeho AP varianty s delecí v doménách a Flk-AP se zachytily na destičce s 96 prohlubněmi a inkubovaly se s lidskými anti-KDR Fab fragmenty. Data jsou prezentována v poměru k navázání Fab fragmentů na KDR v plné délce.

[0021] Obrázek 4 znázorňuje inhibici mitogeneze buněk HUVEC vyvolané VEGF lidskými anti-KDR Fab fragmenty. Různá množství anti-KDR Fab fragmentů se přidalo do duplikovaných prohlubní a inkubovaly se při teplotě 37 °C jednu hodinu. Pak se do prohlubní přidal VEGF tak, aby konečná koncentrace byla 16 ng/ml. Buňky se shromáždily a stanovila se začleněná radioaktivita v DNA.

[0022] Obrázek 5 znázorňuje inhibici migrace lidských leukemických buněk stimulovanou VEGF pomocí anti-KDR Fab fragmentů. Obr. 5A: VEGF podporuje migraci buněk HL60 a HEL způsobem závislým na dávce. Obr. 5B: Inhibice migrace lidských leukemických buněk stimulované VEGF pomocí anti-KDR Fab fragmentů. Množství KDR-AP vázané na imobilizovaný VEGF se stanovilo inkubací destiček s AP substrátem a destičky se odečítaly při 405 nm.

[0023] Obrázek 6 znázorňuje navázání na KDR a blokaci interakce KDR/VEGF lidskými anti-KDR protilátkami. Obr. 6A: Na dávce závislé navázání anti-KDR na imobilizovaný KDR. Různá množství protilátek se inkubovala při teplotě místnosti jednu hodinu na destičkách s 96 prohlubněmi potaženými KDR. Obr. 6B: Inhibice navázání KDR na imobilizovaný VEGF lidskými anti-KDR protilátkami. Různá množství protilátek se inkubovala se stejným množstvím KDR-AP v roztoku při teplotě místnosti jednu hodinu.

[0024] Obrázek 7 znázorňuje inhibici navázání VEGF a mitogeneze buněk HUVEC vyvolané VEGF. Obr. 7A: Inhibice navázání radioaktivně značeného VEGF na KDR na buněčném povrchu lidskými anti-KDR protilátkami. Různá množství anti-KDR protilátek se smíchalo s 2 ng ^{125}I značeného VEGF₁₆₅ a přidala se k monovrstvě buněk HUVEC s 80 až 90 % konfluencí. Buňky se inkubovaly při teplotě místnosti 2 hodiny, promyly se a stanovila se vázaná radioaktivita. Obr. 7B: Inhibice mitogeneze buněk HUVEC vyvolaná VEGF lidskými anti-KDR protilátkami. Různá množství lidských anti-KDR protilátek se inkubovala s buňkami HUVEC jednu hodinu. Pak se přidal VEGF. Buňky se shromáždily a stanovila se radioaktivita začleněná v DNA.

[0025] Obr. 8 znázorňuje expresi KDR a VEGF lidskými leukemickými buňkami. Obr. 8A: množství vybrané mRNA se stanovila RT-PCR. Dráha 1: marker molekulové hmotnosti: 1 000, 850, 650, 500, 400 bp; Dráha 2: negativní kontrola; Dráha 3: buňky HL60 (promyelocyty); Dráha 4: buňky HEL (megakaryocyty); Dráha 5: buňky U937 (histocyty); Dráha 6: HUVEC. Obr. 8B: Vylučování

VEGF lidskými leukemickými buňkami kultivovanými s 10 % FCS nebo v médiu bez séra.

[0026] Obrázek 9 znázorňuje inhibici migrace lidských leukemických buněk stimulované VEGF lidskými anti-KDR protilátkami. Obr. 9A: buňky HL60. Obr. 9B: buňky HEL. Obr. 9C: buňky U937.

[0027] Obrázek 10 znázorňuje inhibici progresu leukemie *in vivo* prezentovanou jako míra přežití. Subletálně ozářené myši NOD-SCID se inokulovaly 2×10^7 buněk HL60 a aplikovaly se jim různé dávky protilátek IMC-1C11, IMC-2C6 nebo IMC-1121 intraperitoneální injekcí.

Podrobný popis vynálezu

[0028] Předmětný vynález popisuje protilátky podle nároků, které se specificky váží na extrabuněčnou doménu VEGFR-2 (KDR). Protilátky obsahují lidské základní strukturální oblasti V_H a V_L (FW) stejně jako oblasti určující komplementaritu (CDR). Všechny variabilní oblasti V_H a V_L jsou lidské nebo odvozené z lidských sekvencí. Variabilní oblast podle vynálezu se může například získat z lymfocytů periferní krve, které obsahují nově uspořádaný gen variabilní oblasti. V jiném případě části variabilní oblasti, jako jsou oblasti CDR a FW, se mohou získat z různých lidských sekvencí. V jiném příkladu lidská variabilní oblast V_H je kódována segmentem lidského genu V_H a syntetickou sekvencí oblasti CDR3H (to je segment syntetického genu D_H-J_H). Stejně tak lidská variabilní doména V_L se může kódovat segmentem lidského genu V_L a syntetickou sekvencí oblasti CDR3L (to je segment syntetického genu J_L).

[0029] Protilátky podle předmětného vynálezu také zahrnují ty, jejichž vazebné charakteristiky se zlepšily přímou mutací, způsoby afinitní maturace, vystavením na fágovi nebo mícháním řetězců. Afinita a specifita se může modifikovat nebo zlepšit mutací CDR a skríníngem míst vázajících antigen vykazujících požadované charakteristiky (popisuje se například v publikaci Yang et al, J. Mol. Biol., 254: 392-403 (1995)). CDR se mutují různými způsoby. Jedním způsobem je randomizace jednotlivých

zbytků nebo kombinací zbytků tak, že v populaci jinak shodných míst navázání antigenu se vyskytuje všech dvacet aminokyselin v určitých konkrétních polohách. V jiném případě se mutace vyvolají v celém rozmezí zbytků CDR metodami „error prone“ PCR (popisuje se například v publikaci Hawkins et al., J. Mol. Biol., 226: 889-896 (1992)). Například vektory pro vystavení na fágovi obsahující geny variabilních oblastí těžkého a lehkého řetězce se mohou pomnožit v mutátorových kmenech *E. coli* (see, e.g., Low et al., J. Mol. Biol., 250: 359-368 (1996)). Tyto způsoby mutagenese ilustrují řadu metod známých v oboru.

[0030] Protilátky se váží na KDR a neutralizují aktivaci například blokadou dimerizace receptoru a/nebo navázání VEGF. Protilátky podle vynálezu se mohou použít k neutralizaci aktivace VEGFR *in vitro* nebo *in vivo* tím, že se naváží na extracelulární doménu receptoru. Extracelulární domény VEGF receptoru zahrnují například doménu vázající ligand na extracelulární části receptoru. *In vivo* protilátky inhibují angiogenezi a/nebo zpomalují růst nádoru.

[0031] Protilátky jsou proteiny, které rozeznávají specifický antigen nebo látku a váží se na ně. Protilátky podle předmětného vynálezu se váží na KDR alespoň tak silně jako přirozený ligand. Afinity, reprezentovaná rovnovážnou konstantou disociace antigenu s protilátkou (K_d), měří vazebnou sílu mezi antigenní determinantou a místem navázání protilátky. Avidita je míra síly navázání protilátky na její antigen. Avidita se vztahuje k afinitě epitopu s jeho místem navázání antigenu na protilátce a k valenci protilátky. Valence znamená počet míst vázajících antigen imunoglobulinu specifických pro určitý epitop. Monovalentní protilátka například má jedno vazebné místo pro určitý epitop. Antigenní determinanta nebo epitop je místo na antigenu, na které se váže daná protilátka. Typické hodnoty K jsou 10^5 až 10^{11} litrů/mol. Libovolná hodnota K nižší než 10^4 litrů/mol se považuje indikací nescifického navázání. Převrácená hodnota K se označuje jako K_d (K_d také známa jako disociační konstanta). Čím nižší hodnoty K_d , tím vyšší vazebná síla mezi antigenní determinantou a vazebným místem protilátky.

[0032] Přirozeným ligandem KDR je lidský VEGF. VEGF se váže na KDR s afinitou (K_d) přibližně 0,93 nM. K zabránění navázání VEGF na KDR, je nutné, aby se anti-KDR protilátky vázaly na KDR alespoň tak silně jako VEGF. Jinými slovy je nutné, aby anti-KDR protilátky úspěšně soupeřily s VEGF s ohledem na navázání na KDR. Protilátka s hodnotou K_d maximálně 5 nM se váže stejně silně jako přirozený ligand. Protilátky podle vynálezu se s výhodou váží na KDR s afinitou maximálně přibližně 4 nM, výhodněji s afinitou maximálně přibližně 3 nM, nejvýhodněji s afinitou maximálně přibližně 2 nM a v optimálním případě s afinitou maximálně přibližně 1 nM. Avidita bivalentních protilátek bude samozřejmě vyšší než afinita. Bivalentní protilátky se s výhodou váží na KDR s aviditou vyšší než 0,5 nM, výhodněji vyšší než 0,25 nM a v optimálním případě vyšší než 0,1 nM.

[0033] Protilátky podle vynálezu neutralizují KDR (popisuje se v příkladech). Termín „neutralizace receptoru“ znamená zeslabení a/nebo deaktivaci intrinsické kinázové aktivity receptoru transdukovat signál. Spolehlivým testem neutralizace KDR je inhibice receptoru fosforylací.

[0034] Předmětný vynález není omezen žádným určitým mechanismem neutralizace KDR. Není nutné použít mechanismu s určitou protilátkou stejně jako ten s jinou protilátkou. Některé možné mechanismy brání navázání VEGF ligandu na extrabuněčnou vazebnou doménu KDR a brání dimerizaci nebo oligomerizaci receptorů. Ostatní mechanismy však nelze vyloučit.

[0035] Protilátky podle vynálezu zahrnují bez omezení přirozeně se vyskytující protilátky, bivalentní fragmenty, jako $(Fab')_2$, monovalentní fragmenty, jako Fab, jednořetězcové protilátky, jednořetězcový Fv (scFv), protilátky s jednou doménou, multivalentní jednořetězcové protilátky, diabody, triabody a podobně, které se specificky váží na antigeny.

[0036] Monovalentní jednořetězcové protilátky (to je scFv) zahrnují fragment protilátky obsahující variabilní oblast těžkého řetězce (V_H) spojený s fragmentem protilátky obsahující variabilní oblast lehkého řetězce (V_L) peptidovým linkerem, který

umožňuje spojení obou fragmentů za vzniku funkčního místa vázajícího antigen (popisuje se například v dokumentu patent USA č. 4,946,778 (Ladner et al.), WO 88/09344, (Huston et al.). Dokument WO 92/01047 (McCafferty et al.) popisuje vystavení scFv fragmentů na povrchu rozpustných pakáží vystavujících rekombinantní geny, jako je bakteriofág. Jednořetězcová protilátka s linkerem (L) může být prezentována jako V_L-L-V_H nebo V_H-L-V_L .

[0037] Každá doména protilátek podle tohoto vynálezu může být úplná variabilní doména těžkého nebo lehkého řetězce protilátky nebo to může být funkční ekvivalent nebo mutant nebo derivát přirozeně se vyskytující domény nebo syntetická doména konstruovaná například in vitro použitím postupu popsaného v dokumentu WO 93/11236 (Griffiths et al.). Je například možné spojit dohromady domény odpovídající variabilním doménám protilátky, kterým chybí alespoň jedna aminokyselina. Důležitým charakteristickým rysem každé domény je její schopnost asociace s komplementární doménou za vzniku místa vázajícího antigen. „Fragment variabilního těžkého/lehkého řetězce“ by neměl být konstruován tak, aby eliminovat varianty, které nemají vliv na funkci vynálezu.

[0038] Funkční ekvivalenty podle vynálezu zahrnují polypeptidy s aminokyselinovými sekvencemi podstatně stejnými jako je aminokyselinová sekvence variabilních nebo hypervariabilních oblastí KDR protilátek v plné délce. Termín „podstatně stejná“ aminokyselinová sekvence se zde definuje jako sekvence vykazující alespoň 70 %, s výhodou alespoň přibližně 80 % a výhodněji alespoň přibližně 90 % homologii s jinou aminokyselinovou sekvencí. Tato homologie se stanoví metodou FASTA v souladu s publikací Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 2444-8 (1988).

[0039] Protilátky s jednou doménou vykazují jedinou variabilní doménu, která je schopna účinně vázat antigen. V oboru jsou známy příklady protilátek, jejichž vazebná afinita a specifita je primárně dána právě jednou nebo druhou variabilní doménou. Publikace Jeffrey, P.D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:

10310-4 (1993) popisuje anti-digoxin protilátku, která se váže na digoxin primárně svým těžkým řetězcem. Proto je možné identifikovat jednotlivé domény protilátek, které se dobře váží na VEGF receptory. Takové protilátkové domény se mohou získat například z přirozeně se vyskytujících protilátek nebo fágových knihoven vystavujících Fab nebo scFv. Rozumí se, že k vytvoření protilátky s jednou doménou z protilátky obsahující V_H a V_L doménu může být nutné, k zesílení navázání, exprese nebo rozpustnosti, provést substituce jistých aminokyselin mimo oblasti CDR. Může být například nutné modifikovat aminokyselinové zbytky, které budou jinak uloženy mezi V_H - V_L .

[0040] Nedávno se u velbloudovitých (velbloud dvouhrbý, velbloud jednohrbý a lama) objevily protilátky, které jsou homodiméry těžkých řetězců. Tyto protilátky s těžkým řetězcem neobsahují lehké řetězce a první konstantní oblast (popisuje se například v publikaci Muyldermans, S., 2001, J. Biotechnol. 74: 277-302). Fragmenty vázající antigen s menší velikostí se velmi dobře exprimují v bakteriích, váží antigen s vysokou afinitou a jsou velmi stabilní. Je možné připravit fágové knihovny protilátek s jednou doménou (mají jednu variabilní doménu, která může být variabilní doménou lehkého nebo těžkého řetězce) a může se provést skrínig stejným způsobem jako u scFv a Fab knihoven. Základem takových protilátek s jednou doménou mohou být upravené myší nebo lidské variabilní oblasti. Je nutné poznamenat, že protilátky s jednou doménou mohou vázat antigen různými způsoby. To znamená, že primární interakce protilátka-antigen nejsou omezeny na aminokyselinové zbytky odpovídající CDR protilátek obsahujících V_H - V_L . Zvažují se i vazebné interakce mimo CDR zbytky, pokud optimalizují vazebné charakteristiky takových protilátek.

[0041] Jednořetězcovým protilátkám chybí některé nebo všechny konstantní domény celých protilátek, ze kterých se získaly. Při jejich použití je možné proto obejít některé problémy spojené s použitím celých protilátek. Jednořetězcové protilátky například nevykazují jisté nežádoucí interakce mezi konstantními oblastmi těžkého řetězce a jinými biologickými molekulami. Jedno-

řetězcové protilátky jsou navíc znatelně menší, než celé protilátky a mohou vykazovat vyšší permeabilitu ve srovnání s celými protilátkami. To umožňuje jednořetězcovým protilátkám účinněji lokalizovat vazebná místa antigenu a také se na ně účinněji vázat. Jednořetězcové protilátky se mohou také produkovat v relativně velkém měřítku v prokaryontních buňkách, což usnadňuje jejich produkci. Dále, ve srovnání s celými protilátkami relativně malá velikost jednořetězcových protilátek snižuje pravděpodobnost vyvolání nežádoucí imunitní odezvy recipienta celých protilátek.

[0042] Peptidové linkery užívané k produkci jednořetězcových protilátek mohou být flexibilní peptidy vybrané tak, aby ke správnému trojrozměrnému sbalení domén V_L a V_H došlo jen, když jsou spojeny linkerem, přičemž si uchovávají vazebnou specifitu pro cílové molekuly anti-KDR protilátek celé délky. V obecném případě C-konec sekvence V_L nebo V_H může být kovalentně spojen uvedeným peptidovým linkerem s N-koncem komplementární sekvence V_H nebo V_L . Linker v obecném případě obsahuje 10 až 50 aminokyselinových zbytků. Linker s výhodou obsahuje 10 až 30 aminokyselinových zbytků. Linker výhodněji obsahuje 12 až 30 aminokyselinových zbytků. Linker nejvýhodněji obsahuje 15 až 25 aminokyselinových zbytků. Příkladem takových linkerových peptidů je $(\text{Gly-Gly-Gly-Gly-Ser})_3$.

[0043] Jednořetězcové protilátky, přičemž každá má jednu V_H a jednu V_L doménu kovalentně spojenou prvním peptidovým linkerem, mohou být kovalentně spojeny alespoň jedním dalším peptidovým linkerem za vzniku multivalentní jednořetězcové protilátky. Multivalentní jednořetězcové protilátky umožňují konstrukci protilátkových fragmentů, které vykazují specifitu a aviditu celých protilátek, ale chybí jim konstantní oblasti protilátek celé délky.

[0044] Multivalentní protilátky mohou být specifické nebo multispecifické. Termín specifita se odvolává na určitý počet různých typů antigenních determinant, na které se určitá protilátka může vázat. Pokud se protilátka váže pouze na jeden typ an-

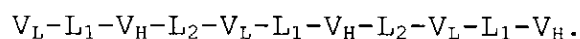
tigenní determinanty, pak je protilátka specifická. Pokud se protilátka váže na různé typy antigenních determinant, pak je protilátka multispecifická.

[0045] Bispecifická multivalentní jednořetězcová protilátka rozeznává dva různé typy epitopů. Oba epitopy mohou být na KDR. V jiném případě jeden epitop může být na KDR a druhý epitop může být na jiném antigenu.

[0046] Každý řetězec multivalentní jednořetězcové protilátky zahrnuje variabilní fragment lehkého řetězce a variabilní fragment těžkého řetězce a je spojen peptidovým linkerem s alespoň s jedním dalším řetězcem. Peptidový linker obsahuje alespoň 15 aminokyselinových zbytků. Maximální počet aminokyselinových zbytků je přibližně 100. Ve výhodném provedení počet domén V_L a V_H je ekvivalentní. Je výhodné, když peptidový linker (L_1) spojující domény V_H a V_L za vzniku řetězce a peptidový linker (L_2) spojující dva nebo více řetězců za vzniku multivalentního scFv mají podstatně stejnou aminokyselinovou sekvenci.

[0047] Bivalentní jednořetězcová protilátka může být prezentována například následovně: $V_L-L_1-V_H-L_2-V_L-L_1-V_H$ nebo $V_L-L_1-V_H-L_2-V_H-L_1-V_H$ nebo $V_H-L_1-V_L-L_2-V_H-L_1-V_L$ nebo $V_H-L_1-V_L-L_2-V_L-L_1-V_H$.

[0048] Multivalentní jednořetězcové protilátky, které jsou trivalentní nebo více valentní vykazují jeden nebo více fragmentů protilátky spojených do bivalentní jednořetězcové protilátky dalšími peptidovými linkery. Jedním příkladem trivalentní jednořetězcové protilátky je



[0049] Dvě jednořetězcové protilátky se mohou kombinovat za vzniku diabody, také známé jako bivalentní dimer. Diabody vykazují dva řetězce a dvě vazebná místa. Mohou být specifická nebo bispecifická. Každý řetězec diabody zahrnuje doménu V_H spojenou s doménou V_L . Domény jsou spojeny linkery, které jsou dostatečně krátké, aby zabránily párování domén na stejném řetězci, podpo-

rují tedy párování komplementárních domén na různých řetězcích, přičemž vznikají dvě místa vázající antigen. Jeden řetězec bispecifické diabody obsahuje V_H charakterizující první specifitu a V_L charakterizující druhou specifitu, zatímco druhý řetězec obsahuje V_H charakterizující druhou specifitu a V_L charakterizující první specifitu. Peptidový linker zahrnuje alespoň pět aminokyselinových zbytků a ne více než deset aminokyselinových zbytků, například (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser), (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₂. (SEQ ID NO:19). Struktura diabody je stabilní a kompaktní. Místa pro navázání antigenu jsou na opačných koncích molekuly.

[0050] Tři jednořetězcové protilátky se mohou kombinovat za vzniku triabody, také známé jako trivalentní trimery. Triabody se zkonstruovaly tak, že N-konec domény V_L nebo V_H přímo fúzovaly s C-koncem domény V_L nebo V_H . To znamená, že se nepoužila sekvence linkeru. Triabody vykazuje tři hlavy F_v s polypeptidy uspořádanými do kruhu způsobem „hlava-ocas“. Možné prostorové uspořádání triabody je planární se třemi vazebnými místy umístěnými v rovině, přičemž vzájemně svírají úhel 120 stupňů. Triabody mohou být specifické, bispecifické nebo trispecifické.

[0051] Protilátky podle tohoto vynálezu s výhodou obsahují všech šest oblastí určujících komplementaritu celé protilátky. Ačkoli fiktivní jsou také protilátky obsahující méně takových oblastí, jako tři, čtyři nebo pět CDR.

[0052] Za účelem minimalizovat imunogenost protilátek vázajících se na VEGF receptory, předmětný vynález popisuje protilátky, které obsahují sekvence lidské variabilní a konstantní domény. Protilátky se získaly z člověka a váží se na extracelulární doménu KDR a neutralizují aktivaci receptoru. DNA kódující lidské protilátky se mohou připravit rekombinací DNA kódující lidské konstantní oblasti a DNA kódující variabilní oblasti získaných z člověka. Protilátka podle vynálezu se může například získat skríníngem knihoven skládajících se z variabilních domén lehkého a těžkého řetězce. Nukleové kyseliny, které exprimují protilátky, se mohou somaticky mutovat nebo to mohou být zárodečné sekvence získané z naivních B buněk.

[0053] DNA kódující lidské protilátky se mohou připravit rekombinací DNA kódující lidské konstantní a variabilní oblasti, jiné než CDR, získané podstatně nebo pouze z odpovídajících oblastí lidské protilátky a DNA kódující CDR získané z člověka.

[0054] Vhodné zdroje DNA kódující fragmenty protilátek zahrnují libovolnou buňku, jako je hybridom a buňky sleziny, které exprimují protilátku celé délky. Jiným zdrojem jsou jednořetězcová protilátky produkované z fágové knihovny, způsobem popsaným v oboru.

[0055] Protilátkou podle tohoto vynálezu může být imunoglobulin z libovolné třídy nebo kombinace členů libovolné třídy imunoglobulinů, jako je IgG, IgM, IgA, IgD nebo IgE, nebo její podtřídy.

[0056] Protein užívaný k identifikaci protilátek vázajících se na VEGFR podle vynálezu je obvykle KDR a v normálním případě se omezuje na extracelulární doménu KDR. Extracelulární doména KDR může být volná nebo konjugovaná s jinou molekulou.

[0057] V příkladech dále v textu se vysokoafinitní anti-KDR protilátka, která blokuje navázání VEGF na KDR, izolovala z fágové knihovny konstruované z genů variabilních oblastí lidského těžkého a lehkého řetězce. Více než 90 % získaných klonů po třech kolech selekce vykazuje specifitu ke KDR. Vazebné afinity ke KDR fragmentů Fab, u kterých se provedl skrínig, jsou v nanomolárním rozpětí. Jsou to hodnoty vysoké tak, jako hodnoty několika bivalentních anti-KDR monoklonálních protilátek produkovaných technologií hybridomů.

[0058] Protilátky podle tohoto vynálezu se mohou fúzovat s dalšími aminokyselinovými zbytky. Takovými zbytky může být peptidová značka, která může umožnit izolaci, nebo to může být signální sekvence sekrece polypeptidu z hostitelské buňky při jeho syntéze. Vhodné je použití sekrečního naváděcího (signálního) peptidu, což jsou aminokyseliny připojené na N-konec polypeptidu a slouží k přímému transportu z cytozolu.

[0059] Předmětný vynález také popisuje nukleové kyseliny, které obsahují sekvenci kódující polypeptid podle vynálezu, a souhrn takových různorodých nukleových kyselin.

[0060] Protilátky podle vynálezu neutralizují aktivaci KDR. Jedním způsobem neutralizace KDR je inhibice tyrozinkinázové aktivity receptoru. Inhibice tyrozinkinázy je možné dosáhnout použitím metod dobře známých v oboru. Protilátky podle předmětného vynálezu v obecném případě způsobují inhibici nebo regulaci fosforylace. Tudiž fosforylační testy se mohou použít ke stanovení, zda je protilátka použitelná v souladu s předmětným vynálezem. Inhibice tyrozinkinázy se může stanovit měřením úrovně autofosforylace rekombinantního kinázového receptoru a/nebo fosforylací přirozeného nebo syntetického substrátu. Fosforylace se může například detekovat použitím protilátky specifické pro fosfotyrozín v testu ELISA nebo v některých testech western blot. V publikacích Panek et al., *J. Pharmacol. Exp. Thera*, 283: 1433-44 (1997) a Batley et al., *Life Sci.*, 62: 143-50 (1998) se popisují některé testy vhodné ke stanovení tyrozinkinázové aktivity.

[0061] Navíc je možné využít metody detekce exprese proteinu, přičemž měřené proteiny jsou regulovány tyrozinkinázovou aktivitou KDR. Tyto metody používají k detekci exprese proteinu imunohistochemickou analýzu (IHC), k detekci amplifikace genu fluorescenční in situ hybridizaci (FISH), testy kompetitivního navázání radioaktivně značeného ligandu, postupy blotování na pevnou matrici, jako je northern blot nebo southern blot, polymerázovou řetězovou reakci s reverzní transkriptázou (RT-PCR) a test ELISA (jak se popisuje například v publikacích Grandis et al., *Cancer*, 78:1284-92. (1996); Shimizu et al., *Japan J. Cancer Res.*, 85:567-71 (1994); Sauter et al., *Am. J. Pathol.*, 148: 1047-53 (1996); Collins, *Glia*, 15:289-96 (1995); Radinsky et al., *Clin. Cancer Res.*, 1:19-31 (1995); Petrides et al., *Cancer Res.*, 50:3934-39 (1990); Hoffmann et al., *Anticancer Res.*, 17:4419-26 (1997); Wikstrand et al., *Cancer Res.*, 55:3140-48 (1995)).

[0062] Mohou se také využít testy *in vivo*. Inhibice tyrosinkinázového receptoru je možné pozorovat v mitogenních testech použitím buněčných linií stimulovaných receptorovým ligandem v přítomnosti inhibitoru nebo bez něj. V testu inhibice VEGFR se mohou například použít buňky HUVEC (ATCC) stimulované VEGF. Jiná metoda zahrnuje testování inhibice růstu nádorových buněk exprimujících VEGF. Mohou se například použít lidské nádorové buňky zavedené injekcí do myši (popisuje se v dokumentu patent USA č. 6,365,157 (Rockwell et al.)).

[0063] V jiných metodách podle předmětného vynálezu se savci, který to potřebuje, aplikuje terapeuticky účinné množství protilátky podle vynálezu. Zde používaný termín „aplikace“ znamená zavedení protilátek podle předmětného vynálezu savci libovolnou metodou, kterou je možné dosáhnout požadovaného výsledku. Protilátka se může aplikovat například intravenózně nebo intramuskulárně. Ačkoli lidské protilátky podle vynálezu jsou zvláště vhodné k aplikaci lidem, mohou se také aplikovat jiným savcům. Zde používaný termín „savec“ zahrnuje bez omezení člověka, laboratorní zvířata, domácí zvířata a chovná zvířata. Termín „terapeuticky účinné množství“ znamená množství protilátky podle předmětného vynálezu, které, pokud se aplikuje savci, je účinné k vyvolání požadovaného terapeutického účinku, jako je inhibice kinázové aktivity.

[0064] Aniž se vynález spojuje s libovolným určitým mechanismem, onemocnění a stavy, které se mohou léčit nebo se jim předchází zde uvedenými metodami, zahrnují například ty, kde je patogenní angiogeneze nebo růst nádoru stimulován prostřednictvím VEGFR parakrinní a/nebo autokrinní smyčky.

[0065] Neutralizace aktivace VEGF receptoru u endoteliálních nebo jiných buněk, jako jsou nádorové buňky, se může provést *in vitro* nebo *in vivo*. Neutralizace VEGF aktivace VEGF receptoru ve vzorku buněk exprimujících VEGF receptor zahrnuje kontakt buněk s antagonistou, například protilátkou podle vynálezu. Buňky jsou v kontaktu s antagonistou *in vitro* například

s protilátkou, dříve než se ke vzorku buněk přidá VEGF, současně s přidáním VEGF a nebo po přidání VEGF.

[0066] Protilátka podle vynálezu se přivede do kontaktu s VEGF receptorem *in vivo* tím, že se aplikuje savci, s výhodou člověku. Způsob neutralizace *in vivo* u savce je možné použít k inhibici růstu nádoru, inhibici angiogeneze spojené s růstem nádoru nebo při jiném patologickém stavu spojeném s angiogenezí. Protilátky podle vynálezu jsou tudíž anti-angiogenní a anti-nádorová imunoterapeutická činidla.

[0067] Nádory, které je možné léčit uvedeným způsobem, zahrnují primární nádory a metastáze, stejně jako nádory rezistentní k léčbě. Odolné nádory zahrnují nádory, které nereagují nebo odolávají léčbě samotnými chemoterapeutickými činidly, samotnými protilátkami, samotné radioterapii nebo jejich kombinaci. Odolné nádory také zahrnují ty nádory, které jsou inhibovány uvedenými činidly, ale znovu se objevují do pěti let po přerušení léčby, někdy do deseti let nebo i později.

[0068] Protilátky podle předmětného vynálezu je možné použít při léčbě nádorů exprimujících VEGF receptory, zvláště KDR. Pro takové nádory je charakteristické, že jsou citlivé na přítomnost VEGF ve svém prostředí, mohou produkovat VEGF a mohou být stimulovány VEGF v autokrinní stimulační smyčce. Metoda je proto účinná při léčbě solidního nádoru nebo i jiného nádoru, který není vaskularizován nebo ještě není podstatně vaskularizován. Příklady solidních nádorů, které je možné léčit odpovídajícím způsobem, zahrnují karcinom prsu, karcinom plic, kolorektální karcinom, karcinom slinivky, gliom a lymfom. Některé příklady takových nádorů zahrnují epidermoidní nádory, spinocelulární nádory, jako jsou nádory hlavy a krku, kolorektální nádory, nádory prostaty, nádory prsu, nádory plic zahrnující malobuněčné a nemalobuněčné nádory plic, nádory slinivky, nádory štítné žlázy, nádory vaječnicků a nádory jater. Jiné příklady zahrnují Kaposiho sarkom, neoplazma CNS, neuroblastomy, kapilární hemangioblastomy, meningiomy a cerebrální metastáze, melanom, gastrointestinální a renální karcinom a sarkom, rhabdo-

myosarkom, glioblastom, s výhodou multiformní glioblastom a leiomyosarkom. Příklady vaskularizovaného karcinomu kůže, v případě kterých je léčba antagonisty podle tohoto vynálezu účinná, zahrnují spinocelulární karcinom, bazocelulární karcinom a karcinomy kůže, které je možné léčit potlačením růstu maligních keratinocytů, jako jsou lidské maligní keratinocyty.

[0069] Příklady hematologických malignit zahrnují leukemii, mnohotný myelom a lymfom. Některé příklady leukemií zahrnují akutní myeloidní leukemii (AML), chronickou myeloidní leukemii (CML), akutní lymfocytickou leukemii (ALL), chronickou lymfocytickou leukemii (CLL), leukemie erytrocytů nebo monocytů. Některé příklady lymfomů zahrnují Hodgkinův lymfom a ne-Hodgkinův lymfom.

[0070] Výsledky získané v experimentech uvedených dále v textu ukazují, že protilátky podle vynálezu specificky blokují stimulaci KDR (VEGFR-2) v leukemických buňkách vyvolanou VEGF. Studie *in vivo* také popsané dále v textu ukazují, že protilátky jsou schopné podstatně inhibovat růst nádorů u nahých myši.

[0071] Koktejl antagonistů VEGF receptoru, například monoklonální protilátky, umožňuje zvláště účinnou léčbu vedoucí k inhibici růstu nádorových buněk. Koktejl může zahrnovat VEGFR antagonisty, kterými nejsou protilátky, a může obsahovat pouze několik jako 2, 3 nebo 4 antagonisty receptorů nebo 6, 8 nebo 10 antagonistů.

[0072] V jiném provedení vynálezu se anti-KDR protilátky použily k inhibici angiogeneze. VEGFR stimulace vaskulárního endotelu je spojena s angiogeneze-dependentním onemocněním a vaskularizací nádorů. V typickém případě je vaskulární endotel stimulován parakrinním způsobem faktorem VEGF z jiných zdrojů (například nádorové buňky).

[0073] Lidské anti-KDR protilátky jsou proto účinné při léčbě jedinců s vaskularizovanými nádory nebo s neoplazmy a s angiogeneze-dependentním onemocněním. Takové nádory a neoplazma zahrnují například maligní nádory a neoplazma, jako jsou blasto-

my, karcinomy nebo sarkomy a silně vaskularizované nádory a neoplazma. Karcinomy, které je možné léčit metodami podle předmětného vynálezu, zahrnují například karcinom mozku, karcinom urogenitálního traktu, karcinom lymfatického systému, karcinom žaludku, renální karcinom, karcinom střev, karcinom laryngu a plic a karcinom kostí. Příklady dále zahrnují bez omezení epidermoidní nádory, spinocelulární karcinom, jako je nádor hlavy a krku, kolorektální nádory, nádory prostaty, nádory prsu, nádory plic zahrnující plicní adenokarcinom a malobuněčné a nemalobuněčné nádory plic, nádory slinivky, nádory štítné žlázy, nádory vaječníků a nádory jater. Metoda se také používá k léčbě vaskularizovaných karcinomů kůže zahrnujících spinocelulární karcinom, bazocelulární karcinom a karcinomy kůže, které se mohou léčit potlačením růstu maligních keratinocytů, jako jsou lidské maligní keratinocyty. Jiné karcinomy, které je možné léčit, zahrnují Kaposiho sarkom, neoplazma CNS (neuroblastomy, kapilární hemangioblastomy, meningiomy a cerebrální metastáze), melanom, gastrointestinální a renální karcinomy a sarkomy, rhabdomyosarkom, glioblastom zahrnující multiformní glioblastom a leiomyosarkom.

[0074] Jiné provedení předmětného vynálezu zahrnuje metody léčby nebo prevence patologických stavů charakterizovaných nadměrnou angiogenezí zahrnující například vaskularizaci a/nebo zánět, jako je ateroskleróza, revmatoidní artritida (AR), neovaskulární glaukom, proliferativní retinopatie zahrnující proliferativní diabetickou retinopatie, degenerace makuly, hemangiom, angiofibrom a psoriáza. Jiné nelimitující příklady angiogeneze-dependentního onemocnění, které není neoplastické, jsou retinopatie nedonošených (retrolentální fibroplazie), odmítnutí štěpu rohovky, inzulin-dependentní diabetes mellitus, roztroušená skleróza, myasthenia gravis, Crohnova nemoc, autoimunní nefritida, primární biliární cirhóza, akutní pankreatitida, odmítnutí allograftu, alergický zánět, kontaktní dermatitida a pozdní hypersenzitivní reakce, zánětlivé onemocnění střev, septický šok, osteoporóza, osteoartritida, poruchy vědomí vyvolané inflamací neuronů, Osler-Weberův syndrom, restinóza a fungální,

parazitické a virové infekce zahrnující cytomegalovirové infekce.

[0075] Odborník má schopnosti a znalosti identifikovat takové onemocnění. Například jedinci, kteří trpí klinicky podstatným neoplastickým nebo angiogenním onemocněním nebo kterým hrozí nebezpečí vývoje klinicky podstatných symptomů, jsou vhodným cílem aplikace předmětných protilátek VEGF receptorů. Lékař může snadno stanovit například použitím klinických testů, tělesného vyšetření a na základě předchozí/rodinné anamnézy, zda je jedinec vhodným kandidátem takové léčby.

[0076] Vynález navíc zahrnuje použití předmětných protilátek *in vivo* a *in vitro* v investigativních nebo diagnostických metodách, které jsou dobře známy v oboru.

[0077] Předmětné anti-KDR protilátky se mohou aplikovat při terapii pacientovi, který má nádor nebo angiogeneze-dependentní patologický stav, v množství dostatečném k prevenci, inhibici nebo zpomalení progresu nádoru nebo patologického stavu. Progrese zahrnuje například růst, invazi, metastáze a/nebo opětný výskyt nádoru a/nebo patologického stavu. Adekvátní množství se definuje jako terapeuticky účinná dávka. Množství účinné k tomuto použití bude záviset na vážnosti onemocnění a obecném stavu pacientova imunitního systému. Schéma dávek se bude také lišit v závislosti na stádiu onemocnění a statutu pacienta a bude v typickém případě v rozmezí jediné bolusové dávky nebo kontinuální infúze až do více aplikací za den (například každých 4 až 6 hodin) nebo schéma určí přímo ošetřující lékař na základě stavu pacienta. Je však nutné poznamenat, že předmětný vynález se neomezuje na žádnou určitou dávku.

[0078] Anti-KDR protilátky se mohou aplikovat v kombinaci s jedním nebo více jinými anti-neoplastickými činidly. Kombinace terapií se například popisují v dokumentech patent USA č. 6,217,866 (Schlessinger et al) (Anti-EGFR protilátky v kombinaci s anti-neoplastickými činidly); WO 99/60023 (Waksal et al.) (Anti-EGFR protilátky v kombinaci s radiací). Může se použít libovolné vhodné anti-neoplastické činidlo, jako je chemo-

terapeutické činidlo nebo ozáření. Příklady chemoterapeutických činidel zahrnují bez omezení cis-platinu, doxorubicin, paclitaxel, irinotecan (CPT-11), topotecan nebo jejich kombinace. Pokud je anti-neoplastickým činidlem radiace, zdroj radiace může být vzhledem k léčenému pacientovi buď externí (zevní ozařování - EBRT) nebo interní (brachyradioterapie - BT). Dávka aplikovaného anti-neoplastického činidla závisí na řadě faktorů, které zahrnují například typ činidla, typ a vážnost léčeného nádoru a způsob aplikace činidla. Je však nutné zdůraznit, že vynález se neomezuje na žádnou určitou dávku.

[0079] Dále, anti-KDR protilátky podle vynálezu se mohou aplikovat s protilátkami, které neutralizují jiné receptory, které se účastní růstu nádoru nebo angiogeneze. Příkladem takového receptoru je VEGFR-1/Flt-1 receptor. V jednom provedení vynálezu se použila anti-KDR protilátka v kombinaci s antagonistou receptoru, který se váže specificky na VEGF-1. Zvláště výhodné jsou proteiny vázající antigen, které se vážou na extracelulární doménu VEGFR-1 a blokují navázání jednoho nebo více ligandů, VEGF a PlGF a/nebo neutralizují aktivaci VEGFR-1 vyvolanou VEGF nebo PlGF. Například monoklonální protilátka mAb 6.12 je scFv, která se váže na rozpustný a na povrchu buněk exprimovaný VEGFR-1. Fragment scFv 6.12 obsahuje domény V_L a V_H myši monoklonální protilátky mAb 6.12. Buněčná linie hybridomů produkující mAb 6.12 je uložena jako ATCC číslo PTA-3344 v souladu s Budapeštskou smlouvou o mezinárodním uznávání uložení mikroorganismů pro účely patentového řízení a se směrnicemi spojenými s touto smlouvou.

[0080] Jiným příkladem takového receptoru je EGFR. V jednom provedení předmětného vynálezu se anti-KDR protilátka používá v kombinaci s EGFR antagonistou. EGFR antagonistou může být protilátka, která se váže na EGFR nebo ligand EGFR a inhibuje navázání EGFR na svůj ligand. Ligandy EGFR zahrnují například EGF, TGF- α amfirogulin, heparin vázající EGF (HB-EGF) a betarecullulin. EGF a TGF- α se považují za hlavní endogenní ligandy, které vedou ke stimulaci zprostředkované EGFR, ačkoli TGF- α silněji podporuje angiogenezi. Je vhodné, aby se EGFR antago-

nista externě vázal na extracelulární část EGFR, což může nebo nemusí inhibovat navázání ligandu, nebo se může uvedený antagonist interně vázat na tyrozinkinázovou doménu. Příklady EGFR antagonistů vázajících se na EGFR zahrnují bez omezení biologické molekuly, jako jsou protilátky (a jejich funkční ekvivalenty) specifické pro EGFR a malé molekuly, jako jsou syntetické kinázové inhibitory, které působí přímo na cytoplazmatickou doménu EGFR.

[0081] Jinými příklady receptorů růstových faktorů zahrnutých v tumorigenezi jsou receptory růstového faktoru produkovaného destičkami (PDGFR), inzulínu-podobného růstového faktoru (IGFR), nervového růstového faktoru (NGFR) a fibroblastového růstového faktoru (FGFR).

[0082] V dalším alternativním provedení vynálezu VEGF antagonisty se může aplikovat v kombinaci s jedním nebo více vhodných adjuvans, jako jsou například cytokiny (například IL-10 a IL-13) nebo s jinými imunostimulátory, jak se popisuje například v Larrivé et al., citace uvedena shora v textu. Je vhodné, aby aplikace samotné anti-KDR protilátky byla dostatečná k prevenci, inhibici nebo zpomalení progresu nádoru terapeuticky účinným způsobem.

[0083] Při kombinované terapii anti-KDR protilátka se aplikuje před, během nebo po zahájení terapie s jiným činidlem nebo v libovolné časové kombinaci, jako před a během, před a po, během a po nebo před, během a po zahájení terapie s anti-neoplastickým činidlem. Anti-KDR protilátka se může aplikovat například 1 až 30 dní, s výhodou 3 až 20 dní, výhodněji 5 až 12 dní před zahájením radioterapie.

[0084] V předmětném vynálezu se může použít libovolná vhodná metoda nebo způsob aplikace anti-KDR protilátek podle vynálezu a je možné je aplikovat společně s anti-neoplastickými činidly a/nebo antagonisty jiných receptorů. Způsoby aplikace například zahrnují orální, intravenózní, intraperitoneální, subkutánní nebo intramuskulární aplikaci. Aplikovaná dávka antagonisty závisí na řadě faktorů, které zahrnují například typ antagonisty,

typ a vážnost léčeného nádoru a způsobu aplikace antagonisty. Mělo by se však zdůraznit, že předmětný vynález se neomezuje na žádnou určitou metodu nebo způsob aplikace.

[0085] Je nutné poznamenat, že anti-KDR protilátka se může aplikovat jako konjugát, který se váže specificky na receptor a způsobuje toxické, letální zatížení následující po zavedení konjugátu ligand-toxin.

[0086] Rozumí se, že anti-KDR protilátky podle vynálezu, pokud se užívají u savce k profylaxi nebo léčbě, se budou aplikovat ve formě prostředku, který navíc obsahuje farmaceuticky přijatelný nosič. Vhodné farmaceuticky přijatelné nosiče zahrnují například jednu nebo více substancí ze skupiny obsahující vodu, fyziologický roztok, fyziologický roztok pufovaný fosforečnanem, dextrózu, glycerol, ethanol a podobně, stejně jako jejich kombinace. Farmaceuticky přijatelné nosiče mohou dále obsahovat minoritní množství pomocných látek, jako jsou smáčecí nebo emulgační činidla, konzervační činidla nebo pufrů, které prodlužují dobu skladování nebo účinnost navázání proteinů. Prostředky vhodné pro zavedení injekcí se mohou, jak je dobře známo v oboru, připravit tak, aby vedly k rychlému, postupnému nebo zpožděnému uvolnění aktivní složky při aplikaci savci.

[0087] Vynález dále zahrnuje kity inhibující růst nádoru a/nebo angiogenezi. Kity obsahují terapeuticky účinné množství lidské anti-KDR protilátky. Kity mohou dále obsahovat libovolného vhodného antagonistu například receptoru jiného růstového faktoru, který se podílí na tumorogenezi nebo angiogenezi (např. VEGFR-1/Flt-1, BGFR, PDGFR, IGFR, NGFR, FGFR atd., jak se popisuje shora v textu). V jiném případě nebo navíc kity mohou obsahovat anti-neoplastické činidlo. Popisují se zde příklady vhodných anti-neoplastických činidel podle předmětného vynálezu. Kity mohou dále obsahovat adjuvans. Příklady se také uvádějí shora v textu.

[0088] Anti-KDR protilátky podle vynálezu se mohou chemicky nebo biosynteticky spojit s jedním nebo více anti-neoplastickými nebo anti-angiogenními činidly.

[0089] Dále se popisují anti-KDR protilátky, na které se váží cílové nebo reportérové části. Cílové části jsou prvními členy vazebných párů. Anti-neoplastická činidla jsou například konjugována s druhými členy takových párů a jsou tak směřovány do místa, kde se váže anti-KDR protilátka. Běžným příkladem takového vazebného páru je avidin a biotin. Biotin se konjuguje s anti-KDR protilátkou a tak tvoří cíl pro anti-neoplastické činidlo nebo jinou část, která je konjugována s avidinem nebo streptavidinem. V jiném případě biotin nebo jiná taková část je spojena s anti-KDR protilátkou podle vynálezu a užívá se jako reportérová molekula například v diagnostickém systému, kde činidlo produkující detekovatelný signál je konjugován s avidinem nebo

[0090] Předmětní antagonisté receptorů se tudíž mohou použít *in vivo* a *in vitro* v investigativních, diagnostických, profylaktických nebo léčebných metodách, které jsou dobře známy v oboru.

Příklady

[0091] Příklady a referenční příklady, které následují, se uvádí z důvodu lepšího porozumění vynálezu, ale žádným způsobem neomezují rozsah vynálezu. Příklady nezahrnují podrobné popisy běžných metod, jako jsou ty používané při konstrukci vektorů a plazmidů nebo při zavedení plazmidů do hostitelských buněk. Takové metody jsou dobře známy v oboru a popisují se v řadě publikací zahrnujících Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Příklad I. Produkce lidského Fah

Příklad I(a). Proteiny a buněčné linie

[0092] Primárně kultivované buňky HUVEC se získaly od Dr. S. Rafii, Cornell Medical Center, New York a udržovaly se v médiu EBM-2 (Clonetics, Walkersville, MD) při teplotě 37°C, 5 % CO₂. Rozpustné fúzní proteiny, KDR-alkalická fosfatáza (AP), jeho

varianty s delecí v imunoglobulinových (Ig) doménách a Flk-1-AP, se exprimovaly ve stabilně transfekovaných buňkách NIH 3T3 a izolovaly se ze supernatantů buněčných kultur afinitní chromatografií použitím imobilizované monoklonální protilátky k AP, jak se popisuje v publikaci Lu et al., J. Biol. Chem. 275: 14321-30 (2000). Protein VEGF₁₆₅ se exprimoval v bakulovirech a izoloval se postupy popsány v publikaci Zhu et al., Cancer Res. 58: 3209-14 (1998). Leukemické buněčné linie HL60 a HEL se udržovaly v RPMI, které obsahuje 10 % fetální telecí sérum.

Příklad 1(b). Fágová ELISA

[0093] Izolovaly se jednotlivé klony TG1 a nechaly se růst na destičkách s 96 prohlubněmi při teplotě 37 °C. Pak se přidal pomocný fág M13K07, jak se popisuje shora v textu. Amplifikovaný fágový přípravek se blokoval 1/6 objemu 18 % mléko/PB8 při teplotě místnosti jednu hodinu a přidal se do Maxi-sorp mikrotitračních destiček s 96 prohlubněmi (Nunc) potažených KDR-AP nebo AP (1 µg/ml x 100 µl). Po inkubaci při teplotě místnosti jednu hodinu se destičky promyly třikrát PBST a inkubovaly se s konjugátem králičí anti-M13 fág-HRP (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Destičky se 5 krát promyly, přidal se substrát TMB peroxidázy (KPL, Gaithersburg, MD) a odečítala se absorbance při 450 nm použitím odečítacího zařízení pro mikrotitrační destičky (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Příklad I(c). Analýza *Bst*N I paternu DNA a sekvenování nukleotidů

[0094] Rozdílnost anti-KDR Fab klonů po každém cyklu selekce se analyzovala na základě paternů štěpení restričními enzymy (DNA fingerprinting). Inzert genu Fab jednotlivých klonů se amplifikoval pomocí PCR použitím primerů: PUC19 reverzní, 5' AGCGGATAACAATTTTCACACAGG 3'; a fdtet seq, 5' GTCGTCTTTCCAGACGTTAGT 3'. Amplifikovaný produkt se štěpil restričním enzymem s vysokou frekvencí štěpení *Bst*N I a analyzoval se na 3 % agarózovém gelu. Sekvence DNA reprezentativních

klonů z každého paternu štěpení se stanovily dideoxynukleotidovým sekvenováním.

Příklad I(d). Exprese a izolace vhodných fragmentů Fab.

[0095] Plazmidy jednotlivých klonů se použily k transformaci nesupresivního hostitele *E. coli* kmen HB2151. Exprese fragmentů Fab v HB2151 se vyvolala kultivací buněk v médiu 2YTA, které obsahuje 1 mM izopropyl-1-thio- β -D-galaktopyranozid (IPTG, Sigma) při teplotě 30°C. Periplazmatický extrakt buněk se připravil resuspendováním buněčného peletu v 25 mM Tris (pH 7,5) obsahujícím 20 % (hmotnost/objem) sacharózy, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA a 0,1 mM PMSF. Pak následuje inkubace při teplotě 4 °C s jemným mícháním jednu hodinu. Po centrifugaci při 15 000 ot./min. 15 minut se rozpustný protein Fab izoloval ze supernatantu afinitní chromatografií použitím kolony s proteinem G podle protokolu výrobce (Amersham Pharmacia Biotech).

Příklad I(e). Selekcce lidského anti-KDR Fab z fágové knihovny

[0096] K selekci se použila velká fágová knihovna vystavující lidský Fab obsahující $3,7 \times 10^{10}$ klonů (DeHaard et al., J. Biol. Chem. 274: 18218-30 (1999)). Knihovnu tvoří geny variabilních lehkých řetězců protilátky amplifikované PCR fúzované s geny lidských konstantních lehkých řetězců (κ a λ) a geny variabilních těžkých řetězců amplifikované PCR fúzované s DNA kódující doménu C_{H1} těžkého řetězce IgG1. Konstrukcím těžkých řetězců a lehkých řetězců předchází signální sekvence *pelB* v případě lehkého řetězce a signální sekvence genu III v případě těžkého řetězce. Konstrukce těžkých řetězců dále kódují část genu III proteinu k vystavení na fágovi, hexahistidinovou značku a značku c-myc tvořenou 11 aminokyselinami následovanou kodonem amber (TAG). Hexahistidinová značka a značka c-myc se může použít k izolaci nebo detekci. Kodon amber umožňuje použít k vystavení na fágovi supresivního hostitele (jako jsou buňky TG1) nebo produkci fragmentů Fab v rozpustné formě, pokud se transformovaly do nesupresivního hostitele (jako jsou buňky HB2151).

[0097] Zásobní roztok vytvořené knihovny se nechal růst do dosažení log fáze, přidal se pomocný fág M13-K07 a amplifikoval se přes noc v médiu 2YTAK (2YT obsahující 100 µg/ml ampicilinu a 50 µg/ml kanamycinu) při teplotě 30 °C. Fágový přípravek se srážel ve 4 % PEG/0,5 M NaCl, resuspendoval se v 3 % odtučněné mléko/PBS obsahující 500 µg/ml proteinu AP a inkuboval se při teplotě 37 °C jednu hodinu, přičemž došlo k zachycení fága vystavujícího anti-AP Fab fragmenty a k blokování jiného nespecifického navázání.

[0098] Zkumavky Maxisorp Star (Nunc, Roskilde, Dánsko) potažené KDR-AP (10 µg/ml v PBS) se nejdříve blokovaly 3 % mléko/PBS při teplotě 37 °C jednu hodinu a pak se inkubovaly s fágovým přípravkem při teplotě místnosti jednu hodinu. Zkumavky se promyly desetkrát PBST (PBS obsahující 0,1 % Tween-20) následovalo deseti násobné promytí PBS. Vázaný fág se eluoval při teplotě místnosti 10 minut 1 ml čerstvě připraveného roztoku 100 mM triethylaminu (Sigma, St. Louis, MO). Eluovaný fág se inkuboval s 10 ml buněk TG1 v mid-log fázi při teplotě 37 °C 30 minut za stálého míchání. Infikované buňky TG1 se shromáždily centrifugací, nanesly se na několik velkých ploten s médiem 2YTAG a inkubovaly se přes noc při teplotě 30 °C. Všechny kolonie vyrostlé na plotnách se seškrábly do 3 až 5 ml média 2YTA, přimíchal se glycerol (konečná koncentrace 10 %). Buňky se rozdělily do alikvotů a uchovávaly se při teplotě -70 °C. Při dalším cyklu selekce se 100 µl zásobního roztoku fága přidalo k 25 ml média 2YTAG a buňky se nechaly se růst do dosažení mid-log fáze. Ke kultuře se přidal pomocný fág M13K07. Kultura se amplifikovala, srážela a použila se k selekci podle postupu popsánoho shora v textu. V postupu došlo ke snížení koncentrací KDR-AP imobilizovaném na imunologických zkumavkách a ke zvýšení počtu promytí po navázání.

[0099] S imobilizovaným KDR se provedly celkem tři cykly selekce, přičemž se použily různé koncentrace proteinu a různý počet promytí po počátečním navázání. Po každém cyklu selekce se náhodně vybralo 93 klonů a v testu fágová ELISA se zjišťovala jejich schopnost vázat se na KDR. 70 klonů ze 93 (75 %) po druhém

cyklu selekce a více než 90 % získaných klonů po třetím cyklu selekce se vázalo na KDR. To naznačuje vysokou účinnost postupu selekce. Segmenty DNA ze všech 70 klonů kódující Fab vázajících se na KDR ve druhém cyklu selekce, se amplifikovaly, štěpily se restriktivním enzymem *Bst*I a porovnávaly se jejich paterny fingerprintingu. Získalo se celkem 42 různých paternů, což indikuje výbornou rozdílnost izolovaných anti-KDR Fab. Test zkřížené reaktivity ukázal, že 19 ze 42 protilátek je k KDR specifických, zatímco 23 protilátek se váže na KDR a na jeho myší homolog Flk-1. Další selekce se dosáhlo testem konkurenčního navázání VEGF, kde se hodnotí navázání rozpustného KDR na imobilizovaný VEGF v přítomnosti anti-KDR Fab fragmentů nebo v jejich nepřítomnosti. Test identifikoval 4 klony Fab, které byly schopny blokovat navázání VEGF na KDR. Tři z nich byly KDR specifické a jeden zkříženě reagoval s Flk-1. Analýza DNA fingerprintingu a sekvenční analýzy potvrdily, že všechny čtyři protilátky blokující KDR/VEGF se liší (Obr. 1) a obsahují jedinečné sekvence DNA a aminokyselinové sekvence.

[0100] Aminokyselinové sekvence CDR1, CDR2 a CDR3 domén V_H a V_L čtyř klonů referenčních příkladů jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1- CDR sekvence vybraných lidských Fab vázajících se na KDR			
klon	CDR1	CDR2	CDR3
Lehký řetězce			
D2C6	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO:1)	DSSNRAT (SEQ ID NO:2)	LQHNTFPFT (SEQ ID NO:3)
D2H2	RASQGISSRLA (SBQ ID NO:4)	AASSLQT (SEQ ID NO:5)	QQANRFPPT (SEQ ID NO:6)
DIH4	AGTTTDLTYIDLVS (SEQ ID NO:7)	DGNKRPS (SEQ ID NO:8)	NSYVSSRFYV (SBQ ID NO:9)
D1F7	SGBTSWGNTAN (SEQ ID NO:10)	NNNQRP (SEQ ID NO:11)	AAWDDSLNGHWV (SEQ ID NO:12)

Tabulka 1- CDR sekvence vybraných lidských Fab vázajících se na KDR

klon	CDR1	CDR2	CDR3
Lehký řetězce			
Těžký řetězec			
D2C6	GFTFSSYSMN (SEQ M NO:13)	SISSSSSYIYYADSVKG (SBQ ID NO:14)	VTDAFDI (SEQ ID NO:15)
D2H2	GFTFSSYSMN (SEQ ID NO:13)	SISSSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:14)	VTDAFDI (SEQ ID NO:15)
D1H4	GFTFSSYSMN (SBQ ID NO:13)	SISSSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:14)	VTDAFDI (SEQ ID NO:15)
D1F7	GGTFSSYAIS (SEQ ID NO:16)	GGHFIFGTANYAQKFQG (SEQ ID NO:17)	GYDYYDSSGVASPPDY (SEQ ID NO:18)
Úplné sekvence V_H a V_L řetězců jsou uvedeny v seznamu sekvencí. V případě referenčního D1F7 je sekvence DNA oblasti V_H reprezentována SEQ ID NO: 19 a aminokyselinová sekvence V_H je reprezentována SEQ ID NO: 20 a sekvence DNA oblasti V_L reprezentována SEQ ID NO: 21 a aminokyselinová sekvence V_L je reprezentována SEQ ID NO: 22.			

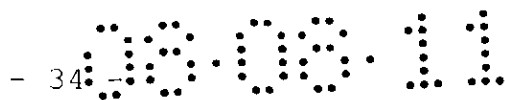
[0101] V případě referenčního příkladu D2C6 je sekvence DNA V_H reprezentována SEQ ID NO: 23 a aminokyselinová sekvence V_H je reprezentována SEQ ID NO: 24 a sekvence DNA V_L reprezentována SEQ ID NO: 25 a aminokyselinová sekvence V_L je reprezentována SEQ ID NO: 26.

[0102] V případě referenčního příkladu D2H2 je sekvence DNA V_H reprezentována SEQ ID NO: 30 a aminokyselinová sekvence V_H je reprezentována SEQ ID NO: 31 a sekvence DNA V_L reprezentována SEQ ID NO: 32 a aminokyselinová sekvence V_L je reprezentována SEQ ID NO: 33.

[0103] V případě referenčního příkladu D1H4 je sekvence DNA V_H reprezentována SEQ ID NO: 27 a aminokyselinová sekvence V_H je reprezentována SEQ ID NO: 24 a sekvence DNA V_L reprezentována

SEQ ID NO: 28 a aminokyselinová sekvence V_L je reprezentována SEQ ID NO: 29.

[0104] Druhá knihovna se vytvořila kombinací jediného těžkého řetězce referenčního příkladu D2C6 s diverzní populací lehkých řetězců získaných z původní knihovny. Identifikovalo se deset rozdílných fragmentů Fab a označily se SA1, SA3, SB10, SB5, SC7, SD2, SD5, SF2, SF7 a 1121. Sekvence DNA a aminokyselinové sekvence V_L deseti fragmentů Fab jsou reprezentovány následujícím způsobem. V případě referenčního příkladu SA1 je sekvence DNA V_L reprezentována SEQ ID NO: 34 a aminokyselinová sekvence V_L je reprezentována SEQ ID NO: 35. V případě referenčního příkladu SA3 je sekvence DNA V_L reprezentována SEQ ID NO: 36 a aminokyselinová sekvence V_L je reprezentována SEQ ID NO: 37. V případě referenčního příkladu SB10 je sekvence DNA V_L reprezentována SEQ ID NO: 38 a aminokyselinová sekvence V_L je reprezentována SEQ ID NO: 39. V případě referenčního příkladu SC7 je sekvence DNA V_L reprezentována SEQ ID NO: 42 a aminokyselinová sekvence V_L je reprezentována SEQ ID NO: 43. V případě referenčního příkladu SD2 je sekvence DNA V_L reprezentována SEQ ID NO: 44 a aminokyselinová sekvence V_L je reprezentována SEQ ID NO: 45. V případě referenčního příkladu SD5 je sekvence DNA V_L reprezentována SEQ ID NO: 46 a aminokyselinová sekvence V_L je reprezentována SEQ ID NO: 47. V případě referenčního příkladu SF2 je sekvence DNA V_L reprezentována SEQ ID NO: 48 a aminokyselinová sekvence V_L je reprezentována SEQ ID NO: 49. V případě referenčního příkladu SF7 je sekvence DNA V_L reprezentována SEQ ID NO: 50 a aminokyselinová sekvence V_L je reprezentována SEQ ID NO: 51. V případě příkladu 1121 je sekvence DNA V_L reprezentována SEQ ID NO: 52 a aminokyselinová sekvence V_L je reprezentována SEQ ID NO: 53.



[0105] Sekvence V_L CDR jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2 - Sekvence CDR lehkého řetězce lidských Fab vázajících se na KDR			
Klon	CDR1	CDR2	CDR3
SA1	TGSHSNFGAGTDV (SEQ ID NO:54)	GDSNRPS (SEQ ID NO:55)	QSYDYGLRGWV (SEQ ID NO:56)
SA3	RASQNINNYLN (SEQ ID NO:57)	AASTLQS (SEQ ID NO:58)	QQYSRYPPT (SEQ ID NO:59)
SB10	TGSSTDVGNINYIS (SEQ ID NO:60)	DVTSRPS (SEQ ID NO:61)	NSYSATDTLV (SEQ ID NO:52)
SBS	TGQSSNIGADYDVH (SEQ ID NO:63)	GHNNRPS (SEQ ID NO:64)	QSYDSSLGLV (SEQ ID NO:65)
SC7	RASQDISSWLA (SEQ ID NO:66)	AASLLQS (SEQ ID NO:67)	QQADSFPT (SEQ ED NO:68)
SD2	RASQSIKRWLA (SEQ ID NO:69)	AASTLQS (SEQ ID NO:70)	QQANSFPPT (SEQ ID NO:71)
SD5	SGSRNIGAEHYEVQ (SEQ ID NO:72)	GDTNRPS (SEQ ID NO:73)	QSYDTSLRGPV (SEQ ID NO:74)
SF2	TGSSNIGTGVDVH (SEQ ID NO:75)	AYTNRPS (SEQ ID NO:76)	QSFDDSLNGLV (SEQ ID NO:77)
SF7	TGSHSNFGAGTDVH (SEQ ID NO:78)	GDTHRPS (SEQ ID NO:79)	QSYDYGLRGWV (SEQ ID NO:80)
1121	RASQGIDNWLG (SEQ ID NO:81)	DASMLDT (SEQ ID NO:82)	QQAKAFPPT (SEQ ID NO:83)

Referenční příklad II. Testy

Referenční příklad II(a). Kvantitativní navázání KDR a blokace interakce KDR/VEGF

[0106] V přímém vazebném testu se přidala do mikrotitrační destičky Maxi-sorp s 96 prohlubněmi potažená KDR různá množství rozpustných Fab proteinů a inkubovala se při teplotě místnosti

jednu hodinu. Po inkubaci se destičky třikrát promyly PBST. Dále se destičky inkubovaly při teplotě místnosti jednu hodinu se 100 μ l konjugátu králičí anti-lidská Fab protilátka-HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratory Inc., West Grove, PA).

Destičky se promyly a provedlo se vyvinutí postupem vhodným pro test fágová ELISA popsaným shora v textu. V konkurenčním testu blokace KDR/VEGF se různá množství proteinů Fab smíchala s pevným množstvím KDR-AP (100 ng) a inkubovaly se při teplotě místnosti jednu hodinu. Směsi se pak přenesly na mikrotitrační destičky s 96 prohlubněmi, které byly předem potaženy VEGF₁₆₅ (200 ng/prohlubeň) a inkubovaly se při teplotě místnosti další 2 hodiny. Pak se destičky pětkrát promyly a přidal se substrát pro AP (*p*-nitrofenylfosforečnan, Sigma). Ke kvantifikaci vázaných molekul KDR-AP (8) se měřila absorbance při 405 nm. Pak se vypočítala hodnota IC₅₀, to je koncentrace proteinu nutná k 50 % inhibici navázání KDR na VEGF.

[0107] Čtyři klony blokuující VEGF (D2C6, D2H2, D1H4, D1F7) se exprimovaly jako rozpustné Fab a izolovaly se z periplazmatických extraktů *E. coli* pomocí afinitní chromatografie s proteinem G. Výtěžek čištěných proteinů Fab těchto klonů je v rozmezí od 60 do 400 μ g/l kultury. Analýza SDS-PAGE každého izolovaného Fab přípravku prokázala jediný pruh proteinu s očekávanou molekulovou velikostí (Obr. 1B).

[0108] Obrázek zobrazuje na dávce-závislé navázání anti-KDR Fab fragmentů na imobilizovaný receptor. K testování se použil pří-
mý vazebný test ELISA. Klony D2C6 a D2H2 se váží s vyšší účinností a pak následují klony D1H4 a D1F7. Všechny čtyři Fab blokují navázání KDR na imobilizovaný VEGF (Obr. 2B). Koncentrace protilátek nutné k 50 % inhibici navázání KDR na VEGF je přibližně 1 nM v případě klonů D2C6, D2H2 a D1H4 a 20 nM v případě klonu D1F7. Pouze klon D1F7 blokuje navázání VEGF na Flk-1 (Fig. 2C) s hodnotou IC₅₀ přibližně 15 nM.

Referenční příklad II(b). BIAcore analýza rozpustného scFv

[0109] Kinetiky navázání rozpustných proteinů Fab na KDR se stanovily metodou rezonance povrchového plazmonu použitím bi-

osenzoru DIAcore (Pharmacia Biosensor). Fúzní protein KDR-AP se imobilizoval na čip senzoru a rozpustné proteiny Fab se zavedly injekcí v rozmezí koncentrací od 1,5 M do 100 nM. Získaly se senzogramy pro každou koncentrací a hodnotily se použitím programu BIA Evaluation 2.0, přičemž se stanovily rychlostní konstanty *kon* a *koff*. Hodnota K_d se vypočítala z poměru rychlostních konstant *koff/kon*.

[0110] Všechny tři KDR specifické Fab fragmenty se váží na imobilizovaný receptor s hodnotou K_d 2 až 4 nM (tabulka 3). Zkříženě reagující klon D1F7 má hodnotu K_d 45 nM, která je přibližně 10 až 15 násobně slabší než hodnoty KDR-specifických klonů. Je nutné si pamatovat, že ačkoli všechny hodnoty K_d tří KDR specifických Fab fragmentů jsou podobné, jednotlivé vazebné kinetiky, to je *kon* a *koff* těchto protilátek se liší. Například klon D2C6 vykazuje nejrychlejší „on-rate“, zatímco D1H4 vykazuje nejpomalejší „off-rate“ (tabulka 3).

Tabulka 3 - Vazebné kinetiky čtyř neutralizačních lidských anti-KDR-Fab fragmentů

Klon	<i>kon</i> ($10^4 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$)	<i>koff</i> (10^{-4}S^{-1})	K_d (nM)
Hu-2C6 Fab	27,3±8,6*	5,38±0,54	1,97
Hu-2H2 Fab	12,4±29	4,87±0,18	3,93
Hu-1H4 Fab	5,55±0,59	1,53±0,22	2,76
Hu-1F7 Fab	4,14±1,21	18,7±2,12	45,2

*Všechna čísla jsou stanovena analýzou BIAcore a reprezentují průměr ± SE z alespoň tří nezávislých stanovení.

Referenční příklad II(c). Mapování vazebného epitopu

[0111] Produkce variant KDR s delecí v extracelulárních Ig-podobných doménách se popisuje v publikaci (Lu et al. (2000)). V testu mapování epitopu se nejdříve KDR-AP celé délky, Ap fúze dvou KDR variant s delecí v Ig doménách a Flk-1-AP imobilizovaly na destičku s 96 prohlubněmi (Nunc), kde se jako záchyťové

činidlo používá králičí anti-Ap protilátky (DAKO-immunoglobulins Glostrup, Dánsko). Destička se pak inkubovala s různými anti-KDR Fab proteiny při teplotě místnosti jednu hodinu. Pak následovala inkubace s konjugátem králičí anti-lidská Fab protilátka-MP. Destička se promyla a provedlo se vyvíjení, jak se popisuje shora v textu.

[0112] Vazebné epitopy anti-KDR Fab fragmentů se mapovaly použitím KDR v plné délce a dvou variant KDR s delecí v Ig doménách. KDR(1-3) je varianta KDR obsahující první tři N-terminální Ig domény. KDR(3) je varianta obsahující pouze třetí Ig doménu. Jak je zobrazeno na Obr. 3, klony D2C6 a D1H4 se váží na KDR stejně dobře, KDR(1-3) a KDR(3) mají tedy svůj vazebný epitop(y) lokalizovaný v Ig doméně 3. Klony D2H2 a D1F7 se váží na KDR v plné délce a RDR(1-3) s vyšší účinností, což indikuje širší vazebný epitop(y) v KDR Ig oblastech 1 až 3. Pouze klon D1F7 reaguje zkříženě s Flk-1.

Referenční příklad II(d). Anti-mitogenní test.

[0113] Buňky HUVEC (5×10^3 buněk/prohlubeň) se nanesly na destičky pro tkáňové kultury s 96 prohlubněmi (Wallach Inc., Gaithersburg, MD) ve 200 μ l média BBM-2 bez VEGF, bazického fibroblastového růstového faktoru (bFGF) nebo epidermálního růstového faktoru (EGF) a inkubovaly se při teplotě 37 °C 72 hodin. Stanovení se provedlo ve zdvojeném provedení. Do prohlubní se přidala různá množství Fab proteinů a destičky se pre-inkubovaly při teplotě 37 °C jednu hodinu. Pak se přidal VEGF₁₆₅, aby konečná koncentrace byla 16 ng/ml. Po 18 hodinách inkubace se do každé prohlubně přidalo 0,25 μ Ci [³H]TdR (Amersham) a destičky se inkubovaly další 4 hodiny. Buňky se promyly jedenkrát PBS, aplikoval se trypsin a buňky se shromáždily použitím skleněného filtru (Printed Filtermat A, Wallach) pomocí zařízení (Harvester 96, MACH III, TOMTEC, Orange, CT). Membrána se třikrát promyla vodou a sušila se na vzduchu. Přidal se scintilační roztok a radioaktivita začleněná do DNA se stanovila scintilačním detektorem (Wallach, Model 1450 Microbeta Scintillation Counter).

[0114] Schopnost lidského anti-KDR Fab blokovat mitogenní aktivitu stimulovanou VEGF v buňkách HUVEC je zobrazená na Obr. 4. Všechny čtyři lidské Fab fragmenty inhibovaly syntézu DNA vyvolanou VEGF v buňkách HUVEC na dávce závislým způsobem. Koncentrace Fab, která inhibovala 50 % (EC_{50}) začlenění [3H]-TdR stimulované VEGF v buňkách HUVEC je přibližně 0,5 nM v případě klonů D2C6 a D1H4, 0,8 nM v případě klonů D2H2 a 15 nM v případě klonů D1F7. Kontroly zahrnovaly pouze VEGF (1 500 cpm) a pouze médium (60 cpm). Test se provedl ve zdvojeném provedení. Zobrazená data reprezentují alespoň tři nezávislé experimenty.

Příklad II(e). Migrační test leukemických buněk

[0115] Buňky HL60 a HEL se třikrát promyly médiem RPMI 1640 bez séra a suspendovaly se v médiu v koncentraci 1×10^6 buněk/ml. V případě buněk HL60 se alikvot o objemu 100 μ l přidal do inzertů Transwell (Costar®, Coming Incorporated, Corning, NY) s velikostí pórů 3 μ m. V případě buněk HEL se stejným způsobem použily inzerty s velikostí pórů 8 μ m. Buňky se inkubovaly s anti-KDR Fab proteiny (5 μ g/ml) 30 minut při teplotě 37 °C. Inzerty se pak umístily do prohlubní destiček s 24 prohlubněmi, které obsahují 0,5 ml média RPMI 1640 bez séra s VEGF₁₆₅ nebo do média bez séra i bez uvedeného proteinu. Migrace se provedla při teplotě 37 °C, 5 % CO₂ 16 až 18 hodin v případě buněk HL60 a v případě buněk HEL migrace trvala pouze 4 hodiny. Migrované buňky se shromáždily ze spodní části a jejich počet se stanovil přístrojem Coulter (Model Z1, Coulter Electronics Ltd., Luton, Anglie).

[0116] Na dávce závislé migrace buněk HL60 a HEL vyvolaná VEGF s maximální stimulací se dosáhlo při 200 ng/ml (Obr. 5A). Všechny anti-KDR Fab fragmenty podstatně inhibovaly migraci buněk HL60 a HEL stimulovanou VEGF (Obr. 5B). Jako kontrola se použil Fab fragment C225, což je protilátka určená proti receptoru BGF, který nevykazoval v tomto testu podstatný inhibiční účinek.

Příklad III(a). Produkce IgG

Příklad III(a). Konstrukce vektorů k expresi IgG.

[0117] K expresi lehkých a těžkých řetězců IgG se zkonstruovaly nezávislé vektory. Klonované geny V_L se štěpily a ligovaly do vektoru pKN100 (MRC). Klonované geny V_H se štěpily a ligovaly do vektoru pGID105, který obsahuje konstantní oblast těžkého řetězce (γ) lidského IgG I. Vektory pKN100 a pGID105 jsou od firmy MRC. Konstrukce se testovaly štěpením restriktivními enzymy a ověřovaly se dideoxynukleotidovým sekvenováním. V obou případech expresi řídí HCMV promotor a je ukončena umělou terminační sekvencí.

[0118] Uspořádané geny těžkého a lehkého řetězce se pak klonovaly do Lonza GS expresivních vektorů pEE6.1 a pEE12.1. Vektor těžkého a lehkého řetězce se rekombinovaly do jediného vektoru, aby se dosáhlo stabilní transfekce buněk CHO a NS0. Transfekované buňky se kultivovaly v médiu bez glutaminu a exprimovaly se protilátky v koncentraci až 1 g/l.

Příklad III(b). Produkce a charakterizace lidského anti-KDR-IgG.

[0119] IMC-2C6 a IMC-1121 se produkovaly ve stabilně transfekovaných buněčných liniích NS0 kultivovaných v podmínkách bez séra a izolovaly se ze vsádkové buněčné kultury použitím afinitní chromatografie s proteinem A. Čistota protilátky se analyzovala SDS-PAGE a koncentrace se stanovila testem ELISA, kde se jako záchytové činidlo použily anti-lidské Fc protilátky a jako detekční činidlo konjugát protilátky proti lidskému řetězci k - křenová peroxidáza (HRP). Jako standard ke kalibraci se použily protilátky IMC-225 stupně použití v klinické praxi. Aby se dokázalo, že produkty nejsou kontaminovány endotoxiny, se testovala hladina endotoxinu každého protilátkového přípravku.

[0120] U anti-KDR protilátek se hodnotila schopnost vázat se na KDR a blokovat navázání VBGF. V přímém vazebném testu se do mikrotitračních destiček Maxi-sorp (Nunc, Roskilde, Dánsko) s

96 prohlubněmi potaženými KDR přidalo různé množství protilátek. Destičky se inkubovaly při teplotě místnosti jednu hodinu. Destičky se třikrát promyly PBS obsahujícím 0,1 % Tween-20. Destičky se inkubovaly při teplotě místnosti jednu hodinu se 100 μ l konjugátu králičího Fc proti lidskému IgG - HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratory Inc., West Grove, PA). Destičky se promyly a provedlo se jejich vyvíjení, jak se uvádí shora v textu. Lidské protilátky IMC-2C6 a IMC-1121 se porovnávaly s IMC-1C11 (myší protilátka specifická pro KDR) a s IMC-C225 chimerová protilátka specifická pro EGFR). Anti-KDR protilátky se váží na KDR v režimu závislém na dávce, přičemž IMC-1121 se váže silněji (Obr. 6A).

[0121] Účinnost anti-KDR protilátek při blokaci navázání KDR na VEGF se měřila v kompetičním testu. Různá množství protilátek se smíchala s pevným množstvím KDR-AP (100 ng) a inkubovaly se při teplotě místnosti jednu hodinu. Směsi se pak přenesly na mikrotitrační destičky s 96 prohlubněmi předem potaženými VBQF₁₆₅ (200 ng/prohlubeň) a destičky se inkubovaly při teplotě místnosti další 2 hodiny. Pak se destičky 5 krát promyly a přidal se substrát pro AP (*p*-nitrofenylfosforečnan, Sigma). Ke kvantifikaci vázaných molekul KDR-AP se odečetla absorbance při 405 nm. Pak se vypočítala hodnota IC₅₀, to je koncentrace protilátky nutná k 50 % inhibici navázání KDR na VEGF. Anti-KDR protilátky silně blokovaly navázání KDR na VEGF (Obr. 6B) s vysokou účinností. Hodnota IC₅₀ je v případě všech tří protilátek přibližně 0,8 až 1,0 nM. Kontrolní protilátka IMC-C225 (anti-lidská EGFR) se neváže na KDR a neblokuje interakci KDR/VEGF.

[0122] Afinita nebo avidita protilátky se stanovila analýzou BIAcore, jak se popisuje shora v textu. Stanovily se vazebné kinetiky, to je asociační rychlostní konstanta (*kon*) a disociační rychlostní konstanta (*koff*), anti-KDR protilátek a vypočítala se disociační konstanta **Kd** (tabulka 4).

Tabulka 4 - Vazebné kinetiky anti-KDR protilátek			
Protilátka	k_{on} ($10^4 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$)	k_{off} (10^{-4}S^{-1})	Kd (nM)
referenční p1C11 scFv	7,7±2,1*	1,0±0,09	1,4±0,3
referenční IMC-1C11	13,4±2,9	0,37±0,13	0,27±0,06
referenční Hu-2C6 Fab	17,1±5,7	5,5±0,76	3,6±1,7
referenční IMC-2C6 IgG	21,2±8,1	0,43±0,03	0,20±0,01
Hu-1121 Fab	29,6±7,3	0,31±0,06	0,11±0,02
IMC-1121 IgG	47,9±2,4	0,25±0,04	0,05±0,01
* Všechny čísla se stanovila analýzou BIAcore a reprezentují průměr ± SE z alespoň tří nezávislých experimentů			

IMC-1C11 se váže na imobilizovaný KDR s disociační konstantou (K_d) 0,27 nM, což je přibližně pět krát vyšší hodnota, než je tomu u jejího Fab doplňku. Hodnota K_d IMC-2C6 je 0,2 nM, což je přibližně 18 krát vyšší ve srovnání s hodnotou monovalentní Hu-2C6 Fab, což hlavně způsobilo zlepšení „off-rate“. Afinitní maturace Hu-2C6 vedla k Hu-1121 Fab s 33 násobným zlepšením hodnoty K_d (z 3,4 nM na 0,11 nM). Konverze protilátky Hu-1121 na bivalentní IgG, IMC-1121, vedla k přibližně dvojnásobnému zvýšení celkové vazebné avidity.

Příklad III(c). Inhibice navázání VEGF na buňky a mitogeneze HUVBC stimulovaná VEGF

[0123] Při buněčném radioimunologickém testu se různá množství anti-KDR protilátek smíchala s pevným množstvím (2 ng) VEGF₁₆₅ značeného ¹²⁵I (R & D Systems). Směsi se přidaly k buňkám HUVEC, které tvoří v mikrotitrační destičce s 96 prohlubněmi z 80 až 90 % konfluentní monovrstvu. Destička se inkubovala při teplotě místnosti 2 hodiny, promyla se pětkrát chlazeným PBS a stanovilo se množství radioaktivity vázané na endoteliální buňky. Jak je zobrazeno na Obr. 7A, anti-KDR protilátky úspěšně konkurova-

ly radioaktivně značenému VEGF při navázání na buňky HUVEC. Data reprezentují průměr \pm SD vypočítaný ze tří nezávislých stanovení.

[0124] Protilátky také blokují mitogenezi buněk HUVEC stimulo-
vanou VEGF způsobem závislým na dávce (Obr. 7B). Jak se popisu-
je shora v textu v případě fragmentů Fab, různá množství anti-
KDR protilátek se nejdříve předem inkubovala s buňkami HUVEC
(které se před tím inkubovaly bez růstového faktoru) (5×10^3
buněk/prohlubeň) při teplotě 37 °C jednu hodinu, pak se přidal
VEGF165, aby konečná koncentrace byla 16 ng/ml. Po 18 hodinách
inkubace se přidalo do každé prohlubně 0,25 μ Ci [3 H]-TdR (Amer-
sham) a destička se inkubovala 4 hodiny. Buňky se promyly,
shromáždily se a na scintilačním detektoru se stanovila radio-
aktivita začleněná v DNA. IMC-1121, protilátka s nejvyšší afi-
nitou, je nejúčinnější inhibitor s ED50 přibližně 0,7 nM
v porovnání s hodnotou 1,5 nM odpovídající protilátkám IMC-1C11
i IMC-2C6. ED50 je koncentrace, která vede k 50 % inhibici za-
členění [3 H]-TdR.

Příklad IV. Inhibice leukemických buněk a progresu leukemie

Příklad IV(a). Exprese VEGFR a BDR v leukemických buňkách

[0125] Testovala se exprese VEGF a KDR, pomocí RT-PCR, ve třech
buněčných liniích myeloidní leukemie: HL60 (promyelocyty); HEL
(megakaryocyty) a U937 (histiocyty). Při amplifikaci VEGF, Flt-
1, KDR a interní kontroly, kterou je α -aktin, se použily násle-
dující primery: VEGF forward: 5'-TCGGCCTCCGAAACCATGA-3' (SEQ
ID NO:86) a reverzní: 5'-CCTGGTGGAGATCTGGTTC-3' (SEQ ID
NO:87); Flt-1 forward: 5'-TTTGTGATTTGGCCTTGC-3' (SEQ ID NO:88)
a reverzní: 5'-CAGGCTCATGAACTTGAAAGC-3' (SEQ ID NO:89); KDR
forward: 5'-GTGACCAACATGGAGTCGTG-3' (SEQ ID NO:90) a reverzní:
5'-CCAGAGATTCCATGCCACTT-3' (SEQ ID NO:91); α -aktin forward:
5'-TCATGTTTGGAGACCTTCAA-3' (SEQ ID NO:92) a reverzní:
5'-GTCTTTGCGGATGTCCACG-3' (SEQ ID NO:93). Produkty PCR se ana-
lyzovaly na 1% agarózovém gelu. Jak je zobrazeno na Obr. 8A,
všechny tři linie exprimují VEGF a buňky HL60 a HEL, nikoliv

U937, také exprimují KDR. Uvedené tři buněčné linie také exprimují Flt-1, jak se potvrdilo RT-PCR (není zobrazeno).

[0126] Produkce VEGF se testovala u všech třech leukemických buněčných linií kultivovaných za podmínek s 10 % FCS nebo bez séra. Leukemické buňky se shromáždily, promyly se samotným médiem RPMI 1640 a inokulovaly se na destičky s 24 prohlubněmi s hustotou 5×10^5 buněk/ml. Pak se přidalo 10 % FCS nebo se buňky kultivovaly bez séra. Inkubace proběhla při teplotě 37 °C 72 hodin. Celkový počet buněk se stanovil použitím přístroje Coulter (Model Z1, Coulter Electronics Ltd., Luton, Anglie) a koncentrace VEGF se stanovila použitím kitu pro test ELISA (Biosource International, Camarillo, CA). Leukemické buňky vylučovaly podstatné množství VEGF, pokud se kultivovaly *in vitro* (Obr. 8B), a buňky HL60 a U937 produkovaly více VEGF v podmínkách kultivace bez séra.

Příklad IV(b). Inhibice migrace leukemických buněk vyvolaná VEGF

[0127] V testech migrace leukemických buněk, jak se popisuje v příkladu II(e), se použily tři leukemické buněčné linie. Migrace trvala 16 až 18 hodin v případě buněk HL60 nebo 4 hodiny v případě buněk HEL a U937.

[0128] Všechny tři leukemické buněčné linie migrují při odezvě na VEGF (Obr. 9). Při inkubaci s anti-KDR protilátkami došlo k inhibici migrace buněk HL60 a HEL vyvolané VEGF (Obr. 9A a 9B), ale neměla vliv na migraci buněk U937, které neexprimují KDR (Obr. 9C). Inhibice je závislá na dávce. Migraci buněk U937 vyvolanou VEGF však účinně inhibovala anti-lidský Flt-1 protilátka, Mab 612 (Obr. 9C). Jak se očekávalo, anti-EGFR protilátka IMC-C225 nevykazovala žádný účinek na migraci lidských leukemických buněk vyvolanou VEGF.

Příklad IV(b). Inhibice růstu leukemie *in vivo*.

[0129] Ve všech experimentech se použily myši NOD-SCID jedno-
ného pohlaví (samice) ve věku 6 až 8 týdnů. Myši se ozářily 3,5

Gy ze zdroje gamma záření ^{137}Cs dávkou záření přibližně 0,9 Gy/min a intravenózně se inokulovaly 2×10^7 buněk HL60. Tři dny po inokulaci nádoru se skupinám obsahujícím 7 až 9 myši dvakrát týdně aplikovaly intraperitoneální injekcí různé dávky protilátek IMC-1C11, IMC-2C6 nebo IMC-1121. U myši se denně sledovaly příznaky toxicity a zaznamenával se čas přežití. Ke statistické analýze se použil neparametrický, „one-tailed“ test Mann Whitney Rank Sum Test

[0130] Všechny myši, které nebyly ošetřeny, uhynuly během 17 dní (Obr. 10, průměrný čas přežití, 14 ± 3 dny). Při těchto vysokých dávkách nádorových buněk aplikace IMC-1 C11 v množství 200 $\mu\text{g}/\text{myš}/\text{injekce}$ trochu prodloužila čas přežití, ale všechny myši uhynuly během 35 dní (průměrná doba přežití 21 ± 7 dní; střední hodnota přežití 19 dní, $p=0,03$ v porovnání s kontrolní skupinou). IMC-2C6 aplikovaná ve stejné dávce 200 $\mu\text{g}/\text{myš}/\text{injekce}$ podstatě prodloužila přežití myši na 34 ± 12 dní (střední hodnota = 29 dní, $p < 0,01$ v porovnání s kontrolou a $p=0,01$ v porovnání se skupinou, kde se aplikovala protilátka IMC-1C11). Protilátka s nejvyšší afinitou, IMC-1121, demonstrovala při leukemii daleko silnější účinek, zvláště s ohledem na IMC-1C11. Myši, kterým se aplikovala protilátka IMC-1121, přežily 63 ± 12 dní (střední hodnota = 60 dní, $p < 0,001$ při srovnání se skupinou, kde se aplikovala IMC-1C11, i se skupinou, kde se aplikovala IMC-2C6). Když se aplikovala nižší testovaná dávka protilátek (100 $\mu\text{g}/\text{myš}/\text{injekce}$), IMC-1121 byla opět účinnější. Myši ošetřené nižší dávkou IMC-1121 přežily 46 ± 16 dní (střední hodnota = 41 dní). V průběhu experimentu se nepozorovaly u žádného zvířete ošetřeného protilátkami známky toxicity.

Seznam sekvencí

[0131]

<110> ImClone Systems Incorporated
<120> Lidské protilátky specifické pro KDR a jejich použití

<130> 11245/47876
<140> PCT/US03/06459
<141> 2003-03-04
<150> 60/361,783
<151> 2002-03-04
<160> 93
<170> wordPerfect 8.0 pro windows

<210> 1
<211> 11
<212> protein
<213> člověk

<400> 1

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
5 10

<210> 2
<211> 7
<212> protein
<213> člověk

<400> 2

Asp Ser Ser Asn Arg Ala Thr
3

<210> 3
<211> 9
<212> protein
<213> člověk

<400> 3

Leu Gln His Asn Thr Phe Pro Pro Thr
5

<210> 4

<211> 11

<212> protein

<213> člověk

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Arg Leu Ala
5 10

<210> 5

<211> 7

<212> protein

<213> člověk

<400> 5

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Thr
5

<210> 6

<211> 9

<212> protein

<213> člověk

<400> 6

Gln Gln Ala Asn Arg Phe Pro Pro Thr
5

<210> 7

<211> 14

<212> protein

<213> člověk

<400> 7

Ala Gly Thr Thr Thr Asp Leu Thr Tyr Tyr Asp Leu Val Ser
5 10

<210> 8

<211> 7

<212> protein

<213> člověk

<400> 8

Asp Gly Asn Lys Arg Pro Ser
5

<210> 9

<211> 10

<212> protein

<213> člověk

<400> 9

Asn Ser Tyr Val Ser Ser Arg Phe Tyr Val
5 10

<210> 10

<211> 13

<212> protein

<213> člověk

<400> 10

Ser Gly Ser Thr Ser Asn Ile Gly Thr Asn Thr Ala Asn
5 10

<210> 11

<211> 7

<212> protein

<213> člověk

<400> 11

Asn Asn Asn Gln Arg Pro Ser
5

<210> 12

<211> 12

<212> protein

<213> člověk

<400> 12

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly His Trp Val
5 10

<210> 13
<211> 10
<212> protein
<213> člověk

<400> 13

Gly Phe Thr Phe Ser₅ Ser Tyr Ser Met Asn₁₀

<210> 14
<211> 17
<212> protein
<213> člověk

<400> 14

ser Ile Ser Ser Ser₅ Ser Ser Tyr Ile Tyr₁₀ Tyr Ala Asp Ser Val₁₅ Lys

Gly₁₇

<210> 15
<211> 7
<212> protein
<213> člověk

<400> 15

Val Thr Asp Ala Phe₅ Asp Ile

<210> 16
<211> 10
<212> protein
<213> člověk

<400> 16

Gly Gly Thr Phe Ser₅ Ser Tyr Ala Ile Ser₁₀

<210> 17
<211> 18
<212> protein
<213> člověk

<400> 17

Gly Gly Ile Ile Pro₅ Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 10 15
 Gln Gly
 18

<210> 18

<211> 16

<212> protein

<213> člověk

<400> 18

Gly Tyr Asp Tyr Tyr₅ Asp Ser Ser Gly Val Ala Ser Pro Phe Asp Tyr
 10 15

<210> 19

<211> 375

<212> DNA

<213> člověk

<400> 19

gag gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg gcc	48
Glu Val Gln Leu Val ₅ Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	15
tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga ggc acc ttc agc agc tat	96
Ser Val Lys Val ₂₀ Ser Cys Lys Ala Ser ₂₅ Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr	30
gct atc agc tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg	144
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	45
gga ggg atc atc cct atc ttt ggt aca gca aac tac gca cag aag ttc	192
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe ₅₅ Gly Thr Ala Asn Tyr ₆₀ Ala Gln Lys Phe	60
cag ggc aga gtc act ttt acc gcg gac aaa tcc acg agt aca gcc tat	240
Gln Gly Arg Val Thr Phe ₇₀ Thr Ala Asp Lys Ser ₇₅ Thr Ser Thr Ala Tyr	80
atg gag ttg agg agc ctg aga tct gac gac acg gcc gtg tat tac tgt	288
Met Glu Leu Arg Ser ₈₅ Leu Arg Ser Asp ₉₀ Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	95
gcg aga gga tac gat tac tat gat agt agt ggc gtg gct tcc ccc ttt	336
Ala Arg Gly Tyr Asp Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Val Ala Ser Pro Phe	110
gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tca agc	375
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	125

<210> 20

<211> 125

<212> protein

<213> člověk

<400> 20

```

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

<210> 21

<211> 333

<212> DNA

<213> člověk

<400> 21

```

cag tct gtg ctg act cag cca ccc tca gcg tct ggg acc ccc ggg cag      48
Gln Ser Val Leu Thr 5 Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln 15
agg gtc acc atc tct tgt tct gga agc acc tcc aac atc ggt act aat      96
Arg Val Thr Ile 20 Ser Cys Ser Gly Ser 25 Thr Ser Asn Ile Gly Thr Asn 30
act gca aac tgg ttc cag cag ctc cca gga acg gcc ccc aaa ctc ctc      144
Thr Ala Asn Trp Phe Gln Gln 40 Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu 45
atc cac aat aat aat cag cgg ccc tca ggg gtc cct gac cga ttc tct      192
Ile His Asn Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser 50 55 60
ggc tcc aag tct ggc acc tca gcc tcc ctg gcc atc agt ggg ctc cag      240
Gly Ser Lys Ser Gly Thr 70 Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln 75 80
tct gag gat gag gct gat tat tac tgt gca gca tgg gat gac agc ctg      288
Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu 85 90 95
aat ggc cat tgg gtg ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc ctg      333
Asn Gly His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu 100 105 110
    
```

<210> 22

<211> 111

<212> protein

<213> člověk

<400> 22

```

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

<210> 23

<211> 348

<212> DNA

<213> člověk

<400> 23

```

gag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc ctg gtc aag cct ggg ggg      48

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
      5              10      15
tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt agc tat      96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
      20              25      30
agc atg aac tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc      144
Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35              40      45
tca tcc att agt agt agt agt agt tac ata tac tac gca gac tca gtg      192
Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
      50              55      60
aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac tca ctg tat      240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
      65              70      75      80
ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt      288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85              90      95
gcg aga gtc aca gat gct ttt gat atc tgg ggc caa ggg aca atg gtc      336
Ala Arg Val Thr Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
      100             105      110
acc gtc tca agc
Thr Val Ser Ser      348
      115
    
```

- <210> 24
- <211> 116
- <212> protein
- <213> člověk

- <400> 24

```

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

- <210> 25
- <211> 321
- <212> DNA
- <213> člověk

- <400> 25

```

gaa att gtg atg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg      48
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
      5          10          15
gaa aga gcc acc ctg tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc tac      96
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
      20          25          30
tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctg ctg atc      144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
      35          40          45
tat gat tca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc aga ttc agt ggc      192
Tyr Asp Ser Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
      50          55          60
agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctg acc atc agc agc cta gag cct      240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
      65          70          75          80
gaa gat ttt gca act tat tac tgt cta cag cat aac act ttt cct ccg      288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Thr Phe Pro Pro
      85          90          95
acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa      321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
      100          105
    
```

<210> 26
 <211> 107
 <212> protein
 <213> člověk

<400> 26

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

<210> 27
 <211> 348
 <212> DNA
 <213> člověk

<400> 27

gag gtc cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc ctg gtc aag cct ggg ggg 48
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 5 10 15
 tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt agc tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 agc atg aac tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc 144
 Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 tca tcc att agt agt agt agt agt tac ata tac tac gca gac tca gtg 192
 Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac tca ctg tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 gcg aga gtc aca gat gct ttt gat atc tgg ggc caa ggg aca atg gtc 336
 Ala Arg Val Thr Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
 100 105 110
 acc gtc tca agc 348
 Thr Val Ser Ser
 115

<210> 28
 <211> 330
 <212> DNA
 <213> člověk

<400> 28

```

cag tct gcc ctg act cag cct gcc tcc ctg tct ggg tct cct gga cag    48
Gln Ser Ala Leu Thr 5 Gln Pro Ala Ser Leu Ser Gly Ser Pro Gly Gln
                    10
tcg atc acc atc tcc tgc gct gga acc acc act gat ctt aca tat tat    96
Ser Ile Thr Ile Ser Cys Ala Gly Thr Thr Thr Asp Leu Thr Tyr Tyr
                    20                    25                    30
gac ctt gtc tcc tgg tac caa cag cac cca ggc caa gca ccc aaa ctc    144
Asp Leu Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu
                    35                    40                    45
gtg att tat gac ggc aat aag cgg ccc tca gga gtt tct aat cgc ttc    192
Val Ile Tyr Asp Gly Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
                    50                    55                    60
tct ggc tcc aag tct ggc aac acg gcc tcc ctg aca atc tct gga ctc    240
Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
                    65                    70                    75                    80
cag gct gag gac gag gct gat tat tac tgc aac tca tat gta agc agc    288
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Tyr Val Ser Ser
                    85                    90                    95
agg ttt tat gtc ttc gga act ggg acc aag gtc acc gtc cta          330
Arg Phe Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
                    100                    105                    110
    
```

<210> 29
 <211> 110
 <212> protein
 <213> člověk

<400> 29

```

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

<210> 30
 <211> 348
 <212> DNA
 <213> člověk

 <400> 30

gaa gtg cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc ctg gtc aag cct ggg ggg	48
Glu Val Gln Leu Val ₅ Gln Ser Gly Gly ₁₀ Leu Val Lys Pro Gly ₁₅ Gly	
tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt agc tat	96
Ser Leu Arg Leu ₂₀ Ser Cys Ala Ala Ser ₂₅ Gly Phe Thr Phe Ser ₃₀ Ser Tyr	
agc atg aac tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc	144
Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala ₄₀ Pro Gly Lys Gly ₄₅ Leu Glu Trp Val	
tca tcc att agt agt agt agt agt tac ata tac tac gca gac tca gtg	192
Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag gac tca ctg tat	240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala ₇₅ Lys Asp Ser Leu Tyr ₈₀	
ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt	288
Leu Gln Met Asn Ser ₈₅ Leu Arg Ala Glu Asp ₉₀ Thr Ala Val Tyr Tyr ₉₅ Cys	
gcg aga gtc aca gat gct ttt gat atc tgg ggc caa ggg aca atg gtc	336
Ala Arg Val Thr Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly ₁₁₀ Thr Met Val	
acc gtc tca agc	348
Thr Val Ser Ser ₁₁₅	

<210> 31
 <211> 116
 <212> protein
 <213> člověk

<400> 31

```

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

<210> 32

<211> 321

<212> DNA

<213> člověk

<400> 32

```

gac atc cag ttg acc cag tct cca tct tct gtg tct gca tct gta gga      48
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
      5                               10      15
gac aga gtc acc atc act tgt cgg gcg agt cag ggt att agt agt cgg      96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Arg
      20                               25      30
tta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc      144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
      35                               40      45
tat gct gca tcc agt ttg caa act ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc      192
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
      50                               55      60
agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc act atc agc agc ctg cag cct      240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
      65                               70      75
gaa gat ttt gca act tac tat tgt caa cag gct aac agg ttc cct ccg      288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Arg Phe Pro Pro
      85                               90      95
act ttc ggc cct ggg acc aaa gtg gat atc aaa      321
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
      100                              105
  
```

<210> 33

<211> 107

<212> protein

<213> člověk

<400> 33

```

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

<210> 34

<211> 333

<212> DNA

<213> člověk

<400> 34

```

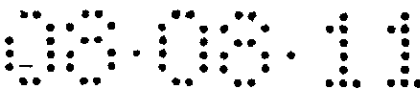
cag tct gtc gtg acg cag ccg ccc tca gtg tct ggg gcc cca ggg cag      48
Gln Ser Val Val Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
      5           10           15
agg gtc acc atc tcc tgc act ggg agc cac tcc aac ttc ggg gca gga      96
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser His Ser Asn Phe Gly Ala Gly
      20           25           30
act gat gta cat tgg tac caa cac ctt cca gga aca gcc ccc aga ctc      144
Thr Asp Val His Trp Tyr Gln His Leu Pro Gly Thr Ala Pro Arg Leu
      35           40           45
ctc att cat gga gac agt aat cgg ccc tcc ggg gtc cct gac cga ttc      192
Leu Ile His Gly Asp Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
      50           55           60
tct ggc tcc agg tct ggc acc tca gcc tcc ctg gcc atc act ggg ctc      240
Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
      65           70           75           80
cgg gtt gag gat gag gct gat tat tac tgt cag tcg tat gac tat ggc      288
Arg Val Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Tyr Gly
      85           90           95
ctg aga ggt tgg gtg ttc ggc ggc ggg acc aag ctg acc gtc ctt      333
Leu Arg Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
      100          105          110
  
```

<210> 35

<211> 111

<212> protein

<213> člověk



<400> 35

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

<210> 36

<211> 321

<212> DNA

<213> člověk

<400> 36

```
gat gtt gtg atg act cag tct cca tcg tcc ctg tct gca tct gta ggg      48
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
                    5                            10        15
gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag aac att aac aac tat      96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Asn Tyr
                20                25                30
tta aat tgg tat caa cag aaa cca gga aaa gcc cct aag ctc ctg atc      144
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
                35                    40                    45
tat gct gcc tcc act ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agt ggc      192
Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
                50                    55                    60
agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc acc agc cta cag cct      240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Ser Leu Gln Pro
                65                    70                    75                    80
gaa gat tct gca act tat tac tgc caa cag tat tcc cgt tat cct ccc      288
Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Arg Tyr Pro Pro
                85                    90                    95
act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aca
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Thr
                100                   105                   110
```

<210> 37

<211> 107

<212> protein

<213> člověk

<400> 37

```

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

```

<210> 38

<211> 330

<212> DNA

<213> člověk

<400> 38

```

cag tct gcc ctg act cag cct gcc tcc gtg tct ggg tct cgt gga cag      48
Gln Ser Ala Leu Thr 5 Gln Pro Ala Ser Val 10 Ser Gly Ser Arg Gly Gln 15

tcg atc acc ctc tcc tgc acc ggc tcc agc act gat gtg ggt aat tat      96
Ser Ile Thr Leu Ser 20 Cys Thr Gly Ser 25 Ser Thr Asp Val Gly Asn Tyr 30

aac tat atc tcc tgg tac caa caa cac cca ggc caa gcc ccc aaa ctc      144
Asn Tyr Ile 35 Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu 45

ttg att tac gat gtc act agt cgg ccc tca ggt gtt tct gat cgc ttc      192
Leu Ile Tyr Asp Val Thr Ser Arg Pro Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe 50 60

tct ggc tcc aag tca ggc ctc acg gcc tcc ctg acc atc tct gga ctc      240
Ser Gly Ser Lys Ser 70 Gly Leu Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu 80

cag cct gaa gac gag gct gac tat tac tgc aac tcc tat tct gcc acc      288
Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Tyr Ser Ala Thr 85 90 95

gac act ctt gtt ttt ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta      330
Asp Thr Leu Val 100 Phe Gly Gly Gly Thr 105 Lys Leu Thr Val Leu 110

```

<210> 39

<211> 110

<212> protein

<213> člověk

<400> 39

Gln Ser Ala Leu Thr₅ Gln Pro Ala Ser Val₁₀ Ser Gly Ser Arg Gly₁₅ Gln
 Ser Ile Thr Leu₂₀ Ser Cys Thr Gly Ser₂₅ Ser Thr Asp Val Gly₃₀ Asn Tyr
 Asn Tyr Ile₃₅ Ser Trp Tyr Gln Gln₄₀ His Pro Gly Gln Ala₄₅ Pro Lys Leu
 Leu Ile Tyr Asp Val Thr Ser Arg Pro Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly₇₀ Leu Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu₈₀
 Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Tyr Ser Ala Thr₉₅
 Asp Thr Leu Val₁₀₀ Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu₁₁₀

<210> 40

<211> 333

<212> DNA

<213> člověk

<400> 40

cag gct gtg ctg act cag ccg tcc tca gtg tct ggg gcc cca gga cag 48
 Gln Ala Val Leu Thr₅ Gln Pro Ser Ser Val₁₀ Ser Gly Ala Pro Gly₁₅ Gln
 agg gtc acc atc tcc tgc act ggg caa agc tcc aat atc ggg gca gat 96
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Gln Ser Ser Asn Ile Gly Ala Asp
 tat gat gta cat tgg tac cag caa ttt cca gga aca gcc ccc aaa ctc 144
 Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Phe Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 ctc atc tat ggt cac aac aat cgg ccc tca ggg gtc cct gac cga ttc 192
 Leu Ile Tyr Gly His Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 tct ggc tcc aag tct ggc acc tca gtc tcc ctg gtc atc agt ggg ctc 240
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Val Ser Leu Val Ile Ser Gly Leu
 cag gct gag gat gag gct gat tat tat tgc cag tcc tat gac agc agt 288
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
 cta agt ggt ttg gta ttc ggc gga ggg acc aag gtg acc gtc cta 333
 Leu Ser Gly Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

<210> 41

<211> 111

<212> protein

<213> člověk

<400> 41

```

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

<210> 42

<211> 321

<212> DNA

<213> člověk

<400> 42

```

gac atc cag ttg acc cag tct cca tct tct gtg tct gca tct gtt gga      48
Asp Ile Gln Leu Thr      5 Gln Ser Pro Ser      10 Val Ser Ala Ser Val Gly
gac agc gtc acc atc act tgt cgg gcg agt cag gat att agc agc tgg      96
Asp Ser Val Thr      20 Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Trp
tta gcc tgg tat caa cag aaa cca ggg gag gcc cct aag ctc ctg atc      144
Leu Ala Trp Tyr      35 Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Pro Lys Leu Leu Ile
tat gct gca tcc ctt ctt caa agt ggg gtc cca tca cgg ttc agc ggc      192
Tyr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
agt gga tct ggg aca gat ttc gct ctc act atc aac agc ctg cag cct      240
Ser Gly Ser Gly Thr      70 Phe Ala Leu Thr      75 Ile Asn Ser Leu Gln Pro
gaa gat ttt gca act tac ttt tgt caa cag gct gac agt ttc cct ccc      288
Glu Asp Phe Ala Thr      85 Tyr Phe Cys Gln Gln Ala Asp Ser Phe Pro Pro
acc ttc ggc caa ggg aca cgg ctg gag att aaa      321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
          100          105
  
```

<210> 43

<211> 107

<212> protein

<213> člověk

<400> 43

```

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

```

<210> 44

<211> 321

<212> DNA

<213> člověk

<400> 44

```

gac atc gag ttg acc cag tct cca tct tcc gtg tct gca tct gtg gga 48
Asp Ile Glu Leu Thr 5 Gln Ser Pro Ser Ser 10 Val Ser Ala Ser Val 15 Gly
gac aga gtc acc ctc act tgt cgg gcg agt cag agt att aag agg tgg 96
Asp Arg Val Thr 20 Leu Thr Cys Arg Ala Ser 25 Gln Ser Ile Lys Arg Trp 30
tta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aag gcc cct agg ctc ctc atc 144
Leu Ala Trp Tyr 35 Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Leu Leu Ile 45
tat gct gca tcc act ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc 192
Tyr Ala Ala Ser Thr 50 Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly 60
ggg gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc aac agc ctg cag cct 240
Gly Gly Ser Gly Thr 70 Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro 80
gaa gat ttt gca att tac tac tgt caa cag gct aac agt ttc cct ccc 288
Glu Asp Phe Ala Ile 85 Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Pro 95
act ttc ggc cct ggg acc aaa gtg gat atc aaa 321
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys 100 105

```

<210> 45

<211> 107

<212> protein

<213> člověk

<400> 45

```

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

```

<210> 46

<211> 333

<212> DNA

<213> člověk

<400> 46

```

cag tct gtc gtg acg cag ccg ccc tca gtg tct ggg gcc cca ggg cag      48
Gln Ser Val Val Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
      5                               10                               15
agg gtc acc atc tcc tgc agt ggg agc agg tcc aac atc ggg gca cac      96
Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Arg Ser Asn Ile Gly Ala His
      20                               25                               30
tat gaa gtc cag tgg tac cag cag ttt ccg gga gca gcc ccc aaa ctc      144
Tyr Glu Val Gln Trp Tyr Gln Gln Phe Pro Gly Ala Ala Pro Lys Leu
      35                               40                               45
ctc atc tat ggt gac acc aat cgg ccc tca ggg gtc cct gac cga ttc      192
Leu Ile Tyr Gly Asp Thr Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
      50                               55                               60
tct gcc tcc cac tct ggc acc tca gcc tcc ctt gcc atc aca ggg ctc      240
Ser Ala Ser His Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
      65                               70                               75
cag gct gag gat gag gct gat tat tac tgc cag tcg tat gac acc agt      288
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Thr Ser
      85                               90                               95
cta cgt ggt ccg gtg ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta      333
Leu Arg Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
      100                               105

```

<210> 47

<211> 111

<212> protein

<213> člověk

<400> 47

```

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

```

<210> 48

<211> 333

<212> DNA

<213> člověk

<400> 48

```

cag tct gtc gtg acg cag ccg ccc tca gtg tct ggg gcc cca ggg cag      48
Gln Ser Val Val Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
                    5                               10                               15
agg gtc acc atc tcc tgc act ggg agc agc tcc aac atc ggg aca ggt      96
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Thr Gly
                20                               25                               30

tat gat gta cat tgg tac cag cag gtt cca gga tca gcc ccc aaa ctc      144
Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Val Pro Gly Ser Ala Pro Lys Leu
                35                               40                               45
ctc atc tat gct tac acc aat cgg ccc tca ggg gtc cct gac cga ttc      192
Leu Ile Tyr Ala Tyr Thr Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
                50                               55                               60
tct ggc tcc aag tct ggc atg tca gcc tcc ctg gtc atc ggt ggt ctc      240
Ser Gly Ser Lys Ser Gly Met Ser Ala Ser Leu Val Ile Gly Gly Leu
                65                               70                               75                               80
cag gct gag gat gag gct gat tat tac tgc cag tcc ttt gac gac agc      288
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Phe Asp Asp Ser
                85                               90                               95
ctg aat ggt ctt gtc ttc gga cct ggg acc tcg gtc acc gtc ctc      333
Leu Asn Gly Leu Val Phe Gly Pro Gly Thr Ser Val Thr Val Leu
                100                               105                               110

```

<210> 49

<211> 111

<212> protein

<213> člověk

<400> 49

```

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

```

<210> 50

<211> 333

<212> DNA

<213> člověk

<400> 50

```

cag tct gtg ttg acg cag ccg ccc tca gtg tct ggg gcc cca ggg cag 48
Gln Ser Val Leu Thr 5 Pro Pro Ser Val 10 Ser Gly Ala Pro Gly Gln 15
agg gtc acc atc tcc tgc act ggg agc cac tcc aac ttc ggg gca ggt 96
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser His Ser Asn Phe Gly Ala Gly 20 25 30
act gat gtc cat tgg tac caa cac ctt cca gga aca gcc ccc aga ctc 144
Thr Asp Val His Trp Tyr Gln His Leu Pro Gly Thr Ala Pro Arg Leu 35 40 45
ctc att cat gga gac act cat cgg ccc tcc ggg gtc gct gac cga ttc 192
Leu Ile His Gly Asp Thr His Arg Pro Ser Gly Val Ala Asp Arg Phe 50 55 60
tct ggc tcc agg tct ggc gcc tca gcc tcc ctg gcc atc act ggg ctc 240
Ser Gly Ser Arg Ser Gly Ala Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu 65 70 75 80
cgg gtt gag gat gag gct gat tat tac tgt cag tcg tat gac tat ggc 288
Arg Val Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Tyr Gly 85 90 95
ctg aga ggt tgg gtg ttc ggc ggc ggg acc aag ctg acc gtc ctt 333
Leu Arg Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu 100 105 110

```

<210> 51

<211> 111

<212> protein

<213> člověk

<400> 51

```

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

```

<210> 52

<211> 321

<212> DNA

<213> člověk

<400> 52

```

gac atc cag atg acc cag tct cca tct tcc gtg tct gca tct ata gga      48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Ile Gly
      5                               10                               15

gac aga gtc acc atc act tgt cgg gcg agt cag ggt att gac aac tgg      96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asp Asn Trp
      20                               25                               30

tta ggc tgg tat cag cag aaa cct ggg aaa gcc cct aaa ctc ctg atc     144
Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
      35                               40                               45

tac gat gca tcc aat ttg gac aca ggg gtc cca tca agg ttc agt gga     192
Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Asp Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
      50                               55                               60

agt gga tct ggg aca tat ttt act ctc acc atc agt agc ctg caa gct     240

Ser Gly Ser Gly Thr Tyr Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
      65                               70                               75                               80

gaa gat ttt gca gtt tat ttc tgt caa cag gct aaa gct ttt cct ccc     288
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ala Lys Ala Phe Pro Pro
      85                               90                               95

act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gac atc aaa      321
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
      100                              105

```

<210> 53

<211> 107

<212> protein

<213> člověk

<400> 53

```

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

<210> 54

<211> 13

<212> protein

<213> člověk

<400> 54

```

Thr Gly Ser His Ser Asn Phe Gly Ala Gly Thr Asp Val
           5              10
    
```

<210> 55

<211> 7

<212> protein

<213> člověk

<400> 55

```

Gly Asp Ser Asn Arg Pro Ser
           5
    
```

<210> 56

<211> 11

<212> protein

<213> člověk

<400> 56

```

Gln Ser Tyr Asp Tyr Gly Leu Arg Gly Trp Val
           5              10
    
```

<210> 57
<211> 11
<212> protein
<213> člověk

<400> 57

Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Asn Tyr Leu Asn
5 10

<210> 58
<211> 7
<212> protein
<213> člověk

<400> 58

Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser
5

<210> 59
<211> 9
<212> protein
<213> člověk

<400> 59

Gln Gln Tyr Ser Arg Tyr Pro Pro Thr
5

<210> 60
<211> 14
<212> protein
<213> člověk

<400> 60

Thr Gly Ser Ser Thr Asp Val Gly Asn Tyr Asn Tyr Ile Ser
5 10

<210> 61
<211> 7
<212> protein
<213> člověk

<400> 61

Asp Val Thr Ser Arg Pro Ser
5

<210> 62

<211> 10

<212> protein

<213> člověk

<400> 62

Asn Ser Tyr Ser Ala Thr Asp Thr Leu Val
5 10

<210> 63

<211> 14

<212> protein

<213> člověk

<400> 63

Thr Gly Gln Ser Ser Asn Ile Gly Ala Asp Tyr Asp Val His
5 10

<210> 64

<211> 7

<212> protein

<213> člověk

<400> 64

Gly His Asn Asn Arg Pro Ser
5

<210> 65

<211> 11

<212> protein

<213> člověk

<400> 65

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Leu Val
5 10

<210> 66

<211> 11

<210> 71

<211> 9

<212> protein

<213> člověk

<400> 71

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Pro Thr
5

<210> 72

<211> 14

<212> protein

<213> člověk

<400> 72

Ser Gly Ser Arg Ser Asn Ile Gly Ala His Tyr Glu Val Gln
5 10

<210> 73

<211> 7

<212> protein

<213> člověk

<400> 73

Gly Asp Thr Asn Arg Pro Ser
5

<210> 74

<211> 11

<212> protein

<213> člověk

<400> 74

Gln Ser Tyr Asp Thr Ser Leu Arg Gly Pro Val
5 10

<210> 75

<211> 14

<212> protein

<213> člověk

<400> 75

Thr Gly Ser Ser Ser₅ Asn Ile Gly Thr Gly₁₀ Tyr Asp Val His

<210> 76

<211> 7

<212> protein

<213> člověk

<400> 76

Ala Tyr Thr Asn Arg₅ Pro Ser

<210> 77

<211> 11

<212> protein

<213> člověk

<400> 77

Gln Ser Phe Asp Asp₅ Ser Leu Asn Gly₁₀ Leu Val

<210> 78

<211> 14

<212> protein

<213> člověk

<400> 78

Thr Gly Ser His Ser₅ Asn Phe Gly Ala Gly₁₀ Thr Asp Val His

<210> 79

<211> 7

<212> protein

<213> člověk

<400> 79

Gly Asp Thr His Arg₅ Pro Ser

<210> 80
<211> 11
<212> protein
<213> člověk

<400> 80

Gln Ser Tyr Asp Tyr₅ Gly Leu Arg Gly Trp Val₁₀

<210> 81
<211> 11
<212> protein
<213> člověk

<400> 81

Arg Ala Ser Gln Gly₅ Ile Asp Asn Trp Leu Gly₁₀

<210> 82
<211> 7
<212> protein
<213> člověk

<400> 82

Asp Ala Ser Asn Leu₅ Asp Thr

<210> 83
<211> 9
<212> protein
<213> člověk

<400> 83

Gln Gln Ala Lys Ala₅ Phe Pro Pro Thr

<210> 84
<211> 2351
<212> DNA
<213> člověk

<400> 84

ggtaccgag aaagaaccgg ctccccgagtt ctgggcattt cgccccggctc gaggtgcagg	59
atg cag agc aag gtg ctg ctg gcc gtc gcc ctg tgg ctc tgc gtg gag Met Gln Ser Lys Val Leu Leu Ala Val Ala Leu Trp Leu Cys Val Glu	107
acc cgg gcc gcc tct gtg ggt ttg cct agt gtt tct ctt gat ctg ccc Thr Arg Ala Ala Ser Val Gly Leu Pro Ser Val Ser Leu Asp Leu Pro	155
agg ctc agc ata caa aaa gac ata ctt aca att aag gct aat aca act Arg Leu Ser Ile Gln Lys Asp Ile Leu Thr Ile Lys Ala Asn Thr Thr	203
ctt caa att act tgc agg gga cag agg gac ttg gac tgg ctt tgg ccc Leu Gln Ile Thr Cys Arg Gly Gln Arg Asp Leu Asp Trp Leu Trp Pro	251
aat aat cag agt ggc agt gag caa agg gtg gag gtg act gag tgc agc Asn Asn Gln Ser Gly Ser Glu Gln Arg Val Glu Val Thr Glu Cys Ser	299
gat gcc ctc ttc tgt aag aca ctc aca att cca aaa gtg atc gga aat Asp Gly Leu Phe Cys Lys Thr Leu Thr Ile Pro Lys Val Ile Gly Asn	347
gac act gga gcc tac aag tgc ttc tac cgg gaa act gac ttg gcc tcg Asp Thr Gly Ala Tyr Lys Cys Phe Tyr Arg Glu Thr Asp Leu Ala Ser	395
gtc att tat gtc tat gtt caa gat tac aga tct cca ttt att gct tct Val Ile Tyr Val Tyr Val Gln Asp Tyr Arg Ser Pro Phe Ile Ala Ser	443
gtt agt gag caa cat gga gtc gtg tac att act gag aac aaa aac aaa Val Ser Asp Gln His Gly Val Val Tyr Ile Thr Glu Asn Lys Asn Lys	491
act gtg gtg att cca tgt ctc ggg tcc att tca aat ctc aac gtg tca Thr Val Val Ile Pro Cys Leu Gly Ser Ile Ser Asn Leu Asn Val Ser	539
ctt tgt gca aga tac cca gaa aag aga ttt gtt cct gat ggt aac aga Leu Cys Ala Arg Tyr Pro Glu Lys Arg Phe Val Pro Asp Gly Asn Arg	587
att tcc tgg gac agc aag aag ggc ttt act att ccc agc tac atg atc Ile Ser Trp Asp Ser Lys Lys Gly Phe Thr Ile Pro Ser Tyr Met Ile	635
agc tat gct gcc atg gtc ttc tgt gaa gca aaa att aat gat gaa agt Ser Tyr Ala Gly Met Val Phe Cys Glu Ala Lys Ile Asn Asp Glu Ser	683
tac cag tct att atg tac ata gtt gtc gtt gta ggg tat agg att tat Tyr Gln Ser Ile Met Tyr Ile Val Val Val Val Gly Tyr Arg Ile Tyr	731
gat gtg gtt ctg agt ccg tct cat gga att gaa cta tct gtt gga gaa Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu	779

aag ctt gtc tta aat tgt aca gca aga act gaā cta aat gtg ggg att	827
Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile	
	245
	250
	255
gac ttc aac tgg gaa tac cct tct tcg aag cat cag cat aag aaa ctt	875
Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu	
	260
	265
	270
gta aac cga gac cta aaa acc cag tct ggg agt gag atg aag aaa ttt	923
Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe	
	275
	280
	285
ttg agc acc tta act ata gat ggt gta acc cgg agt gac caa gga ttg	971
Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu	
	290
	295
	300
tac acc tgt gca gca tcc agt ggg ctg atg acc aag aag aac agc aca	1019
Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr	
	305
	310
	315
	320
ttt gtc agg gtc cat gaa aaa cct ttt gtt gct ttt gga agt ggc atg	1067
Phe Val Arg Val His Glu Lys Pro Phe Val Ala Phe Gly Ser Gly Met	
	325
	330
	335
gaa tct ctg gtg gaa gcc acg gtg ggg gag cgt gtc aga atc cct gcg	1115
Glu Ser Leu Val Glu Ala Thr Val Gly Glu Arg Val Arg Ile Pro Ala	
	340
	345
	350
aag tac ctt ggt tac cca ccc cca gaa ata aaa tgg tat aaa aat gga	1163
Lys Tyr Leu Gly Tyr Pro Pro Pro Glu Ile Lys Trp Tyr Lys Asn Gly	
	355
	360
	365
ata ccc ctt gag tcc aat cac aca att aaa gcg ggg cat gta ctg acg	1211
Ile Pro Leu Glu Ser Asn His Thr Ile Lys Ala Gly His Val Leu Thr	
	370
	375
	380
att atg gaa gtg agt gaa aga gac aca gga aat tac act gtc atc ctt	1259
Ile Met Glu Val Ser Glu Arg Asp Thr Gly Asn Tyr Thr Val Ile Leu	
	385
	390
	395
	400
acc aat ccc att tca aag gag aag cag agc cat gtg gtc tct ctg gtt	1307
Thr Asn Pro Ile Ser Lys Glu Lys Gln Ser His Val Val Ser Leu Val	
	405
	410
	415
gtg tat gtc cca ccc cag att ggt gag aaa tct cta atc tct cct gtg	1355
Val Tyr Val Pro Pro Gln Ile Gly Glu Lys Ser Leu Ile Ser Pro Val	
	420
	425
	430
gat tcc tac cag tac ggc acc act caa acg ctg aca tgt acg gtc tat	1403
Asp Ser Tyr Gln Tyr Gly Thr Thr Gln Thr Leu Thr Cys Thr Val Tyr	
	435
	440
	445
gcc att cct ccc ccg cat cac atc cac tgg tat tgg cag ttg gag gaa	1451
Ala Ile Pro Pro Pro His His Ile His Trp Tyr Trp Gln Leu Glu Glu	
	450
	455
	460
gag tgc gcc aac gag ccc agc cat gct gtc tca gtg aca aac cca tac	1499
Glu Cys Ala Asn Glu Pro Ser His Ala Val Ser Val Thr Asn Pro Tyr	
	465
	470
	475
	480
cct tgt gaa gaa tgg aga agt gtg gag gac ttc cag gga gga aat aaa	1547
Pro Cys Glu Glu Trp Arg Ser Val Glu Asp Phe Gln Gly Gly Asn Lys	
	485
	490
	495
att gaa gtt aat aaa aat caa ttt gct cta att gaa gga aaa aac aaa	1595
Ile Glu Val Asn Lys Asn Gln Phe Ala Leu Ile Glu Gly Lys Asn Lys	
	500
	505
	510

act	gta	agt	acc	ctt	gtt	atc	caa	gcg	gca	aat	gtg	tca	gct	ttg	tac	1643
Thr	Val	Ser	Thr	Leu	Val	Ile	Gln	Ala	Ala	Asn	Val	Ser	Ala	Leu	Tyr	
		515					520					525				
aaa	tgt	gaa	gcg	gtc	aac	aaa	gtc	ggg	aga	gga	gag	agg	gtg	atc	tcc	1691
Lys	Cys	Glu	Ala	Val	Asn	Lys	Val	Gly	Arg	Gly	Glu	Arg	Val	Ile	Ser	
	530					535					540					
ttc	cac	gtg	acc	agg	ggt	cct	gaa	att	act	ttg	caa	cct	gac	atg	cag	1739
Phe	His	Val	Thr	Arg	Gly	Pro	Glu	Ile	Thr	Leu	Gln	Pro	Asp	Met	Gln	
					550					555					560	
ccc	act	gag	cag	gag	agc	gtg	tct	ttg	tgg	tgc	act	gca	gac	aga	tct	1787
Pro	Thr	Glu	Gln	Glu	Ser	Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Thr	Ala	Asp	Arg	Ser	
				565					570					575		
acg	ttt	gag	aac	ctc	aca	tgg	tac	aag	ctt	ggc	cca	cag	cct	ctg	cca	1835
Thr	Phe	Glu	Asn	Leu	Thr	Trp	Tyr	Lys	Leu	Gly	Pro	Gln	Pro	Leu	Pro	
			580					585					590			
atc	cat	gtg	gga	gag	ttg	ccc	aca	cct	gtt	tgc	aag	aac	ttg	gat	act	1883
Ile	His	Val	Gly	Glu	Leu	Pro	Thr	Pro	Val	Cys	Lys	Asn	Leu	Asp	Thr	
		595					600					605				
ctt	tgg	aaa	ttg	aat	gcc	acc	atg	ttc	tct	aat	agc	aca	aat	gac	att	1931
Leu	Trp	Lys	Leu	Asn	Ala	Thr	Met	Phe	Ser	Asn	Ser	Thr	Asn	Asp	Ile	
	610					615					620					
ttg	atc	atg	gag	ctt	aag	aat	gca	tcc	ttg	cag	gac	caa	gga	gac	tat	1979
Leu	Ile	Met	Glu	Leu	Lys	Asn	Ala	Ser	Leu	Gln	Asp	Gln	Gly	Asp	Tyr	
					630					635					640	
gtc	tgc	ctt	gct	caa	gac	agg	aag	acc	aag	aaa	aga	cat	tgc	gtg	gtc	2027
Val	Cys	Leu	Ala	Gln	Asp	Arg	Lys	Thr	Lys	Lys	Arg	His	Cys	Val	Val	
				645					650					655		
agg	cag	ctc	aca	gtc	cta	gag	cgt	gtg	gca	ccc	acg	atc	aca	gga	aac	2075
Arg	Gln	Leu	Thr	Val	Leu	Glu	Arg	Val	Ala	Pro	Thr	Ile	Thr	Gly	Asn	
			660					665					670			
ctg	gaa	aat	cag	acg	aca	agt	att	ggg	gaa	agc	atc	gaa	gtc	tca	tgc	2123
Leu	Glu	Asn	Gln	Thr	Thr	Ser	Ile	Gly	Glu	Ser	Ile	Glu	Val	Ser	Cys	
		675					680				685					
acg	gca	tct	ggg	aat	ccc	cct	cca	cag	atc	atg	tgg	tat	aaa	gat	aat	2171
Thr	Ala	Ser	Gly	Asn	Pro	Pro	Pro	Gln	Ile	Met	Trp	Phe	Lys	Asp	Asn	
	690				695					700						
gag	acc	ctt	gta	gaa	gac	tca	ggc	att	gta	ttg	aag	gat	ggg	aac	cgg	2219
Glu	Thr	Leu	Val	Glu	Asp	Ser	Gly	Ile	Val	Leu	Lys	Asp	Gly	Asn	Arg	
				710						715					720	
aac	ctc	act	atc	cgc	aga	gtg	agg	aag	gag	gac	gaa	ggc	ctc	tac	acc	2267
Asn	Leu	Thr	Ile	Arg	Arg	Val	Arg	Lys	Glu	Asp	Glu	Gly	Leu	Tyr	Thr	
				725					730					735		
tgc	cag	gca	tgc	agt	gtt	ctt	ggc	tgt	gca	aaa	gtg	gag	gca	ttt	ttc	2315
Cys	Gln	Ala	Cys	Ser	Val	Leu	Gly	Cys	Ala	Lys	Val	Glu	Ala	Phe	Phe	
			740				745						750			
ata	ata	gaa	ggt	gcc	cag	gaa	aag	acg	aac	ttg	gaa					2351
Ile	Ile	Glu	Gly	Ala	Gln	Glu	Lys	Thr	Asn	Leu	Glu					
		755					760									

<210> 85

<211> 764

<212> protein

<213> člověk

<400> 85

Met Gln Ser Lys Val₅ Leu Leu Ala Val₁₀ Ala Leu Trp Leu Cys Val₁₅ Glu
 Thr Arg Ala Ala₂₀ Ser Val Gly Leu Pro₂₅ Ser Val Ser Leu Asp₃₀ Leu Pro
 Arg Leu Ser₃₅ Ile Gln Lys Asp₄₀ Ile Leu Thr Ile Lys Ala₄₅ Asn Thr Thr
 Leu Gln₅₀ Ile Thr Cys Arg Gly₅₅ Gln Arg Asp Leu Asp₆₀ Trp Leu Trp Pro
 Asn Asn Gln Ser Gly Ser₇₀ Glu Gln Arg Val₇₅ Glu Val Thr Glu Cys Ser₈₀
 Asp Gly Leu Phe Cys₈₅ Lys Thr Leu Thr Ile₉₀ Pro Lys Val Ile Gly₉₅ Asn
 Asp Thr Gly Ala Tyr Lys Cys Phe Tyr₁₀₅ Arg Glu Thr Asp Leu Ala Ser
 Val Ile Tyr₁₁₅ Val Tyr Val Gln Asp Tyr Arg Ser Pro Phe Ile Ala Ser
 Val Ser Asp Gln His Gly Val₁₃₅ Val Tyr Ile Thr Glu Asn Lys Asn Lys
 Thr Val Val Ile Pro Cys₁₅₀ Leu Gly Ser Ile Ser Asn Leu Asn Val Ser₁₆₀
 Leu Cys Ala Arg Tyr₁₆₅ Pro Glu Lys Arg Phe Val Pro Asp Gly Asn Arg
 Ile Ser Trp Asp₁₈₀ Ser Lys Lys Gly Phe Thr Ile Pro Ser Tyr Met Ile
 Ser Tyr Ala Gly Met Val Phe Cys₂₀₀ Glu Ala Lys Ile Asn Asp Glu Ser
 Tyr Gln Ser Ile Met Tyr Ile Val Val Val Val Gly₂₂₀ Tyr Arg Ile Tyr
 Asp Val Val Leu Ser Pro₂₃₀ Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu
 Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr₂₅₀ Glu Leu Asn Val Gly Ile
 Asp Phe Asn Trp₂₆₀ Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu
 Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met₂₈₅ Lys Lys Phe
 Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp₂₉₅ Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu
 Tyr Thr Cys Ala Ala Ser₃₁₀ Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr
 Phe Val Arg Val His Glu Lys Pro Phe Val₃₃₀ Ala Phe Gly Ser Gly Met
 Glu Ser Leu Val₃₄₀ Glu Ala Thr Val Gly Glu Arg Val Arg Ile Pro Ala
 350

Lys Tyr Leu Gly Tyr Pro Pro Pro Glu Ile Lys Trp Tyr Lys Asn Gly
 355 360 365
 Ile Pro Leu Glu Ser Asn His Thr Ile Lys Ala Gly His Val Leu Thr
 370 375 380
 Ile Met Glu Val Ser Glu Arg Asp Thr Gly Asn Tyr Thr Val Ile Leu
 385 390 395 400
 Thr Asn Pro Ile Ser Lys Glu Lys Gln Ser His Val Val Ser Leu Val
 405 410 415
 Val Tyr Val Pro Pro Gln Ile Gly Glu Lys Ser Leu Ile Ser Pro Val
 420 425 430
 Asp Ser Tyr Gln Tyr Gly Thr Thr Gln Thr Leu Thr Cys Thr Val Tyr
 435 440 445
 Ala Ile Pro Pro Pro His His Ile His Trp Tyr Trp Gln Leu Glu Glu
 450 455 460
 Glu Cys Ala Asn Glu Pro Ser His Ala Val Ser Val Thr Asn Pro Tyr
 465 470 475 480
 Pro Cys Glu Glu Trp Arg Ser Val Glu Asp Phe Gln Gly Gly Asn Lys
 485 490 495
 Ile Glu Val Asn Lys Asn Gln Phe Ala Leu Ile Glu Gly Lys Asn Lys
 500 505 510
 Thr Val Ser Thr Leu Val Ile Gln Ala Ala Asn Val Ser Ala Leu Tyr
 515 520 525
 Lys Cys Glu Ala Val Asn Lys Val Gly Arg Gly Glu Arg Val Ile Ser
 530 535 540
 Phe His Val Thr Arg Gly Pro Glu Ile Thr Leu Gln Pro Asp Met Gln
 545 550 555 560
 Pro Thr Glu Gln Glu Ser Val Ser Leu Trp Cys Thr Ala Asp Arg Ser
 565 570 575
 Thr Phe Glu Asn Leu Thr Trp Tyr Lys Leu Gly Pro Gln Pro Leu Pro
 580 585 590
 Ile His Val Gly Glu Leu Pro Thr Pro Val Cys Lys Asn Leu Asp Thr
 595 600 605
 Leu Trp Lys Leu Asn Ala Thr Met Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asp Ile
 610 615 620
 Leu Ile Met Glu Leu Lys Asn Ala Ser Leu Gln Asp Gln Gly Asp Tyr
 625 630 635 640
 Val Cys Leu Ala Gln Asp Arg Lys Thr Lys Lys Arg His Cys Val Val
 645 650 655
 Arg Gln Leu Thr Val Leu Glu Arg Val Ala Pro Thr Ile Thr Gly Asn
 660 665 670
 Leu Glu Asn Gln Thr Thr Ser Ile Glu Gly Glu Ser Ile Glu Val Ser Cys
 675 680 685
 Thr Ala Ser Gly Asn Pro Pro Pro Gln Ile Met Trp Phe Lys Asp Asn
 690 695 700
 Glu Thr Leu Val Glu Asp Ser Gly Ile Val Leu Lys Asp Gly Asn Arg
 705 710 715 720
 Asn Leu Thr Ile Arg Arg Val Arg Lys Glu Asp Glu Gly Leu Tyr Thr
 725 730 735
 Cys Gln Ala Cys Ser Val Leu Gly Cys Ala Lys Val Glu Ala Phe Phe
 740 745 750
 Ile Ile Glu Gly Ala Gln Glu Lys Thr Asn Leu Glu
 755 760

<210> 86

<211> 20

<212> DNA

<213> umělá sekvence

<220>

<223> amplifikační primer pro VEGF

<400> 86

tcgggcctcc gaaaccatga 20

<210> 87

<211> 20

<212> DNA

<213> umělá sekvence

<220>

<223> amplifikační primer pro VEGF

<400> 87

cctggtgaga gatctggttc 20

<210> 88

<211> 19

<212> DNA

<213> umělá sekvence

<220>

<223> amplifikační primer pro Flt-1

<400> 88

tttgtgattt tggccttgc 19

<210> 89

<211> 21

<212> DNA

<213> umělá sekvence

<220>

<223> amplifikační primer pro Flt-1

<400> 89

caggctcatg aacttgaaag c 21

<210> 90

<211> 20

<212> DNA

<213> umělá sekvence

<220>

<223> amplifikační primer pro KDR

<400> 90

gtgaccaaca tggagtcgtg 20

<210> 91

<211> 20

<212> DNA

<213> umělá sekvence

<220>

<223> amplifikační primer pro KDR

<400> 91

ccagagattc catgccactt 20

<210> 92

<211> 19

<212> DNA

<213> umělá sekvence

<220>

<223> amplifikační primer pro KDR

<400> 92

tcatgtttga gaccttcaa 19

<210> 93

<211> 19

<212> DNA

<213> umělá sekvence

<220>

<223> amplifikační primer pro KDR

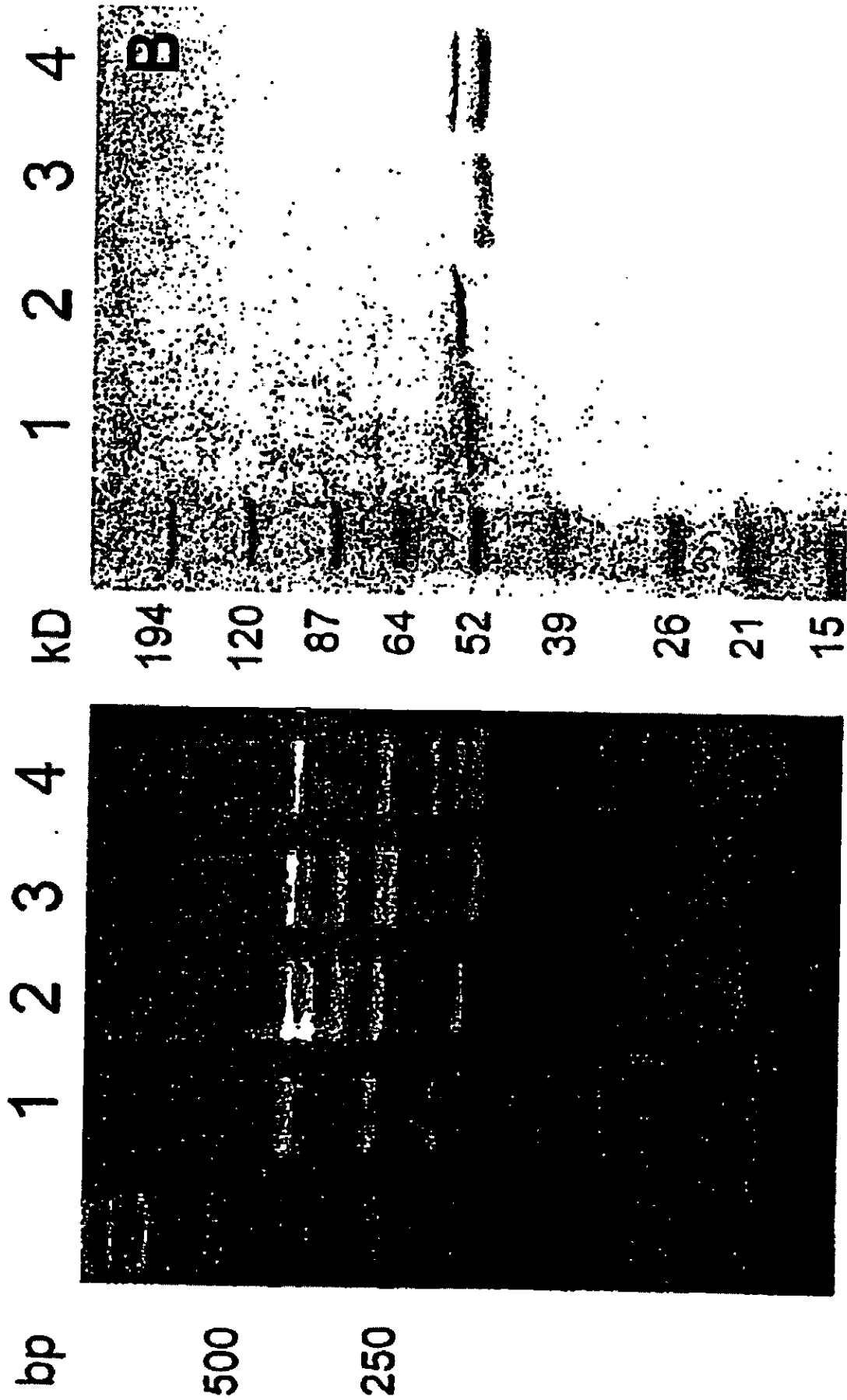
<400> 93

gtctttgctg atgtccacg 19

P A T E N T O V É N Á R O K Y

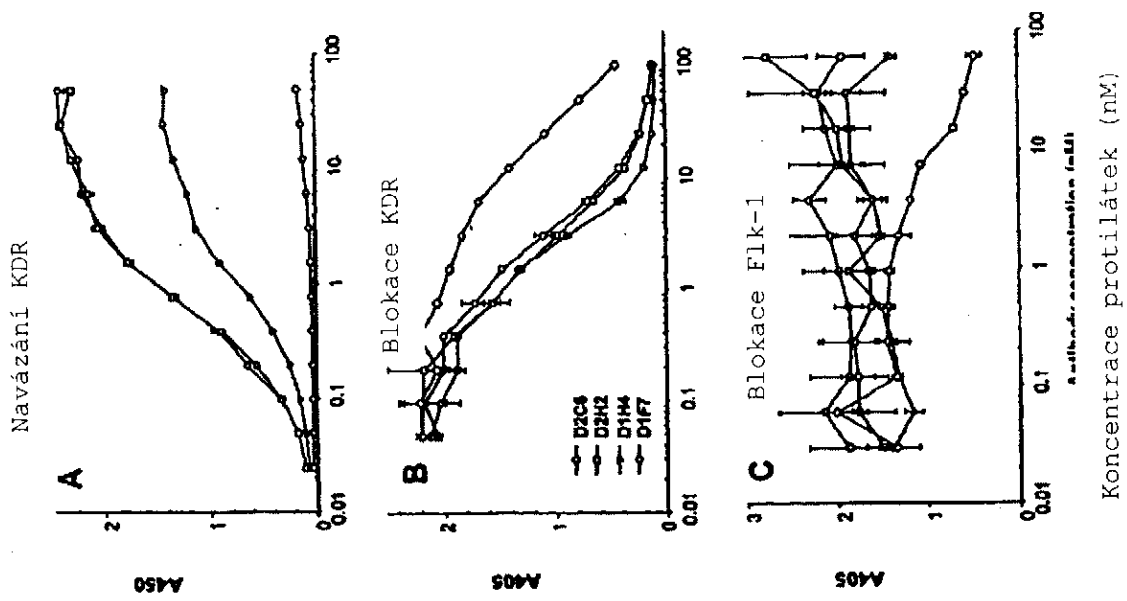
1. Izolovaná protilátka nebo její fragment, která se selektivně váže na receptor obsahující lidské kinázové inzerční domény (KDR), přičemž protilátka nebo její fragment obsahuje oblasti určující komplementaritu reprezentované sekvencemi SEQ ID NO: 81 v CDRL1; SEQ ID NO: 82 v CDRL2; SEQ ID NO: 83 v CDRL3; SEQ ID NO: 13 v CDRH1; SEQ ID NO: 14 v CDRH2 a SEQ ID NO: 15 v CDRH3.
2. Protilátka nebo její fragment podle nároku 1 obsahující variabilní doménu lehkého řetězce reprezentovanou sekvencí SEQ ID NO: 53 a variabilní doménu těžkého řetězce reprezentovanou sekvencí SEQ ID NO: 24.
3. Protilátka nebo její fragment podle nároků 1 nebo 2 vybrané ze skupiny skládající se z jednořetězcové protilátky, Fab, jednořetězcového Fv, diabody a triabody.
4. Izolovaný polynukleotid obsahující nukleotidovou sekvenci, která kóduje protilátku nebo její fragment podle libovolného z nároků 1 až 3.
5. Polynukleotid podle nároku 4, přičemž nukleotidová sekvence obsahuje sekvenci SEQ ID NO: 52.
6. Expresivní vektor obsahující polynukleotid podle nároku 5.
7. Rekombinantní hostitelská buňka obsahující expresivní vektor podle nároku 6.
8. Rekombinantní hostitelská buňka podle nároku 7, která produkuje polypeptid obsahující sekvenci SEQ ID NO: 24 a polypeptid obsahující sekvenci SEQ ID NO: 53.
9. Protilátka nebo její fragment podle libovolného z nároků 1 až 3 pro použití při terapii.

- 10.** Protilátka nebo její fragment podle libovolného z nároků 1 až 3 pro použití při terapii neoplastických onemocnění.
- 11.** Protilátka pro použití podle nároku 10, přičemž neoplastickým onemocněním je nádor střev, nádor prsu nebo nesolidní nádor.
- 12.** Protilátka pro použití podle nároku 10 nebo 11, přičemž neoplastickým onemocněním je nádor, který nadměrně expri-
muje KDR.
- 13.** Farmaceutický prostředek obsahující protilátku nebo její fragment podle libovolného z nároků 1 až 3 a farmaceuticky přijatelný nosič.
- 14.** Protilátka nebo její fragment podle libovolného z nároků 1 až 3 pro použití před, během a po zahájení terapie jiným činidlem vybraným z VEGFR-1 antagonisty, EGFR antagonisty, chemoterapeutického činidla nebo radiace k léčbě neoplastického onemocnění.

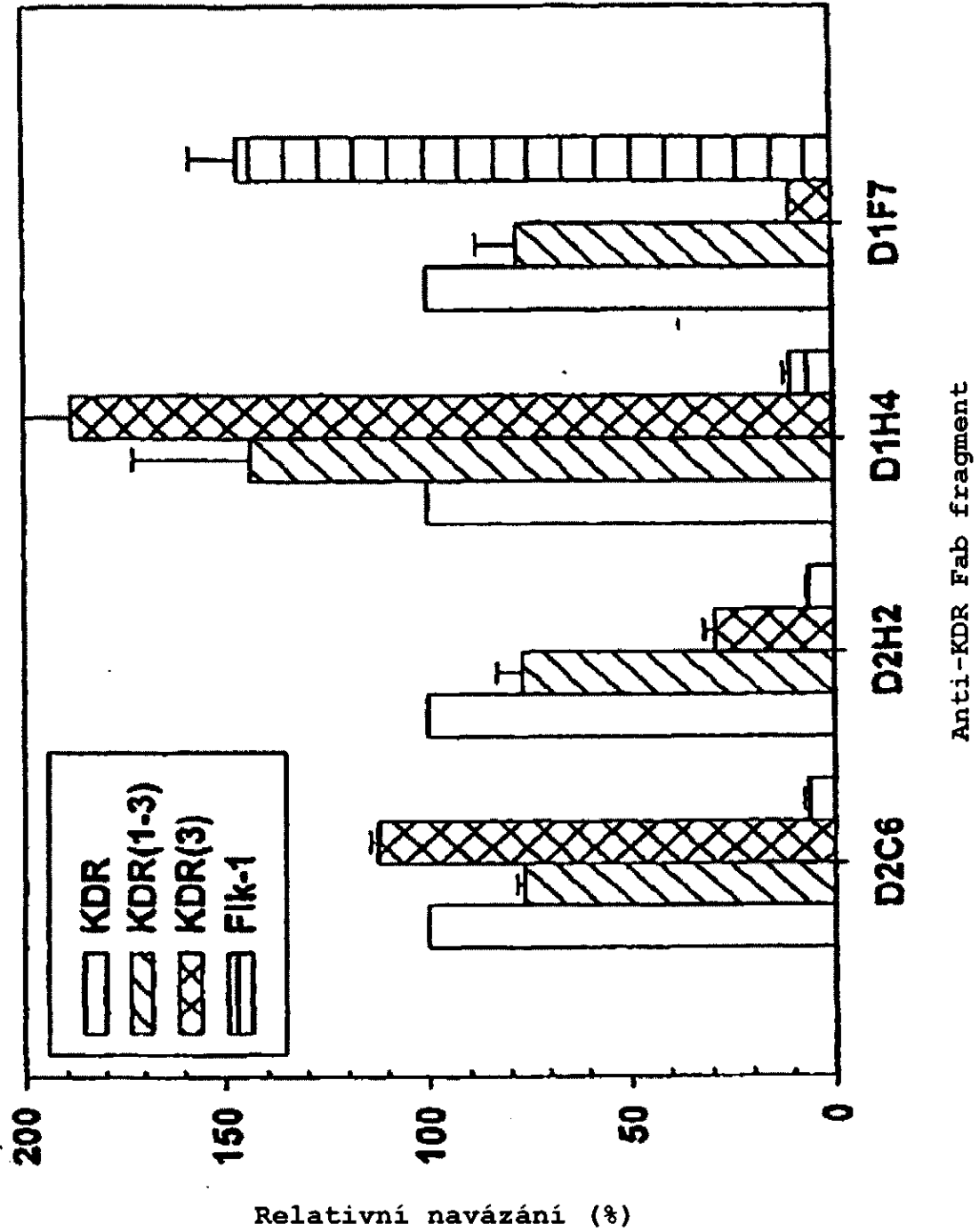


Obr. 1

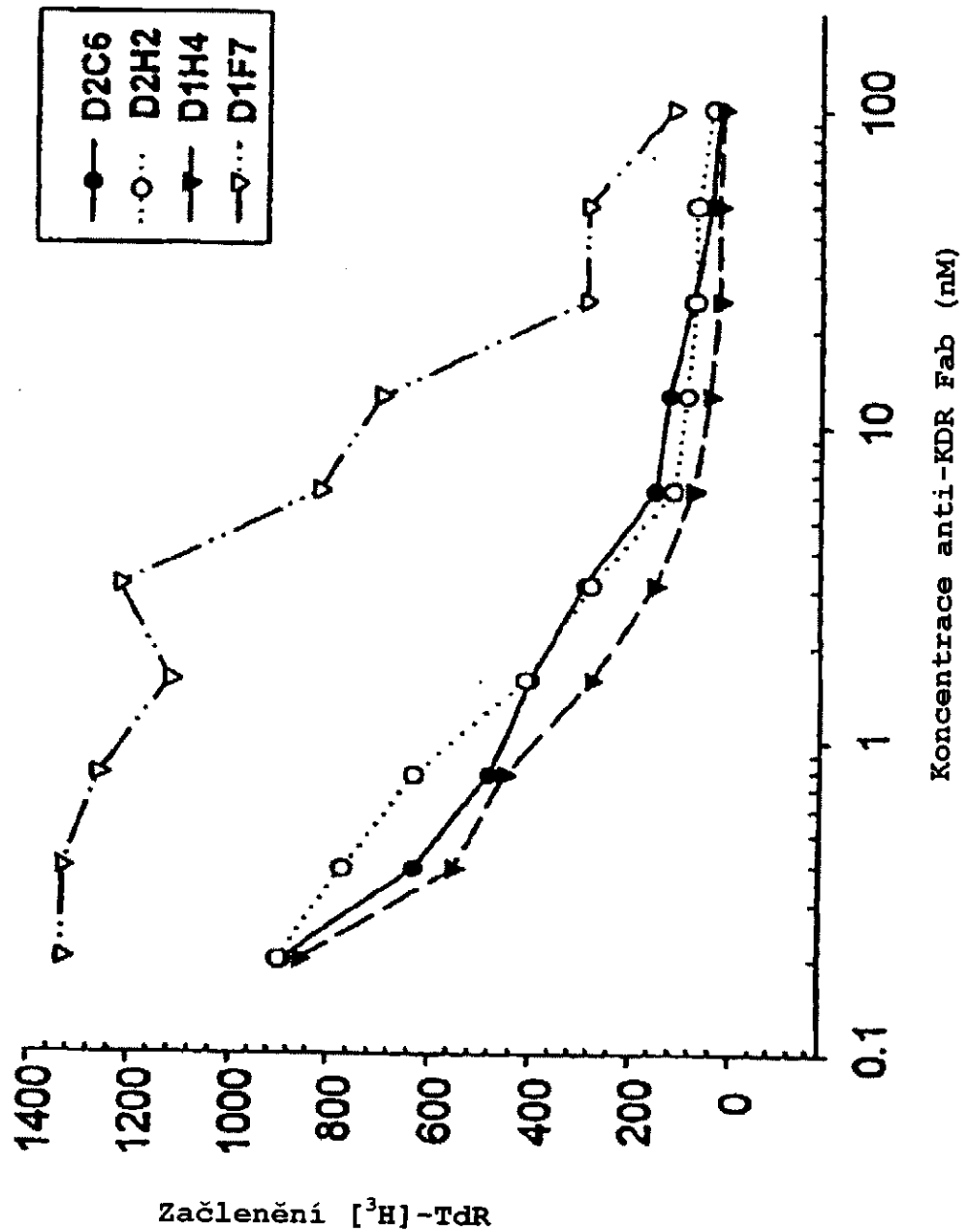
Obr. 2



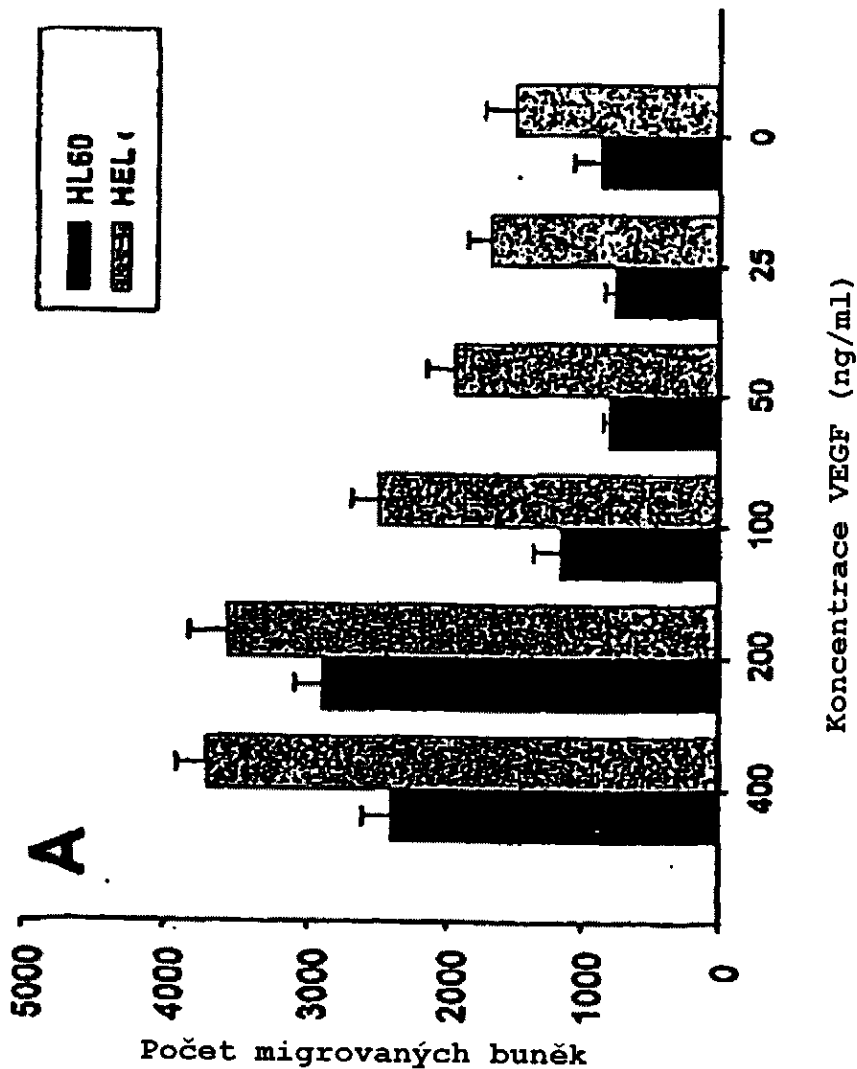
Obr. 3



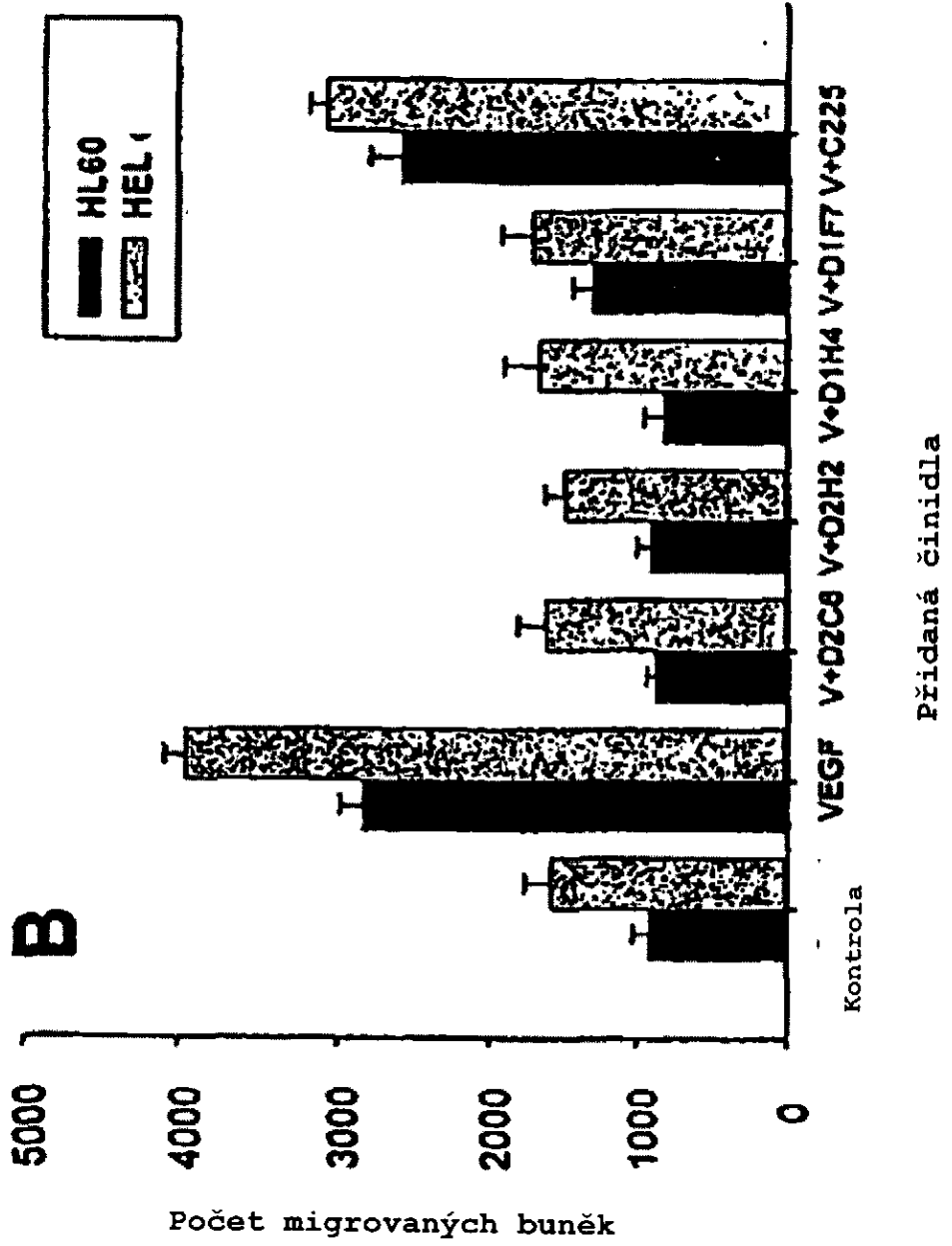
Obr. 4



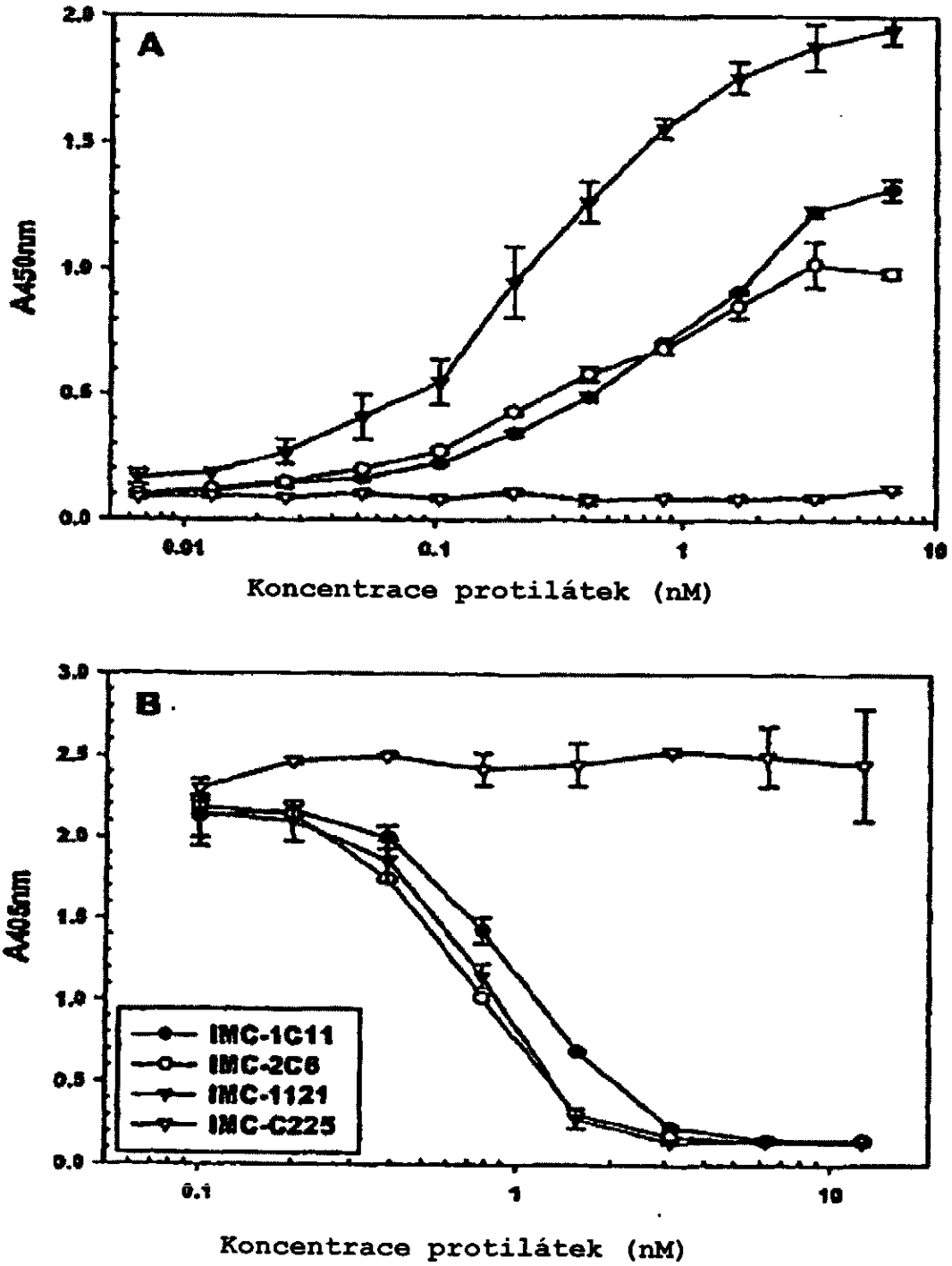
Obr. 5



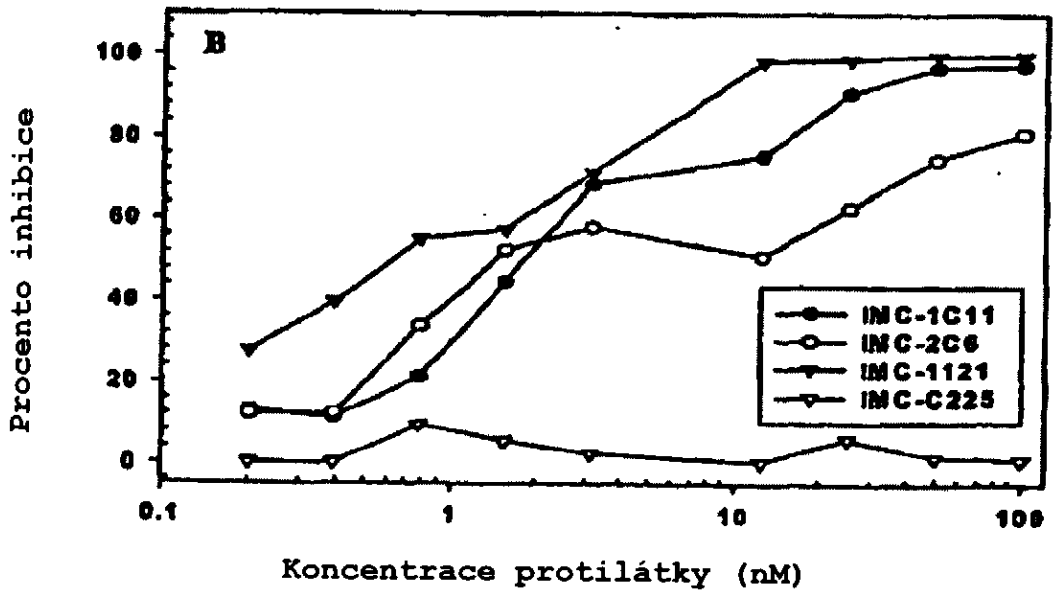
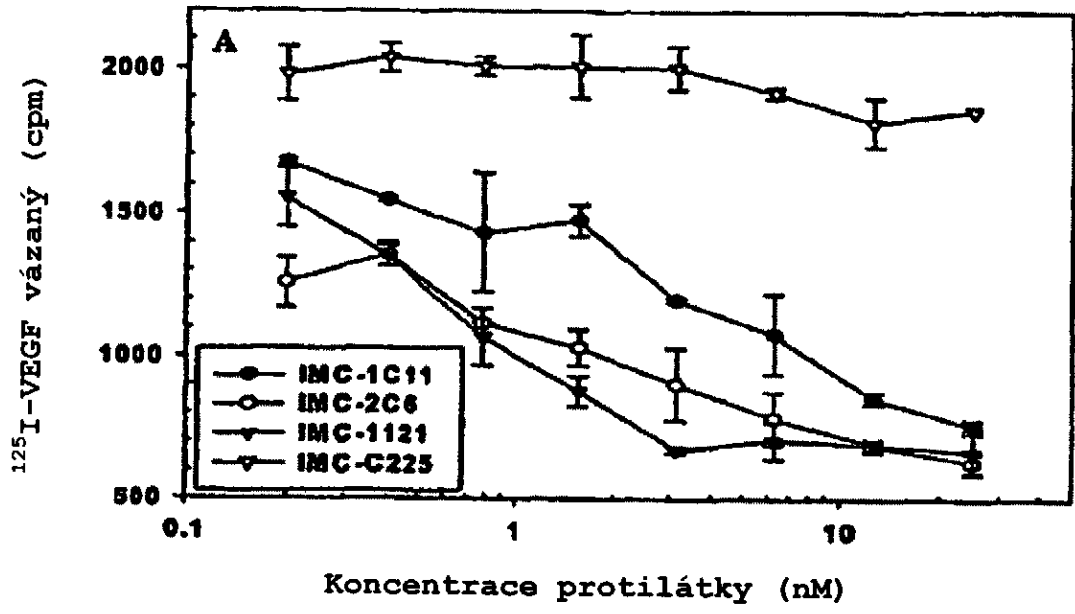
Obr. 5



Obr. 6

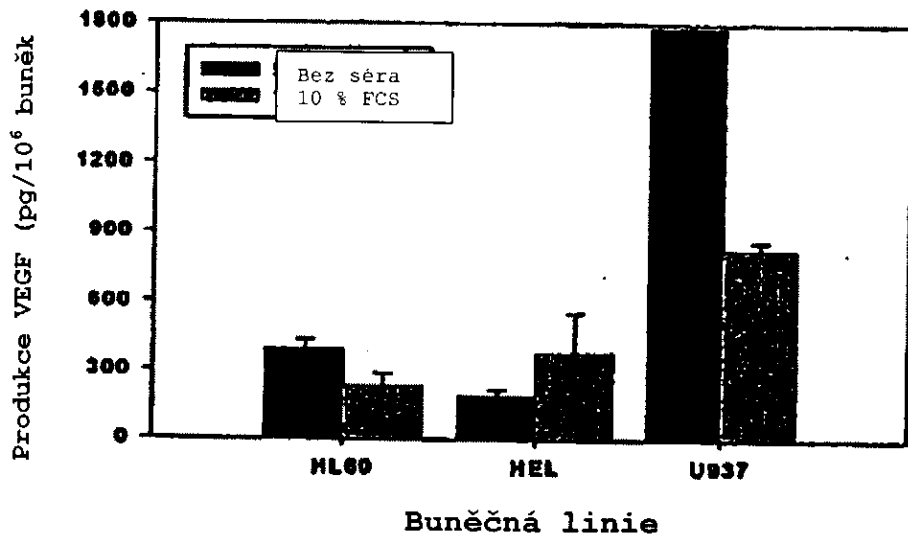
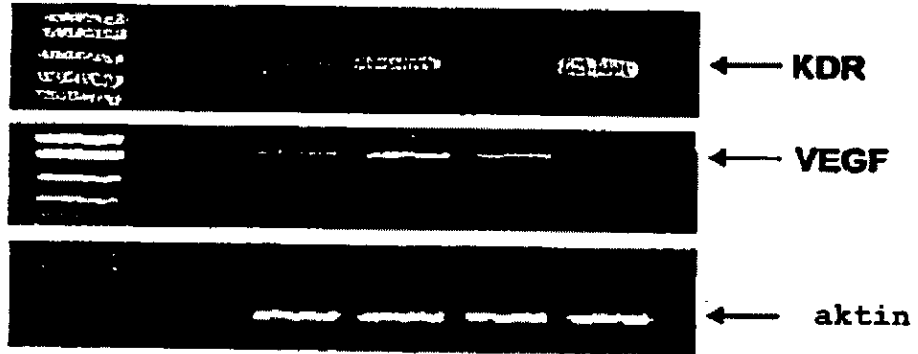


Obr. 7

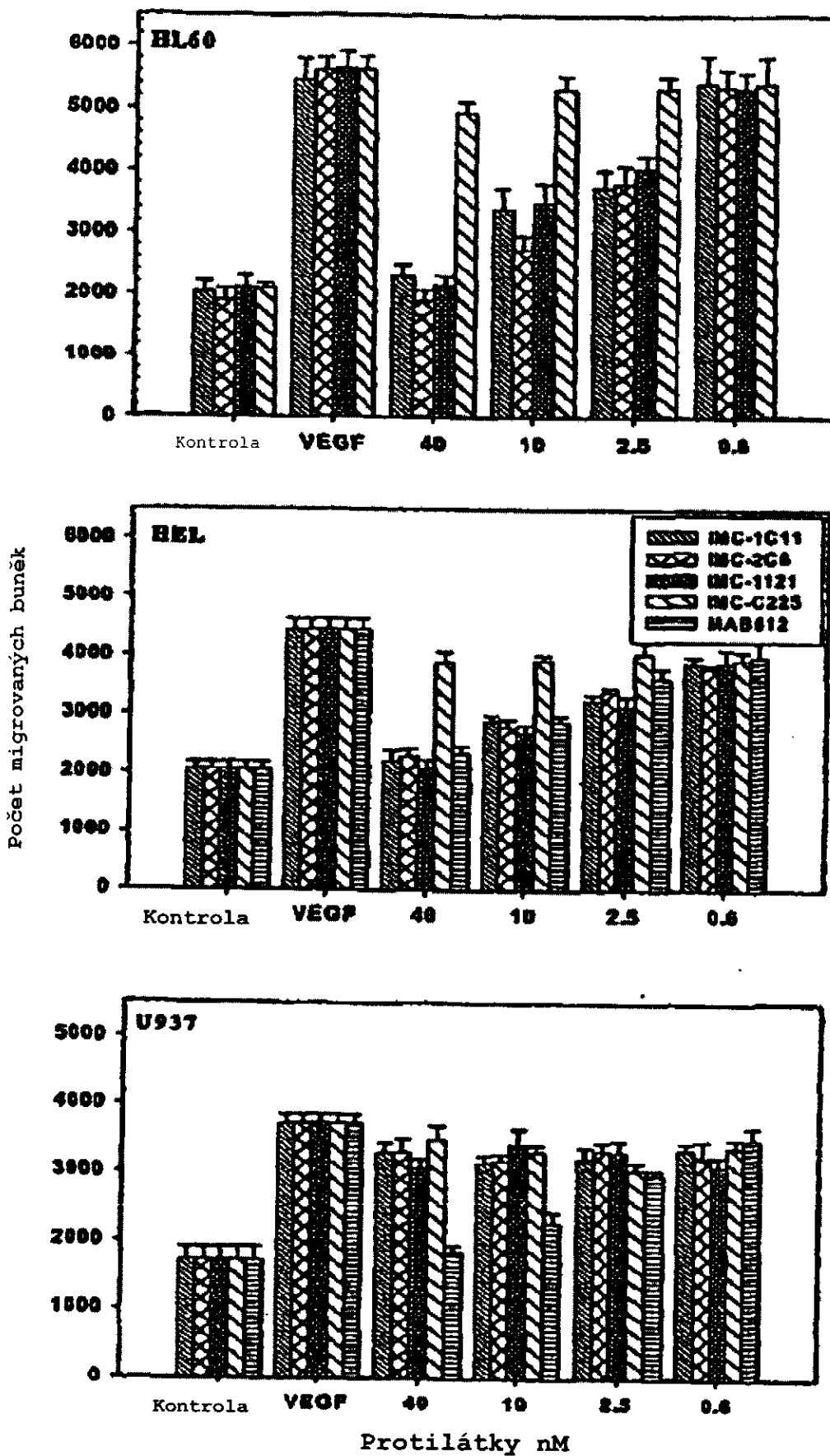


Obr. 8

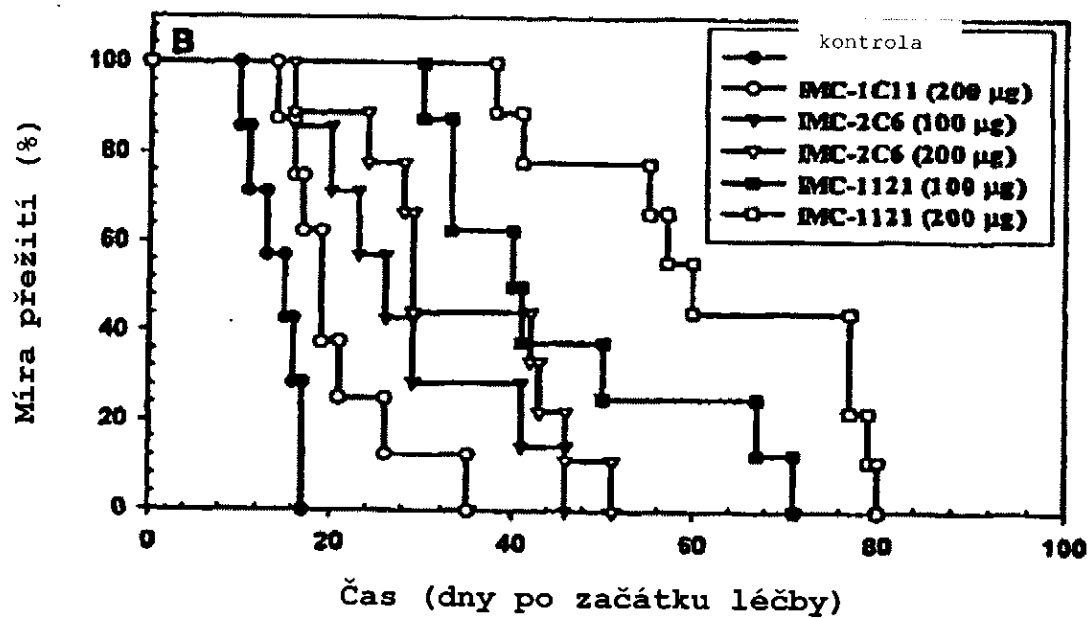
C HL60 HEL U937 HUVEC



Obr. 9



Obr. 10



REFERENCE CITOVANÉ V POPISU

Tento seznam referencí citovaných přihlašovatelem slouží jen pro pohodlí čtenáře. Tento seznam netvoří část evropského patentu. I když byla vytváření seznamu referencí věnována velká péče, nelze vyloučit chyby nebo opomenutí a EPÚ se v této souvislosti zříká jakékoli zodpovědnosti.

Patentové dokumenty citované v popisu

- WO 9214248 A [0009]
- US 6365157 B, Rockwell [0012] [0062]
- WO 0044777 A, Zhu [0012]
- WO 01154723 A, Kerbel [0012]
- WO 0174296 A, Witte [0012] [0013]
- WO 0190192 A, Zhu [0012]
- WO 03002144 A, Zhu [0012]
- WO 03000183 A, Carmeliet [0012]
- US 4946778 A, Ladner [0036]
- WO 8809344 A, Huston [0036]
- WO 9201047 A, McCafferty [0036]
- WO 9311236 A, Griffiths [0037]
- US 6217866 B, Schlessinger [0078]
- WO 9960023 A, Waksal [0078]
- US 0306459 W [0131]
- US 60361783 B [0131]

Ostatní literatura citovaná v popisu

- Folkman, J. ; Klagsbrun, M. *Science*, 1987, vol. 235, 442-7 [0003]
- Klagsbrun, M. ; D'Amore, P. *Annual Rev. Physiol.*, 1991, vol. 53, 217-39 [0005]
- Breier et al. *Development*, 1992, vol. 114, 521-32 [0007]
- Brown et al. *J. Exp. Med.*, 1992, vol. 176, 1375-9 [0007]
- Ferrara et al. *Endocr. Rev.*, 1992, vol. 13, 18-32 [0007]
- Plate, K. et al. *Nature*, 1992, vol. 359, 845-8 [0007]
- Plate, K. et al. *Cancer Res.*, 1993, vol. 53, 5822-7 [0007]
- Berkman, R. et al. *J. Clin. Invest.*, 1993, vol. 91, 153-9 [0007]
- Nakamura, S. et al. *AIDS Weekly*, 1992, vol. 13 (1) [0007]
- Millauer, B. et al. *Cell*, 1993, vol. 72, 835-46 [0008]
- Kaipainen et al. *J. Exp. Med.*, 1993, vol. 178, 2077-88 [0009]
- Terman et al. *Oncogene*, 1991, vol. 6, 1677-83 [0009]
- Shibuya et al. *Oncogene*, 1990, vol. 5, 519-24 [0009]
- Wu et al. Monoclonal antibody against VEGFR1 inhibits flt1-positive DU4475 human breast tumor growth by a dual mechanism involving anti-angiogenic and tumor cell growth inhibitory activities. *AACR NCI EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics*, 29 October 2001 [0013]
- Lu et al. *International Journal of Cancer*, January 2002, vol. 97, 393-399 [0013]
- Yang et al. *J. Mol. Biol.*, 1995, vol. 254, 392-403 [0029]
- Hawkins et al. *J. Mol. Biol.*, 1992, vol. 226, 889-896 [0029]
- Low et al. *J. Mol. Biol.*, 1996, vol. 250, 359-368 [0029]
- Pearson ; Lipman. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 2444-8 [0038]
- Jeffrey, P.D. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 10310-4 [0039]
- Muyldermans, S. *J. Biotechnol.*, 2001, vol. 74, 277-302 [0040]
- Panek et al. *J. Pharmacol. Exp. Thera*, 1997, vol. 283, 1433-44 [0060]
- Batley et al. *Life Sci.*, 1998, vol. 62, 143-50 [0060]

- Matthews et al. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 9026-30 [0009]
- Kim, K. et al. *Nature*, 1993, vol. 362, 841-4 [0011]
- Fielder et al. *Blood*, 1997, vol. 89, 1870-5 [0013]
- Bellamy et al. *Cancer Res.*, 1999, 59728-33 [0013]
- Dias et al. *J. Clin. Invest.*, 2000, vol. 106, 511-21 [0013]
- Sato, K. et al. *Tohoku J. Exp. Med.*, 1998, vol. 185, 173-84 [0013]
- Ishii, Y. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*, 1995, vol. 47, 133-40 [0013]
- Ferrer, F.A. et al. *Urology*, 1999, vol. 54, 567-72 [0013]
- Wikstrand et al. *Cancer Res.*, 1995, vol. 55, 3140-48 [0061]
- Sambrook, J. ; Russell, D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001 [0091]
- Grandis et al. *Cancer*, 1996, vol. 78, 1284-92 [0061]
- Shimizu et al. *Japan J. Cancer Res.*, 1994, vol. 85, 567-71 [0061]
- Sauter et al. *Am. J. Path.*, 1996, vol. 148, 1047-53 [0061]
- Collins. *Glia*, 1995, vol. 15, 289-96 [0061]
- Radinsky et al. *Clin. Cancer Res.*, 1995, vol. 1, 19-31 [0061]
- Petrides et al. *Cancer Res.*, 1990, vol. 50, 3934-39 [0061]
- Hoffmann et al. *Anticancer Res.*, 1997, vol. 17, 4419-26 [0061]
- Lu et al. *J. Biol. Chem.*, 2000, vol. 275, 14321-30 [0092]
- Zhu et al. *Cancer Res.*, 1998, vol. 58, 3209-14 [0092]
- DeHaard et al. *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, 18218-30 [0096]