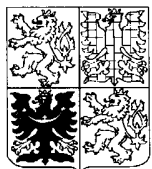


# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **23.12.1999**  
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **23.12.1998**  
(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/113647**  
(33) Země priority: **US**  
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17.10.2001**  
(Věstník č. 10/2001)  
(86) PCT číslo: **PCT/US99/30895**  
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO00/37504**

(21) Číslo dokumentu:

**2001 - 2349**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>:

**C 07 K 16/28**  
**A 61 K 39/395**  
**A 61 P 29/00**  
**A 61 P 35/00**  
**A 61 P 37/00**

(71) Přihlašovatel:

PFIZER INC., Groton, CT, US;

(72) Původce:

Hanson Douglas Charles, Niantic, CT, US;  
Neveu Märk Joseph, Mystic, CT, US;  
Mueller Eileen Elliot, Old Lyme, CT, US;  
Hanke Jeffrey Herbert, Reading, MA, US;  
Gilman Steven Christopher, Old Lyme, CT, US;  
Davis C. Geoffrey, Burlingame, CA, US;  
Corvalan Jose Ramon, Foster City, CA, US;

(74) Zástupce:

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

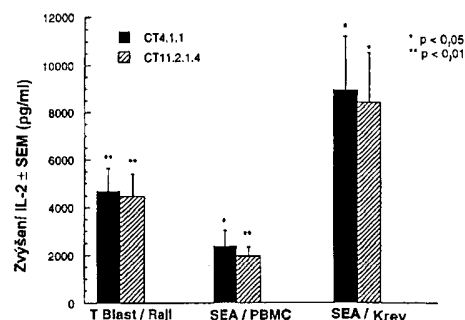
(54) Název přihlášky vynálezu:

**Lidské monoklonální protilátky proti CTLA-4**

(57) Anotace:

Plně lidské monoklonální protilátky proti antigenu 4 lidských cytotoxických T lymfocytů (CTLA-4). Nukleotidové sekvence kódující aminokyselinové sekvence lehkých a těžkých řetězců imunoglobulinových molekul, zejména souvislé sekvence lehkého a těžkého řetězce zahrnující úseky určující komplementaritu (CDR), specificky zahrnující úseky od FR1 a/nebo CDR1 až do CDR3 a/nebo úsek FR4. Protilátky mající podobné vazebné vlastnosti a protilátky (nebo jiné antagonisty) mající podobné funkce jako popsané protilátky.

Zvýšení tvorby IL-2 po indukci monoklonálními protilátkami (MAb) anti-CTLA-4 (30 µg/ml) v 72hodinovém testu T lymfoblastů/buněk Raji a v superantigenovém testu (6 dárců)



22.08.01

PV 2001-2349

179356/HK

1

## **Lidské monoklonální protilátky proti CTLA-4**

Odkaz na související přihlášky

Předkládaná přihláška si nárokuje prioritu z prozatímní přihlášky U.S. č. 60/113 647, podané 23 prosince 1998, jejíž význaky jsou plně zahrnuty formou odkazu.

### Oblast techniky

Předmětem předkládaného vynálezu jsou plně lidské monoklonální protilátky proti lidskému antigenu 4 cytotoxických T lymfocytů (CTLA-4). Dále nukleotidové sekvence kódující a aminokyselinové sekvence obsahující těžké a lehké řetězce imunoglobulinových molekul, obzvláště souvislé sekvence těžkého a lehkého řetězce zahrnující oblasti určující komplementaritu (CDR), specificky od FR1 a/nebo CDR1 až do CDR3 a/nebo v FR4. Předmětem vynálezu jsou také protilátky mající podobné vazebné vlastnosti a protilátky (nebo jiní antagonisté) mající podobnou funkci jako protilátky popsané v tomto vynálezu.

### Dosavadní stav techniky

Regulace imunitní reakce pacientů by poskytla žádoucí léčbu mnoha lidských nemocí, která by mohla vést ke specifickému účinku, jehož lze zřídka dosáhnout použitím běžných léků. Bylo by možné dosáhnout aktivace i utlumení reakcí imunitního systému. Úlohy T a B lymfocytů byly obsáhle studovány a charakterizovány ve spojitosti s regulací imunitní reakce. Z těchto studií vyplývá, že úloha

T lymfocytů je v mnoha případech obzvláště důležitá při prevenci nemocí a léčbě.

T lymfocyty mají velmi složitý systém kontroly svých interakcí. Pro interakce mezi T lymfocyty jsou používány početné receptory a rozpustné faktory. Tudíž účinek každého konkrétního signálu na imunitní reakci se většinou mění a závisí na konkrétních faktorech, receptorech a proti-receptorech, které jsou zapojeny do metabolické dráhy. Metabolické dráhy pro utlumení reakcí jsou stejně důležité jako dráhy vyžadované pro aktivaci. Jeden mechanismus prevence imunitní reakce na konkrétní antigen je vyzrávání v thymu vedoucí k toleranci T lymfocytů. Jsou také známy další mechanismy, jako je například sekrece supresivních cytokinů.

Aktivace T lymfocytů nevyžaduje pouze stimulaci prostřednictvím antigenového receptoru (T buněčný receptor (TCR)), ale další signály prostřednictvím kostimulačních (společně stimulujících) povrchových molekul, jako je například CD28. Ligandy pro CD28 jsou proteiny B71 (CD80) a B7-2 (CD86), které jsou exprimovány na buňkách prezentujících antigen jako jsou například dendritické buňky, aktivované B lymfocyty nebo monocyty, které interagují s CD28 nebo CTLA-4 T lymfocytů pro zajištění kostimulačního signálu. Úloha kostimulačních signálů byla studována u experimentální alergické encefalomyelitidy (EAE) autory Perrinem et al. (Immunol. Res., 14, 189-99, 1995). EAE je autoimunitní porucha indukovaná buňkami Th1 namířenými proti myelinovým antigenům, která poskytuje *in vivo* model pro studium úlohy B7 zprostředkované kostimulace v indukci patologické imunitní reakce. Použitím rozpustného fúzního proteinového ligandu pro receptory B7, jakož i monoklonálních protilátek specifických buď pro CD80 nebo CD86, Perrin et al. prokázali, že B7 kostimulace má významnou úlohu pro určení klinického výsledku nemoci u EAE.

Interakce mezi B7 a CD28 je jedna z několika kostimulačních signálních drah, která se jeví postačující pro spuštění maturace a proliferace antigen-specifických T lymfocytů. Nedostatečná kostimulace a doprovodná nedostatečnost produkce IL-2 zabraňují následné proliferaci T lymfocytů a indukují stav nereaktivity nazývaný „anergie“. Aktivaci a proliferaci T lymfocytů může blokovat celá řada virů a nádorů, což vede k nepostačující aktivitě nebo nereaktivitě hostitelského imunitního systému k infikovaným nebo transformovaným buňkám. Z celé řady možných poruch T lymfocytů může být anergie alespoň částečně zodpovědná za selhání hostitele zbavit se patogenů nebo nádorových buněk.

Použití proteinu B7 ke zprostředkování protinádorové imunity bylo popsáno v práci Chen et al. (Cell, 71, 1093-1102, 1992) a Townsend a Allison (Science, 259, 368, 1993). Schwartz (Cell, 71, 1065, 1992) podává přehled úlohy CD28, CTLA-4, a B7 v produkci IL-2 a imunoterapii. Harding et al. (Nature, 356, 607-609, 1994) dokazuje, že signály zprostředkované CD28 kostimulují myší T lymfocyty a zabraňují indukci anergie u klonů T lymfocytů. (viz také patenty Spojených Států č. 5 434 131, 5 770 197, a 5 773 253, a mezinárodní patentové přihlášky č. WO 93/00431, WO 95/01994, WO 95/03408, WO 95/24217, a WO 95/33770).

Z výše uvedeného je jasné, že T lymfocyty vyžadují dva typy signálů od buněk prezentujících antigen (APC) pro aktivaci a následnou diferenciaci efektorové funkce. Zaprvé je zde antigen-specifický signál vznikající pro interakcích mezi TCR na T lymfocytech a molekulách MHC prezentujících peptidy na APC. Zadruhé zde je signál na antigenu nezávislý, který je zprostředkováván interakcí CD28 se členy rodiny B7 (B7-1 (CD80) nebo B7-2 (CD86)). Zpočátku bylo nejasné, kam přesně do prostředí imunitní reaktivity CTLA-4 patří. Myší CTLA-4 byl poprvé identifikován a klonován autory Brunet et al. (Nature, 328, 267-270, 1987) jako součást hledání

molekul, které jsou přednostně exprimovány na cytotoxických T lymfocytech. Lidský CTLA-4 byl identifikován a klonován krátce nato autory Dariavach et al. (Eur. J. Immunol., 18, 1901-1905, 1988). Molekuly CTLA-4 myšího a lidského původu mají přibližně celkem ze 76 % homologní sekvence a blíží se k úplné identitě sekvencí svých cyto plasmatických domén (Dariavach et al., Eur. J. Immunol., 18, 1901-1905, 1988). CTLA-4 je člen imunoglobulinové (Ig) velké rodiny ("superfamily") proteinů. Rodina Ig je skupina proteinů, které sdílejí klíčové strukturní charakteristické vlastnosti buď variabilních (V) nebo konstantních (C) domén Ig molekul. Členové Ig rodiny, bez omezení, zahrnují samotné imunoglobuliny, molekuly hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) (tj. MHC třídy I a II) a molekuly TCR.

V roce 1991, Linsley et al. (J. Exp. Med., 174, 561-569, 1991) navrhovali, že CTLA-4 je druhý receptor pro B7. Podobně Harper et al. (J. Immunol., 147, 1037-44, 1991) prokázali, že molekuly CTLA-4 a CD28 jsou blízce příbuzné u myši a člověka, co se týče sekvence, exprese RNA, genové struktury a lokalizace chromozomů. (Viz také Balzano et al., Int. J. Cancer Suppl., 7, 28-32, 1992). Další důkaz pro tuto úlohu byl získán funkčními studiemi. Například Lenschow et al. (Science, 257, 789-792, 1992) prokázal, že CTLA-4-Ig indukoval dlouhodobé přežívání štěpů pankreatických ostrůvků. Freeman et al. (Science, 262, 907-909, 1993) zkoumal úlohu CTLA-4 u myši s deficitem B7. Zkoumání ligandů pro CTLA-4 je popsáno v práci Lenschow et al. (P.N.A.S., 90, 11054-11058, 1993). Linsley et al. (Science, 257, 792-795, 1992) popisuje imunosupresi *in vivo* prostřednictvím rozpustné formy CTLA-4. Linsley et al. (J. Exp. Med. 176, 1595-604, 1992) připravili protilátky, které váží CTLA-4 a které nereagují zkříženě s CD28 a uzavřeli, že CTLA-4 je exprimován společně (koexprimován) s CD28 na aktivovaných T lymfocytech a kooperativně reguluje adhezi T lymfocytů a aktivaci

prostřednictvím B7. Kuchroo et al. (Cell, 80, 707-18, 1995) prokázali, že kostimulační molekuly B7-1 a B7-2 odlišně aktivovaly vývojové metabolické dráhy Th1/Th2. Yiqun et al. (Int. Immunol. 8, 37-44, 1996) prokázali, že existují odlišné požadavky na kostimulační signály od členů rodiny B7 pomocí klidových versus nově aktivovaných paměťových T lymfocytů vůči rozpustným upomínacím antigenům. (Viz také de Boer et al., Eur. J. Immunol., 23, 3120-5, 1993).

Několik skupin vědců navrhovalo alternativní nebo rozdílné interakce receptor/ligand pro CTLA-4 ve srovnání s CD28 a dokonce přemýšleli o třetím B-7 komplexu, který byl rozpoznáván prostřednictvím protilátky BB1. (Viz například Hathcock et al., Science, 262, 905-7, 1993, Freeman et al., Science, 262, 907-9, 1993, Freeman et al., J. Exp. Med., 178, 2185-92, 1993, Lenschow et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90, 11054-8, 1993, Razi-Wolf et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90, 11182-6, 1993 a Boussiotis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90, 11059-63, 1993). Ale Freeman et al. (J. Immunol., 161, 2708-15, 1998) diskutovali zjištění, že protilátka BB1 váže molekulu, která je totožná s buněčnou povrchovou formou CD74, a tudíž BB1 mAB váže protein odlišný než je B7-1, a tento epitop se také vyskytuje na proteinu B7-1. Toto zjištění tedy vyžadovalo prostor pro opětné uvážení studií s použitím BB1 mAB v analýze exprese a funkce CD80.

Počínaje rokem 1993 s kulminací v roce 1995 začali vědci dále zpřesňovat úlohu CTLA-4 ve stimulaci T lymfocytů. Nejdříve s použitím monoklonálních protilátek proti CTLA-4 Walunas et al. (Immunity, 1, 405-13, 1994) poskytli důkaz, že CTLA-4 může působit jako negativní regulátor aktivace T lymfocytů. Potom Waterhouse et al. (Science, 270, 985-988, 1995) prokázali, že myši s deficitem CTLA-4 akumulovaly T lymfoblasty s aktivovanými aktivačními markery ve svých lymfatických uzlinách a slezině. Blasty také infiltrovaly

játra, srdce, plíce a pankreatickou tkáň, a množství sérových imunoglobulinů bylo zvýšeno a T lymfocyty proliferovaly silně a spontánně, když byly stimulovány prostřednictvím T buněčného receptoru, ale byly senzitivní k buněčné smrti indukované obsazením (zesítněním, "cross-linking") receptorů Fas a zářením gama. Waterhouse et al. uzavřeli, že CTLA-4 působí jako negativní regulátor aktivace T lymfocytů a je životně důležitý pro kontrolu homeostázy lymfocytů. V komentáři ve stejném vydání Allison a Krummel Science, 270, 932-933, 1995) diskutovali práci Waterhouse et al. jako průkaznou, že CTLA-4 působí tak, že tlumí reaktivitu T lymfocytů nebo má inhibiční signální úlohu v aktivaci a vývoji T lymfocytů. Tivol et al. (Immunity, 3, 541-7, 1995) také vytvořili myši s deficitem CTLA-4 a prokázali, že se u těchto myší rychle vyvíjejí lymfoproliferativní choroby s multiorgánovou lymfocytární infiltrací a tkáňovou destrukcí, s obzvláště závažnou myokarditidou a pankreatitidou. Uzavřeli, že CTLA-4 má klíčovou úlohu v tlumení aktivace T lymfocytů a udržování imunologické homeostázy. Krummel a Allison (J. Exp. Med., 182, 459-65, 1995) dále objasnili, že CD28 a CTLA-4 mají opačné účinky na reakci T lymfocytů na stimulaci. Vytvořili protilátku proti CTLA-4 a zkoumali účinky její vazby na CTLA-4 v systému používajícímu vysoce purifikované T lymfocyty. Ve svém článku ukázali, že přítomnost nízkých hladin B7-2 na čerstvě explantované T lymfocyty může částečně inhibovat proliferaci T lymfocytů a tato inhibice byla zprostředkována interakcemi s CTLA-4. Zkřížená vazba CTLA-4 spolu s TCR a CD28 silně inhibuje proliferaci a sekreci IL-2 T lymfocyty. Konečně výsledky ukázaly, že CD28 a CTLA-4 předávají opačné signály, které se zdají být sjednoceny T lymfocyty při určování reakce na antigen. Autoři tudíž uzavřeli, že výsledek stimulace receptoru T lymfocytu antigenem je regulován CD28 kostimulačními signály, jakož i inhibičními signály

pocházejícími od CTLA-4. (Viz také Krummel et al., Int. Immunol., 8, 519-23, 1996, a patent Spojených Států č. 5 811 097 a mezinárodní patentová přihláška WO 97/20574.)

Byla prováděna celá řada dalších pokusů pro další objasnění výše uvedené funkce CTLA-4. Například Walunas et al. (J. Exp. Med., 183, 2541-50, 1996) prostřednictvím použití protilátek anti-CTLA-4 navrhovali, že signální dráha CTLA-4 nereguluje přežívání buněk nebo reaktivitu na IL-2, ale inhibuje produkci IL-2 závislou na CD28. Také Perrin et al. (J. Immunol., 157, 1333-6, 1996) prokázali, že protilátky anti-CTLA-4 použité u experimentální alergické encefalomyelitidy (EAE) exacerbovaly nemoc a zvýšily úmrtnost. Exacerbace nemoci byla spojena se zvýšenou produkcí encefalitogenních cytokinů TNF-alfa, IFN-gama a IL-2. Tito autoři tedy uzavřeli, že CTLA-4 reguluje intenzitu autoimunitní reakce u EAE, oslabuje produkci zánětlivých cytokinů a klinickou manifestaci nemoci. (Viz také Hurwitz et al., J. Neuroimmunol., 73, 57-62, 1997 a Cepero et al., J. Exp. Med., 188, 199-204, 1998) (anti-CTLA-4 "vlásenkový" ribozym, který specificky ruší expresi CTLA-4 po přenosu genu do myšího modelu T lymfocytů).

Kromě toho Blair et al. (J. Immunol., 160, 12-5, 1998) vyhodnotili působení panelu CTLA-4 monoklonálních protilátek (mAb) na klidové lidské CD4+ T lymfocyty. Jejich výsledky prokázaly, že některé CTLA-4 mAb inhibovaly proliferaci klidových buněk CD4+ a přechodné stádium buněčného cyklu od G0 do G1. Inhibiční vliv CTLA-4 byl zjevný během 4 hodin, v době, kdy exprese buněčného povrchového CTLA-4 nebyla detekovatelná. Ale další CTLA-4 mAb neměly zjistitelný inhibiční účinek, což indikovalo, že vazba mAb na samotný CTLA-4 nebyla postačující pro zprostředkování útlumu reakcí T lymfocytů. Je zajímavé, že zatímco produkce IL-2 byla zastavena, inhibiční anti-CTLA-4 mAb umožnily indukci a expresi genu přežívání buněk bcl-X(L). Ve shodě s tímto

pozorováním zůstávaly buňky životaschopné a po ligaci CTLA-4 nebyla zjišťována apoptóza.

Ve spojitosti s anergií Perez et al. (Immunity, 6, 411-7, 1997) prokázali, že indukci anergie T lymfocytů bylo zabráněno bloádou CTLA-4 a uzavřeli, že výsledek rozpoznávání antigenu T lymfocyty je určován interakcí CD28 nebo CTLA-4 na T lymfocytech s molekulami B7. Také Van Parijs et al. (J. Exp. Med., 186, 1119-28, 1997) zkoumali úlohu interleukinu 12 a kostimulátorů u anergie T lymfocytů *in vivo* a našli, že prostřednictvím inhibice zapojení CTLA-4 v průběhu indukce anergie byla blokována proliferace T lymfocytů a nebyla podněcována plná diferenciace Th1. Ale T lymfocyty vystavené antigenu vyvolávajícímu toleranci v přítomnosti jak IL-12, tak protilátky anti-CTLA-4 nebyly anergizovány a chovaly se identicky jako T lymfocyty, které potkaly imunogenní antigen. Tyto výsledky svědčí pro to, že k indukci anergie *in vivo* přispívají dva procesy: zapojení CTLA-4, které vede k bloádě schopnosti T lymfocytů proliferovat, a absence prototypového zánětlivého cytokinu, IL-12, který zabraňuje diferenciaci T lymfocytů na Th1 efektorové buňky. Kombinace IL-12 a anti-CTLA-4 protilátky byla postačující ke konverzi normálně tolerovaného stimulu na imunogenní podnět.

Ve spojitosti s infekcemi prokázali McCoy et al. (J. Exp. Med., 186, 183-7, 1997), že anti-CTLA-4 protilátky značně zesílily a urychlily imunitní reakci T lymfocytů na *Nippostrongylus brasiliensis*, což mělo za následek vydatnou redukci počtu dospělých červů a časně ukončení produkce vajíček parazitem. (Viz také Murphy et al., J. Immunol., 161, 4153-4160, 1998) (*Leishmania donovani*).

Ve spojitosti s rakovinou zavedli Kwon et al. (PNAS USA, 94, 8099-103, 1997) syngenní myší model karcinomu prostaty a zkoumali dvě odlišné manipulace, o kterých se předpokládalo, že vyvolají reakci proti karcinomu prostaty prostřednictvím

zvýšené kostimulaace T lymfocytů: i) zabezpečení přímé kostimulace prostatickými rakovinnými buňkami transdukovanými tak, že exprimovaly ligand B7-1 a ii) *in vivo* blokáda CTLA-4 T lymfocytů zprostředkovaná protilátkou, což zabráňovalo útlumu T lymfocytů. Bylo prokázáno, že *in vivo* blokáda CTLA-4 zprostředkovaná protilátkou zvýšila imunitní reakci proti karcinomu prostaty. Také Yang et al. (Cancer Res., 57, 4036-41, 1997) studovali, zda blokáda funkce CTLA-4 vede k zesílení protinádorové odpovědi T lymfocytů v různých stádiích nádorového růstu. Na základě *in vitro* a *in vivo* výsledků zjistili, že blokáda CTLA-4 u jedinců s nádorem zvýšila kapacitu vytvářet protinádorovou odpověď T lymfocytů, ale exprese tohoto zesilujícího účinku v jejich modelu byla omezena na časná stádia růstu nádoru. Dále Hurwitz et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 95, 10067-71, 1998) zjistili, že vyvolání protinádorové reakce zprostředkované T lymfocyty závisí na zapojení receptoru T lymfocytů hlavním histokompatibilním komplexem/antigenem, jakož i ligace CD28 prostřednictvím B7. Určité nádory, jako například karcinom prsu SM1, byly refrakterní na imunoterapii anti-CTLA-4. A tak díky použití kombinace blokády CTLA-4 a vakcíny obsahující faktor stimulující granulocytové a makrofágové kolonie exprimovaný buňkami SM1 byla pozorována regrese parentálních SM1 nádorů, navzdory neúčinnosti každé jednotlivé léčby použité samotné. Tato kombinační léčba měla za následek dlouhotrvající imunitu na SM1 a závisela jak na CD4(+), tak na CD8(+) T lymfocytech. Zjištění svědčí pro to, že blokáda CTLA-4 působí na úrovni buňky prezentující antigen pocházející z hostitele.

Ve spojitosti s diabetem Luhder et al. (J. Exp. Med., 187, 427-32, 1998) injikovali anti-CTLA-4 mAb do TCR transgenního myšího modelu diabetu v různých stádiích nemoci. Nalezli, že zapojení CTLA-4 v době, kdy jsou poprvé aktivovány potenciálně diabetogenní T lymfocyty, je klíčový

jev, je-li zapojení tolerováno, nastává invaze ostrůvků, ale zůstává po celé měsíce zcela neškodná. Jestliže zapojení tolerováno není, inzulitida je mnohem agresivnější a rychle vzniká diabetes.

Ve spojitosti s imunizací prostřednictvím vakcíny zjistili Horspool et al. (J. Immunol., 160, 2706-14, 1998), že intaktní anti-CTLA-4 mAb, ale ne fragmenty Fab, tlumili primární humorální odpověď na pCIA/beta gal bez ovlivnění upomínací reakce, což naznačuje, že aktivace CTLA-4 inhibovala produkci Ab, ale ne instruování ("priming") T lymfocytů. Blokáda ligandů pro CD28 a CTLA-4, CD80 (B7-1) a CD86 (B7-2), odhalila rozdílnou a nepřekrývající se funkci. Blokáda CD80 při iniciální imunizaci kompletně zrušila primární a sekundární Ab reakci, zatímco blokáda CD86 tlumila odpověď primární, ale ne sekundární. Současná blokáda CD80 + CD86 byla méně účinná v tlumení Ab reakcí, než blokáda každého z nich samotného. Zesílení kostimulace prostřednictvím společné injekce plazmidů exprimujících B7 zvýšilo CTL reakce, ale ne Ab odpovědi, a bez průkazu asymetrie Th1 k Th2. Tato zjištění svědčí pro složité a rozdílné úlohy CD28, CTLA-4, CD80 a CD86 při kostimulaci T lymfocytů po vakcinaci nukleovou kyselinou.

Ve spojitosti s rejekcí štěpu zjistili Markees et al. (J. Clin. Invest., 101, 2446-55, 1998) v myším modelu rejekce kožního aloštěpu, že přijetí zpočátku záviselo na přítomnosti IFN-gama, CTLA-4, a CD4(+) T lymfocytů. Přidání anti-CTLA-4 neb anti-IFN-gama mAb do laboratorního protokolu bylo spojeno s okamžitou rejekcí štěpu, zatímco anti-IL-4 mAb neměla žádný účinek.

Ve spojitosti s úlohou CTLA-4 ve vztahu k CD28, Fallarino et al. (J. Exp. Med., 188, 205-10, 1998) vytvořili transgenní myši TCR/s deficitem genu 2 aktivujícího rekombinázu/ s CD28 divokým typem nebo s deficitem CD28, které byly imunizovány nádorem exprimujícím antigen.

Instruované T lymfocyty od obou typů myší produkovaly cytokiny a proliferovaly při reakci na stimulující buňky bez exprese B7. Avšak zatímco odpověď CD28+/+ T lymfocytů zesílena kostimulací s B7-1, odpověď CD28-/- T lymfocytů byla silně inhibována. Tato inhibice byla zrušena monoklonální protilátkou proti B7-1 nebo CTLA-4. Tedy CTLA-4 mohou účinně inhibovat aktivaci T lymfocytů v nepřítomnosti CD28, což indikuje, že antagonismus signálu zprostředkovaného TCR je postačující pro vysvětlení inhibičního účinku CTLA-4. Také Lin et al. (J. Exp. Med., 188, 199-204, 1998) studovali rejekci srdečních aloštěpů u myší s deficitem CD28. H-2(q) srdce byla transplantována do myší s alogenním divokým typem nebo s deficitem CD28 (H-2(b)). Rejekce štěpu byla oddálena u myší s deficitem CD28 ve srovnání s myšmi s divokým typem. Ošetření příjemců s divokým typem s CTLA-4 imunoglobulinem (Ig) nebo s anti-B7-1 plus anti-B7-2 mAb významně prodloužilo přežívání aloštěpu. Na rozdíl od toho, ošetření myší s deficitem CD28 s CTLA-4-Ig, anti-B7-1 plus anti-B7-2 mAb, nebo blokující anti-CTLA-4 mAb indukovalo akceleraci rejekce aloštěpu. Tato zvýšená rychlost rejekce štěpu byla spojena se závažnější infiltrací mononukleárními buňkami a zvýšenými hladinami transkriptů IFN-gama a IL-6 v dárcovských srdcích neošetřeného divokého typu a myší s deficitem CD28 ošetřených CTLA-4-Ig- nebo anti-CTLA-4 mAb. Tudíž negativní regulační úloha CTLA-4 se šíří za jeho potenciální schopnost zabránit aktivaci CD28 prostřednictvím kompetice o ligand. Dokonce i v nepřítomnosti CD28 má CTLA-4 inhibiční účinek v regulaci rejekce aloštěpu.

Byla také studována další charakterizace exprese CTLA-4. Například Alegre et al. (J. Immunol., 157, 4762-70, 1996) navrhli, že povrchový CTLA-4 je rychle internalizován, což může vysvětlit nízké hladiny exprese obecně zjišťované na povrchu buněk. Uzavřeli, že jak CD28 tak IL-2 mají důležité úlohy v aktivaci exprese CTLA-4. Kromě toho se zdá, že

akumulace CTLA-4 na buněčném povrchu je primárně regulována jeho rychlou endocytózou. Také Castan et al. (Immunology, 90, 265-71, 1997) na základě *in situ* imunohistologických analýz exprese CTLA-4 naznačili, že germinální centra T lymfocytů, která byla CTLA-4 pozitivní, mohou být důležitá pro imunitní regulaci.

Podle toho ve světle široké a ústřední úlohy, kterou jak se ukazuje, CTLA-4 má v imunní reaktivitě, by bylo žádoucí vytvořit protilátky k CTLA-4, které mohou být účinně používány v imunoterapii. Navíc by bylo žádoucí vytvořit protilátky proti CTLA-4, které mohou být používány u chronických nemocí, u kterých je vyžadováno opakované podávání protilátek.

#### Popis obrázků

Obrázek 1 popisuje řadu nukleotidových a aminokyselinových sekvencí těžkého řetěze a lehkého řetězce kapa ( $\kappa$ ) imunoglobulinových molekul podle vynálezu: 4.1.1 (obrázek 1A), 4.8.1 (obrázek 1B), 4.14.3 (obrázek 1C), 6.1.1 (obrázek 1D), 3.1.1 (obrázek 1E), 4.10.2 (obrázek 1F), 2.1.3 (obrázek 1G), 4.13.1 (obrázek 1H), 11.2.1 (obrázek 1I), 11.6.1 (obrázek 1J), 11.7.1 (obrázek 1K), 12.3.1.1 (obrázek 1L) a 12.9.1.1 (obrázek 1M).

Obrázek 2 poskytuje srovnání sekvencí mezi predikovanými aminokyselinovými sekvencemi těžkého řetězce z klonů 4.1.1, 4.8.1, 4.14.3, 6.1.1, 3.1.1, 4.10.2, 4.13.1, 11.2.1, 11.6.1, 11.7.1, 12.3.1.1, and 12.9.1.1 a aminokyselinová sekvence zárodečné linie DP-50 (3-33). Rozdíly v aminokyselinové sekvenci zárodečné linie DP-50 a sekvencí v klonu jsou znázorněny tučně. Obrázek také ukazuje pozici sekvencí CDR1, CDR2 a CDR3, které jsou vystínovány.

Obrázek 3 ukazuje přiřazení sekvencí predikované aminokyselinové sekvence těžkého řetězce klonu 2.1.3 a zárodečné linie DP-65 (4-31). Rozdíly v aminokyselinové sekvenci zárodečné linie DP-65 a sekvencí v klonu jsou znázorněny tučně. Obrázek také ukazuje pozici sekvencí CDR1, CDR2 a CDR3, které jsou podtrženy.

Obrázek 4 ukazuje přiřazení predikované aminokyselinové sekvence lehkého řetězce kapa klonů 4.1.1, 4.8.1, 4.14.3, 6.1.1, 4.10.2 a 4.13.1 a zárodečné linie A27 aminokyselinové sekvence. Rozdíly v aminokyselinové sekvenci zárodečné linie A27 a sekvencí v klonu jsou znázorněny tučně. Obrázek také ukazuje pozici sekvencí CDR1, CDR2 a CDR3 protilátky, které jsou podtrženy. Zjevné delece v úseku CDR1 klonů 4.8.1, 4.14.3 a 6.1.1 jsou označeny symboly "0".

Obrázek 5 ukazuje přiřazení predikované aminokyselinové sekvence lehkého řetězce kapa klonů 3.1.1, 11.2.1, 11.6.1, a 11.7.1 a zárodečné linie 012. Rozdíly v aminokyselinové sekvenci zárodečné linie 012 a sekvencí v klonu jsou znázorněny tučně. Obrázek také ukazuje pozici sekvencí CDR1, CDR2 a CDR3 protilátky, které jsou podtrženy.

Obrázek 6 ukazuje přiřazení predikované aminokyselinové sekvence lehkého řetězce kapa klonu 2.1.3 a sekvencí zárodečné linie A10/A26. Rozdíly v aminokyselinové sekvenci zárodečné linie A10/A26 a sekvencí klonu jsou znázorněny tučně. Obrázek také ukazuje pozici sekvencí CDR1, CDR2 a CDR3 protilátky, které jsou podtrženy.

Obrázek 7 ukazuje přiřazení predikované aminokyselinové sekvence lehkého řetězce kapa klonu 12.3.1 a sekvencí zárodečné linie A17. Rozdíly v aminokyselinové sekvenci zárodečné linie A17 a sekvencí klonu jsou znázorněny tučně.

Obrázek také ukazuje pozici sekvencí CDR1, CDR2 a CDR3 protilátky, které jsou podtrženy.

Obrázek 8 ukazuje přiřazení predikované aminokyselinové sekvence lehkého řetězce kapa klonu 12.9.1 a zárodečné linie A3/A19. Rozdíly v aminokyselinové sekvenci zárodečné linie A3/A19 a sekvencí klonu jsou znázorněny tučně. Obrázek také ukazuje pozici sekvencí CDR1, CDR2 a CDR3 protilátky, které jsou podtrženy.

Obrázek 9 ukazuje souhrn N-koncové aminokyselinové sekvence získaný přímým proteinovým sekvencováním těžkého a lehkého řetězce protilátek.

Obrázek 10 uvádí některé další charakteristiky některých protilátek podle vynálezu. Na obr. 10A jsou shrnuta data týkající se klonů 3.1.1, 4.1.1, 4.8.1, 4.10.2, 4.14.3 a 6.1.1. Data týkající se koncentrace, isoelektrického fokusingu (IEF), SDS-PAGE, vylučovací chromatografie, kapalinové chromatografie/hmotové spektroskopie (LCMS), hmotové spektroskopie (MALDI), N-koncové sekvence lehkého řetězce jsou uvedena. Další detailní údaje týkající se IEF jsou na obr. 10B, data týkající se SDS-PAGE na obr. 10C a SEC protilátky klonu 4.1.1. na obr. 10D.

Obrázek 11 ukazuje expresi B7-1 a B7-2 na buňkách Raji užitím monoklonálních protilátek (mAb) anti-CD80-PE and anti-CD86-PE.

Obrázek 12 ukazuje na koncentraci závislé zvýšení produkce IL-2 v testu T lymfoblastů/Raji indukované blokujícími protilátkami anti-CTLA-4 (BNI3, 4.1.1, 4.8.1 a 6.1.1).

Obrázek 13 ukazuje na koncentraci závislé zvýšení produkce IFN- $\gamma$  v testu T lymfoblastů/Raji indukované blokujícími protilátkami anti-CTLA-4 (BNI3, 4.1.1., 4.8.1 a 6.1.1) (shodné donorové T-buňky).

Obrázek 14 ukazuje průměrné zvýšení produkce IL-2 T-buňkami ze 6 donorů indukovaných blokujícími monoklonálními protilátkami anti-CTLA-4 testu T-buňky blast/Raji.

Obr. 15 ukazuje průměrné zvýšení produkce IFN- $\gamma$  T-buňkami ze 6 donorů indukovaných blokujícími monoklonálními protilátkami anti-CTLA-4 testu T-buňky blast/Raji.

Obr. 16 ukazuje průměrné zvýšení produkce IL-2 v hPBMC z 5 donorů indukovaných blokujícími monoklonálními protilátkami anti-CTLA-4 testu T-buňky blast/Raji, měřeno 72 hodin po stimulaci SEA.

Obrázek 17 ukazuje průměrné zvýšení produkce IL-2 v celé krvi ze 3 donorů indukovaných blokujícími monoklonálními protilátkami anti-CTLA-4 testu T-buňky blast/Raji, měřeno 72 a 96 hodin po stimulaci SEA.

Obrázek 18 ukazuje inhibici růstu tumorů s protilátkou anti-myší CTLA-4 na modelu myšího fibrosarkomu.

Obrázek 19 ukazuje zvýšení produkce IL-2 indukované protilátkami anti-CTLA4 (4.1.1 a 11.2.1) podle vynálezu v testu T blast/Raji a Superantigen po 72 hodinách (mononukleární buňky z celé krve a periferní krve ze 6 dárců).

Obrázek 20 ukazuje na dávce závislé zvýšení produkce IL-2 indukované protilátkami anti-CTLA4 (4.1.1 a 11.2.1) podle vynálezu v testu T blast/Raji a Superantigen po 72 hodinách.

Obrázek 21 ukazuje na dávce závislé zvýšení produkce IL-2 indukované protilátkami anti-CTLA4 (4.1.1 a 11.2.1) podle vynálezu v testu a Superantigenu po 72 hodinách, kde celá krev byla stimulovaná 100 ng/ml superantigenem.

Obr. 22 ukazuje sérii dalších nukleotidových a aminokyselinových sekvencí následujících řetězců protilátek anti-CTLA-4: těžký řetězec 4.1.1 plné délky (cDNA 22(a), genomická sekvence 22(b), a aminokyselinová sekvence 22(c)), aglykosylovaný těžký řetězec plné 4.1.1 (cDNA 22(d) a aminokyselinová sekvence 22(e)), lehký řetězec 4.1.1 (cDNA 22(f) a aminokyselinová sekvence 22(g)), těžký řetězec 4.8.1 plné délky (cDNA 22(h) a aminokyselinová sekvence 22(i)), lehký řetězec 4.8.1 (cDNA 22(j) a aminokyselinová sekvence 22(k)), těžký řetězec 6.1.1 plné délky (cDNA 22(l) a aminokyselinová sekvence 22(m)), lehký řetězec 6.1.1 (cDNA 22(n) a aminokyselinová sekvence 22(o)), těžký řetězec 11.2.1 plné délky (cDNA 22(p) a aminokyselinová sekvence 22(q)), a lehký řetězec 11.2.1 (cDNA 22 (r) a aminokyselinová sekvence 22(s)).

#### Podstata vynálezu

Předkládaný vynález v prvním aspektu poskytuje protilátku schopnou vázat CTLA-4, která obsahuje aminokyselinovou sekvenci variabilního úseku těžkého řetězce obsahující souvislou sekvenci aminokyselin od sekvence FR1 do sekvence FR3, který je kódován genem lidské rodiny V<sub>H</sub>3-33, a obsahuje alespoň jednu z aminokyselinových substitucí

v sekvenci CDR1, CDR2 nebo sekvenci kostry, jak je ukázáno na obr. 2. Ve výhodném provedení vynálezu aminokyselinová sekvence obsahuje sekvenci vybranou ze skupiny obsahující SEKVENCI ID. Č.1, SEKVENCI ID. Č. 2, SEKVENCI ID. Č. 3; SEKVENCI ID. Č. 4, SEKVENCI ID. Č. 5, SEKVENCI ID. Č. 6, SEKVENCI ID. Č. 8, SEKVENCI ID. Č. 9, SEKVENCI ID. Č. 10, SEKVENCI ID. Č. 11, SEKVENCI ID. Č. 12, SEKVENCI ID. Č. 13, SEKVENCI ID. Č. 63, SEKVENCI ID. Č. 64, SEKVENCI ID. Č. 66, SEKVENCI ID. Č. 68 a SEKVENCI ID. Č. 70. V jiném výhodném provedení protilátka dále obsahuje sekvenci variabilního úseku lehkého řetězce, která obsahuje sekvenci vybranou ze skupiny obsahující SEKVENCI ID. Č. 14, SEKVENCI ID. Č. 15, SEKVENCI ID. Č. 16, SEKVENCI ID. Č. 17, SEKVENCI ID. Č. 18, SEKVENCI ID. Č. 19, SEKVENCI ID. Č. 20, SEKVENCI ID. Č. 21, SEKVENCI ID. Č. 22, SEKVENCI ID. Č. 23, SEKVENCI ID. Č. 24, SEKVENCI ID. Č. 25, SEKVENCI ID. Č. 26, SEKVENCI ID. Č. 65, SEKVENCI ID. Č. 67, SEKVENCI ID. Č. 69, a SEKVENCI ID. Č. 71.

Předkládaný vynález ve druhém aspektu poskytuje protilátku, která obsahuje aminokyselinovou sekvenci těžkého řetězce obsahující SEKVENCI ID. Č. 1 a aminokyselinovou sekvenci variabilního úseku lehkého řetězce obsahující SEKVENCI ID. Č. 14.

Třetí aspekt předkládaného vynálezu poskytuje protilátku, která obsahuje aminokyselinovou sekvenci těžkého řetězce obsahující SEKVENCI ID. Č. 2 a variabilní aminokyselinovou sekvenci lehkého řetězce obsahující SEKVENCI ID. Č. 15.

Čtvrtý aspekt předkládaného vynálezu poskytuje protilátku, která obsahuje aminokyselinovou sekvenci těžkého řetězce obsahující SEKVENCI ID. Č. 4 a variabilní aminokyselinovou sekvenci lehkého řetězce obsahující SEKVENCI ID. Č. 17.

Pátý aspekt předkládaného vynálezu poskytuje izolovanou lidskou monoklonální protilátku, která je schopná vázat s na

CTLA-4. Ve výhodném provedení vynálezu je protilátka schopná kompetovat o vazbu s CTLA-4 s protilátkou vybranou ze skupiny obsahující protilátky 3.1.1, 4.1.1, 4.8.1, 4.10.2, 4.13.1, 4.14.3, 6.1.1, 11.2.1, 11.6.1, 11.7.1, 12.3.1.1 a 12.9.1.1. V jiném výhodném provedení mají protilátky v podstatě podobnou vazebnou specifitu k CTLA-4 jako protilátky vybrané ze skupiny obsahující protilátky 3.1.1, 4.1.1, 4.8.1, 4.10.2, 4.13.1, 4.14.3, 6.1.1, 11.2.1, 11.6.1, 11.7.1, 12.3.1.1 a 12.9.1.1.

V ještě dalším výhodném provedení vynálezu jsou protilátky vybrány ze skupiny obsahující protilátky 3.1.1, 4.1.1, 4.8.1, 4.10.2, 4.13.1, 4.14.3, 6.1.1, 11.2.1, 11.6.1, 11.7.1, 12.3.1.1 a 12.9.1.1. V ještě dalším provedení předkládaného vynálezu není protilátka křížově reaktivní s CTLA-4 nižších savců, kdy výhodně k nižším savcům patří druhy jako je myš, potkan/krysa a králík, nejvýhodněji myš a potkan/krysa. V jiném výhodném provedení je protilátka křížově reaktivní s CTLA-4 primátů, zejména výhodně primáty rodu makak (*Macaca*), jako *M. fascicularis* (cynomologní m.) a *M. mullata* (m. rhesus). V dalším výhodném provedení protilátka vykazuje selektivitu pro CTLA-4 ve srovnání s CD28, B7-2, CD44 a hIgG1 vyšší než 100:1 a výhodně 500:1 nebo vyšší. V dalším výhodném provedení je vazebná afinita protilátky  $10^{-9}$  M nebo vyšší a výhodně  $10^{-10}$  M nebo vyšší. V jiném výhodném provedení protilátka inhibuje vazbu mezi CTLA-4 B7-2 s  $IC_{50}$  menší než 100 nM a výhodně menší než 0,38 nM. V dalším výhodném provedení protilátka inhibuje vazbu mezi CTLA-4 B7-1 s  $IC_{50}$  menší než 100 nM a výhodně menší než 0,50 nM. V jiném výhodném provedení protilátka zvyšuje produkci IL-2 v testu T buněk blast/Raji o 500 pg/ml nebo více a výhodně o 3846 pg/ml nebo více. V jiném výhodném provedení protilátka zvyšuje produkci IFN- $\gamma$  v testu T buněk blast/Raji o 500 pg/ml nebo více a výhodně o 1233 pg/ml nebo více. V ještě dalším výhodném provedení protilátka zvyšuje

produkci IL-2 v superantigenovém testu hPBMT nebo celé krve o 500 pg/ml nebo více. V jiném výhodném provedení protilátka zvyšuje produkci IFN- $\gamma$  v testu T buněk blast/Raji o 500 pg/ml nebo více a výhodně o 1233 pg/ml nebo více. V ještě dalším výhodném provedení protilátka zvyšuje produkci IL-2 v superantigenovém testu hPBMT nebo celé krve o 500 pg/ml nebo více a výhodně o 1500 pg/ml a více nebo o 30 % více, výhodně o 50 % více ve srovnání s kontrolou.

Předkládaný vynález v šestém aspektu poskytuje humanizovanou protilátku, která má v podstatě podobnou vazebnou specifitu k CTLA-4 jako protilátky vybrané ze skupiny obsahující protilátky 3.1.1, 4.1.1, 4.8.1, 4.10.2, 4.13.1, 4.14.3, 6.1.1, 11.2.1, 11.6.1, 11.7.1, 12.3.1.1 a 12.9.1.1. Ve výhodném provedení není protilátka křížově reaktivní s CTLA-4 nižších savců, kdy výhodně k nižším savcům patří druhy jako je myš, potkan/krysa a králík, nejvýhodněji myš a potkan/krysa. V jiném výhodném provedení je protilátka křížově reaktivní s CTLA-4 primátů, jako je zejména výhodně "cynomolgní" makak (*Macaca fascicularis*) a makak "rhesus" (*Macaca mullata*). V dalším výhodném provedení protilátka vykazuje selektivitu pro CTLA-4 ve srovnání s CD28, B7-2, CD44 a hIgG1 vyšší než 100:1 a výhodně 500:1 nebo vyšší. V dalším výhodném provedení je vazebná afinita protilátky  $10^{-9}$  M nebo vyšší a výhodně  $10^{-10}$  M nebo vyšší. V jiném výhodném provedení protilátka inhibuje vazbu mezi CTLA-4 B7-2 s  $IC_{50}$  menší než 100 nM a výhodně menší než 0,38 nM. V dalším výhodném provedení protilátka inhibuje vazbu mezi CTLA-4 B7-1 s  $IC_{50}$  menší než 100 nM a výhodně menší než 0,50 nM. V jiném výhodném provedení protilátka zvyšuje produkci IL-2 v testu s T blasty/buňkami Raji o 500 pg/ml nebo více a výhodně o 3846 pg/ml nebo více. V jiném výhodném provedení protilátka zvyšuje produkci IFN- $\gamma$  v testu T blast/Raji o 500 pg/ml nebo více a výhodně o 1233 pg/ml nebo více. V ještě dalším výhodném provedení protilátka zvyšuje produkci IL-2

v superantigenovém testu hPBMT nebo celé krve o 500 pg/ml nebo více. V jiném výhodném provedení protilátka zvyšuje produkci IFN- $\gamma$  v testu T buněk blast/Raji o 500 pg/ml nebo více a výhodně o 1233 pg/ml nebo více. V ještě dalším výhodném provedení protilátka zvyšuje produkci IL-2 v superantigenovém testu hPBMT nebo celé krve o 500 pg/ml nebo více a výhodně o 1500 pg/ml a více, nebo o 30 % více, výhodně o 50 % více ve srovnání s kontrolou.

Předkládaný vynález v sedmém aspektu poskytuje protilátku, která se váže CTLA-4, a která obsahuje aminokyselinovou sekvenci těžkého řetězce obsahující lidské sekvenční FR1, FR2, a FR3 kódované genem lidské rodiny V<sub>H</sub>3-33, který je operativně spojen ve čtecím rámci se sekvencí CDR1, CDR2 a CDR3, přičemž sekvenční CDR1, CDR2 a CDR3 jsou nezávisle vybrány ze sekvencí CDR1, CDR2 a CDR3 uvedených na obr. 2. Ve výhodném provedení protilátka podle vynálezu dále obsahuje jakékoliv somatické mutace v sekvencích FR1, FR2 a FR3, jak je ilustrováno na obr. 2.

Předkládaný vynález v osmém aspektu poskytuje protilátku vázající se k CTLA-4, která obsahuje aminokyselinovou sekvenci těžkého řetězce obsahující lidské sekvenční FR1, FR2, a FR3 kódované genem lidské rodiny V<sub>H</sub>3-33, který je operativně spojen ve čtecím rámci se sekvencí CDR1, CDR2 a CDR3, přičemž protilátka má následující výhodné vlastnosti: vazebnou afinitu pro CTLA-4  $10^{-9}$  M nebo vyšší, inhibuje vazbu mezi CTLA-4 a B7-1 s IC<sub>50</sub> 100 nM nebo nižší, inhibuje vazbu mezi CTLA-4 a B7-2 s IC<sub>50</sub> 100 nM nebo nižší a zvyšuje produkci cytokinu v testu lidských T lymfocytů o 500 pg/ml nebo více. Předkládaný vynález v devátém aspektu poskytuje protilátku vázající se k CTLA-4, která obsahuje aminokyselinovou sekvenci těžkého řetězce obsahující lidské sekvenční FR1, FR2, a FR3 operativně spojené ve čtecím rámci se sekvencí CDR1, CDR2 a CDR3, nezávisle vybranou ze sekvencí CDR1, CDR2 a CDR3 uvedených na obr. 2 a 3, přičemž protilátka má následující

výhodné vlastnosti: vazebnou afinitu pro CTLA-4  $10^{-9}$  M nebo vyšší, inhibuje vazbu mezi CTLA-4 a B7-1 s  $IC_{50}$  100 nM nebo nižší, inhibuje vazbu mezi CTLA-4 a B7-2 s  $IC_{50}$  100 nM nebo nižší a zvyšuje produkci cytokinu v testu lidských T lymfocytů o 500 pg/ml nebo více.

Předkládaný vynález v desátém aspektu poskytuje systém buněčné kultury pro testování stimulace T lymfocytů, obsahující kulturu lidských T lymfoblastů kokultivovaných (společně kultivovaných) s buňkami linie Raji. Ve výhodném provedení T lymfoblasty jsou před kokultivací opláchnuty s buněčnou linií Raji.

Předkládaný vynález v jedenáctém aspektu poskytuje způsob testování pro měření stimulace T lymfocytů, který spočívá v tom, že se poskytne kultura lidských T lymfoblastů a buněk Raji, tato kultura se přivede do kontaktu s testovaným činidlem, a měří se produkce cytokinů v této kultuře.

Předkládaný vynález ve dvanáctém aspektu poskytuje funkční test pro screening stimulačních funkčních skupin T lymfocytů, který spočívá v tom, že se poskytne kultura lidských T lymfoblastů a buněk Raji, tato kultura se přivede do kontaktu s testovanou funkční skupinou, a vyhodnotí se produkce cytokinů v této kultuře.

Předkládaný vynález ve třináctém aspektu poskytuje test stimulace T lymfocytů pro CTLA-4 inhibiční funkce, který spočívá v tom, že se kultura lidských T lymfoblastů a buněk Raji přivede do kontaktu s testovaným činidlem a vyhodnotí se produkce cytokinů v této kultuře.

Předkládaný vynález ve čtrnáctém aspektu poskytuje způsob testování (screening) na stimulační aktivitu T lymfocytů, který spočívá v tom, že se činidlo přivede do kontaktu s kulturou lidských T lymfoblastů a buněk Raji a vyhodnotí se produkce cytokinů v této kultuře.

V desátém až čtrnáctém aspektu vynálezu se výhodně T lymfoblasty před kultivací s buňkami Raji opláchnou. V jiném výhodném provedení vynálezu cytokiny jsou IL-2 nebo IFN- $\gamma$ . Ve výhodném provedení vynálezu se produkce cytokinů měří v supernatantu izolovaném z kultury. Ve výhodném provedení je činidlo protilátka a výhodně se váže k CTLA-4.

Předkládaný vynález v patnáctém aspektu poskytuje test k měření stimulace T lymfocytů, který spočívá v tom, že se poskytne populace lidských mononukleárních buněk periferní krve nebo celé krve stimulovaných stafylokokovým enterotoxinem A, kultura se přivede do kontaktu s činidlem, a měří se produkce cytokinů buněčnou populací.

Předkládaný vynález v šestnáctém aspektu poskytuje funkční test pro screening skupin se stimulační funkcí pro T lymfocyty, který spočívá v tom, že se poskytne populace lidských mononukleárních buněk periferní krve nebo celé krve stimulovaných stafylokokovým enterotoxinem A, kultura se přivede do kontaktu s funkční skupinou, a měří se produkce cytokinů buněčnou populací.

Předkládaný vynález v sedmnáctém aspektu poskytuje stimulační test T lymfocytů na inhibiční funkce CTLA-4, který spočívá v tom, že se populace lidských mononukleárních buněk periferní krve nebo celé krve stimulovaných stafylokokovým enterotoxinem A přivede do kontaktu s činidlem a vyhodnotí se produkce cytokinů buněčnou populací.

Předkládaný vynález v osmnáctém aspektu poskytuje způsob screeningu činidel na stimulační aktivitu pro T lymfocyty, který spočívá v tom, že se populace lidských mononukleárních buněk periferní krve nebo celé krve stimulovaných stafylokokovým enterotoxinem A přivede do kontaktu s činidlem a vyhodnotí se produkce cytokinů buněčnou populací.

Ve výhodném provedení šestnáctého až osmnáctého aspektu předkládaného vynálezu je cytokin IL-2. V jiném výhodném provedení je produkce cytokinů měřena v supernatantu

izolovaném z kultury. Ve výhodném provedení je činidlo protilátka a výhodně protilátka vázající se na CTLA-4.

#### Podrobný popis vynálezu

Předkládaný vynález poskytuje plně lidskou monoklonální protilátku proti lidskému CTLA-4. Vynález zejména poskytuje také nukleotidová sekvence kódující aminokyselinové sekvence obsahující těžký a lehký řetězec imunoglobulinových molekul, zejména sekvence odpovídající souvislým sekvencím těžkého a lehkého řetězce z FR1 a CDR1 a CDR3 a FR4. Dále vynález poskytuje protilátky mající podobné vazebné vlastnosti jako protilátky a protilátky (nebo jiné antagonisty) mající podobné funkce jako protilátky popsané ve vynálezu. Také poskytuje hybridomy exprimující tyto imunoglobulinové molekuly a také monoklonální protilátky.

#### Definice

Pokud není definováno jinak, vědecké a technické termíny jsou v předkládané přihlášce užívány v tom smyslu, jak jsou odborníkovi obecně srozumitelné. Pokud ze souvislosti nevyplývá opak, termíny použité v jednotném čísle zahrnují i množné číslo a termíny použité v množném čísle zahrnují i jednotné číslo. Obecně jsou názvosloví a metody použité v této přihlášce v souvislosti s buněčnými a tkáňovými kulturami, molekulární biologii, biochemií proteinů, oligonukleotidů a polynukleotidů a hybridizačními technikami obecně známé a odborníkovi srozumitelné. pro rekombinantní DNA, syntézu oligonukleotidů, tkáňové kultury a transformace byly užity standardní postupy odborníkovi známé (jako je např. elektroforéza, lipofekce atd.). Enzymatické reakce a purifikační metody se prováděly podle návodů výrobce, nebo obecně známými postupy a nebo jak je popsáno zde. Všechny zmíněné metody se prováděly odborníkovi známým způsobem, jak byly popsány v obecných příručkách, jako je např. Sambrook et

al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989, nebo ve specifických publikacích, které jsou dále v textu citovány, a tyto citace jsou formou odkazu do přihlášky zahrnuty. Názvosloví použité v přihlášce v souvislosti s laboratorními postupy z oboru analytické chemie, organické syntetické chemie a lékařské a farmaceutické chemie jsou obecně užívané a odborníkovi známé. Pro chemické syntézy, chemické analýzy, přípravu a formulaci farmaceutických přípravků a podávání přípravků pacientům a léčení byly užity standardní postupy odborníkům známé.

Následující termíny užívané v přihlášce mají, pokud není specificky uvedeno jinak, následující význam:

Termín "izolovaný polynukleotid" znamená podle vynálezu polynukleotid genomové DNA, cDNA nebo syntetického původu nebo jakoukoliv jejich kombinaci, který je "izolovaný" tím, že 1) není spojen ani s celým ani s částí polynukleotidu, ve kterém se "izolovaný polynukleotid" nalézá v přírodě, 2) je operativně spojený s polynukleotidem, se kterým není v přírodě spojen, nebo 3) v přírodě se nevyskytuje jako součást delší sekvence.

Termín "izolovaný protein" znamená podle vynálezu protein vzniklý na základě cDNA, rekombinantní RNA nebo syntetickým způsobem nebo jakoukoliv jejich kombinací, který je "izolovaný" vzhledem k původu nebo vzniku tím, že 1) není spojen s proteiny tak, jak se nachází v přírodě, 2) neobsahuje další proteiny ze stejného zdroje, např. neobsahuje žádné další proteiny z myši, a 3) je exprimován buňkami jiného biologického druhu, nebo 4) nevyskytuje se v přírodě.

Termín "polypeptid" se užívá v popisu vynálezu jako generický termín a označuje nativní protein, fragmenty nebo analogy polypeptidové sekvence. Tudíž nativní protein,

fragmenty nebo analogy jsou "druhy" polypeptidových "rodu". Výhodné polypeptidy podle předkládaného vynálezu jsou např. molekuly těžkého řetězce lidského imunoglobulinu a molekuly lehkého řetězce kapa lidského imunoglobulinu uvedené na obr. 1, a také molekuly protilátek vytvořené jejich kombinací, obsahující molekuly těžkého řetězce s molekulami lehkého řetězce, např. lehkého řetězce kapa lidského imunoglobulinu, a také naopak, a také jejich fragmenty a analogy.

Termín "přirozeně se vyskytující" nebo "vyskytující se v přírodě" se v popisu vynálezu týká skutečnosti, že příslušný předmět lze nalézt v přírodě. Tak např. polypeptid nebo polynukleotidová sekvence, které jsou přítomny v organismu (včetně virů) a které z takové přírodního zdroje mohou být izolovány a nebyly přitom záměrně člověkem modifikovány, ať už v laboratoři nebo jinak, jsou "přirozeně se vyskytující".

Termín "operativně spojený" v popisu vynálezu označuje to, že složky jsou v takové pozici, která jim umožňuje zamýšlenou funkci. Kontrolní sekvence operativně spojená s kódující sekvencí je ligována s kódující sekvencí takovým způsobem, aby bylo dosaženo exprese kódující sekvence za podmínek vhodných pro funkci kontrolní sekvence.

Termín "kontrolní sekvence" označuje v popisu vynález polynukleotidovou sekvenci, která je nutná k expresi a obecně k činnosti kódující sekvence, ke které je ligována (připojena). Kontrolní sekvence jsou různé povahy v závislosti na hostitelském organismu: u prokaryotických organismů obsahuje kontrolní sekvence obecně promotor, ribozomální vazebné místo a terminační sekvenci transkripce, u eukaryotických organismů obsahuje kontrolní sekvence obecně promotor a terminační sekvenci transkripce. Termín "kontrolní sekvence" zahrnuje jakožto minimum všechny složky, jejichž přítomnost je nezbytná pro expresi a "zpracování" DNA, přitom

může obsahovat ještě další složky, jejichž přítomnost je výhodná, např. vedoucí sekvenci ("leader") nebo partnerskou fúzní sekvenci.

Termín "polynukleotid" podle předkládaného vynálezu znamená polymerní formu nukleotidů délky nejméně 10 bazí, a to buďto ribonukleotidů nebo deoxyribonukleotidů nebo modifikované formy obou těchto typů nukleotidů. termín přitom zahrnuje jak jednořetězcové tak dvouřetězcové formy DNA.

Termín "oligonukleotid" podle vynálezu označuje přirozeně se vyskytující i modifikované nukleotidy navázané oligonukleotidovými vazbami přirozeně se vyskytujícími nebo jinými než přirozeně se vyskytujícími. Oligonukleotidy jsou obecně podmnožinou polynukleotidu a obsahují přibližně 200 bazí nebo méně. Výhodné oligonukleotidy obsahují 10 až 60 bazí a nejvýhodněji 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 nebo 20 až 40 bazí. Oligonukleotidy jsou obvykle jednořetězcové, např. oligonukleotidové sondy, ačkoliv mohou být i dvouřetězcové, např. pro konstrukci mutovaných genů. Oligonukleotidy podle vynálezu jsou buďto "sense" nebo "antisense" oligonukleotidy. Termín "přirozeně se vyskytující oligonukleotidy" označuje jak ribonukleotidy tak i deoxyribonukleotidy. Termín "modifikované oligonukleotidy" označuje v popisu vynálezu nukleotidy s modifikovanými nebo substituovanými cukernými skupinami a podobně. Termín "oligonukleotidové vazby" označuje oligonukleotidové vazby jako je vazba fosforothioátová, fosforodithioátová, fosforoselenoátová, fosfordiselenoátová, fosforoaniloaltoátová, fosforoaniladátová, fosforoamidátová a další. Viz např. publikace LaPlanche et al. Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stec et al. J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984); Stein et al. Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988); Zon et al. Anti-Cancer Drug Design 6:539 (1991); Zon et al. Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec et al. U.S.

Patent č. 5,151,510; Uhlmann and Peyman Chemical Reviews 90:543 (1990), které jsou zahrnuty formou odkazu. Všechny oligonukleotidy mohou být pro detekci označeny, pokud je to třeba.

Termín "selektivně hybridizovat" znamená v popisu vynálezu detekovatelně a specificky se vázat. Polynukleotidy, oligonukleotidy a jejich fragmenty podle vynálezu selektivně hybridizují s řetězcí nukleových kyselin za podmínek hybridizace a promývání, kdy je minimalizováno množství detekovatelné vazby nespecifických nukleových kyselin. Podmínky s vysokou stringencí se užívají k dosažení selektivní hybridizace, což je odborníkům známo a bude zde ještě diskutováno. Obecně homologie sekvencí nukleových kyselin mezi polynukleotidy, oligonukleotidy a fragmenty sekvencí nukleových kyselin podle vynálezu a požadovanými nukleovými kyselinami je nejméně 80 % a více, výhodně s rostoucí homologií alespoň 85%, 90%, 95%, 99% a 100%. Dvě aminokyselinové sekvence jsou homologní, pokud je zde částečná nebo úplná identita mezi jejich sekvencemi. Tak např. 85% homologie znamená, že 85 % aminokyselin je identických, když jsou dvě sekvence přiřazeny ("alignment") s dosažením maximální shody ("matching"). Mezery (v jedné ze dvou přiřazených sekvencí) jsou povoleny, aby bylo dosaženo maximální shody, výhodně jsou mezery velikosti 5 nebo kratší, nejvýhodnější jsou mezery velikosti dvě nebo kratší. Alternativně a výhodně, dvě proteinové sekvence (nebo dvě polypeptidové sekvence z nich odvozené dlouhé alespoň 30 aminokyselin) jsou homologní, ve smyslu zde užívaného termínu, pokud mají skóre shody přiřazení vyšší než 5 (v jednotkách standardní odchylky) při užití programu ALIGN s mutační datovou maticí a sankcí za mezeru 6 nebo více. Viz Dayhoff, M.O., in *Atlas of Protein: Sequence and Structure*, str. 101-110 (Volume 5, National Biomedical Research Foundation (1972)), a Supplement 2 k tomuto dílu, str. 1-10.

Dvě sekvence nebo jejich části jsou výhodně homologní, když jejich aminokyseliny jsou z 50 %a více identické při dosažení optimální shody přiřazení v programu ALIGN. Termín "odpovídá" se v popisu vynálezu užívá ve významu, že polynukleotidová sekvence je homologní (tj. identická, nikoliv evolučně příbuzná) s celou nebo částí referenční polynukleotidové sekvence, nebo že polypeptidová sekvence je identická s referenční polypeptidovou sekvencí. Naproti tomu termín "komplementární" znamená, že komplementární sekvence je homologní k části nebo celé polynukleotidové sekvence, ke které se srovnává. Tak pro ilustraci nukleotidová sekvence "TATAC" odpovídá referenční sekvenci "TATAC" a je komplementární k referenční sekvenci "GTATA".

Následující termíny se užívají k popisu vztahů mezi dvěma nebo více polynukleotidovými nebo aminokyselinovými sekvencemi: "referenční sekvence", "srovnávací okno", "sekvenční identita", "procento sekvenční identity" a "podstatná identita". "Referenční sekvence" je definována jako sekvence použitá jako základ pro srovnávání sekvencí, referenční sekvence může být podmnožina větší sekvence, např. segment cDNA plné délky nebo genové sekvence uvedené v seznamu sekvencí, nebo může obsahovat celou cDNA nebo genovou sekvenci. Obecně je referenční sekvence dlouhá alespoň 18 nukleotidů nebo 6 aminokyselin, často 24 nukleotidů nebo 8 aminokyselin, a častěji alespoň 48 nukleotidů nebo 16 aminokyselin. Jelikož v případě dvou polynukleotidů nebo aminokyselinových sekvencí každý/á z nich 1) může obsahovat sekvenci (tj. část úplné polynukleotidové nebo aminokyselinové sekvence), která je pro obě molekuly podobná a 2) dále může obsahovat sekvenci, která je pro obě molekuly odlišná, srovnávání dvou nebo více sekvencí se provádí obvykle pomocí tzv. "srovnávacího okna" pro identifikaci a srovnání lokálních úseků sekvenční identity/podobnosti. Termín "srovnávací okno" označuje

myšlený segment alespoň 18 souvisle po sobě následujících nukleotidových pozic nebo 6 aminokyselin, kde polynukleotidová sekvence nebo aminokyselinová sekvence může být srovnána s referenční sekvencí alespoň 18 souvisle po sobě jdoucích nukleotidů nebo sekvencí 6 aminokyselin, přičemž úsek polynukleotidové sekvence ve srovnávacím okně může obsahovat adice, delece, substituce apod. (tj. mezery) z 20 % nebo méně ve srovnání s referenční sekvencí (která neobsahuje adice nebo delece) pro dosažení optimální shody přiřazení dvou sekvencí. Optimální přiřazení sekvencí při porovnávání srovnávacích oken může být prováděno algoritmem lokální homologie podle Smith a Waterman *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), algoritmem homologního přiřazení podle Needleman and Wunsch *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), metodou vyhledávání podobnosti podle Pearson and Lipman *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 85:2444 (1988), počítačovou implementací těchto algoritmů (GAP, BESTFIT, FASTA, a TFASTA v programovém balíku Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0 od Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), nebo v programovém balíku Geneworks nebo MacVector), nebo prohlížením, a nejlepší přiřazení (které vede k nejvyššímu procentu homologie ve srovnávacím okně) získané různými metodami se vybere.

Termín "sekvenční identita" znamená identitu dvou polynukleotidových nebo aminokyselinových sekvencí (tj. jsou identické na bázi nukleotid za nukleotidem nebo zbytek za zbytkem) ve srovnávacím okně. Termín "procento sekvenční identity" označuje hodnotu, která se vypočte porovnáním dvou optimálně přiřazených sekvencí ve srovnávacím okně a určením počtu pozic, kde jsou identické báze (např. A, T, C, G, U nebo I) nebo aminokyselinové zbytky v obou sekvencích, čímž se získá počet shodných pozic, a tento počet shodných pozic se dělí celkovým počtem pozic ve srovnávacím okně (tj. velikostí okna) a výsledek se vynásobí 100, čímž se dostane

hodnota procenta sekvenční identity. Termín "podstatná identita" v přihlášce označuje vlastnosti polynukleotidové nebo aminokyselinové sekvence, kdy polynukleotidová nebo aminokyselinová sekvence obsahuje sekvenci, která má alespoň 85% sekvenční identitu, výhodně alespoň 90 až 95% sekvenční identitu, a nejvýhodněji a nejobvykleji alespoň 99% sekvenční identitu při srovnání s referenční sekvencí ve srovnávacím okně velikosti alespoň 18 nukleotidů (6 aminokyselin), často velikosti alespoň 24 až 48 nukleotidů (8 až 16 aminokyselin), kdy procento sekvenční identity se vypočítává ze srovnání referenční sekvence se sekvencí, která může obsahovat delece nebo adice představující nejvýše 20 % celkové referenční sekvence ve srovnávacím okně.

V popisu vynálezu se pro označení 20 esenciálních aminokyselin užívají konvenční zkratky, viz publikace *Immunology - A Synthesis* (2nd Edition, E.S. Golub and D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. 20 (1991)), která je vložena formou odkazu. Stereoisomery dvaceti konvenčních aminokyselin (např. D-aminokyseliny), přírodně se nevyskytující aminokyseliny, jako např.  $\alpha$ -,  $\alpha$ -disubstituované aminokyseliny, N-alkylaminokyseliny, kyselina mléčná a další neobvyklé aminokyseliny mohou být také vhodné složky polypeptidů podle předkládaného vynálezu. K příkladům neobvyklých aminokyselin patří: 4-hydroxyprolin,  $\gamma$ -karboxyglutamát,  $\epsilon$ -N,N,N-trimethyllysin,  $\epsilon$ -N-acetyllysine, O-fosfoserin, N-acetylserin, N-formylmethionin, 3-methylhistidin, 5-hydroxylysin,  $\sigma$ -N-methylarginin, a další podobné aminokyseliny (např. 4-hydroxyprolin). Při označování polypeptidu v popisu vynálezu je vlevo amino-koncová část a vpravo karboxy-koncová část polypeptidu v souladu s konvencí odborníkovi známou.

Obdobně, pokud není specifikováno jinak, levý konec jednořetězcové polynukleotidové sekvence je 5'-konec a tudíž směr vlevo u dvouřetězcové polynukleotidové sekvence je

označován jako 5'-směr. Směr od 5'-konce do 3'-konce, kterým vzniká RNA transkript je označován jako směr transkripce, úseky DNA řetězce mající stejnou sekvenci jako RNA, ležící 5'-směrem od 5'-konce RNA transkriptu jsou označovány jako "upstream" (tj. proti směru transkripce) sekvence, úseky DNA řetězce mající stejnou sekvenci jako RNA, ležící 3'-směrem od 3'-konce RNA transkriptu jsou označovány jako "downstream" (tj. po směru transkripce) sekvence.

Při aplikaci na polypeptidy termín "podstatná identita" znamená, že dvě peptidové sekvence, pokud jsou optimálně přiřazeny, jako např. v programu GAP nebo BESTFit při požití předem nastavených hodnot váhy mezery, sdílejí alespoň 80% sekvenční identitu, výhodně alespoň 90% sekvenční identitu, výhodněji 95% sekvenční identitu a nejvýhodněji alespoň 99% sekvenční identitu. Výhodně aminokyselinové zbytky v pozicích, které nejsou identické, se liší konzervativní substitucí aminokyselin. Konzervativní aminokyselinové substituce jsou vzájemné záměny takových aminokyselin, které mají podobné postranní řetězce. tak např. skupiny aminokyselin s alifatickým postranním řetězcem obsahuje glycin, alanin, valin, leucin a isoleucin, skupina aminokyselin majících alifatický-hydroxylový postranní řetězec obsahuje serin a threonin, skupina aminokyselin s postranním řetězcem obsahujícím amidovou skupinu obsahuje asparagin a glutamin, skupina aminokyselin majících aromatické postranní řetězce obsahuje fenylalanin, tyrosin a tryptofan, skupina aminokyselinmajících bazický postranní řetězec obsahuje lysin, arginin a histidin, a skupina aminokyselin majících postranní řetězec obsahující síru obsahuje cystein a methionin. Výhodné skupiny aminokyselin pro konzervativní substituce jsou: valin-leucin-isoleucin, fenylalanin-tyrosin, lysin-arginin, alanin-valin, glutamát-aspartát a asparagin-glutamin.

Jak již bylo diskutováno, menší variace v aminokyselinové sekvenci protilátek nebo imunoglobulinových molekul jsou zahrnuty v předkládaném vynálezu, za předpokladu, že variace udržují alespoň 75%, výhodněji alespoň 80%, 90% nebo 95% a nejvýhodněji 99% sekvenční identitu. Zejména sem patří konzervativní substituce aminokyselin. Konzervativní substituce jsou takové substituce, které se odehrávají v rámci rodiny aminokyselin, které jsou příbuzné svými postranními skupinami. Geneticky kódované aminokyseliny se obecně dělí do rodin: (1) kyselé = aspartát, glutamát, (2) bazické = lysin, arginin, histidin, (3) nepolární = alanin, valin, leucin, isoleucin, prolin, fenylalanin, methionin, tryptofan, a (4) nenabitě polární = glycin, asparagin, glutamin, cystein, serin, threonin, tyrosin. Výhodnější rodiny jsou: serin a threonin tvoří rodinu alifatickou-hydroxylovou, asparagin a glutamin tvoří rodinu obsahující amidovou skupinu, alanin, valin, leucin a isoleucin tvoří alifatickou rodinu, a fenylalanin, tryptofan a tyrosin tvoří aromatickou rodinu. Tak např. je rozumné očekávat, že izolované nahrazení leucinu isoleucinem nebo valinem, aspartátu glutamátem, threoninu serinem nebo podobné náhrady aminokyselin strukturně příbuznými aminokyselinami, nebudou mít závažný vliv na vazebné nebo jiné vlastnosti výsledné molekuly, zejména pokud se náhrady nebudou týkat oblasti kostry. Zda záměna aminokyseliny vedle k funkčnímu peptidu lze okamžitě ověřit testováním specifické aktivity polypeptidového derivátu. Příslušné testy jsou v této přihlášce podrobně popsány. Fragmenty nebo analogy protilátek nebo imunoglobulinových molekul mohou být odborníkem snadno připraveny. Výhodné amino-konce nebo karboxy-konce fragmentů nebo analogů se vyskytují v blízkosti hranic funkčních domén. Strukturní a funkční domény mohou být identifikovány srovnáním nukleotidové a/nebo aminokyselinové sekvence s daty ve veřejných nebo soukromých databázích sekvencí. Výhodně se

užívají počítačové metody k identifikaci sekvenčních motivů nebo predikci proteinových konformačních domén, které se vyskytují u jiných proteinů, jejichž struktura a/nebo funkce je známá. Metody k identifikaci proteinových sekvencí, které se skládají do známých trojrozměrných struktur, jsou odborníkům známy (viz např. Bowie et al. *Science* 253:164 (1991)). Čili předcházející příklady ukazují, že odborník je schopen rozeznat motivy a strukturní konformace, které lze užít pro definování strukturních a funkčních domén podle předkládaného výsledku.

Výhodné aminokyselinové substituce jsou takové, které: (1) redukuje citlivost k proteolýze, (2) redukuje citlivost k oxidaci, (3) mění vazebnou afinitu pro vytvářející se proteinové komplexy, (4) mění vazebné afinity a (5) poskytují nebo modifikují jiné fyzikálně-chemické nebo funkční vlastnosti takových analogů. Analogy mohou obsahovat různé muteiny sekvenční odlišné od přirozeně se vyskytující peptidové sekvenční. Tak např. jednoduchá nebo vícenásobná aminokyselinová substituce (výhodně konzervativní substituce aminokyselin) se může provést v přirozeně se vyskytující sekvenci (výhodně v části polypeptidu mimo doménu/domény tvořící intermolekulární spojení). Konzervativní aminokyselinové substituce by neměla podstatně změnit strukturní charakteristiky původní (parentální) sekvenční (např. náhrada aminokyseliny by neměla narušit šroubovicovou strukturu parentální molekuly nebo narušit jiné typy sekundárních struktur charakteristických pro parentální sekvenci). Příklady v oboru známých sekundárních a terciárních struktur polypeptidů byly popsány např. v publikacích *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)), *Introduction to Protein Structure* (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)), a Thornton

et al. *Nature* 354:105 (1991), které jsou vloženy formou odkazu.

Termín "polypeptidový fragment" označuje v předkládané přihlášce polypeptid s delecí amino-konce a/nebo karboxy-konce, přičemž zbývající aminokyselinová sekvence je identická s odpovídajícími pozicemi přirozeně se vyskytující sekvence, dedukované např. na základě cDNA plné délky. Fragmenty jsou typicky dlouhé alespoň 6, 6, 8 nebo 10 aminokyselin, výhodně alespoň 14 aminokyselin a nejvýhodněji alespoň 20 aminokyselin, obvykle však alespoň 50 aminokyselin a ještě výhodněji alespoň 70 aminokyselin.

Termín "analog" v popisu vynálezu znamená polypeptid, který obsahuje segment alespoň 25 aminokyselin, který má podstatnou identitu s úsekem dedukované aminokyselinové sekvence a která má alespoň jednu z následujících vlastností: (1) specificky se váže k CTLA-4 za vhodných vazebných podmínek, (2) má schopnost blokovat vazbu CTLA-4 s jeho receptorem, nebo (3) má schopnost inhibovat růst buněk exprimujících CTLA-4 *in vitro* nebo *in vivo*. Typicky polypeptidové analogy obsahují konzervativní aminokyselinové substituce (nebo adice nebo delece) vzhledem k přirozeně se vyskytující sekvenci. Analogy jsou typicky dlouhé alespoň 20 aminokyselin, výhodně alespoň 50 aminokyselin nebo delší, a často jsou dlouhé stejně jako přirozeně se vyskytující polypeptid plné délky.

Peptidové analogy jsou obecně ve farmaceutickém průmyslu užívány jako nepeptidové léčiva s vlastnostmi analogickými s původním (templátovým) peptidem. Tyto typy nepeptidových sloučenin se nazývají "peptidová mimetika" nebo také "peptidomimetika" (viz Fauchere, *J. Adv. Drug Res.* 15:29 (1986); Veber and Freidinger *TINS* p.392 (1985); and Evans et al. *J. Med. Chem.* 30:1229 (1987)). Takové sloučeniny jsou obvykle vyvíjeny pomocí počítačového modelování molekul. Peptidomimetika strukturně podobná terapeuticky užitečným

peptidům se mohou užít pro dosažení ekvivalentního terapeutického nebo profylaktického účinku. Obecně jsou peptidomimetika strukturně podobná "paradigmatickému" peptidu (tj. polypeptidu, který má požadované biochemické vlastnosti nebo farmakologickou aktivitu), jako jsou např. protilátky, ale má jednu nebo více peptidových vazeb nahrazených vazbou vybranou ze skupiny obsahující:  $--CH_2NH--$ ,  $--CH_2S--$ ,  $--CH_2-CH_2--$ ,  $--CH=CH--$  (*cis* a *trans*),  $--COCH_2--$ ,  $--CH(OH)CH_2--$ , a  $--CH_2SO--$ , a sice metodami, které jsou odborníkům známy. Systematická substituce jedné nebo více aminokyselin kanonickou sekvencí D-aminokyselin stejného typu (tj. např. D-lysin místo L-lysinu) se může využít k přípravě stabilnějších peptidů. Kromě toho "nepřirozené" peptidy obsahující kanonickou sekvenci nebo v podstatě identickou variaci mohou být připraveny metodami, které jsou odborníkům známy (viz např. Rizo a Gierasch *Ann. Rev. Biochem.* 61:387 (1992)), např. přidáním vnitřních cysteinových zbytků schopných tvořit intramolekulární disulfidické můstky, které cyklizují peptid.

Termíny "protilátka" nebo "protilátkový peptid" se týkají intaktní protilátky nebo jejího vazebného fragmentu, který kompetuje s intaktní protilátkou o specifickou vazbu. Vazebné fragmenty se připravují technikami rekombinantní DNA nebo enzymatickým nebo chemickým štěpením intaktních protilátek. K vazebným fragmentům patří fragmenty Fab, Fab',  $F(ab')_2$ , Fv a jednořetězcové protilátky. Protilátky jiné než "bispecifické" nebo "bifunkční" jsou takové, které mají všechna svá vazebná místa identická. Protilátka podstatně inhibuje adhezi receptoru na "protireceptor", když přístup protilátky snižuje množství receptoru vázaného na "protireceptor" alespoň o 20 %, 40 %, 60 % nebo 80 %, obvykle alespoň o více než 85 % (měřeno kompetitivním vazebným testem *in vitro*).

Termín "epitop" označuje jakoukoliv proteinovou determinantu schopnou specificky se vázat na imunoglobulin nebo receptor T-buňky. Epitopové determinanty jsou obvykle tvořeny chemicky aktivním povrchovým seskupením molekul jako jsou aminokyseliny nebo cukerné postranní řetězce a obvykle mají specifické trojrozměrné strukturní vlastnosti a také specifické vlastnosti pokud jde o náboj. Protilátka se specificky váže na antigen, když disociační konstanta je menší nebo rovna  $1\ \mu\text{M}$ , výhodně menší nebo rovna  $100\ \text{nM}$  a nejvýhodněji je menší nebo rovna  $10\ \text{nM}$ .

Termín "činidlo" nebo "agens" označuje v přihlášce chemickou sloučeninu, směs chemických sloučenin, biologickou makromolekulu nebo extrakt připravený z biologických materiálů.

Termín "značka" a/nebo "značený" v popisu vynálezu znamená inkorporaci detekovatelného markeru, tj. např. vložení radioaktivně značené aminokyseliny nebo navázání biotinylových skupin k polypeptidu, které pak mohou být detekovány značeným avidinem (tj. straptavidin obsahující fluorescenční marker nebo enzymatickou aktivitu, které mohou být detekovány optickými nebo kolorimetrickými metodami. Mohou být použity různé metody značení polypeptidů a glykoproteinů, které jsou odborníkům známy. K příkladům značek pro polypeptidy patří, aniž by výčet byl omezující, následující: radioisotopy nebo radionuklidy (např.  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ), fluorescenční značky (např. FITC, rhodamin, lanthanidfosfory), enzymatické značky (např. křenuvá peroxidáza,  $\beta$ -galaktosidáza, luciferáza, alkalická fosfatáza), chemiluminiscenční značky, biotinylové skupiny, predeterminované polypeptidové epitopy rozpoznávané sekundární reportérovou molekulou (např. párové sekvence leucinového zipu, vazebná místa pro sekundární protilátku, domény vázající kov, epitopové značky). V některých provedeních vynálezu jsou značky navázány prostřednictvím

oddělovacího ramínka (spaceru) různé délky, aby se redukovaly potenciální sterické zábrany.

Termíny "farmaceutické činidlo" nebo "farmaceutický přípravek" nebo "léčivo" se v popisu vynálezu užívají k označení chemických sloučenin, které jsou schopné vyvolat požadovaný terapeutický účinek, pokud jsou správně podávány pacientovi. Další chemické termíny jsou v předkládané přihlášce užívány ve smyslu, který je obvyklý a odborníkům známý, např. jak je uvedeno ve slovníku The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)).

Termín "antineoplázické činidlo" označuje činidlo, které má takové funkční vlastnosti, že inhibuje vývoj nebo progresi neoplázií u člověka, zejména maligních (rakovinných) lézí, jako je např. karcinom, sarkom, lymfom nebo leukémie. Častou vlastností antineoplázického činidla je inhibice metastáz.

"V podstatě čistý" znamená v předkládané přihlášce znamená, že předmětný druh je převládající přítomný druh (tj. na molární úrovni je hojnější než jakýkoliv jiný druh přítomný ve sloučenině), výhodně "v podstatě čistá" frakce je přípravek, kde předmětný druh je zastoupen alespoň z 50 % (na molárním základě) mezi všemi přítomnými makromolekulami. Obecně v podstatě čistý přípravek obsahuje více než 80 % všech druhů makromolekul přítomných v přípravku, výhodněji více než 85 %, 90 %, 95 % a 99 %. Nejvýhodněji je předmětný druh purifikován do nezbytné homogenity (konvenčními metodami nelze detekovat kontaminující druhy molekul), přičemž přípravek je v podstatě tvořen jediným druhem makromolekuly.

#### Struktura protilátky

Základní strukturní jednotka protilátky je, jak je známo, tvořena tetramerem. Každý tetramer je složen ze dvou identických dvojic polypeptidových řetězců, přičemž každý pár obsahuje jeden "lehký" (přibližně 25 kDa) a jeden "těžký"

(přibližně 50 až 70 kDa) řetězec. Amino-koncová část každého řetězce obsahuje variabilní úsek složený přibližně ze 100 až 110 nebo i více aminokyselin, primárně zodpovědný za rozpoznání antigenu. Karboxy-koncová část každého řetězce definuje konstantní úsek primárně zodpovědný za efektorové funkce. Lidské lehké řetězce jsou klasifikovány jako kap a lambda lehké řetězce. Lidské těžké řetězce jsou klasifikovány jako  $\mu$ , delta, gama, alfa a epsilon a definují isotyp protilátky označovaný jako IgM, IgD, IgG, IgA, a IgE, v uvedeném pořadí. Uvnitř těžkého a lehkého řetězce jsou variabilní a konstantní úsek spojeny úsekem "J" velikosti 12 nebo více aminokyselin, přičemž těžký řetězec obsahuje navíc úsek "D" velikosti 10 a více aminokyselin (pro obecný přehled viz publikace *Fundamental Immunology* Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)), která je celá zahrnuta formou odkazu. Variabilní úseky každé dvojice těžký/lehký řetězec vytvářejí vazebné místo protilátky.

Takže intaktní IgG má dvě vazebná místa. Až na bifunkční nebo bispecifické protilátky, tato vazebná místa jsou shodná.

Všechny řetězce mají stejnou obecnou strukturu relativně konzervativního úseku kostry (FR) spojeného třemi hypervariabilními úseky, které se nazývají úseky determinující komplementaritu, zkráceně CDR. úseky CDR ze dvou řetězců z každého páru jsou spojeny úsekem kostry, což umožňuje vazbu na specifický epitop. Ve směru od N-konce k C-konci, těžký a lehký řetězec obsahují domény FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 and FR4. Přiřazení aminokyselin ke každé doméně je v souladu s definicí podle Kabata: *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), nebo publikacemi Chothia & Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987), Chothia et al. *Nature* 342:878-883 (1989).

Bispecifická nebo bifunkční protilátka je umělá hybridní protilátka obsahující dva různé páry těžký/lehký

řetězec a dvě odlišná vazebná místa. Bispecifické protilátky mohou být připraveny řadou metod, např. fúzí hybridomů nebo spojením fragmentů Fab' (viz Songsivilai & Lachmann *Clin. Exp. Immunol.* 79: 315-321 (1990), Kostelny et al. *J. Immunol.* 148:1547-1553 (1992)). Kromě toho bispecifické protilátky mohou být tvořeny jako tzv. "diabodies" (Holliger et al. "'Diabodies': small bivalent and bispecific antibody fragments" *PNAS USA* 90:6444-6448 (1993)) nebo "Janusiny" (Traunecker et al. "Bispecific single chain molecules (Janusins) target cytotoxic lymphocytes on HIV infected cells" *EMBO J* 10:3655-3659 (1991), Traunecker et al. "Janusin: new molecular design for bispecific reagents" *Int J Cancer Suppl* 7:51-52 (1992)). Produkce bispecifických protilátek je proces relativně náročný na práci ve srovnání s produkcí konvenčních protilátek a výtěžky i stupeň čistoty, kterých se dosahuje, jsou obvykle nižší pro bispecifické protilátky. Bispecifické protilátky neexistují ve formě fragmentů majících jedno vazebné místo (jako jsou např. fragmenty Fab, Fab' a Fv).

#### Lidské protilátky a humanizace protilátek

Při použití lidských protilátek nedochází k některým problémům, které jsou spojeny s protilátkami, které obsahují variabilní a/nebo konstantní úseky z protilátek myši nebo potkana. Přítomnost proteinů pocházejících z myši nebo potkana vede k tomu, že se zvyšuje clearance a protilátka může vyvolat imunitní reakci u pacienta. Aby se zabránilo užívání protilátek pocházejících z myši nebo potkana, bylo navrženo vyvinout humanizované protilátky nebo připravit plně lidské protilátky tím, že se vnesou funkce lidských protilátek do hlodavce, který pak bude produkovat protilátky mající plně lidské sekvence.

### Lidské protilátky

Schopnost klonování a rekonstrukce lidských lokusů velikosti megabází v YAC (umělých kvasinkových chromozómech a jejich vnesení do myších zárodečných buněk poskytují velmi účinné metody ke zjištění funkčních komponent velmi velkých nebo jen hrubě zmapovaných lokusů a k vytvoření užitečných modelů lidských nemocí. Kromě toho užití takové technologie k nahrazení myších lokusů jejich lidskými ekvivalenty poskytuje jedinečné informace o expresi a regulaci produktů lidských genů v průběhu vývoje, jejich komunikaci s jinými systémy a jejich účast v indukci a rozvoj nemoci.

Důležitou praktickou aplikací takové strategie je "humanizace" myšího humorálního imunitního systému. Vnesení lidských imunoglobulinových (Ig) lokusů do myši, jejíž endogenní Ig geny byly inaktivovány, nabízí možnost zkoumat mechanismus programované exprese a sestavování protilátek a také jejich roli ve vývoji B lymfocytů. Kromě toho tato strategie poskytuje ideální zdroj pro produkci monoklonálních plně lidských protilátek jakožto významný milník na cestě ke splnění příslibu protilátkových terapií lidských nemocí. Očekává se, že plně lidské protilátky minimalizují imunitní a alergické reakce, které jsou vlastní myším protilátkám nebo protilátkám z nich derivatizovaných, a tudíž zvýší bezpečnost a účinnost podávání protilátek. Podávání plně lidských protilátek bude zásadně výhodné pro léčení chronických a rekurentních nemocí, jako jsou zánětlivá a autoimunitní onemocnění a rakovina, kdy je třeba opakované podávání protilátek.

Jeden z přístupů k dosažení tohoto cíle je metodami genového inženýrství upravit myší kmeny deficientní v tvorbě protilátek pomocí velkých fragmentů lidských Ig lokusů s očekáváním, že takto modifikované myši budou tvořit velký repertoár lidských protilátek aniž by tvořily myší protilátky. Velké fragmenty lidské Ig zachovají velkou

genovou diverzitu a také správnou regulaci tvorby a exprese protilátek. Vzhledem k využití mechanismů myšního organismu pro diverzifikaci a selekci protilátek a nepřítomnosti imunologické tolerance k lidským proteinům, reprodukováný repertoár lidských protilátek v těchto myších kmenech by mělo vést k vysokoafinitním protilátkám proti jakémukoliv požadovanému antigenu, včetně lidských antigenů. Užitím technologie hybridomů mohou být snadno připravovány a selektovány antigenně specifické monoklonální protilátky.

Tato obecná strategie byla poprvé demonstrována ve spojení s vytvořením prvních kmenů myší XenoMouse™, jak bylo publikováno v r. 1994 (viz Green et al. *Nature Genetics* 7:13-21 (1994)). Kmeny XenoMouse™ byly geneticky manipulovány pomocí umělých kvasinkových chromozómů (YAC) obsahujících fragmenty velikosti 245 a 190 kb se zárodečnou konfigurací lokusů pro lidský těžký řetězce lidský lehký řetězec kapa, obsahující jádro sekvencí konstantního a variabilního úseku. YAC obsahující lidské Ig se ukázaly jako kompatibilní s myším systémem jak pro nové uspořádání tak expresi protilátek a byly vhodné pro substituci inaktivovaných myších Ig genů. To bylo prokázáno jejich schopností indukovat vývoj B-lymfocytů, vytvářet dospělý repertoár plně lidských protilátek a vytvářet antigenně specifické lidské mní protilátky. Tyto výsledky také vedly k předpokladu, že vnesení velkých částí lidských Ig lokusů obsahujících velký počet V genů, další regulační elementy a lidské konstantní úseky, by mohlo v podstatě opakovat plný repertoár, který je charakteristický pro lidskou imunitní humorální reakci na infekci a imunizaci. Práce Greena et al. byla nedávno rozšířena o vnesení více než 80 % repertoáru lidských protilátek prostřednictvím fragmentů YAC velikosti megabází obsahujících zárodečnou konfiguraci lokusů pro lidský těžký řetězec a lidský lehký řetězec kapa do myší XenoMouse™ (viz např. Mendez et al. *Nature Genetics* 15:146-156 (1997), Green a Jakobovits *J. Exp. Med.* 188:483-

495 (1998), patentová přihláška U.S. Serial No. 08/759,620, podaná 3.12.1996, vložená formou odkazu).

Tento experimentální přístup byl dále diskutován a popsán v patentové přihlášce U.S. 07/466,008, podané 12.1.1990, 07/610,515, podané 8.11.1990, 07/919,297, podané 24.7.1992, 07/922,649, podané 30.7.1992, 08/031,801, podané 15.3.1993, 08/112,848, podané 27.8.1993, 08/234,145, podané 28.4.1994, 08/376,279, podané 20.1.1995, 08/430, 938, podané 27.4.1995, 08/464,584, podané 5.6.1995, 08/464,582, podané 5.6.1995, 08/463,191, podané 5.6.1995, 08/462,837, podané 5.6.1995, 08/486,853, podané 5.6.1995, 08/486,857, podané 5.6.1995, 08/486,859, podané 5.6.1995, 08/462,513, podané 5.6.1995, 08/1724,752, podané 2.10. 1996, a 08/759,620, podané 3.12.1996. Viz také publikace Mendez et al. *Nature Genetics* 15:146-156 (1997) a Green a Jakobovits *J. Exp. Med.* 188:483-495 (1998). Viz dále také Evropský patent EP 0 463 151 B 1, udělení zveřejněno 12.6. 1996, mezinárodní patentová přihláška č. WO94/02602, publikovaná 3.2.1994, mezinárodní patentová přihláška č. WO 96/34096, publikovaná 31.10.1996, a mezinárodní patentová přihláška č. WO 98/24893, publikovaná 11.6.1998. Vynálezy popsané ve výše citovaných patentech, přihláškách a publikacích jsou v úplnosti formou odkazu zahrnuty v předkládané přihlášce.

Alternativní přístup použitý dalšími, např. firmou GenPharm International, Inc., využil tzv. "minilokusů". Při této metodě je exogenní Ig lokus napodoben vložením kousků (jednotlivých genů) z Ig lokusů. Takže se vytvoří konstrukt, obsahující jeden nebo více  $V_H$  genů, jeden nebo více  $D_H$  genů, jeden nebo více  $J_H$  genů, konstantní úsek  $\mu$  a druhý konstantní úsek (výhodně konstantní úsek  $\gamma$ ), vhodný pro inzerci do zvířete. Takové metody byly popsány v patentu U.S. č. 5,545,807, Surani et al., a U.S. č. 5,545,806, 5,625,825, 5,625,126, 5,633,425, 5,661,016, 5,770,429, 5,789,650, a 5,814,318, všechny Lonberg a Kay, a U.S. č. 5,591,669,

Krimpenfort a Berns, U.S. č. 5,612,205, 5,721,367 a 5,789,215, Berns et al., a U.S. č. 5,643,763 Choi a Dunn, a U.S. patentové přihlášky GenPharm International č. 07/574,748, podaná 29.8.1990, č. 07/575,962, podaná 31.8.1990, č. 07/810,279, podaná 17.12. 1991, 07/853,408, 18.3.1992, č. 07/904,068, podaná 23.6.1992, č. 07/990,860, podaná 16.12.1992, č. 08/053,131, podaná 26.4.1993, č. 08/096,762, podaná 22.6.1993, č. 08/155,301, podaná 18.11.1993, č. 08/161,739, podaná 3.12.1993, č. 08/165,699, podaná 10.12.1993, č. 08/209,741, podaná 9.3.1994, jejichž úplné popisy jsou zahrnuty formou odkazu. Viz také Evropský patent č.0 546 073 B 1, mezinárodní patentové přihlášky WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852, a WO 98/24884, jejichž úplné popisy jsou také zahrnuty formou odkazu. Viz také publikace Taylor et al., 1992, Chen et al., 1993, Tuailon et al., 1993, Choi et al., 1993, Lonberg et al., (1994), Taylor et al., (1994), and Tuailon et al., (1995) a Fishwild et al., (1996), které jsou také plně zahrnuty formou odkazu.

Původci Surani et al., ve výše citovaném vynálezu přihlašovatele Medical Research Counsel ("MRC"), připravily transgenní myši mající Ig lokus metodou minilokusů. Původci vynálezů firmy GenPharm International Lonberg a Kay navrhli inaktivaci endogenního myšího Ig lokusu spojenou s podstatnou duplikací práce Surani et al.

Výhodou metody minilokusů je především rychlost, s jakou mohou být konstrukty obsahující úseky Ig lokusů vytvářeny a vkládány do zvířat. Avšak současně nevýhodou metody minilokusů je to, že vnesením malého počtu V, D, a J genů se vnese nedostatečná diverzita. A skutečně publikované práce potvrzují tyto obavy. Vývoj B-lymfocytů a tvorba protilátek u zvířat připravených metodou minilokusů jsou nedostatečné. Tudíž výzkum, který byl základem pro předkládaný vynález, byl

zaměřen na vnesení velkých úseků Ig lokusů, aby bylo dosaženo velké diverzity a aby byl rekonstituován celý imunitní repertoár.

Lidská anti-myší protilátková reakce (HAMA) vedla průmysl k přípravě chimérických nebo jiným způsobem humanizovaných protilátek. Jelikož chimérické protilátky mají lidský konstantní úsek a myší variabilní úsek, očekává se, že bude pozorována určitá lidská antichimérická protilátková reakce (HACA), zejména při chronickém nebo mnohodávkovém použití protilátky.

Je tudíž potřebné poskytnout plně lidské protilátky proti CTLA-4, aby bylo možné odstranit obavy a také ovlivnit HAMA nebo HACA reakce.

#### Humanizace protilátek a metody displeje

Jak bylo již diskutováno výše ve spojitosti s tvorbou lidských protilátek, je výhodné připravovat protilátky se sníženou imunogenicitou. Toho lze do jisté míry dosáhnout metodami humanizace a displeje užitím vhodných knihoven. Je známo, že myší protilátky nebo protilátky z jiných druhů mohou být humanizovány nebo primatizovány metodami, které jsou v oboru dobře známy, viz např. Winter a Harris *Immunol Today* 14:43-46 (1993) a Wright et al. *Crit. Reviews in Immunol.* 12:125-168 (1992). Požadované protilátky lze připravit metodami rekombinantní DNA substitucí domén CH1, CH2, CH3, kloubové domény a/nebo domény kostry odpovídajícími lidskými doménami (viz WO 92/02190 a U.S. patenty č. 5,530,101, 5,585,089, 5,693,761, 5,693,792, 5,714,350, a 5,777,085). Také použití Ig cDNA pro konstrukci chimérických Ig genů je odborníkům známo (viz např. Liu et al. *P.N.A.S.* 84:3439 (1987) a *J. Immunol.* 139:3521 (1987)). mRNA se izoluje z hybridomů nebo jiných buněk produkujících protilátku a užije se pro přípravu cDNA. Požadovaná cDNA se pak amplifikuje např. polymerázovou řetězovou reakcí (PCR)

užitím specifických primerů (viz U.S. patenty č. 4,683,195 a 4,683,202). Alternativně se připraví knihovna a provede se její screening, čímž se izoluje požadovaná sekvence. DNA sekvence kódující variabilní úsek protilátky se pak fúzuje se sekvencí lidskou konstantní sekvencí. Sekvence lidských konstantních úseků lze najít v publikaci Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, N.I.H. publication no. 91-3242. Lidské geny C úseků jsou okamžitě k dispozici ze známých klonů. Výběr isotypů se řídí požadovanými efektorovými funkcemi, jako je např. fixace komplementu, nebo aktivita v buněčné cytotoxicitě závislé na protilátkách. Výhodné isotypy jsou IgG1, IgG2, IgG3 a IgG4. Zvláště výhodné isotypy protilátek podle předkládaného vynálezu jsou IgG2 a IgG4. Mohou být užity oba typy konstantních úseků lidského lehkého řetězce kapa i lambda. Chimérické humanizované protilátky se pak exprimují obvyklým způsobem.

Protilátkové fragmenty jako např. Fv, F(ab')<sub>2</sub> a Fab se připraví štěpením intaktních proteinů, např. proteázami nebo chemicky. Alternativně se připraví zkrácené geny. Tak např. chimérický gen kódující část fragmentu F(ab')<sub>2</sub> by zahrnoval sekvence DNA kódující doménu CH1 a kloubový úsek H řetězce, pak by následoval translační stop-kodon, aby vznikla zkrácená molekula.

V jedné metodě se užijí kanonické sekvence kódující J úseky těžkého a lehkého řetězce pro návrh sekvencí oligonukleotidových primerů, které se užijí pro vnesení vhodných restričních míst do J úseků pro následné spojení segmentů V úseku se segmenty lidského C úseku. cDNA C úseku může být modifikována místně cílenou mutagenezí, aby se umístila restriční místa do analogických pozic v lidské sekvenci.

K expresním vektorům patří plazmidy, retroviry, kosmidy, YAC, episomy odvozené z EBV, atd. Vhodným vektorem je takový,

který kóduje funkčně kompletní CH nebo CL sekvenci lidského imunoglobulinu, s vhodně vloženými restričními místy, takže jakákoliv sekvence VH nebo VL může být snadno vložena a exprimována. V takových vektorech dochází k sestřihu zpravidla mezi donorovým sestřihovým místem ve vloženém J úseku a akceptorovým sestřihovým místem, které předchází lidský C úsek, a také v sestřihových úsecích, které se vyskytují v lidských CH exonech. Polyadenylace a terminace transkripce se uskutečňuje v přirozených chromozomových místech směrem "downstream" od kódujícího úseku. Výsledná chimérická protilátka se může spojit s jakýmkoliv silným promotorem, včetně promotorů jako je retrovirový LTR, např. časný promotor SV-40 (Okayama et al. *Mol. Cell. Bio.* 3:280 (1983)), LTR viru Rousova sarkomu (Gorman et al. *P.N.A.S.* 79:6777 (1982)), a LTR Moloneyho myšího leukemického viru (Grosschedl et al. *Cell* 41:885 (1985)), nativní promotory Ig apod.

Kromě toho lidské protilátky nebo protilátky z jiných biologických druhů mohou být připraveny metodami typu displeje, např. displeje na fágu, retroviru, ribozomu apod., což jsou metody odborníkovi známé, a výsledné molekuly se podrobí dodatečné maturaci (zrání), jako je např. afinitní maturace, které jsou v oboru známy (viz např. Wright a Harris, viz výše, Hanes a Plutchau *PNAS USA* 94:4937-4942 (1997) (ribosomální display), Parmley a Smith *Gene* 73:305-318 (1988) (fágový displej), Scott *TIBS* 17:241-245 (1992), Cwirla et al. *PNAS USA* 87:6378-6382 (1990), Russel et al. *Nucl. Acids Research* 21:1081-1085 (1993), Hoganboom et al. *Immunol. Reviews* 130:43-68 (1992), Chiswell a McCafferty *TIBTECH* 10:80-84 (1992), a U.S. Patent č. 5,733,743.

Pokud se uvedené metody displeje užijí k produkci protilátek, které nejsou lidské, takové protilátky se pak mohou humanizovat, jak bylo již výše popsáno.

Užitím těchto postupů lze připravit protilátky k buňkám produkujícím CTLA-4, samotnému CTLA-4, formám CTLA-4 epitopů nebo peptidů a jejich expresním knihovnám (viz např. U.S. Patent č. 5,703,057), které se pak mohou podrobit screeningu na aktivity výše popsané.

Další kritéria pro protilátková léčiva

Obecně řečeno není žádoucí usmrtit buňky exprimující CTLA-4. Spíše je potřebné jednoduše inhibovat vazbu CTLA-4 s ligandy, aby se zmírnila inaktivace T-lymfocytů. Jeden z hlavních mechanismů, kterým protilátky usmrcují buňky, je fixace komplemetu a účast na CDC. Konstantní úsek protilátky hraje důležitou roli ve schopnosti protilátky fixovat komplemet a podílet se na CDC. Takže obecně se vybere isotyp protilátky, který buďto umožňuje fixaci komplementu nebo ne. V předkládaném vynálezu není výhodné, jak již bylo zmíněno výše, užít takové protilátky, které vedou k usmrcení buněk. Existují četné isotypy protilátek, které jsou schopné fixovat komplemet a CDC, patří k nim např. následující protilátky: myší IgM, myší IgG2a, myší IgG2b, myší IgG3, lidská IgM, lidská IgG1 a lidská IgG3. nepatří sem však např. isotypy lidské IgG2 a IgG4.

Protilátky, které se připraví, nemusejí mít na počátku zvláštní požadovaný isotyp, ale mohou to být protilátky v podstatě jakéhokoliv isotypu a pak je isotyp "přepnut" užitím metod, které jsou odborníkovi známy. K takovým metodám patří např. metody přímé rekombinace (viz např. U.S. Patent č. 4,816,397), metody buněčné fúze (viz např. U.S. patentová přihláška 08/730,639, podání 11.10.1996).

Při metodě buněčných fúzí se připraví myelomová buněčná linie nebo jiná linie, která obsahuje těžký řetězec požadovaného isotypu a další myelomová buněčná linie nebo jiná linie, která obsahuje lehký řetězec. Tyto buňky jsou pak

fúzovány a výsledná buněčná linie exprimující intaktní protilátku je izolována.

Jako příklad uvádíme, že většina CTLA-4 protilátek diskutoivaných v předložené přihlášce jsou lidské anti-CTLA-4 IgG2 protilátky. Jelikož tyto protilátky mají požadovanou vazbu k molekule CTLA-4, kterákoliv z nich může být snadno isotypově "přepnuta" a vytvořit např. lidský isotyp IgG4, přičemž si uchová stejný variabilní úsek (který definuje protilátkovou specificitu a také z části afinitu).

Tudíž se připraví kandidátní protilátky, které splňují "strukturní" požadavky jak byly diskutovány výše, a které jsou vybaveny alespoň některými dalšími "funkčními" vlastnostmi nutnými pro přepnutí isotypu.

#### Návrhy a tvorba dalších léčiv

Na základě aktivity protilátek k CTLA-4 popsaných a charakterizovaných zde lze v souladu s vynálezem snadno navrhovat další léčiva, včetně dalších protilátek, antagonistů nebo chemických sloučenin jiných než jsou protilátky. K takovým formám léčiv patří např. protilátky mající podobnou vazebnou aktivitu nebo funkci, pokročilá protilátkaová léčiva, jako jsou např. bispecifické protilátky, imunotoxiny a radioaktivně značená léčiva, tvorba peptidových léčiv, genové terapie, "intrabodies", antisense léčiva a malé molekuly. Kromě toho, jak již bylo diskutováno výše, efektorové funkce protilátek podle vynálezu mohou být změněny "přepnutím" isotypu na IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgA nebo IgM pro různá terapeutická využití.

Ve spojení s přípravou pokročilých protilátkových léčiv, kde je požadovanou vlastností fixace komplementu, je možné závisost usmrcení buněk na komplementu obejít, tím že se užijí bispecifické protilátky, imunotoxiny nebo radioaktivní značky.

Mohou být připraveny takové bispecifické protilátky, které obsahují (I) dvě protilátky, kdy jedna má specifitu k CTLA-4 a druhá protilátka má specifitu k druhé molekule, které jsou společně konjugovány, (II) jednu protilátku, která má jeden řetězec specifický pro CTLA-4 a druhý řetězec specifický pro druhou molekulu, nebo (III) jednořetězcovou protilátku, která má specifitu k CTLA-4 a k druhé molekule. Takové bispecifické protilátky mohou být připraveny metodami, které jsou odborníkům známy, pro (I) a (II) viz např. Fanger et al. *Immunol Methods* 4:72-81 (1994) a Wright a Harris, cit. výše, pro (III) viz např. Traunecker et al. *Int. J. Cancer (Suppl.)* 7:51-52 (1992).

Kromě toho mohou být připraveny i tzv. "kappabodies" (Ill et al. "Design and construction of a hybrid immunoglobulin domain with properties of both heavy and light chain variable regions" *Protein Eng* 10:949-57 (1997)), "minibodies" (Martin et al. "The affinity-selection of a minibody polypeptide inhibitor of human interleukin-6" *EMBO J* 13:5303-9 (1994)), "diabodies" (Holliger et al. "'Diabodies': small bivalent and bispecific antibody fragments" *PNAS USA* 90:6444-6448 (1993)), nebo "Janusiny" (Traunecker et al. "Bispecific single chain molecules (Janusins) target cytotoxic lymphocytes on HIV infected cells" *EMBO J* 10:3655-3659 (1991) a Traunecker et al. "Janusin: new molecular design for bispecific reagents" *Int J Cancer Suppl* 7:51-52 (1992)).

Pokud jde o imunotoxiny, protilátky mohou být modifikovány tak, aby působily jako imunotoxiny, a sice metodami, které jsou odborníkům známy. Viz např. Vitetta *Immunol Today* 14:252 (1993) a také U.S. Patent č. 5,194,594.

Pokud jde o přípravu radioaktivně značených protilátek, takto modifikované protilátky lze snadno připravit metodami, které jsou odborníkům známy. Viz např. Junghans et al., *Cancer Chemotherapy and Biotherapy* 655-686 (2d edition,

Chafner and Longo, eds., Lippincott Raven (1996)), U.S. Patenty č. 4,681,581, 4,735,210, 5,101,827, 5,102,990 (RE 35,500), 5,648,471 a 5,697,902. Každý z imunotoxinů nebo radiativně značených molekul pravděpodobně povede k usmrcení buněk exprimujících CTLA-4, zejména těch buněk, kde protilátky podle vynálezu jsou účinné.

Pokud jde o přípravu peptidových léčiv, užitím strukturních informací týkajících se CTLA-4 a protilátek k CTLA-4, např. protilátek podle vynálezu (jak bude ještě popsáno dále ve spojení s malými molekulami), nebo screeningem peptidových knihoven, je možné připravit terapeutické peptidy namířené proti CTLA-4. Návrh a screening peptidových léčiv byly např. popsány v publikacích Houghten et al. *Biotechniques* 13:412-421 (1992), Houghten *PNAS USA* 82:5131-5135 (1985), Pinalla et al. *Biotechniques* 13:901-905 (1992), Blake a Litzi-Davis *BioConjugate Chem.* 3:510-513 (1992). Imunotoxiny a radioaktivně značené protilátky mohou být připraveny podobným způsobem, jako peptidové části, jak bylo diskutováno výše pro protilátky.

Důležité informace týkající se vazby protilátky a antigenu mohou být získány experimenty s fágovou expozicí (fágový displej). Takové experimenty se obecně provádějí "rýžováním" fágové knihovny exprimující náhodné peptidy na vazbu s protilátkou podle vynálezu, a pak určením, zda peptid, který se váže, může být izolován. Pokud je pokus úspěšný, z peptidu, který se váže, je možné získat určité informace o epitopu.

Obecně fágové knihovny exprimující náhodné peptidy mohou být koupeny od firmy New England Biolabs (knihovny 7-merů a 12-merů, souprava Ph.D.-7 Peptide 7-mer Library Kit a Ph.D.-12 Peptid představují valnou většinu, pokud ne všechny, z  $20^7 = 1,28 \times 10^9$  sekvencí 7-merů. Knihovna 12-merů představuje diverzitu přibližně  $1,9 \times 10^9$  nezávislých klonů, které představují jen velmi malou část možných  $20^{12} = 4.1 \times 10^{15}$  sekvencí 12-merů.

Každá z knihoven 7-merů a 12-merů byla "rýžována" nebo "screenována" podle návodu výrobce, kde destičky byly potaženy protilátkou k zachycení vhodné protilátky (např. kozí anti-lidský IgG Fc pro IgG protilátku) a pak opláchnuty. Navázaný fág byl eluován 0,2 M glycín-HCl, pH 2,2. Po třech opakováních cyklů selekce/amplifikace při konstantní stringenci (0,5% Tween) bylo možné pomocí sekvencování DNA charakterizovat klony z knihovny, které reagovaly s jednou nebo více protilátkami. reaktivita peptidů se může určit pomocí ELISA. Pro další diskusi o epitopové analýze peptidů viz např. také Scott, J.K. a Smith, G.P. *Science* 249:386-390 (1990); Cwirla et al. *PNAS USA* 87:6378-6382 (1990); Felici et al. *J. Mol. Biol.* 222:301-310 (1991), and Kuwabara et al. *Nature Biotechnology* 15:74-78 (1997).

Návrh a příprava genových léčiv a antisense léčiv konvenčními metodami jsou také usnadněny prostřednictvím předkládaného vynálezu. Tyto formy léčiv se mohou užít pro modulaci funkce CTLA-4. V této souvislosti protilátky podle vynálezu usandňují návrh a použití funkčních testů. Návrh a příprava antisense léčiv byly podrobně diskutovány např. v mezinárodní patentové přihlášce WO 94/29444. Návrhy a strategie pro genovou terapii jsou odborníkům známy. Avšak ve specifickém případě použití metod užívajících "intrabodies" může být zvláště výhodné. Viz např. Chen et al. *Human Gene Therapy* 5:595-601 (1994) a Marasco *Gene Therapy* 4:11-15 (1997). Obecné návrhy a úvahy týkající se léčiv vhodných pro genové terapie lze najít např. Také mezinárodní patentové přihlášce WO 97/38137. Genetické materiály kódující protilátky podle vynálezu (jako např. 4.1.1, 4.8.1 nebo 6.1.1, a další) se vloží do vhodného expresního systému (ve formě viru, atenuovaného viru, nevirové formě, "nahé" formě nebo jiné) a podají se příjemci, a pak se protilátky tvoří *in vivo* v příjemci/hostiteli.

Léčiva zvaná malé molekuly lze také připravovat užitím předkládaného vynálezu. Lze navrhnout taková léčiva, která budou modulovat aktivitu CTLA-4. Znalosti získané ze struktury CTLA-4 a interakce s jinými molekulami podle vynálezu, např. CD28, B7, B7-1, B7-2, a dalšími, se mohou využít k racionálnímu návrhu dalších forem léčiv. V tomto ohledu mohou být využity metody racionálních návrhů léčiv jako je rentgenová krystalografie, počítačové molekulové modelování (CAMP), kvantitativní nebo kvalitativní analýza vztahu struktura-aktivita (QSAR) a podobné metody, k dalšímu upřesnění cílů při objevování nových léčiv. Metody racionálního navrhování dovolují predikovat proteinové nebo syntetické struktury, které reagují s molekulou nebo její specifickou formou, a které mohou být užity k modifikaci nebo modulaci aktivity CTLA-4. Takové struktury se mohou syntetizovat chemicky nebo exprimovat v biologických systémech. Tyto metody byly v přehledu uvedeny např. v Capsey et al. *Genetically Engineered Human Therapeutic Drugs* (Stockton Press, NY (1988)). A skutečně racionální návrh molekul (peptidů, peptidomimetic, malých molekul apod.) založený na známém, nebo alespoň nastíněném, vztahu mezi strukturou a aktivitou s jinými molekulami (jako jsou např. protilátky podle vynálezu), se nyní obecně stává rutinním postupem. Viz např. Fry et al. "Specific, irreversible inactivation of the epidermal growth factor receptor and erbB2, by a new class of tyrosine kinase inhibitor" *Proc Natl Acad Sci USA* 95:12022-7 (1998); Hoffman et al. "A model of Cdc25 phosphatase catalytic domain and Cdk-interaction surface based on the presence of a rhodanese homology domain" *J Mol Biol* 282:195-208 (1998); Ginalski et al. "Modelling of active forms of protein kinases: p38--a case study" *Acta Biochim Pol* 44:557-64 (1997); Jouko et al. "Identification of csk tyrosine phosphorylation sites and a tyrosine residue important for kinase domain structure" *Biochem J* 322:927-35

(1997); Singh et al. "Structure-based design of a potent, selective, and irreversible inhibitor of the catalytic domain of the erbB receptor subfamily of protein tyrosine kinases" J Med Chem 40:1130-5 (1997); Mandel et al. "ABGEN: a knowledge-based automated approach for antibody structure modeling" Nat Biotechnol 14:323-8 (1996); Monfardini et al. "Rational design analysis, and potential utility of GM-CSF antagonists" Proc Assoc Am Physicians 108:420-31 (1996); Furet et al. "Modelling study of protein kinase inhibitors: binding mode of staurosporine and origin of the selectivity of CGP 52411" J Comput Aided Mol Des 9:465-72 (1995).

Jako další možnost se mohou připravit a syntetizovat kombinační knihovny a použít ve screeningových programech, jako jsou např. vysokovýkonné screeningové programy.

#### Formulace léčiv a jejich podávání

Léčiva obsahující sloučeniny podle vynálezu se podávají formulována s vhodnými nosiči, excipienty a dalšími činidly, která jsou součástí farmaceutického přípravku, aby se zlepšil přenos, příjem, tolerance apod. Existují mnohé vhodné lékové formy, jak je známo odborníkům v oboru farmaceutické chemie, a jak bylo popsáno např. v publikaci Remington's Pharmaceutical Sciences (15th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA (1975)), zejména kapitola 87: Blaug a Seymour. Takové přípravky obsahují např. prášky, pasty, masti, želé, vosky, oleje, tuky, vesikuly (kationtové nebo aniontové) obsahující tuky (jako je např. Lipofectin™), DNA konjugáty, bezvodé absorpční pasty, emulze typu olej ve vodě nebo typu vody v oleji, emulzní karbovosky (polyethylenglykoly různých molekulových hmotností), polotuhé gely a polotuhé směsi obsahující karbovosky. Kterákoliv výše uvedená směs může být vhodná pro použití vynálezu za předpokladu, že účinná složka přípravku není inaktivována těmito pomocnými látkami pro formulaci přípravku a že přípravek je fyziologicky

kompatibilní a tolerovatelný při daném způsobu podávání. Pro další informace týkající se excipientů a nosičů, které jsou odborníkům ve farmaceutické chemii známy, viz také Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" *PDA J Pharm Sci Technol.* 52:238-311 (1998).

#### Příprava protilátek

Protilátky podle předkládaného vynálezu se výhodně připravují prostřednictvím transgenních myší, které obsahují vloženou podstatnou část lidského genomu produkujícího protilátky a naopak jsou deficientní v produkci endogenních myších protilátek. Takové myši jsou pak schopné produkovat molekuly lidského imunoglobulinu a protilátek a jsou deficientní v produkci myších imunoglobulinových molekul a protilátek. Postupy vhodné k dosažení tohoto cíle byly popsány v patentech, patentových přihláškách a dalších publikacích, které jsou uvedeny ve stavu techniky. Výhodné provedení transgenních myší a produkce protilátek je popsáno v U.S. patentové přihlášce č. 08/759,620, podané 3.12.1996, a dále také viz Mendez et al. *Nature Genetics* 15:146-156 (1997), což je plně zahrnuto formou odkazu.

Použitím těchto metod byly připraveny plně lidské monoklonální protilátky k celé řadě různých antigenů. Podstata postupu spočívala v tom, že myši linií XenoMouse™ byly imunizovány požadovaným antigenem, z myši, která exprimovala požadované protilátky byly odebrány lymfatické buňky (jako např. B-lymfocyty), fúzovány s buňkami myeloidní linie, čímž se získaly imortalizované hybridomové linie a tyto hybridomové linie se pak podrobily screeningu a selekci, kdy byly identifikovány hybridomové buněčné linie produkující protilátku specifickou k požadovanému antigenu. V předkládaném vynálezu byly tyto metody použity pro přípravu protilátek specifických k CTLA-4. Popisuje se zde proto příprava mnoha hybridomových linií, které produkují

protilátky specifické proti CTLA-4. Dále vynález poskytuje charakteristiky těchto protilátek, včetně analýz nukleotidových a aminokyselinových sekvencí těžkého a lehkého řetězce těchto protilátek.

Protilátky pocházející z výše uvedených hybridomových linií byly označeny 3.1.1, 4.1.1, 4.8.1, 4.10.2, 4.13.1, 4.14.3, 6.1.1, 11.2.1, 11.6.1, 11.7.1, 12.3.1.1 a 12.9.1.1. Každá z těchto protilátek představuje plně lidský buďto IgG2 nebo IgG4 řetězec s lidským lehkým řetězcem kapa. Obecně řečeno protilátky podle vynálezu mají velmi vysokou afinitu, typicky mají hodnoty  $K_d$  od  $10^{-9}$  do  $10^{-11}$ M, když jsou měřeny v pevné nebo kapalně fázi.

Protilátky podle vynálezu mohou být exprimovány i v jiných buňkách či buněčných liniích než jen hybridomových.

Sekvence kódující cDNA nebo genomické klony určitých protilátek mohou být užity pro transformaci buněk vhodného hostitele, kterým je savec nebo organismus jiný než savec. K transformaci lze užít jakoukoliv známou metodu pro vnesení polynukleotidů do hostitelské buňky, včetně metod jako je např. sbalení ("pakážování") polynukleotidu do viru (nebo do virového vektoru a transdukce hostitelské buňky virem (vektorem), nebo transfekcí, jak byly např. popsány v U.S. Patentech č. 4,399,216, 4,912,040, 4,740,461 a 4,959,455 (které jsou zahrnuty formou odkazu). Použitá metody transformace závisí na hostiteli, který má být transformován. Metody pro vnášení heterologních polynukleotidů do savčích buněk jsou odborníkům známy a patří k nim, aniž by však tento výčet byl vyčerpávající, dextranem zprostředkovaná transfekce, precipitace s kalciumfosfátem, transfekce zprostředkovaná polybrenem, fúze protoplastů, elektroporace, bombardování mikročásticemi, enkapsulace polynukleotidu do liposomů, peptidové konjugáty, dendrimery a přímé mikroinjekce DNA do jádra.

Linie savčích buněk vhodných jako hostitelské buňky pro expresi jsou odborníkům dobře známy a patří k nim mnoho imortalizovaných buněčných linií dostupných v Americké sbírce kultur a mikroroganismů (ATCC), jako jsou např. buňky vaječníků Čínksého křečka (CHO), buňky NSO<sub>0</sub>, buňky HeLa, buňky BHK (křeččí fetální ledviny), COS buňky (opičích ledvin), buňky lidského hepatocelulárního karcinomu (např. Hep G2) a celá řada dalších buněčných linií. K vhodným buňkám, které nejsou ze savců, a které mohou být užity pro expresi rekombinantních protilátek patří, avšak výčet tím není omezen, např. bakteriální buňky, kvasinky, houby, hmyz a rostliny. Místně cílená mutageneze protilátkové domény CH2, která eliminuje glykosylaci, je výhodná k tomu, aby se zabránilo změnám v imunogenicitě, farmakokinetice a/nebo efektorových funkcích, které jsou výsledkem glykosylace lišící se od lidského glykosylačního profilu. Metody exprese se vybírají na základě toho, že se stanoví, který systém produkuje nejvyšší expresní hladiny a tvoří protilátky s konstitutivními vazebnými vlastnostmi pro CTLA-4.

Dále exprese protilátek podle vynálezu (nebo jiných sloučenin) v produkčních liniích může být zesílena řadou známých metod. Tak např. expresní systém glutaminsyntetázy a DHFR jsou známé systémy pro zvýšení exprese za jistých podmínek. Buněčné klony s vysokou expresí mohou být identifikovány konvenčními metodami, jako je např. klonování limitního ředění a nebo technika mikrokapky. Systém GS byl podrobně popsán a diskutován ve spojení s Evropskými patenty č. 0 216 846, 0 256 055 a 0 323 997 a evropskou patentovou přihláškou č. 5 89303964.4.

Protilátky podle vynálezu mohou být připraveny také transgenním způsobem, a sice vytvořením transgenního zvířete nebo transgenní rostliny, které je transgenní na požadované sekvenční těžkého a lehkého řetězce imunoglobulinu, a produkcí protilátek v izolovatelné formě. Pokud jde o transgenní

savce, protilátky mohou být produkovány do mléka, ze kterého jsou pak izolovány, a sice u kozy, krávy a jiných savců (viz patenty U.S. č. 5,827,690, 5,756,687, 5,750,172, a 5,741,957.

Protilátky podle předkládaného vynálezu byly analyzovány strukturně i funkčně. Ve spojení se strukturami protilátek byly aminokyselinové sekvence těžkého a lehkého řetězce predikovány na základě cDNA sekvencí získaných pomocí RT-PCR hybridomů. Viz příklady 3 a 4 a obrázky 1 až 8. Sekvencování A-konců protilátek bylo také provedeno pro potvrzení výsledků diskutovaných v příkladech 3 a 4. Viz také příklad 5 a obr. 9. Kinetické analýzy protilátek byly provedeny ke stanovení jejich afinit, viz příklad 2. Protilátky podle vynálezu (zejména 4.1.1, 4.8.1 a 6.1.1) mají vysoké afinity (4.1.1:  $1,63 \times 10^{10}$  1/M, 4.8.1:  $3,54 \times 10^{10}$  1/M; a 6.1.1:  $7,2 \times 10^9$  1/M). Dále byly protilátky analyzovány izoelektrickým zaostřováním (IEF), redukující gelovou elektroforézou (SDS-PAGE), velikostní vylučovací chromatografií, kapalinovou chromatografií a hmotovou spektroskopií a vhodnocením tvorby protilátek hybridomů. Viz příklad 6 a obr. 10.

Pokud jde o funkční analýzu protilátek podle vynálezu, tyto protilátky se ukázaly být silnými inhibitory CTLA-4 a jeho vazby na ligandy z rodiny molekul B7. Tak např. bylo ukázáno, že protilátky podle vynálezu blokovaly vazbu CTLA-4 jak na B7-1 tak i B7-2. Viz příklad 7. Skutečně, mnoho protilátek podle vynálezu má hodnotu  $IC_{50}$  pro inhibici vazby CTLA-4 na B7-1 nebo B7-2 řádu nanomolů a nižší. kromě toho protilátky podle vynálezu mají vynikající selektivitu pro CTLA-4 ve srovnání např. s CD28, CD44, B7-2 nebo hIgG1. Viz příklad 8. Selektivita je poměr, který odráží stupeň preference vazby molekuly s prvním činidlem ve srovnání s druhým, a případně dalším, činidlem. V předkládaném popisu se termín selektivita týká stupně preference vazby protilátky podle vynálezu k CTLA-4 ve srovnání s vazbou protilátky s jinými molekulami, jako např. CD28, CD44, B7-2 nebo hIgG1.

Hodnoty selektivity protilátek podle vynálezu vyšší než 500:1 jsou běžné. Bylo také ukázáno, že protilátky podle vynálezu indukují nebo zvyšují expresi některých cytokinů (jako např. IL-2 a IFN- $\gamma$ ) v kultuře T lymfocytů a v modelu T lymfoblastů. Viz příklady 9 a 10 a také obrázky 12 až 17. Lze také očekávat, že protilátky podle vynálezu budou inhibovat růst nádorů ve vhodných *in vivo* modelech nádorů. Návrh takových modelů je popsán a diskutován v příkladech 11 a 12.

Výsledky popsané v předkládané přihlášce ukázaly, že protilátky podle vynálezu mají určité výhodné vlastnosti, pro které jsou vhodnější a účinnější než v současnosti užívané protilátky proti CTLA-4.

Zejména protilátky 4.1.1, 4.8.1 a 6.1.1 podle vynálezu mají výhodné vlastnosti. Jejich strukturní charakteristiky, funkce nebo aktivity poskytují měřítko, která usnadňují návrh a selekci dalších protilátek nebo jiných typů molekul, jak již bylo diskutováno výše. K těmto kritériím patří jedno nebo více z následujících:

- schopnost kompetovat o vazbu k CTLA-4 s jednou nebo více protilátkami podle vynálezu,
- podobná vazebná specificita k CTLA-4 jako má jedna nebo více protilátek podle vynálezu,
- vazebná afinita k CTLA-4  $10^{-9}$  nebo vyšší, výhodně  $10^{-10}$  nebo vyšší,
- nereaguje křížově s CTLA-4 nižších savců, jako je např. myš, potkan, králík, výhodně nereaguje s CTLA-4 myši a potkana,
- reaguje křížově s CTLA-4 primátů, výhodně "cynomolgního" makaka (*Macaca fascicularis*) a makaka "rhesus" (*Macaca mullata*),
- selektivita pro CTLA-4 proti CD2B, B7-2, CD44 nebo hIgG1 je alespoň 100:1 nebo vyšší, výhodně 300, 400 nebo 500:1 nebo vyšší,

- IC<sub>50</sub> blokování CTLA-4 vazby na B7-2 je 100 nM nebo nižší, výhodně 5, 4, 3, 2, 1, 0,5 nebo 0,38 nM nebo nižší,
- IC<sub>50</sub> blokování CTLA-4 vazby na B7-1 je 100 nM nebo nižší, výhodně 5, 4, 3, 2, 1, 0,5 nebo 0,50 nM nebo nižší,
- zvyšuje produkci cytokinů v jednom nebo více *in vitro* testech, např.
- zvyšuje produkci IL-2 v testu T lymfoblasty/Raji buňky o 500 pg/ml nebo více, výhodně 750, 1000, 1500, 2000, 3000 nebo 3846 pg/ml,
- zvyšuje produkci IFN- $\gamma$  v testu T lymfoblasty/Raji buňky o 500 pg/ml nebo více, výhodně 750, 1000 nebo 1233 pg/ml nebo více,
- zvyšuje produkci IL-2 v testu hPBMC nebo testu superantigenu celé krve o 500 pg/ml nebo více a výhodně 750, 1000, 1200 nebo 1511 pg/ml nebo více, vyjádřeno jinak produkce IL-2 je zvýšena o 30, 35, 40, 45, 50 procent a více při srovnání s kontrolním testem.

Očekává se, že protilátky podle vynálezu (nebo molekuly na jejich základě navržené nebo syntetizované), mající jednu nebo více z uvedených vlastností, budou mít také podobnou účinnost jako protilátky podle předkládaného vynálezu.

Požadované funkční vlastnosti popsané výše vedou k vazbě na CTLA-4 a inhibici vazby CTLA-4 molekulou (např. protilátkou, protilátkovým fragmentem, peptidem, malou molekulou) podobným způsobem jako se chová protilátka podle vynálezu (tj. vazbou na stejný nebo podobný epitop molekuly CTLA-4).

Molekula podle vynálezu se podává buďto přímo (tj. přímé podávání molekul pacientovi) nebo se může "podávat" nepřímě (tj. např. podáváním peptidu nebo podobné molekuly, která vyvolá imunitní reakci u pacienta, podobně jako vakcína, a tato reakce zahrnuje tvorbu protilátek, které se váží na stejný nebo podobný epitop nebo protilátku nebo její

fragment, které jsou produkovány po podání genetického materiálu, který kóduje takové protilátky nebo jejich fragmenty vázající se stejný nebo podobný epitop). Takže je jasné, že epitop na CTLA-4, ke kterému se váží protilátky podle vynálezu, je užitečný ve spojení s přípravou léčiv podle vynálezu. Při návrhu léčiv bývá stejně tak důležitá i negativní informace (tj. skutečnost, že protilátka, která se váže na CTLA-4, se neváže na epitop, který působí jako inhibitor CTLA-4, je užitečná). Takže epitop, na který se váží protilátky podle vynálezu, které nevedou k požadovaným funkcím, může být také velmi důležitý. Tudiž do rozsahu předkládaného vynálezu spadají také molekuly (a zejména protilátky), které se váží na stejný nebo podobný epitop jako protilátky podle předkládaného vynálezu.

Kromě toho, že předmětem předkládaného vynálezu jsou protilátky a lze tudíž uvažovat i epitopy, na které se váží, byly provedeny i předběžné studie mapování epitopů pro určité protilátky podle vynálezu, zejména protilátky 4.1.1 a 11.2.1

Jako první krok byly provedeny kompetiční studie BIAcore pro vytvoření hrubé mapy vazeb mezi protilátkami podle vynálezu také ve spojení s jejich schopností kompetovat o vazbu s CTLA-4. Pro tento účel byl CTLA-4 navázán na čip BIAcore a první protilátka, za saturujících podmínek, byla navázána na čip a pak byla měřena kompetiční vazba následné sekundární protilátky na CTLA-4. Tato metoda umožňuje vytvoření hrubé mapy, podle které lze klasifikovat rodiny protilátek.

Tímto způsobem bylo stanoveno, že protilátky podle vynálezu lze rozdělit do následujících epitopových kategorií.

| Kategorie | Protilátka | Kompetice o vazbu CTLA-4                                                                                |
|-----------|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| A         | BO1M*      | Plně křížově kompetují navzájem, křížově kompetují s kategorií B, do jisté míry kompetují s kategorií D |
|           | BO2M*      |                                                                                                         |
| B         | 4.1.1      | Plně křížově kompetují navzájem, křížově kompetují s kategorií A, C a D                                 |
|           | 4.13.1     |                                                                                                         |
| C         | 6.1.1      | Plně křížově kompetují navzájem, křížově kompetují s kategorií B a D                                    |
|           | 3.1.1      |                                                                                                         |
|           | 4.8.1      |                                                                                                         |
|           | 11.2.1     |                                                                                                         |
|           | 11.6.1     |                                                                                                         |
|           | 11.7.1     |                                                                                                         |
| D         | 4.14.1     | křížově kompetují s kategorií C a B, do jisté míry s kategorií A                                        |
| E         | 4.9.1      | BNI3 blokuje vazbu 4.9.1 na CTLA-4, ale ne naopak                                                       |
|           | BNI3***    |                                                                                                         |

(\*) a (\*\*) jsou dostupné od Biostride

(\*\*\*) jsou dostupné od Pharmingen

V dalším kroku se původci pokusili stanovit, zda protilátky podle vynálezu rozpoznávají lineární epitop na CTLA-4 z aredukujících a neredukujících podmínek metodou westernového přenosu (western blot). Bylo pozorováno, že žádná z protilátek 4.1.1, 3.1.1, 11.7.1, 11.6.1 nebo 11.2.1 nerozpoznávala redukovanou formu CTLA-4 na westernovém přenosu. Tudíž se zdá, že všechny epitopy rozpoznávané příslušnými protilátkami nejsou lineární epitopy, ale spíše konformační epitop, jehož struktura je zrušena v redukujících podmínkách.

Tudíž bylo dále zkoumáno, zda je možné něco zjistit o aminokyselinových zbytcích, které jsou důležité pro vazbu protilátek podle vynálezu. Jednou metodou bylo užití kinetické metody stanovení rychlostních konstant pro lidský

CTLA-4 a dva vysoce konzervativní CTLA-4 primátů (makak, *Macaca fascicularis* a marmoset, *Callithrix jacchus*). Studie pomocí techniky BIAcore ukázaly, že protilátka podle vynálezu 4.1.1 se váže na CTLA-4 člověka i obou primátů stejnou rychlostí. Avšak vzhledem ke kinetice se ukázalo, že protilátka 4.1.1 má nejvyšší afinitu (nejmenší rychlost rozpadu) pro lidský CTLA-4, rychlejší rozpad pro CTLA-4 makaka a ještě mnohem rychlejší pro marmoseta. Naproti tomu protilátka 11.2.1 se váže na CTLA-4 člověka i obou primátů se stejnou rychlostí, přitom má i stejné afinity (rychlosti rozpadu) pro všechny tři CTLA-4. Tato informace dále ukazuje, že protilátky 4.1.1 a 11.2.1 se váží na různé epitopy CTLA-4.

Pro další zkoumání epitopů, na které se váží protilátky kategorie B a C podle vynálezu byly provedeny studie s místně cílenou mutagenézí. CTLA-4 marmoseta má proti lidskému dva významné rozdíly, a sice ve zbytcích 105 a 106. Tyto rozdíly jsou změna lucinu na methionio v pozici 105 a glycinu na serin v pozici 106. Tudíž byla mutována cDNA kódující lidský CTLA-4 tak, aby kódovala mutovaný CTLA-4 mající záměny L105M a G106S. Homologní náhrada mutovaného CTLA-4 neovlivnila vazbu B7.2-IgGI fúzního proteinu. Avšak tato molekula byla významně inhibována ve schopnosti vázat se na protilátku 4.1.1 podle vynálezu (podobně marmoset). Dále byla mutován cDNA marmoseta kódující CTLA-4, čímž byla vytvořena mutanta CTLA-4 marmoseta obsahující záměnu S106G. Tato záměna vedla k obnovení původní stabilní vazby. Kromě toho byla připravena mutanta CTLA-4 marmoseta mající záměnu M105L. Tato záměna částečně obnovila vazbu mezi protilátkou 4.1.1 a mutovaným CTLA-4.

Každá z kategorií protilátek A až D podle vynálezu se zdá mít podobné funkční vlastnosti a má zřejmě potenciál působit jako silné terapeutické činidlo anti-CTLA-4. Dále každá z molekul vykazuje jistou křížovou kompetici ve vazbě k CTLA-4. Avšak jak již bylo výše diskutováno, každá z molekul

různých kategorií se zjevně váže na samostatný konformační epitop CTLA-4.

Z předchozích údajů a diskusí vyplývá, že informace o epitopech diskutované výše ukazují, že protilátky (nebo jiné molekuly) podle vynálezu, které křížově kompetují s protilátkami, budou mít zřejmě značný terapeutický potenciál. Dále lze čekat, že protilátky (nebo jiné molekuly) podle vynálezu, které křížově kompetují s protilátkami podle vynálezu (tj. křížově kompetují s protilátkami skupin B, C a/nebo D, budou mít podle předkládaného vynálezu další terapeutický potenciál. A dále lze čekat, že protilátky (nebo jiné molekuly) podle vynálezu, které křížově kompetují s protilátkami podle vynálezu (tj. křížově kompetují s protilátkami skupin B, C a/nebo D) a I) nemají sníženou vazbu s CTLA-4 marmoseta (podobné protilátkce 111.2.1) nebo II) mají sníženou vazbu s CTLA-4 marmoseta, budou mít podle předkládaného vynálezu další terapeutický potenciál. Také protilátky (nebo jiné molekuly) podle vynálezu, které křížově kompetují s protilátkami skupin A a E podle vynálezu mají určitý terapeutický potenciál.

### Příklady provedení vynálezu

Následující příklady včetně provedených pokusů a dosažených výsledků jsou uvedeny pouze pro ilustrativní účely a předkládaný vynález nijak neomezují.

#### Příklad 1

##### Příprava hybridomů produkujících protilátku anti-CTLA-4

Protilátky podle vynálezu byly připraveny, selektovány a testovány podle popsaného příkladu.

##### Příprava antigenu:

Pro imunizaci myší XenoMouse™ byly připraveny tři rozdílné imunogeny: i) fúzní protein CTLA-4-IgG, ii) peptid CTLA-4 a iii) buňky myšího lymfomu 300,19 transfekované mutantou CTLA-4 (Y201V), která je konstitutivně exprimovaná na buněčném povrchu.

##### i) fúzní protein CTLA-4-IgG

##### Konstrukce expresního vektoru:

cDNA kódující zralou extracelulární doménu CTLA-4 byla amplifikována pomocí PCR z cDNA knihovny lidského thymu (Clontech) s použitím primerů navržených podle publikované sekvence (Eur. J. Immunol., 18, 1901-1905, 1988). Fragment byl směrově subklonován do pSR5, expresního plazmidu viru Sindbis (InVitrogen), mezi domény CH1/CH2/CH3 signálního peptidu lidského onkostatinu M a lidského IgG gama 1 (IgG1). Fúzní protein neobsahuje kloubovou doménu, ale obsahuje cystein 120 v extracelulární doméně CTLA-4 za vzniku kovalentního dimeru. Výsledný vektor byl nazván CTLA-4-

IgG/pSR5. Sekvence kompletní cDNA CTLA-4-IgG1 ve vektoru byla potvrzena v obou vláknech. Aminokyselinová sekvence proteinu CTLA-4-Ig je ukázána níže. Zralá extracelulární doména pro CD44 byla amplifikována pomocí PCR z lidské lymfocytové knihovny (Clontech) a subklonována do pSinRep5 za vzniku kontrolního proteinu s identickým koncem IgG1.

Fúzní protein OM-CTLA4-IgG1:

**MGVLLTORTLLSLVLALLFPSMASMAMHVAQPAVVLASSRGIASFVC**  
**EYASPGKATEVRVTVLRLQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICT**  
**GTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLIGINGTQIY**  
**VIDPEPCPDSDLEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE**  
**VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE**  
**YKCKVSNKALPTPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL**  
**VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR**  
**WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**

Podtrženo: signální peptid

Tučně: extracelulární doména CTLA-4

cDNA pro zralou extracelulární doménu CD28 byly amplifikovány pomocí PCR z lidské lymfocytové knihovny (Clontech), a pak subklonovány do pCDM8 (J. Immunol., 151, 5261-71, 1993) za vzniku fúzního proteinu lidského IgG1 obsahujícího oblast štěpení trombinem a kloubovou oblast. CTLA-4 z opic *Callithrix jacchuss*, *Macaca fascicularis* a *Macaca mullata* byl klonován z mRNA izolované z PBMC stimulovaných PHA s použitím standardních technik degenerované PCR. Sekvencování prokázalo, že aminokyselinové sekvence opis rhesus a cynomologous byly totožné, se třemi odlišnostmi oproti zralé lidské extracelulární doméně CTLA-4 (S13N, I17T a L105M). U opic *C. jacchuss* bylo prokázáno deset aminokyselinových odchylek od zralé lidské extracelulární

domény CTLA-4 (V21A, V33I, A41T, A51G, 54I, S71F, Q75K, T88M, L105M a G106S). Místně cílená mutagenese byla použita pro vytváření jednobodových mutací všech aminokyselin odlišných v marmoset CTLA-4 pro mapování aminokyselin důležitých pro interakci protilátek s lidským CTLA-4-IgG. Mutace lidského a marmoset CTLA-4-IgG pro epitopové mapování byly vytvářeny pomocí značkovací soupravy pro místně cílené mutagenese (Promega). Fúzní proteiny IgG byly produkovány pomocí přechodné transfekce buněk Cos7 a purifikovány s použitím standardních technik Protein A. U mutovaných proteinů CTLA-4-IgG byla hodnocena vazba k protilátkám prostřednictvím imunopřenosu ("immunoblotting") a s použitím analýz BIAcore.

#### Exprese/purifikace rekombinantního proteinu

Rekombinantní virus Sindbis vznikal elektroporací (Gibco) buněk z embryonálních ledvin křečka s SP6 *in vitro* transkribovanou mRNA CTLA-4-IgG1/pSR5 a pomocnou mRNA DH-26S, jak popsáno firmou InVitrogen. Rekombinantní virus byl sklizen čtyřicet osm hodin později a titrován na optimální expresi proteinu v buňkách ovarií čínského křečka (CHO-K1). Buňky CHO-K1 byly pěstovány v suspenzi DMEM/F12 (Gibco) obsahující 10% teplem inaktivované fetální bovinní sérum (Gibco), neesenciální aminokyseliny (Gibco), 4mM glutamin (Gibco), penicilin/streptomycin (Gibco), 10mM Hepes pH 7,5 (Gibco). Aby produkovaly CTLA-4-IgG, byly buňky CHO-K1 resuspendovány v množství  $1 \times 10^7$  buněk/ml v DMEM/F12 a inkubovány s virem Sindbis jednu hodinu při teplotě místnosti. Pak byly buňky naředěny na  $1 \times 10^6$ /ml v DMEM/F12 obsahujícím 1% fetální bovinní sérum zbavené bovinního IgG s použitím Protein A Sepharose (Pharmacia), neesenciální aminokyseliny, 4mM glutamin, 12,5mM Hepes pH 7,5, a penicilin/streptomycin. Čtyřicet osm hodin po infekci byly buňky peletovány a kondicionovaná média byla sklizena a doplněna tabletami úplného inhibitoru proteáz (Boehringer

Mannheim), pH bylo upraveno na 7,5, a média byla filtrována přes 0,2 filtr (Nalgene). FPLC (Pharmacia) byla použita pro afinitní purifikaci fúzního proteinu s použitím 5ml kolony A HiTrap (Pharmacia) při rychlosti průtoku 10 ml/minutu. Kolona byla promyta PBS 30 objemy kolony a eluována 0,1M glycinem/HCl, pH 2,8, rychlostí 1 ml/minutu. Frakce (1 ml) byly okamžitě neutralizovány na pH 7,5 pomocí Tris pH 9. Frakce obsahující CTLA-4-IgG1 byly identifikovány prostřednictvím SDS-PAGE, a pak koncentrovány s použitím Centriplus 50 (Amicon) před aplikací na kolonu Sepharose 200 (Pharmacia) rychlostí 1 ml/minutu s použitím PBS jako rozpouštědla. Frakce obsahující CTLA-4-IgG1 byly sloučeny, sterilizovány filtrací 0,2 (Millipore), rozděleny na poměrné části a zmrazeny v -80°C. CD44-IgG1 byl exprimován a purifikován s použitím stejných metod. CD28-IgG byl purifikován z kondicionovaných médií od přechodně transfekovaných buněk Cos7.

#### Charakterizace CTLA-4-IgG1

Purifikovaný CTLA-4-IgG1 migroval jako jeden pás na SDS-PAGE při použití barvení koloidní modří Coomassie (Novex). Za neredukujících podmínek byl CTLA-4-IgG1 dimer (100kD), který se redukoval na monomer o velikosti 50 kD, když byl ošetřen 50mM DTT. Sekvencování aminokyselin purifikovaného CTLA-4-IgG1 v roztoku potvrdilo N-koncovou část CTLA-4 (MHVAQPAVVLAS) a to, že signální peptid onkostatinu M byl odštěpen ze zralého fúzního proteinu.

CTLA-4-IgG1 se vázal na imobilizovaný B7.1-IgG způsobem závislým na koncentraci a vazba byla blokována křeččí protilidskou anti-CTLA-4 protilátkou (BNI3, PharMingen). Sterilní CTLA-4-IgG byl bez endotoxinu a byl kvantifikován při OD280 s použitím 1,4 jako extinčního koeficientu. Výtěžek purifikovaného CTLA-4-IgG se pohyboval v rozmezí 0,5 až 3 mg/l buněk CHO-K1.

## (ii) CTLA-4 peptid

Následující peptid CTLA-4 byl připraven tak, jak je popsáno dále:

NH<sub>2</sub>:MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRLQADSQVT  
 EVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICK  
 VELMYPPPYLGGIGNGTQIYVIDPEPC-CONH<sub>2</sub>

## Zkratky/materiál:

NMP, N-methylpyrolidinon; TFE, 2,2,2-trifluoroethanol; DCM, dichloromethan; Fmoc, fluorenylmethoxykarbonyl. Všechny reagenty byly dodávány firmou Perkin Elmer s následujícími výjimkami: TFE od firmy Aldrich Chemical, Fmoc-PAL-PEG pryskyřice od firmy Perseptive Biosystems. Pro ty aminokyseliny, které vyžadují ochranné skupiny postranních řetězců, byly použity: Fmoc-Arg(PMC)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-His(Boc)-OH, Fmoc-Lys(BOC)OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH a Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

## Syntéza peptidu

Syntéza peptidu byla prováděna na přístroji Perkin-Elmer 431A dodatečně vybaveném monitorováním vazby prostřednictvím UV absorpce v 301 nm (Perkin-Elmer Model 759A detector). Sekvence peptidu byla syntetizována na pryskyřici Fmoc-PAL-PEG s použitím kondicionovaných dvojité kondenzačních cyklů. Zesílené dvojité kondenzační reakce byly prováděny v cyklech 10, 11, 18, 19, 20 a 28 až 33. Pryskyřice byla promyta 50% směsí DCM a TFE při ukončení každého acylačního cyklu, a potom následovalo "zakrytí" nezreagovaných aminoskupin acetanhydridem v NMP. Pryskyřice byla odstraněna z reaktoru po ukončení cyklu 49 a zbytek pokračoval až do ukončení. Odštěpení peptidu z pryskyřice bylo prováděno

s použitím Reagent K (King et al., International Journal of Protein and Peptide Research, 36, 255-266, 1990) po dobu 6 hodin na 415 mg pryskyřice, která poskytla 186 mg hrubého peptidu CTLA-4.

#### Charakterizace peptidu

25mg alikvoty hrubého peptidu CTLA-4 byly rozpuštěny v 5 ml 6M guanidin HCl/100mM K<sub>2</sub>PO<sub>3</sub> při pH 6,4 a eluovány přes kolonu Pharmacia Hi Load Superdex 75 16/60 (16 mm x 600 mm, 120 ml objem kolony) s 2M guanidin HCl/100mM K<sub>2</sub>PO<sub>3</sub> při pH 6,4 rychlostí 2 ml/min po dobu 180 minut a při sběru 5ml frakcí. Frakce byly analyzovány nanesením 1,7 µl frakce na gel NuPAGE Laemeli s MES pufrem a vizualizací prostřednictvím Daichiova protokolu barvení stříbrem. Frakce mající molekulovou hmotnost 12 kD, jak usuzováno ze srovnání se standardy molekulové hmotnosti, byly sloučeny a uloženy ve 4 °C. Spojené frakce byly analyzovány pomocí UV a elektroforézy v gelu. Sekvencování aminokyselin bylo prováděno absorpcí vzorku o objemu 100 µl na zásobník ProSorb (absorpce na membránu PVDF) a promytím pro odstranění solí pufru. Sekvencování bylo prováděno na přístroji Applied Biosystems 420. Byla pozorována očekávaná N-koncová sekvence (M H V A Q P A V V L A). Imunopřenos prokázal, že peptid byl rozpoznáván CTLA-4 proti-lidskou BNI3 (PharMingen). Pro odsolení byl alikvot obsahující 648 µg materiálu přenesen do dialyzačních trubiček 3500 D MWCO a byl dialyzován proti 0,1% TFA/H<sub>2</sub>O ve 4 °C po dobu 9 dnů s mícháním. Veškerý obsah dialyzačního vaku byl lyofilizován na prášek.

#### (iii) Buňky 300.19 transfekované CTLA-4 (Y201V)

Kompletní cDNA CTLA-4 byla amplifikována pomocí PCR z cDNA knihovny lidského thymu (Stratagene) a subklonována do pIRESneo (Clontech). Byla zavedena mutace CTLA-4, která má za následek konstitutivní expresi na buněčném povrchu s použitím

systému MatchMaker Mutagenesis (Promega). Mutace tyrosinu Y201 na valin inhibuje vazbu proteinu adaptinu AP50, který je zodpovědný za rychlou internalizaci CTLA-4 (Chuang et al., J. Immunol., 159, 144-151, 1997). Buňky 300.19 myšího lymfomu bez mykoplasmat byly pěstovány v RPMI-1640 obsahujícím 10% fetální telecí sérum, neesenciální aminokyseliny, penicilin/streptomycin, 2mM glutamin, 12,5mM Hepes pH 7,5, a 25 M beta-merkapt ethanol. Buňky byly transfekovány elektroporací ( $3 \times 10^6$ /0,4 ml RPMI bez séra) v 1ml komůrce s 20 g CTLA-4--Y201V/pIRESneo s použitím 200V/1180uF (Gibco CellPorator). Buňky byly ponechány v klidu 10 minut, a pak bylo přidáno 8 ml předem ohřátého kompletního média RPMI. Za 48 hodin byly buňky naředěny na  $0,5 \times 10^6$ /ml kompletním médiem RPMI obsahujícím 1 mg/ml G418 (Gibco). Rezistentní buňky se rozšířily a vykazovaly expresi CTLA-4 na buněčném povrchu při použití protilátky BNI3 konjugované s fykoerythrinem (PharMingen). Buňky s vysokou hladinou exprese byly izolovány sterilním tříděním.

#### Imunizace a příprava hybridomu

Myši XenoMouse (staré 8 až 10 týdnů) byly imunizovány i) subkutánně do kořene ocasu s  $1 \times 10^7$  buněk 300.19, které byly transfekovány tak, aby exprimovaly CTLA-4, jak popsáno výše, a resuspendovány ve fyziologickém roztoku pufovaném fosfáty (PBS) s kompletním Freundovým adjuvans, nebo ii) subkutánně do kořene ocasu s a) 10 g CTLA-4 fúzního proteinu nebo b) 10 g peptidu CTLA-4 emulgovaného v kompletním Freundově adjuvans. V každém případě byla dávka opakována třikrát nebo čtyřikrát v nekompletním Freundově adjuvans. Čtyři dny před fúzí dostaly myši poslední injekci imunogenu nebo buněk v PBS. Lymfocyty ze sleziny a/nebo lymfatických uzlin z imunizovaných myší byly fúzovány s buněčnou linií myšího nesekrečního myelomu P3 a byly podrobeny selekci HAT tak, jak bylo popsáno dříve (Galfre, G. a Milstein, C., "Preparation

of monoclonal antibodies, strategies and procedures.", Methods Enzymol., 73, 3-46, 1981). Byl získán velký panel hybridomů, které všechny sekretovaly CTLA-4 specifické lidské IgG<sub>2</sub>k nebo IgG<sub>4</sub>k protilátky (jak odhaleno níže).

#### Test ELISA

ELISA pro zjišťování antigen-specifických protilátek v myším séru a v supernatantech hybridomů byla prováděna tak, jak bylo popsáno (Coligan et al., oddíl 2.1, "Enzyme-linked immunosorbent assays", Current protocols in immunology, 1994) s použitím CTLA-4-Ig fúzního proteinu k záchytu protilátek. Zvířata, která byla imunizována fúzním proteinem CTLA-4-Ig, původci navíc testovali na nespecifickou reaktivitu proti lidské Ig části fúzního proteinu. To bylo prováděno s použitím ELISA destiček potažených lidským Ig jako negativní kontrolou specifiity.

Ve výhodném testu ELISA byly použity následující techniky:

ELISA destičky byly potahovány 100  $\mu$ l/jamku potahovacím pufrem pro destičky s antigenem (0,1M uhličitanový pufr, pH 9,6 a NaHCO<sub>3</sub> (MW 84) 8,4 g/l). Potom byly destičky inkubovány přes noc ve 4 °C. Po inkubaci byl potahovací pufr odstraněn a destička byla blokována 200  $\mu$ l/jamku blokovacího pufru (0,5% BSA, 0,1% Tween 20, 0,01% Thimerosal v 1 x PBS) a inkubována při teplotě místnosti 1 hodinu. Nebo byly destičky s blokovacím pufrem uloženy v lednici a utěsněny. Blokovací pufr byl odstraněn a bylo přidáno 50  $\mu$ l/jamku supernatantu z hybridomu, séra nebo supernatantu z jiného hybridomu (pozitivní kontrola) a média HAT nebo blokovacího pufru (negativní kontrola). Destičky byly inkubovány 2 hodiny při teplotě místnosti. Po inkubaci byly destičky promyty promývacím pufrem (1x PBS). Detekující protilátka (tj. myší proti-lidská IgG2-HRP (SB, #9070-05) pro protilátky IgG2 nebo myší proti-lidská IgG4-HRP (SB #9200-05) pro protilátky IgG4)

byla přidána v množství 100  $\mu$ l/jamku (myší proti-lidská IgG2-HRP v ředění 1:2000 nebo myší proti-lidská IgG4-HRP v ředění 1:1000 (každá naředěná blokujícím pufrem). Destičky byly inkubovány při teplotě místnosti po dobu 1 hodiny, a pak promyty promývacím pufrem. Potom bylo do jamek přidáno 100  $\mu$ l/jamku čerstvě připraveného vyvíjecího roztoku (10 ml substrátového pufru, 5 mg OPD (o-fenylendiamin, Sigma kat. č. P-7288) a 10  $\mu$ l 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Sigma). Destičky se ponechaly vyvíjet 10 až 20 minut, dokud se neobjevilo slabé zabarvení v jamkách s negativními kontrolami. Potom bylo přidáno 100  $\mu$ l/jamku stopovacího roztoku (2M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) a destičky byly odečítány na odečítacím zařízení pro destičky ELISA při vlnové délce 490 nm.

Zjišťování afinitních konstant plně lidských Mab pomocí zařízení BIAcore

Měření afinity purifikovaných lidských monoklonálních protilátek, Fab fragmentů nebo supernatantů z hybridomu prostřednictvím plazmonové rezonance bylo prováděno s použitím přístroje BIAcore 2000, s použitím obecných postupů uvedených výrobcem.

Kinetická analýza protilátek byla prováděna s použitím antigenů imobilizovaných s nízkou denzitou na povrchu senzoru. Na třech površích senzorského čipu BIAcore byl imobilizován fúzní protein CTLA-4-Ig v hustotě pohybující se od přibližně 390 do 900 při použití fúzního proteinu CTLA-4-Ig v koncentraci 20 nebo 50 g/ml v 10mM acetátu sodném, pH 5,0, s použitím soupravy pro kondenzaci aminů dodávané výrobcem (BIAcore, Inc.). Na čtvrtém povrchu senzorského čipu BIAcore byl imobilizován IgG1 (900 RU) a byl použit jako negativní kontrolní povrch pro nespecifickou vazbu. Kinetická analýza byla prováděna při rychlosti průtoku 25 nebo 50  $\mu$ l/minutu a byly určovány disociační ( $k_d$  nebo  $k_{off}$ ) a asociační ( $k_a$  nebo  $k_{on}$ ) rychlosti s použitím software

poskytnutého výrobcem (BIA evaluation 3.0), který umožnil celkové výpočty.

## Příklad 2

### Měření afinity anti-CTLA-4 protilátek

V následující tabulce jsou poskytnuty výsledky měření afinity některých z protilátek takto vybraných.

Tabulka I

| Hybridom | Pevná fáze (pomocí BIAcore)                               |                                                         |                                                                        |                                                                   |                        |
|----------|-----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|------------------------|
|          | Rychlost asociace $K_a$<br>( $M^{-1}S^{-1} \times 10^6$ ) | Rychlost disociace $K_d$<br>( $S^{-1} \times 10^{-4}$ ) | Asociační konstanta $K_A$<br>( $1/M$ ) = $k_a/k_d$<br>$\times 10^{10}$ | Disociační konstanta $K_D$<br>( $M$ ) = $k_d/k_a \times 10^{-10}$ | Povrchová denzita [RU] |
| Moab01   | 0,68                                                      | 1,01                                                    | 0,67                                                                   | 1,48                                                              | 878,7                  |
|          | 0,70                                                      | 4,66                                                    | 0,15                                                                   | 6,68                                                              | 504,5                  |
|          | 0,77                                                      | 6,49                                                    | 0,19                                                                   | 8,41                                                              | 457,2                  |
|          | 0,60                                                      | 3,08                                                    | 0,20                                                                   | 5,11                                                              | 397,8                  |
| 4.1.1    | 1,85                                                      | 0,72                                                    | 2,58                                                                   | 0,39                                                              | 878,7                  |
|          | 1,88                                                      | 1,21                                                    | 1,55                                                                   | 0,64                                                              | 504,5                  |
|          | 1,73                                                      | 1,54                                                    | 1,13                                                                   | 0,88                                                              | 457,2                  |
|          | 1,86                                                      | 1,47                                                    | 1,26                                                                   | 0,79                                                              | 397,8                  |
| 4.8.1    | 0,32                                                      | 0,07                                                    | 4,46                                                                   | 0,22                                                              | 878,7                  |
|          | 0,31                                                      | 0,23                                                    | 1,33                                                                   | 0,75                                                              | 504,5                  |
|          | 0,28                                                      | 0,06                                                    | 4,82                                                                   | 0,21                                                              | 397,8                  |
| 4.14.3   | 2,81                                                      | 3,04                                                    | 0,92                                                                   | 1,08                                                              | 878,7                  |
|          | 2,88                                                      | 3,97                                                    | 0,73                                                                   | 1,38                                                              | 504,5                  |
|          | 2,84                                                      | 6,66                                                    | 0,43                                                                   | 2,35                                                              | 457,2                  |
|          | 3,17                                                      | 5,03                                                    | 0,63                                                                   | 1,58                                                              | 397,8                  |

|        |      |       |      |       |       |
|--------|------|-------|------|-------|-------|
| 6.1.1  | 0,43 | 0,35  | 1,21 | 0,83  | 878,7 |
|        | 0,46 | 0,90  | 0,51 | 1,98  | 504,5 |
|        | 0,31 | 0,51  | 0,61 | 1,63  | 457,2 |
|        | 0,45 | 0,79  | 0,57 | 1,76  | 397,8 |
| 3.1.1  | 1,04 | 0,96  | 1,07 | 0,93  | 878,7 |
|        | 0,95 | 1,72  | 0,55 | 1,82  | 504,5 |
|        | 0,73 | 1,65  | 0,44 | 2,27  | 457,2 |
|        | 0,91 | 2,07  | 0,44 | 2,28  | 397,8 |
| 4.9.1  | 1,55 | 13,80 | 0,11 | 8,94  | 878,7 |
|        | 1,43 | 19,00 | 0,08 | 13,20 | 504,5 |
|        | 1,35 | 20,50 | 0,07 | 15,20 | 397,8 |
| 4.10.2 | 1,00 | 2,53  | 0,39 | 2,54  | 878,7 |
|        | 0,94 | 4,30  | 0,22 | 4,55  | 504,5 |
|        | 0,70 | 5,05  | 0,14 | 7,21  | 457,2 |
|        | 1,00 | 5,24  | 0,19 | 5,25  | 397,8 |
| 2.1.3  | 1,24 | 9,59  | 0,13 | 7,72  | 878,7 |
|        | 1,17 | 13,10 | 0,09 | 11,20 | 504,5 |
|        | 1,11 | 13,00 | 0,09 | 11,70 | 397,8 |
| 4.13.1 | 1,22 | 5,83  | 0,21 | 4,78  | 878,7 |
|        | 1,29 | 6,65  | 0,19 | 5,17  | 504,5 |
|        | 1,23 | 7,25  | 0,17 | 5,88  | 397,8 |

Jak je z údajů vidět, protilátky připravené podle vynálezu mají vysoké afinity a vazebné konstanty.

### Příklad 3

Struktury anti-CTLA-4 protilátek připravených podle vynálezu

V následující diskusi jsou poskytnuty strukturální informace týkající se protilátek připravených podle vynálezu.

Aby se analyzovaly struktury protilátek vytvořených podle vynálezu, vyklonovali původci geny kódující fragmenty

těžkého a lehkého řetězce z konkrétního hybridomu. Klonování genů a sekvencování bylo prováděno následovně:

Poly(A)<sup>+</sup> mRNA byla izolována z přibližně  $2 \times 10^5$  hybridomových buněk pocházejících z imunizovaných myší XenoMouse s použitím soupravy Fast-Track (Invitrogen). Po vytvoření cDNA s náhodnými primery následovala PCR. Byly použity primery specifické pro variabilní oblasti rodin lidských V<sub>H</sub> nebo lidských V<sub>K</sub> (Marks et al., „Oligonucleotide primers for polymerase chain reaction amplification of human immunoglobulin variable genes and design of family-specific oligonucleotide probes.“, Eur. J. Immunol., 21, 985-991, 1991) ve spojení s primery specifickými pro konstantní oblast lidského C 2 (MG-40d, 5'-GCTGAGGGAGTAGAGTCCTGAGGA-3') nebo konstantní oblast C<sub>K</sub> (hKp2, jak popsáno dříve v Green et al., 1994). Sekvence transkriptů lidských mAb pocházejících z těžkého řetězce a řetězce kappa z hybridomů byly získány přímým sekvencováním produktů PCR vzniklých z poly(A)<sup>+</sup> RNA s použitím primerů popsaných výše. Produkty PCR byly také klonovány do pCRII s použitím TA klonovacího kitu (Invitrogen) a obě vlákna byla sekvencována s použitím souprav pro sekvencování s terminační barevnou značkou Prism a přístrojem pro sekvencování ABI 377. Všechny sekvence byly analyzovány pomocí srovnání s „V BASE sequence directory“ (Tomlinson et al., MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK) s použitím programového software MacVector a Geneworks.

Dále byla každá z protilátek 4.1.1, 4.8.1, 11.2.1 a 6.1.1 podrobena sekvencování kompletní DNA. Pro toto sekvencování byla izolována poly(A)<sup>+</sup> mRNA z přibližně  $4 \times 10^6$  hybridomových buněk s použitím soupravy mRNA Direct kit (Dynal). mRNA byla reverzně přepsána s použitím oligo-dT(18) a soupravy Advantage RT/PCR kit (Clontech). Byla použita databáze variabilních oblastí (V Base) pro navržení

amplifikačních primerů začínajících v počátečním místě ATG těžkého řetězce genu DP50:

5 -TATCTAAGCTTCTAGACTCGACCGCCACCATGGAGTTTGGGCTGAGCTG-3 a ke stop kodonu konstantní oblasti IgG2:

5 -TTCTCTGATCAGAATTCCTATCATTTACCCGGAGACAGGGAGAGCT-3 .

K počátečnímu místu ATG byla přidána 5 optimální Kozakova sekvence (ACCGCCACC). Stejná metoda byla použita pro návrh primeru k počátečnímu místu ATG řetězce kappa genu A27:

5 -TCTTCAAGCTTGCCCGGGCCCGCCACCATGGAAACCCAGCGCAG-3 a ke stop kodonu kappa konstantní oblasti:

5 -TTCTTTGATCAGAATTCTACTAACAACCTCTCCCCTGTTGAAGC-3 . 012 cDNA byla klonována s použitím primeru k počátečnímu místu ATG:

5 -TCTTCAAGCTTGCCCGGGCCCGCCACCATGGCATGAGGGTCCCCGCT-3 a

primeru pro stop kodon kappa konstantní oblasti uvedeného výše. cDNA těžkého řetězce byly také klonovány jako genomové konstrukty místně cílenou mutagenezí přidáním místa *NheI* na konec variabilní J domény a subklonováním fragmentu *NheI* obsahujícím genomové oblasti IgG2 CH1/kloubová oblast/CH2/CH3. Bodová mutace pro vznik místa *NheI* nemění aminokyselinovou sekvenci proti sekvenci zárodečné linie. Páry primerů byly použity pro amplifikaci cDNA s použitím soupravy Advantage High Fidelity PCR Kit (Clontech). Sekvence z PCR byla získána přímým sekvencováním s použitím sekvenačních souprav s terminační barevnou značkou a přístrojem pro sekvencování ABI. Produkt PCR byl klonován do savčích expresních vektorů pEE-glutaminsyntetáza (Lonza) a tři klony byly sekvencovány pro potvrzení somatických mutací. U každého klonu byla sekvence verifikována na obou vláknech v přinejmenším třech reakcích. Neglykosylovaná protilátka 4.1.1 byla vytvořena místně cílenou mutagenezí N294Q v doméně CH2. Rekombinantní protilátky byly produkovány přechodnou transfekcí buněk Cos7 v FCS bez IgG a purifikovány s použitím standardních technik Protein A Sepharose. Stabilní transfektanty byly vytvářeny elektroporací myších buněk NSO a

selekcí v médiu bez glutaminu. Rekombinantní 4.1.1 s glykosylací nebo bez ní projevovaly identickou specifitu a afinitu pro CTLA-4 v *in vitro* testech ELISA a BIAcore.

#### Analýza utilizace genu

Následující tabulka uvádí utilizaci genu prokázanou vybranými hybridomovými klony protilátek podle vynálezu:

Tabulka II

Utilizace genů těžkého a lehkého řetězce

| Klon     | Těžký řetězec |                  |     | Lehký řetězec kapa |     |
|----------|---------------|------------------|-----|--------------------|-----|
|          | VH            | D                | JH  | VK                 | JK  |
| 4.1.1    | DP-50         | DIR4 nebo DIR3   | JH4 | A27                | JK1 |
| 4.8.1    | DP-50         | 7-27             | JH4 | A27                | JK4 |
| 4.14.3   | DP-50         | 7-27             | JH4 | A27                | JK3 |
| 6.1.1    | DP-50         | DIR5 nebo DIR5rc | JH4 | A27                | JK3 |
| 3.1.1    | DP-50         | 3-3              | JH6 | 012                | JK3 |
| 4.10.2   | DP-50         | 7-27             | JH4 | A27                | JK3 |
| 2.1.3    | DP-65         | 1-26             | JH6 | A10/A26            | JK4 |
| 4.13.1   | DP-50         | 7-27             | JH4 | A27                | JK3 |
| 11.2.1   | DP-50         | D1-26            | JH6 | 012                | JK3 |
| 11.6.1   | DP-50         | D2-2 nebo D4     | JH6 | 012                | JK3 |
| 11.7.1   | DP-50         | D3-22 nebo D21-9 | JH4 | 012                | JK3 |
| 12.3.1.1 | DP-50         | D3-3 nebo DXP4   | JH6 | A17                | JK1 |
| 12.9.1.1 | DP-50         | D6-19            | JH4 | A3/A19             | JK4 |
| 4.9.1    | DP-47         | 5-24 a/nebo 6-19 | JH4 | L5                 | JK1 |

Jak bylo pozorováno, protilátky podle předkládaného vynálezu byly vytvářeny se silnou tendencí k utilizaci variabilní oblasti těžkého řetězce DP-50. Gen DP-50 je také odkazován do rodiny genu  $V_H$  3-33. Pouze jedna protilátka, která byla selektována na základě vazby CTLA-4 a předběžných *in vitro* funkčních testů vykazala utilizaci genu těžkého

řetězce jiného než je DP-50. Tento klon, 2.1.3., používal variabilní oblast těžkého řetězce DP-65 a je izotypu IgG4. Gen DP-65 je také odkazován do rodiny genu  $V_H$  4-31. Na druhé straně klon 4.9.1, který má variabilní oblast těžkého řetězce DP-47, váže CTLA-4, ale neinhibuje vazbu k B7-1 nebo B7-2. U myši XenoMouse je více než 30 odlišných funkčních variabilních genů těžkého řetězce, ke kterým se tvoří protilátky. Tato tendence je tudíž ukazatel preferovaného vazebného motivu v interakci protilátka-antigen s ohledem na kombinované vlastnosti vazby k antigenu a funkční aktivitu.

#### Mutační analýza

Jak bylo vyhodnoceno, analýza utilizace genů poskytuje pouze omezený přehled protilátkové struktury. Protože B lymfocyty myši XenoMouse náhodně vytvářejí transkripty V-D-J- těžkého řetězce nebo V-J kappa lehkého řetězce, je zde celá řada sekundárních procesů, které se objevují, včetně, ale bez omezení, somatické hypermutace, n-adicí a CDR3 extenzí. (Viz například Mendez et al., Nature Genetics, 15, 146-156, 1997, patentová přihláška Spojených Států č. 08/759 620, podaná 3. prosince, 1996. V souladu s tím byly pro další zkoumání protilátkové struktury vytvářeny z cDNA získané z klonů predikované aminokyselinové sekvence protilátek. Navíc byly získány prostřednictvím sekvencování proteinů N-koncové aminokyselinové sekvence.

Obrázek 1 poskytuje nukleotidové a predikované aminokyselinové sekvence těžkých a kappa lehkých řetězců z klonů 4.1.1 (obrázek 1A), 4.8.1 (obrázek 1B), 4.14.3 (obrázek 1C), 6.1.1 (obrázek 1D), 3.1.1 (obrázek 1E), 4.10.2 (obrázek 1F), 2.1.3 (obrázek 1G), 4.13.1 (obrázek 1H), 11.2.1 (obrázek 1I), 11.6.1 (obrázek 1J), 11.7.1 (obrázek 1K), 12.3.1.1 (obrázek 1L) a 12.9.1.1 (obrázek 1M). Na obrázcích 1A, 1B a 1D jsou uvedené rozšířené sekvence protilátek 4.1.1, 4.8.1 a 6.1.1 získané klonováním kompletních cDNA, jak

popsáno výše. Na těchto obrázcích jsou sekvence signálního peptidu (nebo báze kódující totéž) označeny tučně a sekvence používané pro 5 PCR reakce jsou podtrženy.

Obrázek 2 poskytuje srovnání sekvencí mezi predikovanými aminokyselinovými sekvencemi těžkého řetězce z klonů 4.1.1, 4.8.1, 4.14.3, 6.1.1, 3.1.1, 4.10.2, 4.13.1, 11.2.1, 11.6.1, 11.7.1, 12.3.1.1 a 12.9.1.1 a aminokyselinovou sekvencí zárodečné linie DP-50 (3-33). Rozdíly mezi sekvencí zárodečné linie DP-50 a sekvencemi z klonů jsou označeny tučným písmem. Obrázek také ukazuje pozice sekvencí CDR1, CDR2 a CDR3 protilátek jako stínované.

Obrázek 3 poskytuje srovnání sekvencí mezi predikovanou aminokyselinovou sekvencí těžkého řetězce klonu 2.1.3 a aminokyselinovou sekvencí zárodečné linie DP-65 (4-31). Rozdíly mezi sekvencí zárodečné linie DP-65 a sekvencí z klonu jsou označeny tučným písmem. Obrázek také ukazuje pozice sekvencí CDR1, CDR2 a CDR3 protilátky jako podtržené.

Obrázek 4 poskytuje srovnání sekvencí mezi predikovanou aminokyselinovou sekvencí kappa lehkého řetězce z klonů 4.1.1, 4.8.1, 4.14.3, 6.1.1, 4.10.2 a 4.13.1 a aminokyselinovou sekvencí zárodečné linie A27. Rozdíly mezi sekvencí zárodečné linie A27 a sekvencemi z klonů jsou označeny tučným písmem. Obrázek také ukazuje pozice sekvencí CDR1, CDR2 a CDR3 protilátek jako podtržené. Zřejmě delece v CDR klonů 4.8.1, 4.14.3 a 6.1.1 jsou označeny „0“.

Obrázek 5 poskytuje srovnání sekvencí mezi predikovanou aminokyselinovou sekvencí kappa lehkého řetězce z klonů 3.1.1, 11.2.1., 11,6,1 a 11.7.1 a aminokyselinovou sekvencí zárodečné linie 012. Rozdíly mezi sekvencí zárodečné linie 012 a sekvencí z klonů jsou označeny tučným písmem. Obrázek také ukazuje pozice sekvencí CDR1, CDR2 a CDR3 protilátek jako podtržené.

Obrázek 6 poskytuje srovnání sekvencí mezi predikovanou aminokyselinovou sekvencí kappa lehkého řetězce klonu 2.1.3 a

aminokyselinovou sekvencí zárodečné linie A10/A26. Rozdíly mezi sekvencí zárodečné linie A10/A26 a sekvencí z klonu jsou označeny tučným písmem. Obrázek také ukazuje pozice sekvencí CDR1, CDR2 a CDR3 protilátek jako podtržené.

Obrázek 7 poskytuje srovnání sekvencí mezi predikovanou aminokyselinovou sekvencí kappa lehkého řetězce klonu 12.3.1 a aminokyselinovou sekvencí zárodečné linie A17. Rozdíly mezi sekvencí zárodečné linie A17 a sekvencí z klonu jsou označeny tučným písmem. Obrázek také ukazuje pozice sekvencí CDR1, CDR2 a CDR3 protilátek jako podtržené.

Obrázek 8 poskytuje srovnání sekvencí mezi predikovanou aminokyselinovou sekvencí kappa lehkého řetězce klonu 12.9.1 a aminokyselinovou sekvencí zárodečné linie A3/A19. Rozdíly mezi sekvencí zárodečné linie A3/A19 a sekvencí z klonu jsou označeny tučným písmem. Obrázek také ukazuje pozice sekvencí CDR1, CDR2 a CDR3 protilátek jako podtržené.

Obrázek 22 poskytuje série dalších nukleotidových a aminokyselinových sekvencí následujících anti-CTLA-4 protilátkových řetězců:

#### 4.1.1:

kompletní 4.1.1 těžký řetězec (cDNA 22(a), genomová 22(b) a aminokyselinová 22(c))

kompletní neglykosylovaný 4.1.1 těžký řetězec (cDNA 22(d) a aminokyselinová 22(e))

4.1.1 lehký řetězec (cDNA 22(f) a aminokyselinová 22(g))

#### 4.8.1:

kompletní 4.8.1 těžký řetězec (cDNA 22(h) a aminokyselinová 22(i))

4.8.1 lehký řetězec (cDNA 22(j) a aminokyselinová 22(k))

## 6.1.1:

kompletní 6.1.1 těžký řetězec (cDNA 22(l) a aminokyselinová 22(m))

6.1.1 lehký řetězec (cDNA 22(n) a aminokyselinová 22(o))

## 11.2.1:

kompletní 11.2.1 těžký řetězec (cDNA 22(p) a aminokyselinová 22(q))

11.2.1 lehký řetězec (cDNA 22(r) a aminokyselinová 22(s))

Sekvence signálního peptidu jsou označeny tučným písmem a velkým textem. Otevřené čtecí rámce kompletní sekvence 4.1.1 genomové DNA (obr. 22(b)) jsou podtržené. A mutace zavedené pro vytvoření neglykosylovaného 4.1.1 těžkého řetězce a výsledná změna (N294Q) jsou označeny podtržením a tučným textem (sekvence cDNA (obr. 22(b)) a aminokyselinová sekvence (obr. 22(c))).

## Příklad 4

Analýza aminokyselinových substitucí těžkého a lehkého řetězce

Na obrázku 2, který poskytuje srovnání sekvencí mezi predikovanými aminokyselinovými sekvencemi těžkého řetězce z klonů 4.1.1, 4.8.1, 4.14.3, 6.1.1, 3.1.1, 4.10.2, 4.13.1, 11.2.1, 11.6.1, 11.7.1, 12.3.1.1 a 12.9.1.1 a aminokyselinovou sekvencí zárodečné linie DP-50 (3-33), vyšel najevo zajímavý vzor. Navíc k faktu dispozice pro těžký řetězec DP-50 ve většině klonů, existuje relativně omezená hypermutace v protilátkách příbuzných s genem zárodečné linie DP-50. Například klony 3.1.1 a 11.2.1 neměly žádné mutace. Navíc mutace v dalších klonech jsou všeobecně konzervativní

změny týkající se substitucí aminokyselin s podobnými vlastnostmi s aminokyselinami v zárodečné linii. Mutace v mnoha sekvencích CDR1 a CDR2 jsou obzvláště konzervativní povahy. Tři těžké řetězce zobrazené na obrázku 2, 4.10.2, 4.13.1 a 4.14.3, jasně pocházejí od jednoho rekombinantního jevu (tj. pocházejí z totožného germinálního centra) a mají téměř totožnou sekvenci. Jestliže jsou tyto tři považovány za jednu sekvenci, pak z 10 rozdílných protilátek obsahujících DP50 těžký řetězec, jsou v CDR1 a CDR2 3 pozice, ve kterých je nepolární zbytek nahrazen jiným nepolárním zbytkem, 12, kdy je polární nenabitý zbytek nahrazen jiným polárním nenabitým zbytkem a 1, ve které je polární nabitý zbytek nahrazen jiným polárním nabitým zbytkem. Navíc jsou dvě pozice, ve kterých jsou dva zbytky, které jsou velice podobné strukturálně, glycin a alanin, substituovány navzájem. Jediné mutace, které nejsou striktně konzervativní, se týkají 3 substitucí polárního nabitého zbytku polárním nenabitým zbytkem a jedné substituce nepolárního zbytku polárním zbytkem.

Lehké řetězce těchto protilátek pocházejí z 5 rozdílných genů Vk. Gen A27 je zastoupen nejvíce a je zdrojem 6 odlišných lehkých řetězců. Srovnání těchto 6 sekvencí odhalilo dvě pozoruhodné charakteristické stránky. Zaprvé tři z nich, 4.8.1, 4.14.3 a 6.1.1, obsahují delece jednoho nebo dvou zbytků v CDR1, což je vzácný jev. Zadruhé, existuje silný důvod proti serinu v pozici šest v CDR3 zárodečné linie, a serin je v každé sekvenci nahrazen. To svědčí pro to, že serin v této pozici je nekompatibilní s vazbou CTLA-4.

Uznává se, že mnoho z výše identifikovaných aminokyselinových substitucí existuje v těsné blízkosti s CDR nebo v CDR. Zdá se, že tyto substituce mají určitý vliv na vazbu protilátky k molekule CTLA-4. Dále tyto substituce by mohly mít významný účinek na afinitu protilátek.

## Příklad 5

Analýza N-koncové aminokyselinové sekvence protilátek podle vynálezu

Aby se dále verifikovalo složení a struktura protilátek podle vynálezu identifikovaných výše, sekvencovali původci několik těchto protilátek s použitím sekvenačního přístroje Perkin-Elmer. Byly izolovány oba, těžký a kappa lehký řetězec protilátek, a purifikovány prostřednictvím preparativní gelové elektroforézy a elektropřenosu, a pak přímo sekvencovány, jak je popsáno v příkladu 6. Většina sekvencí těžkého řetězce byla blokována na svém amino-konci. Tyto protilátky byly tedy nejdříve ošetřeny pyroglutamátaminopeptidázou, a pak sekvencovány.

Výsledky tohoto pokusu jsou ukázány na obrázku 9. Obrázek 9 také poskytuje molekulovou hmotnost těžkého a lehkého řetězce, jak byly určeny hmotnostní spektroskopií (MALDI).

## Příklad 6

Další charakterizace protilátek podle vynálezu

Obrázek 10 poskytuje některé další charakteristické informace o určitých protilátkách podle vynálezu. Na obrázku jsou sumarizována data týkající se klonů 3.1.1, 4.1.1, 4.8.1, 4.14.3 a 6.1.1. Jsou poskytnuta následující data: koncentrace, izoelektrické "zaostřování" ("focusing") (IEF), SDS-PAGE, vylučovací chromatografie, FACS, hmotnostní spektroskopie (MALDI) a N-koncové sekvence lehkého řetězce.

Data všeobecně byla získávána následovně:

### Materiál a metody:

Proteinová koncentrace byla zjišťována při 280 nm z UV skenu (200 až 350 nm), kdy 1,58 jednotky absorbance při 280 nm odpovídalo 1 mg/ml.

SDS-PAGE byla prováděna s použitím elektroforetického systému s 10% gelem NuPAGE a pracovním pufrem MES. Vzorky byly připraveny ředěním 3:1 s 4x pufrem NuPAGE pro vzorky (+/-), beta-merkaptioethanolem, zahřátím a na gel bylo naneseno ~5 g proteinu. Gel byl pak obarven barvicím roztokem Brilliant Blue R (Sigma kat. č. B-6529) a molekulové hmotnosti byly vyhodnoceny srovnáním obarvených pásů se standardy „Perfect Protein Markers“ (Novagen kat. č. 69149-3).

Pro N-koncové sekvencování byly vzorky děleny tak, jak je uvedeno výše, na gelech NuPAGE, přeneseny na imobilizační membránu Pro Blot (Applied Biosystems), a pak obarveny modří Coomassie Blue R-250. Obarvené proteinové pásy byly vyříznuty a podrobeny sekvenační analýze pomocí automatizované Edmanovy degradace na sekvenačním přístroji Applied Biosystems 494 Procise HT Sequencer.

Izoelektrické zaostřování (IEF) bylo prováděno s použitím gelů Pharmacia IEF 3-9 pHast (kat. č. 17-0543-01). Vzorky byly naředěny 10% glycerolem na koncentraci ~0,8 mg/ml a 1  $\mu$ l byl nanesen na gel, a poté obarven. Hodnoty pI pak byly vyhodnoceny srovnáním obarvených pásů se standardy IEF pro široké rozmezí (pH 3 až 10) (Pharmacia, kat. č. 17-0471-01).

Vylučovací chromatografie (SEC) byla prováděna ve fyziologickém roztoku pufovaném fosfáty (PBS) na systému SMART Pharmacia s použitím kolony Superdex 75 PC 3.2/30. Molekulové hmotnosti byly vyhodnoceny srovnáním retenčního času vrcholu s retenčním časem gelu.

Pro studie FACS byly připraveny lidské periferní T lymfocyty a 48 hodin stimulovány. T lymfocyty byly jednou

promyty, resuspendovány ve FACS pufru v množství  $1 \times 10^6$  buněk/100  $\mu$ l a barveny na povrchovou expresi CD3 s 10  $\mu$ l anti-CD3-FITC (Immunotech, Marseille, Francie) po dobu 30 minut při teplotě místnosti. Buňky byly promyty dvakrát, pak fixovány, permeabilizovány (Fix and Perm, Caltag) a obarveny na intracelulární expresi CTLA-4 s 10  $\mu$ l anti-CD152-PE (Pharmingen). Průtoková cytometrie byla prováděna s použitím přístroje FACSort Becton Dickinson. Kvadranty byly ustanoveny analýzou relevantních izotypových kontrolních protilátek (Caltag).

Jak bylo diskutováno výše, bylo prokázáno, že anti-CTLA-4 protilátky mají spolehlivou silnou imunomodulační aktivitu. Následující pokusy byly prováděny proto, aby se určilo, jestli protilátky podle předkládaného vynálezu mají tuto aktivitu. Pokusy byly obecně navrženy pro stanovení schopnosti protilátek inhibovat interakci mezi molekulami CTLA-4 a B7, být selektivní pro molekuly CTLA-4, B7 a CD28 a podporovat produkci cytokinů T lymfocyty, včetně, ale bez omezení, exprese IL-2 a/nebo IFN- $\gamma$ . Dále se vyšetřovala zkřížená reaktivita protilátek podle vynálezu s některými lidskými tkáněmi a molekulami CTLA-4 jiných živočišných druhů (např. myši a primátů).

#### Příklad 7

Kompetitivní ELISA: inhibice interakce CTLA-4/B7-1 nebo B7-2 protilátkami podle vynálezu

Byl prováděn *in vitro* test, aby se určilo, jestli byly protilátky podle předkládaného vynálezu schopné inhibice vazby CTLA-4 s B7-1 nebo B7-2. Jak bylo uznáno, očekává se, že protilátky podle vynálezu, které jsou schopné inhibovat vazbu CTLA-4 s molekulami B7, jsou kandidáty pro regulaci

imunity prostřednictvím metabolické dráhy CTLA-4. V testu byly použity následující materiály a metody:

#### Materiály a metody

96-jamkové destičky MaxiSorp byly potaženy 3 nM B7.1-Ig(G1) nebo B7.2-Ig(G1) (Repligen, Inc. Needham, MA) v Dulbeccově PBS a inkubovány ve 4 °C přes noc. Druhý den byl B7-Ig odstraněn a destičky byly blokovány 1% BSA s 0,05% Tween-20 v D-PBS po dobu dvou hodin. Destičky byly promyty 3x promývacím pufrem (0,05% Tween-20 v D-PBS). Protilátky v příslušných testovaných koncentracích a CTLA-4-Ig(G4) (0,3 nM konečná koncentrace) (Repligen, Inc. Needham, MA) byly předem míchány po dobu 15 minut a pak přidány na destičku potaženou B7-Ig (60 µl celkový objem) a inkubovány při teplotě místnosti 1,5 hodiny. Destičky byly promyty 3x a bylo přidáno 50 µl ředění 1 až 1000 myší protilidské protilátky IgG4 konjugované s HRP (Zymed, San Francisco, CA, č. 05-3820) a destičky byly inkubovány 20 minut při teplotě místnosti, a pak bylo na destičku přidáno 50 µl 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Destičky byly odečítány ve 450 nm s použitím odečítacího zařízení pro destičky od Molecular Devices (Sunnyvale, CA). Všechny vzorky byly testovány v duplikátech. Maximální signál byl definován jako vazba CTLA-4 v nepřítomnosti testované protilátky. Nespecifická vazba byla definována jako absorbance v nepřítomnosti CTLA-4-Ig a testované protilátky.

Výsledky testu jsou uvedeny v tabulkách IIIA a IIIB. V tabulce IIIA jsou výsledky uvedeny pro celou řadu protilátek podle vynálezu. V tabulce IIIB jsou uvedeny výsledky srovnávající protilátku 4.1.1 podle vynálezu s protilátkou 11.2.1 podle vynálezu ze samostatného pokusu.

Tabulka IIIA

| Klon CTLA-4-Ig | Izotyp | CTLA-4/B7.2<br>komp. ELISA<br>IC50 (nM) | CTLA-4/B7.1<br>komp. ELISA<br>IC50 (nM) |
|----------------|--------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|
| CT3.1.1        | IgG2   | 0,45±0,07 (n=3)                         | 0,63±0,10 (n=2)                         |
| CT4.1.1        | IgG2   | 0,38±0,06 (n=5)                         | 0,50±0,05 (n=2)                         |
| CT4.8.1        | IgG2   | 0,57±0,03 (n=3)                         | 0,17±0,28 (n=2)                         |
| CT4.9.1        | IgG2   | Nekompetitivní<br>(n=3)                 | Nekompetitivní<br>(n=2)                 |
| CT4.10.2       | IgG2   | 1,50±0,37 (n=3)                         | 3,39±0,31 (n=2)                         |
| CT4.13.1       | IgG2   | 0,49±0,05 (n=3)                         | 0,98±0,11 (n=2)                         |
| CT4.14.3       | IgG2   | 0,69±0,11 (n=3)                         | 1,04±0,15 (n=2)                         |
| CT6.1.1        | IgG2   | 0,39±0,06 (n=3)                         | 0,67±0,07 (n=2)                         |

Tabulka IIIB

| Klon CTLA-4-Ig | Izotyp | CTLA-4/B7.2<br>komp. ELISA<br>IC50 (nM) | CTLA-4/B7.1<br>komp. ELISA<br>IC50 (nM) |
|----------------|--------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|
| CT4.1.1        | IgG2   | 0,55±0,08 (n=4)                         | 0,87±0,14 (n=2)                         |
| CT11.2.1       | IgG2   | 0,56±0,05 (n=4)                         | 0,81±0,24 (n=2)                         |

## Příklad 8

Poměr selektivity protilátek podle vynálezu k CTLA-4 ve srovnání s CD28 nebo B7-2

Byl prováděn další *in vitro* test, aby se určila selektivita protilátek podle vynálezu vzhledem k CTLA-4 buď proti CD28 nebo B7-2. V pokusech byly použity následující materiály a metody.

## ELISA na selektivitu CTLA-4: Materiály a metody

96-jamková destička FluroNUNC (Nunc kat. č. 475515) byla potažena čtyřmi antigeny: CTLA-4/Ig, CD44/Ig, CD28/Ig a B7.2/Ig (antigeny vytvořené ve vlastní laboratoři). Destička byla potahována přes noc ve 4 °C antigeny v koncentraci 1 g/ml v množství 100 µl/jamku v 0,1M pufru hydrogenuhlíčitanu sodném, pH 9,6. Destička pak byla promyta s PBST (PBS + 0,1% Tween-20) třikrát s použitím myčky destiček NUNC. Destička byla blokována s PPBST +0,5% BSA v množství 150 µl/jamku. Destička byla inkubována při teplotě místnosti po dobu 1 hodiny, a pak promyta třikrát s PBST. Pak byly naředěny anti-CTLA-4 protilátky podle vynálezu *en bloc* v 1 g/ml a byly přidány na destičku. Destička byla inkubována při teplotě místnosti po dobu 1 hodiny, a pak promyta třikrát s PBST. Jamky, které obsahovaly protilátky podle vynálezu, pak byly ošetřeny 100 µl/jamku proti-lidským IgG2-HRP (Southern Biotech kat. č. 9070-05) v ředění 1:4000 *en bloc*. Jedna řada byla také ošetřena proti-lidským IgG (Jackson kat. č. 209-035-088) pro normalizaci potažení destiček. Tato protilátka byla naředěna 1:5000 *en bloc* a přidána v množství 100 µl/jamku. Jedna řada byla také ošetřena proti-lidským CTLA-4-HRP (PharMingen, kat. č. 345815/konjugováno s HRP na přání zákazníka) jako pozitivní kontrola. Tato protilátka byla použita v množství 0,05 g/ml ředěná *en bloc*. Destička byla inkubována při teplotě místnosti po dobu 1 hodiny, a pak promyta třikrát s PBST. LBA chemiluminescenční substrát (Pierce) byl přidán v množství 100 µl/jamku a destička byla inkubována na třepačce destiček 5 minut. Destička pak byla odečtena s použitím zobrazovacího zařízení luminescence po 2 minutové expozici.

## Test selektivity vazby IGEN pro CTLA-4: materiály a metody

Perličky M-450 Dynabeads (Dynal A.S., Oslo, Norsko, č. 140.02) byly promyty 3x pufrům fosfátem sodným, pH 7,4, a resuspendovány v pufru fosfátu sodném. Ke 100  $\mu$ l perliček byl přidán 1,0 g CTLA-4-Ig(G1), 1,0 g CD28-Ig(G1) nebo 1,0 až 3,0 g B7.2-Ig(G1) (Repligen, Inc. Needham, MA) a byly inkubovány přes noc na rotátoru ve 4 °C. Druhý den byly perličky promyty 3x v 1% BSA plus 0,05% Tween-20 v Dulbeccově PBS a blokovány 30 minut. Perličky byly naředěny 1 až 10 blokujícím pufrům a 25  $\mu$ l potažených perliček bylo dáno do polypropylenových zkumavek 12x75 mm. Všechny vzorky byly testovány v duplikátu. Do zkumavek bylo přidáno 50  $\mu$ l testované protilátky (konečná koncentrace 1 g/ml) nebo blokujícího pufru a inkubováno 30 minut na karuselovém pásu analyzátoru Origen 1,5 (IGEN International, Inc., Gaithersburg, MD) při teplotě místnosti, vortexováno 100 rpm. Do zkumavek bylo přidáno 25  $\mu$ l myší proti-lidské IgG1, IgG2 nebo IgG4 s rutheniem (Zymed, Inc., San Francisco, CA, č. 05-3300, 05-3500 a 05-3800) (konečná koncentrace 3 g/ml ve 100  $\mu$ l celkového objemu). Zkumavky byly inkubovány 30 minut při teplotě místnosti na karuselovém pásu, vortexováno 100 rpm. Bylo přidáno 200  $\mu$ l pufru testu Origen (IGEN International, Inc., Gaithersburg, MD, č. 402-050-03) do každé zkumavky, krátce vortexováno, a pak byly zkumavky odečítány na analyzátoru Origen a pro každou zkumavku byly určeny jednotky ECL (elektrochemiluminiscence). Byly zjištěny noramlizační faktory pro opravu odchylek vazby fúzních proteinů na perličky Dynabeads a jednotky ECL byly korigovány na nespecifickou vazbu před výpočtem stupně selektivity.

Výsledky testů jsou uvedeny v tabulkách IVA a IVB.

Tabulka IVA

| Klon   | Izotyp | CTLA4/CD28<br>ELISA         | CTLA4/B7.2<br>ELISA         | CTLA4/CD44<br>ELISA         | CTLA4/CD28<br>IGEN          | CTLA4/B7.2<br>IGEN          |
|--------|--------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 3.1.1  | IgG2   | >500:1 (n=3)                | >500:1 (n=3)                | >500:1 (n=3)                | >500:1 (n=2)                | >500:1 (n=1)<br>195:1 (n=1) |
| 4.1.1  | IgG2   | >500:1 (n=3)                | >500:1 (n=2)<br>485:1 (n=1) | >500:1 (n=3)                | >500:1 (n=1)<br>261:1 (n=1) | >500:1 (n=1)<br>107:1 (n=1) |
| 4.8.1  | IgG2   | >500:1 (n=3)                | >500:1 (n=2)<br>190:1 (n=1) | >500:1 (n=3)                | >500:1 (n=2)                | >500:1 (n=2)                |
| 4.9.1  | IgG2   | >500:1 (n=2)<br>244:1 (n=1) | >500:1 (n=2)<br>33:1 (n=1)  | >500:1 (n=3)                | >500:1 (n=1)                | >500:1 (n=1)                |
| 4.10.2 | IgG2   | >500:1 (n=3)                | >500:1 (n=3)                | >500:1 (n=3)                | >500:1 (n=1)                | >500:1 (n=1)                |
| 4.13.1 | IgG2   | >500:1 (n=2)<br>46:1 (n=1)  | >500:1 (n=3)                | >500:1 (n=3)                | >500:1 (n=1)<br>329:1 (n=1) | >500:1 (n=2)                |
| 4.14.3 | IgG2   | >500:1 (n=2)<br>80:1 (n=1)  | >500:1 (n=2)<br>10:1 (n=1)  | >500:1 (n=2)<br>126:1 (n=1) | >413:1 (n=1)                | >234:1 (n=1)                |
| 6.1.1  | IgG2   | >500:1 (n=2)<br>52:1 (n=1)  | >500:1 (n=3)                | >500:1 (n=3)                | >500:1 (n=2)                | >500:1 (n=2)                |

Tabulka IVB

| Klon   | Izotyp | CTLA4/CD28<br>ELISA | CTLA4/B7.2<br>ELISA | CTLA4/hIgG<br>ELISA |
|--------|--------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 4.1.1  | IgG2   | >500:1 (n=3)        | >500:1 (n=2)        | >500:1 (n=3)        |
| 11.2.1 | IgG2   | >500:1 (n=3)        | >500:1 (n=3)        | >500:1 (n=3)        |

## Příklad 9

## Model buněčného signálu lidských T lymfocytů

Pro další vymezení aktivity protilátek podle vynálezu při působení jako regulátorů imunity, vyvinuli původci některé testy T lymfocytů, aby se kvantifikovalo zvýšení produkce IL-2 T lymfocyty při bloádě CTLA-4 signálu protilátkami. Při těchto pokusech byly použity následující materiály a metody:

## Materiály a metody

Čerstvě izolované lidské T lymfocyty byly připraveny a použitím Histopaque (Sigma, St. Louis, MO, č. A-70543) a T-kwik (Lympho-Kwik, One Lambda, Canoga Park, CA, č. LK-50-T) a stimulovány s PHA (1 g/ml) (purifikovaný fytohemagglutinin, Murex Diagnostics Ltd., Dartford, England, č. HA 16) v médiu (RPMI 1640 obsahující L-glutamin, MEM neesenciální aminokyseliny, penicilin, streptomycin, 25 mM Hepes a 10% FBS) v koncentraci  $1 \times 10^6$  buněk/ml a inkubovány ve 37 °C po 2 dny. Buňky byly promyty a naředěny médiem na  $2 \times 10^6$  buněk/ml. Buňky Raji (Burkittův lymfom, lidský, ATCC č.: CCL 86 Class II American Type Culture Collection, Rockville, MD) byly ošetřeny mitomycinem C (Sigma, St. Louis, MO, č. M-4287) (25 g/ml) jednu hodinu ve 37 °C. Buňky Raji byly promyty 4x v PBS a resuspendovány v množství  $2 \times 10^6$  buněk/ml. Lidské T lymfoblasty ( $5 \times 10^5$ /ml), buňky Raji ( $5 \times 10^5$ /ml) a anti-CTLA-4 protilátka nebo kontrolní protilátka souhlasného izotypu v různých koncentracích byly přidány na 96-jamkové mikrotitrační destičky a destičky byly inkubovány ve 37 °C po 72 hodin. Celkový objem jamky byl 200  $\mu$ l. 72 hodin po stimulaci byly destičky stočeny a supernatant byl odstraněn a zamražen pro pozdější zjišťování IL-2 (Quantikine IL-2 ELISA kit, R&D Systems, MN, č. D 2050) a IFN- (Quantikine IL-2

ELISA kit, R&D Systems). Zvýšení cytokinů bylo definováno jako rozdíl mezi hladinami cytokinů v tkáňových kulturách obsahujících anti-CTLA-4 blokující mAb proti kontrolní protilátce souhlasného izotypu. Pro experimenty s průtokovou cytometrií byly buňky Raji promyty 1x puforem FACS (PBS obsahující 2% teplem inaktivované FCS, 0,025% azid sodný). Buněčné pelety byly resuspendovány v pufru FACS v množství  $1 \times 10^6$  buněk/100  $\mu$ l a inkubovány s 10  $\mu$ l anti-CD80-PE (Becton Dickinson, San Josse, CA) nebo anti-CD86-PE (Pharmingen, San Diego) po dobu 30 minut při teplotě místnosti. Buňky byly promyty dvakrát a resuspendovány v 1 ml pufru FACS. Průtoková cytometrie byla prováděna s použitím přístroje Becton Dickinson FACSort. Histogramové markery byly nastavené analýzou relevantních izotypových kontrolních protilátek (Caltag, Burlingame, CA).

Původci obecně vyvinuly test, který může být použit pro rychlé určení aktivace IL-2 T lymfocyty. Jak bylo uznáno, stimulace T lymfocytů je závislá na B7 a CD28. Navíc promyté T blasty netvořily zjistitelný IL-2 a buňky Raji netvořily zjistitelný IL-2, dokonce ani když byly stimulovány LPS neb PWM. Ale, v kombinaci, T blasty společně pěstované s buňkami Raji mohou modelovat signální jevy B7, CTLA-4 a CD28 a může na nich tedy být hodnocen účinek protilátek.

Obrázek 11 ukazuje expresi B7-1 a B7-2 na buňkách Raji při použití anti-CD80-PE a anti-CD86-Pe mAb a s použitím průtokové cytometrie (FACS), jak je popsáno v příkladu 6.

Obrázek 12 ukazuje na koncentraci závislé zvýšení produkce IL-2 v testu s T lymfoblasty/Raji indukované protilátkami blokujícími CTLA-4 (BNI3 (Pharmingen) a 4.1.1, 4.8.6 a 6.1.1 protilátkami podle vynálezu).

Obrázek 13 ukazuje na koncentraci závislé zvýšení produkce IFN- v testu s T lymfoblasty/Raji indukované protilátkami blokujícími CTLA-4 (BNI3 (Pharmingen) a 4.1.1,

4.8.6 a 6.1.1 protilátkami podle vynálezu) (stejně dárcovské T lymfocyty).

Obrázek 14 ukazuje průměrné zvýšení produkce IL-2 v T lymfocytech od 6 dárců indukované protilátkami blokujícími CTLA-4 v testu s T lymfoblasty/Raji. Je zajímavé zvážit, že mAb CT4.9.1 se váže na CTLA-4, ale neblokuje vazbu B7. Tedy pouhá vazba na CTLA-4 nepostačuje sama zajistit funkční protilátku podle vynálezu.

Obrázek 15 ukazuje průměrné zvýšení produkce IFN- v T lymfocytech od 6 dárců indukované protilátkami blokujícími CTLA-4 v testu s T lymfoblasty/Raji.

Obrázek 19 ukazuje srovnání mezi 4.1.1 a 11.2.1 protilátkami podle vynálezu v koncentraci 30 g/ml v 72 hodinovém testu s T lymfoblasty/Raji, jak bylo popsáno v tomto příkladu 9 a v testu se superantigenem popsaném v příkladu 10.

Obrázek 20 ukazuje na koncentraci závislé zvýšení produkce IL-2 v testu s T lymfoblasty/Raji indukované 4.1.1 a 11.2.1 CTLA-4 protilátkami podle vynálezu.

Následující tabulka IVC poskytuje informaci týkající se průměrného zvýšení a rozsahu zvýšení cytokinové odpovědi v testech Raji a SEA podle vynálezu. Každý z pokusů zahrnutých ve výsledcích je založen na protilátce v dávce 30 g/ml a měřen v 72 hodinách. Jsou uvedeny počty dárců zúčastněných v pokusech, jakož i odpovědi.

Tabulka IVC

| Test                   | mAb    | Cytokin | Průměrné<br>zvýšení pg/ml | SEM | Rozsah<br>zvýšení pg/ml | n  | Reakce<br>dárců |
|------------------------|--------|---------|---------------------------|-----|-------------------------|----|-----------------|
| T lymfoblasty/<br>Raji | 4.1.1  | IL-2    | 3329                      | 408 | 0 až 8861               | 42 | 19 z 21         |
| T lymfoblasty/<br>Raji | 4.1.1  | IFN-    | 3630                      | 980 | 600 až 13939            | 17 | 13 ze 13        |
| T lymfoblasty/<br>Raji | 11.2.1 | IL-2    | 3509                      | 488 | 369 až 6424             | 18 | 14 ze 14        |
| SEA (PBMC)             | 4.1.1  | IL-2    | 2800                      | 312 | 330 až 6699             | 42 | 17 ze 17        |
| SEA (PBMC)             | 11.2.1 | IL-2    | 2438                      | 366 | 147 až 8360             | 25 | 15 z 15         |
| SEA (plná krev)        | 4.1.1  | IL-2    | 6089                      | 665 | -168 až 18417           | 46 | 15 ze 17        |
| SEA (plná krev)        | 11.2.1 | IL-2    | 6935                      | 700 | -111 až 11803           | 25 | 12 z 14         |

## Příklad 10

## Model signálu T lymfocytů u člověka

Původci vyvinuli druhý buněčný test, aby se kvantifikovalo zvýšení aktivace IL-2 T lymfocyty při blokádě signálu CTLA-4 protilátkami. Při těchto pokusech byly použity následující materiály a metody:

## Materiály a metody

Lidské PBMC byly připraveny s použitím Accuspin. Mikrotitrační destičky byly předem potaženy s anti-CD3 protilátkou (leu4, Becton Dickinson) (60 ng/ml) a inkubovány 2 hodiny ve 37 °C. Do jamek byly přidány hPBMC v množství 200 000 buněk na jamku. Do jamek byl přidán stafylokokový enterotoxin A (SEA) (Sigma) v koncentraci 100 ng/ml. Do jamek byly přidány protilátky, obvykle v koncentraci 30 g/ml. Pak byly buňky stimulovány 48, 72 nebo 96 hodin. Destičky byly

stočeny v žádoucím časovém bodu a z jamek byl odstraněn supernatant. Potom byla v supernatantu vyšetřována produkce IL-2 s použitím ELISA (R&D Systems).

Výsledky z těchto pokusů jsou ukázány na obrázcích 16, 17 a 21. Na obrázku 16 byla měřena indukce produkce IL-2 v hPBMC od 5 dárců 72 hodin po stimulaci. Na obrázku 17 jsou ukázány výsledky z měření plné krve rozebírající rozdíl v indukci produkce IL-2 v krvi 3 dárců, jak byla měřena 72 a 96 hodin po stimulaci.

Na obrázku 21 je zvýšení produkce IL-2 v plné krvi 2 dárců, jak měřeno 72 hodin po stimulaci.

#### Příklad 11

##### Model nádoru u zvířat

Původci nastolili modle nádoru u zvířat pro *in vivo* analýzu proti-myších CTLA-4 protilátek při inhibici nádorového růstu. V tomto modelu nádoru je pěstován myší fibrosarkom a zvířata jsou ošetřována proti-myšími CTLA-4 protilátkami. Materiály a metody pro zavedení modelu jsou poskytnuty níže:

##### Materiály a metody

Samicím myší A/J (ve věku 6 až 8 týdnů) byly podány subkutánní injekce do dorzální strany krku s 0,2 ml nádorových buněk Sa1N ( $1 \times 10^6$ ) (Baskar 1995). Intraperitoneální injekcí byla podána proti-myší CTLA-4 nebo kontrolní protilátka souhlasného izotypu (Phramingen, San Diego, CA, 200 g/zvíře) ve dnech 0, 4, 7 a 14 po injekci nádorových buněk. Nádor byl měřen v průběhu 3 až 4 týdnů pokusů s použitím elektronického kaliperu Starrett SPC Plus

(Athol, MA) a velikost nádoru byla vyjádřena jako povrchová oblast postižená růstem nádoru ( $\text{mm}^2$ ).

Obrázek 18 ukazuje inhibici nádorového růstu při proti-myší CTLA-4 protilátce v modelu nádoru myšího fibrosarkomu. Jak je ukázáno na obrázku 18, u zvířat ošetřených s anti-CTLA-4 nastala redukce nádorového růstu ve srovnání se zvířaty ošetřenými izotypovou kontrolní protilátkou. Podle toho jsou proti-myší CTLA-4 mAb schopné inhibovat růst fibrosarkomu v modelu myšího nádoru.

Lze očekávat, že protilátky, které reagují zkříženě s myším CTLA-4, se budou v tomto modelu chovat podobně. Ale žádná z protilátek podle vynálezu, u kterých byla zkoumána zkřížená reaktivita, nereaguje zkříženě s myším CTLA-4.

#### Příklad 12

##### Model nádoru u zvířat

Aby se dále zkoumala aktivita protilátek podle vynálezu, byl navržen model xenoimplantátu myší SCID pro testování eradikace zjištěných nádorů a jejich metastáz. V tomto modelu jsou myším SCID podány jako štěp lidské T lymfocyty a myším jsou implantovány buňky pocházející z velkobuněčného plicního karcinomu (NSCL) nebo kolorektálního (CC) karcinomu pacientů. Implantace se provádí do tukových polštářků v gonádách myší SCID. Tumory se ponechají narůst, a pak se odstraní. U myší se rozvinuly nádorové metastázy jater podobné lidskému nádoru. Tento model je popsán v práci Bumpers et al., J. Surgical Res., 61, 282-288, 1996).

Očekává se, že protilátky podle vynálezu budou inhibovat růst nádorů tvořených u těchto myší.

SEZNAM SEKVENCÍ

Nukleotidové a aminokyselinové sekvence jsou uvedeny ve formě seznamu podle WIPO standardu 25.

Všechny uvedené sekvence jsou lidského původu, v popisném poli <213> angl. termín "human" označuje zdroj sekvence *Homo sapiens*.

<210> 1  
 <211> 463  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 1  
 Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly  
 1 5 10 15  
 Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln  
 20 25 30  
 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
 35 40 45  
 Ser Ser His Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 50 55 60  
 Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Arg Asn Lys Tyr Tyr Ala  
 65 70 75 80  
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn  
 85 90 95  
 Thr Leu Phe Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
 100 105 110  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly His Phe Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly  
 115 120 125  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
 130 135 140  
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala  
 145 150 155 160  
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
 165 170 175  
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
 180 185 190  
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
 195 200 205  
 Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His  
 210 215 220  
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys

```

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

```

```

<210> 2
<211> 464
<212> PRT
<213> Human

```

```

<400> 2
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
1          5          10          15
Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
          20          25          30
Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe
          35          40          45
Ser Asn Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
          50          55          60
Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys His Tyr Gly
65          70          75          80
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn Ser Lys Asn
          85          90          95
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
          100          105          110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Glu Arg Leu Gly Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp
          115          120          125
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
          130          135          140
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
145          150          155          160
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
          165          170          175
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
          180          185          190
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr

```

```

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

```

```

<210> 3
<211> 163
<212> PRT
<213> Human

```

```

<400> 3
Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
1      5      10      15
Ser Ser His Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
20      25      30
Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Arg Asn Lys Asp Tyr Ala
35      40      45
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Lys
50      55      60
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
65      70      75      80
Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Ala Pro Leu Gly Pro Leu Asp Tyr Trp Gly
85      90      95
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
100      105      110
Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
115      120      125
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
130      135      140
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
145      150      155      160
Val Leu Gln

```

<210> 4  
 <211> 463  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 4

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Glu | Phe | Gly | Leu | Ser | Trp | Val | Phe | Leu | Val | Ala | Leu | Leu | Arg | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Val | Gln | Cys | Gln | Val | Gln | Leu | Val | Glu | Ser | Gly | Gly | Gly | Val | Val | Glu |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Pro | Gly | Arg | Ser | Leu | Arg | Leu | Ser | Cys | Thr | Ala | Ser | Gly | Phe | Thr | Phe |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Ser | Ser | Tyr | Gly | Met | His | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Lys | Gly | Leu |
|     |     | 50  |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Glu | Trp | Val | Ala | Val | Ile | Trp | Tyr | Asp | Gly | Ser | Asn | Lys | His | Tyr | Ala |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     | 75  |     |     |     |     |     | 80  |
| Asp | Ser | Ala | Lys | Gly | Arg | Phe | Thr | Ile | Ser | Arg | Asp | Asn | Ser | Lys | Asn |
|     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     |     | 95  |     |
| Thr | Leu | Tyr | Leu | Gln | Met | Asn | Ser | Leu | Arg | Ala | Glu | Asp | Thr | Ala | Val |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Tyr | Tyr | Cys | Ala | Arg | Ala | Gly | Leu | Leu | Gly | Tyr | Phe | Asp | Tyr | Trp | Gly |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Gln | Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser |
|     |     | 130 |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Val | Phe | Pro | Leu | Ala | Pro | Cys | Ser | Arg | Ser | Thr | Ser | Glu | Ser | Thr | Ala |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Ala | Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val |
|     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     |     | 175 |     |
| Ser | Trp | Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala |
|     |     | 180 |     |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Val | Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Pro | Ser | Ser | Asn | Phe | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Thr | Cys | Asn | Val | Asp | His |
|     |     | 210 |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Thr | Val | Glu | Arg | Lys | Cys | Cys |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     |     | 235 |     |     |     | 240 |
| Val | Glu | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Pro | Val | Ala | Gly | Pro | Ser | Val |
|     |     |     | 245 |     |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr |
|     |     | 260 |     |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| Val | Gln | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys |
|     |     | 290 |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Phe | Asn | Ser | Thr | Phe | Arg | Val | Val | Ser |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     |     | 315 |     |     |     | 320 |
| Val | Leu | Thr | Val | Val | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys |
|     |     |     | 325 |     |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |
| Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Gly | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile |
|     |     | 340 |     |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |
| Ser | Lys | Thr | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | Leu | Pro |
|     |     | 355 |     |     |     | 360 |     |     |     |     |     | 365 |     |     |     |
| Pro | Ser | Arg | Glu | Glu | Met | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu | Thr | Cys | Leu |
|     |     | 370 |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |
| Val | Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Trp | Glu | Ser | Asn |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |
| Gly | Gln | Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro | Met | Leu | Asp | Ser |
|     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     |     | 415 |     |
| Asp | Gly | Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr | Val | Asp | Lys | Ser | Arg |

420                      425                      430  
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
          435                      440                      445  
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
          450                      455                      460

<210> 5  
 <211> 169  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 5  
 Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser  
 1                      5                      10                      15  
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro  
          20                      25                      30  
 Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn  
          35                      40                      45  
 Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp  
          50                      55                      60  
 Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu  
 65                      70                      75                      80  
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ala Arg Ile Ile Thr Pro  
          85                      90                      95  
 Cys Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala  
          100                      105                      110  
 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser  
          115                      120                      125  
 Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe  
          130                      135                      140  
 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly  
 145                      150                      155                      160  
 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
                                  165

<210> 6  
 <211> 167  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 6  
 Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser  
 1                      5                      10                      15  
 Gly Phe Ile Phe Ser Ser His Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro  
          20                      25                      30  
 Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Arg Asn  
          35                      40                      45  
 Lys Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp  
          50                      55                      60  
 Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu  
 65                      70                      75                      80  
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Ala Pro Leu Gly Pro Leu  
          85                      90                      95  
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr  
          100                      105                      110  
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser  
          115                      120                      125  
 Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu  
          130                      135                      140  
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His  
 145                      150                      155                      160

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
165

<210> 7  
<211> 172  
<212> PRT  
<213> Human

<400> 7  
Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Ile Leu Ser Leu Thr Cys  
1 5 10 15  
Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly Gly His Tyr Trp Ser Trp  
20 25 30  
Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr  
35 40 45  
Tyr Ile Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr  
50 55 60  
Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser  
65 70 75 80  
Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly  
85 90 95  
Asp Tyr Tyr Gly Ile Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val  
100 105 110  
Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys  
115 120 125  
Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys  
130 135 140  
Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu  
145 150 155 160  
Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
165 170

<210> 8  
<211> 153  
<212> PRT  
<213> Human

<400> 8  
Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
1 5 10 15  
Ser Ser His Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
20 25 30  
Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Arg Asn Lys Asp Tyr Ala  
35 40 45  
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn  
50 55 60  
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
65 70 75 80  
Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Ala Pro Leu Gly Pro Leu Asp Tyr Trp Gly  
85 90 95  
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
100 105 110  
Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala  
115 120 125  
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
130 135 140  
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
145 150

<210> 9  
<211> 167

<212> PRT  
<213> Human

<220>

<400> 9

```

Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 1          5          10          15
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro
          20          25          30
Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn
          35          40          45
Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
          50          55          60
Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
65          70          75          80
Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Arg Gly Ala Thr Leu
          85          90          95
Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Arg Xaa Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
          100          105          110
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
          115          120          125
Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
          130          135          140
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145          150          155          160
Ala Leu Thr Ser Gly Val His
          165

```

<210> 10  
<211> 151  
<212> PRT  
<213> Human

<400> 10

```

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

```

<210> 11  
<211> 146  
<212> PRT  
<213> Human

&lt;220&gt;

&lt;400&gt; 11

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

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 174

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 12

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

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 163

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 13

Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe  
 1 5 10 15

```

Thr Phe Ser Asn Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
      20      25      30
Gly Leu Glu Trp Val Val Val Ile Trp His Asp Gly Asn Asn Lys Tyr
      35      40      45
Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
      50      55      60
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
      65      70      75      80
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gln Gly Thr Gly Trp Tyr Gly Gly
      85      90      95
Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
      100      105      110
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr
      115      120      125
Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
      130      135      140
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
      145      150      155      160
His Thr Phe

```

```

<210> 14
<211> 235
<212> PRT
<213> Human

```

```

<400> 14
Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
  1      5      10      15
Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
      20      25      30
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
      35      40      45
Ile Ser Ser Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala
      50      55      60
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
      65      70      75      80
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
      85      90      95
Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
      100      105      110
Gly Thr Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
      115      120      125
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
      130      135      140
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
      145      150      155      160
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
      165      170      175
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
      180      185      190
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
      195      200      205
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
      210      215      220
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
      225      230      235

```

```

<210> 15
<211> 233
<212> PRT

```

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 15

```

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

```

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 139

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 16

```

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

```

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 234

22.05.01

107

<212> PRT  
<213> Human

<400> 17

```

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

```

<210> 18  
<211> 152  
<212> PRT  
<213> Human

<400> 18

```

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

```

22.08.01

108

<210> 19  
 <211> 142  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 19  
 Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser  
 1 5 10 15  
 Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln  
 20 25 30  
 Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Pro Ser Ser  
 35 40 45  
 Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Ser Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr  
 50 55 60  
 Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Leu  
 65 70 75 80  
 Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly  
 85 90 95  
 Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile  
 100 105 110  
 Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val  
 115 120 125  
 Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln  
 130 135 140

<210> 20  
 <211> 155  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 20  
 Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys Glu Lys Val Thr Ile Thr  
 1 5 10 15  
 Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser Leu His Trp Tyr Gln Gln  
 20 25 30  
 Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser  
 35 40 45  
 Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
 50 55 60  
 Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr  
 65 70 75 80  
 Tyr Cys His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr  
 85 90 95  
 Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe  
 100 105 110  
 Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys  
 115 120 125  
 Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val  
 130 135 140  
 Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu  
 145 150 155

<210> 21  
 <211> 146  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 21  
 Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu  
 1 5 10 15

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

<210> 22  
 <211> 139  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 22  
 Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
 1 5 10 15  
 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ser Tyr Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys  
 20 25 30  
 Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln  
 35 40 45  
 Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe  
 50 55 60  
 Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr  
 65 70 75 80  
 Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys  
 85 90 95  
 Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro  
 100 105 110  
 Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu  
 115 120 125  
 Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val  
 130 135

<210> 23  
 <211> 134  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 23  
 Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr  
 1 5 10 15  
 Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Ser Arg Tyr Leu Asn Trp Tyr  
 20 25 30  
 Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Phe Leu Ile Tyr Val Ala Ser  
 35 40 45  
 Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Gly Phe Ser Ala Ser Gly Ser Gly  
 50 55 60  
 Pro Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala  
 65 70 75 80  
 Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro

22.06.01

110

85 90 95  
 Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe  
 100 105 110  
 Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val  
 115 120 125  
 Val Cys Leu Leu Asn Asn  
 130

<210> 24  
 <211> 150  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 24  
 Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr  
 1 5 10 15  
 Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Cys Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr  
 20 25 30  
 Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Val Leu Ile Tyr Ala Ala Ser  
 35 40 45  
 Ser Leu Gln Gly Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly  
 50 55 60  
 Ile Asp Cys Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala  
 65 70 75 80  
 Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ile Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro  
 85 90 95  
 Gly Thr Arg Val Asp Ile Glu Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe  
 100 105 110  
 Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val  
 115 120 125  
 Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp  
 130 135 140  
 Lys Val Asp Asn Ala Tyr  
 145 150

<210> 25  
 <211> 139  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 25  
 Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys  
 1 5 10 15  
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn  
 20 25 30  
 Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys  
 35 40 45  
 Val Ser Asn Trp Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp  
 65 70 75 80  
 Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly Ser His Trp Pro Pro Thr Phe  
 85 90 95  
 Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser  
 100 105 110  
 Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala  
 115 120 125  
 Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro  
 130 135

<210> 26

22.05.01

111

<211> 133  
<212> PRT  
<213> Human

<400> 26

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

<210> 27  
<211> 364  
<212> PRT  
<213> Human

<400> 27

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

22.05.01

112

245 250 255  
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg  
 260 265 270  
 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly  
 275 280 285  
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro  
 290 295 300  
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser  
 305 310 315 320  
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln  
 325 330 335  
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
 340 345 350  
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 355 360

<210> 28  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 28  
 Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser  
 1 5 10

<210> 29  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 29  
 Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile  
 1 5 10 15  
 Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val  
 20 25 30  
 Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys  
 35 40 45  
 Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser  
 50 55 60  
 Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln  
 65 70 75 80  
 Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu  
 85 90 95  
 Met Tyr Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile  
 100 105 110  
 Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys  
 115 120

<210> 30  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 30  
 Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala  
 1 5 10

<210> 31  
 <211> 89  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 31  
 Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser  
 1 5 10 15  
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro  
 20 25 30  
 Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn  
 35 40 45  
 Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp  
 50 55 60  
 Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu  
 65 70 75 80  
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 85

<210> 32  
 <211> 169  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 32  
 Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser  
 1 5 10 15  
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro  
 20 25 30  
 Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn  
 35 40 45  
 Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp  
 50 55 60  
 Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu  
 65 70 75 80  
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ala Arg Ile Ile Thr Pro  
 85 90 95  
 Cys Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala  
 100 105 110  
 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser  
 115 120 125  
 Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe  
 130 135 140  
 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly  
 145 150 155 160  
 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
 165

<210> 33  
 <211> 167  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 33  
 Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser  
 1 5 10 15  
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser His Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro  
 20 25 30  
 Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Arg Asn  
 35 40 45  
 Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp  
 50 55 60  
 Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu  
 65 70 75 80  
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly His Phe Gly Pro Phe

```

      85          90          95
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
      100          105          110
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser
      115          120          125
Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
      130          135          140
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
      145          150          155          160
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
      165

```

```

<210> 34
<211> 166
<212> PRT
<213> Human

```

```

      <400> 34
Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser
  1          5          10          15
Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro
      20          25          30
Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn
      35          40          45
Lys His Tyr Gly Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp
      50          55          60
Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
      65          70          75          80
Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Glu Arg Leu Gly Ser Tyr
      85          90          95
Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
      100          105          110
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr
      115          120          125
Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
      130          135          140
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
      145          150          155          160
His Thr Phe Pro Ala Val
      165

```

```

<210> 35
<211> 167
<212> PRT
<213> Human

```

```

      <400> 35
Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser
  1          5          10          15
Gly Phe Ile Phe Ser Ser His Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro
      20          25          30
Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Arg Asn
      35          40          45
Lys Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
      50          55          60
Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
      65          70          75          80
Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Ala Pro Leu Gly Pro Leu
      85          90          95
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
      100          105          110

```

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser  
                   115                  120                  125  
 Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu  
           130                  135                  140  
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His  
 145                  150                  155                  160  
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
                           165

<210> 36  
 <211> 153  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 36  
 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
   1                  5                  10                  15  
 Ser Ser His Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
           20                  25                  30  
 Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Arg Asn Lys Asp Tyr Ala  
           35                  40                  45  
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn  
   50                  55                  60  
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
  65                  70                  75                  80  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Ala Pro Leu Gly Pro Leu Asp Tyr Trp Gly  
           85                  90                  95  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
           100                  105                  110  
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala  
           115                  120                  125  
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
           130                  135                  140  
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 145                  150

<210> 37  
 <211> 163  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 37  
 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
   1                  5                  10                  15  
 Ser Ser His Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
           20                  25                  30  
 Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Arg Asn Lys Asp Tyr Ala  
           35                  40                  45  
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Lys  
   50                  55                  60  
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
  65                  70                  75                  80  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Ala Pro Leu Gly Pro Leu Asp Tyr Trp Gly  
           85                  90                  95  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
           100                  105                  110  
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala  
           115                  120                  125  
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
           130                  135                  140  
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

145  
Val Leu Gln

150

155

160

<210> 38  
<211> 138  
<212> PRT  
<213> Human

<400> 38

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

<210> 39  
<211> 167  
<212> PRT  
<213> Human

<220>

<400> 39

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Val | Val | Gln | Pro | Gly | Arg | Ser | Leu | Arg | Leu | Ser | Cys | Ala | Ala | Ser |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Gly | Phe | Thr | Phe | Ser | Ser | Tyr | Gly | Met | His | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro |
|     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |     |
| Gly | Lys | Gly | Leu | Glu | Trp | Val | Ala | Val | Ile | Trp | Tyr | Asp | Gly | Ser | Asn |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Lys | Tyr | Tyr | Ala | Asp | Ser | Val | Lys | Gly | Arg | Phe | Thr | Ile | Ser | Arg | Asp |
| 50  |     |     |     |     |     | 55  |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |
| Asn | Ser | Lys | Asn | Thr | Leu | Tyr | Leu | Gln | Met | Asn | Ser | Leu | Arg | Ala | Glu |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |
| Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | Ala | Arg | Asp | Pro | Arg | Gly | Ala | Thr | Leu |
|     |     |     | 85  |     |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Tyr | Tyr | Tyr | Tyr | Tyr | Arg | Xaa | Asp | Val | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Thr | Val |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Pro | Leu | Ala |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Pro | Cys | Ser | Arg | Ser | Thr | Ser | Glu | Ser | Thr | Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | Leu |
| 130 |     |     |     |     |     | 135 |     |     |     | 140 |     |     |     |     |     |
| Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | Asn | Ser | Gly |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     | 160 |     |
| Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     |     | 165 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

<210> 40

22-05-01

117

<211> 150  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 40  
 Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser  
 1 5 10 15  
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro  
 20 25 30  
 Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser His  
 35 40 45  
 Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp  
 50 55 60  
 Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu  
 65 70 75 80  
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ala Val Val Val Pro Ala  
 85 90 95  
 Ala Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala  
 100 105 110  
 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser  
 115 120 125  
 Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe  
 130 135 140  
 Pro Glu Pro Val Thr Val  
 145 150

<210> 41  
 <211> 146  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 41  
 Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly  
 1 5 10 15  
 Phe Thr Phe Ser Ser Cys Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly  
 20 25 30  
 Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Ser Asp Gly Ser His Lys  
 35 40 45  
 Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn  
 50 55 60  
 Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
 65 70 75 80  
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Thr Met Ile Val Val Gly Thr  
 85 90 95  
 Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser  
 100 105 110  
 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr  
 115 120 125  
 Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro  
 130 135 140  
 Glu Pro  
 145

<210> 42  
 <211> 171  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 42  
 Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser  
 1 5 10 15

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro  
                   20                  25                  30  
 Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn  
                   35                  40                  45  
 Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp  
                   50                  55                  60  
 Asn Ser Lys Ser Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu  
 65                  70                  75                  80  
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Tyr Tyr Asp Phe Trp  
                   85                  90                  95  
 Ser Gly Arg Gly Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr  
                   100                  105                  110  
 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro  
                   115                  120                  125  
 Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val  
                   130                  135                  140  
 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala  
 145                  150                  155                  160  
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
                   165                  170

<210> 43  
 <211> 163  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 43  
 Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe  
 1                  5                  10                  15  
 Thr Phe Ser Asn Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys  
                   20                  25                  30  
 Gly Leu Glu Trp Val Val Val Ile Trp His Asp Gly Asn Asn Lys Tyr  
                   35                  40                  45  
 Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser  
                   50                  55                  60  
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr  
 65                  70                  75                  80  
 Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gln Gly Thr Gly Trp Tyr Gly Gly  
                   85                  90                  95  
 Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser  
                   100                  105                  110  
 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr  
                   115                  120                  125  
 Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro  
                   130                  135                  140  
 Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val  
 145                  150                  155                  160  
 His Thr Phe

<210> 44  
 <211> 76  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 44  
 Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile  
 1                  5                  10                  15  
 Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr  
                   20                  25                  30  
 Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile

35 40 45  
 Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val  
 50 55 60  
 Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 65 70 75

<210> 45  
 <211> 172  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 45  
 Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Ile Leu Ser Leu Thr Cys  
 1 5 10 15  
 Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly Gly His Tyr Trp Ser Trp  
 20 25 30  
 Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr  
 35 40 45  
 Tyr Ile Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr  
 50 55 60  
 Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser  
 65 70 75 80  
 Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly  
 85 90 95  
 Asp Tyr Tyr Gly Ile Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val  
 100 105 110  
 Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys  
 115 120 125  
 Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys  
 130 135 140  
 Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu  
 145 150 155 160  
 Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
 165 170

<210> 46  
 <211> 96  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 46  
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser  
 20 25 30  
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
 35 40 45  
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
 65 70 75 80  
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro  
 85 90 95

<210> 47  
 <211> 141  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 47  
 Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu

```

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

```

<210> 48  
 <211> 141  
 <212> PRT  
 <213> Human

```

<400> 48
Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu
1           5           10           15
Ser Cys Arg Thr Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
      20           25           30
Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg
      35           40           45
Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
      50           55           60
Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr
65           70           75           80
Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ile Ser Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr
      85           90           95
Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
      100          105          110
Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
      115          120          125
Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
      130          135          140

```

<210> 49  
 <211> 139  
 <212> PRT  
 <213> Human

```

<400> 49
Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg
1           5           10           15
Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
      20           25           30
Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
      35           40           45
Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
      50           55           60
Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
65           70           75           80
Gln Gln Tyr Gly Arg Ser Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val
      85           90           95

```

Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro  
                   100                  105                  110  
 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu  
                   115                  120                  125  
 Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln  
                   130                  135

<210> 50  
 <211> 142  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 50  
 Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu  
   1                  5                  10                  15  
 Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln  
                   20                  25                  30  
 Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Leu Ile Tyr Gly Val Ser Ser  
                   35                  40                  45  
 Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr  
                   50                  55                  60  
 Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val  
   65                  70                  75                  80  
 Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ile Ser Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly  
                   85                  90                  95  
 Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile  
                   100                  105                  110  
 Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val  
                   115                  120                  125  
 Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln  
                   130                  135                  140

<210> 51  
 <211> 142  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 51  
 Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser  
   1                  5                  10                  15  
 Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln  
                   20                  25                  30  
 Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Pro Ser Ser  
                   35                  40                  45  
 Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Ser Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr  
                   50                  55                  60  
 Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Leu  
   65                  70                  75                  80  
 Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly  
                   85                  90                  95  
 Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile  
                   100                  105                  110  
 Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val  
                   115                  120                  125  
 Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln  
                   130                  135                  140

<210> 52  
 <211> 146  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 52  
 Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu  
 1 5 10 15  
 Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln  
 20 25 30  
 Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser  
 35 40 45  
 Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr  
 50 55 60  
 Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val  
 65 70 75 80  
 Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Arg Ser Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly  
 85 90 95  
 Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile  
 100 105 110  
 Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val  
 115 120 125  
 Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys  
 130 135 140  
 Gly Gly  
 145

<210> 53  
 <211> 95  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 53  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Ala Ala Ser Ser 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 Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro  
 85 90 95

<210> 54  
 <211> 152  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 54  
 Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile  
 1 5 10 15  
 Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Thr Tyr Leu Ile Trp Tyr Gln  
 20 25 30  
 Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Phe Leu Ile Ser Ala Thr Ser Ile  
 35 40 45  
 Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr  
 50 55 60  
 Asn Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu His Pro Glu Asp Phe Ala Thr  
 65 70 75 80  
 Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly  
 85 90 95  
 Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile

100 105 110  
 Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val  
 115 120 125  
 Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys  
 130 135 140  
 Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly  
 145 150

<210> 55  
 <211> 139  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 55  
 Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
 1 5 10 15  
 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ser Tyr Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys  
 20 25 30  
 Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln  
 35 40 45  
 Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe  
 50 55 60  
 Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr  
 65 70 75 80  
 Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys  
 85 90 95  
 Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro  
 100 105 110  
 Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu  
 115 120 125  
 Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val  
 130 135

<210> 56  
 <211> 134  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 56  
 Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr  
 1 5 10 15  
 Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Ser Arg Tyr Leu Asn Trp Tyr  
 20 25 30  
 Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Phe Leu Ile Tyr Val Ala Ser  
 35 40 45  
 Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Gly Phe Ser Ala Ser Gly Ser Gly  
 50 55 60  
 Pro Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala  
 65 70 75 80  
 Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro  
 85 90 95  
 Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe  
 100 105 110  
 Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val  
 115 120 125  
 Val Cys Leu Leu Asn Asn  
 130

<210> 57  
 <211> 150  
 <212> PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 57

```

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

```

&lt;210&gt; 58

&lt;211&gt; 96

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 58

```

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

```

&lt;210&gt; 59

&lt;211&gt; 155

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 59

```

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

```

Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe  
                   100                  105                  110  
 Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys  
                   115                  120                  125  
 Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val  
                   130                  135                  140  
 Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu  
 145                  150                  155

<210> 60  
 <211> 100  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 60  
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly  
 1                  5                  10                  15  
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser  
                   20                  25                  30  
 Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
                   35                  40                  45  
 Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro  
                   50                  55                  60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65                  70                  75                  80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly  
                   85                  90                  95  
 Thr His Trp Pro  
                   100

<210> 61  
 <211> 139  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 61  
 Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys  
 1                  5                  10                  15  
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn  
                   20                  25                  30  
 Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys  
                   35                  40                  45  
 Val Ser Asn Trp Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly  
                   50                  55                  60  
 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp  
 65                  70                  75                  80  
 Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly Ser His Trp Pro Pro Thr Phe  
                   85                  90                  95  
 Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser  
                   100                  105                  110  
 Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala  
                   115                  120                  125  
 Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro  
                   130                  135

<210> 62  
 <211> 100  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 62

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

<210> 63  
 <211> 133  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 63  
 Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu  
 1 5 10 15  
 His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly  
 20 25 30  
 Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly  
 35 40 45  
 Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu  
 50 55 60  
 Lys Leu Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met  
 65 70 75 80  
 Gln Ala Leu Gln Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu  
 85 90 95  
 Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser  
 100 105 110  
 Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn  
 115 120 125  
 Asn Phe Tyr Pro Arg  
 130

<210> 64  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 64  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr  
 20

<210> 65  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 65  
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr  
 20

<210> 66  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 66  
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr  
 20

<210> 67  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 67  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr  
 20

<210> 68  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 68  
 Thr Gly Glu Phe Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser  
 1 5 10 15  
 Pro Gly Glu Arg  
 20

<210> 69  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 69  
 Glu Phe Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr  
 20

<210> 70  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 70  
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr  
 20

<210> 71  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 71  
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr  
 20

<210> 72  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 72  
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr  
 20

<210> 73  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 73  
 Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser  
 1 5 10 15  
 Leu Arg Leu Ser  
 20

<210> 74  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 74  
 Pro Glu Val Gln Phe  
 1 5

<210> 75  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 75  
 Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser  
 1 5 10 15  
 Leu Arg Leu Ser  
 20

<210> 76  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 76  
 Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 1 5 10

<210> 77  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 77  
 Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser  
 1 5 10 15  
 Leu

<210> 78  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 78  
 Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr  
 1 5

<210> 79  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 79  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu  
 20

<210> 80  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 80  
 Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser  
 1 5 10 15  
 Leu Arg Leu Ser  
 20

<210> 81  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 81  
 Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 1 5 10

<210> 82  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 82  
 Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser  
 1 5 10 15  
 Leu Arg Leu Ser  
 20

<210> 83  
 <211> 9  
 <212> PRT

<213> Human

<400> 83

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val  
1 5

<210> 84

<211> 20

<212> PRT

<213> Human

<400> 84

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser  
1 5 10 15  
Leu Arg Leu Ser  
20

<210> 85

<211> 6

<212> PRT

<213> Human

<400> 85

Pro Glu Val Gln Phe Asn  
1 5

<210> 86

<211> 20

<212> PRT

<213> Human

<400> 86

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Glu Pro Gly Arg Ser  
1 5 10 15  
Leu Arg Leu Ser  
20

<210> 87

<211> 10

<212> PRT

<213> Human

<400> 87

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
1 5 10

<210> 88

<211> 8

<212> PRT

<213> Human

<400> 88

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro  
1 5

<210> 89

<211> 8

<212> PRT

<213> Human

<400> 89

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro  
1 5

<210> 90  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Human

<400> 90

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro  
1 5

<210> 91  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Human

<400> 91

Thr Gly Glu Phe Val Leu Thr Gln Ser Pro  
1 5 10

<210> 92  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Human

<400> 92

Glu Phe Val Leu Thr Gln Ser Pro  
1 5

<210> 93  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Human

<400> 93

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro  
1 5

<210> 94  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Human

<400> 94

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro  
1 5

<210> 95  
<211> 463  
<212> PRT  
<213> Human

<400> 95

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

|                                                                 |                                             |     |
|-----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|-----|
| 50                                                              | 55                                          | 60  |
| Glu Trp Val Ala Val                                             | Ile Trp Tyr Asp Gly Arg Asn Lys Tyr Tyr Ala |     |
| 65                                                              | 70                                          | 75  |
| Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn |                                             | 80  |
|                                                                 | 85                                          | 90  |
| Thr Leu Phe Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val |                                             | 95  |
|                                                                 | 100                                         | 105 |
| Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly His Phe Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly |                                             | 110 |
|                                                                 | 115                                         | 120 |
| Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser |                                             | 125 |
|                                                                 | 130                                         | 135 |
| Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala |                                             | 140 |
| 145                                                             | 150                                         | 155 |
| Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val |                                             | 160 |
|                                                                 | 165                                         | 170 |
| Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala |                                             | 175 |
|                                                                 | 180                                         | 185 |
| Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val |                                             | 190 |
|                                                                 | 195                                         | 200 |
| Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His |                                             | 205 |
|                                                                 | 210                                         | 215 |
| Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys |                                             | 220 |
| 225                                                             | 230                                         | 235 |
| Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val |                                             | 240 |
|                                                                 | 245                                         | 250 |
| Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr |                                             | 255 |
|                                                                 | 260                                         | 265 |
| Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu |                                             | 270 |
|                                                                 | 275                                         | 280 |
| Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys |                                             | 285 |
|                                                                 | 290                                         | 295 |
| Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser |                                             | 300 |
| 305                                                             | 310                                         | 315 |
| Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys |                                             | 320 |
|                                                                 | 325                                         | 330 |
| Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile |                                             | 335 |
|                                                                 | 340                                         | 345 |
| Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro |                                             | 350 |
|                                                                 | 355                                         | 360 |
| Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu |                                             | 365 |
|                                                                 | 370                                         | 375 |
| Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn |                                             | 380 |
| 385                                                             | 390                                         | 395 |
| Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser |                                             | 400 |
|                                                                 | 405                                         | 410 |
| Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg |                                             | 415 |
|                                                                 | 420                                         | 425 |
| Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu |                                             | 430 |
|                                                                 | 435                                         | 440 |
| His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys     |                                             | 445 |
|                                                                 | 450                                         | 455 |
|                                                                 |                                             | 460 |

<210> 96  
 <211> 463  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 96  
 Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly  
 1 5 10 15  
 Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln

|       |       |
|-------|-------|
| <210> | 97    |
| <211> | 235   |
| <212> | PRT   |
| <213> | Human |

&lt;400&gt; 97

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

&lt;210&gt; 98

&lt;211&gt; 464

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 98

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

```

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

```

```

<210> 99
<211> 233
<212> PRT
<213> Human

```

```

      <400> 99
Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
  1      5      10      15
Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
      20      25      30
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Thr Ser Val Ser
      35      40      45
Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
      50      55      60
Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg
      65      70      75      80
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg
      85      90      95
Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ile
      100      105      110
Ser Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
      115      120      125
Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
      130      135      140
Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro

```

145                      150                      155                      160  
 Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly  
                                  165                      170                      175  
 Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr  
                                  180                      185                      190  
 Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His  
                                  195                      200                      205  
 Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val  
                                  210                      215                      220  
 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225                                   230

<210> 100  
 <211> 463  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 100  
 Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly  
   1                                    5                                    10                                    15  
 Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Glu  
                                  20                                    25                                    30  
 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
                                  35                                    40                                    45  
 Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
                                  50                                    55                                    60  
 Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys His Tyr Ala  
   65                                    70                                    75                                    80  
 Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn  
                                  85                                    90                                    95  
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
                                  100                                    105                                    110  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Gly Leu Leu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly  
                                  115                                    120                                    125  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
                                  130                                    135                                    140  
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala  
   145                                    150                                    155                                    160  
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
                                  165                                    170                                    175  
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
                                  180                                    185                                    190  
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
                                  195                                    200                                    205  
 Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His  
                                  210                                    215                                    220  
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys  
   225                                    230                                    235                                    240  
 Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val  
                                  245                                    250                                    255  
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
                                  260                                    265                                    270  
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
                                  275                                    280                                    285  
 Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
                                  290                                    295                                    300  
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser  
   305                                    310                                    315                                    320  
 Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
                                  325                                    330                                    335  
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile

340 345 350  
 Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
 355 360 365  
 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
 370 375 380  
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
 385 390 395 400  
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser  
 405 410 415  
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 420 425 430  
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
 435 440 445  
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 450 455 460

<210> 101  
 <211> 234  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 101  
 Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro  
 1 5 10 15  
 Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser  
 20 25 30  
 Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser  
 35 40 45  
 Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro  
 50 55 60  
 Arg Pro Leu Ile Tyr Gly Val Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp  
 65 70 75 80  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 85 90 95  
 Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly  
 100 105 110  
 Ile Ser Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg  
 115 120 125  
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
 130 135 140  
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
 145 150 155 160  
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
 165 170 175  
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
 180 185 190  
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
 195 200 205  
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
 210 215 220  
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230

<210> 102  
 <211> 451  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 102  
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asp Pro Arg Gly Ala Thr Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met  
 100 105 110  
 Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr  
 115 120 125  
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser  
 130 135 140  
 Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu  
 145 150 155 160  
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His  
 165 170 175  
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser  
 180 185 190  
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys  
 195 200 205  
 Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu  
 210 215 220  
 Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala  
 225 230 235 240  
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 245 250 255  
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 260 265 270  
 Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 275 280 285  
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe  
 290 295 300  
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 305 310 315 320  
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile  
 325 330 335  
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 340 345 350  
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 355 360 365  
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 370 375 380  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 385 390 395 400  
 Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 405 410 415  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 420 425 430  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 435 440 445  
 Pro Gly Lys  
 450

<210> 103  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 103  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ser Tyr  
 20 25 30  
 Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Ala Ala Ser Ser 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 Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110  
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125  
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140  
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160  
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175  
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190  
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205  
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 104  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Human

<400> 104  
 caggtgcagc tggagcagtc gg

22

<210> 105  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Human

<400> 105  
 gctgaggag tagagtcctg agga

24

<210> 106  
 <211> 49  
 <212> DNA  
 <213> Human

<400> 106  
 tatctaagct tctagactcg accgccacca tggagtttgg gctgagctg

49

<210> 107  
 <211> 46  
 <212> DNA  
 <213> Human

<400> 107

ttctctgatc agaattccta tcatttaccc ggagacaggg agagct 46

<210> 108  
<211> 9  
<212> DNA  
<213> Human

<400> 108  
accgccacc 9

<210> 109  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> Human

<400> 109  
tcttcaagct tgcccgggcc cgccaccatg gaaaccccag cgcag 45

<210> 110  
<211> 43  
<212> DNA  
<213> Human

<400> 110  
ttctttgatc agaattctca ctaacactct cccctgttga agc 43

<210> 111  
<211> 48  
<212> DNA  
<213> Human

<400> 111  
tcttcaagct tgcccgggcc cgccaccatg gacatgaggg tccccgct 48

<210> 112  
<211> 1392  
<212> DNA  
<213> Human

<400> 112  
atggagtttg ggctgagctg ggttttctctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag 60  
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggteccct gagactctcc 120  
tgtgtagcgt ctggattcac cttcagtagc catggcatgc actgggtccg ccaggctcca 180  
ggcaaggggc tggagtgggt ggcagttata tgggtatgat gaagaaataa atactatgca 240  
gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtttctg 300  
caaatagaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag aggaggtcac 360  
ttcggtcctt ttgactactg gggccaggga accctgggtca ccgtctctcc agcctccacc 420  
aaggggcccat cggctcttccc cctggcgccc tgctccagga gcacctccga gagcacagcg 480  
gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca 540  
ggcgctctga ccagcggcgt gcacaccttc ccagctgtcc tacagtccctc aggactctac 600  
tcctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcaacttcg gcaccagac ctacacctgc 660  
aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga cagttgagcg caaatgttgt 720  
gtcgagtgcc caccgtgcc agcaccacct gtggcaggac cgtcagttct cctcttcccc 780  
ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccttg aggtcacgtg cgtgggtggtg 840  
gacgtgagcc acgaagaccc cgagggtccag ttcaactggg acgtggacgg cgtggagggtg 900  
cataatgcca agacaaagcc acgggaggag cagttcaaca gcacgttccg tgtggtcagc 960  
gtcctcaccg ttgtgcacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1020  
aaciaaggcc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aaaccaaagg gcagccccga 1080  
gaaccacagg tgtacacct gcccccctcc cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc 1140  
ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctacccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1200  
gggcagccgg agaacaacta caagaccaca cctcccatgc tggactccga cggctccttc 1260

|            |             |            |            |            |            |      |
|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------|
| ttcctctaca | gcaagctcac  | cgtggacaag | agcaggtggc | agcaggggaa | cgtcttctca | 1320 |
| tgctccgtga | tgcattgaggc | tctgcacaac | cactacacgc | agaagagcct | ctccctgtct | 1380 |
| ccgggtaaat | ga          |            |            |            |            | 1392 |

<210> 113  
 <211> 708  
 <212> DNA  
 <213> Human

|            |            |            |            |            |            |     |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| <400> 113  |            |            |            |            |            |     |
| atggaaaccc | cagcgcagct | tctcttctct | ctgctactct | ggctcccaga | taccaccgga | 60  |
| gaaatttgt  | tgacgcagtc | tccaggcacc | ctgtctttgt | ctccagggga | aagagccacc | 120 |
| ctctcctgca | gggccagtc  | gagtattagc | agcagcttct | tagcctggta | ccagcagaga | 180 |
| cctggccagg | ctcccaggct | cctcatctat | ggtgcatcca | gcagggccac | tggcatccca | 240 |
| gacaggttca | gtggcagtg  | gtctgggaca | gacttcactc | tcaccatcag | cagactggag | 300 |
| cctgaagatt | ttgcagtgta | ttactgtcag | cagtatggta | cctcacctcg | gacgttcggc | 360 |
| caagggacca | aggtggaaat | caaacgaact | gtggtgcac  | catctgtctt | catcttcccg | 420 |
| ccatctgatg | agcagttgaa | atctggaact | gcctctgttg | tgtgcctgct | gaataacttc | 480 |
| tatcccagag | aggccaaagt | acagtggag  | gtggataacg | ccctccaatc | gggtaactcc | 540 |
| caggagagtg | tcacagagca | ggacagcaag | gacagcacct | acagcctcag | cagcaccctg | 600 |
| acgctgagca | aagcagacta | cgagaaacac | aaagtctacg | cctgcgaagt | cacccatcag | 660 |
| ggcctgagct | cgcccgtcac | aaagagcttc | aacaggggag | agtggttag  |            | 708 |

<210> 114  
 <211> 1395  
 <212> DNA  
 <213> Human

|             |             |             |            |            |             |      |
|-------------|-------------|-------------|------------|------------|-------------|------|
| <400> 114   |             |             |            |            |             |      |
| atggagtttg  | ggctgagctg  | ggttttctct  | gttgctcttt | taagaggtgt | ccagtgtcag  | 60   |
| gtgcagctgg  | tggagtctgg  | gggagggcgtg | gtccagcctg | ggaggtccct | gagactctcc  | 120  |
| tgtacagcgt  | ctggattcac  | cttcagtaac  | tatggcatgc | actgggtccg | ccaggetcca  | 180  |
| ggcaaggggc  | tggagtgggt  | ggcagttata  | tggatgatg  | gaagtaataa | acactatgga  | 240  |
| gactccgtga  | agggccgatt  | caccatctcc  | agtgacaatt | ccaagaacac | gctgtatctg  | 300  |
| caaatgaaca  | gcctgagagc  | cgaggacacg  | gctgtgtatt | actgtgcgag | aggagagaga  | 360  |
| ctggggctct  | actttgacta  | ctggggccag  | ggaaccctgg | tcaccgtctc | ctcagcctcc  | 420  |
| accaagggcc  | catcggctct  | ccccctggcg  | ccctgtccca | ggagcacctc | cgagagcaca  | 480  |
| gcggccctgg  | gctgcctggg  | caaggactac  | ttccccgaac | cggtgacggg | gtcgtgggaa  | 540  |
| tcaggcgtc   | tgaccagcgg  | cgtgcacacc  | ttcccagctg | tcctacagtc | ctcaggactc  | 600  |
| tactccctca  | gcagcgtggg  | gaccgtgccc  | tccagcaact | tcggcaccca | gacctacacc  | 660  |
| tgcaacgtag  | atcacaagcc  | cagcaacacc  | aaggtggaca | agacagttga | gcgcaaatgt  | 720  |
| tgtgtcgagt  | gccaccctg   | cccagcacca  | cctgtggcag | gaccgtcagt | cttctctctc  | 780  |
| ccccaaaac   | ccaaggacac  | cctcatgatc  | tcccggaccc | ctgaggtcac | gtgctgtggg  | 840  |
| gtggacgtga  | gccacgaaga  | ccccgaggtc  | cagttcaact | ggtacgtgga | cggcgtggag  | 900  |
| gtgcataatg  | ccaagacaaa  | gccacgggag  | gagcagttca | acagcacgtt | ccgtgtggtc  | 960  |
| agcgtcctca  | ccgttgtgca  | ccaggactgg  | ctgaacggca | aggagtacaa | gtgcaagggtc | 1020 |
| tccaacaaag  | gcctcccagc  | ccccatcgag  | aaaacctct  | ccaaaaccaa | agggcagccc  | 1080 |
| cgagaaccac  | aggtgtacac  | cctgccccca  | tcccgggagg | agatgaccaa | gaaccaggtc  | 1140 |
| agcctgacct  | gcctgggtcaa | aggcttctac  | cccagcgaca | tcgccgtgga | gtgggagagc  | 1200 |
| aatgggcagc  | cggagaacaa  | ctacaagacc  | acacctccca | tgctggactc | cgacggctcc  | 1260 |
| ttcttctct   | acagcaagct  | caccgtggac  | aagagcaggt | ggcagcaggg | gaacgtcttc  | 1320 |
| tcattgctccg | tgatgcattga | ggctctgcac  | aaccactaca | cgcagaagag | cctctccctg  | 1380 |
| tctccgggta  | aatga       |             |            |            |             | 1395 |

<210> 115  
 <211> 702  
 <212> DNA  
 <213> Human

|            |            |            |            |            |            |    |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|----|
| <400> 115  |            |            |            |            |            |    |
| atggaaaccc | cagcgcagct | tctcttctct | ctgctactct | ggctcccaga | taccaccgga | 60 |

|             |            |            |            |            |            |     |
|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| gaaatttgtgt | tgacgcagtc | tccaggcacc | ctgtctttgt | ctccagggga | aagagccacc | 120 |
| ctctcctgca  | ggaccagtgt | tagcagcagt | tacttagcct | ggtaccagca | gaaacctggc | 180 |
| caggctccca  | ggctcctcat | ctatggtgca | tccagcaggg | ccactggcat | cccagacagg | 240 |
| ttcagtggca  | gtgggtctgg | gacagacttc | actctcacca | tcagcagact | ggagcctgaa | 300 |
| gattttgcag  | tctattactg | tcagcagtat | ggcatctcac | ccttcacttt | cggcggaggg | 360 |
| accaaggtgg  | agatcaagcg | aactgtggct | gcaccatctg | tcttcatctt | cccgccatct | 420 |
| gatgagcagt  | tgaaatctgg | aactgcctct | gttgtgtgcc | tgctgaataa | cttctatccc | 480 |
| agagaggcca  | aagtacagtg | gaagggtgat | aacgccctcc | aatcgggtaa | ctcccaggag | 540 |
| agtgtcacag  | agcaggacag | caaggacagc | acctacagcc | tcagcagcac | cctgacgctg | 600 |
| agcaaagcag  | actacgagaa | acacaaagtc | tacgcctgcg | aagtcaccca | tcagggcctg | 660 |
| agctcgcccc  | tcacaaagag | cttcaacagg | ggagagtgtt | ag         |            | 702 |

<210> 116  
 <211> 489  
 <212> DNA  
 <213> Human

|            |            |            |            |            |            |     |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| <400> 116  |            |            |            |            |            |     |
| cctgggaggt | ccctgagact | ctcctgtgca | gcgtctggat | tcaccttcag | tagtcatggc | 60  |
| atccactggg | tccgccaggc | tccaggcaag | gggctggagt | gggtggcagt | tatatggtat | 120 |
| gatggaagaa | ataaagacta | tgcagactcc | gtgaagggcc | gattcaccat | ctccagagac | 180 |
| aattccaaga | agacgctgta | tttgcaaatg | aacagcctga | gagccgagga | cacggctgtg | 240 |
| tattactgtg | cgagagtggc | cccactgggg | ccacttgact | actggggcca | gggaaccttg | 300 |
| gtcaccgtct | cctcagcctc | caccaagggc | ccatcggtct | tccccctggc | gccctgtctc | 360 |
| aggagcacct | ccgagagcac | agcggccctg | ggctgcctgg | tcaaggacta | cttccccgaa | 420 |
| ccggtgacgg | tgctgtggaa | ctcaggcgct | ctgaccagcg | gcgtgcacac | cttcccagct | 480 |
| gtcctacag  |            |            |            |            |            | 489 |

<210> 117  
 <211> 417  
 <212> DNA  
 <213> Human

|            |            |            |            |            |            |     |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| <400> 117  |            |            |            |            |            |     |
| ggcaccctgt | ctttgtctcc | aggggaaaga | gccaccctct | cctgcagggc | cagtcagagt | 60  |
| gtcagcagct | acttagcctg | gtaccagcag | aaacctggcc | aggctcccag | actcctcatc | 120 |
| tatggtgcat | ccagcagggc | cactggcatc | ccagacaggt | tcagtggcag | tgggtctggg | 180 |
| acagacttca | ctctcaccat | cagcagactg | gagcctgagg | attttgcagt | gtattactgt | 240 |
| cagcagtatg | gtaggtcacc | attcactttc | ggccctggga | ccaaagtgga | tatcaagcga | 300 |
| actgtggctg | caccatctgt | cttcatcttc | ccgccatctg | atgagcagtt | gaaatctgga | 360 |
| actgcctctg | ttgtgtgcct | gctgaataac | ttctatccca | gagaggccaa | agtacag    | 417 |

<210> 118  
 <211> 1392  
 <212> DNA  
 <213> Human

|             |             |            |            |             |            |     |
|-------------|-------------|------------|------------|-------------|------------|-----|
| <400> 118   |             |            |            |             |            |     |
| atggagtttg  | ggctgagctg  | ggttttcctc | gttgctcttt | taagaggtgt  | ccagtgtcag | 60  |
| gtgcagctgg  | tggagtctgg  | gggaggcggt | gtcagagcct | ggaggctccct | gagactctcc | 120 |
| tgtacagcgt  | ctggattcac  | cttcagtagt | tatggcatgc | actgggtccg  | ccagggtcca | 180 |
| ggcaaggggc  | tggagtgggt  | ggcagttata | tggtatgatg | gaagcaataa  | acactatgca | 240 |
| gactccgcga  | agggccgatt  | caccatctcc | agagacaatt | ccaagaacac  | gctgtatctg | 300 |
| caaatgaaca  | gcctgagagc  | cgaggacacg | gctgtgtatt | actgtgcgag  | agccggactg | 360 |
| ctgggttact  | ttgactactg  | gggccaggga | accctggtea | ccgtctcctc  | agcctccacc | 420 |
| aagggcccat  | cgtcttcccc  | cctggcgccc | tgctccagga | gcacctccga  | gagcacagcg | 480 |
| gccctgggct  | gcctgggtcaa | ggactacttc | cccgaaccgg | tgacgggtgtc | gtggaactca | 540 |
| ggcgtctctga | ccagcggcgt  | gcacaccttc | ccagctgtcc | tacagtcctc  | aggactctac | 600 |
| tcctctagca  | gcgtgggtgac | cgtgccctcc | agcaacttcg | gcacccagac  | ctacacctgc | 660 |
| aacgtagatc  | acaagcccag  | caacaccaag | gtggacaaga | cagttgagcg  | caaatgttgt | 720 |
| gtcagagtgc  | caccgtgccc  | agcaccacct | gtggcaggac | cgtcagtcct  | cctcttcccc | 780 |

|            |             |             |            |            |             |      |
|------------|-------------|-------------|------------|------------|-------------|------|
| ccaaaaccca | aggacaccct  | catgatctcc  | cggacccttg | aggcacgtg  | cgtgggtggtg | 840  |
| gacgtgagcc | acgaagaccc  | cgagggtccag | ttcaactggt | acgtggacgg | cgtggaggtg  | 900  |
| cataatgcca | agacaaagcc  | acgggaggag  | cagttcaaca | gcacgttccg | tgtggtcagc  | 960  |
| gtcctcaccg | ttgtgcacca  | ggactggctg  | aacggcaagg | agtacaagt  | caaggtctcc  | 1020 |
| aacaaaggcc | tcccagcccc  | catcgagaaa  | accatctcca | aaaccaagg  | gcagccccga  | 1080 |
| gaaccacagg | tgtacaccct  | gccccatcc   | cgggaggaga | tgaccaagaa | ccaggtcagc  | 1140 |
| ctgacctgcc | tgggtcaaagg | cttctacccc  | agcgacatcg | ccgtggagtg | ggagagcaat  | 1200 |
| gggcagccgg | agaacaacta  | caagaccaca  | cctcccatgc | tggactccga | cggctccttc  | 1260 |
| ttcctctaca | gcaagctcac  | cgtggacaag  | agcaggtggc | agcaggggaa | cgtcttctca  | 1320 |
| tgctccgtga | tgcattgaggc | tctgcacaac  | cactacacgc | agaagagcct | ctccctgtct  | 1380 |
| ccgggtaaat | ga          |             |            |            |             | 1392 |

<210> 119  
 <211> 705  
 <212> DNA  
 <213> Human

|            |            |             |             |            |            |     |
|------------|------------|-------------|-------------|------------|------------|-----|
| <400> 119  |            |             |             |            |            |     |
| atggaaaccc | cagcgagct  | tctcttctc   | ctgtactct   | ggctcccaga | taccaccgga | 60  |
| gaaattgtgt | tgacgcagtc | tccaggcacc  | ctgtctttgt  | ctccagggga | aagagccacc | 120 |
| ctctcctgta | gggccagtc  | aagtgttagc  | agctacttag  | cctggtacca | acagaaacct | 180 |
| ggccaggctc | ccaggcccc  | catctatggt  | gtatccagca  | ggccactgg  | catcccagac | 240 |
| aggttcagtg | gcagtgggtc | tgggacagac  | ttcactctca  | ccatcagcag | actggagcct | 300 |
| gaagattttg | cagtgtatta | ctgtcagcag  | tatggtatct  | caccattcac | tttcggccct | 360 |
| gggaccaaag | tggatatcaa | acgaactgtg  | gctgcacccat | ctgtcttcat | cttcccgcga | 420 |
| tctgatgagc | agttgaaatc | tggaaactgcc | tctgttgtgt  | gcctgctgaa | taacttctat | 480 |
| cccagagagg | ccaaagtaca | gtggaagggtg | gataacgccc  | tccaatcggg | taactcccag | 540 |
| gagagtgtca | cagagcagga | cagcaaggac  | agcacctaca  | gcctcagcag | cacctgacg  | 600 |
| ctgagcaaag | cagactacga | gaaacacaaa  | gtctacgcct  | gcgaagtcac | ccatcagggc | 660 |
| ctgagctcgc | ccgtcacaaa | gagcttcaac  | aggggagagt  | gttag      |            | 705 |

<210> 120  
 <211> 507  
 <212> DNA  
 <213> Human

|             |            |            |            |            |            |     |
|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| <400> 120   |            |            |            |            |            |     |
| ggcgtgggtcc | agcctgggag | gtccctgaga | ctctcctgtg | cagcgtctgg | attcaccttc | 60  |
| agtagctatg  | gcatgcactg | ggtccgccag | gctccaggca | aggggctgga | gtgggtggca | 120 |
| gttatatggt  | atgatggaag | taataaatac | tatgcagact | ccgtgaagg  | ccgattcacc | 180 |
| atctccagag  | acaattccaa | gaacacgctg | tatctgcaaa | tgaacagcct | gagagccgag | 240 |
| gacacggctg  | tgtattactg | tgcgagagg  | gcccgtataa | taaccccttg | tatggacgtc | 300 |
| tggggccaag  | ggaccacggt | caccgtctcc | tcagcctcca | ccaagggccc | atcggtcttc | 360 |
| cccctggcgc  | cctgtctcag | gagcacctcc | gagagcacag | cggccctggg | ctgctgtgtc | 420 |
| aaggactact  | tcccgaacc  | ggtgacggtg | tcgtggaact | caggcgtct  | gaccagcggc | 480 |
| gtgcacacct  | tcccagctgt | cctacag    |            |            |            | 507 |

<210> 121  
 <211> 458  
 <212> DNA  
 <213> Human

|            |            |             |            |            |            |     |
|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|-----|
| <400> 121  |            |             |            |            |            |     |
| cagtctccat | cctccctgtc | tgcattctgta | ggagacagag | tcaccatcac | ttgccgggca | 60  |
| agtcagagca | ttaacaccta | tttaatttgg  | tatcagcaga | aaccagggaa | agccctaacc | 120 |
| ttcctgatct | ctgtacatc  | cattttgcaa  | agtgggtgcc | catcaagggt | ccgtggcagt | 180 |
| ggctctggga | caaatttcac | tctcaccatc  | aacagtcttc | atcctgaaga | ttttgcaact | 240 |
| tactactgtc | aacagagtta | cagtacccca  | ttcactttcg | gccctgggac | caaagtggat | 300 |
| atcaaacgaa | ctgtggctgc | accatctgtc  | ttcatcttcc | cgccatctga | tgagcagttg | 360 |
| aaatctggaa | ctgcctctgt | tgtgtgcctg  | ctgaataact | tctatcccag | agaggccaaa | 420 |
| gtacagtggg | aggtggataa | cgccctccaa  | tcgggtaa   |            |            | 458 |

<210> 122  
 <211> 501  
 <212> DNA  
 <213> Human

<400> 122  
 ggcggtgggcc agcctgggag gtccctgaga ctctcctgtg tagcgtctgg attcatcttc 60  
 agtagtcatg gcatccactg ggtccgccag gctccaggca aggggctgga gtgggtggca 120  
 gttatatggt atgatggaag aaataaagac tatgcagact ccgtgaaggg ccgattcacc 180  
 atctccagag acaattccaa gaacacgctg tatttgcaaa tgaacagcct gagagccgag 240  
 gacacggctg tgtattactg tgcgagagtg gcccactgg ggccacttga ctactggggc 300  
 cagggaaacc tggtcaccgt ctctcagcc tccaccaagg gcccatcggt cttccccctg 360  
 gcgccctgct ccaggagcac ctccgagagc acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac 420  
 tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg aactcaggcg ctctgaccag cggcgtgcac 480  
 accttcccag ctgtctaca g 501

<210> 123  
 <211> 426  
 <212> DNA  
 <213> Human

<400> 123  
 tctccaggca ccctgtcttt gtctccaggg gaaagagcca ccctctcctg cagggccagt 60  
 cagagtatta gcagcaattt cttagcctgg taccagcaga aacctggcca ggctcccagg 120  
 ctctcatct atcgtccatc cagcagggcc actggcatcc cagacagttt cagtggcagt 180  
 gggctctggga cagacttcac tctcaccatc agcagactgg agcctgagga ttttgcatta 240  
 tattactgtc agcagtatgg tacgtcacca ttcactttcg gccctgggac caaagtggat 300  
 atcaagcgaa ctgtggctgc accatctgtc ttcactttcc cgccatctga tgagcagttg 360  
 aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg ctgaataact tctatcccag agaggccaaa 420  
 gtacag 426

<210> 124  
 <211> 516  
 <212> DNA  
 <213> Human

<400> 124  
 tcggggcccag gactggtgaa gccttcacag atcctgtccc tcacctgcac tgtctctggt 60  
 ggctccatca gcagtgtgg tcactactgg agctggatcc gccagcacc agggaaagggc 120  
 ctggagtggga ttgggtacat ctattacatt gggaacacct actacaaccc gtccctcaag 180  
 agtcagtgta ccatacagt agacacgtct aagaaccagt tctccctgaa gctgagctct 240  
 gtgactgccg cggacacggc cgtgtattat tgtgcgagag atagtgggga ctactacggg 300  
 atagactgtct ggggccaagg gaccacggtc accgtctcct cagcttccac caagggccca 360  
 tccgtcttcc ccctggcgcc ctgctccagg agcacctccg agagcacagc cgcctggggc 420  
 tgctgtgta aggactactt cccgaaccg gtgacgggtg cgtggaactc aggcgccttg 480  
 accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc ctacaa 516

<210> 125  
 <211> 465  
 <212> DNA  
 <213> Human

<400> 125  
 tctccagact ttcagtctgt gactccaaag gagaaagtca ccatcacctg ccgggccagt 60  
 cagagcattg gtagtagctt acattggtat cagcagaaac cagatcagtc tccaaagctc 120  
 ctcatcaagt atgcttccca gtcttctct ggggtccct cgaggttcag tggcagtggga 180  
 tctgggacag atttcaccct caccatcaat agcctggaag ctgaagatgc tgcaacgtat 240  
 tactgtcatc agagtagtag tttaccgctc actttcggcg gagggaccaa ggtggagatc 300  
 aaacgaactg tggtgcacc atctgtcttc atcttccgc catctgatga gcagttgaaa 360  
 tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg aataacttct atcccagaga ggccaaagta 420

cagtgggaagg tggataacgc cctccaatcg ggtaactccc aggag

465

<210> 126  
 <211> 459  
 <212> DNA  
 <213> Human

&lt;400&gt; 126

|            |            |            |            |            |            |     |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| cctgggaggt | ccctgagact | ctcctgtgca | gcgtctggat | tcaccttcag | tagtcatggc | 60  |
| atccactggg | tccgccaggc | tccaggcaag | gggctggagt | gggtggcagt | tatatgggat | 120 |
| gatggaagaa | ataaagacta | tgcagactcc | gtgaagggcc | gattcaccat | ctccagagac | 180 |
| aattccaaga | acacgctgta | tttgcaaata | aacagcctga | gagccgagga | cacggctgtg | 240 |
| tattactgtg | cgagagtggc | cccactgggg | ccacttgact | actggggcca | gggaaccctg | 300 |
| gtcaccgtct | cctcagcctc | caccaagggc | ccatcggtct | tccccctggc | gccctgctcc | 360 |
| aggagcacct | ccgagagcac | agcggccctg | ggctgcctgg | tcaaggacta | cttccccgaa | 420 |
| ccggtgacgg | tgctgtggaa | ctcaggcgct | ctgaccagc  |            |            | 459 |

<210> 127  
 <211> 440  
 <212> DNA  
 <213> Human

&lt;400&gt; 127

|            |             |            |            |            |            |     |
|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| cagtctccag | gcaccctgtc  | tttgtctcca | ggggaaagag | ccaccctctc | ctgcagggcc | 60  |
| agtcagagt  | tcagcagcta  | cttagcctgg | taccagcaga | aacctggcca | ggctcccagg | 120 |
| ctcctcatct | atgggtgcatc | cagcagggcc | actggcatcc | cagacagggt | cagtggcagt | 180 |
| gggtctggga | cagacttcac  | tctcaccatc | agcagactgg | agcctgagga | ttttgcagt  | 240 |
| tattactgtc | aacagtatgg  | taggtcacca | ttcactttcg | gccctgggac | caaagtagat | 300 |
| atcaagcgaa | ctgtggctgc  | accatctgtc | ttcatcttcc | cgccatctga | tgagcagttg | 360 |
| aaatctggaa | ctgcctctgt  | tgtgtgcctg | ctgaataact | tctatcccag | agaggccaaa | 420 |
| gtacagtgga | aaggtggata  |            |            |            |            | 440 |

<210> 128  
 <211> 503  
 <212> DNA  
 <213> Human

&lt;400&gt; 128

|             |            |            |            |             |            |     |
|-------------|------------|------------|------------|-------------|------------|-----|
| ggcgtgggtcc | agcctgggag | gtccctgaga | ctctcctgtg | cagcgtctgg  | attcaccttc | 60  |
| agtagctatg  | gcatgcactg | ggtccgccag | gctccaggca | aggggctgga  | gtgggtggca | 120 |
| gttatatggt  | atgatggaag | taataaatac | tatgcagact | ccgtgaagg   | ccgattcacc | 180 |
| atctccagag  | acaattccaa | gaacacgctg | tatctgcaaa | tgaacagcct  | gagagccgag | 240 |
| gacacggctg  | tgtattactg | tgcgagagat | ccgaggggag | ctacccttta  | ctactactac | 300 |
| taccggtkgg  | acgtctgggg | ccaagggacc | acggtcaccg | tctcctcagc  | ctccaccaag | 360 |
| ggcccatcgg  | tcttccccct | ggcgccctgc | tccaggagca | cctccgagag  | cacagcggcc | 420 |
| ctgggctgcc  | tggtcaagga | ctacttcccc | gaaccggtga | cgggtgtcgtg | gaactcaggc | 480 |
| gctctgacca  | gcggcgtgca | cac        |            |             |            | 503 |

<210> 129  
 <211> 417  
 <212> DNA  
 <213> Human

&lt;400&gt; 129

|            |            |            |            |            |            |     |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| ccatcctccc | tgtctgcatc | tgtaggagac | agagtcacca | tcacttgccg | ggcaagtcag | 60  |
| agcattaaca | gctatttaga | ttggtatcag | cagaaaccag | ggaaagcccc | taaactcctg | 120 |
| atctatgctg | catccagttt | gcaaagtggg | gtcccatcaa | ggttcagtgg | cagtggatct | 180 |
| gggacagatt | tcactctcac | catcagcagt | ctgcaacctg | aagattttgc | aacttactac | 240 |
| tgtaacagat | attacagtac | tccattcact | ttcggccctg | ggaccaaagt | ggaaatcaaa | 300 |
| cgaactgtgg | ctgcaccatc | tgtcttcac  | ttcccgccat | ctgatgagca | gttgaaatct | 360 |
| ggaactgect | ctgttgtgtg | cctgctgaat | aacttctatc | ccagagaggc | caaagta    | 417 |

<210> 130  
 <211> 451  
 <212> DNA  
 <213> Human

<400> 130  
 ggcgtgggtcc agcctgggag gtccctgaga ctctcctgtg cagcgtctgg attcaccttc 60  
 agtagctatg gcatgcaact ggtccgccag gctccaggca aggggctgga gtgggtggca 120  
 gttatatggt atgatggaag tcataaatac tatgcagact ccgtgaaggg ccgattcacc 180  
 atctccagag acaattccaa gaacacgctg tatctgcaa tgaacagcct gagagccgag 240  
 gacacggctg tgtattactg tgcgagaggc gctgtagtag taccagctgc tatggacgtc 300  
 tggggccaag ggaccacggg caccgtctcc tcagcctcca ccaagggccc atcgggtctc 360  
 cccctggcgc cctgctccag gagcacctcc gagagcacag cggccctggg ctgacctggc 420  
 aaggactact tccccgaacc ggtgacgggtg t 451

<210> 131  
 <211> 402  
 <212> DNA  
 <213> Human

<220>

<400> 131  
 acccagtctc catcctccct gtctgcatct gtaggagaca gagtcaccat cacttgccgg 60  
 gcaagtcaga acattagcag gtattttaa attggtatcaac agaaaccagg gaaagcccct 120  
 aagttcctga tctatgttgc atctattttg caaagtgggg tcccatcagg gttcagtgcc 180  
 agtggatctg ggccagattt cactctnacc atcagcagtc tgcaacctga agattttgca 240  
 acttactact gtcaacagag ttacagtacc ccattcactt tcggccctgg gaccaaagtg 300  
 gatatacaaac gaactgtggc tgcaccatct gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag 360  
 ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc ctgctgaata ac 402

<210> 132  
 <211> 438  
 <212> DNA  
 <213> Human

<220>

<400> 132  
 gtgggtccagc ctgggagggt cctgagactc tctgtgtcag cgtctggatt caccttcagt 60  
 agcngtggca tgcactgggt ccgccaggct ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt 120  
 atatgtcttg atggaagtca taaatactat gcagactccg tgaagggccg attcaccatc 180  
 tccagagaca attccaagaa cacgctgtat ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac 240  
 acggctgtgt attactgtgc gagaggaact atgatagtag tgggtaccct tgactactgg 300  
 ggccagggaa ccctgggtcac cgtctcctca gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc 360  
 ctggcgccct gctccaggag cacctccgag agcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag 420  
 gactacttcc ccgaaccg 438

<210> 133  
 <211> 451  
 <212> DNA  
 <213> Human

<400> 133  
 acccagtctc catcctccct gtctgcatct gtaggagaca gagtcaccat cacttgccgg 60  
 gcaagtcaga gcatttgcaa ctattttaa attggtatcagc agaaaccagg aaaagcccct 120  
 aggggtcctga tctatgtctg atccagtttg caaggtgggg tcccgtaag gttcagtggtc 180  
 agtggatctg ggacagattg cactctcacc atcagcagtc tgcaacctga agattttgca 240  
 acttactact gtcaacagag ttacactacc ccattcactt tcggccctgg gaccagagtg 300  
 gatatcgaa gaactgtggc tgcaccatct gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag 360

ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc 420  
 aaagtacagt ggaaggtgga taacgcctat t 451

<210> 134  
 <211> 562  
 <212> DNA  
 <213> Human

<400> 134  
 tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt tactatggcg tctgggggag gcgtgggtcca 60  
 gcctgggagg tccctgagac tctcctgtgc agcgtctgga ttcaccttca gtagctatgg 120  
 cgtgcactgg gtccgccagg ctccaggcaa ggggctggag tgggtggcag ttatatggta 180  
 tgatggaagt aataaatact atgcagactc cgtgaagggc cgattcacca tctccagaga 240  
 caattccaag agcacgctgt atctgcaaat gaacagcctg agagccgagg acacggctgt 300  
 gtattattgt gcgagagact cgtattacga tttttggagt ggtcggggcg gtatggacgt 360  
 ctgggggcca gggaccacgg tcaccgtctc ctcagcctcc accaagggcc catcggtctt 420  
 cccctggcg cctgtctcca ggagcacctc cgagagcaca gcggccctgg gctgcctggg 480  
 caaggactac tccccgaac cggtgacggg gtcgtggaac tcaggcgctc tgaccagcgg 540  
 cgtgcacacc ttcccagctg tc 562

<210> 135  
 <211> 419  
 <212> DNA  
 <213> Human

<400> 135  
 ccactctccc tgcccgtcac ccttggacag cgggcctcca tctcctgcag gtctagtcaa 60  
 agcctcgtat acagtgatgg aaacacctac ttgaattggg ttcagcagag gccaggccaa 120  
 tctccaaggc gcctaattta taaggtttct aactgggact ctgggggtccc agacagattc 180  
 agcggcagtg ggtcaggcac tgatttcaca ctgaaaatca gcagggtgga ggctgaggat 240  
 gttggggttt attactgcat gcaagggtca cactggcctc cgacgttcgg ccaagggacc 300  
 aagggtgaaa tcaaacgaac tgtggctgca ccactctgtc tcactctccc gccatctgat 360  
 gagcagttga aatctggaac tgcctctgtt gtgtgcctgc tgaataactt ctatcccac 419

<210> 136  
 <211> 490  
 <212> DNA  
 <213> Human

<400> 136  
 gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc tgtgcagcgt ctggattcac cttcagtaac 60  
 tatgccatgc actgggtccg ccaggctcca ggcaaggggc tggagtgggt ggtagttatt 120  
 tggcatgatg gaaataataa atactatgca gagtccgtga agggccgatt caccatctcc 180  
 agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg 240  
 gctgtatatt actgtgcgag agatcagggc actggctggg acggaggctt tgacttctgg 300  
 ggccagggaa ccttgggtcac cgtctctca gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc 360  
 ctggcgccct gctccaggag cacctccgag agcacagcgg ccttgggctg cctgggtcaag 420  
 gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtc tggaaactcag gcgctctgac cagcggcggtg 480  
 cacaccttcc 490

<210> 137  
 <211> 419  
 <212> DNA  
 <213> Human

<400> 137  
 cctggagagc cggcttccat ctcttgcagg tctagtcaga gcctcctgca tagtaatgga 60  
 tacaactatt tggattggta cctgcagaag ccaggacagt ctccacagct cctgatctat 120  
 ttgggttcta atcgggcctc cggggctcct gacaggttca gtggcagtgg atcaggcaca 180  
 gattttacac tgaaactcag cagagtggag gctgaggatg ttggggttta ttactgcatg 240  
 caagctctac aaactcctct cactttcggc ggagggacca aggtggagat caaacgaact 300

|            |            |            |            |            |            |     |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| gtggctgcac | catctgtctt | catcttcccc | ccatctgatg | agcagttgaa | atctggaact | 360 |
| gcctctgttg | tgtgcctgct | gaataacttc | tatcccagar | aggccaaagt | acattccat  | 419 |

<210> 138  
 <211> 1392  
 <212> DNA  
 <213> Human

|            |             |             |             |             |             |      |
|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| <400> 138  |             |             |             |             |             |      |
| atggagtttg | ggctgagctg  | ggttttcctc  | gttgctcttt  | taagaggtgt  | ccagtgtcag  | 60   |
| gtgcagctgg | tggagctctg  | gggaggcggt  | gtccagcctg  | ggaggtccct  | gagactctcc  | 120  |
| tgtgtagcgt | ctggattcac  | cttcagtagc  | catggcatgc  | actgggtccg  | ccagggtcca  | 180  |
| ggcaaggggc | tggagtgggt  | ggcagttata  | tggtagatg   | gaagaaataa  | atactatgca  | 240  |
| gactccgtga | agggccgatt  | caccatctcc  | agagacaatt  | ccaagaacac  | gctgtttctg  | 300  |
| caaatgaaca | gcctgagagc  | cgaggacacg  | gctgtgtatt  | actgtgctgag | aggaggtcac  | 360  |
| ttcggtcctt | ttgactactg  | gggccaggga  | accctgggtca | ccgtctcctc  | agcctccacc  | 420  |
| aagggcccat | cggctcttccc | cctggcgccc  | tgctccagga  | gcacctccga  | gagcacagcg  | 480  |
| gccctgggct | gcctgggtcaa | ggactacttc  | cccgaaccgg  | tgacgggtgtc | gtggaactca  | 540  |
| ggcgctctga | ccagcggcgt  | gcacaccttc  | ccagctgtcc  | tacagtcctc  | aggactctac  | 600  |
| tcctctagca | gcgtgggtgac | cgtgccctcc  | agcaacttcg  | gcacccagac  | ctacacctgc  | 660  |
| aacgtagatc | acaagcccag  | caacaccaag  | gtggacaaga  | cagttgagcg  | caaagtgtgt  | 720  |
| gtcagtgccc | caccgtgccc  | agcaccacct  | gtggcaggac  | cgtcagctct  | cctcttcccc  | 780  |
| ccaaaaccga | aggacacctc  | catgatctcc  | cggaccctcg  | aggtcacgtg  | cgtggtagtg  | 840  |
| gacgtgagcc | acgaagaccc  | cgagggtccag | ttcaactggg  | acgtggacgg  | cgtggaggtg  | 900  |
| cataatgcc  | agacaaagcc  | acgggaggag  | cagttcaaca  | gcacgttccg  | tgtgggtcagc | 960  |
| gtcctcaccc | ttgtgcacca  | ggactggctg  | aacggcaagg  | agtacaagt   | caaggtctcc  | 1020 |
| aacaaaggcc | tcctcagcccc | catcgagaaa  | accatctcca  | aaaccaaaagg | gcagccccga  | 1080 |
| gaaccacagg | tgtacacctc  | gcccccatcc  | cgggaggaga  | tgaccaagaa  | ccaggtcagc  | 1140 |
| ctgacctgcc | tggtcaaagg  | cttctacccc  | agcgacatcg  | ccgtggagtg  | ggagagcaat  | 1200 |
| gggcagccgg | agaacaacta  | caagaccaca  | cctcccattg  | tggaactccga | cggctccttc  | 1260 |
| ttcctctaca | gcaagctcac  | cgtggacaag  | agcaggtggc  | agcaggggaa  | cgtcttctca  | 1320 |
| tgctccgtga | tgcatgaggc  | tctgcacaac  | cactacacgc  | agaagagcct  | ctccctgtct  | 1380 |
| ccgggtaaat | ga          |             |             |             |             | 1392 |

<210> 139  
 <211> 1999  
 <212> DNA  
 <213> Human

|            |             |            |             |             |             |      |
|------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|------|
| <400> 139  |             |            |             |             |             |      |
| atggagtttg | ggctgagctg  | ggttttcctc | gttgctcttt  | taagaggtgt  | ccagtgtcag  | 60   |
| gtgcagctgg | tggagctctg  | gggaggcggt | gtccagcctg  | ggaggtccct  | gagactctcc  | 120  |
| tgtgtagcgt | ctggattcac  | cttcagtagc | catggcatgc  | actgggtccg  | ccagggtcca  | 180  |
| ggcaaggggc | tggagtgggt  | ggcagttata | tggtagatg   | gaagaaataa  | atactatgca  | 240  |
| gactccgtga | agggccgatt  | caccatctcc | agagacaatt  | ccaagaacac  | gctgtttctg  | 300  |
| caaatgaaca | gcctgagagc  | cgaggacacg | gctgtgtatt  | actgtgctgag | aggaggtcac  | 360  |
| ttcggtcctt | ttgactactg  | gggccaggga | accctgggtca | ccgtctcctc  | agctagcacc  | 420  |
| aagggcccat | cggctcttccc | cctggcgccc | tgctccagga  | gcacctccga  | gagcacagcg  | 480  |
| gccctgggct | gcctgggtcaa | ggactacttc | cccgaaccgg  | tgacgggtgtc | gtggaactca  | 540  |
| ggcgctctga | ccagcggcgt  | gcacaccttc | ccagctgtcc  | tacagtcctc  | aggactctac  | 600  |
| tcctctagca | gcgtgggtgac | cgtgccctcc | agcaacttcg  | gcacccagac  | ctacacctgc  | 660  |
| aacgtagatc | acaagcccag  | caacaccaag | gtggacaaga  | cagttgggtga | gaggccagct  | 720  |
| cagggaggga | gggtgtctgc  | tggaagccag | gctcagccct  | cctgcctgga  | cgcaccccg   | 780  |
| ctgtgcagcc | ccagcccagg  | gcagcaaggc | aggccccatc  | tgtctcctca  | cccggaggcc  | 840  |
| tctgcccgcc | ccactcatgc  | tcaggagag  | ggctctctgg  | ctttttccac  | cagggtccag  | 900  |
| gcaggcacag | gctgggtgcc  | cctaccccag | gcccttcaca  | cacaggggca  | ggtgcttggc  | 960  |
| tcagacctgc | caaaagccat  | atccggggag | accctgcccc  | tgacctaaag  | cgaccccaaa  | 1020 |
| ggccaaactg | tccactccct  | cagctcggac | accttctctc  | ctcccagatc  | cgagtaactc  | 1080 |
| ccaatcttct | ctctgcagag  | cgcaaatgtt | gtgtcgagtg  | cccaccgtgc  | ccaggtaaagc | 1140 |
| cagcccaggc | ctcgccctcc  | agctcaaggc | gggacagggt  | ccctagagta  | gcctgcattc  | 1200 |
| agggacaggc | cccagctggg  | tgctgacacg | tccacctcca  | tctcttctc   | agcaccacct  | 1260 |

|            |            |             |            |            |            |      |
|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|------|
| gtggcaggac | cgtcagtcct | cctcttcccc  | ccaaaaccca | aggacaccct | catgatctcc | 1320 |
| cggaccctcg | aggtcacgtg | cgtggtggtg  | gacgtgagcc | acgaagaccc | cgaggtccag | 1380 |
| ttcaactggt | acgtggacgg | cgtggagggtg | cataatgcc  | agacaaagcc | acgggaggag | 1440 |
| cagttcaaca | gcacgttccg | tgtggtcagc  | gtcctcaccg | ttgtgcacca | ggactggctg | 1500 |
| aacggcaagg | agtacaagtg | caaggtctcc  | aacaaaggcc | tcccagcccc | catcgagaaa | 1560 |
| accatctcca | aaaccaaagg | tgggacccgc  | ggggtatgag | ggccacatgg | acagaggccg | 1620 |
| gctcggccca | ccctctgccc | tgggagtgac  | cgctgtgcca | acctctgtcc | ctacagggca | 1680 |
| gccccgagaa | ccacaggtgt | acaccctgcc  | cccatcccgg | gaggagatga | ccaagaacca | 1740 |
| ggtcagcctg | acctgcctgg | tcaaaggctt  | ctaccccagc | gacatcgccg | tggagtggga | 1800 |
| gagcaatggg | cagccggaga | acaactacaa  | gaccacacct | cccatgctgg | actccgacgg | 1860 |
| ctccttcttc | ctctacagca | agctcaccgt  | ggacaagagc | aggtggcagc | aggggaacgt | 1920 |
| cttctcatgc | tccgtgatgc | atgaggctct  | gcacaaccac | tacacgcaga | agagcctctc | 1980 |
| cctgtctccg | ggtaaatga  |             |            |            |            | 1999 |

&lt;210&gt; 140

&lt;211&gt; 1392

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 140

|            |             |            |             |            |             |      |
|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------|
| atggagtttg | ggctgagctg  | ggttttcctc | gttgetcttt  | taagaggtgt | ccagtgtcag  | 60   |
| gtgcagctgg | tggagtctgg  | gggaggcgtg | gtccagcctg  | ggaggtccct | gagactctcc  | 120  |
| tgtgtagcgt | ctggattcac  | cttcagtagc | catggcatgc  | actgggtccg | ccaggtcca   | 180  |
| ggcaaggggc | tggagtgggt  | ggcagttata | tggatatgat  | gaagaaataa | atactatgca  | 240  |
| gactccgtga | agggccgatt  | caccatctcc | agagacaatt  | ccaagaacac | gctgtttctg  | 300  |
| caaataaaca | gcctgagagc  | cgaggacacg | gctgtgtatt  | actgtgcgag | aggaggtcac  | 360  |
| ttcggtcctt | ttgactactg  | gggccaggga | accctgggtca | ccgtctctct | agcctccacc  | 420  |
| aagggcccat | cggtcttccc  | cctggcgccc | tgctccagga  | gcacctccga | gagcacagcg  | 480  |
| gccctgggct | gcctggtcaa  | ggactacttc | cccgaaccgg  | tgacgggtgc | gtggaactca  | 540  |
| ggcgctctga | ccagcggcgt  | gcacaccttc | ccagctgtcc  | tacagtcctc | aggactctac  | 600  |
| tccctcagca | cgctgggtgac | cgtgccctcc | agcaacttcg  | gcacccagac | ctacacctgc  | 660  |
| aacgtagatc | acaagcccag  | caacaccaag | gtggacaaga  | cagttgagcg | caaagtgtgt  | 720  |
| gtcgagtgcc | caccgtgccc  | agcaccacct | gtggcaggac  | cgtcagtcct | cctcttcccc  | 780  |
| ccaaaaccca | aggacaccct  | catgatctcc | cggaccctcg  | aggtcacgtg | cgtggtggtg  | 840  |
| gacgtgagcc | acgaagaccc  | cgaggtccag | ttcaactggt  | acgtggacgg | cgtggagggtg | 900  |
| cataatgcc  | agacaaagcc  | acgggaggag | cagttccaaa  | gcacgttccg | tgtggtcagc  | 960  |
| gtcctcaccg | ttgtgcacca  | ggactggctg | aacggcaagg  | agtacaagtg | caaggtctcc  | 1020 |
| aacaaaggcc | tcccagcccc  | catcgagaaa | accatctcca  | aaaccaaagg | gcagccccga  | 1080 |
| gaaccacagg | tgtacaccct  | gccccatcc  | cgggaggaga  | tgaccaagaa | ccaggtcagc  | 1140 |
| ctgacctgcc | tgggtcaaagg | cttctacccc | agcgacatcg  | ccgtggagtg | ggagagcaat  | 1200 |
| gggcagccgg | agaacaacta  | caagaccaca | cctcccatgc  | tggactccga | cggctccttc  | 1260 |
| ttcctctaca | gcaagctcac  | cgtggacaag | agcaggtggc  | agcaggggaa | cgtcttctca  | 1320 |
| tgctccgtga | tgcattgaggc | tctgcacaac | cactacacgc  | agaagagcct | ctccctgtct  | 1380 |
| cggggtaaat | ga          |            |             |            |             | 1392 |

&lt;210&gt; 141

&lt;211&gt; 708

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 141

|            |            |            |             |            |            |     |
|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|-----|
| atggaaaccc | cagcgcagct | tctcttcttc | ctgtactctt  | ggctcccaga | taccaccgga | 60  |
| gaaatttgtt | tgacgcagtc | tccaggcacc | ctgtctttgt  | ctccagggga | aagagccacc | 120 |
| ctctcctgca | gggccagtca | gagtattagc | agcagcttct  | tagcctggta | ccagcagaga | 180 |
| cctggccagg | ctcccaggct | cctcatctat | gggtgcattca | gcagggccac | tggcatccca | 240 |
| gacaggttca | gtggcagtgg | gtctgggaca | gacttcactc  | tcaccatcag | cagactggag | 300 |
| cctgaagatt | ttgcagtgtg | ttactgtcag | cagtatggta  | cctcaccctg | gacgttcggc | 360 |
| caagggacca | aggtggaat  | caaacgaact | gtggctgcac  | catctgtctt | catcttcccg | 420 |
| ccatctgatg | agcagttgaa | atctggaact | gcctctgttg  | tgtgcctgct | gaataacttc | 480 |
| tatcccagag | aggccaaagt | acagtggaa  | gtggataacg  | ccctccaatc | gggtaactcc | 540 |
| caggagagtg | tcacagagca | ggacagcaag | gacagcacct  | acagcctcag | cagcaccctg | 600 |

|            |             |            |            |            |            |     |
|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| acgctgagca | aagcagacta  | cgagaaacac | aaagtctacg | cctgcgaagt | cacccatcag | 660 |
| ggcctgagct | cgccccgtcac | aaagagcttc | aacaggggag | agtgttag   |            | 708 |

<210> 142  
 <211> 1395  
 <212> DNA  
 <213> Human

|             |             |             |            |            |             |      |
|-------------|-------------|-------------|------------|------------|-------------|------|
| <400> 142   |             |             |            |            |             |      |
| atggagtttg  | ggctgagctg  | ggttttcctc  | gttgctcttt | taagaggtgt | ccagtgtcag  | 60   |
| gtgcagctgg  | tggagtctgg  | gggaggcgtg  | gtccagcctg | ggaggtccct | gagactctcc  | 120  |
| tgtacagcgt  | ctggattcac  | cttcagtaac  | tatggcatgc | actgggtccg | ccagggtcca  | 180  |
| ggcaaggggc  | tggagtgggt  | ggcagttata  | tggtatgatg | gaagtaataa | acactatgga  | 240  |
| gactccgtga  | agggccgatt  | caccatctcc  | agtgacaatt | ccaagaacac | gctgtatctg  | 300  |
| caaatgaaca  | gcctgagagc  | cgaggacacg  | gctgtgtatt | actgtgagag | aggagagaga  | 360  |
| ctggggtcct  | actttgacta  | ctggggccag  | ggaaccctgg | tcaccgtctc | ctcagcctcc  | 420  |
| accaagggcc  | catcgggtctt | ccccctggcg  | cctgtctcca | ggagcacctc | cgagagcaca  | 480  |
| gcggccctgg  | gctgcctggt  | caaggactac  | ttccccgaac | cggtgacggg | gtcgtggaac  | 540  |
| tcaggcgctc  | tgaccagcgg  | cgtgcacacc  | ttcccagctg | tcctacagtc | ctcaggactc  | 600  |
| tactccctca  | gcagcgtggt  | gaccgtgccc  | tccagcaact | tcggcaccca | gacctacacc  | 660  |
| tgcaacgtag  | atcacaagcc  | cagcaaacacc | aaggtggaca | agacagttga | gcgcaaatgt  | 720  |
| tgtgtcaggt  | gcccaccgtg  | cccagcacca  | cctgtggcag | gaccgtcagt | cttcctcttc  | 780  |
| ccccaaaaac  | ccaaggacac  | cctcatgata  | tcccggaccc | ctgaggtcac | gtgctgtggtg | 840  |
| gtggagctga  | gccacgaaga  | ccccgaggtc  | cagttcaact | ggtacgtgga | cggtgtggag  | 900  |
| gtgcataatg  | ccaagacaaa  | gccacgggag  | gagcagttca | acagcacgtt | ccgtgtggtc  | 960  |
| agcgtcctca  | ccgttgtgca  | ccaggactgg  | ctgaacggca | aggagtacaa | gtgcaagggtc | 1020 |
| tccaacaaag  | gcctcccagc  | ccccatcgag  | aaaaccatct | ccaaaaccaa | agggcagccc  | 1080 |
| cgagaaccac  | aggtgtacac  | cctgccccca  | tcccgggagg | agatgaccaa | gaaccagggtc | 1140 |
| agcctgacct  | gcctggtcaa  | aggctctctac | cccagcgaca | tcgccgtgga | gtgggagagc  | 1200 |
| aatgggcagc  | cggagaacaa  | ctacaagacc  | acacctccca | tgctggactc | cgacggctcc  | 1260 |
| ttcttctctc  | acagcaagct  | caccgtggac  | aagagcaggt | ggcagcaggg | gaacgtcttc  | 1320 |
| tcattgctccg | tgatgcatga  | ggctctgcac  | aaccactaca | cgcagaagag | cctctccctg  | 1380 |
| tctccgggta  | aatga       |             |            |            |             | 1395 |

<210> 143  
 <211> 702  
 <212> DNA  
 <213> Human

|            |            |            |            |            |            |     |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| <400> 143  |            |            |            |            |            |     |
| atggaaaccc | cagcgcagct | tctcttcctc | ctgctactct | ggctcccaga | taccaccgga | 60  |
| gaaatttgtg | tgacgcagtc | tccaggcacc | ctgtctttgt | ctccagggga | aagagccacc | 120 |
| ctctcctgca | ggaccagtgt | tagcagcagt | tacttagcct | ggtaccagca | gaaacctggc | 180 |
| caggtcctca | ggctcctcat | ctatgggtga | tccagcaggg | ccactggcat | cccagacagg | 240 |
| ttcagtggca | gtgggtctgg | gacagacttc | actctacca  | tcagcagact | ggagcctgaa | 300 |
| gattttgcag | tctattactg | tcagcagtat | ggcatctcac | ccttcacttt | cggcggaggg | 360 |
| accaaggtgg | agatcaagcg | aactgtgggt | gcaccatctg | tcttcactct | cccgccatct | 420 |
| gatgagcagt | tgaaatctgg | aactgcctct | gttggtgtgc | tgctgaataa | cttctatccc | 480 |
| agagaggcca | aagtacagtg | gaaggtggat | aacgccctcc | aatcgggtaa | ctcccaggag | 540 |
| agtgtcacag | agcaggacag | caaggacagc | acctacagcc | tcagcagcac | cctgacgctg | 600 |
| agcaaagcag | actacgagaa | acacaaagtc | tacgcctgcg | aagtcaccca | tcagggcctg | 660 |
| agctcgcccc | tcacaaagag | cttcaacagg | ggagagtgtt | ag         |            | 702 |

<210> 144  
 <211> 1392  
 <212> DNA  
 <213> Human

|            |            |            |            |            |            |     |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| <400> 144  |            |            |            |            |            |     |
| atggagtttg | ggctgagctg | ggttttcctc | gttgctcttt | taagaggtgt | ccagtgtcag | 60  |
| gtgcagctgg | tggagtctgg | gggaggcgtg | gtcagacctg | ggaggtccct | gagactctcc | 120 |

|            |             |            |            |             |             |      |
|------------|-------------|------------|------------|-------------|-------------|------|
| tgtacagcgt | ctggattcac  | cttcagtagt | tatggcatgc | actgggtccg  | ccagggtcca  | 180  |
| ggcaaggggc | tggagtgggt  | ggcagttata | tggtatgatg | gaagcaataa  | acactatgca  | 240  |
| gactccgcga | agggccgatt  | caccatctcc | agagacaatt | ccaagaacac  | gctgtatctg  | 300  |
| caaatgaaca | gcctgagagc  | cgaggacacg | gctgtgtatt | actgtgcgag  | agccggactg  | 360  |
| ctgggttact | ttgactactg  | gggccaggga | accctggtca | ccgtctcctc  | agcctccacc  | 420  |
| aagggcccat | cggctctccc  | cctggcgccc | tgctccagga | gcacctccga  | gagcacagcg  | 480  |
| gccctgggct | gcctgggtcaa | ggactacttc | cccgaaccgg | tgacgggtgtc | gtggaactca  | 540  |
| ggcgctctga | ccagcggcgt  | gcacaccttc | ccagctgtcc | tacagtcctc  | aggactctac  | 600  |
| tccttcagca | gcgtgggtgac | cgtgccctcc | agcaacttcg | gcaccagac   | ctacacctgc  | 660  |
| aacgtagatc | acaagcccag  | caacaccaag | gtggacaaga | cagttgagcg  | caaatgttgt  | 720  |
| gtcgagtgcc | caccgtgccc  | agcaccacct | gtggcaggac | cgtcagtcct  | cctcttcccc  | 780  |
| ccaaaaccca | aggacacctt  | catgatctcc | cggacccttg | aggtcacgtg  | cgtgggtggtg | 840  |
| gacgtgagcc | acgaagacct  | cgaggtccag | ttcaactggt | acgtggacgg  | cgtggagggtg | 900  |
| cataatgcc  | agacaaagcc  | acgggaggag | cagttcaaca | gcacgttccg  | tgtgggtcagc | 960  |
| gtcctcaccg | ttgtgcacca  | ggactggctg | aacggcaagg | agtacaagtg  | caagggtctcc | 1020 |
| aacaaaggcc | tcccagcccc  | catcgagaaa | accatctcca | aaaccaaagg  | gcagccccga  | 1080 |
| gaaccacagg | tgtacacctt  | gccccatcc  | cgggaggaga | tgaccaagaa  | ccagggtcagc | 1140 |
| ctgacctgcc | tggtaaaagg  | cttctacccc | agcgacatcg | ccgtggagtg  | ggagagcaat  | 1200 |
| gggcagccgg | agaacaacta  | caagaccaca | cctcccatgc | tggactccga  | cggtccttc   | 1260 |
| ttcctctaca | gcaagctcac  | cgtggacaag | agcaggtggc | agcaggggaa  | cgtcttctca  | 1320 |
| tgctccgtga | tgcatgaggc  | tctgcacaac | cactacacgc | agaagagcct  | ctccctgtct  | 1380 |
| ccgggtaaat | ga          |            |            |             |             | 1392 |

&lt;210&gt; 145

&lt;211&gt; 705

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 145

|            |            |             |            |            |            |     |
|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|-----|
| atggaaaccc | cagcgcagct | tctcttcctc  | ctgctactct | ggctcccaga | taccaccgga | 60  |
| gaaatttgtg | tgacgcagtc | tccaggcacc  | ctgtctttgt | ctccagggga | aagagccacc | 120 |
| ctctcctgta | gggccagtc  | aagtgttagc  | agctacttag | cctggtacca | acagaaacct | 180 |
| ggccaggctc | ccaggcccc  | catctatggg  | gtatccagca | gggccactgg | catcccagac | 240 |
| aggttcagtg | gcagtgggtc | tgggacagac  | ttcactctca | ccatcagcag | actggagcct | 300 |
| gaagattttg | cagtgtatta | ctgtcagcag  | tatggatctt | caccattcac | tttcggccct | 360 |
| gggaccaaag | tggatatcaa | acgaactgtg  | gctgcaccat | ctgtcttcat | cttcccgcga | 420 |
| tctgatgagc | agttgaaatc | tggaaactgcc | tctgttgtgt | gcctgctgaa | taacttctat | 480 |
| cccagagagg | ccaaagtaca | gtggaagggtg | gataacgccc | tccaatcggg | taactcccag | 540 |
| gagagtgtca | cagagcagga | cagcaaggac  | agcactaca  | gcctcagcag | caccctgacg | 600 |
| ctgagcaaa  | gagactacga | gaaacacaaa  | gtctacgct  | gcgaagtcac | ccatcagggc | 660 |
| ctgagctcgc | ccgtcacaaa | gagcttcaac  | aggggagagt | gtag       |            | 705 |

&lt;210&gt; 146

&lt;211&gt; 1413

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 146

|            |            |            |            |            |            |     |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| atggagtttg | ggctgagctg | ggttttcctc | gttgctcttt | taagaggtgt | ccagtgtcag | 60  |
| gtgcagctgg | tggagtctgg | gggaggcgtg | gtccagcctg | ggaggtccct | gagactctcc | 120 |
| tgtgcagcgt | ctggattcac | cttcagtagc | tatggcatgc | actgggtccg | ccagggtcca | 180 |
| ggcaaggggc | tggagtgggt | ggcagttata | tggtatgatg | gaagtaataa | atactatgca | 240 |
| gactccgtga | agggccgatt | caccatctcc | agagacaatt | ccaagaacac | gctgtatctg | 300 |
| caaatgaaca | gcctgagagc | cgaggacacg | gctgtgtatt | actgtgcgag | agatccgagg | 360 |
| ggagctaccc | tttactacta | ctactacggg | atggacgtct | ggggccaagg | gaccacggtc | 420 |
| accgtctcct | cagcctccac | caagggccca | tgggtcttcc | ccctggcgcc | ctgctccagg | 480 |
| agcacctccg | agagcacagc | ggccctgggc | tgcttggtca | aggactactt | ccccgaaccg | 540 |
| gtgacgggtg | cgtggaactc | aggcgtctg  | accagcggcg | tgacacacct | cccagctgtc | 600 |
| ctacagtcct | caggactcta | ctccctcagc | agcgtgggtg | ccgtgccctc | cagcaacttc | 660 |
| ggcaccacga | cctacacctg | caacgtagat | cacaagccca | gcaacaccaa | ggtggacaag | 720 |
| acagttgagc | gcaaatgttg | tgtcgagtgc | ccaccgtgcc | cagcaccacc | tgtggcagga | 780 |

|             |            |            |             |            |            |      |
|-------------|------------|------------|-------------|------------|------------|------|
| ccgtcagttct | tcctcttccc | cccaaaaccc | aaggacaccc  | tcatgatctc | ccggacccct | 840  |
| gaggtcacgt  | gcgtgggtgt | ggacgtgagc | cacgaagacc  | ccgaggtcca | gttcaactgg | 900  |
| tacgtggacg  | gcgtggaggt | gcataatgcc | aagacaaagc  | cacgggagga | gcagttcaac | 960  |
| agcacgttcc  | gtgtggtcag | cgtcctcacc | gttgtgcacc  | aggactggct | gaacggcaag | 1020 |
| gagtacaagt  | gcaaggtctc | caacaaaggc | ctcccagccc  | ccatcgagaa | aacctcttcc | 1080 |
| aaaaccaaaag | ggcagccccg | agaaccacag | gtgtacaccc  | tgcccccatc | ccgggaggag | 1140 |
| atgaccaaga  | accaggtcag | cctgacctgc | ctgggtcaaag | gcttctaccc | cagcgacatc | 1200 |
| gccgtggagt  | gggagagcaa | tgggcagccg | gagaacaact  | acaagaccac | acctcccatg | 1260 |
| ctggactccg  | acggctcctt | cttcctctac | agcaagctca  | ccgtggacaa | gagcaggtgg | 1320 |
| cagcagggga  | acgtcttctc | atgctccgtg | atgcatgagg  | ctctgcacaa | ccactacacg | 1380 |
| cagaagagcc  | tctccctgtc | tccgggtaaa | tga         |            |            | 1413 |

&lt;210&gt; 147

&lt;211&gt; 714

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 147

|            |             |            |            |            |             |     |
|------------|-------------|------------|------------|------------|-------------|-----|
| atggacatga | gggtccccgc  | tcagctcctg | gggctcctgc | tactctggct | ccgaggtgcc  | 60  |
| agatgtgaca | tccagatgac  | ccagtctcca | tcctccctgt | ctgcatctgt | aggagacaga  | 120 |
| gtcaccatca | cttgccgggc  | aagtcagagc | attaacagct | atttagattg | gtatcagcag  | 180 |
| aaaccagggg | aagccccctaa | actcctgata | tatgctgcat | ccagtttgca | aagtggggtc  | 240 |
| ccatcaaggt | tcagtggcag  | tggatctggg | acagatttca | ctctcaccat | cagcagctctg | 300 |
| caacctgaag | atthttgcaac | ttactactgt | caacagtatt | acagtactcc | attcactttc  | 360 |
| ggccctggga | ccaaagtggg  | aatcaaacga | actgtggctg | caccatctgt | cttcactctt  | 420 |
| ccgccatctg | atgagcagtt  | gaaatctgga | actgcctctg | ttgtgtgcct | gctgaataac  | 480 |
| ttctatccca | gagaggccaa  | agtacagtgg | aaggtggata | acgccctcca | atcgggtaac  | 540 |
| tcccaggaga | gtgtcacaga  | gcaggacagc | aaggacagca | cctacagcct | cagcagcacc  | 600 |
| ctgacgctga | gcaaagcaga  | ctacgagaaa | cacaaagtct | acgcctgcga | agtcacccat  | 660 |
| cagggcctga | gctcgcccg   | cacaaagagc | ttcaacaggg | gagagtgtta | gtga        | 714 |

Seznam citované literatury

Všechny publikace citované v přihlášce včetně patentů, patentových přihlášek, vědeckých článků, příruček apod., a také publikace v nich citované, jsou zahrnuty v plném rozsahu formou odkazu. Kromě toho jsou plně zahrnuty i následující publikace, včetně publikací v nich citovaných.

Alegre et al. *J Immunol* 157:4762-70 (1996)

Allison and Krummel *Science* 270:932-933 (1995)

Balzano et al. *Int J Cancer Suppl* 7:28-32 (1992)

Blair et al. *J Immunol* 160:12-5 (1998)

Blake and Litzi-Davis *BioConjugate Chem.* 3:510-513 (1992)

Boussiotis et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:11059-63 (1993)

Bowie et al. *Science* 253:164 (1991)

Bruggeman et al. *PNAS USA* 86:6709-6713 (1989)

Bruggeman, M. and Neuberger, M.S. in *Methods: A companion to Methods in Enzymology* 2:159-165 (Lerner et al. eds. Academic Press (1991))

Bruggemann et al., "Human antibody production in transgenic mice: expression from 100 kb of the human IgH locus." *Eur. J. Immunol.* 21:1323-1326 (1991)

Bruggemann, M. and Neuberger, M.S. "Strategies for expressing human antibody repertoires in transgenic mice." *Immunology Today* 17:391-397 (1996)

Brunet et al. *Nature* 328:267-270 (1987)

Bumpers et al. *J. Surgical Res.* 61:282-288 (1996)

Capsey et al. *Genetically Engineered Human Therapeutic Drugs* (Stockton Press, NY (1988))

Castan et al. *Immunology* 90:265-71 (1997)

- Cepero et al. *J Exp Med* 188:199-204 (1998)
- Chen et al. "Immunoglobulin gene rearrangement in B-cell deficient mice generated by targeted deletion of the J<sub>H</sub> locus" *International Immunology* 5:647-656 (1993)
- Chen et al. *Cell* 71:1093-1102 (1992)
- Chen et al. *Human Gene Therapy* 5:595-601 (1994)
- Chiswell and McCafferty *TIBTECH* 10:80-84 (1992)
- Choi et al. "Transgenic mice containing a human heavy chain immunoglobulin gene fragment cloned in a yeast artificial chromosome" *Nature Genetics* 4:117-123 (1993)
- Chothia & Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)
- Chothia et al. *Nature* 342:878-883 (1989)
- Chuang et al. *J. Immunol.* 159:144-151 (1997)
- Coligan et al., Unit 2.1, "Enzyme-linked immunosorbent assays," in *Current protocols in immunology* (1994)
- Cwirla et al. *PNAS USA* 87:6378-6382 (1990)
- Dariavach et al. *Eur. J. Immunol.* 18:1901-1905 (1988)
- Dayhoff, M.O., in *Atlas of Protein Sequence and Structure*, pp. 101-110 (Volume 5, National Biomedical Research Foundation (1972)) and Supplement 2 to this volume, pp. 1-10
- de Boer et al. *Eur J Immunol* 23:3120-5 (1993)
- Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991))
- Evans et al. *J. Med. Chem.* 30:1229 (1987)
- Fallarino et al. *J Exp Med* 188:205-10 (1998)
- Fanger et al. *Immunol Methods* 4:72-81 (1994)
- Fauchere, J. *Adv. Drug Res.* 15:29 (1986)
- Fishwild et al., "High-avidity human IgG<sub>Y</sub> monoclonal antibodies from a novel strain of minilocus transgenic mice." *Nature Biotech.* 14:845-851 (1996).

- Freeman et al. *J Exp Med* 178:2185-92 (1993)
- Freeman et al. *J Immunol* 161:2708-15 (1998)
- Freeman et al. *Science* 262:907-9 (1993)
- Fundamental Immunology* Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989))
- Galfre, G. and Milstein, C., "Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures." *Methods Enzymol.* 73:3-46 (1981)
- Gorman et al. *P.N.A.S.* 79:6777 (1982)
- Green and Jakobovits *J. Exp. Med.* 188:483-495 (1998)
- Green et al. *Nature Genetics* 7:13-21 (1994)
- Grosschedl et al. *Cell* 41:885 (1985)
- Hanes and Pluchau *PNAS USA* 94:4937-4942 (1997)
- Harding et al. *Nature* 356:607-609 (1994)
- Harper et al. *J Immunol* 147:1037-44 (1991)
- Hathcock et al. *Science* 262:905-7 (1993)
- Hoganboom et al. *Immunol. Reviews* 130:43-68 (1992)
- Horspool et al. *J Immunol* 160:2706-14 (1998)
- Houghten et al. *Biotechniques* 13:412-421 (1992)
- Houghten *PNAS USA* 82:5131-5135 (1985)
- Hurwitz et al. *J Neuroimmunol* 73:57-62 (1997)
- Hurwitz et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:10067-71 (1998)
- Immunology - A Synthesis* (2<sup>nd</sup> Edition, E.S. Golub and D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991))
- Introduction to Protein Structure* (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991))

Jakobovits et al., "Germ-line transmission and expression of a human-derived yeast artificial-chromosome." *Nature* 362:255-258 (1993)

Jakobovits, A. et al., "Analysis of homozygous mutant chimeric mice: Deletion of the immunoglobulin heavy-chain joining region blocks B-cell development and antibody production." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2551-2555 (1993)

Jakobovits, A., "Humanizing the mouse genome." *Current Biology* 4:761-763 (1994)

Jakobovits, A., "Production of fully human antibodies by transgenic mice." *Current Opinion in Biotechnology* 6:561-566 (1995)

Junghans et al. in *Cancer Chemotherapy and Biotherapy* 655-686 (2d edition, Chafner and Longo, eds., Lippincott Raven (1996))

Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, N.I.H. publication no. 91-3242

Kabat *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991))

Kostelny et al. *J. Immunol.* 148:1547-1553 (1992)

Krummel and Allison *J Exp Med* 182:459-65 (1995)

Krummel et al. *Int Immunol* 8:519-23 (1996)

Kuchroo et al. *Cell* 80:707-18 (1995)

Kwon et al. *PNAS USA* 94:8099-103 (1997)

LaPlanche et al. *Nucl. Acids Res.* 14:9081 (1986)

Lenschow et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:11054-8 (1993)

Lenschow et al. *Science* 257:789-792 (1992)

Lin et al. *J Exp Med* 188:199-204 (1998)

Linsley et al. *J Exp Med* 176:1595-604 (1992)

Linsley et al. *J. Exp. Med.* 174:561-569 (1991)

Linsley et al. *Science* 257:792-795 (1992)

Liu et al. *J.Immunol.*139:3521 (1987)

- Liu et al. *P.N.A.S.* 84:3439 (1987)
- Lonberg et al., "Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications." *Nature* 368:856-859 (1994).
- Luhder et al. *J Exp Med* 187:427-32 (1998)
- Marasco *Gene Therapy* 4:11-15 (1997)
- Markees et al. *J Clin Invest* 101:2446-55 (1998)
- Marks et al., "Oligonucleotide primers for polymerase chain reaction amplification of human immunoglobulin variable genes and design of family-specific oligonucleotide probes." *Eur. J. Immunol.* 21:985-991 (1991)
- McCoy et al. *J Exp Med* 186:183-7 (1997)
- Mendez et al. *Nature Genetics* 15:146-156 (1997)
- Needleman and Wunsch *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970)
- Okayama et al. *Mol. Cell. Bio.* 3:280 (1983)
- Parmley and Smith *Gene* 73:305-318 (1988)
- Pearson and Lipman *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 85:2444 (1988)
- Perez et al. *Immunity* 6:411-7 (1997)
- Perrin et al. *Immunol Res* 14:189-99 (1995)
- Perrin et al. *J Immunol* 157:1333-6 (1996)
- Pinalla et al. *Biotechniques* 13:901-905 (1992)
- Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984))
- Razi-Wolf et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:11182-6 (1993)
- Remington's Pharmaceutical Sciences (15<sup>th</sup> ed, Mack Publishing Company, Easton, PA (1975)), particularly Chapter 87 by Blaug, Seymour
- Rizo and Gierasch *Ann. Rev. Biochem.* 61:387 (1992)
- Russel et al. *Nucl. Acids Research* 21:1081-1085 (1993)
- Schwartz *Cell* 71:1065 (1992)

Scott *TIBS* 17:241-245 (1992)

Smith and Waterman *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981)

Songsivilai & Lachmann *Clin. Exp. Immunol.* 79: 315-321 (1990)

Stec et al. *J. Am. Chem. Soc.* 106:6077 (1984)

Stein et al. *Nucl. Acids Res.* 16:3209 (1988)

Taylor et al., "A transgenic mouse that expresses a diversity of human sequence heavy and light chain immunoglobulins." *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295 (1992)

Taylor et al., "Human immunoglobulin transgenes undergo rearrangement, somatic mutation and class switching in mice that lack endogenous IgM." *International Immunology* 6:579-591 (1994)

*The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985))

Thornton et al. *Nature* 354:105 (1991)

Tivol et al. *Immunity* 3:541-7 (1995)

Townsend and Allison *Science* 259:368 (1993)

Traunecker et al. *Int. J. Cancer (Suppl.)* 7:51-52 (1992)

Tuaillon et al. "Analysis of direct and inverted DJ<sub>H</sub> rearrangements in a human Ig heavy chain transgenic minilocus" *J. Immunol.* 154:6453-6465 (1995)

Tuaillon et al., "Human immunoglobulin heavy-chain minilocus recombination in transgenic mice: gene-segment use in  $\mu$  and  $\gamma$  transcripts." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-3724 (1993)

Uhlmann and Peyman *Chemical Reviews* 90:543 (1990)

Van Parijs et al. *J Exp Med* 186:1119-28 (1997)

Veber and Freidinger *TINS* p.392 (1985)

Vitetta *Immunol Today* 14:252 (1993)

Walunas et al. *Immunity* 1:405-13 (1994)

Walunas et al. *J Exp Med* 183:2541-50 (1996)

- Waterhouse et al. *Science* 270:985-988 (1995)
- Winter and Harris *Immunol Today* 14:43-46 (1993)
- Wright et al. *Crit. Reviews in Immunol.* 12:125-168 (1992)
- Yang et al. *Cancer Res* 57:4036-41 (1997)
- Yi-qun et al. *Int Immunol* 8:37-44 (1996)
- Zon et al. *Anti-Cancer Drug Design* 6:539 (1991)
- Zon et al. *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991))
- Fry et al. "Specific, irreversible inactivation of the epidermal growth factor receptor and erbB2, by a new class of tyrosine kinase inhibitor" *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:12022-7 (1998)
- Hoffman et al. "A model of Cdc25 phosphatase catalytic domain and Cdk-interaction surface based on the presence of a rhodanese homology domain" *J Mol Biol* 282:195-208 (1998)
- Ginalski et al. "Modelling of active forms of protein kinases: p38--a case study" *Acta Biochim Pol* 44:557-64 (1997)
- Jouko et al. "Identification of csk tyrosine phosphorylation sites and a tyrosine residue important for kinase domain structure" *Biochem J* 322:927-35 (1997)
- Singh et al. "Structure-based design of a potent, selective, and irreversible inhibitor of the catalytic domain of the erbB receptor subfamily of protein tyrosine kinases" *J Med Chem* 40:1130-5 (1997)
- Mandel et al. "ABGEN: a knowledge-based automated approach for antibody structure modeling" *Nat Biotechnol* 14:323-8 (1996)
- Monfardini et al. "Rational design, analysis, and potential utility of GM-CSF antagonists" *Proc Assoc Am Physicians* 108:420-31 (1996)
- Furet et al. "Modelling study of protein kinase inhibitors: binding mode of staurosporine and origin of the selectivity of CGP 52411" *J Comput Aided Mol Des* 9:465-72 (1995)
- Ill et al. "Design and construction of a hybrid immunoglobulin domain with properties of both heavy and light chain variable regions" *Protein Eng* 10:949-57 (1997)

Martin et al. "The affinity-selection of a minibody polypeptide inhibitor of human interleukin-6" *EMBO J* 13:5303-9 (1994)

Přihlášky vynálezu USA:

U.S. Patent Application Serial No. 07/466,008, filed January 12, 1990  
U.S. Patent Application Serial No. 07/574,748, filed August 29, 1990  
U.S. Patent Application Serial No. 07/575,962, filed August 31, 1990  
U.S. Patent Application Serial No. 07/610,515, filed November 8, 1990  
U.S. Patent Application Serial No. 07/810,279, filed December 17, 1991  
U.S. Patent Application Serial No. 07/853,408, filed March 18, 1992  
U.S. Patent Application Serial No. 07/904,068, filed June 23, 1992  
U.S. Patent Application Serial No. 07/919,297, filed July 24, 1992  
U.S. Patent Application Serial No. 07/922,649, filed July 30, 1992  
U.S. Patent Application Serial No. 07/990,860, filed December 16, 1992  
U.S. Patent Application Serial No. 08/031,801, filed March 15, 1993  
U.S. Patent Application Serial No. 08/053,131, filed April 26, 1993  
U.S. Patent Application Serial No. 08/096,762, filed July 22, 1993  
U.S. Patent Application Serial No. 08/112,848, filed August 27, 1993  
U.S. Patent Application Serial No. 08/155,301, filed November 18, 1993  
U.S. Patent Application Serial No. 08/161,739, filed December 3, 1993  
U.S. Patent Application Serial No. 08/165,699, filed December 10, 1993  
U.S. Patent Application Serial No. 08/209,741, filed March 9, 1994  
U.S. Patent Application Serial No. 08/234,145, filed April 28, 1994  
U.S. Patent Application Serial No. 08/724,752, filed October 2, 1996  
U.S. Patent Application Serial No. 08/730,639, filed October 11, 1996  
U.S. Patent Application Serial No. 08/759,620, filed December 3, 1996  
U.S. Patent Application Serial No. 08/759,620, filed December 3, 1996

Patenty USA:

U.S. Patent No. 4,399,216  
U.S. Patent No. 4,681,581  
U.S. Patent No. 4,683,195  
U.S. Patent No. 4,683,202  
U.S. Patent No. 4,735,210  
U.S. Patent No. 4,740,461  
U.S. Patent No. 4,816,397  
U.S. Patent No. 4,912,040  
U.S. Patent No. 4,959,455  
U.S. Patent No. 5,101,827  
U.S. Patent No. 5,102,990 (RE 35,500)  
U.S. Patent No. 5,151,510  
U.S. Patent No. 5,194,594  
U.S. Patent No. 5,434,131  
U.S. Patent No. 5,530,101  
U.S. Patent No. 5,545,806  
U.S. Patent No. 5,545,807  
U.S. Patent No. 5,585,089  
U.S. Patent No. 5,591,669

U.S. Patent No. 5,612,205  
U.S. Patent No. 5,625,126  
U.S. Patent No. 5,625,825  
U.S. Patent No. 5,633,425  
U.S. Patent No. 5,643,763  
U.S. Patent No. 5,648,471  
U.S. Patent No. 5,661,016  
U.S. Patent No. 5,693,761  
U.S. Patent No. 5,693,792  
U.S. Patent No. 5,697,902  
U.S. Patent No. 5,703,057  
U.S. Patent No. 5,714,350  
U.S. Patent No. 5,721,367  
U.S. Patent No. 5,733,743  
U.S. Patent No. 5,770,197  
U.S. Patent No. 5,770,429  
U.S. Patent No. 5,773,253  
U.S. Patent No. 5,777,085  
U.S. Patent No. 5,789,215  
U.S. Patent No. 5,789,650  
U.S. Patent No. 5,811,097

Evropské patenty:

European Patent No. EP 0 546 073 B1

European Patent No. EP 0 463 151 B1, grant published June 12, 1996

Mezinárodní přihlášky PCT:

International Patent Application No. WO 92/02190  
International Patent Application No. WO 92/03918  
International Patent Application No. WO 92/22645  
International Patent Application No. WO 92/22647  
International Patent Application No. WO 92/22670  
International Patent Application No. WO 93/00431  
International Patent Application No. WO 93/12227  
International Patent Application No. WO 94/00569  
International Patent Application No. WO 94/02602, published February 3, 1994  
International Patent Application No. WO 94/25585  
International Patent Application No. WO 94/29444  
International Patent Application No. WO 95/01994  
International Patent Application No. WO 95/03408  
International Patent Application No. WO 95/24217  
International Patent Application No. WO 95/33770  
International Patent Application No. WO 96/14436  
International Patent Application No. WO 96/34096, published October 31, 1996  
International Patent Application No. WO 97/13852  
International Patent Application No. WO 97/20574  
International Patent Application No. WO 97/38137  
International Patent Application No. WO 98/24884

International Patent Application No. WO 98/24893, published June 11, 1998

### Ekvivalenty

Popis vynálezu a příklady výhodných provedení uvádějí dle původců nejvýhodnější provedení vynálezu. Je však zřejmé, že vynález lze realizovat různými ekvivalentními způsoby. Předmět vynálezu je definován následujícími patentovým nároky a jejich ekvivalenty.

## P A T E N T O V É   N Á R O K Y

1. Lidská monoklonální protilátka, která se váže na antigen 4 cytotoxických T lymfocytů (CTLA-4) nebo její fragment vázající se na antigen.
2. Protilátka nebo její fragment podle nároku 1, která inhibuje vazbu lidského CTLA-4 na B7-1 s  $IC_{50}$  100 nM nebo nižší, a inhibuje vazbu lidského CTLA-4 na B7-2 s  $IC_{50}$  100 nM nebo nižší, přičemž protilátka má alespoň jednu vlastnost vybranou z následujících:
  - a) váže se na CTLA-4 s vazebnou afinitou  $10^{-9}$  nebo vyšší,
  - b) zvyšuje produkci cytokinů v testu lidských T lymfocytů o 500 pg/ml nebo více,
  - c) zvyšuje produkci IL-2 v testu lidských T lymfocytů o 500 pg/ml nebo více,
  - d) zvyšuje produkci interferonu- $\gamma$  v testu lidských T lymfocytů o 500 pg/ml nebo více,
  - e) neváže se na CTLA-4 myši, potkana nebo králíka, a
  - f) váže se na CTLA-4 "cynomolgního" makaka (*Macaca fascicularis*) a "rhesus" makaka (*Macaca mullata*).
3. Způsob přípravy protilátek vázajících se na CTLA-4 v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje kroky, kdy:
  - a) imunizuje se savec jiný než člověk imunogenem obsahujícím CTLA-4, přičemž tento savec je schopen exprimovat lidské protilátky ve svých B lymfocytech,
  - b) ze savce se izolují B lymfocyty,
  - c) provede se screening B lymfocytů nebo buněčných linií pocházejících z těchto lymfocytů na protilátky vázající se na CTLA-4,

- d) kultivují se buněčné linie exprimující protilátky vázající se na CTLA-4, a
  - e) izolují se protilátky vázající se na CTLA-4.
4. Protilátka vázající se na CTLA-4, která je připravena způsobem podle nároku 3.
5. Protilátka nebo její fragment podle kteréhokoliv z nároků 1, 2 a 4, která inhibuje vazbu lidského CTLA-4 na B7-1 s  $IC_{50}$  nižší než 0,50 nM a inhibuje vazbu lidského CTLA-4 na B7-2 s  $IC_{50}$  nižší než 0,38 nM.
6. Protilátka nebo její fragment podle nároku 1, která obsahuje aminokyselinovou sekvenci lehkého řetězce vybranou ze skupiny obsahující:
- a) zárodečnou aminokyselinovou sekvenci lidského genu A27 V<sub>L</sub> nebo tuto zárodečnou sekvenci s alespoň jednou mutací,
  - b) zárodečnou aminokyselinovou sekvenci lidského genu 012 V<sub>L</sub> nebo tuto zárodečnou sekvenci s alespoň jednou mutací,
  - c) zárodečnou aminokyselinovou sekvenci lidského genu A10/A26 V<sub>L</sub> nebo tuto zárodečnou sekvenci s alespoň jednou mutací,
  - d) zárodečnou aminokyselinovou sekvenci lidského genu A17 V<sub>L</sub> nebo tuto zárodečnou sekvenci s alespoň jednou mutací,
  - e) zárodečnou aminokyselinovou sekvenci lidského genu A3/A19 V<sub>L</sub> nebo tuto zárodečnou sekvenci s alespoň jednou mutací.

7. Protilátka nebo její fragment podle nároku 6, kde zárodečná aminokyselinová sekvence lidského genu A27 V<sub>L</sub> obsahuje alespoň jednu mutaci vybranou ze skupiny obsahující mutace:
- a) alespoň jedna aminokyselina v CDR1 je deletována ve srovnání s lidskou zárodečnou aminokyselinovou sekvencí A27 V<sub>L</sub>,
  - b) serinový zbytek v pozici 6 zárodečné CDR3, uvedené na obr. 4, lidského genu A27 V<sub>L</sub> byl nahrazen, a
  - c) CDR1 obsahuje alespoň jednu konzervativní nebo nekonzervativní aminokyselinovou substituci ve srovnání s lidskou zárodečnou aminokyselinovou sekvencí A27 V<sub>L</sub>.
8. Protilátka nebo její fragment podle kteréhokoliv z nároků 1, 2 a 4 až 7, která obsahuje sekvence lehkého řetězce CDR1, CDR2 nebo CDR3 uvedené na kterémkoliv z obrázků 4 až 8.
9. Protilátka nebo její fragment podle nároku 8, kde aminokyselinová sekvence CDR1, CDR2 nebo CDR3 je vybrána ze skupiny obsahující:
- a) aminokyselinové sekvence CDR1, CDR2 a CDR3 protilátky 4.1.1, protilátky 4.14.3., protilátky 6.1.1, protilátky 4.10.2 nebo protilátky 4.13.1, uvedených na obr. 4,
  - b) aminokyselinové sekvence CDR1, CDR2 a CDR3 protilátky 3.1.1, protilátky 11.2.1, protilátky 11.6.1 nebo protilátky 11.7.1, uvedených na obr. 5,
  - c) aminokyselinové sekvence CDR1, CDR2 a CDR3 protilátky 2.1.3 uvedené na obr. 6,
  - d) aminokyselinové sekvence CDR1, CDR2 a CDR3 protilátky 12.3.1 uvedené na obr. 7,
  - e) aminokyselinové sekvence CDR1, CDR2 a CDR3 protilátky

12.9.1 uvedené na obr. 8.

10. Protilátka nebo její fragment podle kteréhokoliv z nároků 1, 2 a 4 až 9, která obsahuje aminokyselinovou sekvenci lehkého řetězce vybranou ze skupiny obsahující aminokyselinové sekvence uvedené zde jako SEKVENCE ID. Č. 14 až 26, 65, 67, 69 a 71.
11. Protilátka nebo její fragment podle kteréhokoliv z nároků 1, 2 a 4 až 10, která má těžký řetězec obsahující zárodečnou aminokyselinovou sekvenci lidského genu V<sub>H</sub> 3-33 (DP-50) nebo tuto zárodečnou sekvenci s alespoň jednou mutací.
12. Protilátka nebo její fragment podle nároku 1, která obsahuje aminokyselinovou sekvenci těžkého řetězce vybranou ze skupiny obsahující:
- a) zárodečnou aminokyselinovou sekvenci lidského genu V<sub>H</sub> 3-33 (DP-50) nebo tuto zárodečnou sekvenci s alespoň jednou mutací,
  - b) zárodečnou aminokyselinovou sekvenci lidského genu V<sub>H</sub> 4-31 (DP-65) nebo tuto zárodečnou sekvenci s alespoň jednou mutací, a
  - c) zárodečnou aminokyselinovou sekvenci lidského genu V<sub>H</sub> DP-47 nebo tuto zárodečnou sekvenci s alespoň jednou mutací.
13. Protilátka nebo její fragment podle nároku 1 nebo 11, která obsahuje sekvenci CDR1, CDR2 a CDR3 těžkého řetězce uvedenou na obr. 2.

14. Protilátka nebo její fragment podle nároku 1, která obsahuje těžký řetězec obsahující aminokyselinové sekvence CDR1, CDR2 a CDR3 protilátky uvedené na obr. 2.
15. Protilátka nebo její fragment podle kteréhokoliv z nároků 1, 2 a 4 až 14, která obsahuje aminokyselinovou sekvenci těžkého řetězce vybranou ze skupiny obsahující aminokyselinové sekvence uvedené zde jako SEKVENCE ID. Č. 1 až 8, 10 až 13, 63, 66, 68 nebo 70.
16. Protilátka nebo její fragment podle nároku 1, která je vybraná ze skupiny obsahující:
- a) protilátku nebo její fragment obsahující aminokyselinovou sekvenci variabilního úseku těžkého řetězce uvedenou jako SEKVENCE ID. Č. 63 a dále obsahující aminokyselinovou sekvenci variabilního úseku lehkého řetězce uvedenou jako SEKVENCE ID. Č. 65,
  - b) protilátku nebo její fragment obsahující aminokyselinovou sekvenci variabilního úseku těžkého řetězce uvedenou jako SEKVENCE ID. Č. 66 a dále obsahující aminokyselinovou sekvenci variabilního úseku lehkého řetězce uvedenou jako SEKVENCE ID. Č. 67,
  - c) protilátku nebo její fragment obsahující aminokyselinovou sekvenci variabilního úseku těžkého řetězce uvedenou jako SEKVENCE ID. Č. 68 a dále obsahující aminokyselinovou sekvenci variabilního úseku lehkého řetězce uvedenou jako SEKVENCE ID. Č. 69,
  - d) protilátku nebo její fragment obsahující aminokyselinovou sekvenci variabilního úseku těžkého řetězce uvedenou jako SEKVENCE ID. Č. 70 a dále obsahující aminokyselinovou sekvenci variabilního úseku lehkého řetězce uvedenou jako SEKVENCE ID. Č. 71.

17. Protilátka nebo její fragment podle nároku 16, která obsahuje:

- a) aminokyselinovou sekvenci těžkého řetězce podle SEKVENCE ID. Č. 63 a aminokyselinovou sekvenci lehkého řetězce podle SEKVENCE ID. Č. 65, přičemž protilátka postrádá signální peptidy uvedené v těchto sekvencích,
- b) aminokyselinovou sekvenci těžkého řetězce podle SEKVENCE ID. Č. 66 a aminokyselinovou sekvenci lehkého řetězce podle SEKVENCE ID. Č. 67, přičemž protilátka postrádá signální peptidy uvedené v těchto sekvencích,
- c) aminokyselinovou sekvenci těžkého řetězce podle SEKVENCE ID. Č. 68 a aminokyselinovou sekvenci lehkého řetězce podle SEKVENCE ID. Č. 69, přičemž protilátka postrádá signální peptidy uvedené v těchto sekvencích,
- d) aminokyselinovou sekvenci těžkého řetězce podle SEKVENCE ID. Č. 70 a aminokyselinovou sekvenci lehkého řetězce podle SEKVENCE ID. Č. 71, přičemž protilátka postrádá signální peptidy uvedené v těchto sekvencích.

18. Protilátka podle nároku 1, která má jednu nebo více vlastností vybraných ze skupiny obsahující vlastnosti:

- a) kompetitivně inhibuje vazbu CTLA-4 s protilátkou podle nároku 16 nebo 17,
- b) váže se na stejný epitop jako protilátka podle nároku 16 nebo 17, a
- c) má vazebnou specificitu, která je v podstatě shodná s protilátkou podle nároku 16 nebo 17.

19. Protilátka, která kompetitivně inhibuje vazbu CTLA-4 s protilátkou 4.1.1, 4.8.1, 6.1.1 nebo 11.2.1, mající aminokyselinovou sekvenci uvedenou na obr. 22.

20. Protilátka podle nároku 19, která obsahuje sekvenci CDR identickou s CDR sekvencí protilátky uvedené na obr. 22.
21. Protilátka nebo její fragment podle kteréhokoliv z nároků 1, 2 a 4 až 5, která obsahuje alespoň jednu sekvenci ze skupiny obsahující:
- a) lidské sekvence FR1, FR2 a FR3 kódované lidskou rodinou genů  $V_H$  3-33 nebo touto rodinou genů s konzervativní substitucí, jednoduchou nekonzervativní substitucí nebo oběma,
  - b) lidské sekvence FR1, FR2 a FR3 kódované lidskou rodinou genů  $V_K$  A27 nebo touto rodinou genů s konzervativní substitucí, jednoduchou nekonzervativní substitucí nebo oběma.
22. Protilátka vázající CTLA-4, která obsahuje aminokyselinovou sekvenci vybranou ze skupiny obsahující:
- a) aminokyselinovou sekvenci obsahující úsek aminokyselinových zbytků 1 až 89 podle SEKVENCE ID. Č. 5 operativně spojený s aminokyselinovou sekvencí CDR3, který je kódován genem D7-27 a genem JH4,
  - b) aminokyselinovou sekvenci uvedenou v předchozím bodu dále obsahující mutace v pozicích 24, 40 a 47 v úseku aminokyselinových zbytků 1 až 89 podle SEKVENCE ID. Č. 5, a
  - c) aminokyselinovou sekvenci uvedenou v předchozích bodech dále obsahující mutace v pozicích 1, 3 a 7 v aminokyselinové sekvenci CDR.
23. Systém buněčné kultury pro testování stimulace T lymfocytů obsahující lidské T lymfoblasty kokultivované s buněčnou

linií Raji.

24. Způsob měření stimulace T lymfocytů v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje kroky, kdy:
- a) poskytne se kultura lidských T lymfoblastů a buněčné linie Raji,
  - b) tato kultura se přivede do kontaktu s činidlem,
  - c) měří se produkce cytokinů v kultuře.
25. Farmaceutický přípravek pro léčení rakoviny, zánětlivých nebo autoimunitních onemocnění v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje protilátku nebo její fragment podle kteréhokoliv z nároků 1, 2 a 4 až 22 a farmaceuticky přijatelný nosič.
26. Buněčná linie produkující protilátky nebo její fragmenty podle kteréhokoliv z nároků 1, 2 a 4 až 22.
27. Izolovaná nukleová kyselina, která kóduje těžký nebo lehký řetězec protilátky nebo jejího fragmentu podle kteréhokoliv z nároků 1, 2 a 4 až 22, nebo fragment takové nukleové kyseliny.
28. Izolovaná nukleová kyselina podle nároku 27 operativně spojená s expresní kontrolní sekvencí.
29. Hostitelská buňka obsahující izolovanou nukleovou kyselinu podle nároku 27 nebo 28.
30. Transgenní savec nebo rostlina obsahující nukleovou kyselinu podle nároku 27 nebo 28, kterýžto savec nebo rostlina exprimuje tuto nukleovou kyselinu.

31. Způsob zvýšení tvorby cytokinů v T lymfocytech pacienta, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje krok, kdy se pacientovi podá protilátka nebo její fragment podle kteréhokoliv z nároků 1, 2 a 4 až 22 nebo farmaceutický přípravek podle nároku 25.
32. Způsob zvýšení reakce cytotoxických T lymfocytů pacienta, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje krok, kdy se pacientovi podá protilátka nebo její fragment podle kteréhokoliv z nároků 1, 2 a 4 až 22 nebo farmaceutický přípravek podle nároku 25.
33. Způsob léčení nádorů u pacienta, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje krok, kdy se pacientovi podá kombinace obsahující protilátku nebo její fragment podle kteréhokoliv z nároků 1, 2 a 4 až 22 nebo farmaceutický přípravek podle nároku 25 a buňky exprimující faktor stimulující kolonie granulocytů-makrofágů.
34. Způsob podle nároku 32 v y z n a č u j í c í s e t í m, že protilátka nebo její fragment se nepodílejí na cytotoxicitě závislé na komplementu.

## Obr. 1A

1/48

**4.1.1 DNA těžkého řetězce**

|            |            |             |            |            |      |
|------------|------------|-------------|------------|------------|------|
| ATGGAGTTTG | GGCTGAGCTG | GGTTTTCTCTC | GTTGCTCTTT | TAAGAGGTGT | 50   |
| CCAGTGTCAG | GTGCAGCTGG | TGGAGTCTGG  | GGGAGGCGTG | GTCCAGCCTG | 100  |
| GGAGGTCCCT | GAGACTCTCC | TGTGTAGCGT  | CTGGATTAC  | CTTCAGTAGC | 150  |
| CATGGCATGC | ACTGGGTCCG | CCAGGCTCCA  | GGCAAGGGGC | TGGAGTGGGT | 200  |
| GGCAGTTATA | TGGTATGATG | GAAGAAATAA  | ATACTATGCA | GACTCCGTGA | 250  |
| AGGGCCGATT | CACCATCTCC | AGAGACAATT  | CCAAGAACAC | GCTGTTTCTG | 300  |
| CAAATGAACA | GCCTGAGAGC | CGAGGACACG  | GCTGTGTATT | ACTGTGCGAG | 350  |
| AGGAGGTCAC | TTCGGTCCTT | TTGACTACTG  | GGGCCAGGGA | ACCCTGGTCA | 400  |
| CCGTCTCCTC | AGCCTCCACC | AAGGGCCCAT  | CGGTCTTCCC | CCTGGCGCCC | 450  |
| TGCTCCAGGA | GCACCTCCGA | GAGCACAGCG  | GCCCTGGGCT | GCCTGGTCAA | 500  |
| GGACTACTTC | CCCGAACCGG | TGACGGTGTC  | GTGGAACTCA | GGCGCTCTGA | 550  |
| CCAGCGGCGT | GCACACCTTC | CCAGCTGTCC  | TACAGTCCTC | AGGACTCTAC | 600  |
| TCCCTCAGCA | GCGTGGTGAC | CGTGCCCTCC  | AGCAACTTCG | GCACCCAGAC | 650  |
| CTACACCTGC | AACGTAGATC | ACAAGCCCAG  | CAACACCAAG | GTGGACAAGA | 700  |
| CAGTTGAGCG | CAAATGTTGT | GTCGAGTGCC  | CACCGTGCCC | AGCACCACCT | 750  |
| GTGGCAGGAC | CGTCAGTCTT | CCTCTTCCCC  | CCAAAACCCA | AGGACACCCT | 800  |
| CATGATCTCC | CGGACCCCTG | AGGTCACGTG  | CGTGGTGGTG | GACGTGAGCC | 850  |
| ACGAAGACCC | CGAGGTCCAG | TTCAACTGGT  | ACGTGGACGG | CGTGGAGGTG | 900  |
| CATAATGCCA | AGACAAAGCC | ACGGGAGGAG  | CAGTTCAACA | GCACGTTCCG | 950  |
| TGTGGTCAGC | GTCCTCACCG | TTGTGCACCA  | GGACTGGCTG | AACGGCAAGG | 1000 |
| AGTACAAGTG | CAAGGTCTCC | AACAAAGGCC  | TCCCAGCCCC | CATCGAGAAA | 1050 |
| ACCATCTCCA | AAACCAAAGG | GCAGCCCCGA  | GAACCACAGG | TGTACACCCT | 1100 |
| GCCCCCATCC | CGGGAGGAGA | TGACCAAGAA  | CCAGGTCAGC | CTGACCTGCC | 1150 |
| TGGTCAAAGG | CTTCTACCCC | AGCGACATCG  | CCGTGGAGTG | GGAGAGCAAT | 1200 |
| GGGCAGCCGG | AGAACAATA  | CAAGACCACA  | CCTCCCATGC | TGGACTCCGA | 1250 |
| CGGCTCCTTC | TTCCTCTACA | GCAAGCTCAC  | CGTGGACAAG | AGCAGGTGGC | 1300 |
| AGCAGGGGAA | CGTCTTCTCA | TGCTCCGTGA  | TGCATGAGGC | TCTGCACAAC | 1350 |
| CACTACACGC | AGAAGAGCCT | CTCCCTGTCT  | CCGGGTAAAT | GA         | 1392 |

(SEKVENCE ID. Č. 27)

**4.1.1 Protein těžkého řetězce**

|            |            |            |            |            |     |
|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| MEFGLSWVFL | VALLRGVQCQ | VQLVESGGGV | VQPGRSLRLS | CVASGFTFSS | 50  |
| HGMHWVRQAP | GKGLEWVAVI | WYDGRNKYYA | DSVKGRFTIS | RDNSKNTLFL | 100 |
| QMSLRAEDT  | AVYYCARGGH | FGPFDYWGQG | TLVTVSSAST | KGPSVFPLAP | 150 |
| CSRSTSESTA | ALGCLVKDYF | PEPVTVSWNS | GALTSGVHTF | PAVLQSSGLY | 200 |
| SLSSVTVPS  | SNFGTQTYTC | NVDHKPSNTK | VDKTVERKCC | VECPPCPAPP | 250 |
| VAGPSVFLFP | PKPKDTLMIS | RTPEVTCVVV | DVSHEDPEVQ | FNWYVDGVEV | 300 |
| HNAKTKPREE | QFNSTFRVVS | VLTVVHQDWL | NGKEYKCKVS | NKGLPAPIEK | 350 |
| TISKTKGQPR | EPQVYTLPPS | REEMTKNQVS | LTCLVKGFYP | SDIAVEWESN | 400 |
| GQPENNYKTT | PPMLDSGGSF | FLYSKLTVDK | SRWQQGNVFS | CSVMHEALHN | 450 |
| HYTQKSLSLS | PGK        |            |            |            | 463 |

(SEKVENCE ID. Č. 1)

**Obr. 1A (pokrač.)**

2/48

**4.1.1 DNA kapa řetězce**

|            |            |            |            |             |     |
|------------|------------|------------|------------|-------------|-----|
| ATGGAAACCC | CAGCGCAGCT | TCTCTTCCTC | CTGCTACTCT | GGCTCCCAGA  | 50  |
| TACCACCGGA | GAAATTGTGT | TGACGCAGTC | TCCAGGCACC | CTGTCTTTGT  | 100 |
| CTCCAGGGGA | AAGAGCCACC | CTCTCCTGCA | GGGCCAGTCA | GAGTATTAGC  | 150 |
| AGCAGCTTCT | TAGCCTGGTA | CCAGCAGAGA | CCTGGCCAGG | CTCCCAGGCT  | 200 |
| CCTCATCTAT | GGTGCATCCA | GCAGGGCCAC | TGGCATCCCA | GACAGGTTCA  | 250 |
| GTGGCAGTGG | GTCTGGGACA | GACTTCACTC | TCACCATCAG | CAGACTGGAG  | 300 |
| CCTGAAGATT | TTGCAGTGTA | TTACTGTCAG | CAGTATGGTA | CCTCACCCCTG | 350 |
| GACGTTCCGC | CAAGGGACCA | AGGTGGAAAT | CAAACGAACT | GTGGCTGCAC  | 400 |
| CATCTGTCTT | CATCTTCCCG | CCATCTGATG | AGCAGTTGAA | ATCTGGAACT  | 450 |
| GCCTCTGTTG | TGTGCCTGCT | GAATAACTTC | TATCCCAGAG | AGGCCAAAGT  | 500 |
| ACAGTGGAAG | GTGGATAACG | CCCTCCAATC | GGGTAACTCC | CAGGAGAGTG  | 550 |
| TCACAGAGCA | GGACAGCAAG | GACAGCACCT | ACAGCCTCAG | CAGCACCCCTG | 600 |
| ACGCTGAGCA | AAGCAGACTA | CGAGAAACAC | AAAGTCTACG | CCTGCGAAGT  | 650 |
| CACCCATCAG | GGCCTGAGCT | CGCCCGTCAC | AAAGAGCTTC | AACAGGGGGAG | 700 |
| AGTGTTAG   |            |            |            |             | 708 |

**(SEKVENCE ID. Č. 40)****4.1.1 Protein kapa řetězce**

|             |            |            |            |             |     |
|-------------|------------|------------|------------|-------------|-----|
| METPAQLLFL  | LLLWLPDTTG | EIVLTQSPGT | LSLSPGERAT | LSCRASQSSIS | 50  |
| SSFLAWYQQR  | PGQAPRLLIY | GASSRATGIP | DRFSGSGSGT | DFTLTISRLE  | 100 |
| PEDFAVYYCQ  | QYGTSPWTFG | QGTKVEIKRT | VAAPSVFIFP | PSDEQLKSGT  | 150 |
| ASVVCLLNNF  | YPREAKVQWK | VDNALQSGNS | QESVTEQDSK | DSTYLSSTL   | 200 |
| TLISKADYEKH | KVYACEVTHQ | GLSSPVTKSF | NRGEC      |             | 235 |

**(SEKVENCE ID. Č. 14)**

**Obr. 1B****4.8.1 DNA těžkého řetězce**

|                   |                   |                   |                   |                   |      |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------|
| <b>ATGGAGTTTG</b> | <b>GGCTGAGCTG</b> | <b>GGTTTTCTC</b>  | <b>GTTGCTCTTT</b> | <b>TAAGAGGTGT</b> | 50   |
| <b>CCAGTGTCAG</b> | <b>GTGCAGCTGG</b> | <b>TGGAGTCTGG</b> | <b>GGGAGGCGTG</b> | <b>GTCCAGCCTG</b> | 100  |
| <b>GGAGGTCCCT</b> | <b>GAGACTCTCC</b> | <b>TGTACAGCGT</b> | <b>CTGGATTAC</b>  | <b>CTTCAGTAAC</b> | 150  |
| <b>TATGGCATGC</b> | <b>ACTGGGTCCG</b> | <b>CCAGGCTCCA</b> | <b>GGCAAGGGGC</b> | <b>TGGAGTGGGT</b> | 200  |
| <b>GGCAGTTATA</b> | <b>TGGTATGATG</b> | <b>GAAGTAATAA</b> | <b>ACACTATGGA</b> | <b>GACTCCGTGA</b> | 250  |
| <b>AGGGCCGATT</b> | <b>CACCATCTCC</b> | <b>AGTGACAATT</b> | <b>CCAAGAACAC</b> | <b>GCTGTATCTG</b> | 300  |
| <b>CAAATGAACA</b> | <b>GCCTGAGAGC</b> | <b>CGAGGACACG</b> | <b>GCTGTGTATT</b> | <b>ACTGTGCGAG</b> | 350  |
| <b>AGGAGAGAGA</b> | <b>CTGGGGTCCT</b> | <b>ACTTTGACTA</b> | <b>CTGGGGCCAG</b> | <b>GGAACCCTGG</b> | 400  |
| <b>TCACCGTCTC</b> | <b>CTCAGCCTCC</b> | <b>ACCAAGGGCC</b> | <b>CATCGGTCTT</b> | <b>CCCCCTGGCG</b> | 450  |
| <b>CCCTGCTCCA</b> | <b>GGAGCACCTC</b> | <b>CGAGAGCACA</b> | <b>GCGGCCCTGG</b> | <b>GCTGCCTGGT</b> | 500  |
| <b>CAAGGACTAC</b> | <b>TTCCCCGAAC</b> | <b>CGGTGACGGT</b> | <b>GTCGTGGAAC</b> | <b>TCAGGCGCTC</b> | 550  |
| <b>TGACCAGCGG</b> | <b>CGTGACACAC</b> | <b>TTCCCAGCTG</b> | <b>TCCTACAGTC</b> | <b>CTCAGGACTC</b> | 600  |
| <b>TACTCCCTCA</b> | <b>GCAGCGTGGT</b> | <b>GACCGTGCCC</b> | <b>TCCAGCAACT</b> | <b>TCGGCACCCA</b> | 650  |
| <b>GACCTACACC</b> | <b>TGCAACGTAG</b> | <b>ATCACAAGCC</b> | <b>CAGCAACACC</b> | <b>AAGGTGGACA</b> | 700  |
| <b>AGACAGTTGA</b> | <b>GCGCAAATGT</b> | <b>TGTGTCGAGT</b> | <b>GCCCACCGTG</b> | <b>CCCAGCACCA</b> | 750  |
| <b>CCTGTGGCAG</b> | <b>GACCGTCAGT</b> | <b>CTTCCTCTTC</b> | <b>CCCCAAAAC</b>  | <b>CCAAGGACAC</b> | 800  |
| <b>CCTCATGATC</b> | <b>TCCCGGACCC</b> | <b>CTGAGGTCAC</b> | <b>GTGCGTGGTG</b> | <b>GTGGACGTGA</b> | 850  |
| <b>GCCACGAAGA</b> | <b>CCCCGAGGTC</b> | <b>CAGTTCAACT</b> | <b>GGTACGTGGA</b> | <b>CGGCGTGGAG</b> | 900  |
| <b>GTGCATAATG</b> | <b>CCAAGACAAA</b> | <b>GCCACGGGAG</b> | <b>GAGCAGTTCA</b> | <b>ACAGCACGTT</b> | 950  |
| <b>CCGTGTGGTC</b> | <b>AGCGTCCTCA</b> | <b>CCGTTGTGCA</b> | <b>CCAGGACTGG</b> | <b>CTGAACGGCA</b> | 1000 |
| <b>AGGAGTACAA</b> | <b>GTGCAAGGTC</b> | <b>TCCAACAAAG</b> | <b>GCCTCCCAGC</b> | <b>CCCCATCGAG</b> | 1050 |
| <b>AAAACCATCT</b> | <b>CCAAAACCAA</b> | <b>AGGGCAGCCC</b> | <b>CGAGAACCAC</b> | <b>AGGTGTACAC</b> | 1100 |
| <b>CCTGCCCCCA</b> | <b>TCCCGGGAGG</b> | <b>AGATGACCAA</b> | <b>GAACCAGGTC</b> | <b>AGCCTGACCT</b> | 1150 |
| <b>GCCTGGTCAA</b> | <b>AGGCTTCTAC</b> | <b>CCCAGCGACA</b> | <b>TCGCCGTGGA</b> | <b>GTGGGAGAGC</b> | 1200 |
| <b>AATGGGCAGC</b> | <b>CGGAGAACAA</b> | <b>CTACAAGACC</b> | <b>ACACCTCCCA</b> | <b>TGCTGGACTC</b> | 1250 |
| <b>CGACGGCTCC</b> | <b>TTCTTCCTCT</b> | <b>ACAGCAAGCT</b> | <b>CACCGTGGAC</b> | <b>AAGAGCAGGT</b> | 1300 |
| <b>GGCAGCAGGG</b> | <b>GAACGTCTTC</b> | <b>TCATGCTCCG</b> | <b>TGATGCATGA</b> | <b>GGCTCTGCAC</b> | 1350 |
| <b>AACCACTACA</b> | <b>CGCAGAAGAG</b> | <b>CCTCTCCCTG</b> | <b>TCTCCGGGTA</b> | <b>AATGA</b>      | 1395 |

**( SEKVENCE ID. Č. 28)****4.8.1 Protein těžkého řetězce**

|                   |                   |                   |                   |                   |     |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----|
| <b>MEFGLSWVFL</b> | <b>VALLRGVQCQ</b> | <b>VQLVESGGGV</b> | <b>VQPGRSLRLS</b> | <b>CTASGFTFSN</b> | 50  |
| <b>YGMHWVRQAP</b> | <b>GKLEWVAVI</b>  | <b>WYDGSNKHYG</b> | <b>DSVKGRFTIS</b> | <b>SDNSKNTLYL</b> | 100 |
| <b>QMNSLRAEDT</b> | <b>AVYYCARGER</b> | <b>LGSYFDYWQ</b>  | <b>GTLVTVSSAS</b> | <b>TKGPSVFPLA</b> | 150 |
| <b>PCSRSTSEST</b> | <b>AALGCLVKDY</b> | <b>FPEPVTVSWN</b> | <b>SGALTSGVHT</b> | <b>FPAVLQSSGL</b> | 200 |
| <b>YSLSSVVTVP</b> | <b>SSNFGTQTYT</b> | <b>CNVDHKPSNT</b> | <b>KVDKTVERKC</b> | <b>CVECPCPAP</b>  | 250 |
| <b>PVAGPSVFLF</b> | <b>PPKPKDTLMI</b> | <b>SRTPEVTCVV</b> | <b>VDVSHEDPEV</b> | <b>QFNWYVDGVE</b> | 300 |
| <b>VHNAKTKPRE</b> | <b>EQFNSTFRVV</b> | <b>SVLTVVHQDW</b> | <b>LNGKEYKCKV</b> | <b>SNKGLPAPIE</b> | 350 |
| <b>KTISKTKGQP</b> | <b>REPQVYTLPP</b> | <b>SREEMTKNQV</b> | <b>SLTCLVKGFY</b> | <b>PSDIAVEWES</b> | 400 |
| <b>NGQPENNYKT</b> | <b>TPPMLDSGDS</b> | <b>FFLYSKLTVD</b> | <b>KSRWQQGNVF</b> | <b>SCSVMEALH</b>  | 500 |
| <b>NHYTQKSLSL</b> | <b>SPGK</b>       |                   |                   |                   | 514 |

**(SEKVENCE ID. Č. 2)**

**Obr. 1B (pokrač.)**

4/48

**4.8.1 DNA kapa řetězce**

|                   |                   |            |            |            |     |
|-------------------|-------------------|------------|------------|------------|-----|
| <u>ATGGAAACCC</u> | <u>CAGCGCAGCT</u> | TCTCTTCCTC | CTGCTACTCT | GGCTCCCAGA | 50  |
| TACCACCGGA        | GAAATTGTGT        | TGACGCAGTC | TCCAGGCACC | CTGTCTTTGT | 100 |
| CTCCAGGGGA        | AAGAGCCACC        | CTCTCCTGCA | GGACCAGTGT | TAGCAGCAGT | 150 |
| TACTTAGCCT        | GGTACCAGCA        | GAAACCTGGC | CAGGCTCCCA | GGCTCCTCAT | 200 |
| CTATGGTGCA        | TCCAGCAGGG        | CCACTGGCAT | CCCAGACAGG | TTCAGTGGCA | 250 |
| GTGGGTCTGG        | GACAGACTTC        | ACTCTCACCA | TCAGCAGACT | GGAGCCTGAA | 300 |
| GATTTTGCAG        | TCTATTACTG        | TCAGCAGTAT | GGCATCTCAC | CCTTCACTTT | 350 |
| CGGCGGAGGG        | ACCAAGGTGG        | AGATCAAGCG | AACTGTGGCT | GCACCATCTG | 400 |
| TCTTCATCTT        | CCCGCCATCT        | GATGAGCAGT | TGAAATCTGG | AACTGCCTCT | 450 |
| GTTGTGTGCC        | TGCTGAATAA        | CTTCTATCCC | AGAGAGGCCA | AAGTACAGTG | 500 |
| GAAGGTGGAT        | AACGCCCTCC        | AATCGGGTAA | CTCCCAGGAG | AGTGTCACAG | 550 |
| AGCAGGACAG        | CAAGGACAGC        | ACCTACAGCC | TCAGCAGCAC | CCTGACGCTG | 600 |
| AGCAAAGCAG        | ACTACGAGAA        | ACACAAAGTC | TACGCCTGCG | AAGTCACCCA | 650 |
| TCAGGGCCTG        | AGCTCGCCCG        | TCACAAAGAG | CTTCAACAGG | GGAGAGTGTT | 700 |
| AG                |                   |            |            |            | 702 |

**(SEKVENCE ID. Č. 41)****4.8.1 Protein kapa řetězce**

|                   |                   |            |            |            |     |
|-------------------|-------------------|------------|------------|------------|-----|
| <u>METPAQLLFL</u> | <u>LLLWLPDTTG</u> | EIVLTQSPGT | LSLSPGERAT | LSCRTSVSSS | 50  |
| YLAWYQQKPG        | QAPRLLIYGA        | SSRATGIPDR | FSGSGSGTDF | TLTISRLEPE | 100 |
| DFAVYYCQY         | GISPFTFGGG        | TKVEIKRTVA | APSVFIFPPS | DEQLKSGTAS | 150 |
| VVCLLNNFYP        | REAKVQWKVD        | NALQSGNSQE | SVTEQDSKDS | TYSLSSTLTL | 200 |
| SKADYEKHKV        | YACEVTHQGL        | SSPVTKSFNR | GEC        |            | 233 |

**(SEKVENCE ID. Č. 15)**

**Obr. 1C**

5/48

**4.14.3 DNA těžkého řetězce**

```

CCTGGGAGGT CCCTGAGACT CTCCTGTGCA GCGTCTGGAT TCACCTTCAG 50
TAGTCATGGC ATCCACTGGG TCCGCCAGGC TCCAGGCAAG GGGCTGGAGT 100
GGGTGGCAGT TATATGGTAT GATGGAAGAA ATAAAGACTA TGCAGACTCC 150
GTGAAGGGCC GATTCACCAT CTCCAGAGAC AATTCCAAGA AGACGCTGTA 200
TTTGCAAATG AACAGCCTGA GAGCCGAGGA CACGGCTGTG TATTACTGTG 250
CGAGAGTGGC CCCACTGGGG CCACTTGA CTGAGGCTG 300
GTCACCGTCT CCTCAGCCTC CACCAAGGGC CCATCGGTCT TCCCCCTGGC 350
GCCCTGCTCC AGGAGCACCT CCGAGAGCAC AGCGGCCCTG GGCTGCCTGG 400
TCAAGGACTA CTTCCCCGAA CCGGTGACGG TGTCGTGGAA CTCAGGCGCT 450
CTGACCAGCG GCGTGACAC CTTCCAGCT GTCCTACAG 489
( SEKVENCE ID. Č. 29)

```

**4.14.3 Protein těžkého řetězce**

```

PGRSLRLSCA ASGFTFSSHG IHWVRQAPGK GLEWVAVIY DGRNKDYADS 50
VKGRFTISR NSKKTLYLQM NSLRAEDTAV YYCARVAPLG PLDYWGQGT 100
VTVSSASTKG PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA 150
LTSGVHTFPA VLO 163
( SEKVENCE ID. Č. 3)

```

**4.14.3 DNA kapa řetězce**

```

GGCACCTGT CTTTGTCTCC AGGGGAAAGA GCCACCCTCT CCTGCAGGGC 50
CAGTCAGAGT GTCAGCAGCT ACTTAGCCTG GTACCAGCAG AAACCTGGCC 100
AGGCTCCCAG ACTCCTCATC TATGGTGCAT CCAGCAGGGC CACTGGCATC 150
CCAGACAGGT TCAGTGGCAG TGGGTCTGGG ACAGACTTCA CTCTCACCAT 200
CAGCAGACTG GAGCCTGAGG ATTTTGCAGT GTATTACTGT CAGCAGTATG 250
GTAGGTCACC ATTCACCTTC GGCCCTGGGA CCAAAGTGGA TATCAAGCGA 300
ACTGTGGCTG CACCATCTGT CTTTCATCTTC CCGCATCTG ATGAGCAGTT 350
GAAATCTGGA ACTGCCTCTG TTGTGTGCCT GCTGAATAAC TTCTATCCCA 400
GAGAGGCCAA AGTACAG 417
( SEKVENCE ID. Č. 42)

```

**4.14.3 Protein kapa řetězce**

```

GTLSSLSPGER ATLSCRASQS VSSYLAWYQQ KPGQAPRLLI YGASSRATGI 50
PDRFSGSGSG TDFTLTISRL EPEDFAVYQC QQYGRSPFTF GPGTKVDIKR 100
TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQ 139
( SEKVENCE ID. Č. 16)

```

**Obr. 1D****6.1.1 DNA těžkého řetězce**

|            |             |            |            |            |      |
|------------|-------------|------------|------------|------------|------|
| ATGGAGTTTG | GGCTGAGCTG  | GGTTTTCTC  | GTTGCTCTTT | TAAGAGGTGT | 50   |
| CCAGTGTCAG | GTGCAGCTGG  | TGGAGTCTGG | GGGAGGCGTG | GTCGAGCCTG | 100  |
| GGAGGTCCCT | GAGACTCTCC  | TGTACAGCGT | CTGGATTAC  | CTTCAGTAGT | 150  |
| TATGGCATGC | ACTGGGTCCG  | CCAGGCTCCA | GGCAAGGGGC | TGGAGTGGGT | 200  |
| GGCAGTTATA | TGGTATGATG  | GAAGCAATAA | ACACTATGCA | GACTCCGCGA | 250  |
| AGGGCCGATT | CACCATCTCC  | AGAGACAATT | CCAAGAACAC | GCTGTATCTG | 300  |
| CAAATGAACA | GCCTGAGAGC  | CGAGGACACG | GCTGTGTATT | ACTGTGCGAG | 350  |
| AGCCGGACTG | CTGGGTACT   | TTGACTACTG | GGGCCAGGGA | ACCCTGGTCA | 400  |
| CCGTCTCCTC | AGCCTCCACC  | AAGGGCCCAT | CGGTCTTCCC | CCTGGCGCCC | 450  |
| TGCTCCAGGA | GCACCTCCGA  | GAGCACAGCG | GCCCTGGGCT | GCCTGGTCAA | 500  |
| GGACTACTTC | CCCGAACC GG | TGACGGTGTC | GTGGAACTCA | GGCGCTCTGA | 550  |
| CCAGCGGCGT | GCACACCTTC  | CCAGCTGTCC | TACAGTCCTC | AGGACTCTAC | 600  |
| TCCCTCAGCA | GCGTGGTGAC  | CGTGCCCTCC | AGCAACTTCG | GCACCCAGAC | 650  |
| CTACACCTGC | AACGTAGATC  | ACAAGCCAG  | CAACACCAAG | GTGGACAAGA | 700  |
| CAGTTGAGCG | CAAATGTTGT  | GTCGAGTGCC | CACCGTGCCC | AGCACCACCT | 750  |
| GTGGCAGGAC | CGTCAGTCTT  | CCTCTTCCCC | CCAAAACCCA | AGGACACCCT | 800  |
| CATGATCTCC | CGGACCCCTG  | AGGTCACGTG | CGTGGTGGTG | GACGTGAGCC | 850  |
| ACGAAGACCC | CGAGGTCCAG  | TTCAACTGGT | ACGTGGACGG | CGTGGAGGTG | 900  |
| CATAATGCCA | AGACAAAGCC  | ACGGGAGGAG | CAGTTCAACA | GCACGTTCCG | 950  |
| TGTGGTCAGC | GTCCTCACCG  | TTGTGCACCA | GGACTGGCTG | AACGGCAAGG | 1000 |
| AGTACAAGTG | CAAGGTCTCC  | AACAAAGGCC | TCCAGCCCC  | CATCGAGAAA | 1050 |
| ACCATCTCCA | AAACCAAAGG  | GCAGCCCCGA | GAACCACAGG | TGTACACCCT | 1100 |
| GCCCCATCC  | CGGGAGGAGA  | TGACCAAGAA | CCAGGTCAGC | CTGACCTGCC | 1150 |
| TGGTCAAAGG | CTTCTACCCC  | AGCGACATCG | CCGTGGAGTG | GGAGAGCAAT | 1200 |
| GGGCAGCCGG | AGAACAATA   | CAAGACCACA | CCTCCCATGC | TGGACTCCGA | 1250 |
| CGGCTCCTTC | TTCTCTACA   | GCAAGCTCAC | CGTGGACAAG | AGCAGGTGGC | 1300 |
| AGCAGGGGAA | CGTCTTCTCA  | TGCTCCGTGA | TGCATGAGGC | TCTGCACAAC | 1350 |
| CACTACACGC | AGAAGAGCCT  | CTCCCTGTCT | CCGGGTAAAT | GA         | 1392 |

(SEKVENCE ID. Č. 30)

**6.1.1 Protein těžkého řetězce**

|            |            |            |            |            |     |
|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| MEFGLSWVFL | VALLRGVQCQ | VQLVESGGGV | VEPGRSLRLS | CTASGFTFSS | 50  |
| YGMHWVRQAP | GKGLEWVAVI | WYDGSNKHYA | DSAKGRFTIS | RDNSKNTLYL | 100 |
| QMNSLRAEDT | AVYYCARAGL | LGYFDYWQQG | TLVTVSSAST | KGPSVFPLAP | 150 |
| CSRSTSESTA | ALGCLVKDYF | PEPVTVSWNS | GALTSGVHTF | PAVLQSSGLY | 200 |
| SLSSVVTVPS | SNFGTQTYTC | NVDHKPSNTK | VDKTVERKCC | VECPPCPAPP | 250 |
| VAGPSVFLFP | PKPKDTLMIS | RTPEVTCVVV | DVSHEDPEVQ | FNWYVDGVEV | 300 |
| HNAKTKPREE | QFNSTFRVVS | VLTVVHQDWL | NGKEYKCKVS | NKGLPAPIEK | 350 |
| TISKTKGQPR | EPQVYTLPPS | REEMTKNQVS | LTCLVKGFYP | SDIAVEWESN | 400 |
| GQPENNYKTT | PPMLDSGGSF | FLYSKLTVDK | SRWQQGNVFS | CSVMHEALHN | 450 |
| HYTQKSLSL  | PGK        |            |            |            | 463 |

(SEKVENCE ID. Č. 4)

22.05.01

PV 2001-2349

**Obr. 1D (pokrač.)**

7/48

**6.1.1 DNA kapa řetězce**

|            |            |             |            |             |     |
|------------|------------|-------------|------------|-------------|-----|
| ATGGAAACCC | CAGCGCAGCT | TCTCTTCCTC  | CTGCTACTCT | GGCTCCCAGA  | 50  |
| TACCACCGGA | GAAATTGTGT | TGACGCAGTC  | TCCAGGCACC | CTGTCTTTGT  | 100 |
| CTCCAGGGGA | AAGAGCCACC | CTCTCCTGTA  | GGGCCAGTCA | AAGTGTTAGC  | 150 |
| AGCTACTTAG | CCTGGTACCA | ACAGAAACCT  | GGCCAGGCTC | CCAGGCCCCCT | 200 |
| CATCTATGGT | GTATCCAGCA | GGGCCACTGG  | CATCCCAGAC | AGGTTCAGTG  | 250 |
| GCAGTGGGTC | TGGGACAGAC | TTCACCTCTCA | CCATCAGCAG | ACTGGAGCCT  | 300 |
| GAAGATTTTG | CAGTGTATTA | CTGTCAGCAG  | TATGGTATCT | CACCATTAC   | 350 |
| TTTCGGCCCT | GGGACCAAAG | TGGATATCAA  | ACGAACTGTG | GCTGCACCAT  | 400 |
| CTGTCTTCAT | CTTCCCGCCA | TCTGATGAGC  | AGTTGAAATC | TGGAAGTGCC  | 450 |
| TCTGTTGTGT | GCCTGCTGAA | TAACCTCTAT  | CCCAGAGAGG | CCAAAGTACA  | 500 |
| GTGGAAGGTG | GATAACGCCC | TCCAATCGGG  | TAACCTCCAG | GAGAGTGTCA  | 550 |
| CAGAGCAGGA | CAGCAAGGAC | AGCACCTACA  | GCCTCAGCAG | CACCCTGACG  | 600 |
| CTGAGCAAAG | CAGACTACGA | GAAACACAAA  | GTCTACGCCT | GCGAAGTCAC  | 650 |
| CCATCAGGGC | CTGAGCTCGC | CCGTCACAAA  | GAGCTTCAAC | AGGGGAGAGT  | 700 |
| GTTAG      |            |             |            |             | 705 |

**(SEKVENCE ID. Č. 43)****6.1.1 Protein kapa řetězce**

|            |            |            |            |            |     |
|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| METPAQLLFL | LLLWLPDTTG | EIVLTQSPGT | LSLSPGERAT | LSCRASQSVS | 50  |
| SYLAWYQQKP | GQAPRPLIYG | VSSRATGIPD | RFSGSGSGTD | FTLTISRLEP | 100 |
| EDFAVYYCQQ | YGISPFTFGP | GTKVDIKRTV | AAPSVFIFPP | SDEQLKSGTA | 150 |
| SVVCLLNNFY | PREAKVQWKV | DNALQSGNSQ | ESVTEQDSKD | STYSLSSTLT | 200 |
| LSKADYEKHK | VYACEVTHQG | LSSPVTKSFN | RGEC       |            | 234 |

**(SEKVENCE ID. Č. 17)**

22.08.01

PV 2007 - 2379

**Obr. 1E**

8/48

**3.1.1 DNA těžkého řetězce**

```

GGCGTGGTCC AGCCTGGGAG GTCCCTGAGA CTCTCCTGTG CAGCGTCTGG 50
ATTCACCTTC AGTAGCTATG GCATGCACTG GGTCCGCCAG GCTCCAGGCA 100
AGGGGCTGGA GTGGGTGGCA GTTATATGGT ATGATGGAAG TAATAAATAC 150
TATGCAGACT CCGTGAAGGG CCGATTACAC ATCTCCAGAG ACAATTCCAA 200
GAACACGCTG TATCTGCAAA TGAACAGCCT GAGAGCCGAG GACACGGCTG 250
TGTATTACTG TGCGAGAGGG GCCCGTATAA TAACCCCTTG TATGGACGTC 300
TGGGGCCAAG GGACCACGGT CACCGTCTCC TCAGCCTCCA CCAAGGGCCC 350
ATCGGTCTTC CCCCTGGCGC CCTGCTCCAG GAGCACCTCC GAGAGCACAG 400
CGGCCCTGGG CTGCCTGGTC AAGGACTACT TCCCCGAACC GGTGACGGTG 450
TCGTGGAACCT CAGGCGCTCT GACCAGCGGC GTGCACACCT TCCCAGCTGT 500
CCTACAG                                         507

```

**(SEKVENCE ID. Č. 31)****3.1.1 Protein těžkého řetězce**

```

GVVQPGRSLR LSCAASGFTF SSYGMHWVRQ APGKGLEWVA VIWYDGSNKY 50
YADSVKGRFT ISRDNSKNTL YLQMNSLRAE DTAVYYCARG ARIITPCMDV 100
WGQGTITVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV 150
SWNSGALTSG VHTFPAVLQ                                         169

```

**(SEKVENCE ID. Č. 5)****3.1.1 DNA kapa řetězce**

```

CAGTCTCCAT CCTCCCTGTC TGCATCTGTA GGAGACAGAG TCACCATCAC 50
TTGCCGGGCA AGTCAGAGCA TTAACACCTA TTTAATTTGG TATCAGCAGA 100
AACCAGGGAA AGCCCCTAAC TTCCTGATCT CTGCTACATC CATTTTGCAA 150
AGTGGGGTCC CATCAAGGTT CCGTGGCAGT GGCTCTGGGA CAAATTTTAC 200
TCTCACCATC AACAGTCTTC ATCCTGAAGA TTTTGCAACT TACTACTGTC 250
AACAGAGTTA CAGTACCCCA TTCACCTTCG GCCCTGGGAC CAAAGTGGAT 300
ATCAAACGAA CTGTGGCTGC ACCATCTGTC TTCATCTTCC CGCCATCTGA 350
TGAGCAGTTG AAATCTGGAA CTGCCTCTGT TGTGTGCCTG CTGAATAACT 400
TCTATCCCAG AGAGGCCAAA GTACAGTGGA AGGTGGATAA CGCCCTCCAA 450
TCGGGTAA                                         458

```

**(SEKVENCE ID. Č. 44)****3.1.1 Protein kapa řetězce**

```

QSPSSLSASV GDRVITICRA SQSINTYLIW YQKPGKAPN FLISATSILO 50
SGVPSRFRGS GSGTNFTLTI NSLHPEDFAT YYCQQSYSTP FTFGPGTKVD 100
IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPRK VQWKVDNALQ 150
SG                                         152

```

**(SEKVENCE ID. Č. 18)**

**Obr. 1F****4.10.2 DNA těžkého řetězce**

```

GGCGTGGTCC AGCCTGGGAG GTCCCTGAGA CTCTCCTGTG TAGCGTCTGG 50
ATTCATCTTC AGTAGTCATG GCATCCACTG GGTCCGCCAG GCTCCAGGCA 100
AGGGGCTGGA GTGGGTGGCA GTTATATGGT ATGATGGAAG AAATAAAGAC 150
TATGCAGACT CCGTGAAGGG CCGATTACAC ATCTCCAGAG ACAATTCCAA 200
GAACACGCTG TATTTGCAA TGAACAGCCT GAGAGCCGAG GACACGGCTG 250
TGTATTACTG TGCAGAGAGT GCCCCTGAGG GGCCACTTGA CTACTGGGGC 300
CAGGGAACCC TGGTCACCGT CTCCTCAGCC TCCACCAAGG GCCCATCGGT 350
CTTCCCCCTG GCGCCCTGCT CCAGGAGCAC CTCCGAGAGC ACAGCGGCC 400
TGGGCTGCCT GGTCAAGGAC TACTTCCCCG AACCGGTGAC GGTGTCGTGG 450
AACTCAGGCG CTCTGACCAG CGGCGTGCAC ACCTTCCCAG CTGTCTTACA 500
G 501

```

**(SEKVENCE ID. Č. 32)****4.10.2 Protein těžkého řetězce**

```

GVVQPGRLSLR LSCVASGFIF SSHGIHWVRQ APGKGLEWVA VIWYDGRNKD 50
YADSVKGRFT ISRDNKNTL YLQMNSLRAE DTAVYYCARV APLGPLDYWG 100
QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APCSRSTSES TAALGCLVKD YFPEPVTVSW 150
NSGALTSGVH TFPVLQ 167

```

**(SEKVENCE ID. Č. 6)****4.10.2 DNA kapa řetězce**

```

TCTCCAGGCA CCCTGTCTTT GTCTCCAGGG GAAAGAGCCA CCCTCTCCTG 50
CAGGGCCAGT CAGAGTATTA GCAGCAATTT CTTAGCCTGG TACCAGCAGA 100
AACCTGGCCA GGCTCCAGG CTCCTCATCT ATCGTCCATC CAGCAGGGCC 150
ACTGGCATCC CAGACAGTTT CAGTGGCAGT GGGTCTGGGA CAGACTTCAC 200
TCTCACCATC AGCAGACTGG AGCCTGAGGA TTTTGCATTA TATTACTGTC 250
AGCAGTATGG TACGTCACCA TTCACTTTCG GCCCTGGGAC CAAAGTGGAT 300
ATCAAGCGAA CTGTGGCTGC ACCATCTGTC TTCATCTTCC CGCCATCTGA 350
TGAGCAGTTG AAATCTGGAA CTGCCTCTGT TGTGTGCCTG CTGAATAACT 400
TCTATCCCAG AGAGGCCAAA GTACAG 426

```

**(SEKVENCE ID. Č. 45)****4.10.2 Protein kapa řetězce**

```

SPGTLSSLSPG ERATLSCRAS QSISSNFLAW YQQKPGQAPR LLIYRPSSRA 50
TGIPDSFSGS GSGTDFTLTI SRLEPEDFAL YYCQYGTSP FTFGPSTKVD 100
IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVCL LNNFYPRK VQ 142

```

**(SEKVENCE ID. Č. 19)**

200801

PV 2007-2349

**Obr. 1G**

10/48

**2.1.3 DNA těžkého řetězce**

```

TCGGGCCCCAG GACTGGTGAA GCCTTCACAG ATCCTGTCCC TCACCTGCAC 50
TGTCTCTGGT GGCTCCATCA GCAGTGGTGG TCACTACTGG AGCTGGATCC 100
GCCAGCACCC AGGGAAGGGC CTGGAGTGGA TTGGGTACAT CTATTACATT 150
GGGAACACCT ACTACAACCC GTCCCTCAAG AGTCGAGTTA CCATATCAGT 200
AGACACGTCT AAGAACCAGT TCTCCCTGAA GCTGAGCTCT GTGACTGCCG 250
CGGACACGGC CGTGTATTAT TGTGCGAGAG ATAGTGGGGA CTACTACGGT 300
ATAGACGTCT GGGGCCAAGG GACCACGGTC ACCGTCTCCT CAGCTTCCAC 350
CAAGGGCCCA TCCGTCTTCC CCCTGGCGCC CTGCTCCAGG AGCACCTCCG 400
AGAGCACAGC CGCCCTGGGC TGCCTGGTCA AGGACTACTT CCCCGAACCG 450
GTGACGGTGT CGTGGAATC AGGCGCCCTG ACCAGCGGCG TGCACACCTT 500
CCCGGCTGTC CTACAA

```

516

**(SEKVENCE ID. Č. 33)****2.1.3 Protein těžkého řetězce**

```

SGPGLVKPSQ ILSLTCTVSG GSISSGGHYW SWIRQHPGKG LEWIGYIYYI 50
GNTYYNPSLK SRVTISVDTS KNQFSLKLSS VTAADTAVYY CARDSGDYYG 100
IDVWGQGT TVSSASTKGP SVFPLAPCSR STSESTAALG CLVKDYFPEP 150
VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQ

```

172

**(SEKVENCE ID. Č. 7)****2.1.3 DNA kapa řetězce**

```

TCTCCAGACT TTCAGTCTGT GACTCCAAAG GAGAAAGTCA CCATCACCTG 50
CCGGGCCAGT CAGAGCATTG GTAGTAGCTT ACATTGGTAT CAGCAGAAAC 100
CAGATCAGTC TCCAAAGCTC CTCATCAAGT ATGCTTCCCA GTCCTTCTCT 150
GGGGTCCCCT CGAGGTTTCA TGGCAGTGGA TCTGGGACAG ATTTACCCCT 200
CACCATCAAT AGCCTGGAAG CTGAAGATGC TGCAACGTAT TACTGTCATC 250
AGAGTAGTAG TTTACCGCTC ACTTTCGGCG GAGGGACCAA GGTGGAGATC 300
AAACGAACTG TGGCTGCACC ATCTGTCTTC ATCTTCCCGC CATCTGATGA 350
GCAGTTGAAA TCTGGAAGTCT CCTCTGTTGT GTGCCTGCTG AATAACTTCT 400
ATCCCAGAGA GGCCAAAGTA CAGTGGAAGG TGGATAACGC CCTCCAATCG 450
GGTAACTCCC AGGAG

```

465

**(SEKVENCE ID. Č. 46)****2.1.3 Protein kapa řetězce**

```

SPDFQSVTPK EKVTITCRAS QSIGSSLHWY QQKPDQSPKL LIKYASQSFS 50
GVPSRFGSG SGTDFTLTIN SLEAEDAATY YCHQSSSLPL TFGGGTKVEI 100
KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVCLL NNFYPREKQV QWKVDNALQS 150
GNSQE

```

155

**(SEKVENCE ID. Č. 20)**

22.06.01

PU 2007-2249

**Obr. 1H**

11/48

**4.13.1 DNA těžkého řetězce**

```

CCTGGGAGGT CCCTGAGACT CTCCTGTGCA GCGTCTGGAT TCACCTTCAG 50
TAGTCATGGC ATCCACTGGG TCCGCCAGGC TCCAGGCAAG GGGCTGGAGT 100
GGGTGGCAGT TATATGGTAT GATGGAAGAA ATAAAGACTA TGCAGACTCC 150
GTGAAGGGCC GATTACCAT CTCCAGAGAC AATTCCAAGA ACACGCTGTA 200
TTTGCAAATG AACAGCCTGA GAGCCGAGGA CACGGCTGTG TATTACTGTG 250
CGAGAGTGGC CCCACTGGGG CCACTTGACT ACTGGGGCCA GGAACCCCTG 300
GTCACCGTCT CCTCAGCCTC CACCAAGGGC CCATCGGTCT TCCCCCTGGC 350
GCCCTGCTCC AGGAGCACCT CCGAGAGCAC AGCGGCCCTG GGCTGCCTGG 400
TCAAGGACTA CTTCCCCGAA CCGGTGACGG TGTCGTGGAA CTCAGGCGCT 450
CTGACCAGC                                     459

```

**(SEKVENCE ID. Č. 34)****4.13.1 Protein těžkého řetězce**

```

PGRSLRLSCA ASGFTFSSHG IHWVRQAPGK GLEWVAWIWY DGRNKDYADS 50
VKGRFTISR D NSKNTLYLQM NSLRAEDTAV YYCARVAPLG PLDYWGQGT L 100
VTVSSASTKG PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA 150
LTS                                             153

```

**(SEKVENCE ID. Č. 8)****4.13.1 DNA kapa řetězce**

```

CAGTCTCCAG GCACCCTGTC TTTGTCTCCA GGGGAAAGAG CCACCCTCTC 50
CTGCAGGGCC AGTCAGAGTG TCAGCAGCTA CTTAGCCTGG TACCAGCAGA 100
AACCTGGCCA GGCTCCCAGG CTCCTCATCT ATGGTGCATC CAGCAGGGCC 150
ACTGGCATCC CAGACAGGTT CAGTGGCAGT GGGTCTGGGA CAGACTTCAC 200
TCTCACCATC AGCAGACTGG AGCCTGAGGA TTTTGCA GTG TATTACTGTC 250
AACAGTATGG TAGGTCACCA TTCAC TTTCG GCCCTGGGAC CAAAGTAGAT 300
ATCAAGCGAA CTGTGGCTGC ACCATCTGTC TTCATCTTCC CGCCATCTGA 350
TGAGCAGTTG AAATCTGGAA CTGCCTCTGT TGTGTGCCTG CTGAATAACT 400
TCTATCCCAG AGAGGCCAAA GTACAGTGGA AAGGTGGATA 440

```

**(SEKVENCE ID. Č. 47)****4.13.1 Protein kapa řetězce**

```

QSPGTL LSLSP GERATLSCRA SQSVSSYLAW YQKPGQAPR LLIYGASSRA 50
TGIPDRFSGS GSGTDFTLTI SRLEPEDFAV YYCQYGRSP FTFGPGTKVD 100
IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKGG 146

```

**(SEKVENCE ID. Č. 21)**

22.05.01

PV 2007-2349

12/48

**Obr. 1I****11.2.1 DNA těžkého řetězce**

```

GGCGTGGTCC AGCCTGGGAG GTCCCTGAGA CTCTCCTGTG CAGCGTCTGG 50
ATTCACCTTC AGTAGCTATG GCATGCACTG GGTCCGCCAG GCTCCAGGCA 100
AGGGGCTGGA GTGGGTGGCA GTTATATGGT ATGATGGAAG TAATAAATAC 150
TATGCAGACT CCGTGAAGGG CCGATTACAC ATCTCCAGAG ACAATTCCAA 200
GAACACGCTG TATCTGCAAA TGAACAGCCT GAGAGCCGAG GACACGGCTG 250
TGTATTACTG TGCGAGAGAT CCGAGGGGAG CTACCCTTTA CTACTACTAC 300
TACCGGTKGG ACGTCTGGGG CCAAGGGACC ACGGTCACCG TCTCCTCAGC 350
CTCCACCAAG GGCCCATCGG TCTTCCCCCT GCGGCCCTGC TCCAGGAGCA 400
CCTCCGAGAG CACAGCGGCC CTGGGCTGCC TGGTCAAGGA CTACTTCCCC 450
GAACCGGTGA CCGTGTCGTG GAACTCAGGC GCTCTGACCA GCGGCGTGCA 500
CAC 503

```

**(SEKVENCE ID. Č. 35)****11.2.1 Protein těžkého řetězce**

```

GVVQPGRSLR LSCAASGFTF SSYGMHWVRQ APGKGLEWVA VIWYDGSNKY 50
YADSVKGRFT ISRDNSKNTL YLQMNLSRAE DTAVYYCARD PRGATLYYYY 100
YRXDVWGQGT TVTVSSASTK GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP 150
EPVTVSWNSG ALTSGVH

```

**(SEKVENCE ID. Č. 9)****11.2.1 DNA kapa řetězce**

```

CCATCCTCCC TGTCTGCATC TGTAGGAGAC AGAGTCACCA TCACTTGCCG 50
GGCAAGTCAG AGCATTAAAC GCTATTTAGA TTGGTATCAG CAGAAACCAG 100
GGAAAGCCCC TAAACTCCTG ATCTATGCTG CATCCAGTTT GCAAAGTGGG 150
GTCCCATCAA GGTTCAAGTG CAGTGGATCT GGGACAGATT TCACTCTCAC 200
CATCAGCAGT CTGCAACCTG AAGATTTTGC AACTTACTAC TGTCACAGT 250
ATTACAGTAC TCCATTCACT TTCGGCCCTG GGACCAAAGT GGAAATCAAA 300
CGAACTGTGG CTGCACCATC TGTCTTCATC TTCCCGCCAT CTGATGAGCA 350
GTTGAAATCT GGAAGTGCCT CTGTTGTGTG CCTGCTGAAT AACTTCTATC 400
CCAGAGAGGC CAAAGTA 417

```

**(SEKVENCE ID. Č. 48)****11.2.1 Protein kapa řetězce**

```

PSSLSASVGD RVTITCRASQ SINSYLDWYQ QKPGKAPKLL IYAASSLQSG 50
VPSRFSGSGS GTDFLTITSS LQPEDFATYY CQQYYSTPFT FPGPKVEIK 100
RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKV 139

```

**(SEKVENCE ID. Č. 22)**

**Obr. 1J****11.6.1 DNA těžkého řetězce**

```

GGCGTGGTCC AGCCTGGGAG GTCCCTGAGA CTCTCCTGTG CAGCGTCTGG 50
ATTCACCTTC AGTAGCTATG GCATGCACTG GGTCCGCCAG GCTCCAGGCA 100
AGGGGCTGGA GTGGGTGGCA GTTATATGGT ATGATGGAAG TCATAAATAC 150
TATGCAGACT CCGTGAAGGG CCGATTACCC ATCTCCAGAG ACAATTCCAA 200
GAACACGCTG TATCTGCAAA TGAACAGCCT GAGAGCCGAG GACACGGCTG 250
TGTATTACTG TGCGAGAGGC GCTGTAGTAG TACCAGCTGC TATGGACGTC 300
TGGGGCCAAG GGACCACGGT CACCGTCTCC TCAGCCTCCA CCAAGGGCCC 350
ATCGGTCTTC CCCCTGGCGC CCTGCTCCAG GAGCACCTCC GAGAGCACAG 400
CGGCCCTGGG CTGCCTGGTC AAGGACTACT TCCCCGAACC GGTGACGGTG 450
T 451

```

**(SEKVENCE ID. Č. 36)****11.6.1 Protein těžkého řetězce**

```

GVVQPGRSLR LSAAASGFTF SSYGMHWVRQ APGKGLEWVA VIWYDGS HKY 50
YADSVKGRFT ISRDNSKNTL YLQMNSLRAE DTA VYYCARG AVVVPAAMDV 100
WGQGT TTVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KD YFPEPVTV 150
S 151

```

**(SEKVENCE ID. Č. 10)****11.6.1 DNA kapa řetězce**

```

ACCCAGTCTC CATCCTCCCT GTCTGCATCT GTAGGAGACA GAGTCACCAT 50
CACTTGCCGG GCAAGTCAGA ACATTAGCAG GTATT TAAAT TGGTATCAAC 100
AGAAACCAGG GAAAGCCCCT AAGTTCCTGA TCTATGTTGC ATCTATTTTG 150
CAAAGTGGGG TCCCATCAGG GTTCAGTGCC AGTGGATCTG GGCCAGATTT 200
CACTCTNACC ATCAGCAGTC TGCAACCTGA AGATTTTGCA ACTTACTACT 250
GTCAACAGAG TTACAGTACC CCATTCACTT TCGGCCCTGG GACCAAAGTG 300
GATATCAAAC GAACTGTGGC TGCACCATCT GTCTTCATCT TCCCGCCATC 350
TGATGAGCAG TTGAAATCTG GAACTGCCTC TGT TGTGTGC CTGCTGAATA 400
AC 402

```

**(SEKVENCE ID. Č. 49)****11.6.1 Protein kapa řetězce**

```

TQSPSSLSAS VGDRV TITCR ASQNISR YLN WYQ QKPGKAP KFLIYVASIL 50
QSGVPSGFSA SGSGPDFTLT ISSLQPEDFA TY YCQ QSYST PFTFGPGTKV 100
DIKRTVAAPS VFIFPPSDEQ LKSGTASVVC LLNN 134

```

**(SEKVENCE ID. Č. 23)**

**Obr. 1K****11.7.1 DNA těžkého řetězce**

|            |            |            |            |            |     |
|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| GTGGTCCAGC | CTGGGAGGTC | CCTGAGACTC | TCCTGTGCAG | CGTCTGGATT | 50  |
| CACCTTCAGT | AGCNGTGGCA | TGCACTGGGT | CCGCCAGGCT | CCAGGCAAGG | 100 |
| GGCTGGAGTG | GGTGGCAGTT | ATATGGTCTG | ATGGAAGTCA | TAAATACTAT | 150 |
| GCAGACTCCG | TGAAGGGCCG | ATTCAACATC | TCCAGAGACA | ATTCCAAGAA | 200 |
| CACGCTGTAT | CTGCAAATGA | ACAGCCTGAG | AGCCGAGGAC | ACGGCTGTGT | 250 |
| ATTACTGTGC | GAGAGGAACT | ATGATAGTAG | TGGGTACCCT | TGACTACTGG | 300 |
| GGCCAGGGAA | CCCTGGTCAC | CGTCTCCTCA | GCCTCCACCA | AGGGCCCATC | 350 |
| GGTCTTCCCC | CTGGCGCCCT | GCTCCAGGAG | CACCTCCGAG | AGCACAGCGG | 400 |
| CCCTGGGCTG | CCTGGTCAAG | GACTACTTCC | CCGAACCG   |            | 438 |

**(SEKVENCE ID. Č. 37)****11.7.1 Protein těžkého řetězce**

|            |            |            |            |            |     |
|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| VVQPGRSLRL | SCAASGFTFS | SXGMHWVRQA | PGKGLEWVAV | IWSDGSHKYY | 50  |
| ADSVKGRFTI | SRDNSKNTLY | LQMNSLRAED | TAVYYCARGT | MIVVGTLDYW | 100 |
| QGTLVTVSS  | ASTKGPSVFP | LAPCSRSTSE | STAALGCLVK | DYFPEP     | 146 |

**(SEKVENCE ID. Č. 11)****11.7.1 DNA kapa řetězce**

|            |            |              |            |            |     |
|------------|------------|--------------|------------|------------|-----|
| ACCCAGTCTC | CATCCTCCCT | GTCTGCATCT   | GTAGGAGACA | GAGTCACCAT | 50  |
| CACTTGCCGG | GCAAGTCAGA | GCATTTGCAA   | CTATTTAAAT | TGGTATCAGC | 100 |
| AGAAACCAGG | AAAAGCCCCT | AGGGTCCTGA   | TCTATGCTGC | ATCCAGTTTG | 150 |
| CAAGGTGGGG | TCCCGTCAAG | GTTTCAAGTGGC | AGTGGATCTG | GGACAGATTG | 200 |
| CACTCTCACC | ATCAGCAGTC | TGCAACCTGA   | AGATTTTGCA | ACTTACTACT | 250 |
| GTCAACAGAG | TTACACTACC | CCATTCACTT   | TCGGCCCTGG | GACCAGAGTG | 300 |
| GATATCGAAC | GAAGTGTGGC | TGCACCATCT   | GTCTTCATCT | TCCCGCCATC | 350 |
| TGATGAGCAG | TTGAAATCTG | GAAGTGCCTC   | TGTTGTGTGC | CTGCTGAATA | 400 |
| ACTTCTATCC | CAGAGAGGCC | AAAGTACAGT   | GGAAGGTGGA | TAACGCCTAT | 450 |
| T          |            |              |            |            | 451 |

**(SEKVENCE ID. Č. 50)****11.7.1 Protein kapa řetězce**

|            |            |            |            |            |     |
|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| TQSPSSLSAS | VGDRVITICR | ASQSICNYLN | WYQQKPGKAP | RVLIYAASSL | 50  |
| QGGVPSRFSG | SGSGIDCTLT | ISSLQPEDFA | TYQCQSYIT  | PFTFGPGTRV | 100 |
| DIERTVAAPS | VFIFPPSDEQ | LKSGTASVVC | LLNMFYPREA | KVQWKVDNAY | 150 |

**(SEKVENCE ID. Č. 24)**

**Obr. 1L**

15/48

**12.3.1 DNA těžkého řetězce**

TCCTGTGCAG CGTCTGGATT CACCTTCAGT TACTATGGCG

|             |            |            |            |            |     |
|-------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| TCTGGGGGAG  | GCGTGGTCCA | GCCTGGGAGG | TCCCTGAGAC | TCTCCTGTGC | 50  |
| AGCGTCTGGA  | TTCACCTTCA | GTAGCTATGG | CGTGCACTGG | GTCCGCCAGG | 100 |
| CTCCAGGCAA  | GGGGCTGGAG | TGGGTGGCAG | TTATATGGTA | TGATGGAAGT | 150 |
| AATAAATACT  | ATGCAGACTC | CGTGAAGGGC | CGATTCACCA | TCTCCAGAGA | 200 |
| CAATTCCAAG  | AGCACGCTGT | ATCTGCAAAT | GAACAGCCTG | AGAGCCGAGG | 250 |
| ACACGGCTGT  | GTATTATTGT | GCGAGAGACT | CGTATTACGA | TTTTTGGAGT | 300 |
| GGTCGGGGCG  | GTATGGACGT | CTGGGGCCAA | GGGACCACGG | TCACCGTCTC | 350 |
| CTCAGCCTCC  | ACCAAGGGCC | CATCGGTCTT | CCCCCTGGCG | CCCTGCTCCA | 400 |
| GGAGCACCTC  | CGAGAGCACA | GCGGCCCTGG | GCTGCCTGGT | CAAGGACTAC | 450 |
| TTCCCCGAAC  | CGGTGACGGT | GTCGTGGAAC | TCAGGCGCTC | TGACCAGCGG | 500 |
| CGTGACACACC | TTCCCAGCTG | TC         |            |            | 522 |

**(SEKVENCE ID. Č. 38)****12.3.1.1 Protein těžkého řetězce**

|            |            |            |            |            |     |
|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| SGGGVVQPGR | SLRLSCAASG | FTFSSYGVHW | VRQAPGKGLE | WVAVIWYDGS | 50  |
| NKYYADSVKG | RFTISRDNK  | STLYLQMNSL | RAEDTAVYYC | ARDSYYDFWS | 100 |
| GRGGMDVWGQ | GTTVTVSSAS | TKGPSVFPLA | PCSRSTSEST | AALGCLVKDY | 150 |
| FPEPVTVSWN | SGALTSGVHT | FPAV       |            |            | 174 |

**(SEKVENCE ID. Č. 12)****12.3.1.1 DNA kapa řetězce**

|            |             |            |            |            |     |
|------------|-------------|------------|------------|------------|-----|
| CCACTCTCCC | TGCCCCGTCAC | CCTTGGACAG | CCGGCCTCCA | TCTCCTGCAG | 50  |
| GTCTAGTCAA | AGCCTCGTAT  | ACAGTGATGG | AAACACCTAC | TTGAATTGGT | 100 |
| TTCAGCAGAG | GCCAGGCCAA  | TCTCCAAGGC | GCCTAATTTA | TAAGGTTTCT | 150 |
| AACTGGGACT | CTGGGGTCCC  | AGACAGATTC | AGCGGCAGTG | GGTCAGGCAC | 200 |
| TGATTTTACA | CTGAAAATCA  | GCAGGGTGGG | GGCTGAGGAT | GTTGGGGTTT | 250 |
| ATTACTGCAT | GCAAGGTTCA  | CACTGGCCTC | CGACGTTTCG | CCAAGGGACC | 300 |
| AAGGTGGAAA | TCAAACGAAC  | TGTGGCTGCA | CCATCTGTCT | TCATCTTCCC | 350 |
| GCCATCTGAT | GAGCAGTTGA  | AATCTGGAAC | TGCCTCTGTT | GTGTGCCTGC | 400 |
| TGAATAACTT | CTATCCCAC   |            |            |            | 419 |

**(SEKVENCE ID. Č. 51)****12.3.1.1 Protein kapa řetězce**

|            |            |            |            |            |     |
|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| PLSLPVTLGQ | PASISCRSSQ | SLVYSDGNTY | LNWFQQRPGQ | SPRRLIYKVS | 50  |
| NWDSGVPRDF | SGSGSGTDFT | LKISRVEAED | GVVYCMQGS  | HWPPTFGQGT | 100 |
| KVEIKRTVAA | PSVFIFPPSD | EQLKSGTASV | VCLLNNFYP  |            | 139 |

**(SEKVENCE ID. Č. 25)**

**Obr. 1M****12.9.1.1 DNA těžkého řetězce**

|            |            |            |            |            |     |
|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| GTCCAGCCTG | GGAGGTCCT  | GAGACTCTCC | TGTGCAGCGT | CTGGATTAC  | 50  |
| CTTCAGTAAC | TATGCCATGC | ACTGGGTCCG | CCAGGCTCCA | GGCAAGGGGC | 100 |
| TGGAGTGGGT | GGTAGTTATT | TGGCATGATG | GAAATAATAA | ATACTATGCA | 150 |
| GAGTCCGTGA | AGGGCCGATT | CACCATCTCC | AGAGACAATT | CCAAGAACAC | 200 |
| GCTGTATCTG | CAAATGAACA | GCCTGAGAGC | CGAGGACACG | GCTGTATATT | 250 |
| ACTGTGCGAG | AGATCAGGGC | ACTGGCTGGT | ACGGAGGCTT | TGACTTCTGG | 300 |
| GGCCAGGGAA | CCCTGGTCAC | CGTCTCCTCA | GCCTCCACCA | AGGGCCCATC | 350 |
| GGTCTTCCCC | CTGGCGCCCT | GCTCCAGGAG | CACCTCCGAG | AGCACAGCGG | 400 |
| CCCTGGGCTG | CCTGGTCAAG | GACTACTTCC | CCGAACCGGT | GACGGTGTCG | 450 |
| TGGAATCAG  | GCGCTCTGAC | CAGCGGCGTG | CACACCTTCC |            | 490 |

**(SEKVENCE ID. Č. 39)****12.9.1.1 Protein těžkého řetězce**

|            |            |            |            |            |     |
|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| VQPGRLRLS  | CAASGFTFSN | YAMHWVRQAP | GKGLEWVVVI | WHDGNNKYIA | 50  |
| ESVKGRFTIS | RDNSKNTLYL | QMNSLRAEDT | AVYYCARDQG | TGWYGGFDFW | 100 |
| GQGLTVTVSS | ASTKGPSVFP | LAPCSRSTSE | STAALGCLVK | DYFPEPVTVS | 150 |
| WNSGALTSGV | HTF        |            |            |            | 163 |

**(SEKVENCE ID. Č. 13)****12.9.1.1 DNA kapa řetězce**

|            |            |            |            |            |     |
|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| CCTGGAGAGC | CGGCTTCCAT | CTCTTGCAAG | TCTAGTCAGA | GCCTCCTGCA | 50  |
| TAGTAATGGA | TACAACTATT | TGGATTGGTA | CCTGCAGAAG | CCAGGACAGT | 100 |
| CTCCACAGCT | CCTGATCTAT | TTGGGTTCTA | ATCGGGCCTC | CGGGGTCCCT | 150 |
| GACAGGTTCA | GTGGCAGTGG | ATCAGGCACA | GATTTTACAC | TGAAACTCAG | 200 |
| CAGAGTGGAG | GCTGAGGATG | TTGGGGTTTA | TACTGTCATG | CAAGCTCTAC | 250 |
| AAACTCCTCT | CACTTTCGGC | GGAGGGACCA | AGGTGGAGAT | CAAACGAACT | 300 |
| GTGGCTGCAC | CATCTGTCTT | CATCTTCCCG | CCATCTGATG | AGCAGTTGAA | 350 |
| ATCTGGAAGT | GCCTCTGTTG | TGTGCCTGCT | GAATAACTTC | TATCCCAGAR | 400 |
| AGGCCAAAGT | ACATTCCAT  |            |            |            | 419 |

**(SEKVENCE ID. Č. 52)****12.9.1.1 Protein kapa řetězce**

|            |            |            |            |            |     |
|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| PGEPASISCR | SSQSLHNSG  | YNYLDWYLQK | PGQSPQLLIY | LGSNRASGVP | 50  |
| DRFSGSGSGT | DFTLKLRSVE | AEDVGVIYCM | QALQTPLTFG | GGTKVEIKRT | 100 |
| VAAPSVFIFP | PSDEQLKSGT | ASVVCLLNNF | YPR        |            | 133 |

**(SEKVENCE ID. Č. 26)**

22.08.01

PV 2001-2349

17/48

## Obr. 2

| CDR      | DP5<br>0 | 3.1.<br>1 | 4.1.<br>1 | 4.8.<br>1 | 4.10<br>.2 | 4.13<br>.1 | 4.14<br>.3 | 6.1.<br>1 | 11.2<br>.1 | 11.6<br>.1 | 11.7<br>.1 | 12.3.1.<br>1 | 12.9.1.<br>1 |
|----------|----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|-----------|------------|------------|------------|--------------|--------------|
|          |          |           |           |           |            |            |            | G         |            |            |            |              |              |
|          | G        | G         | G         | G         | G          |            |            | G         | G          | G          |            | G            |              |
|          | V        | V         | V         | V         | V          |            |            | V         | V          | V          | V          | V            |              |
|          | V        | V         | V         | V         | V          |            |            | V         | V          | V          | V          | V            | V            |
|          | Q        | Q         | Q         | Q         | Q          |            |            | E         | Q          | Q          | Q          | Q            | Q            |
|          | P        | P         | P         | P         | P          | P          | P          | P         | P          | P          | P          | P            | P            |
|          | G        | G         | G         | G         | G          | G          | G          | G         | G          | G          | G          | G            | G            |
|          | R        | R         | R         | R         | R          | R          | R          | R         | R          | R          | R          | R            | R            |
|          | S        | S         | S         | S         | S          | S          | S          | S         | S          | S          | S          | S            | S            |
|          | L        | L         | L         | L         | L          | L          | L          | L         | L          | L          | L          | L            | L            |
|          | R        | R         | R         | R         | R          | R          | R          | R         | R          | R          | R          | R            | R            |
|          | L        | L         | L         | L         | L          | L          | L          | L         | L          | L          | L          | L            | L            |
|          | S        | S         | S         | S         | S          | S          | S          | S         | S          | S          | S          | S            | S            |
|          | C        | C         | C         | C         | C          | C          | C          | C         | C          | C          | C          | C            | C            |
|          | A        | A         | V         | T         | V          | A          | A          | T         | A          | A          | A          | A            | A            |
|          | A        | A         | A         | A         | A          | A          | A          | A         | A          | A          | A          | A            | A            |
|          | S        | S         | S         | S         | S          | S          | S          | S         | S          | S          | S          | S            | S            |
|          | G        | G         | G         | G         | G          | G          | G          | G         | G          | G          | G          | G            | G            |
|          | F        | F         | F         | F         | F          | F          | F          | F         | F          | F          | F          | F            | F            |
|          | T        | T         | T         | T         | I          | T          | T          | T         | T          | T          | T          | T            | T            |
|          | F        | F         | F         | F         | F          | F          | F          | F         | F          | F          | F          | F            | F            |
| CDR<br>1 | S        | S         | S         | S         | S          | S          | S          | S         | S          | S          | S          | S            | S            |
|          | S        | S         | S         | N         | S          | S          | S          | S         | S          | S          | S          | S            | N            |
|          | Y        | Y         | H         | Y         | H          | H          | H          | Y         | Y          | Y          | C          | Y            | Y            |
|          | G        | G         | G         | G         | G          | G          | G          | G         | G          | G          | G          | G            | A            |
|          | M        | M         | M         | M         | I          | I          | I          | M         | M          | M          | M          | V            | M            |
|          | H        | H         | H         | H         | H          | H          | H          | H         | H          | H          | H          | H            | H            |
|          | W        | W         | W         | W         | W          | W          | W          | W         | W          | W          | W          | W            | W            |
|          | V        | V         | V         | V         | V          | V          | V          | V         | V          | V          | V          | V            | V            |
|          | R        | R         | R         | R         | R          | R          | R          | R         | R          | R          | R          | R            | R            |
|          | Q        | Q         | Q         | Q         | Q          | Q          | Q          | Q         | Q          | Q          | Q          | Q            | Q            |
|          | A        | A         | A         | A         | A          | A          | A          | A         | A          | A          | A          | A            | A            |
|          | P        | P         | P         | P         | P          | P          | P          | P         | P          | P          | P          | P            | P            |
|          | G        | G         | G         | G         | G          | G          | G          | G         | G          | G          | G          | G            | G            |
|          | K        | K         | K         | K         | K          | K          | K          | K         | K          | K          | K          | K            | K            |
|          | G        | G         | G         | G         | G          | G          | G          | G         | G          | G          | G          | G            | G            |
|          | L        | L         | L         | L         | L          | L          | L          | L         | L          | L          | L          | L            | L            |
|          | E        | E         | E         | E         | E          | E          | E          | E         | E          | E          | E          | E            | E            |
|          | W        | W         | W         | W         | W          | W          | W          | W         | W          | W          | W          | W            | W            |
|          | V        | V         | V         | V         | V          | V          | V          | V         | V          | V          | V          | V            | V            |
|          | A        | A         | A         | A         | A          | A          | A          | A         | A          | A          | A          | A            | V            |
|          | V        | V         | V         | V         | V          | V          | V          | V         | V          | V          | V          | V            | V            |
|          | I        | I         | I         | I         | I          | I          | I          | I         | I          | I          | I          | I            | I            |
|          | W        | W         | W         | W         | W          | W          | W          | W         | W          | W          | W          | W            | W            |
|          | Y        | Y         | Y         | Y         | Y          | Y          | Y          | Y         | Y          | Y          | S          | Y            | H            |
|          | D        | D         | D         | D         | D          | D          | D          | D         | D          | D          | D          | D            | D            |
|          | G        | G         | G         | G         | G          | G          | G          | G         | G          | G          | G          | G            | G            |
| CDR      | S        | S         | R         | S         | R          | R          | R          | S         | S          | S          | S          | S            | N            |

22.06.01

PV 2001-2349

18/48

## Obr. 2 (pokrač.)

| CDR      | DP5<br>0 | 3.1.<br>1 | 4.1.<br>1 | 4.8.<br>1 | 4.10<br>.2 | 4.13<br>.1 | 4.14<br>.3 | 6.1.<br>1 | 11.2<br>.1 | 11.6<br>.1 | 11.7<br>.1 | 12.3.1.<br>1 | 12.9.1.<br>1 |
|----------|----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|-----------|------------|------------|------------|--------------|--------------|
| 2        |          |           |           |           |            |            |            |           |            |            |            |              |              |
|          | N        | N         | N         | N         | N          | N          | N          | N         | N          | H          | H          | N            | N            |
|          | K        | K         | K         | K         | K          | K          | K          | K         | K          | K          | K          | K            | K            |
|          | Y        | Y         | Y         | H         | D          | D          | D          | H         | Y          | Y          | Y          | Y            | Y            |
|          | Y        | Y         | Y         | Y         | Y          | Y          | Y          | Y         | Y          | Y          | Y          | Y            | Y            |
|          | A        | A         | A         | G         | A          | A          | A          | A         | A          | A          | A          | A            | A            |
|          | D        | D         | D         | D         | D          | D          | D          | D         | D          | D          | D          | D            | E            |
|          | S        | S         | S         | S         | S          | S          | S          | S         | S          | S          | S          | S            | S            |
|          | V        | V         | V         | V         | V          | V          | V          | A         | V          | V          | V          | V            | V            |
|          | K        | K         | K         | K         | K          | K          | K          | K         | K          | K          | K          | K            | K            |
|          | G        | G         | G         | G         | G          | G          | G          | G         | G          | G          | G          | G            | G            |
|          | R        | R         | R         | R         | R          | R          | R          | R         | R          | R          | R          | R            | R            |
|          | F        | F         | F         | F         | F          | F          | F          | F         | F          | F          | F          | F            | F            |
|          | T        | T         | T         | T         | T          | T          | T          | T         | T          | T          | T          | T            | T            |
|          | I        | I         | I         | I         | I          | I          | I          | I         | I          | I          | I          | I            | I            |
|          | S        | S         | S         | S         | S          | S          | S          | S         | S          | S          | S          | S            | S            |
|          | R        | R         | R         | S         | R          | R          | R          | R         | R          | R          | R          | R            | R            |
|          | D        | D         | D         | D         | D          | D          | D          | D         | D          | D          | D          | D            | D            |
|          | N        | N         | N         | N         | N          | N          | N          | N         | N          | N          | N          | N            | N            |
|          | S        | S         | S         | S         | S          | S          | S          | S         | S          | S          | S          | S            | S            |
|          | K        | K         | K         | K         | K          | K          | K          | K         | K          | K          | K          | K            | K            |
|          | N        | N         | N         | N         | N          | N          | K          | N         | N          | N          | N          | S            | N            |
|          | T        | T         | T         | T         | T          | T          | T          | T         | T          | T          | T          | T            | T            |
|          | L        | L         | L         | L         | L          | L          | L          | L         | L          | L          | L          | L            | L            |
|          | Y        | Y         | F         | Y         | Y          | Y          | Y          | Y         | Y          | Y          | Y          | Y            | Y            |
|          | L        | L         | L         | L         | L          | L          | L          | L         | L          | L          | L          | L            | L            |
|          | Q        | Q         | Q         | Q         | Q          | Q          | Q          | Q         | Q          | Q          | Q          | Q            | Q            |
|          | M        | M         | M         | M         | M          | M          | M          | M         | M          | M          | M          | M            | M            |
|          | N        | N         | N         | N         | N          | N          | N          | N         | N          | N          | N          | N            | N            |
|          | S        | S         | S         | S         | S          | S          | S          | S         | S          | S          | S          | S            | S            |
|          | L        | L         | L         | L         | L          | L          | L          | L         | L          | L          | L          | L            | L            |
|          | R        | R         | R         | R         | R          | R          | R          | R         | R          | R          | R          | R            | R            |
|          | A        | A         | A         | A         | A          | A          | A          | A         | A          | A          | A          | A            | A            |
|          | E        | E         | E         | E         | E          | E          | E          | E         | E          | E          | E          | E            | E            |
|          | D        | D         | D         | D         | D          | D          | D          | D         | D          | D          | D          | D            | D            |
|          | T        | T         | T         | T         | T          | T          | T          | T         | T          | T          | T          | T            | T            |
|          | A        | A         | A         | A         | A          | A          | A          | A         | A          | A          | A          | A            | A            |
|          | V        | V         | V         | V         | V          | V          | V          | V         | V          | V          | V          | V            | V            |
|          | Y        | Y         | Y         | Y         | Y          | Y          | Y          | Y         | Y          | Y          | Y          | Y            | Y            |
|          | Y        | Y         | Y         | Y         | Y          | Y          | Y          | Y         | Y          | Y          | Y          | Y            | Y            |
|          | C        | C         | C         | C         | C          | C          | C          | C         | C          | C          | C          | C            | C            |
|          | A        | A         | A         | A         | A          | A          | A          | A         | A          | A          | A          | A            | A            |
|          | R        | R         | R         | R         | R          | R          | R          | R         | R          | R          | R          | R            | R            |
|          |          | G         | G         | G         | V          | V          | V          | A         | D          | G          | G          | D            | D            |
|          |          | A         | G         | E         | A          | A          | A          | G         | P          | A          | T          | S            | Q            |
|          |          | R         | H         | R         | P          | P          | P          | L         | R          | V          | M          | Y            | G            |
|          |          | I         | F         | L         | L          | L          | L          | L         | G          | V          | I          | Y            | T            |
| CDR<br>3 |          | I         | G         | G         | G          | G          | G          | G         | A          | V          | V          | D            | G            |

22.08.01

PV 2007-2349

19/48

## Obr. 2 (pokrač.)

| CDR | DP5<br>0 | 3.1.<br>1 | 4.1.<br>1 | 4.8.<br>1 | 4.10<br>.2 | 4.13<br>.1 | 4.14<br>.3 | 6.1.<br>1 | 11.2<br>.1 | 11.6<br>.1 | 11.7<br>.1 | 12.3.1.<br>1 | 12.9.1.<br>1 |
|-----|----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|-----------|------------|------------|------------|--------------|--------------|
|     |          | T         | P         | S         | P          | P          | P          | Y         | T          | P          | V          | F            | W            |
|     |          | P         | F         | Y         | L          | L          | L          | F         | L          | A          | G          | W            | Y            |
|     |          | C         | D         | F         | D          | D          | D          | D         | Y          | A          | T          | S            | G            |
|     |          | M         | Y         | D         | Y          | Y          | Y          | Y         | Y          | M          | L          | G            | G            |
|     |          | D         | W         | Y         | W          | W          | W          | W         | Y          | D          | D          | R            | F            |
|     |          | V         | G         | W         | G          | G          | G          | G         | Y          | V          | Y          | G            | D            |
|     |          | W         | Q         | G         | Q          | Q          | Q          | Q         | Y          | W          | W          | G            | F            |
|     |          | G         | G         | Q         | G          | G          | G          | G         | G          | G          | G          | M            | W            |
|     |          | Q         | T         | G         | T          | T          | T          | T         | M          | Q          | Q          | D            | G            |
|     |          | G         | L         | T         | L          | L          | L          | L         | D          | G          | G          | V            | Q            |
|     |          | T         | V         | L         | V          | V          | V          | V         | V          | T          | T          | W            | G            |
|     |          | T         | T         | V         | T          | T          | T          | T         | W          | T          | L          | G            | T            |
|     |          | V         | V         | T         | V          | V          | V          | V         | G          | V          | V          | Q            | L            |
|     |          | T         | S         | V         | S          | S          | S          | S         | Q          | T          | T          | G            | V            |
|     |          | V         | S         | S         | S          | S          | S          | S         | G          | V          | V          | T            | T            |
|     |          | S         | A         | S         | A          | A          | A          | A         | T          | S          | S          | T            | V            |
|     |          | S         | S         | A         | S          | S          | S          | S         | T          | S          | S          | V            | S            |
|     |          | A         | T         | S         | T          | T          | T          | T         | V          | A          | A          | T            | S            |
|     |          | S         | K         | T         | K          | K          | K          | K         | T          | S          | S          | V            | A            |
|     |          | T         | G         | K         | G          | G          | G          | G         | V          | T          | T          | S            | S            |
|     |          | K         | P         | G         | P          | P          | P          | P         | S          | K          | K          | S            | T            |
|     |          | G         | S         | P         | S          | S          | S          | S         | S          | G          | G          | A            | K            |
|     |          | P         | V         | S         | V          | V          | V          | V         | A          | P          | P          | S            | G            |
|     |          | S         | F         | V         | F          | F          | F          | F         | S          | S          | S          | T            | P            |
|     |          | V         | P         | F         | P          | P          | P          | P         | T          | V          | V          | K            | S            |
|     |          | F         | L         | P         | L          | L          | L          | L         | K          | F          | F          | G            | V            |
|     |          | P         | A         | L         | A          | A          | A          | A         | G          | P          | P          | P            | F            |
|     |          | L         | P         | A         | P          | P          | P          | P         | P          | L          | L          | S            | P            |
|     |          | A         | C         | P         | C          | C          | C          | C         | S          | A          | A          | V            | L            |
|     |          | P         | S         | C         | S          | S          | S          | S         | V          | P          | P          | F            | A            |
|     |          | C         | R         | S         | R          | R          | R          | R         | F          | C          | C          | P            | P            |
|     |          | S         | S         | R         | S          | S          | S          | S         | P          | S          | S          | L            | C            |
|     |          | R         | T         | S         | T          | T          | T          | T         | L          | R          | R          | A            | S            |
|     |          | S         | S         | T         | S          | S          | S          | S         | A          | S          | S          | P            | R            |
|     |          | T         | E         | S         | E          | E          | E          | E         | P          | T          | T          | C            | S            |
|     |          | S         | S         | E         | S          | S          | S          | S         | C          | S          | S          | S            | T            |
|     |          | E         | T         | S         | T          | T          | T          | T         | S          | E          | E          | R            | S            |
|     |          | S         | A         | T         | A          | A          | A          | A         | R          | S          | S          | S            | E            |
|     |          | T         | A         | A         | A          | A          | A          | A         | S          | T          | T          | T            | S            |
|     |          | A         | L         | A         | L          | L          | L          | L         | T          | A          | A          | S            | T            |
|     |          | A         | G         | L         | G          | G          | G          | G         | S          | A          | A          | E            | A            |
|     |          | L         | C         | G         | C          | C          | C          | C         | E          | L          | L          | S            | A            |
|     |          | G         | L         | C         | L          | L          | L          | L         | S          | G          | G          | T            | L            |
|     |          | C         | V         | L         | V          | V          | V          |           | T          | C          | C          | A            | G            |
|     |          | L         | K         | V         | K          | K          | K          |           | A          | L          | L          | A            | C            |
|     |          | V         | D         | K         | D          | D          | D          |           | A          | V          | V          | L            | L            |
|     |          | K         | Y         | D         | Y          | Y          | Y          |           | L          | K          | K          | G            | V            |
|     |          | D         | F         | Y         | F          | F          | F          |           | G          | D          | D          | C            | K            |
|     |          | Y         | P         | F         | P          | P          | P          |           | C          | Y          | Y          | L            | D            |

PV 2001-2349

## Obr. 2 (pokrač.)

[illegible]

### Obr. 3

#### Produkt genu DP-65 nebo 4-31

VSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTYYNPESLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSTAAADTAVYYCAR  
CDR1 CDR2

#### 2.1.3 protein těžkého řetězce

SGPGLVKPSQILSLTCTVSGGSISSGGHYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYIGNTYYNPESLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSTAAADTAVYYCAR  
CDR1 CDR2  
DSGDYYGIDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ  
CDR3

## Obr. 4

### Produkt genu A27

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQOYGSSP  
CDR1 CDR2 CDR3

#### 4.1.1 protein kapa řetězce

QSPGTLSLSPGERATLSCRASQSISSFLAWYQQRPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQOYGTSPWT  
CDR1 CDR2 CDR3  
FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK

#### 4.8.1 protein kapa řetězce

QSPGTLSLSPGERATLSCRITSMVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQOYGISPET  
CDR1 CDR2 CDR3  
FGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ

#### 4.14.3 protein kapa řetězce

GTLTSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQOYGRSPET  
CDR1 CDR2 CDR3  
FGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ

#### 6.1.1 protein kapa řetězce

QSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLIYGVSSRATGIPDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQOYGISPET  
CDR1 CDR2 CDR3  
FGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ

#### 4.10.2 protein kapa řetězce

SPGTLSLSPGERATLSCRASQSISSNFLAWYQQKPGQAPRLIYRPSSRATGIPDSFSGSGGTDFLTISRLEPEDFALYYCQOYGTSPET  
CDR1 CDR2 CDR3  
FGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ

#### 4.13.1 protein kapa řetězce

QSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQOYGRSPET  
CDR1 CDR2 CDR3  
FGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKGG

2007-2349

PV 2007-2349

## Obr. 5

### Produkt genu 012

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFGSGGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTP  
CDR1 CDR2 CDR3

#### 3.1.1 protein kapa řetězce

QSPSSLSASVGDRVTITCRASQINITYLIWYQQKPKAPNFLISATSILOSGVPSRFRGSGGTNFTLTINSLHPEDFATYYCQQSYSTPFI  
CDR1 CDR2 CDR3

FGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG

#### 11.2.1.1 protein kapa řetězce

PSSLSASVGDRVTITCRASQINSYLDWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFGSGGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYSTPFI  
CDR1 CDR2 CDR3

FGPGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV

#### 11.6.1 protein kapa řetězce

TQSPSSLSASVGDRVTITCRASONISRYLNWYQQKPKAPKFLIYVASILQSGVPSGFASGSGPDFLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPFI  
CDR1 CDR2 CDR3

FGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN

#### 11.7.1 protein kapa řetězce

TQSPSSLSASVGDRVTITCRASQICNYLNWYQQKPKAPRVLIYAASSLQGGVPSRFGSGGIDCTLTISLQPEDFATYYCQQSYITPFI  
CDR1 CDR2 CDR3

FGPGTRVDIERTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAY

## Obr. 6

### Produkt genu A10/A26

EVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLHWYQQKPDQSPKLLIKYASQSESGVPSRFSGSGTGIDFTLTNSLEAEDAATYYCHQSSSLPQ  
CDR1 CDR2 CDR3

### 2.1.3 protein kapa řetězce

SPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLHWYQQKPDQSPKLLIKYASQSESGVPSRFSGSGTGIDFTLTNSLEAEDAATYYCHQSSSLPLT  
CDR1 CDR2 CDR3  
FGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE

# Obr. 7

## Produkt genu A17

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGNITYLNWFQQRPQGQSPRRLIYKVSNRDSGVPDFRSGSGGTIDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGHWP  
 CDR1 CDR2 CDR3

### 12.3.1 protein kapa řetězce

PLSLPVTILGQPASISCRSSQSLVYSDGNITYLNWFQQRPQGQSPRRLIYKVSNNWDSGVPDFRSGSGGTIDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGSHPPT  
 CDR1 CDR2 CDR3

FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP

## Obr. 8

### Produkt genu A3/A19

DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISICRSSQSLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVDPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGYYCMQALQITP  
CDR1 CDR2 CDR3

### 12.9.1 protein kapa řetězce

PGEPAISICRSSQSLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVDPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGYYCMQALQITP  
CDR1 CDR2 CDR3  
FGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR

26/48

20.05.01

PV 2007-2349

## Obr. 9

Aminokyselinová sekvenační analýza amino-konce

| Hybridom | Lehký řetězec                                                                          | m.h.     |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| CT2.1.3  | neurčeno                                                                               | neurčeno |
| CT3.1.1  | NH <sub>2</sub> -DIQMTQSPSSLSASVGDRV                                                   | 26 119   |
| CT4.1.1  | NH <sub>2</sub> -EIVLTQSPGTLSPGERAT                                                    | 23 917   |
| CT4.8.1  | NH <sub>2</sub> -EIVLTQSPGTLSPGERAT                                                    | 23 617   |
| CT4.9.1  | NH <sub>2</sub> -DIQMTQSPSSVSASVGDRV                                                   | 23 702   |
| CT4.10.2 | NH <sub>2</sub> -TGEFVLTQSPGTLSPGER (60%)<br>NH <sub>2</sub> -EFVLTQSPGTLSPGERAT (40%) | 24 101   |
| CT4.14.3 | NH <sub>2</sub> -EIVLTQSPGTLSPGERAT                                                    | 23 770   |
| CT4.13.1 | NH <sub>2</sub> -EIVLTQSPGTLSPGERAT                                                    | 23 802   |
| CT6.1.1  | NH <sub>2</sub> -EIVLTQSPGTLSPGERAT                                                    | 23 747   |

| Hybridom | Těžký řetězec                                                                                                                                                                                         | m.h.     |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| CT2.1.3  | neurčeno                                                                                                                                                                                              | neurčeno |
| CT3.1.1  | NH <sub>2</sub> -blokován. Po působení pyroglutamátaminopeptidázy:<br>NH <sub>2</sub> -pQ-VQLVESGGGVVQPGRSLRLS (hlavní sekvence~80 %)<br>NH <sub>2</sub> -PEVQF ... (vedlejší sekvence~20%)           | 51 813   |
| CT4.1.1  | NH <sub>2</sub> -blokován. Po působení pyroglutamátaminopeptidázy:<br>NH <sub>2</sub> -pQ-VQLVESGGGVVQPGRSLRLS (hlavní sekvence~65 %)<br>NH <sub>2</sub> -PEVQFNWYVD ... (vedlejší sekvence~35%)      | 51 502   |
| CT4.8.1  | NH <sub>2</sub> -blokován. Po působení pyroglutamátaminopeptidázy:<br>NH <sub>2</sub> -pQ-VQLVESGGGVVQPG(R)SL (hlavní sekvence~60 %)<br>NH <sub>2</sub> -PEVQFNWY ... (vedlejší sekvence~40%)         | 51 597   |
| CT4.9.1  | NH <sub>2</sub> -EVQLLESGLVQPGGSLRL (volný amino-konec)                                                                                                                                               | 51 437   |
| CT4.10.2 | NH <sub>2</sub> -blokován. Po působení pyroglutamátaminopeptidázy:<br>NH <sub>2</sub> -pQ-VQLVESGGGVVQPGRSLRLS (hlavní sekvence~60 %)<br>NH <sub>2</sub> -PEVQFNWYVD ... (vedlejší sekvence~40%)      | 51 502   |
| CT4.14.3 | NH <sub>2</sub> -blokován. Po působení pyroglutamátaminopeptidázy:<br>NH <sub>2</sub> -pQ-VQLVESGGGVVQPGRSL(R)(L)(S) (hlavní sekvence~65 %)<br>NH <sub>2</sub> -PEVQFNWYV ... (vedlejší sekvence~35%) | 51 293   |
| CT4.13.1 | NH <sub>2</sub> -blokován. Po působení pyroglutamátaminopeptidázy:<br>NH <sub>2</sub> -pQ-VQLVESGGGVVQPGRSLRLS (hlavní sekvence~75 %)<br>NH <sub>2</sub> -PEVQFN ... (vedlejší sekvence~25%)          | 51 305   |
| CT6.1.1  | NH <sub>2</sub> -blokován. Po působení pyroglutamátaminopeptidázy:<br>NH <sub>2</sub> -pQ-VQLVESGGGVVQPGRSLRLS* (hlavní sekvence~65 %)<br>NH <sub>2</sub> -PEVQFNWYVD ... (vedlejší sekvence~35%)     | 51 476   |

\* Tato sekvence těžkého řetězce je podobná jiným blokováným sekvencím těžkého řetězce s výjimkou jediné změny Gln->Glu v pozici 13.

# Obr.10A

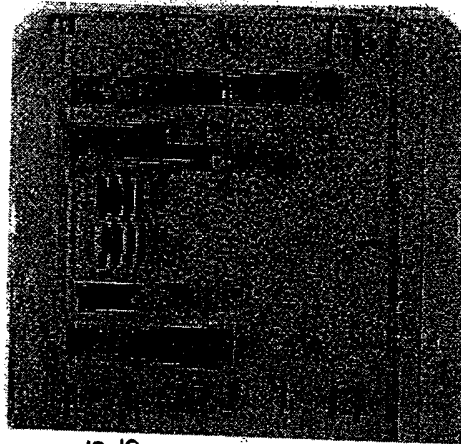
| protilátka                                                                            | konc.<br>(mg/ml) | (Ec1,58) | IEF    | SDS-PAGE   |          | SEC        |            | publik. MALDI |        | n-konc- sekv. (lc)* |            |
|---------------------------------------------------------------------------------------|------------------|----------|--------|------------|----------|------------|------------|---------------|--------|---------------------|------------|
|                                                                                       |                  |          |        | (+) b-me   | (-) b-me | pozorováno | pozorováno | Hc            | Lc     | publikováno         | pozorováno |
| CT3.1.1                                                                               | 1,1              | 1,57     | šmouha | 50 & 28 kD | 6 pásů   | 139 400    | 51 813     | 51 813        | 26 119 | DIQMTQSP            | DIQMTQSP   |
| CT 4.1.1                                                                              | 1,54             | 1,65     | šmouha | 50 & 24 kD | 6 pásů   | 79 900     | 51 502     | 51 502        | 23 917 | EIVLTQSP            | EIVLTQSP   |
| CT 4.8.1                                                                              | 1,52             | 1,54     | 4 pásy | 50 & 24 kD | 6 pásů   | 110 300    | 51 597     | 51 597        | 23 617 | EIVLTQSP            | EIVLTQSP   |
| CT 4.10.2                                                                             | 1,29             | 1,77     | 4 pásy | 50 & 25 kD | 6 pásů   | 107 200    | 51 502     | 51 502        | 24 101 | **                  | ***        |
| CT 4.14.3                                                                             | 1,75             | 1,65     | šmouha | 50 & 24 kD | 6 pásů   | 82 800     | 51 293     | 51 293        | 23 770 | EIVLTQSP            | EIVLTQSP   |
| CT6.1.1                                                                               | 1,36             | 1,3      | 4 pásy | 50 & 24 kD | 6 pásů   | 101 100    | 51 476     | 51 476        | 23 747 | EIVLTQSP            | EIVLTQSP   |
| * všechny těžké řetězce blokovány na n-konci (nesekvencovány v domácích laboratořích) |                  |          |        |            |          |            |            |               |        |                     |            |
| ** publikované smíšené sekvence: TGEFVLTQSP (60) & EFVLTQSP (40)                      |                  |          |        |            |          |            |            |               |        |                     |            |
| *** pozorované smíšené sekvence: TGEFVLTQSP (60) & EFVLTQSP (40)                      |                  |          |        |            |          |            |            |               |        |                     |            |

IOD<sub>280nm</sub> = 0,633 mg/ml  
Ec=1,58

Obr. 10B

IEF

1 2 3 4 5 6 7 8

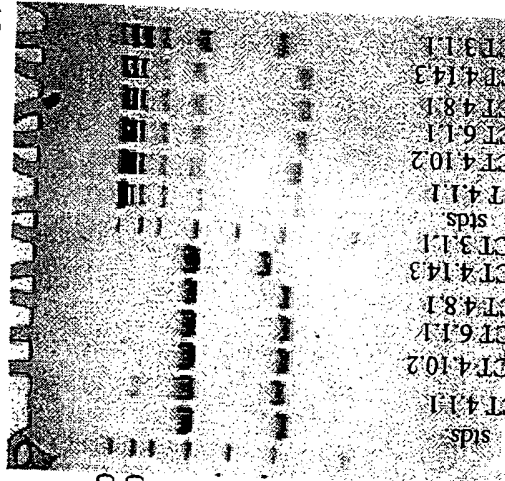


stds.  
CT 4.1.1  
CT 4.10.2  
CT 6.1.1  
CT 4.8.1  
CT 4.14.3  
CT 3.1.1  
stds.

Obr. 10C

SDS-PAGE

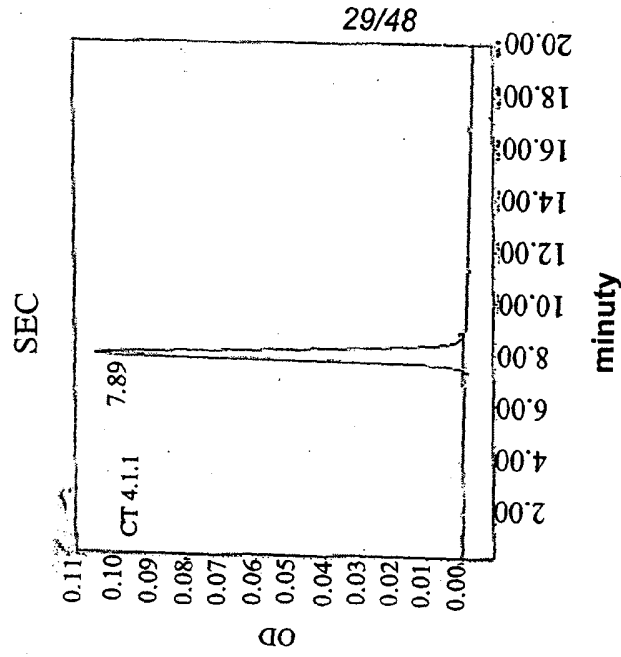
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



stds.  
CT 4.1.1  
CT 4.10.2  
CT 6.1.1  
CT 4.8.1  
CT 4.14.3  
CT 3.1.1  
stds.  
CT 4.1.1  
CT 4.10.2  
CT 6.1.1  
CT 4.8.1  
CT 4.14.3  
CT 3.1.1  
CT 4.1.1

+me -b-me

Obr. 10D



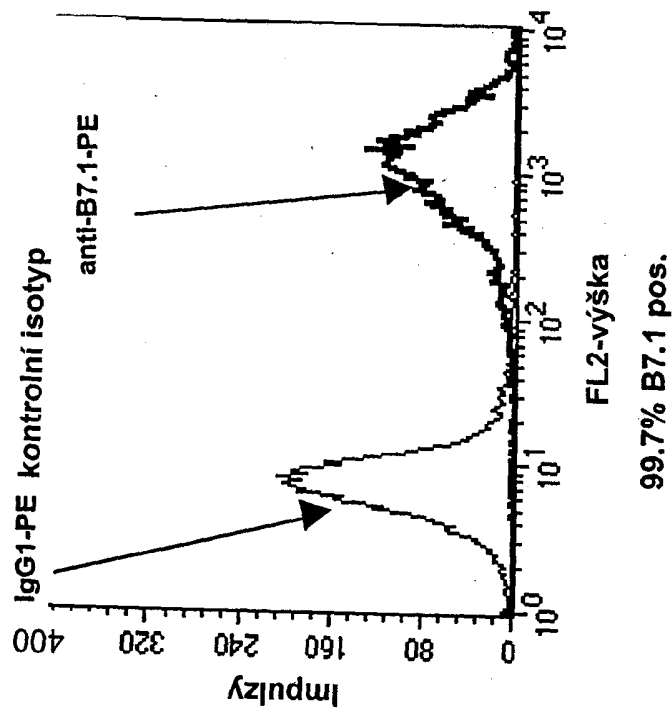
22.08.01

PV 2001-2349

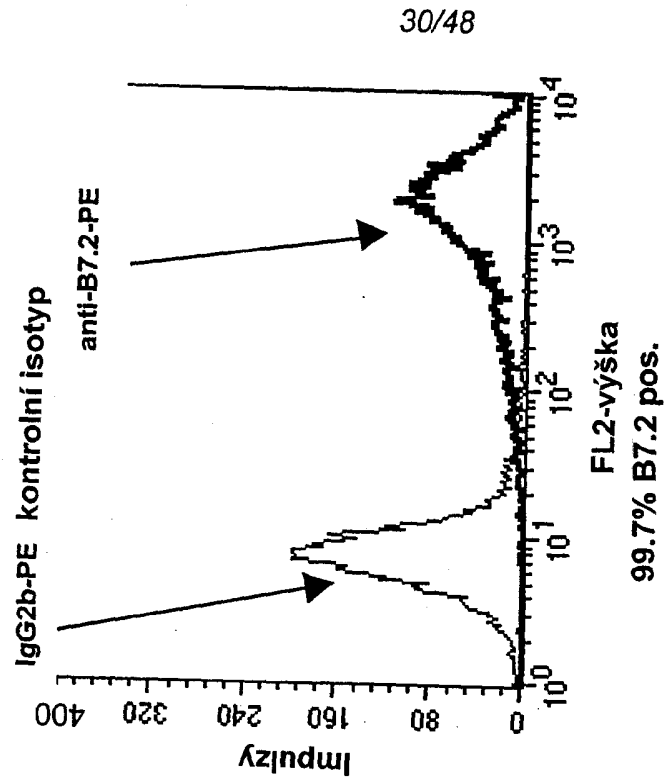
20.08.01

PV 2001-2349

Obr. 11A



Obr. 11B

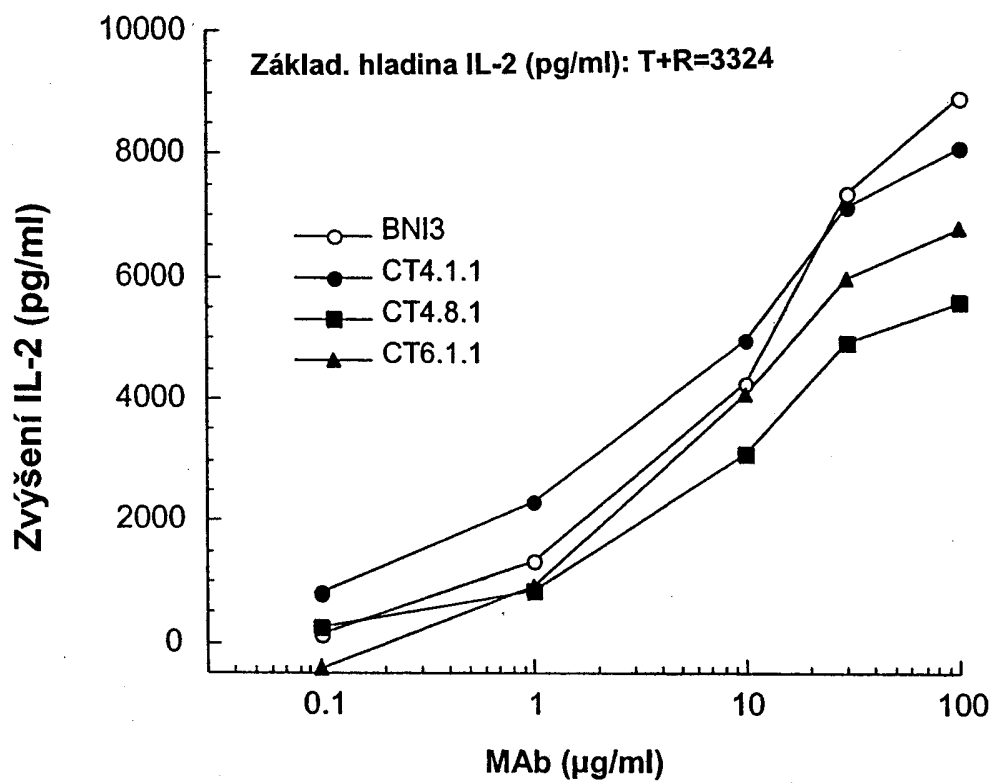


Exprese B7.1 a B7.2 na buňkách Raji

30/48

## Obr. 12

Zvýšení tvorby IL-2 lidskými T lymfocyty po indukci monoklonální protilátkou (MAb) anti-CTLA-4 z XenoMouse v 72hodinovém testu T lymfoblastů/Raji buněk



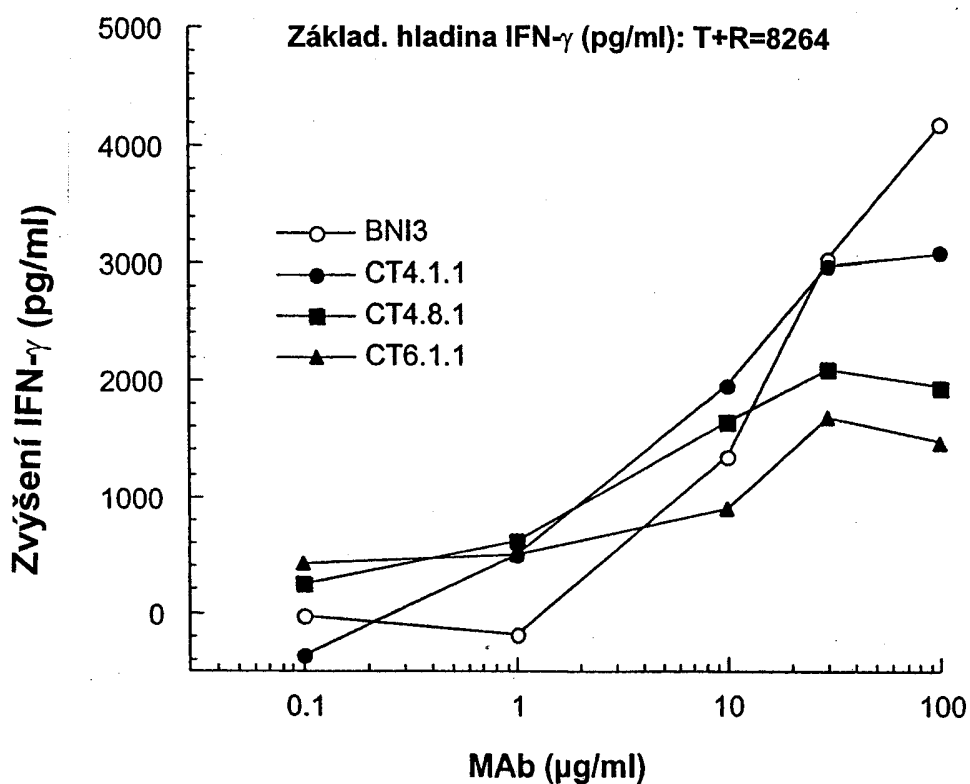
22.08.01

PV 2001-2349

32/48

## Obr. 13

Zvýšení tvorby IFN- $\gamma$  lidskými T lymfocyty po indukci monoklonální protilátkou (MAb) anti-CTLA-4 z XenoMouse v 72hodinovém testu T lymfoblastů/Raji buněk



22.08.01

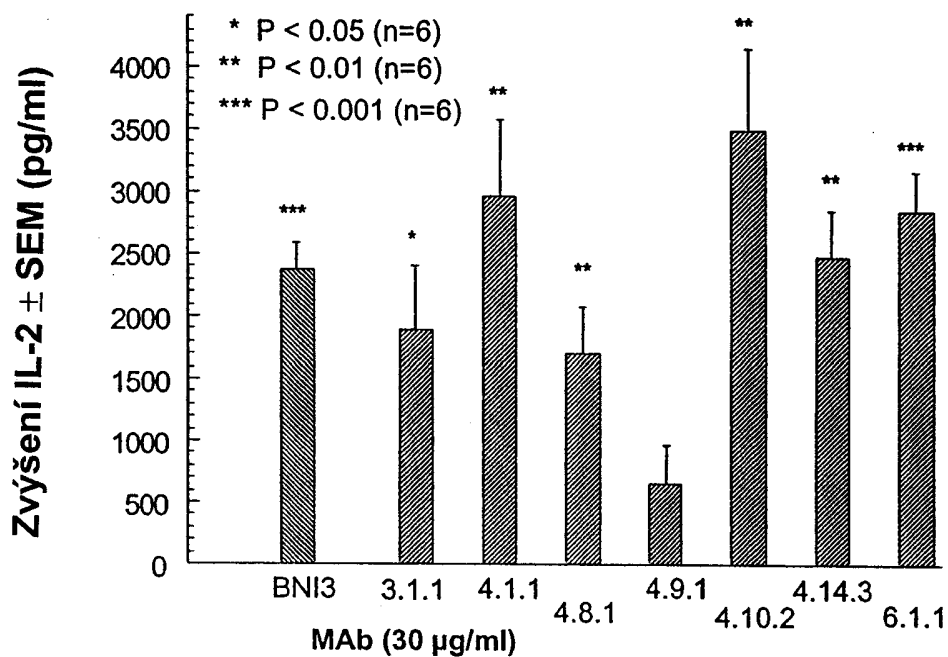
PV 2007-2349

33/48

**Obr. 14**

**Zvýšení tvorby IL-2 lidskými T lymfocyty po indukci monoklonální protilátkou (MAb) anti-CTLA-4 z XenoMouse v 72hodinovém testu T ymfoblastů/Raji buněk (6 dárců)**

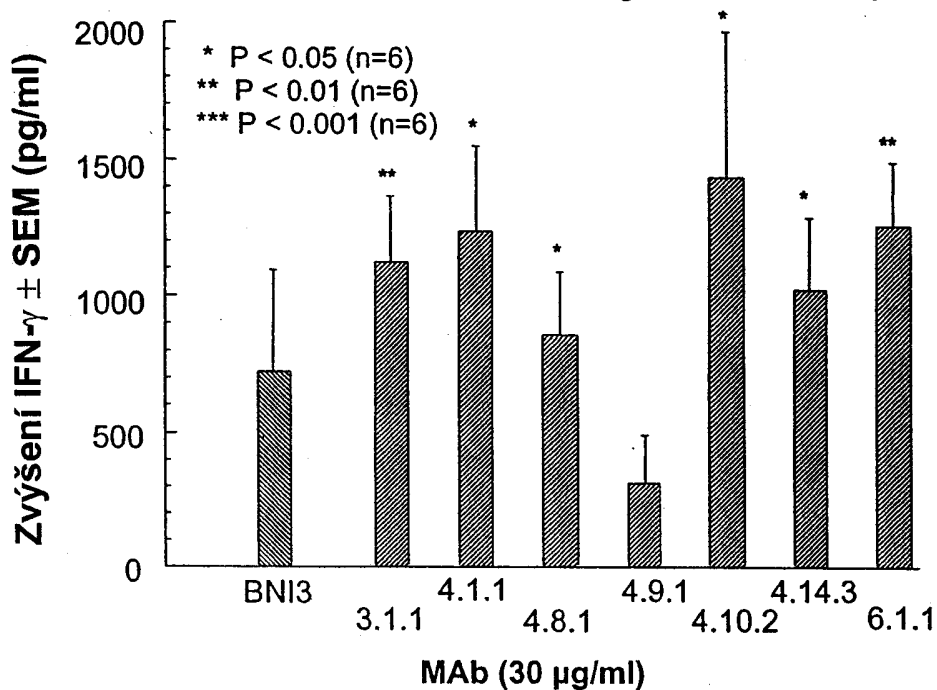
**Základ. hladina IL-2 (pg/ml): T+R=9187, T+R+IgG2a=9389, T+R+IgG2=8509**



**Obr. 15**

**Zvýšení tvorby IFN- $\gamma$  lidskými T lymfocyty po indukci monoklonální protilátkou (MAb) anti-CTLA-4 z XenoMouse v 72hodinovém testu T ymfoblastů/Raji buněk (6 dárců)**

**Základ. hladina IL-2 (pg/ml): T+R=4780, T+R+IgG2a=4868, T+R+IgG2=4331**



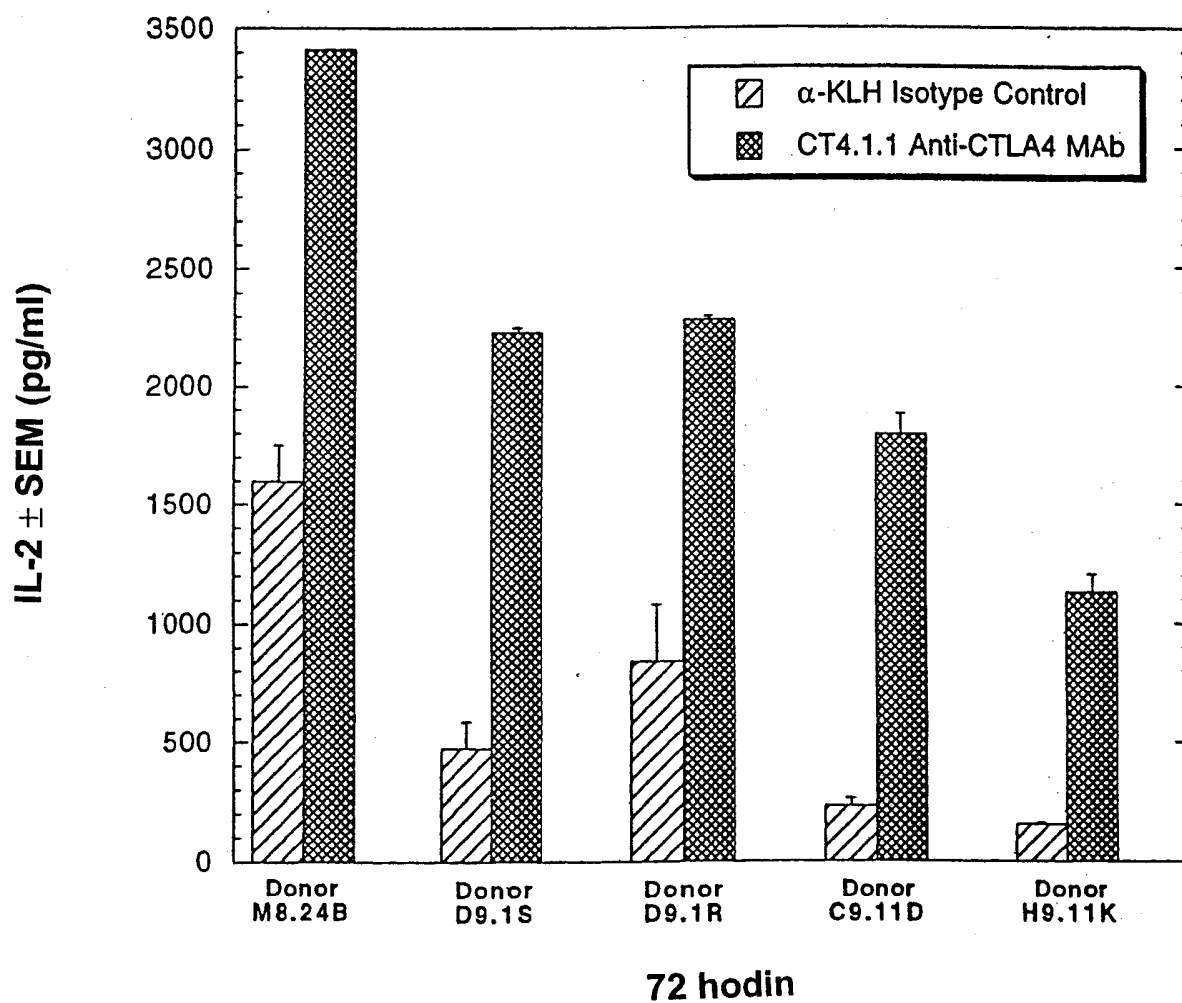
22.08.01

PV 2001 - 2349

35/48

**Obr. 16**

Zvýšení tvorby IL-2 po indukci monoklonální  
protilátkou (MAb) anti-CTLA-4 CT4.1.1 (30  $\mu$ g/ml) v celé lidské krvi  
stimulované SEA (100 ng/ml) a Mab anti-CD3 (60 ng/ml)



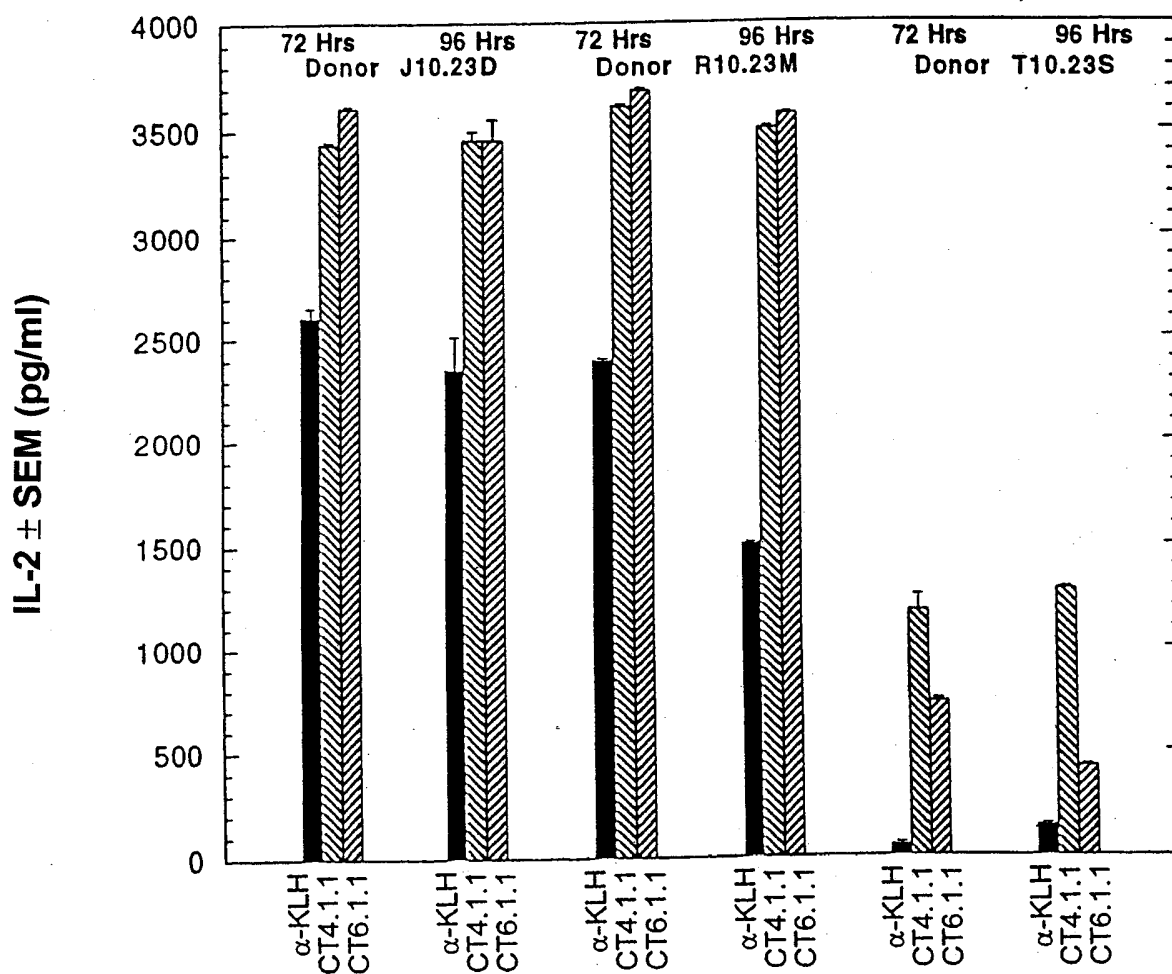
22.08.01

PV 2007-2349

36/48

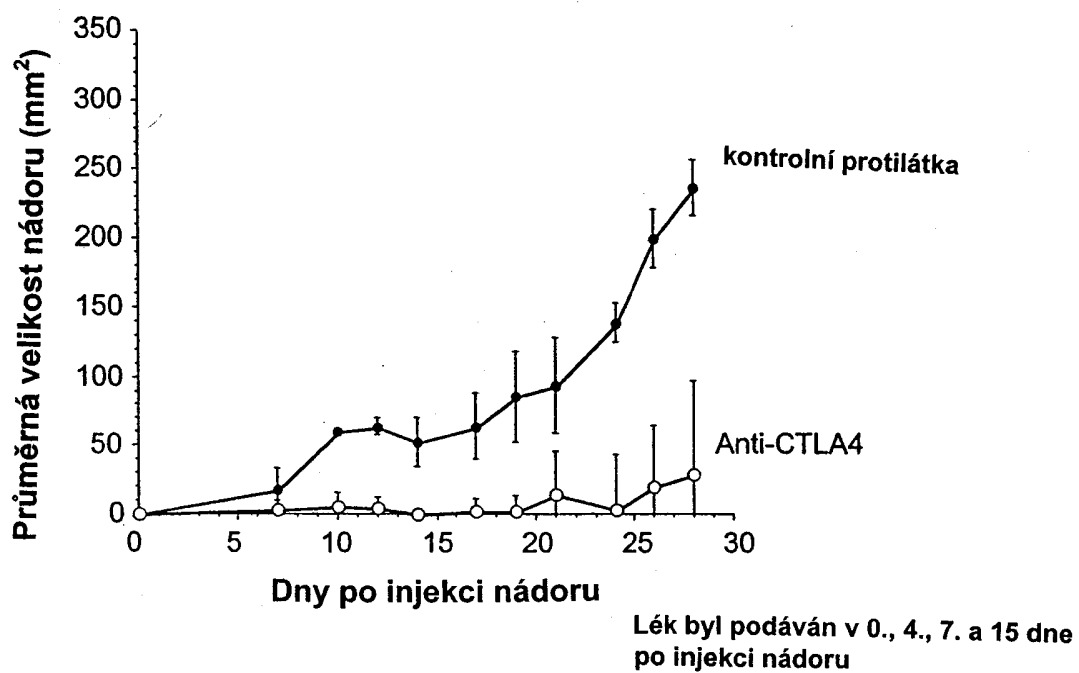
**Obr. 17**

**Zvýšení tvorby IL-2 po indukci monoklonální  
protilátkou (Mab) anti-CTLA-4 CT4.1.1 (30 µg/ml) v celé lidské krvi  
stimulované SEA (100 ng/ml) a Mab anti-CD3 (60 ng/ml)**



## Obr. 18

Anti-myší CTLA-4 inhibuje růst nádorů u myší



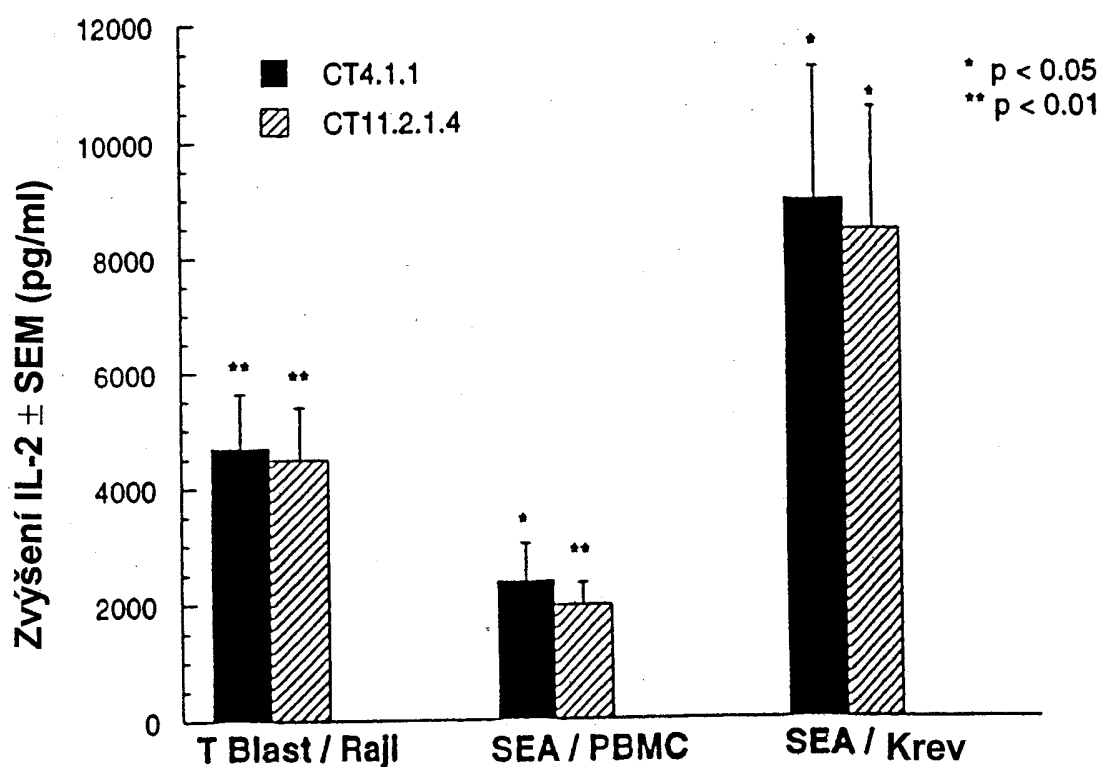
22.08.01

PV 2007-2349

38/48

**Obr. 19**

**Zvýšení tvorby IL-2 po indukci monoklonálními protilátkami (MAb)  
anti-CTLA-4 (30  $\mu$ g/ml) v 72hodinovém testu T lymfoblastů/buněk Raji  
a v superantigenovém testu (6 dárců)**



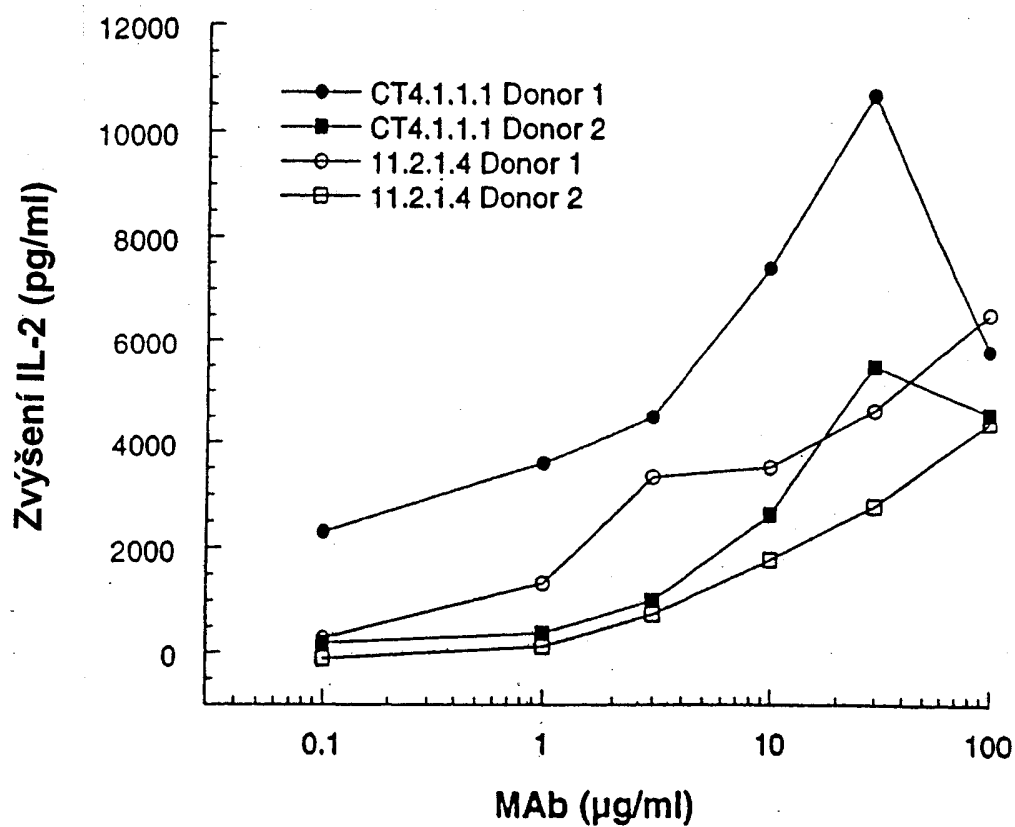
22.05.01

PV 2007-2349

39/48

**Obr. 20**

**Zvýšení tvorby IL-2 lidskými T lymfocyty po indukci  
monoklonální protilátkou (MAb) anti-CTLA-4  
v 72hodinovém testu T lymfoblastů/Raji buněk**



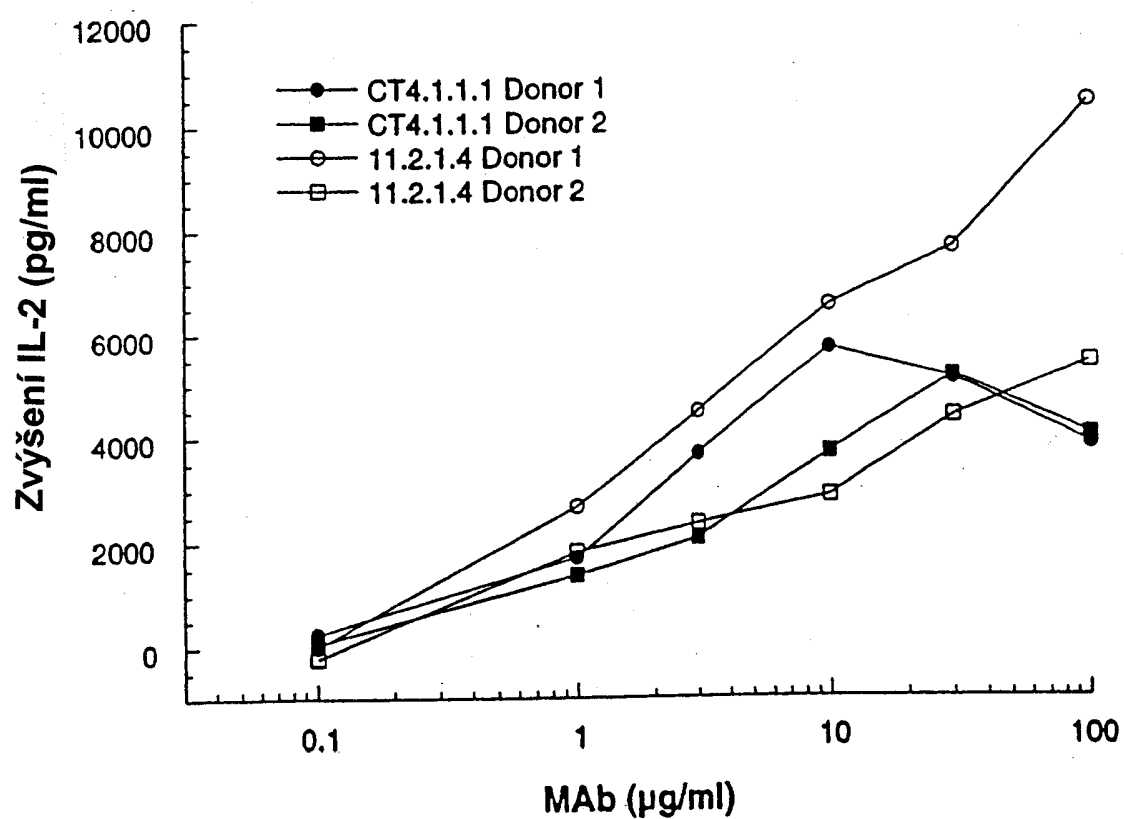
22.08.01

PV 2001-2349

40/48

## Obr. 21

Zvýšení tvorby IL-2 po indukci  
monoklonální protilátkou (MAb) anti-CTLA-4  
v celé krvi stimulované Superantigenem (100 ng/ml)



**Obr. 22A** 4.1.1. cDNA těžkého řetězce IgG2

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTAAGAG  
GTGTCCAGTGT CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGC  
CTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGTAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGC  
CATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC  
AGTTATATGGTATGATGGAAGAAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCC  
GATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTTTCTGCAAATGAAC  
AGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGAGGTCACTT  
CGTCTCTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCAACCGTCTCCTCAGCCT  
CCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCC  
GAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGT  
GACGGTGTCTGTGAACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAG  
CTGTCTACAGTCTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC  
TCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAG  
CAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTGCGAGTGCCAC  
CGTGCCAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAA  
CCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGT  
GGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG  
TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACG  
TTCCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAA  
GGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAA  
CCATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCC  
CCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA  
AGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG  
AGAACAACACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC  
CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT  
CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC  
TCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

(SEKVENCE ID. Č. 53)

V obr. 22 (A-S) jsou :

- signální peptidy znázorněny tučnými a většími písmeny
- otevřený čtecí rámec v genomickém klonu je podtržen
- mutace vnesená pro vytvoření deglykosylované protilátky (N294Q) je znázorněna větším písmem a dvojitě podtržena

**Obr. 22B** 4.1.1. genomická DNA těžkého řetězce IgG2

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTAAGAG  
GTGTCCAGTGT CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGC  
CTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGTAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGC  
CATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC  
AGTTATATGGTATGATGGAAGAAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCC  
GATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTTTCTGCAAATGAAC  
AGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGAGGTCACTT  
CGGTCTTTTACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTA  
GCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCC  
GAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGT  
GACGGTGTGCTGGAATCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCAG  
CTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC  
TCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAG  
CAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGGTGAGAGGCCAGCTCAGGGAGGGAGGG  
TGTCTGCTGGAAGCCAGGCTCAGCCCTCCTGCCTGGACGCACCCCGGCTGTGC  
AGCCCCAGCCCAGGGCAGCAAGGCAGGCCCCATCTGTCTCCTCACCCGGAGGC  
CTCTGCCCCGCCCACTCATGCTCAGGGAGAGGGTCTTCTGGCTTTTTCCACCA  
GGCTCCAGGCAGGCACAGGCTGGGTGCCCTACCCAGGCCCTTCACACACAG  
GGGCAGGTGCTTGGCTCAGACCTGCCAAAAGCCATATCCGGGAGGACCTGCC  
CCTGACCTAAGCCGACCCCAAAGGCCAAACTGTCCACTCCCTCAGCTCGGACA  
CCTTCTCTCCTCCAGATCCGAGTAACTCCCAATCTTCTCTCTGCAGAGCGCA  
AATGTTGTGTCGAGTGCCACCGTGCCAGGTAAGCCAGCCCAGGCCTCGCCC  
TCCAGCTCAAGGCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAGGGACAGGC  
CCCAGCTGGGTGCTGACACGTCCACCTCCATCTCTTCTCAGCACCACCTGTG  
GCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGAT  
CTCCCGGACCCCTGAGGTACAGTGCGTGTTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC  
CCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAG  
ACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCT  
CACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT  
CCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAGGT  
GGGACCCGCGGGGTATGAGGGCCACATGGACAGAGGCCGGCTCGGCCACCCT  
CTGCCCTGGGAGTGACCGCTGTGCCAACCTCTGTCCCTACAGGGCAGCCCCGA  
GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCA  
GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGG  
AGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAACAAGACCACACCTCCCATG  
CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAG  
CAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGC  
ACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

(SEKVENCE ID. Č. 54)

**Obr. 22C** 4.1.1. protein těžkého řetězce IgG2

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSS  
 HGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGRNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMN  
 SLRAEDTAVYYCARGGHFGPFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS  
 ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP  
 SSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPK  
 PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST  
 FRVSVLTVVHQDNLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL P  
 PSRERMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGDSFF  
 LYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID

(SEKVENCE ID. Č. 63)

**Obr. 22D** 4.1.1. cDNA těžkého řetězce IgG2 N294Q

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTAAGAG  
GTGTCCAGTGT CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGC  
CTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGTAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGC  
CATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC  
AGTTATATGGTATGATGGAAGAAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCC  
GATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTTTCTGCAAATGAAC  
AGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGAGGTCACTT  
CGTCTCTTTTGA TACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCAACGTCTCCTCAGCCT  
CCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCC  
GAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGT  
GACGGTGTCTGTGGA ACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCAG  
CTGTCTTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC  
TCCAGCAACTTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAG  
CAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTGAGTGCCAC  
CGTGCCAGCACACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAA  
CCCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGT  
GGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG  
TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCCAAGCACG  
TTCCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAA  
GGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGASAAAA  
CCATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCC  
CCATCCCCGGGAGGAGATCACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAA  
AGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG  
AGAACA ACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC  
CTCTACAGCAAGCTCACCGTCGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT  
CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC  
TCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEKVENCE ID. Č. 55)

**Obr. 22E** 4.1.1. protein těžkého řetězce IgG2 N294Q

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSS  
HGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGRNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMN  
SLRAEDTAVYYCARGGHFGPFDYWQGTLVTVSSASTKGPSVPPLAPCSRSTS  
ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP  
SSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTV ERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPK  
PKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQST  
FRVVS VLTIVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPI EKTISKTKGQPREPQVYTLF  
PSREBMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTT PPM L DSDGSFF  
LYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEKVENCE ID. Č. 64)

**Obr. 22F** 4.1.1. DNA kapa řetězce

ATGGAAACCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCC  
CAGATACCACCGGAGAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTT  
TGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATTAGC  
AGCAGCTTCTTAGCCTGGTACCAGCAGAGACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCT  
CATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACTGGCA  
GTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGAT  
TTTGCAGTGTATTACTGTGTCAGCAGTATGGTACCTCACCCTGGACGTTCCGGCCA  
AGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCT  
TCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTG  
CTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGC  
CCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACA  
GCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAA  
CACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCCGTCAC  
AAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (SEKVENCE ID. Č. 56)

**Obr. 22G** 4.1.1. protein kapa řetězce

METPAQLLFLLLLWLPTTGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSI  
SSFLAWYQQRPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPED  
FAVYYCQYGTSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCL  
LNNFYPRFAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEK  
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEKVENCE ID. Č. 65)

**Obr. 22H** 4.8.1. DNA těžkého řetězce

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCCTCGTTGCTCTTTTAAGAG  
GTGTCCAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGC  
CTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTACAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAAC  
TATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC  
AGTTATATGGTATGATGGAAGTAATAAACACTATGGAGACTCCGTGAAGGGCC  
GATTACCATCTCCAGTGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAAC  
AGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGAGAGAGACT  
GGGGTCTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG  
CCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACC  
TCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACC  
GGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCC  
CAGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTG  
CCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCC  
CAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTGAGTGCC  
CACCGTGCCAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCA  
AAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGT  
GGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACG  
GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGC  
ACGTTCCGTGTGGTCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGA  
AAACCATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTG  
CCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGT  
CAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC  
CGGAGAACAACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC  
TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGT  
CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGA  
GCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEKVENCE ID. Č. 57)

**Obr. 22I** 4.8.1. protein těžkého řetězce

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCTASGFTFSN  
YGMHWVRQAPGKGLEWVAWIYDGSNKHYGDSVKGRFTISSDNSKNTLYLQMN  
SLRAEDTAVYYCARGERLGSYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRST  
SESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV  
PSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKCCVECPAPPPVAGPSVFLFPP  
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS  
TFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL  
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSF  
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEKVENEC ID. Č. 66)

**Obr. 22J** 4.8.1. DNA kapa řetězce

ATGGAAACCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCC  
CAGATACCACCGGAGAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTT  
TGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGACCAGTGTAGCAGCAGT  
TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTA  
TGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGT  
CTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCA  
GTCTATTACTGTTCAGCAGTATGGCATCTCACCTTCACTTTCGGCGGAGGGAC  
CAAGGTGGAGATCAAGCGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGC  
CATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAAT  
AACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCA  
ATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCT  
ACAGCCTCAGCAGCACCTTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAA  
GTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAG  
CTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

(SEKVENEC ID. Č. 58)

**Obr. 22K** 4.8.1. protein kapa řetězce

METPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRTSVSSS  
YLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFA  
VYYCQQYGISPFTEGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN  
NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHK  
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEKVENEC ID. Č. 67)

**Obr. 22L** 6.1.1 DNA těžkého řetězce

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTAAGAG  
GTGTCCAGTGT CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCGAGC  
CTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCTGTACAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGT  
TATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC  
AGTTATATGGTATGATGGAAGCAATAAACACTATGCAGACTCCGCGAAGGGCC  
GATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAAC  
AGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGCCGGAAGTCT  
GGGTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCT  
CCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCC  
GAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGT  
GACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCAG  
CTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC  
TCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAG  
CAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTGAGTGCCAC  
CGTGCCAGCACACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAA  
CCCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGT  
GGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG  
TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACG  
TTCCGTGTGGTCAAGCTCTCACCCTGTGTGACCAGGACTGGCTGAACGGCAA  
GGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAA  
CCATCTCCAAAACCAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCC  
CCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGCTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA  
AGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG  
AGAACAAC TACAAGACCACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC  
CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT  
CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC  
TCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEKVENCE ID. Č. 59)

**Obr. 22M** 6.1.1 protein těžkého řetězce

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVEPGRSLRLSCTASGFTFSS  
YGMHWVRQAPGKLEWVAVIWDGSKHYADSAKGRFTISRDN SKNTLYLQMN  
SLRAEDTAVYYCARAGLLGYFDYWQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS  
ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP  
SSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTKVERKCCVECP PAPPVAGPSVFLFPPK  
PKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST  
FRVVS VLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLF  
PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFF  
LYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEKVENCE ID. Č. 68)

**Obr. 22N** 6.1.1. DNA kapa řetězce

ATGGAAACCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCC  
CAGATACCACCGGAGAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTT  
TGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGTAGGGCCAGTCAAAGTGTTAGC  
AGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCCCTCAT  
CTATGGTGTATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTG  
GGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTT  
GCAGTGTATTACTGTGTCAGCAGTATGGTATCTCACCATTCACTTTTCGGCCCTGG  
GACCAAAGTGGATATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCC  
CGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTG  
AATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCT  
CCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCA  
CCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAC  
AAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAA  
GAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (SEKVENCE ID. Č. 60)

**Obr. 22O** 6.1.1 protein kapa řetězce

METPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVS  
SYLAWYQQKPGQAPRPLIYGVSRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF  
AVYYCQQYGISPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL  
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKH  
KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEKVENCE ID. Č. 69)

**Obr. 22P** 11.2.1 DNA těžkého řetězce IgG2

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCCTCGTTGCTCTTTTAAGAG  
GTGTCCAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGC  
CTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGC  
TATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC  
AGTTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCC  
GATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAAC  
AGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCCGAGGGG  
AGCTACCCTTTACTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCA  
CGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCG  
CCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAA  
GGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGGCGCTCTGACCA  
GCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTC  
AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTG  
CAACGTAGATCAAAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCA  
AATGTTGTGTCGAGTGCCACCGTGCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCA  
GTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCC  
TGAGGTACAGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGT  
TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGG  
GAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTTGTGCA  
CCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCC  
TCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAGGGCAGCCCCGAGAA  
CCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGT  
CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGT  
GGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAAGACACACCTCCCATGCTG  
GACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAG  
GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA  
ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

(SEKVENCE ID. Č. 61)

**Obr. 22Q** 11.2.1 protein těžkého řetězce IgG2

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAWIY  
DGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPRGATLY  
YYYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP  
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH  
KPSNTKVDKTV ERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC  
VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLT VVH QDWL  
NGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC  
LVKGFYPSPDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQG  
NVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEKVENGE ID. Č. 70)

**Obr. 22R** 11.2.1. DNA kapa řetězce IgG2

ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTACTCT  
GGCTCCGAGGTGCCAGATGTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCC  
CTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAG  
CATTAAACAGCTATTTAGATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTA AAC  
TCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCA GT  
GGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGA  
AGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGTATTACAGTACTCCATTCACTTTTCG  
GCCCTGGGACCAAAGTGGAAATCAAACGAAGTGTGGCTGCACCATCTGTCTTC  
ATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTG  
CCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATA  
ACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAG  
GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGA  
GAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCG  
TCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAGTGA (SEKVENGE ID. Č. 62)

**Obr. 22S** 11.2.1. protein kapa řetězce IgG2

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSINSYLDWYQQKPGKAPKLLIYAASS  
LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQYYSTPFTFGPGTKVEI  
KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS  
QESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG  
EC (SEKVENGE ID. Č. 71)