



(10) **LT 5416 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

- (11) Patent numeris: **5416**
- (21) Paraiškos numeris: **2005 099**
- (22) Paraiškos padavimo data: **2005 11 08**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **2006 11 27**
- (45) Patent paskelbimo data: **2007 04 25**
- (62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/US2003/026232**
- (86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **2003 08 19**
- (85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: **2005 11 08**
- (30) Prioritetas: **60/404,802, 2002 08 19, US**
- (72) Išradėjas:
Jean M. GUDAS, US
Mary HAAK-FRENDSCHO, US
Orit FOORD, US
Meina L. LIANG, UA
Kiran AHLUWALIA, US
Sunil BHAKTA, US
- (73) Patent savininkas:
Abgenix, Inc., 6701 Kaiser Drive, Fremont, CA 94555, US
- (74) Patentinis patikėtinis:
Aušra PAKĖNIENĖ, AAA Baltic Service Company, Jasinskio g. 16B, Biurų centras Victoria, LT-01112 Vilnius, LT

- (54) Pavadinimas:
Antikūnai, nukreipti prieš monocito chemotaksio baltymą -1, ir jų panaudojimas

- (57) Referatas:
Išradimo įgyvendinimas susijęs su antikūnais, nukreiptais prieš monocitų chemotaksio baltymo-1 (MCP-1) antigeną, ir tokių antikūnų panaudojimu. Ypatingai, remiantis kai kuriais įgyvendinimais, numatyti pilnai žmogaus monokloniniai antikūnai, nukreipti prieš MCP-1 antigeną. Pateiktos nukleotidų sekos, koduojančios, ir aminorūgščių sekos, apimančios, imunoglobulino molekulės sunkiąją ir lengvąją grandines, ypatingai sekos, atitinkančios artimoms sunkiosios ir lengvosios grandinės sekoms, apimančioms struktūrinę sritį ir/arba

komplementarumą apibrėžiančias sritis (CDR), ypačiai nuo FR1 iki FR4 arba CDR1 iki CDR3. Taip pat pateiktos hibridomos ir kitos ląstelių linijos, ekspresuojančios tokias imunoglobulinų molekules ir monokloninius antikūnus.

Išradimo pagrindimas

Išradimo sritis

Aprašyto išradimo įgyvendinimas susijęs su antikūnais, nukreiptais prieš monocitų chemotaksio baltymo-1 (MCP-1) antigeną, ir tokių antikūnų panaudojimu. Ypatingai, pagal išradimo įgyvendinimą, yra numatyti pilnai žmogaus monokloniniai antikūnai, nukreipti prieš MCP-1 antigeną. Yra numatytos nukleotidų sekos, koduojančios ir aminorūgščių sekos, apimančios, imunoglobulino molekulės sunkiąją ir lengvąją grandines, ypatingai sekas atitinkančias gretimoms sunkiosios ir lengvosios grandinių sekoms, apimančioms struktūrinės sritis ir/arba komplementarumą apibrėžiančias sritis (CDR), konkrečiai nuo FR1 iki FR4 arba CDR1 iki CDR3. Išradime surasti antikūnai naudojami ligų, susijusių su MCP-1 perprodukcija, diagnozei ir gydymui. Taip pat numatytos hibridomos arba kitos ląstelių linijos, ekspresuojančios tokias imunoglobulinų molekules ir monokloninius antikūnus.

Technikos lygio aprašymas

Manoma, kad angiogeninių faktorių gamybos didėjimas ir vėžio ląstelių angiogenozės inhibitorių, kraujagyslių endotelio ląstelių ir kitų stromos ląstelių tipų produkcijos mažėjimas indukuoja auglio angiogenezę. Stroma, apimanti tarpinį jungiamąjį audinį, bazalines plokšteles, kraujo ląsteles, fibroblastų ląsteles, apsupa beveik visas tirpias auglio ląsteles. Sąveikos tarp stromos ir vėžio ląstelių vaidina kritinį vaidmenį auglių neovaskuliarizacijoje. Be to, makrofagai, kurie yra taip pat stromos komponentai, yra svarbūs auglio angiogenezeje. (M. Ono ir kt., Cancer Chemother. Pharmacol. (1999) 43(Suppl.): S69-S71).

Makrofagai pagrindiniai yra vienbranduolinės fagocitų sistemos galutinai diferencijuotų ląstelių tipas, ir taip pat yra vienos iš pagrindinių angiogenozės ląstelių-efektorių, gaminančių tam tikrą skaičių augimo stimuliatorių ir inhibitorių. Žinoma, kad tam tikras skaičius angiogeninių citokinų yra gaunami iš makrofagų, įskaitant monocitų chemotaksio baltymą-1 (MCP-1).

MCP-1 yra žinomas kaip chemotaktinis T limfocitams, bazofilams ir NK ląstelėms. MCP-1 yra vienas iš daugelio pajėgių makrofagus sutelkiančių molekulių. Sutelkti į auglio arba uždegimo vietas, makrofagai gali generuoti tam tikrą skaičių angiogeninių citokinų, tuo būdu stimuliuodami patologinę angiogenezę. Tam tikras skaičius tyrimų parodė sąryšį tarp

angiogenezės, makrofagų telkimo ir prognozių pacientams su įvairiomis auglių rūšimis (G. Fantanini ir kt., Int. J. Cancer (1996) 67:615; N. Weidner ir kt., J. Natl. Cancer Inst. (1992) 84:1875). Leek ir kt. papildomai pademonstravo, kad iš pagrindų didėjantis makrofagų skaičius yra glaudžiai susijęs su vaskuliarizacija ir krūties vėžio pacientų prognoze (Cancer Res. (1996) 56:4625). R. Huang ir kt., (Cancer Res. (2002) 62:2806-2812) parodė, kad Connexin 43 supresuoja glioblastomos ląstelių augimą mažėjant MCP-1 reguliacijai, kaip atrasta naudojant baltymų matricų technologiją.

Goede ir kt. (Int. J. Cancer (1999) 82: 765-770) pirma pademonstravo, kad MCP-1 turi angiogeninį gebėjimą, kuris buvo ekvivalentiškas VEGF gebėjimui, kai buvo tiriamas triušių ragenos modelis. Šiame modelyje, MCP-1 indukuotas angiogeninis aktyvumas buvo susijęs su dideliu makrofagų susitelkimu triušio ragenoje. Salcedo ir kt. pranešė, kad MCP-1 indukavo žmogaus endotelio ląstelių chemotaksį nanomoliarinėse koncentracijose. Šis chemotaktinis atsakas buvo inhibuotas polikloniniu antikūnu prieš žmogaus MCP-1 (R. Salcedo ir kt., Blood (2000) 96(1):34-40).

MCP-1 yra dominuojantis chemokinas, ekspresuotas kiaušidžių vėžio (Negus, R. P. M. ir kt., J. Clin. Invest. (1995) 95: 2391-96; Sica, A. Ir kt., J. Immunology (2000) 164(2):733-8). MCP-1 taip pat yra aukštesnis keletu žmogaus vėžio atvejų, įskaitant šlapimo pūslės, krūties, plaučių vėžį ir glioblastomą.

Be to, MCP-1 svarba uždegimo procese buvo parodyta eilėje tyrimų. Pavyzdžiui, H.J. Anders ir kt. pademonstravo chemokiną ir chemokino receptoriaus ekspresiją glomerunefrito imuninio komplekso iniciacijoje ir išsiskaidyme. Segerer ir kt. (J. Am. Soc. Nephrol. (2000) 11:2231-2242) taip pat tyrė MCP-1 ekspresiją ir jo receptoriaus chemokino receptoriaus-2 ekspresiją žmogaus pusmėnulio glomerulonefrito atveju. J.A. Belperio ir kt. parodė chemokino MCP-1/CCR2 lemiamą vaidmenį *bronchiolitis obliterans* sindromo patogenezėje (J. Clin. Investig. (2001) 108:547-556). N.G. Frangiogiannis ir kt. aprašė MCP-1 vaidmenį uždegiminiam atsakui į miokardo infarktą (Cardiovascular Res. (2002) 53: 31-47). Gerard ir Rollins (Nature Immunol. (2001) 2:108-115) ir Reape ir Groot (Atherosclerosis (1999) 147: 213-225) diskutavo apie MCP-1 vaidmenį aterosklerozei ir kitoms ligoms. Taip pat, Schmidt ir Stern (Arterioscler. Tromb. Vasc. Biol. (2001) 21:297-299) aprašė MCP-1 sąveikas restenozėje.

Žmogaus MCP-1, 76 aminorūgščių CC chemokinas su N-galine piroglutamo rūgštimi pradžioje buvo išskirtas iš keletos šaltinių, įskaitant fitohemaglutinino stimuliuotus žmogaus limfocitus (Yoshimura, T. ir kt., J. Immunol. (1989) 142:1956-62), žmogaus gliomos ląstelių liniją (Yoshimura, T., ir kt., J. Exp. Med. (1989) 169: 1449-59), ir žmogaus mielomonocitinių ląstelių liniją THP-1 (Matsushima, K., ir kt., (1989) J. Exp. Med. (1989)

169: 1485-90). MCP-1 visų pirma buvo aprašytas kaip limfocitų kilmės chemotaktinis faktorius (LDCF). Kiti baltymo pavadinimai yra auglio ląstelių kilmės chemotaktinis faktorius (TDCF), gliomos kilmės monocitų chemotaktinis faktorius (TDCF), gliomos kilmės monocitų chemotaktinis faktorius (GDCF), lygiųjų raumenų ląstelių kilmės chemotaktinis faktorius (SMC-CF), monocitų chemotaktinis aktyvuojantis faktorius (MCAF) ir CCL2. MCP-1 koduojančios cDNR klonavimas atskleidė 99 aminorūgščių atvirą skaitymo rėmelį, įskaitant 23 aminorūgščių signalinį peptidą. MCP-1 pelių homologinis genas buvo pavadintas JE (B.J. Rollins ir kt., 1989).

WO 200189565, paskelbtas 2001 lapkričio 29, atskleidė polikloninius antikūnus prieš žmogaus MCP-1 ir aprašo auglio augimo inhibiciją plikų pelių modelyje, naudojant tokius polikloninius antikūnus.

Aprašyto išradimo įgyvendinimas susijęs su pilnai žmogaus monokloniniu antikūnu prieš žmogaus MCP-1, kuris blokuoja MCP-1 indukuotą HTP-1 ląstelių chemotaksį, ląstelių linijos, išvestos iš pacientų su ūmia monocitine leukemija. Šios ląstelės yra naudojamos kaip normalių žmogaus vienbranduolinių ląstelių pakaitalai judėjimo įvertinimui cirkuliacijoje. Vienbranduolinės ląstelės infiltravimas, stimuliuotas MCP-1, vaidina pataloginį vaidmenį eilėje uždegiminių būklių, įskaitant reumatoidinį artritą, glomerulonefritą, aterosklerozę, transplanto atmetimą, psoriazę, restenozę ir autoimunines ligas, tokias kaip išsėtinę sklerozę. Antikūnas, kuris blokuoja MCP-1 aktyvumą ir trukdo monocitų infiltracijai, gali būti naudojamas šių ir kitų uždegiminių ligų gydymui.

Trumpas išradimo išdėstymas

Čia aprašyti išradimo įgyvendinimai susiję su monokloniniais antikūnais, kurie kaip buvo surasta, susiriša su MCP-1 ir veikia MCP-1 funkciją. Kiti įgyvendinimai susiję su žmogaus anti-MCP-1 antikūnais ir anti-MCP-1 antikūnų gamyba su norimomis savybėmis iš gydymo perspektyvos, įskaitant stiprų prisirišimo trauką prie MCP-1, sugebėjimą neutralizuoti MCP-1 *in vitro*, ir sugebėjimą inhibuoti viso auglio neovaskuliarizaciją.

Vienas išradimo įgyvendinimas yra pilnai žmogaus monokloninis antikūnas, kuris rišasi su MCP-1 ir turi sunkiosios grandinės aminorūgščių seką, parinktą iš grupės, susidedančios iš SEQ ID Nr.: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46, 50, 54, 58, 62, 66, 70, 74, 78, 82, 86, 90, 94, 98, 102, 106, 110, 114, 118, 122, 126, 130, 134, 138, 142 ir 146. Išradimo įgyvendinime antikūnas, toliau apima lengvosios grandinės aminorūgščių seką, parinktą iš grupės, susidedančios iš SEQ ID Nr.: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68, 72, 76, 80, 84, 88, 92, 96, 100, 104, 108, 112, 116, 120, 124, 128, 132, 136, 140, 144 ir 148.

Taigi, čia aprašyto išradimo įgyvendinimas pateikia izoliuotus antikūnus, arba šių antikūnų fragmentus, kurie rišasi su MCP-1. Kaip yra žinoma, antikūnai sėkmingai gali būti pavyzdžiui, monokloniniai, chimeriniai ir/arba žmogaus antikūnai. Čia aprašyto išradimo įgyvendinimas taip pat pateikia ląsteles šių antikūnų gamybai.

Kitas šio išradimo įgyvendinimas yra pilnai žmogaus antikūnas, kuris rišasi su MCP-1, kuris apima sunkiosios grandinės aminorūgščių seką, turinčią CDR, apimančias sekas, parodytas 7 ir 10 figūrose. Pažymima, kad CDR apibrėžimai gali būti atlikti nesunkiai tos srities specialistų. Apskritai, CDR pateiktos šiame išradime, yra aprašytos čia, kaip apibrėžta Kabat ir kt., in Sequences of Proteins of Immunological Interest 1-3 tomuose (Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD 1991).

Dar kitas šio išradimo įgyvendinimas yra pilnai žmogaus antikūnas, kuris rišasi su MCP-1 ir apima lengvosios grandinės aminorūgščių seką, turinčią CDR, apimančias sekas parodytas 8 ir 9 figūrose.

Tolimesnis šio išradimo įgyvendinimas yra pilnai žmogaus antikūnas, kuris rišasi su MCP-1, kuris apima sunkiosios grandinės aminorūgšties seką, turinčią CDR, apimančias sekas, parodytas 7 ir 10 figūrose ir lengvosios grandinės aminorūgšties seką, turinčią CDR, apimančią sekas, parodytas 8 ir 9 figūrose.

Kitas šio išradimo įgyvendinimas yra pilnai žmogaus antikūnas, kuris rišasi su kitais MCP-1 šeimos nariais, įskaitant, bet ne limituotai, su MCP-2, MCP-3 ir MCP-4. Tolimesnis šio išradimo įgyvendinimas yra antikūnas, kuris kryžmiškai konkuruoja dėl susijungimo su MCP-1 su šio išradimo pilnai žmogaus antikūnais.

Reikia suprasti, kad išradimo įgyvendinimai nėra apriboti kuria nors daline antikūno forma, arba kilmės, arba gamybos būdu. Pavyzdžiui, anti-MCP-1 antikūnas gali būti pilno ilgio antikūnas (t.y. turintis sveiką žmogaus Fc sritį) arba antikūno fragmentas (t.y. Fab, Fab' arba F(ab')₂). Be to, antikūnas gali būti pagamintas iš hibridomos, kuri sekretuoja antikūną, arba iš rekombinantiškai gautos ląstelės, kuri gali būti transformuota arba transfekuota genu arba genais, koduojančiais antikūną.

Kiti šio išradimo įgyvendinimai apima izoliuotas nukleino rūgšties molekules, koduojančias bet kurį čia aprašytą antikūną, vektorius, turinčius izoliuotas nukleino rūgšties molekules, koduojančias bet kurį iš tokių anti-MCP-1 antikūnų, ląstelę-šeimininkę, transformuotą kokia nors iš šių nukleino rūgšties molekulių. Be to, šio išradimo įgyvendinimas yra anti-MCP-1 antikūno gavimo būdas, auginant ląsteles-šeimininkes sąlygomis, kuriose nukleino rūgšties molekulė yra išreikšta produkuoti antikūną, išplaukiantį iš antikūno atstatymo.

Tolimesnis šio išradimo įgyvendinimas apima aukšto giminingumo antikūnų prieš MCP-1 gavimo metodą, imunizuojant žinduolį su žmogaus MCP-1 arba jo fragmentu ir viena arba daugiau ortologinių sekų arba jų fragmentų.

Čia aprašyto išradimo įgyvendinimas paremtas izoliuotų antikūnų, kurie specifiškai rišasi su MCP-1, generavimu ir identifikavimu. MCP-1 ekspresuojamas aukštesniame lygyje esant neoplastinėms ligoms, tokioms kaip augliai, arba kitos uždegiminės ligos. MCP-1 biologinio aktyvumo inhibavimas galigali sutrukdyti tolimesnę vienbranduolinių ląstelių infiltraciją į audinius.

Kitas šio išradimo įgyvendinimas apima ligų diagnozavimo metodą arba sąlygas, kurioms esant antikūnai paruošiami pagal išradimo aprašymą panaudojimui MCP-1 lygio nustatymui pacientų pavyzdžiuose. Šiame įgyvendinime pacientų pavyzdžiai yra kraujas arba kraujo serumas. Tolimesniame įgyvendinime, yra rizikos faktorių identifikavimo metodai, ligų diagnozė ir ligų stadijos nustatymas, kurie apima MCP-1 superekspresiją, naudojant anti-MCP-1 antikūnus.

Kitame įgyvendinime išradimas apima diagnozavimo metodą, sąlygų, susijusių su MCP-1 ekspresija ląstelėje, apimančių ląstelės kontaktavimą su anti-MCP-1 antikūnu, ir MCP-1 buvimo nustatymu. Geresnės sąlygos apima, bet ne limituoja, neoplastines ligas, apimančias be apribojimų auglius, vėžį, tokį kaip krūtis, kiaušidžių, skrandžio, endometriumo, seilių liaukų, plaučių, inkstų, gaubtinės žarnos, tiesiosios žarnos, skydliaukės, kepenų, prostatos ir šlapimo pūslės vėžį, o taip pat ir kitas uždegimines sąlygas, įskaitant, bet nelimituojant, reumatoidinį artritą, glomerulonefritą, aterosklerozę, psoriazę, organų transplantus, restenozę ir autoimunines ligas.

Kitame įgyvendinime, išradimas apima reagentų rinkinį nustatymui MCP-1 ir MCP-1 šeimos narių žinduolių audinių kultūrose arba ląstelėse, atrinkimui neoplastinių ligų arba uždegiminių sąlygų, apimančių antikūną, kuris rišasi su MCP-1 ir būdas antikūno reakcijos su antigenu parodymui, jeigu yra. Geriau antikūnas yra monokloninis antikūnas. Viena įgyvendinime, antikūnas, kuris rišasi su MCP-1, yra žymėtas. Kitame įgyvendinime antikūnas yra nežymėtas pirmasis antikūnas ir būdas reakcijos pažymėjimui apima žymėtą antrąjį antikūną, kuris yra imunoglobulinas. Geriau antikūnas yra žymėtas žymeniu, parinktu iš grupės, susidedančios iš fluorochromo, fermento, radioizotopo ir nepralaidžios spindulinei energijai medžiagos.

Kitas išradimo įgyvendinimas apima farmacinę kompoziciją, apimančią efektyvų kiekį šio išradimo antikūno mišinyje su farmaciškai priimtiniu nešikliu arba tirpikliu. Dar kituose įgyvendinimuose anti-MCP-1 antikūnas arba jo fragmentas yra konjuguotas su terapiniu agentu. Terapinis agentas gali būti toksinas arba radioizotopas. Geriau, tokie

antikūnai gali būti naudojami gydymui ligų, tokių kaip, pavyzdžiui, auglių, apimančių be apribojimo, vėžį, tokį kaip krūties, kiaušidžių, skrandžio, endometriumo, seilių liaukų, plaučių, inkstų, gaubtinės žarnos, tiesiosios žarnos, skydliaukės, kepenų, prostatos ir šlapimo pūslės vėžį, o taip pat ir kitas uždegiminius procesus, įskaitant taip pat be apribojimų, reumatoidinį artritą, glomerulonefritą, aterosklerozę, psoriazę, organų transplantus, restenozę ir autoimunines ligas.

Dar vienas išradimo įgyvendinimas pateikia ligų gydymo būdą arba sąlygas, susijusias su MCP-1 ekspresija pacientuose, apimančią anti-MCP-1 antikūno efektyvaus kiekio paskyrimą pacientams. Būdas gali būti atliktas in vivo. Pacientas yra žinduolis pacientas, geriau žmogus pacientas. Rekomenduojamame įgyvendinime būdas susijęs su gydymu auglių, įskaitant be apribojimų, vėžį, tokį kaip krūties, kiaušidžių, skrandžio, endometriumo, seilių liaukų, plaučių, inkstų, gaubtinės žarnos, tiesiosios žarnos, skydliaukės, kepenų, prostatos ir šlapimo pūslės vėžį. Kitame įgyvendinime, būdas susijęs su gydymu uždegiminių būklių, įskaitant be apribojimų, reumatoidinį artritą, glomerulonefritą, aterosklerozę, psoriazę, organų transplantus, restenozę ir autoimunines ligas. Papildomi įgyvendinimai apima gydymo būdus ligų ir būklių, susijusių su MCP-1 ekspresija, kurie gali apimti identifikavimą žinduolio poreikio MCP-1 superekspresijos gydymui ir paskyrimą žinduoliui terapškai aktyvios anti-MCP-1 antikūno dozės.

Kitame įgyvendinime, išradimas numato gamybos būdą, apimančią talpą, susidedančią iš kompozicijos, turinčios anti-MCP-1 antikūną ir įterptą arba žymėtą paketą, reiškiančius, kad kompozicija gali būti naudojama neoplastinių ir uždegiminių ligų, charakterizuojamų MCP-1 superekspresija, gydymui. Geriau žinduolis, ir dar geriau žmogus priims anti-MCP-1 antikūną. Rekomenduojamame įgyvendinime, yra gydyti augliai, įskaitant be apribojimų vėžį, tokį kaip krūties, kiaušidžių, skrandžio, endometriumo, seilių liaukų, plaučių, inkstų, gaubtinės žarnos, tiesiosios žarnos, skydliaukės, kepenų, prostatos ir šlapimo pūslės vėžį, o taip pat ir kitus uždegiminius procesus, įskaitant taip pat be apribojimų, reumatoidinį artritą, glomerulonefritą, aterosklerozę, psoriazę, organų transplantus, restenozę ir autoimunines ligas, tokias kaip išsėtinė sklerozė.

Kai kuriuose įgyvendinimuose, anti-MCP-1 antikūnas yra įvedamas pasekoje klirinimo agento pašalinimo cirkuliuojančio antikūno iš kraujo.

Kai kuriuose įgyvendinimuose, anti-MCP-1 antikūnai gali būti modifikuoti, kad būtų sustiprintas komplemento fiksavimo sugebėjimas ir dalyvavimas nuo komplemento priklausančiame citotoksiškume (CDC). Įgyvendinime anti-MCP-1 antikūnas gali būti modifikuotas taip, kad pakeičiant aminorūgštis būtų pakeistas antikūno klirensas. Pavyzdžiui, kai kurie aminorūgščių pakeitimai gali paspartinti antikūno klirensą iš kūno.

Antraip, aminorūgščių pakeitimai gali lėtinti antikūno klirensą iš kūno. Kituose įgyvendinimuose, anti-MCP-1 antikūnas gali būti pakeistas taip, kad jis pašalinamas iš kūno mažiau sparčiai.

Dar kitas įgyvendinimas yra anti-MCP-1 antikūno naudojimas gamybai medikamento, skirto ligų, tokių kaip neoplastinės ligos ir uždegiminiai būviai, gydymui. Įgyvendinime neoplastinės ligos apima auglius ir vėžį, tokį kaip krūties, kiaušidžių, skrandžio, endometriumo, seilių liaukų, plaučių, inkstų, gaubtinės žarnos, tiesiosios žarnos, skydliaukės, kepenų, prostatos ir šlapimo pūslės vėžį. Alternatyviame įgyvendinime, uždegiminiai procesai apima, bet taip pat be apribojimų, reumatoidinį artritą, glomeronefritą, aterosklerozę, psoriazę, organų transplantuos, restenozę ir autoimunines ligas.

Trumpas figūrų aprašymas

1 figūra rodo THP-1 monocitų migracijos tyrimo į atsaką prieš MCP-1, MCP-2, MCP-3 ir MCP-4 rezultatus.

2 figūra rodo THP-1 ląstelių migracijos slopinimą 3.11.2 antikūnu nuo dozės priklausomu būdu, atsakant į MCP-2.

3 figūra rodo THP-1 ląstelių migracijos slopinimą 3.11.2 antikūnu nuo dozės priklausomu būdu, atsakant į MCP-3.

4 figūra rodo anti-MCP-1 1.7.3 antikūno poveikį į kasos auglio Panc-1 didėjimą.

5 figūra rodo kalcio srauto, chemotaksio ir giminingumo duomenų trimačio išsisklaidymo diagramą MCP-1 antikūnams.

6 figūra rodo kalcio srauto, chemotaksio ir giminingumo duomenų trimačio išsisklaidymo diagramos MCP-1 antikūnams kitą orientaciją.

7A figūra rodo anti-MCP-1 sekų palyginimą Cluster W programa, naudojant VH1-24, pažymint CDR, CDR2 ir CDR3 sritis, ir susijusią dendrogramą (7B figūra).

8A figūra rodo anti-MCP-1 sekų palyginimą Cluster W programa, naudojant VK-B3, pažymint CDR, CDR2 ir CDR3 sritis, ir susijusią dendrogramą (8B figūra).

9A figūra rodo anti-MCP-1 sekų palyginimą Cluster W programa, naudojant VK-08, pažymint CDR, CDR2 ir CDR3 sritis, ir susijusią dendrogramą (9B figūra).

10A figūra rodo anti-MCP-1 sekų palyginimą Cluster W programa, naudojant VH6-1, pažymint CDR, CDR2 ir CDR3 sritis, ir susijusią dendrogramą (10B figūra).

Detalus pageidautino įgyvendinimo aprašymas

Aprašyti išradimo įgyvendinimai susiję su monokloniniais antikūnais, kurie rišasi su MCP-1. Kai kuriuose įgyvendinimuose, antikūnai rišasi su MCP-1 ir paveikia MCP-1 funkciją. Kiti įgyvendinimai pateikia pilnai žmogaus anti-MCP-1 antikūnus ir anti-MCP-1 preparatus su norimomis savybėmis, žvelgiant į gydymo perspektyvą, įskaitant stiprų MCP-1 prisirišimo giminingumą, sugebėjimą neutralizuoti MCP-1 *in vitro* ir sugebėjimą inhibuoti vientiso auglio augimą ir neovaskuliarizaciją *in vivo*.

Atitinkamai, išradimo įgyvendinimai pateikia izoliuotus antikūnus, arba tokių antikūnų fragmentus, kurie rišasi su MCP-1. Kaip žinoma, antikūnai gali būti palankūs, t.y. monokloniniai, chimeriniai ir/arba žmogaus antikūnai. Išradimo įgyvendinimai taip pat pateikia ląsteles šių antikūnų gavimui.

Kai kuriuose įgyvendinimuose, čia aprašyti antikūnai turi gydomąjį naudingumą. Anti-MCP-1 antikūnas gali potencialiai blokuoti arba riboti apimtį auglio neovaskuliarizacijos ir auglio augimo. Daugelis vėžio ląstelių, įskaitant ląsteles iš glioblastomų ir inkstų vėžio, ekspresuoja MCP-1 ir CCR2 receptorius. Bendra ligando ir receptoriaus ekspresija toje pačioje auglio ląstelėje rodo, kad MCP-1 gali reguliuoti autokrinę augimo kilpą vėžio ląstelėse, kurios ekspresuoja abu komponentus. Huang ir kt. (Cancer Res. (2002) 62:2806-2812) neseniai paskelbė, kad MCP-1 gali tiesiogiai įtakoti auglio ląstelių, kurios ekspresuoja MCP-1 receptorių CCR2, augimą ir išgyvenimą. Taigi, dar prie jo efekto į angiogenezę, MCP-1 gali taip pat tiesiogiai reguliuoti auglio ląstelių augimą, migraciją ir invaziją.

Be to, išradimo įgyvendinimai pateikia naudojimui šiuos antikūnus ligų diagnozavimo ir gydymo naudojimui. Pavyzdžiui, išradimo įgyvendinimai pateikia būdus ir antikūnus MCP-1 ekspresijos inhibavimui, susijusius su augliais ir uždegiminėmis būklėmis. Geriau, antikūnai yra naudojami gydymui vėžio, tokio kaip krūtys, kiaušidžių, skrandžio, endometriumo, seilių liaukų, plaučių, inkstų, gaubtinės žarnos, tiesiosios žarnos, skydliaukės, kepenų, prostatos ir šlapimo pūslės vėžio, o taip pat ir kitų uždegiminių procesų, įskaitant taip pat be apribojimų, reumatoidinį artritą, glomerulonefritą, aterosklerozę, psoriazę, organų transplantus, restenozę ir autoimunines ligas. Kartu su tokio gydymo gamybos priemonės, apimančios išradime aprašytus antikūnus, pateikiamos. Be to, bandymo rinkinys, apimantis antikūnus, aprašytus išradime yra pateikiamas auglių arba uždegiminių būklių tikrinimui.

Be to, čia aprašytos nukleino rūgštys, ir jų fragmentai, ir variantai, gali būti naudojami, kaip neribojantys pavyzdžiai, (a) valdymui biosintezės atitinkamų užkoduotų baltymų, polipeptidų, fragmentų ir variantų, kaip rekombinantinių arba heterologinių genų produktų, (b) kaip pavyzdžiai nustatymui ir kvantifikavimui čia aprašytų nukleino rūgščių.

(c) kaip sekų matricos antiprasmių molekulių gavimui, ir panašiai. Toks panaudojimas pilniau aprašytas sekančiame atskleidime.

Dar, čia aprašyti baltymai ir polipeptidai, jų fragmentai ir variantai gali būti naudojami būduose, kurie apima (a) atstovavimą imunogeno, skatinančio anti-MCP-1 antikūno gamybą, (b) sugavimą antigeno imunologiniame bandinyje taip, kaip antikūnas, (c) kaip taikins atrinkimui medžiagos, kuri jungiasi su MCP-1 polipeptidu, aprašytu čia, (d) kaip taikins MCP-1 specifiniams antikūnams, taip kad elgesio su antikūnu poveikyje molekulinės ir/arba ląstelės funkcijos kinta pagal taikinį.

Stipraus efekto į ląstelių augimo moduliavimą požiūriu, MCP-1 polipeptido ekspresijos arba aktyvumo sumažėjimas gali būti naudojamas ląstelių išgyvenimo skatinimui. Priešingai, MCP-1 polipeptido ekspresijos sumažėjimas gali būti naudojamas ląstelių mirties paskatinimui.

Smulkiau įgyvendinimai, ypatybės ir kita, kas liečia šio išradimo antikūnus yra pateikiama papildomose detalėse žemiau.

Sunkiosios ir lengvosios grandinių kintamų sričių nukleotidų ir aminorūgščių sekos tipinio žmogaus anti-MCP-1 antikūno pateiktos sekų sąrašė, kurio turinys susumuotas 1 lentelėje žemiau.

1 lentelė

mAb ID Nr.	Seka	SEQ ID Nr.
1.1.1	Nukleotidų seka, koduojanti sunkiosios grandinės kintamą sritį	1
	Aminorūgščių seka, koduojanti sunkiosios grandinės kintamą sritį	2
	Nukleotidų seka, koduojanti lengvosios grandinės kintamą sritį	3
	Aminorūgščių seka, koduojanti lengvosios grandinės kintamą sritį	4
1.10.1	Nukleotidų seka, koduojanti sunkiosios grandinės kintamą sritį	5
	Aminorūgščių seka, koduojanti sunkiosios grandinės kintamą sritį	6
	Nukleotidų seka, koduojanti lengvosios grandinės kintamą sritį	7
	Aminorūgščių seka, koduojanti lengvosios grandinės kintamą sritį	8
1.12.1	Nukleotidų seka, koduojanti sunkiosios grandinės kintamą sritį	9
	Aminorūgščių seka, koduojanti sunkiosios grandinės kintamą sritį	10
	Nukleotidų seka, koduojanti lengvosios grandinės kintamą sritį	11
	Aminorūgščių seka, koduojanti lengvosios grandinės kintamą sritį	12
1.13.1	Nukleotidų seka, koduojanti sunkiosios grandinės kintamą sritį	13
	Aminorūgščių seka, koduojanti sunkiosios grandinės kintamą sritį	14
	Nukleotidų seka, koduojanti lengvosios grandinės kintamą sritį	15
	Aminorūgščių seka, koduojanti lengvosios grandinės kintamą sritį	16
1.18.1	Nukleotidų seka, koduojanti sunkiosios grandinės kintamą sritį	17
	Aminorūgščių seka, koduojanti sunkiosios grandinės kintamą sritį	18
	Nukleotidų seka, koduojanti lengvosios grandinės kintamą sritį	19
	Aminorūgščių seka, koduojanti lengvosios grandinės kintamą sritį	20
1.2.1	Nukleotidų seka, koduojanti sunkiosios grandinės kintamą sritį	21
	Aminorūgščių seka, koduojanti sunkiosios grandinės kintamą sritį	22
	Nukleotidų seka, koduojanti lengvosios grandinės kintamą sritį	23

[illegible]

[illegible]

3.14.1	Nukleotidų seka, koduojanti sunkiosios grandinės kintamą sritį	133
	Aminorūgščių seka, koduojanti sunkiosios grandinės kintamą sritį	134
	Nukleotidų seka, koduojanti lengvosios grandinės kintamą sritį	135
	Aminorūgščių seka, koduojanti lengvosios grandinės kintamą sritį	136
3.8	Nukleotidų seka, koduojanti sunkiosios grandinės kintamą sritį	137
	Aminorūgščių seka, koduojanti sunkiosios grandinės kintamą sritį	138
	Nukleotidų seka, koduojanti lengvosios grandinės kintamą sritį	139
	Aminorūgščių seka, koduojanti lengvosios grandinės kintamą sritį	140
4.8.1	Nukleotidų seka, koduojanti sunkiosios grandinės kintamą sritį	141
	Aminorūgščių seka, koduojanti sunkiosios grandinės kintamą sritį	142
	Nukleotidų seka, koduojanti lengvosios grandinės kintamą sritį	143
	Aminorūgščių seka, koduojanti lengvosios grandinės kintamą sritį	144
5.1	Nukleotidų seka, koduojanti sunkiosios grandinės kintamą sritį	145
	Aminorūgščių seka, koduojanti sunkiosios grandinės kintamą sritį	146
	Nukleotidų seka, koduojanti lengvosios grandinės kintamą sritį	147
	Aminorūgščių seka, koduojanti lengvosios grandinės kintamą sritį	148

Apibrėžimai

Jeigu kitaip neapibūdinta, moksliniai ir techniniai terminai, naudojami sąryšyje su čia aprašytu išradimu, turi tokias reikšmes, kokios įprastai suprantamos kaip tokios, kaip įprasta toje srityje. Be to, jeigu kitaip nereikalaujama pagal kontekstą, vienskaitos terminai turėtų apimti daugiskaitas ir daugiskaitos terminai turėtų apimti vienskaitą. Iš esmės, terminologija ir metodai naudojami ląstelių ir audinių kultūrų, molekulinės biologijos ir baltymų ir oligo- arba polinukleotidų chemijos ir hibridizacijos aprašyti čia yra gerai žinomi ir dažnai naudojami eksperimentuose. Standartinės technikos naudojamos rekombinantinei DNR, oligonukleotidų sintezei ir audinių kultūroms ir transformacijai (pvz.. elektroporacija, lipofekcija). Fermentinės reakcijos ir gryninimo metodai yra atliekami pagal gamintojų instrukcijas arba kaip bendrai eksperimentuose, arba kaip aprašyta čia. Aukščiau pateiktos metodikos ir procedūros dažniausiai atliekamos įprastiniais metodais, gerai žinomais toje srityje ir kaip aprašyta daugelyje pagrindinių ir labiau specifinių pranešimų, kurie yra cituojami ir aptariami šioje paraiškoje. Žiūr. pvz. Sambrook ir kt., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989). Analizinės chemijos, organinės chemijos sintezės, medicininės ir farmacinės chemijos naudojamos terminologijos bei laboratorinės procedūros ir metodikos aprašytos čia yra gerai žinomos ir dažnai naudojamos praktikoje. Cheminei sintezei, cheminei analizei, farmaciniams preparatams, kompozicijoms ir tiekimui, ir pacientų gydymui naudojamos standartinės metodikos.

Jeigu naudojama sutinkamai su įgyvendinimais, pateiktais čia, sekantys terminai, jeigu nenurodyta kitaip, turėtų būti suprantami, kaip turintys sekančias reikšmes:

Terminas „izoliuotas polinukleotidas“ jeigu naudojamas čia, turėtų reikšti, turėtų reikšti polinukleotidą genominės, cDNR, arba sintetinės kilmės, arba tam tikrą jų derinį, kuris dėka

jo kilmės „izoliuotas polinukleotidas“ (1) nėra susijęs su visais arba dalimi polinukleotidų, kuriuose „izoliuotas polinukleotidas“ yra rastas gamtoje, (2) yra funkciškai susijęs su polinukleotidu, kuris nesusijęs su gamtoje, arba (3) arba neturi pasitaikyti gamtoje kaip dalis didesnės sekos.

Termas „izoliuotas baltymas“ minimas čia reiškia cDNR, rekombinantinės RNR baltymą, arba sintetinės kilmės, arba jų derinį, kuris dėka jo kilmės, arba gavimo šaltinio, „izoliuotas baltymas“ (1) yra nesusijęs su baltymais, randamais gamtoje, (2) yra neturi kitų to paties šaltinio baltymų, t.y. neturi pelių baltymų, (3) yra ekspresuojamas skirtingų rūšių ląstelėse, arba (4) nepasitaiko gamtoje.

Terminas „polipeptidas“ naudojamas čia kaip bendras terminas, nurodyti gamtinį baltymą, fragmentą, arba polipeptidinės sekos analogą. Vadinasi, gamtinis baltymas, fragmentas ir analogas yra polipeptido genties rūšys. Pageidautini polipeptidai, sutinkamai su išradimu, apima žmogaus imunoglobulino molekulės sunkiąją grandinę ir žmogaus imunoglobulino molekulės kappa lengvąją grandinę, kaip ir susiformavę antikūno molekulės, apimančios imunoglobulino molekulės sunkiąją grandinę su imunoglobulino molekulės lengvąją grandinę, tokia kaip imunoglobulino molekulės kappa lengvoji grandinė, ir atvirkščiai, taip pat kaip ir jų fragmentus ir analogus.

Terminas „natūraliai pasitaikantis“ taip naudojamas čia, kaip pritaikytas objektui, remiantis tuo faktu, kad objektas gali būti randamas gamtoje. Pavyzdžiui, polipeptidų arba polinukleotidų sekos, esančios organizme (įskaitant virusus), kurie gali būti išskirti iš gamtinio šaltinio ir kurie gali būti apgalvotai modifikuoti laboratoriniu būdu arba kitaip, yra natūraliai pasitaikantys.

Terminas „funkciškai susijęs“ taip naudojamas čia nurodo komponentų padėtis taip aprašytas, kad jų sąryšis leidžia jiems funkcionuoti jų numatytu būdu. Kontrolinė seka „funkciškai susijusi“ su koduojančia seka liguojama tokiu būdu, kad koduojamos sekos ekspresija pasiekama suderintai su kontrolinėmis sekomis.

Terminas „kontrolinė seka“ taip naudojamas čia nurodo polipeptidų sekas, kurios yra reikalingos paveikti ekspresiją ir brendimą koduojančių sekų, su kuriomis jos yra suliguotos. Tokių kontrolinių sekų esmė skiriasi priklausomai nuo šeimininko organizmo; prokariotuose tokios kontrolinės sekos dažniausiai apima promotorių ir transkripcijos terminacijos seką. Terminas „kontrolinės sekos“ yra skirtas apimti, mažiausiai, visus komponentus, kurių buvimas yra būtinas ekspresijai ir brendimui ir taip pat gali apimti papildomus komponentus, kurių buvimas naudingas, pavyzdžiui, vedančioms sekoms ir susiliejančioms partnerių sekoms.

Terminas „polinukleotidas“, kaip nurodoma čia, reiškia mažiausiai 10 bazių ilgio nukleotido polimerinė forma, arba ribonukleotido, arba dezoksinukleotido, arba modifikuotos formos bet kurio tipo nukleotido. Terminas apima viengrandę ir dvigrandę DNR formas.

Terminas „oligonukleotidas“, kaip nurodoma čia, apima natūraliai pasitaikančius ir modifikuotus nukleotidus, prijungtus kartu prie natūraliai pasitaikančių, ir ne natūraliai pasitaikančių oligonukleotidų jungtis. Oligonukleotidai yra polinukleotidų poaibis dažniausiai apimantis 200 bazių ilgį arba mažesnę. Geriau oligonukleotidai yra nuo 10 iki 60 bazių ilgio ir geriausiai 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 arba 20-40 bazių ilgio. Oligonukleotidai dažnai yra viengrandžiai, t.y. zondams; nors oligonukleotidai gali būti dvigrandžiai, t.y. naudojami genų mutantų konstravimui. Išradimo nukleotidai taip pat gali būti prasminiai ir antiprasminiai.

Terminas „natūraliai pasitaikantys oligonukleotidai“, kaip nurodoma čia, apima dezoksiribonukleotidus ir ribonukleotidus. Terminas „modifikuoti nukleotidai“, kaip nurodoma čia, apima nukleotidus su modifikuotomis arba pakeistomis cukraus grupėmis ir panašius. Terminas „oligonukleotidų sujungimas“, nurodytas čia, apima nukleotidų jungtis, tokias kaip fosforo tioatas, fosforo ditioatas, fosforo selenoatas, fosforo diselenoatas, fosforo anilotioatas, fosforo aniladatas, fosforo amidatas, ir panašias. Žiūr. pvz LaPlance ir kt., Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stec ir kt., J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984); Stein ir kt., Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988); Zon ir kt., Anti-Cancer Drug Design 6:539 (1991); Zon ir kt., Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec ir kt., U.S. Patent No. 5,151,510; Uhlmann and Peyman Chemical Reviews 90:543 (1990). Oligonukleotidas gali turėti, jeigu reikalinga, žymę detekcijai.

Terminas „selektyviai hibridizuotis“, kaip nurodoma čia, reiškia aptinkamai ir specifiškai surišti. Polinukleotidai, oligonukleotidai ir jų fragmentai, sutinkamai su išradimu, pasirinktinai hibridizuojasi su nukleino rūgščių grandinėmis, esant hibridizacijos ir gryninimo sąlygoms, kurios minimizuoja apčiuopiamus kiekius nustatomų prisijungusių nespecifinių nukleino rūgščių. Gali būti naudojamos aukšto griežtumo sąlygos, siekiant selektyvios hibridizacijos sąlygų, kurios žinomos šiuolaikiniame eksperimentiniame lygyje, aptariamame čia. Apskritai, nukleino rūgščių sekų homologija tarp išradimo polinukleotidų, oligonukleotidų ir fragmentų ir dominančių nukleino rūgščių sekų turėtų būti mažiausiai 80 %, ir mažiau tipiškai su pageidaujamu homologijos didėjimu mažiausiai iki 85 %, 90 %, 95 %, 99 % ir 100 %. Dvi aminorūgščių sekos yra homologiškos, jeigu yra dalinis arba pilnas identiškas tarp jų sekų. Pavyzdžiui, 85 % homologija reiškia, kad 85 % aminorūgščių yra

identiškos, jeigu dvi sekos yra sulyginamos maksimaliai sutapatinant. Tarpai (kiekvienoje iš dviejų sekų, kurios buvo sutapatinamos) leistini maksimaliai sutapatinant: tarpų ilgiai 5 arba mažiau yra pageidautini su 2 arba mažiau yra labiau pageidautini. Antraip ir geriau, dvi baltymų sekos (arba polipeptidų sekos, gautos iš jų, mažiausiai 30 aminorūgščių ilgio) yra homologinės, kaip šis terminas vartojamas čia, jeigu jos turi sulyginimo apimtį 5 arba daugiau (standartiniais nuokrypio vienetais), naudojant programą ALIGN su mutacijos duomenų matrica ir tarpo paklaida 6 arba didesne. Žiūr. M.O. Dayhoff, Atlas of Protein Sequence and Structure, Vol. 5, 101-110 ir 2 papildymas t. 5, 1-10 (NATIONAL Biomedical Research Foundation 1972). Dvi sekos arba jų dalis yra daugiau tikėtina homologiškos, jeigu jų aminorūgštys yra daugiau, negu arba lygiai 50 % identiškos, jeigu optimaliai sulyginata naudojant ALIGN programą. Terminas „atitinka“, kaip naudojamas čia, reiškia, kad polipeptido seka yra homologinė (t.y. yra identiška, ne griežtai evoliuciškai susijusi) su visa arba dalimi minėtos polinukleotidų sekos, arba kad polipeptidų seka yra identiška minėtai polipeptidų sekai. Priešingai, terminas „komplementari“, kaip naudojamas čia, reiškia, kad komplementari seka yra homologinė visai arba daliai minėtos polinukleotidų sekos. Pavyzdžiui, nukleotidų seka „TATAC“ atitinka minėtai sekai „TATAC“ ir komplementari sekai „GTATA“.

Sekantys terminai, kurie yra naudojami aprašyti sekų sąryšį (giminingumą) tarp dviejų arba daugiau polinukleotidų arba aminorūgšties sekų: „kontrolinė seka“, „sulyginimo langas“, „sekos identiškumas“, „procentinis sekos identiškumas“ ir „esminis identiškumas“. Terminu „kontrolinė seka“ apibrėžiama seka, naudojama kaip pagrindas sekų palyginimui; nurodytoji seka gali būti didesnės sekos subpopuliacija, pavyzdžiui, kaip segmentas pilno ilgio cDNR arba geno sekos, duotos sekų sąrašė, arba gali apimti visą cDNR arba geno seką. Paprastai, kontrolinė seka yra mažiausiai 18 nukleotidų arba 6 aminorūgščių ilgio, dažnai 24 nukleotidų arba 8 aminorūgščių ilgio. Kadangi dvi polinukleotidų arba aminorūgščių sekos gali kiekviena (1) apimti seką (t.y. dalį pilnos polinukleotidų arba aminorūgščių sekos), kuri yra panaši tarp dviejų molekulių, ir (2) gali toliau apimti seką, kuri yra skirtinga tarp dviejų polinukleotidų ir aminorūgščių sekų, sekų palyginimas tarp dviejų (arba daugiau) molekulių yra tipiškai atliekamas palyginant dviejų molekulių sekas per „sulyginimo langą“, kad būtų nustatomos ir palyginamos sekų panašumo lokalinės sritys. Terminas „sulyginimo langas“, kaip naudojama čia, nurodo į conceptualų segmentą mažiausiai 18 gretimų nukleotidų padėčių arba 6 aminorūgščių, kuriose polinukleotidų seka arba aminorūgščių seka gali būti palyginama su mažiausiai 18 gretimų nukleotidų arba 6 aminorūgščių kontroline seka ir kurioje dalis polinukleotidų sekos sulyginimo lange gali apimti papildymus, delecijas, pakeitimus ir panašiai (t.y. trūkius) 20 % arba mažiau, palyginus su kontroline seka (kuri negali turėti

papildymų ir delecijų), norint optimaliai palyginti dvi sekas. Optimalus sekų sugretinimas, sugretinant sulyginimo langą gali būti atliekamas naudojant lokalinės homologijos algoritmą Smith ir Wterman, Adv. APPL. Math. 2:482 (1981), naudojant homologijos sugretinimo algoritmą Needleman ir Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), pagal atrankos pagal panašumą metodą Pearson ir Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85:2444 (1988), pagal kompiuterinį šių algoritmų įgyvendinimą (GAP, BESTFIT, FASTA ir TFASTA Wisconsinos genetikos programinės įrangos paketo versija 7.0, (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.) Geneworks, arba MacVector programinės įrangos paketai), arba tikrinant ir parenkant sukurtus įvairiais metodais geriausius sugretinimus (t.y. gaunant aukščiausią homologijos procentą iš sulyginimo lango).

Terminas „sekos identiškumas“ reiškia, kad dvi polinukleotidų arba aminorūgščių sekos yra identiškos (t.y. nukleotidas prie nukleotido arba grupė prie grupės pagrindu) pagal sulyginimo langą. Terminas „sekos identiškumo procentas“ yra išskaičiuotas palyginant dvi optimaliai sugretintas sekas pagal sulyginimo langą, nustatant padėčių skaičių, kuriose pasitaiko identiškos nukleino rūgščių bazės (t.y. A, T, C, G, U arba I) arba grupės abiejose sekose, duodančio skaičių suporintų padėčių, dalinant suporintų padėčių skaičių iš bendro padėčių skaičiaus sulyginimo lange (t.y. lango dydžio), ir dalinant rezultata iš 100, kad gautume sekos identiškumo procentą. Terminas „esminis identiškumas“ kaip naudojamas čia reiškia polinukleotidų arba aminorūgščių sekos charakteristiką, kur polinukleotidų arba aminorūgščių seka apima seką, kuri turi mažiausiai 85 procentus sekos identiškumą, geriau mažiausiai 90-95 procentus sekos identiškumą, dažniau mažiausiai 99 procentus sekos identiškumą, palyginus su kontroline seka virš sulyginimo lango mažiausiai 18 nukleotidų (6 aminorūgštys) padėčių, dažnai virš lango mažiausiai 24-48 nukleotidai (8-16 aminorūgščių) padėčių, kuriose sekų procentingumo identiškumas apskaičiuojamas palyginant kontrolinę seką su seka, kuri gali turėti delecijas arba pridėjimus, kurie gali būti sumoje 20 % arba mažiau virš kontrolinės sekos sulyginimo lango. Kontrolinė seka gali būti didelės sekos subpopuliacija.

Kaip naudojama čia, dvidešimt tradicinių aminorūgščių ir jų sutrumpinimų yra įprastai vartojami. Žiūr. Immunology-A Synthesis (2nd ed., Goub E.S. and Gren D.R. eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. 1991). Dvidešimties tradicinių aminorūgščių stereoizomerai (t.y. D-aminorūgštys), dirbtinės aminorūgštys tokios kaip α -, α -dipakeistos aminorūgštys, N-alkilaminorūgštys, pieno rūgštis ir kitos netradicinės aminorūgštys taip pat gali būti išradime aprašytų polipeptidų tinkami komponentai. Netradicinių aminorūgščių pavyzdžiai apima : 4-hidroksiproliną, γ -karboksiglutamata, ϵ -N,N,N-trimetilsilaną, ϵ -N-acetilsilaną, O-fosfoseriną, N-acetilseriną, N-formilmetioniną, 3-metilhistidiną, σ -N-metilargininą ir kitas panašias

aminorūgštis ir imino rūgštis (t.y. hidroksiproliną). Polipeptidų žymėjime, naudojamame čia, kairinė kryptis yra amino-galinė kryptis ir dešininė kryptis yra karboksi-galinė kryptis, sutinkamai su standartiniu naudojimu ir įsigalėjusia tvarka.

Panašiai, išskyrus apibrėžtus kitaip, kairinis viengrandės polinukleotido sekos galas yra 5' galas ; kairinė dvigrandės polinukleotido sekos kryptis yra vadinama 5' kryptimi. Kryptimi nuo 5' į 3' atsirandančio RNR transkripto papildymas yra vadinamas transkripcijos kryptimi; sekos sritys DNR grandinėje, turinčios tą pačią seką kaip RNR ir kurios yra 5' į 5' RNR transkripto galą yra vadinamos „upstream sekomis“; DNR grandinės sekų sritys, turinčios tą pačią seką, kaip RNR, ir kurios yra 3' į 3' RNR transkripto galą yra vadinamos „downstream sekomis“.

Kaip taikoma polipeptidams, terminas „esminis identiškumas“ reiškia, kad dvi peptidų sekos, jeigu optimaliai išlygintos, kaip antai programomis GAP arba BESTFIT, naudojant numatytas trūkių mases, patiria mažiausiai 80 procentų sekos identiškumą, geriau bent jau 90 procentų sekos identiškumą, dar geriau bent jau 95 procentus sekos identiškumą, ir geriausiai bent 99 procentus sekos identiškumą. Geriau, grupių padėtys, kurios yra ne identiškos, skiriasi konservatyvių aminorūgščių pakeitimais. Konservatyvių aminorūgščių pakeitimai rodo į sukeistinimą grupių, turinčių tokias pat šonines grandines. Pavyzdžiui, grupė aminorūgščių, turinti alifatines-hidroksilines šonines grandines yra glicinas, alaninas, valinas, leucinas ir izoleucinas; grupė aminorūgščių, turinti amidą turinčias šonines grandines yra asparaginas ir glutaminas; grupė aminorūgščių, turinti aromatinės šonines grandines yra fenilalaninas, tirozinas ir triptofanas; grupė aminorūgščių, turinti sierą turinčias šonines grandines yra cisteinas ir metioninas. Tinkamesnės konservatyvios aminorūgščių pakaitų grupės yra: valinas-leucinas-izoleucinas, fenilalaninas-tirozinas, lizinas-argininas, alaninas-valinas, glutamino rūgštis-asparagino rūgštis ir asparaginas-glutaminas.

Kaip aptariama čia, mažos variacijos antikūnų arba imunoglobulinų aminorūgščių sekose yra manoma yra apimtos čia aprašyto išradimo, numatant, kad variacijos aminorūgščių sekoje apima mažiausiai 75 %, dar geriau mažiausiai 80 %, 90 %, 95 % ir geriausiai 99 %. Ypatingai, turima galvoje konservatyvių aminorūgščių pakeitimai. Konservatyvūs pakeitimai yra tokie, kurie vyksta aminorūgščių, susijusių šoninėmis grandinėmis, šeimoje. Genetiškai užkoduotos aminorūgštys yra paprastai dalinamos į šeimas: (1) rūgštinės=aspartatai, glutamatai; (2) bazinės=lizinas, argininas, histidinas; (3) nepolinės-alaninas, valinas, leucinas, izoleucinas, prolinas, fenilalaninas, metioninas, triptofanas; ir (4) nepakeičiamos polinės=glicinas, asparaginas, glutaminas, cisteinas, serinas, treoninas, tirozinas. Labiau rekomenduojamos šeimos yra: serinas ir treoninas yra alifatinė-hidroksi šeima; asparaginas ir glutaminas yra amidą turinti šeima; alaninas, valinas, leucinas ir

izoleucinas yra alifatinė šeima; fenilalaninas, tirozinas ir triptofanas yra aromatinė šeima. Pavyzdžiui, yra pagrįsta tikėtis, kad izoliuotas pakeitimas leucino isoleucinu arba valinu, asparagino rūgšties glutamino rūgštimi arba treonino serinu, arba panašaus pakeitimo amino rūgšties panašia pagal struktūrą aminorūgštimi neturėtų turėti didesnio efekto gaunamos molekulės susirišimui arba savybėms, ypač, jeigu pakeitimas neliečia aminorūgšties struktūrinėje srityje. Ar aminorūgšties pakeitimas turi įtakos funkciniam peptidui, galima lengvai nustatyti, ištiriant polipeptido darinio specifinį aktyvumą. Bandymai smulkiai aprašyti čia. Antikūno fragmentai arba analogai arba imunoglobulino molekulės gali būti lengvai paruošti pagal šiuolaikinę technikos lygį. Pageidautini fragmentų arba analogų amino ir karboksi galai yra arti funkcinio domenų ribos. Struktūriniai ir funkciniai domenai gali būti identifikuoti palyginant nukleotidų ir/arba aminorūgščių sekų duomenis su viešomis arba patentuotomis sekų duomenų bazėmis. Geriausiai, naudojami kompiuterizuoti palyginimo metodai identifikavimui sekų motyvų arba numatytų baltymų konformacinių domenų, kurie pasitaiko kituose baltymuose su žinoma struktūra ir/arba funkcija. Yra žinomi identifikavimo būdai baltymų sekų, kurios susidėsto į žinomą trimatę struktūrą. Bowie ir kt., *Science* 253:164 (1991). Taigi, anksčiau minėti pavyzdžiai demonstruoja, kad specialistas gali atpažinti sekų motyvus ir struktūrines konformacijas, kurios gali būti naudojamos apibrėžti struktūriniams ir funkciniais domenams pagal šį išradimą.

Pageidautini aminorūgščių pakeitimai yra tokie, kurie: (1) sumažina jautrumą proteolizei, (2) sumažina polinkį oksidacijai, (3) keičia prisirišimo giminingumą formuojant baltymų kompleksus, (4) keičia prisirišimo giminingumą ir (4) suteikia arba modifikuoja tokių analogų kitas fizikochemines arba funkcines savybes. Analogai gali apimti įvairius sekų, išskyrus gamtoje pasitaikančių peptidų sekų, mutantus. Pavyzdžiui, vienetiniai arba daugiopi aminorūgščių pakeitimai (geriau konservatyvių amino rūgščių pakeitimai) gali būti atlikti natūraliai pasitaikančiose sekose (geriau išorinėje domeno(u) polipeptido dalyje, formuojančioje tarpmolekulinius ryšius). Konservatyvių aminorūgščių pakeitimas gali neesminiai pakeisti motininės sekos charakteristikas (pvz., aminorūgščių pakeitimas neturi polinkio pertraukti spiralės, kuri pasitaiko motininėje sekoje, arba suardyti kitus antrinės struktūros tipus, kurie charakterizuoja motininę seką). Polipeptidų antrinės ir tretinės struktūros atpažinimo būdo pavyzdžiai yra aprašyti: *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton ed., W.H. Freeman and Company, New York 1984); *Introduction to Protein Structure* (Branden C. and Tooze J. eds., Garland Publishing, New York, N.Y. 1991); ir Thornton ir kt., *Nature* 354:105 (1991).

Terminas "polipeptido fragmentas", kaip naudojamas čia, nurodo polipeptidą, kuris turi amino-galinę ir/arba karboksi-galinę delecijas, bet likusi aminorūgščių seka, manoma, yra

identiška atitinkamoms padėtims natūraliai pasitaikančioje sekoje, pavyzdžiui, iš pilno ilgio cDNR sekos. Fragmentai tipiškai yra mažiausiai 5, 6, 8 arba 10 aminorūgščių ilgio, geriau mažiausiai 14 aminorūgščių ilgio, žymiai geriau 20 aminorūgščių ilgio, paprastai mažiausiai 50 aminorūgščių ilgio, ir netgi geriausiai bent jau 70 aminorūgščių ilgio. Terminas „analogas“, kaip naudojamas čia, nurodo polipeptidus, kurie yra apimti mažiausiai 25 aminorūgščių, turinčių esminį identišumą daliai nustatytos aminorūgščių sekos, fragmento ir kuris turi mažiausiai vieną iš sekančių savybių: (1) specifiskai rišasi su MCP-1, esant atitinkamoms prisirišimo sąlygoms, (2) sugebėjimą blokuoti tam tikrą MCP-1 prisirišimą, arba (3) sugebėjimą inhibuoti MCP-1 ekspresuojančių ląstelių augimą *in vitro* arba *in vivo*. Tipiškai polipeptidų analogai apima konservatyvių aminorūgščių pakeitimą (arba pridėjimą, arba deleciją) dėl natūraliai pasitaikančių sekų. Analogai tipiškai yra mažiausiai aminorūgščių ilgio, geriau mažiausiai 50 aminorūgščių ilgio arba ilgesni, ir dažnai gali būti tokio ilgio, kaip pilno ilgio natūraliai pasitaikantys polipeptidai.

Peptidų analogai dažnai naudojami farmacinėje pramonėje, kaip nepeptidiniai vaistai su savybėmis analogiškomis šabloniniam peptidui. Šie tipai nepeptidinių junginių yra vadinami „peptidų mimetikais“ arba „peptidomimetikais“. Fauchere J. Adv. Drug Res. 15:29 (1986); Veber ir Freidinger, TINS p. 392 (1985); ir Evans ir kt., J. Med. Chem. 30:1229 (1987). Tokie junginiai dažnai gaunami kompiuterinio molekulių modeliavimo pagalba. Peptidų mimetikais, kurie yra struktūriškai panašūs į terapijoje naudojamus peptidus, gali būti naudojami ekvivalentiško terapinio arba profilaktinio efekto gavimui. Apskritai, peptidomimetikais struktūriškai yra panašūs į pavyzdžio polipeptidus (t.y. polipeptidai, kurie turi biochemines savybes arba farmakologinį aktyvumą), tokie, kaip žmogaus antikūnai, bet turi vieną arba daugiau peptidinių jungčių, pasirinktinai pakeistų jungtimis, parinktomis iš grupės, susidedančiomis iš: $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$ (cis ir trans), $-\text{COCH}_2-$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ ir $-\text{CH}_2\text{SO}-$, taikant įprastinius metodus. Vienos arba daugiau rūgščių sisteminiai pakeitimai pastovioje sekoje to paties tipo D-aminorūgštimi (t.y. D-lizinas vietoje L-lizino) gali būti naudojami siekiant sukurti stabilesnius peptidus. Be to, sukonstruoti peptidai, apimantys pastovias sritis, arba iš esmės identiškas pastoviųjų sričių variacijas, gali būti gauti gerai žinomais metodais (Rizo ir Gierasch ann. Rev. Biochem. 61:387(1992)); pavyzdžiui, pridėdant vidines cisteino liekanas, galinčias formuoti vidinius molekules disulfidinius tiltelius, kurie ciklizuoja peptidą.

„Antikūnas“ arba „antikūno peptidas(ai)“ nurodo į sveiką antikūną arba jo surišančią fragmentą, kuris konkuruoja su sveiku antikūnu dėl specifinio surišimo. Surišantys fragmentai gaunami rekombinantine DNR technika bei fermentiniu arba cheminiu sveiko antikūno skaldymu. Surišantys fragmentai apima Fab, Fab', F(ab')_2 , Fv ir viengrandžius

antikūnus. Antikūnas, išskyrus „bispecifinį“ arba „bifunkcinį“ antikūną suprantamas turintis kiekvieną jį surišančių vietų identišką. Antikūnas iš esmės inhibuoja receptoriaus adheziją su priešingu receptoriumi, jeigu antikūno perteklius sumažina kiekį receptoriaus pririšto prie priešingo receptoriaus mažiausiai 20 %, 40 %, 60 % arba 80 % ir daugiau dažnai daugiau kaip 85 % (jeigu matuojama *in vitro* konkurencinio prisirišimo būdu).

Terminas „epitopas“ apima bet kurį baltymo determinantą, sugebantį specifiskai prisirišti prie imunoglobulino arba T ląstelės receptoriaus. Epitopinis determinantas įprastai susideda iš chemiškai aktyvių paviršiaus molekulių grupuočių, tokių kaip aminorūgščių arba cukraus šoninės grandinės ir paprastai turi specifines trimates struktūrines charakteristikas, taip pat specifines krūvio charakteristikas. Antikūnas, kaip minėta yra specifiskai surištas su antigenu, jeigu disociacijos konstanta yra $\leq 1 \mu\text{M}$, geriau $\leq 100\text{nM}$ ir geriausiai $\leq 10\text{nM}$.

Terminas „agentas“ naudojamas čia reiškia cheminį junginį, cheminių junginių mišinį, arba biologinę molekulę, arba ekstraktą, pagamintą iš biologinės medžiagos.

„Aktyvus“ arba „aktyvumas“ šio darbo tikslams nurodo MCP-1 polipeptido formą(as), kuri išlaiko biologinį ir/arba imunologinį aktyvumą gamtinio arba natūraliai pasitaikančio MCP-1 polipeptido, kurio „biologinis“ aktyvumas nurodo biologinę funkciją (arba inhibitorinę arba stimulatorinę), sukeltą gamtinio arba natūraliai pasitaikančio MCP-1 polipeptido, išskyrus sugebėjimą indukuoti gamybą antikūno prieš antigeninį epitopą, turintį gamtinį ar natūraliai pasitaikantį MCP-1 polipeptidą, ir „imunologinis“ aktyvumas nurodo sugebėjimą indukuoti gamybą antikūno prieš antigeninį epitopą, turintį gamtinį ar natūraliai pasitaikantį MCP-1 polipeptidą.

„Gydymas“ nurodo ir terapinį gydymą ir profilaktines arba prevencines priemones, kurių tikslas yra sukliudyti arba sulėtinti (sumažinti) suplanuotas patologines sąlygas arba sutrikimus. Tokiu būdu reikalingumas gydyti apima kartu jau sutrikimą ir taip pat polinkį turėti sutrikimą arba tai, kad sutrikimui bus sutrukdyta.

„Žinduolis“ nurodo į bet kokią gyvūną klasifikuojamą kaip žinduolis, įskaitant žmogų, kitus primatus, tokius kaip beždžionės, šimpanzės ir gorilos, naminius ir ūkiniais tikslais auginamus gyvūnus, ir zoologijos soduose auginamus, sportinius, laboratorinius arba kambarinius gyvūnus, tokius kaip šunys, katės, galvijai, arkliai, avys, kiaulės, ožkos, triušiai, graužikai ir kt. Gydymo tikslais žinduoliai yra geriau žmonės.

„Nešiklis“, kaip naudojamas čia, apima farmaciškai priimtina nešiklį, užpildą arba stabilizatorių, kuris yra netoksiškas ląstelei arba žinduoliui, veikiant tam tikromis naudojimo dozėmis ir koncentracijomis. Dažnai fiziologiškai priimtinas nešiklis yra vandeninis pH buferizuotas tirpalas. Fiziologiškai priimtino nešiklio pavyzdžiai apima tokius buferius, kaip fosfatus, citratus ir kt. organinių rūgščių; antioksidantus, įskaitant askorbino rūgštį; žemos

molekulinės masės (mažiau kaip 10 liekanų) polipeptidus; baltymus, tokius kaip serumo albuminas, želatina arba imunoglobulinai; hidrofilinius polimerus, tokius kaip polivinilpirolidonas; aminorūgštis, tokias kaip glicinas, glutaminas, asparaginas, argininas arba lizinas; monosacharidus, disacharidus ir kitus karbohidratus, įskaitant gliukozę, manozę arba dekstrinus; chelatinčius agentus, tokius kaip EDTA; sugar alcohols, tokius kaip manitolis arba sorbitolis; druskas formuojančius priešjonus (counterions), tokius kaip natrij; ir/arba nejonines paviršinio aktyvumo medžiagas, tokias kaip TWEENTM, polietilenglikolis (PEG) ir PLURONICSTM.

Antikūnų papaino skaidymas gamina du identiškus antigeno surišimo fragmentus, vadinamus „Fab“ fragmentais, kiekvienas su viena antigeną rišančia vieta ir likusiu „Fc“ fragmentu, skirtu atspindėti sugebėjimą lengvai kristalizuotis. Pepsino veikimas išskiria „F(ab')₂“ fragmentą, kuris turi du antigeną jungiančias vietas ir net sugebančias kryžmiškai surišti antigeną.

„Fv“ yra mažiausias antikūno fragmentas, kuris turi antigeno atpažinimo ir antikūno prisirišimo vietą. Ši sritis susideda iš vieno sunkiosios ir vieno lengvosios grandinės kintamojo domeno dimero, susietų glaudžiai, nekovalentiškai. Tai yra šioje konfigūracijoje, kad kad kiekvieno kintamojo domero trys CDR sąveikauja, apibrėžiant ant VH-VL dimero paviršiaus antigeno prisirišimo vietą. Bendrai šešios CDR suteikia antigeno rišimosi su antikūnu specifiškumą. Tačiau, pavyzdžiui, tik vienas kintamas domenas (t.y. Fv dimero VH arba VL dalis arba pusė Fv apimanti tik tris CDR specifines prieš antigeną) gali turėti sugebėjimą atpažinti ir prisirišti antigeną, netgi galimai su mažesniu giminingumu, negu visa prisirišimo vieta.

Fab fragmentas taip pat turi pastovų lengvosios grandinės domeną ir pirmą pastovų sunkiosios grandinės (CH1) domeną. Fab fragmentas skiriasi nuo Fab' fragmento keleto liekanų sunkiosios grandinės CH1 domeno karboksi gale pridėjimu, įskaitant vieną arba daugiau cisteinų iš antikūno ašinės (hinge) srities. „F(ab')₂“ antikūno fragmentas iš pradžių buvo pateiktas kaip Fab' fragmentų pora, kuri tarp savęs turi ašinius cisteinus. Taip pat žinomi ir kiti cheminiai antikūnų fragmentų susijungimai.

„Kieta fazė“ reiškia ne vandeninę matricą, prie kurios gali tvirtai laikytis čia aprašyti antikūnai. Kietos fazės pavyzdžiai apimti čia įskaito dalinai arba pilnai įgavusį formą stiklą (t.y. kontroliuojamas porėtas stiklas), polisacharidus (t.y. agarozę), poliakrilamidus, polistireną, polivinilo alkoholį ir silikoną. Kai kuriuose įgyvendinimuose, priklausomai nuo konteksto, kieta fazė gali apimti bandymo plokštelės šulinėlį, kituose tai yra valymo kolonėlė (t.y. afininės (giminingumo) chromatografijos kolonėlė). Šis terminas taip pat apima atskirų dalelių netolydžią kietą fazę, kaip tai aprašyta JAV patente Nr. 4,275,149.

Terminas „liposoma“ naudojamas čia pažymėti mažai vezikulei, susidedančiai iš įvairių tipų lipidų, fosfolipidų ir/arba paviršinių aktyvių medžiagų, kurios naudojamos gauti vaistams (tokiems, kaip MCP-1 polipeptidas ar antikūnas prie to) žinduoliams. Liposomų komponentai dažnai išsidėstę dvisluoksne struktūra, panašiai į lipidų išsidėstymą biologinėse membranose.

Terminas „maža molekulė“ čia naudojamas aprašyti molekulei su molekuline mase mažesne maždaug 500 daltonų.

Kaip naudojami čia, terminai „žymėti“ arba „žymėtas“ nurodo prijungimą susekamo žymens, t.y. prijungimą radioaktyvios aminorūgšties arba prijungimą biotinilintos grupės prie polipeptido, kuris gali būti nustatytas avidino žyme (pvz. streptavidiną turinti fluorescuojanti žymė arba fermentinis aktyvumas, kuris gali būti nustatytas optiniu arba kalorimetriniu metodais). Tam tikrose situacijose žymė gali būti gydomoji. Yra žinomi ir gali būti naudojami įvairūs polipeptidų ir glikoproteinų žymėjimo metodai. Polipeptidų žymėjimo pavyzdžiai apima, bet neapsiriboja, sekančius: radioizotopai arba radionuklidai (pvz. ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), fluorescentinės žymės (pvz. FITC, rodaminas, fosforo lantanoidas), fermentinės žymės (pvz. krienų peroksidazė, β -galaktozidazė, liuciferazė, šarminė fosfatazė), chemoluminescuojančios, biotinilintos grupės, iš anksto numatyti polipeptidų epitopai atpažįstami pagal antrinius reporterius (pvz. leucino užtrauktukų porų sekos, antrinių antikūnų prisirišimo vietos, metalų prisirišimo domenai, epitopų kilpeles). Kai kuriuose įgyvendinimuose, žymės įra prijungtos per įvairaus ilgio tarpines grupes, kad būtų sumažinti galimi erdviniai trukdymai.

Terminas „farmacinis agentas arba vaistas“, kaip naudojamas čia, nurodo į cheminį junginį arba kompoziciją, sugenančią sukelti norimą gydomąjį efektą, jeigu teisingai paskirtas pacientui. Kiti cheminiai terminai čia naudojami pagal konvencinį naudojimą moksle, kaip patvirtinta pagal The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (Parker S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)).

Kaip naudojama čia, „iš esmės grynas“ reiškia, kad daikto rūšis yra dominuojanti rūšis (t.y. moliniu pagrindu yra gausiausia, negu bet kurios kitos individualios rūšys, esančios kompozicijoje), ir geriau iš esmės išgryninta frakcija yra kompozicija, kurioje objekto rūšis apima mažiausiai 50 procentų (moliniu pagrindu) visų esančių makromolekulių rūšių. Apskritai, iš esmės gryna kompozicija turi apimti daugiau kaip 80 procentų visų kompozicijoje esančių makromolekulių rūšių, geriau daugiau kaip 85 %, 90 %, 95 % ir 99 %. Geriausiai, objekto rūšis yra išvalyta iki esminio homogeniškumo (teršalo rūšis kompozicijoje neturi būti nustatoma įprastiniais nustatymo metodais), kur kompozicija susideda iš esmės iš vienos rūšies makromolekulių.

Terminas „pacientas“ apima žmogų ir veterinarinius subjektus.

Antikūno struktūra

Pagrindinis antikūno struktūrinis vienetas žinoma apima tetramerą. Kiekvienas tetrameras susideda iš dviejų identiškų polipeptidinių grandinių porų, kiekviena pora turi vieną „lengvąją“ (apie 25 kDa) ir vieną „sunkiąją“ grandinę (apie 50-70 kDa). Kiekvienos grandinės amino galinė dalis turi kintamąją sritį apie 100-110 arba daugiau aminorūgščių, pirmiausiai atsakingų už antigeno atpažinimą. Karboksi-galinė kiekvienos grandinės dalis charakterizuoja pastoviąją sritį, pirmiausiai atsakingą už efektorinę funkciją. Žmogaus lengvosios grandinės yra klasifikuojamos kaip kappa ir lambda lengvosios grandinės. Sunkiosios grandinės yra klasifikuojamos kaip mu, delta, gamma, alfa arba elipson ir apibrėžia antikūno tipą kaip IgM, IgD, IgG, IgA ir IgE, atitinkamai. Lengvosios ir sunkiosios grandinių viduje, kintamoji ir pastovioji sritys yra sujungtos maždaug 12 aminorūgščių „J“ sritimi su sunkiąja grandine taip pat turinčia maždaug virš 10 aminorūgščių „D“ sritį. Žr.: Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Kiekvienos lengvosios/sunkiosios grandinės poros kintamosios sritys sudaro antikūno prisirišimo vietą. Taigi, sveikas antikūnas turi dvi prisirišimo vietas. Išskyrus dvifunkcinius arba dvispecifinius antikūnus, prisirišimo vietos yra tos pačios.

Visos grandinės turi tą pačią santykinai konservatyvios struktūrinės srities (FR) pagrindinę struktūrą, sujungtą su trimis hiper kintamomis sritimis, taip pat vadinamomis komplementarumą apsprendžiančiomis sritimis arba CDR. Kiekvienos poros dviejų grandinių CDR yra išdėstytos pagal struktūrines sritis, suteikiančias galimybę susirišti su specifiniu epitopu. Nuo N-galo į C-galą, abi sunkioji ir lengvoji grandinės apima domenų FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 ir FR4. Aminorūgštis priskiriama kiekvienam domenui pagal Kabat apibrėžimą: Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. 1991) (1987), arba Chothia ir Lesk, J.Mol.Biol. 196:901-17 (1987); Chothia ir kt., Nature 342:878-83 (1989).

Dvispecifinis arba dvifunkcinis antikūnas yra antikūno dirbtinis hibridas, turintis dvi skirtingas sunkiosios/lengvosios grandinių poras ir dvi skirtingas prisirišimo vietas. Bispecifiniai antikūnai gali būti gaunami įvairiais metodais, įskaitant hibridomų suliejimą arba Fab' fragmentų sukabinimą. Žr. Songsivilai ir Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79: 315-21 (1990); Kostelny ir kt., J. Immunol. 148:1547-53 (1992). Dvispecifinių antikūnų gamyba galėtų būti santykinai intensyves laboratorinis būdas, palyginus su įprastinių antikūnų gamyba, ir išeiga, ir švarumo laipsnis yra dažniausiai žemesnis dvispecifiniams antikūnams. Dvispecifiniai antikūnai negali egzistuoti fragmentų, turinčių vieną prisirišimo vietą formoje (t.y. Fab, Fab' ir Fv).

Žmogaus antikūnai ir antikūnų humanizavimas

Žmogaus antikūnai išvengia tam tikrų problemų, susijusių antikūnais, kurias turi pelių arba žiurkių kintamos ir/arba pastovios sritys. Buvimas tokių iš pelių arba žiurkių kilusių baltymų gali nuvesti prie greito antikūnų klirensio arba gali nuvesti prie paciento imuninio atsako prieš antikūną sukūrimą. Siekiant išvengti iš pelių ir žiurkių išvestų antikūnų utilizavimo, pilnai žmogaus antikūnai gali būti generuojami įvedant žmogaus antikūnų funkciją į graužikų, taip kad graužikai produkuotų pilnai žmogaus antikūnus.

Žmogaus antikūnai

Visiškai žmogaus antikūnų gaminimo būdas yra naudojant pelių XenoMouse® kamieną, kuris buvo sukonstruotas taip, kad turi savo genome žmogaus sunkiosios ir lengvosios grandinių genus. Pavyzdžiui, XenoMouse® pelės turinčios 245 kb ir 190 kb žmogaus sunkiosios grandinės lokuso ir kappa lengvosios grandinės lokuso gemalo konfigūracijos fragmentus, aprašytos Green ir kt., Nature Genetics 7:13-21 (1994). Green ir kt. darbas buvo pratęstas įvedant didesnę negu vidutiniškai 80 % žmogaus antikūno rinkinį, utilizuojant megabazės dydžio žmogaus sunkiosios grandinės lokuso ir kappa lengvosios grandinės lokuso gemalo konfigūracijos YAC fragmentus atitinkamai. Žr. Mendez ir kt., Nature genetics 15:146-56 (1997) ir JAV patento paraiška serijos Nr. 08/759,620, paduota 1996 gruodžio 3d. Be to, buvo sukurtos XenoMouse® pelės, kurios turi ištisą lambda lengvosios grandinės lokusą (JAV patento paraiška, serijos Nr. 60/334,508 paduota 2001 lapkričio 30d.). Ir, buvo sukurtos XenoMouse® pelės, gaminančios daugybinius izotipus (žr. WO 00/76310). XenoMouse® pelės yra prieinamos iš Abgenix, Inc. (Fremont, JAV).

XenoMouse® pelių gamyba toliau aptariama ir apibūdinama JAV patentų paraiškose, kurių Nr. 07/466,008 paduota 1990 sausio 12d., 07/610,515, paduota 1990 lapkričio 8, 07/919,297 paduota 1992 liepos 24, 07/922,649 paduota 1992 birželio 30, 08/031,801 paduota 1993 kovo 15, 08/112,848 paduota 1993 rugpjūčio 27, 08/234,145 paduota 1994 balandžio 28d., 08/376,279 paduota 1995 sausio 20, 08/430,938 paduota 1995 balandžio 27d., 08/464,584 paduota 1995 birželio 5d., 08/464,582 paduota 1995 birželio 5d., 08/463,191 paduota 1995 birželio 5d., 08/486,853 paduota 1995 birželio 5d., 08/486,857 paduota 1995 birželio 5d., 08/486,859 paduota 1995 birželio 5d., 08/462,513 paduota 1995 birželio 5d., 08/724,752 paduota 1996 spalio 2d., ir 08/759,620 paduota 1996 gruodžio 3d. ir JAV patentuose Nr. 6,162,963, 6,150,584, 6,114,598, 6,075,181 ir 5,939,598 Japonijos patentuose Nr. 3 068 180 B2, 3 068 506 B2 ir 3 068 507 B2. Taip pat žiūr. Mendez ir kt. Nature Genetics 15:146-156 (1997) ir Green ir Jakobovits J. Exp. Med., 188:483-495 (1998). Žiūr. taip pat Europos patentą Nr. EP 463151 B1, paskelbtą 1996 birželio 12d., Tarptautinę

patento paraišką Nr. WO 94/02602, paskelbtą 1996 spalio 31d., WO 98/24893, paskelbtą 1998 birželio 11d., WO 00/76310, paskelbtą 2000 gruodžio 21d.

Alternatyviu požiūriu, kiti, įskaitant GenPharm International, Inc., panaudojo „minilokuso“ traktavimą. Minilokuso požiūriu, egzogeninis Ig lokusas yra imituojamas įtraukiant gabalus (individualius genus) iš Ig lokuso. Taigi, vienas arba daugiau V_H genų, vienas arba daugiau D_H genų, vienas arba daugiau J_H genų, mu pastovioji sritis ir antra pastovi sritis (geriau gamma pastovi sritis) yra formuojami į konstrukta, skirtą įterpti į gyvūną. Šis požiūris yra aprašytas JAV patente Nr. 5,545,807 Surani ir kt. ir JAV patentuose Nr. 5,545,806, 5,625,825, 5,625,126, 5,633,425, 5,661,016, 5,770,429, 5,789,650, 5,814,318, 5,877,397, 5,874,299 ir 6,255,458 kiekviename Lonberg ir Kay, JAV patente Nr. 5,591,669 ir 6,023,010 Krimpenfort ir Berns, JAV patentuose Nr. 5,612,205, 5,721,367 ir 5,789,215 Berns ir kt., ir JAV patente Nr. 5,643,763 Choi ir Dunn, ir GenPharm International JAV patento paraiška, serijos Nr. 07/574,748 paduota 1990 rugpjūčio 29d., 07/575,962 paduota 1990 rugpjūčio 31d., 07/810,279 paduota 1991 gruodžio 17d., 07/853,408 paduota 1992 kovo 18d., 07/904,068 paduota 1992 birželio 23, 07/990,860 paduota 1992 gruodžio 16d., 08/053,131 paduota 1993 balandžio 26, 08/096,762 paduota 1993 liepos 22d., 08/155,301 paduota 1993 lapkričio 18d., 08/161,739 paduota 1993 gruodžio 3d., 08/165,699 paduota 1993 gruodžio 10d., 08/209,741 paduota 1994 kovo 9d. Žiūr. Taip pat Europos patentą Nr. 546,073 B1, Tarptautinę patento paraišką Nr. 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 ir WO 98/24884 ir JAV patentą Nr. 5,981,175. Žiūr. Toliau Taylor ir kt., (1992), Chen ir kt., (1993), Tuaillon ir kt. (1993), Choi ir kt., (1993), Lonberg ir kt., (1994), Taylor ir kt., (1994) ir Tuaillon ir kt., (1995), Fishwild ir kt., (1996).

Kirin pademonstravo žmogaus antikūno sukūrimą iš pelės, kuriame per mikroląstelių suliejimą buvo įvestos didelės chromosomos dalys arba visos chromosomos. Žiūr. Europos patento paraiškas Nr. 773288 ir 843961.

Lidak Pharmaceuticals (dabar Xenorex) pademonstravo žmogaus antikūno sukūrimą SCID pelėje, modifikuojant nepiktybiniais subrendusiais leukocitais iš žmogaus donoro. Modifikuotos pelės demonstruoja imuninį atsaką, charakteringą žmogaus donorui, po stimuliacijos imunogenu, kuris glūdi žmogaus antikūnų gamyboje. Žiūr. JAV patentus Nr. 5,476,996 ir 5,698,767.

Žmogaus anti-pelės antikūno (HAMA) atsakas paskatino pramonę gaminti chimerinius arba kitaip humanizuotus antikūnus. Kadangi chimeriniai antikūnai turi žmogaus pastoviąją sritį ir pelių kintamąją sritį, tikimasi, kad tam tikrų žmogaus anti-chimerinių antikūnų (HACA) atsakas turėtų būti stebimas antikūno įprastiniame arba multiporcijiniame

panaudojime. Taigi, turėtų būti pageidaujama iš anksto numatyti pilnai žmogaus antikūnus prieš MCP-1 tam, kad būtų sugadintas HAMA arba HACA atsako interesas ir/arba efektas.

Humanizavimo ir demonstravimo technologijos

Kaip aptarta aukščiau sąryšyje su žmogaus antikūnų generavimu, yra antikūnų su sumažintu imunogeniškumu produkavimo pranašumai. Tam tikru laipsniu tai gali būti atlikta sąryšyje su humanizavimo būdais ir būdų demonstravimas naudojant tam tikras bibliotekas. Turėtų būti įvertinta, kad pelių antikūnai arba antikūnai iš kitų rūšių gali būti humanizuoti arba primatizuoti naudojant gerai žinomas šiuolaikines technikas. Žiūr. Winter ir Harris, Immunol Today 14:43-46 (1993). Dominantis antikūnas gali būti sukonstruotas naudojant rekombinantinės DNR techniką, pakeičiant CH1, CH2, CH3, ašinius (hinge) domenų ir/arba struktūrinės srities domenų atitinkamomis žmogaus sekomis (žiūr. WO 92/02190 ir JAV patentus Nr. 5,530,101, 5,585,089, 5,693,761, 5,693,792, 5,714,350 ir 5,777,085). Be to, Ig cDNR panaudojimas chimerinio imunoglobulino genų konstravimui gerai žinomas (Liu ir kt., P.N. A. S. 84:3439 (1987) ir J. Immunol. 139:3521 (1987)). iRNR yra išskirta iš hibridomos arba kitos ląstelės, produkuojančios antikūną ir naudojama cDNR gaminti. Dominanti cDNR gali būti amplifikuota polimerazės grandinine reakcija, naudojant specifinius pradmenis (JAV patentai Nr. 4.683.195 ir 4.683.202). Kitaip, yra sudaryta biblioteka ir tikrinama, norint išskirti dominančią seką. DNR sekos, koduojančios antikūno kintamą sritį, suliejamos su žmogaus pastovios srities sekomis. Žmogaus pastovios srities genų sekos gali būti randamos Kabat ir kt., „Sequences of Proteins of Immunological Interest“, N.I.H. Nr. 91-3242 (1991). Žmogaus C srities genai yra lengvai gaunami iš žinomų klonų. Izotipo pasirinkimas galėtų būti valdomas pagal norimas efektorines funkcijas, tokias kaip komplemento fiksacija, arba nuo antikūno priklausančio ląstelinio citotoksiškumo aktyvumas. Rekomenduojami izotipai yra IgG1, IgG3 ir IgG4. Gali būti naudojamos abi žmogaus lengvosios grandinės pastovios sritys: kappa ir lambda. Chimerinis, humanizuotas antikūnas tuomet ekspresuojamas įprastiniais metodais.

Antikūno fragmentai, tokie kaip Fv, F(ab')₂ ir Fab gali būti gauti skaldant sveiką baltymą, t.y. su proteaze arba cheminiu skaldymu. Kitaip, konstruojamas sutrumpintas genas. Pavyzdžiui, chimerinis genas, koduojantis dalį F(ab')₂ fragmento turėtų apimti DNR sekas, koduojančias CH1 domeną ir H grandinės ašinę (hinge) sritį, paskui translacijos stop kodonas duoda sutrumpintą molekulę.

H ir L J pastovios sekos gali būti naudojamos projektavimui oligonukleotidų, naudojamų pradmenimis, kad būtų galima įvesti naudingas restrikcijos vietas į J sritį paskesniajam sujungimui V srities segmento su žmogaus C srities segmentu. C srities cDNR

gali būti modifikuota kryptingos mutagenezės būdu, patalpinant restrikcijos vietą analogiškoje padėtyje žmogaus sekoje.

Ekspresijos vektoriai apima plazmides, retrovirusus, YAC, EBV kilmės episomas ir panašiai. Patogus vektorius yra toks, kuris koduoja funkciškai pilną žmogaus imunoglobulino CH ir CL seką, su tam tikromis restrikcijos vietomis, genų inžinerijos būdu sukonstruotomis taip, kad bet kokia VH ir VL seka gali būti lengvai įterpta ir ekspresuota. Tokiuose vektoriuose sukirpimas paprastai įvyksta tarp sukirpimo donoro vietos įterptoje J srityje ir sukirpimo akceptoriaus vietos ir ankstesniosios C srities, ir taip pat prie sukirpimo sričių, kurios pasitaiko žmogaus CH egzonų viduje. Poliadenilimas ir transkripcijos terminacija natyvios chromosomos vietose įvyksta pasroviui pagal koduojančią sritį. Gaunamas chimerinis antikūnas gali būti sujungtas su bet koku stipriu promotoriumi, įskaitant retrovirusines LTR, pvz. SV-40 ankstyvas promotorius, (Okayama ir kt., Mol. Cell. Bio. 3:280 (1983)), Rauso sarkomos viruso LTR (Gorman ir kt., P. N. A. S. 79:6777 (1982)), Moloni pelių leukemijos viruso LTR (Grosschedl ir kt., Cell 41:885 (1985)). Taigi, turėtų būti pripažinta, kad gali būti naudojami gamtiniai Ig promotoriai ir panašūs.

Be to, žmogaus antikūnai arba antikūnai iš kitų rūšių gali būti generuoti atvaizdavimo (displėjinėmis) technologijomis, įskaitant be išimčių, fagų atvaizdavimą, retrovirusų atvaizdavimą, ribosomų atvaizdavimą, naudojant praktikoje gerai žinomas metodikas ir gaunamos molekulės gali būti papildomai brandinamos, kaip antai giminingumo brandinimas, iš esmės gerai žinomos technikos. Wright ir Harris supra., Hanes ir Plutchau, PNAS USA 94:4937-4942 (1997) (ribosomų atvaizdavimas), Parmley ir Smith, Gene 73:305-318 (1988) (fagų atvaizdavimas), Scott, TIBS 17:241-245 (1992), Cwirla ir kt., PNAS USA 87:6378-6382 (1990), Russel ir kt., Nucl. Acids Res. 21:1081-1085 (1993), Hoganboom ir kt., Immunol. Reviews 130:43-68 (1992), Chriswell ir McCafferty, TIBTECH 10:80-84 (1992) ir JAV patentas Nr. 5,733,743. Jeigu atvaizdavimo technologijos naudojamos ne žmogaus antikūnų gavimui, tokie antikūnai gali būti humanizuoti, kaip aprašyta aukščiau.

Naudojant šias metodikas, gali būti generuoti antikūnai prieš MCP-1 ekspresuojančias ląsteles, patį MCP-1, MCP-1 formas, jo epitopus arba peptidus ir taip pat ekspresijos bibliotekas (žiūr. pvz., JAV patentą Nr. 5.703.057), kurios po to gali būti patikrintos kaip aprašyta aukščiau, dėl aukščiau aprašytų aktyvumų.

Antikūnų paruošimas

Sutinkamai su išradimu, antikūnai gali būti paruošti įgyvendinant XenoMouse® metodiką, kaip aprašyta aukščiau. Tokios pelės tuomet sugeba produkuoti žmogaus imunoglobulino molekules ir antikūnus ir neprodukuoja pelių imunoglobulino molekulių ir

antikūnų. Tam pasiekti naudojamos metodikos yra atskleistos patentuose, paraiškose ir nurodymuose, atskleistuose šiame pagrindime. Tačiau, dalinai, pasiūlytas pelių ir jų antikūnų transgeninės gamybos įgyvendinimas atskleistas JAV patento paraiškoje Nr. 08/759,620 paduotoje 1996 gruodžio 3d. ir Tarptautinėje patentinėje paraiškoje Nr. WO 98/24893, publikuotoje 1998 birželio 11d., ir WO 00/76310, publikuotoje 2000 gruodžio 21d. Žiūr. taip pat Mendez ir kt., *Nature Genetics* 15:146-156(1997).

Antikūnai, kaip čia aprašyti, yra neutralizuoti aukšto giminingumo antikūnai prieš žmogaus MCP-1. Be to, kai kuriuose įgyvendinimuose, antikūnai duoda kryžminę reakciją su žiurkių MCP-1. Istoriskai buvo naudojami kai kurie skirtingi metodai gaminimui monokloninių arba polikloninių antikūnų prieš žmogaus MCP-1 N-galą. Šie siūlymai apima imunizavimą su pilno ilgio žmogaus MCP-1 (hMCP-1) arba jaučio MCP-1 (bMCP-1), žmogaus MCP-1 sintetiniais peptidais (1-34 arba 1-37) (Visser ir kt., *Acta Endocrinol.* 90:90-102 (1979)); Logue ir kt., *J. Immunol. Methods* 137:159-66 (1991)) ir daugybiniais antigeniniais peptidais (MAP) hMCP-1(1-10), hMCP-1(9-18) ir hMCP-1(24-37) (Magerlein ir kt., *Drug Res.* 48:783-87 (1998)). Šiais metodais negalima produkuoti antikūnų, tinkančių žmonių gydymui. (Dėl gydymo kriterijų žiūr. čia skyrių, pavadintą "Terapinis paskyrimas ir kompozicija".) Didelio giminingumo hMCP-1 antikūnus yra sunku padaryti, kadangi B ląstelės yra tolerantiškos peptidui. Tačiau, Bradwell ir kt., (1999) pademonstravo, kad imunizavimas mišiniu žmogaus MCP-1(1-34) ir jaučio MCP-1(51-84) MAP sekė sumaišius žmogaus ir jaučio MAP kryptingai hMCP-1(51-84) ir bMCP-1(51-86) buvo efektyvi pažeidžiant B ląstelių toleranciją MCP-1 žmonėse su neoperuojamu prieskydinės liaukos augliu.

Čia aprašytas metodas buvo skirtas susilpninti B ląstelių toleranciją prieš hMCP-1 taip pat, kaip ir produkuoti pilnai žmogaus monokloninį antikūną, tinkantį terapiniam ir diagnostiniam naudojimui. XenoMouse® gyvūnai buvo imunizuoti MCP-1 sintetiniais peptidais (hMCP-1(1-34) ir rMCP-1(1-34)), kadangi sintetiniai peptidai buvo sėkmingai naudojami generuoti antikūnus, specifinius endogeniniam žmogaus MCP-1 (Visser ir kt., (1979)). Be to, kadangi pelių MCP-1 N-galas yra labai tapatus su žmogaus MCP-1 (85 % identiškumas) ir žiurkių MCP-1 (91 % identiškumas), peptidų derinys buvo naudojamas kaip imunogenas susilpninti B ląstelių toleranciją prieš pelių MCP-1 per molekulinę mimikriją, tuo būdu sudarant sąlygas didelio giminingumo anti-žmogaus MCP-1 antikūnų generavimui. Šie abu peptidai kibo prie sraigių limfos hemocianino ir emulgavosi pilname Freundo adjuvante arba nepilname Freund adjuvante, siekiant sustiprinti šių baltymų imunogeniškumą.

Po imunizacijos limfinės ląstelės (tokios kaip B ląstelės) buvo atkurtos iš pelių, kurios ekspresuoja antikūnus, ir tokios atkurtos ląstelių linijos buvo sujungtos su mieloidinių ląstelių linija, sukuriant imortalizuotas hibridomas ląstelių linijas. Tokios hibridomas ląstelių linijos buvo patikrintos ir atrinktos identifikuoti hibridomų ląstelių linijoms, kurios produkuoja antikūnus specifinius dominančiam antigenui. Čia aprašyta gaminimas daugiariopų hibridomas ląstelių linijų, kurios produkuoja MCP-1 specifinius antikūnus. Be to, duotas tokių ląstelių linijų produkuojamų antikūnų charakterizavimas, įskaitant tokių antikūnų sunkiosios ir lengvosios grandinių nukleotidų ir aminorūgščių analizę.

Išradimo įgyvendinimai pateikia produkavimui daugiariopas hibridomas ląstelių linijas, kurios produkuoja specifinius antikūnus prieš MCP-1. Toliau įgyvendinimai susiję su antikūnais, kurie rišasi su ir neutralizuoja kitų MCP-1 šeimos narių aktyvumą, įskaitant MCP-2, MCP-3 ir MCP-4. Taip pat patikrinamas supernatantų reaktyvumas prieš MCP-1 fragmentus tolesniam epitopų žemėlapiui skirtingų antikūnų prieš susijusius žmogaus chemokinus ir prieš žiurkių MCP-1 ir pelių ortologą MCP-1, JE, siekiant nustatyti rūšių kryžminę reakciją. Tolimesni įgyvendinimai pateikia tokių ląstelių linijų produkuotų antikūnų charakterizavimą, įskaitant tokių antikūnų sunkiosios ir lengvosios grandinių nukleotidų ir aminorūgščių sekų analizę.

Antraip, vietoje to, kad būtų sulietos su mielonomos ląstelėmis, sudarant hibridomas, B ląstelės gali būti ištirtos tiesiogiai. Pavyzdžiui, CD19+ B ląstelės gali būti išskirtos iš hiperimuninių XenoMouse® pelių ir joms leidžiama daugintis ir diferencijuotis į antikūnus sekretuojančias plazmos ląsteles. Antikūnai iš ląstelių supernatanto po to tikrinami ELISA dėl reaktyvumo prieš MCP-1 imunogeną. Supernatantas taip pat tikrinamas prieš MCP-1 fragmentus tolesniam epitopų žemėlapiui skirtingų antikūnų prieš susijusius žmogaus chemokinus ir prieš žiurkių MCP-1 ir pelių ortologą MCP-1, JE, siekiant nustatyti rūšių kryžminę reakciją. Atskiros plazmos ląstelės, sekretuojančios antikūnus su norimomis savybėmis paskui išskiriamos, naudojant MCP-1 specifinę hemolizinę dėmelių protrūkio analizę (Babcock ir kt., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:7843-7848 (1996)). Ląstelės nukreiptos lizei yra geriau avių raudonosios kraujo ląstelės (SRBC) padengtos MCP-1 antigenu. Esant B ląstelių kultūrai, turinčiai plazmos ląsteles, sekretuojančias dominantį imunoglobuliną ir komplementą, formavimasis dėmelių rodo specifinę MCP-1 indukuotą lizę avių raudonųjų kraujo ląstelių, apsuptų dominančias plazmos ląsteles. Atskiros antigenui specifinės plazmos ląstelės dėmelės centre gali būti išskirtos ir genetinė informacija, kuri koduoja antikūno specifiškumą yra išskirta iš atskiros plazmos ląstelės. Naudojant PGR atvirkštinę transkriptazę, gali būti klonuota antikūno sunkiosios ir lengvosios grandinių kintamas sritis koduojanti DNR. Tokia klonuota DNR toliau gali būti įterpta į atitinkamą

ekspresijos vektorių, geriau vektoriaus kasetę, tokią kaip pcDNR, dar geriau tokį pcDNR vektorių, turintį imunoglobulino sunkiosios ir lengvosios grandinės pastovų domeną. Sukurtas vektorius paskui gali būti transfekuotas į ląsteles-šeimininkes, geriau CHO ląsteles, ir auginamos įprastinėje maitinimo terpėje, kuri tinkama promotoriaus indukcijai, transformantų atrinkimui, arba norimas sekas koduojančių genų amplifikavimui. Žemiau aprašytas išskyrimas daugiopų atskirų plazmos ląstelių, kurios produkuoja MCP-1 specifinius antikūnus. Be to, genetinė medžiaga, kuri koduoja anti-MCP-1 antikūno specifiskumą gali būti išskirta, įvesta į atitinkamą ekspresijos vektorių, kuris gali būti transfekuotas į ląsteles-šeimininkes.

Apskritai, antikūnai produkuoti sulietų hibridomų, buvo žmogaus IgG2 sunkiosios grandinės su pilnai žmogaus kappa arba lambda lengvosiomis grandinėmis. Kai kuriuose įgyvendinimuose antikūnai, turintys žmogaus IgG4 sunkiąsias grandines kaip ir IgG2 sunkiąsias grandines. Antikūnai taip pat gali būti ir kitų izotipų, įskaitant IgG1. Antikūnai, turintys didelį giminingumą, tipiškai turi K_D nuo maždaug 10^{-6} iki maždaug 10^{-12} M arba žemiau, jeigu matuojama bet kurioje kietoje fazėje ir tirpalo fazėje. Antikūnai, turintys K_D mažiausiai 10^{-11} M yra pageidautini inhibuoti MCP-1 aktyvumą.

Ryšium su giminingumo svarbumu anti MCP-1 antikūnų terapiniam naudingumui, turėtų būti suprantama, kad tai gali generuoti anti-MCP-1 antikūnai, pavyzdžiui, kombinatoriškai, ir įvertinami tokie antikūnai dėl prisirišimo giminingumo. Vienas būdas, kuris gali būti atliktas, yra paimti antikūno sunkiosios grandinės cDNR, paruoštą kaip aprašyta aukščiau, ir surasti gerą giminingumą MCP-1, ir sujungti ją su antrojo antikūno lengvosios grandinės cDNR, paruoštą kaip aprašyta aukščiau, ir taip pat surasti gerą giminingumą su MCP-1, pagaminant trečią antikūną. Gauta trečiojo antikūno giminingumai gali būti išmatuoti, kaip aprašyta čia, ir su pageidaujamomis disociacijos konstantomis išskirti ir charakterizuoti. Antraip, bet kurio aukščiau aprašyto antikūno lengvoji grandinė gali būti naudojama kaip įrankis padėti sunkiosios grandinės kūrimui, kuri, jeigu poruojama su lengvąja grandine turėtų rodyti didelį giminingumą MCP-1, ir atvirkščiai. Tokios sunkiosios grandinės kintamos sritys šioje bibliotekoje gali būti išskirtos iš paprastų gyvūnų, išskirtos iš hiperimunizuotų gyvūnų, sukurtos dirbtiniu būdu iš bibliotekos, turinčios sunkiosios grandinės kintamos srities sekas, skirtingas CDR srityse, arba sukurtas bet koku kitu būdu (tokiu kaip atsitiktinė arba kryptinga mutagenezė), kuris duoda įvairovę bet kurios grandinės kintamos srities geno CDR srityse. Tokios CDR sritys, ir dalinai CDR3, gali būti reikšmingai skirtingo ilgio arba sekų identiškumo nuo sunkiosios grandinės, pradžioje suporuotos su originaliu antikūnu. Gauta biblioteka gali būti atrinkta pagal didelį prisirišimo prie MCP-1 giminingumą, sukuriant terapiškai tinkamą antikūno molekulę su panašiomis

savybėmis, kaip originalus antikūnas (didelis giminingumas ir neutralizavimas). Panašus būdas, naudojant sunkiąją grandinę arba sunkiosios grandinės kintamą sritį gali būti naudojamas sukurti terapiškai tinkamą antikūno molekulę su unikalia lengvosios grandinės kintama sritimi. Be to, nauja sunkiosios grandinės kintama sritis, arba lengvosios grandinės kintama sritis, gali būti naudojamos, kaip aprašyta aukščiau, gali būti naudojamos gepanašiu būdu, kaip aprašyta aukščiau, identifikuoti naują lengvosios grandinės kintamą sritį, arba sunkiosios grandinės kintamą sritį, kas įgalina sukurti naują antikūno molekulę.

Kitas kombinatorinis būdas, kuris gali būti atliktas, yra atlikti mutagenezę sunkiosios ir/arba lengvosios grandinių pradinėje linijoje, kaip parodyta kad atlikta antikūnuose sutinkamai su čia aprašytu išradimu, dalinai komplementarumą apsprendžiančiose srityse (CDR). Gauti antikūno aktyvumai gali būti išmatuoti, kaip aprašyta čia, ir tokie antikūnai su pageidaujamomis konstantomis išskirti ir charakterizuoti. Po pageidaujamo rišiklio atrinkimo, seka arba sekos, koduojančios tai, gali būti naudojamos generuoti rekombinantinius antikūnus, kaip aprašyta aukščiau. Tam tikri mutagenezės atlikimo metodai su oligonukleotidais žinomi tos srities specialistams ir apima cheminę mutagenezę, pavyzdžiui, su natrio bisulfitu, fermentiniu klaidingu įjungimu ir ekspozicine radiacija. Suprantama, kad čia aprašytas išradimas apima antikūnus su esminiu identiškumu, kaip apibrėžta čia, iki antikūnų tikslaus rinkinio, kuris gaunamas mutagenezės arba bet koku kitu būdu. Be to, antikūnai su konservatyviais arba nekonservatyviais aminorūgščių pakeitimais, kaip apibrėžta čia, padarytais antikūnų tiksliame rinkinyje, yra įjungti į čia aprašyto išradimo įgyvendinimą.

Kitas kombinatorinis būdas, kuris gali būti naudojamas išreikšti aukščiau aprašytų antikūnų CDR sritims, ir ypačiai CDR3, aukščiau aprašytų antikūnų, struktūrinių sričių, gautų iš kitų kintamų sričių genų, kontekste. Pavyzdžiui, vieno anti-MCP-1 antikūno sunkiosios grandinės CDR1, CDR2 ir CDR3 gali būti ekspresuotos kitos sunkiosios grandinės kintamų genų struktūrinės srities kontekste. Panašiai, anti-MCP-1 antikūno lengvosios grandinės CDR1, CDR2 ir CDR3 gali būti ekspresuotos kontekste struktūrinės srities kitų kintamos srities genų. Be to, šių CDR sričių pradinės sekos gali būti ekspresuotos kitų sunkiosios ir lengvosios grandinių kintamų sričių genų kontekste. Gauti antikūnai gali būti tiriami dėl specifiškumo ir giminingumo ir gali sudaryti sąlygas naujų antikūnų molekulių generavimui.

Reikėtų įvertinti, kad remiantis čia aprašytu išradimu paruošti antikūnai gali būti ekspresuoti įvairiose ląstelių linijose. Sekos, koduojančios individualius antikūnus, gali būti naudojamos atitinkamų žinduolių ląstelių transformacijai. Transformacija, įvedant polinukleotidus į ląstelę-šeimininkę, gali būti atlikta bet koku žinomu metodu, įskaitant,

pavyzdžiui, polinukleotido supakavimą į virusą (arba į virusinį vektorių) ir ląstelių-šeimininkų transdukciją virusu (arba vektoriumi), arba transfekcijos procedūromis, žinomomis laboratorinėje praktikoje, kaip iliustruojama pavyzdžiais JAV patentuose Nr. 4,399,216, 4,912,040, 4,740,461 ir 4,959,455. Panaudota transformacijos procedūra priklauso nuo šeimininko, kuris yra transformuojamas. Heterologinių polinukleotidų įvedimo į žinduolių ląsteles metodas gerai žinomas praktikoje ir apima transfekciją tarpininkaujant dekstranui, nusodinimą kalcio fosfatu, transfekciją tarpininkaujant polibrenui, protoplastų suliejimą, elektroporaciją, polinukleotido(u) supakavimą į liposomas ir tiesioginę DNR injekciją į branduolį.

Žinduolių ląstelių linijos, tinkamos kaip ekspresijos šeimininkės yra gerai žinomos praktikoje ir apima daug imortalizuotų ląstelių linijų, prieinamų Amerikos kultūrų pavyzdžių kolekcijoje (ATCC), įskaitant, bet neapsiribojant, Kinijos žiurkėno kiaušidžių (CHO) ląsteles, HeLa ląsteles, jauno žiurkėno inkstų (BHK) ląsteles, beždžionių inkstų ląsteles (COS), žmogaus hepatoceliuliarinės karcinomos ląsteles (pvz., Hep G2) ir eilę kitų ląstelių linijų. Ląstelių linijos su tam tikru pirmumu yra atrenkamos nustatant, kuri ląstelių linija turi aukštesnį ekspresijos lygį ir produkuoja antikūnus su esminėmis MCP-1 surišimo savybėmis.

Papildomi antikūnų terapijos kriterijai

Kaip aptarta čia, MCP-1 antikūno funkcija pasirodė svarbi mažiausiai daliai jo funkcionavimo būdų. Dabartinio išradimo anti-MCP-1 antikūnai gali atlikti efektorinę funkciją, įskaitant nuo komplemento priklausančią citotoksiškumą (CDC) ir nuo antikūno priklausančią ląstelinį citotoksiškumą (ADCC). Yra tam tikras skaičius antikūnų izotipų, kurie geba tą patį, įskaitant, be apribojimų, sekančius: pelių IgM, pelių IgG2a, pelių IgG2h, pelių IgG3, žmogaus IgM, žmogaus IgG1 ir žmogaus IgG3. Reikėtų įvertinti, kad antikūnai yra sukurti ne pradiniam reikalingumui kaip izotipas, bet dažniau, antikūnas kaip sukurtas gali apimti bet kurį izotipą ir antikūnas gali būti izotipą pakeitęs nuo to laiko, naudojant toje srityje gerai žinomus įprastinius metodus. Tokie metodai apima tiesioginių rekombinantinių metodų panaudojimą (žiūr. pvz. JAV patentą Nr. 4,816,397 ir JAV patentą Nr. 6,331,415), ląstelių suliejimo metodus (žiūr. pvz. JAV patentus Nr. 5,916,771 ir 6,207,418) ir kitus.

Ląstelių suliejimo metoduose, paruošiama mielomos arba kita ląstelių linija, kuri apima sunkiąją grandinę su bet kuriuo norimu izotipu ir paruošiama mielomos arba kita ląstelių linija, kuri apima lengvąją grandinę. Tokios ląstelės po to gali būti suliejamos ir išskiriama ląstelių linija, ekspresuojanti sveiką antikūną.

Kaip pavyzdys, čia aptarti MCP-1 antikūnai yra žmogaus antiMCP-1 IgG2 ir IgG4 antikūnai. Jeigu tokie antikūnai turi norimą ryšį su MCP-1 molekule, jie galėtų būti lengvai izotipiškai perjungti generuoti žmogaus IgM, žmogaus IgG1, arba žmogaus IgG3, IgA1 arba

IgGA2 izotipus, nors tik turinčius tą pačią kintamą sritį (kuri apibrėžia antikūno specifiškumą ir dalinai jo giminingumą). Tokia molekulė turėtų sugebėti fiksuoti komplementą ir dalyvauti CDC.

Taigi, yra generuoti kaip antikūnų kandidatai, kurie atitinka norimus „struktūrinius“ požymius, kaip aptarta aukščiau, jie gali pagrįste būti numatyti tik su mažiausiai tam tikrais „funkciniais“ požymiais izotipo perjungime.

Epitopų kartografija

Imunoblotingas

Aprašytas antikūnų prisirišimas prie MCP-1 gali būti nustatytas keletu metodų. Pavyzdžiui, MCP-1 gali būti užnešami ant SDS-PAGE ir analizuojami imunoblotingu. SDS-PAGE gali būti atliekama arba nedalyvaujant arba dalyvaujant redukcijos agentui. Tokios cheminės modifikacijos gali duoti cisteino liekanų metilinimą. Taigi, yra galima nustatyti, kurie anti-MCP-1 antikūnai rišasi prie MCP-1 linijinio epitopo.

Paviršinė sustiprinta lazerio desorbija/ionizacija (SELDI)

Čia aprašytų MCP-1 antikūnų epitopų kartografavimas gali taip pat būti atliekamas, naudojant SELDI. SELDIProteinChip® matrica yra naudojama nustatyti baltymas-baltynas sąveikos vietas. Antigenai specifiškai sugaunami antikūnais, kovalentiškai imobilizuojami ant baltymų čipų matricos paviršiaus pradiniu inkubavimu ir plovimu. Surišti antigenai gali būti aptikti lazeriu indukuotu desorbcijos procesu ir analizuojami tiesiogiai nustatant jų masę. Tokie surišti antigeno fragmentai pavadinti kaip baltymo „epitopas“.

SELDI būdas įgalina kompleksinės molekulinės kompozicijos viduje individualius komponentus nustatyti tiesiogiai ir kartografuoti kiekybiškai atžvilgiu kitų komponentų greitu, labai jautriu ir keičiamo mastelio būdu. SELDI naudoja įvairias paviršiaus chemijos matricas, kad galėtų sugauti ir turėti didelį skaičių individualių baltymų molekulių nustatymui lazerio indukuotu desorbcijos būdu. SELDI metodo sėkmė charakterizuojama dalinai daugybinių funkcijų ant paviršiaus („čipo“) miniatiūrizavimu ir integravimui, kiekviena priklausančių skirtingoms technologijoms. SELDI BioChips ir kiti SELDI zondai yra taip paviršiumi „sustiprinti“, kad jie tampa aktyviais dalyviais sugavime, gryninime (atskyrime), pateikime nustatyme ir charakterizavime individualių taikinio molekulių (pvz., baltymų) arba įvertinamų molekulių populiacijų.

Vienas SELDI baltymo BioChip, pakrautas tik su vienu originaliu pavyzdžiu, gali būti skaitomas tūkstančius kartų. SELDI baltymo BioChip iš LumiCyte kompanijos turi daugiau negu 10000 užrašomų baltymų susijungusių padėčių viename kvadratiname centimetre.

Kiekviena padėtis gali atskleisti daugybės individualių baltymų buvimą. Jeigu baltymo kompozicijos informacija iš kiekvienos padėties skiriasi ir unikalus informacijos rinkinys sujungtas, gaunamas kompozicijos žemėlapis, atspindintis ypatybių rinkinį, kuris naudojamas bendrai nustatyti bendrus šablonus arba molekulinis „pirštų atspaudus“. Skirtingi pirštų atspaudai gali būti susiję su įvairiomis sveikatos stadijomis, iš vienos pusės ligos, ligos pradžios, arba su ligos regresija, susijusia su tam tikrų vaistų skyrimu.

SELDI metodas gali būti aprašytas detaliau keturiose dalyse. Pradžioje, vienas arba daugiau dominančių baltymų yra sugaunami arba „sujungiami“ ant ProteinChip gardelės, tiesiogiai iš originalaus šaltinio medžiagos, be pavyzdžio paruošimo ir be pavyzdžio žymėjimo. Antrame etape „signalo su triukšmu“ santykis yra sustiprinamas, silpninant cheminį ir biocheminį „triukšmą“. Toks „triukšmas“ yra slopinamas selektyviai sulaikant taikinį ant čipo, išplaunant nepageidaujamas medžiagas. Toliau, vienas arba daugiau taikinio baltymų, kurie yra sugauti, yra interpretuojami greitai, jautriai, lazeriu indukuotu metodu (SELDI), kuris pateikia tiesioginę informaciją apie taikinį (molekulinę masę). Galiausiai, taikinio baltymas bet kurioje vienoje arba daugiau padėčių gardelės viduje gali būti charakterizuotas *in situ* atliekant vieną arba daugiau pririšimo ant čipo arba modifikacijos reakcijų, kad būtų charakterizuota baltymo struktūra ir funkcija.

Fagų displėjus (fenotipas?)

Aprašytų anti-MCP-1 antikūnų epitopai gali būti nustatyti eksponuojant ProteinChip matricą su kombinatorine biblioteka 12-narių atsitiktinių peptidų, eksponuojamų ant filamentinių fagų (New England Biolabs).

Fagų displėjus apibūdina selekcijos techniką, kurioje peptidai ekspresuojami sulieti su bakteriofago apvalkalo baltymu, pasireiškiantys sulietų baltymų ant viriono paviršiaus fenotipu. Išplovimas atliekamas fagų eksponuojamų peptidų biblioteką inkubuojant su plokštele arba mėgintuvėliu, padengtu taikiniu, išplaunant nesurištus fagus ir specifiskai išplaunant surištus fagus. Išplauti fagai po to amplifikuojami ir papildonų surišimų ir amplifikacijos ciklų pagalba praturtinami sankaupa naudingų sekų. Po trijų ar keturių ciklų individualių klonų surišimas toliau testuojamas fagų ELISA būdu, atliekamu ant antikūnais padengtais šulinėliais ir charakterizuojamu specifiniu teigiamų klonų DNR sekvenavimu.

Po daugybinių tokių išplovimo ciklų prieš aprašytus anti-MCP-1 antikūnus, surišti fagai gali būti eliuuojami ir pateikiami tolimesniam tyrimui surištų peptidų identifikavimui ir charakterizavimui.

Buvo parodyta, kad išradimo monokloniniai antikūnai suriša svarbias liekanas su MCP-1 šerdies domenu. Tirtų monokloninių antikūnų neutralizavimas išskiria dvi funkciškai svarbias vietas žmogaus MCP-1, susijusias su dviem liekanomis, kurios anksčiau buvo

parodytos reikalingos surišimui su receptoriumi. Viena vieta buvo atpažįstama visais tirtais antikūnais, kurie konkuruoja su receptoriaus baltymu dėl MCP-1 susirišimo ir įtraukia Arg24. Antroji vieta buvo nustatyta šešių antikūnų grupė, kurie jungiasi konformaciniais epitopais ir jų prisijungimo vieta kaip pasirodė apima Arg24 ir Lys35, kurios yra labai arti N-galo dėka disulfidinės jungties tarp C11 ir C36.

Aprašyti MCP-1 variantai anksčiau buvo analizuojami dėl biologinio aktyvumo, fizinio receptorių surišimo ir struktūrinio vientisumo (Jarnagin ir kt., (1999) *Biochemistry* 38: 16167-16177; Hemmerich ir kt., (1999) *Biochemistry* 38: 13013-13025) ir numatytos vertingos priemonės nustatant antikūnų surišančius epitopus, kaip aprašyta žemiau.

Anti-MCP-1 3.11.2 antikūnas atpažįsta konformacinius epitopus ir skiria iš kitų antikūnų pagal sunkiosios ir lengvosios grandinių unikalias sekas ir jų sugebėjimą kryžmiškai reaguoti su ir taip pat kryžmiškai neutralizuoti kitus MCP šeimos narius, tokius kaip MCP-2, MCP-3 ir MCP-4. Kaip parodyta su mutagenezės eksperimentais, mAb 3.11.1 prisirišimo vieta buvo paveikta keičiant R24A, bet ne K35A. Šie duomenys yra patvirtinti Lys-C skaldymo ant čipo rezultatais su SELDI, kuris atriboja epitopo prisirišimą, esantį tarp MCP-1 20-35 liekanų.

Nustatymas, kad 3.11.1 epitopas yra tarp 20-35 liekanų, buvotai pat paremta sekų paluoginimu, parodant kad R24, bet ne K35 buvo išsaugota per kitus MCP šeimos narius, konkrečiai MCP-2, MCP-3 ir MCP-4. Surišimo analizė su SPOT peptidų, susintetintų ant membranos, pagalba (Sigma-Genosys, The Woodlands, Texas) atskleidė, kad prisirišimo vieta mažiausiai aštuonių mAb su linijiniais epitopais apima 20-35 liekanas ir įtraukia R24. Atsižvelgiant į šių surišimo tyrimų rezultatų panašumus ir svarbumą homologijos tarp visų mAb kintamų genų struktūrų, prisirišusių prie linijinių epitopų ant MCP-1, pasirodė, kad visi antikūnai rišasi su šituo neutralizuojančiu epitopu.

Epitopų sanaupa apie R24 ir K35 paaiškina visų 36 antikūnų neutralizuojantį aktyvumą. Atpažintas MCP-1 epitopas nepasirodo pratęstas iki N-galinės Pro9 liekanos. Ši liekana pasirodė veikianti į receptoriaus signalizavimą, bet ne prisirišimo giminingumą.

Panaudojimas diagnostikoje

Antikūnai, paruošti pagal čia aprašyto išradimo įgyvendinimą, naudojami tyrimams, ypatingai diagnostikos *in vivo* tyrimuose, pavyzdžiui, nustatant MCP-1 ir visų MCP-1 šeimos narių lygį paciento pavyzdžiuose. Paciento pavyzdžiai gali būti, pavyzdžiui, kūno skysčiai, geriau kraujas, dar geriau kraujo serumas, sinovialinis skystis, audinių lizatai ir ekstraktai, pagaminti iš nesveikų audinių. Pavyzdžių diagnostikos būdai apima MCP šeimos chemokinių lygio matavimą, pavyzdžiui, žmogaus serume, sinovialiniame skystyje ir audinių lizatuose. Specifinių MCP šeimos narių lygio stebėjimas gali būti naudojamas kaip pakaitinis

matas pacientų reakcijos į gydymą ir kaip ligos sunkumo stebėjimo metodas. Aukštesnis MCP-1 lygis, palyginus su kitų tirpių žymenų, turėtų reikšti uždegimo buvimą. MCP-1 antigeno koncentracija esanti paciento pavyzdžiuose yra nustatoma naudojant metodą, kuris specifiskai nustato esančio antigeno kiekį. Toks metodas yra ELISA metodas, kuriame, pavyzdžiui, išradimo antikūnai gali būti patogiai imobilizuoti ant netirpios matricos, tokios kaip polimerinė matrica. Naudojant pavyzdžių populiaciją, kurie pateikia statistiškai svarbius rezultatus kiekvienai progresijos arba gydymo stadijai, gali būti nustatytos antigeno koncentracijos ribos, kurios gali būti vertinga kiekvienos ligos stadijos charakteristika.

Norint nustatyti uždegimo lygį subjekte pagal tyrimą, arba charakterizuoti subjekto atsaką į gydymo kursą, iš subjekto imamas kraujo pavyzdys ir nustatoma pavyzdyje esančio MCP-1 antigeno koncentracija. Taip gauta koncentracija naudojama nustatyti, į kurią koncentracijos ribą reikšmė patenka. Taip nustatyta riba koreliuoja su ligos progresijos stadija arba gydymo stadija nustatyta įvairiose diagnozuotų subjektų populiacijose, tuo būdu nurodant subjekto stadiją po tyrimo.

Genų amplifikavimas ir/arba ekspresija gali būti matuojama pavyzdyje tiesiogiai, pavyzdžiui, įprastiniais Southern blotingo metodu, Northern blotingo metodu nustatant mRNR transkripcijos kiekį (Thomas, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)), dot blotingu (DNR analize) arba hibridizacija *in situ*, naudojant atitinkamai žymėtą bandinį, pagrįstą čia numatyta seka. Antraip, gali būti pritaikyti antikūnai, kurie gali atpažinti specifinius dupleksus, įskaitant DNR dupleksus, RNR dupleksus ir DNR-RNR hibridų dupleksus arba DNR-baltymų dupleksus. Antikūnai paeiliui gali būti žymėti ir gali būti atliktas bandymas, kuriame dupleksas yra surištas su paviršiumi taip, kad po duplekso susiformavimo ant paviršiaus, gali būti nustatytas antikūnas, prisirišęs prie duplekso.

Pavyzdžiui, antikūnai, įskaitant antikūnų fragmentus, gali būti naudojami kokybiniam ir kiekybiniam MCP-1 baltymų ekspresijos nustatymui. Kaip pažymėta aukščiau, antikūnas geriau yra pažymėtas su nustatoma, pvz. fluorescentine žyme, ir surišimas gali būti tikrinamas šviesos mikroskopija, tėkmės citometrija, fluorimetrija arba kitais gerai žinomais metodais. Šie metodai pagrinde tinkami, jeigu amplifikuotas genas koduoja ląstelės paviršiaus baltymą, pvz. augimo faktorių. Tokie surišimo tyrimai yra atliekami kaip įprasta.

Antikūnų, susiriusių su MCP-1 baltymu, nustatymas *in situ* gali būti atliekamas, pavyzdžiui, imunofluorescencija arba imunoelektronine mikroskopija. Šiam tikslui paimamas žmogaus audinio mėginys ir jam taikomas žymėtas antikūnas, geriau užguldamas antikūną ant biologinio pavyzdžio. Ši procedūra taip pat įgalina nustatyti žymėto geno produktą tiriamame audinyje. Šios srities specialistui turėtų būti akivaizdu, kad histologinių metodų didelė įvairovė yra lengvai pritaikoma nustatymui *in situ*.

Vienas iš labiausiai jautrių ir labiausiai lanksčių kiekybinių metodų diferenciniam genų ekspresijos kiekybiniam nustatymui yra RT-PGR, kuris gali būti naudojamas palyginti iRNR lygiui skirtingose pavyzdžių populiacijose, esant normaliems ir auglių audiniams, esant arba nesant vaistų poveikiui, charakterizuoti genų ekspresijos būdus, atskirti artimai susijusias iRNR ir tirti RNR struktūrą.

Pirmasis žingsnis šiame procese yra iRNR išskyrimas iš objekto pavyzdžio. Pradinė medžiaga tipiškai yra suminė RNR nustatyta tvarka išskirta iš nesveiko audinio ir atitinkamų sveikų audinių. Taigi, iRNR gali būti ekstrahuota, pavyzdžiui, iš užšaldytų arba archyvuotų parafinu užlietų ir fiksuotų (pvz. formalinu fiksuotų) nesveikų audinių pavyzdžių palyginimui su to paties tipo normaliu audiniu. iRNR ekstrakcijos metodai yra gerai žinomi šioje srityje ir išdėstyti standartiniuose molekulinės biologijos vadovėliuose, įskaitant Ausubel ir kt., *Current Protocols of Molecular Biology*, John Wiley and Sons (1997). RNR ekstrakcijos metodai iš parafinu užlietų audinių yra išdėstyti, pavyzdžiui, Rupp ir Locker, *Lab Invest.*, 56:A67 (1987) ir De Andres ir kt., *BioTechniques*, 18:42044 (1995). Ypač, RNR išskyrimas gali būti atliekamas naudojant išvalymo rinkinį, buferių rinkinį ir proteazes iš komercinių gamintojų, tokių kaip Qiagen, pagal gamintojų instrukcijas. Pavyzdžiui, suminė RNR iš audinių pavyzdžių gali būti išskirta naudojant RNA Stat-60 (Tel-Test).

Jeigu RNR negali tarnauti kaip PGR matrica, pirmas žingsnis diferencinėje genų ekspresijos analizėje pagal RT-PGR yra atvirkštinė RNR matricos transkripcija į cDNR, sekanti iš jos eksponentinės amplifikacijos PGR reakcijoje. Dvi dažniausiai naudojamos atvirkštinės transkriptazės yra paukščių mieloblastozės viruso atvirkštinė transkriptazė (AMV-RT) ir Moloney pelių leukemijos viruso atvirkštinė transkriptazė (MMLV-RT). Atvirkštinė transkripcija yra atliekama naudojant specifinius pradmenis, atsitiktinius heksameras arba oligo-dT pradmenis, priklausomai nuo aplinkybių ir ekspresijos atlikimo tikslo. Pavyzdžiui, ekstrahuota RNR gali būti atvirkščiai transkribuota, naudojant GeneAmp RNR PGR rinkinį (Perkin Elmer, CA, USA) pagal gamintojo instrukcijas. Gautoji cDNR gali būti po to naudojama kaip matrica paskesnėse PGR reakcijose.

Taip pat PGR stadijoje gali būti naudojama daugybė termostabilių DNR priklausomų DNR polimerazių, tai tipiškai atlieka Taq DNR polimerazė, kuri turi 5'-3' nukleazinį aktyvumą, bet neturi 3'-5' endonukleazinio aktyvumo. Taigi, TaqMan PGR tipiškai naudojamas Taq arba Tth polimerazės 5'-nukleazinis aktyvumas hidrolizavimui hibridizacijos zondo, pririšto prie jo taikinio amplikono, bet negali būti naudojamas kitas fermentas su ekvivalentišku 5' nukleaziniu aktyvumu. Du oligonukleotidų pradmenys naudojami sukurti PGR reakcijos tipiniam amplikonui. Trečiasis oligonukleotidas, arba zondas, skirtas nustatyti tarp dviejų PGR pradmenų esančią nukleotidų seką. Zondas yra

nepailginamas Taq DNR polimerazės fermentu ir žymėtas reporterio fluorescuojančiais dažais ir gesinančiais fluorescuojančiais dažais. Bet kokia laserio indukuota emisija iš reporterio fluorescuojančių dažų yra gesinama gesinančiais dažais, jeigu du dažai yra arti vienas kito, kaip jie yra ant zondo. Amplifikacijos reakcijos metu Taq DNR polimerazės fermentas skaldo zondą nuo matricos priklausomu būdu. Gaunami zondo fragmentai disocijuoja tirpale ir signalas iš išlaisvinto reporterinio dažo yra laisvas nuo antrojo fluoroforo gesinančiojo efekto. Viena reporterio dažų molekulė yra išlaisvinta už kiekvieną naujai susintetintą molekulę, ir neužgesintų reporterio dažų nustatymas nurodo pagrindą kiekybinei duomenų interpretacijai.

TaqMan RT-PGR gali būti atliekama, naudojant komerciškai prieinamas priemones, tokias, kaip pavyzdžiui, ABI PRISM 7700TM Sequence Detection SystemTM (Perkin-Elmer-Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), arba Lightcycler (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). Pateiktame įgyvendinime 5' nukleazės atlikimo metodika tęsiasi realiam laike, naudojant kiekybinę PGR priemonę, tokią kaip ABI PRISM 7700TM Sequence Detection SystemTM. Sistema susideda iš termociklerio, lazerio, krūvio keitimo prietaisas (CCD), kameros ir kompiuterio. Sistema amplifikuoja pavyzdžius termocikleryje 96 šulinėlių formate. Amplifikacijos metu lazerio indukuotas fluorescentinis signalas surenkamas realiam laike per pluoštinį optinį kabelį visiems 96 šulinėliams ir detektuojamas CCD. Sistema apima programinę įrangą instrumento veiklai ir duomenų analizavimui.

5'-nukleazės analizės rezultatų duomenys pradžioje ekspresuojami kaip Ct, arba slenkstinis ciklas. Kaip aptarta aukščiau, fluorescencijos reikšmės yra fiksuojamos kiekviename cikle ir atspindi amplifikacijos reakcijoje tuo metu suamplifikuoto produkto kiekį. Taškas, kai fluorescentinis signalas yra pirma fiksuojamas kaip statistiškai svarbus, yra slenkstinis ciklas (Ct). ΔCt reikšmės yra naudojamos kaip kiekybinis įvertinimas santykinio skaičiaus starto kopijų konkretaus taikinio sekos nukleino rūgšties pavyzdyje, jeigu palyginti RNR ekspresiją ląstelėje iš nesveiko audinio su tuo normalioje ląstelėje.

Norint sumažinti klaidas ir iš pavyzdžio į pavyzdį perėjimo efekto pakitimus, RT-PGR atliekama naudojant vidinį standartą. Idealus vidinis standartas ekspresuojamas pastoviu lygiu skirtinguose audiniuose ir yra nepaveiktas eksperimentinio apdoravimo. RNR dažniausiai naudojamos genų ekspresijos būdams normalizuoti yra iRNR gyvybiškai svarbių funkcijų genų – glicerinaldehido-3-fosfato dehidrogenazės (GAPDH) ir β -aktino.

Diferencinė genų ekspresija gali būti taip pat identifikuota arba patvirtinta, naudojant mikrogardelių techniką. Šiame metode dominančios nukleotidų sekos yra paklojamos arba

išdėstomos ant mikročipų substrato. Išdėstytos sekos po to hibridizuojamos su specifiniais DNR zondais iš dominančių ląstelių arba audinių.

Specifiniame mikrogardelių technikos įgyvendinime, PGR amplifikacijos įterpti cDNR klonai yra taikomi prie substrato dideliu rinkiniu. Geriausiai mažiausiai 10000 nukleotidų sekų yra taikomos prie substrato. Genai, išdėstyti ant mikrogardelių, imobilizuoti ant mikročipų 10000 elementų kiekvienas, yra tinkami hibridizacijai, esant griežtoms sąlygoms. Fluorescentiškai žymėti cDNR zondai gali būti generuojami inkorporuojant fluorescentinius nukleotidus iš dominančių audinių ekstrahuotos RNR atvirkštine transkripcija. Žymėti cDNR zondai pritaikyti prie čipo selektyviai hibridizuojasi su kiekvienu DNR gardelės tašku. Po privalomo plovimo, kad būtų pašalinti nespecifiškai prisijungę zondai, čipas skanuojamas konfokaline lazerio mikroskopija. Kiekvieno išdėstyto elemento hibridizacijos kiekybinis įvertinimas galimas įvertinant atitinkamos iRNR perteklių. Su dvejopa spalvos fluorescencija, atskirai žymėti cDNR zondai generuoti iš dviejų RNR šaltinių hibridizuoti poromis prie gardelės. Santykinis perteklius transkriptų iš dviejų šaltinių atitinkančių kiekvienam tiksliai apibūdintam genui tokiu būdu nustatomas vienu metu. Sumažinta hibridizacijos skalė pateikia patogų ir greitą didelio skaičiaus genų ekspresijos įvertinimo būdą. Tokie metodai parodė, kad reikia turėti jautrumą, reikalingą nustatyti retai pasitaikančių genų transkriptus, kurie ekspresuojami nuo keleto kopijų iš ląstelės ir atkuriamai nustatyti mažiausiai vidutiniškai dukartinį ekspresijos lygių skirtumą (Scheno ir kt., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93(20)L106-49). Nukleino rūgščių hibridizacijos metodologija ir mikrogardelių technologija yra gerai žinoma šioje srityje.

MCP-1 agonistai ir antagonistai

Čia aprašyto išradimo įgyvendinimai taip pat susiję su MCP-1 baltymo variantais, kurie funkcionuoja kaip bet kuris MCP-1 agonistas (mimetikas) arba kaip MCP-1 antagonistas. MCP-1 baltymo variantai gali būti generuoti mutagenezės būdu, pvz. pavienne taškine mutacija arba MCP-1 baltymo trumpinimu. MCP-1 baltymo agonistas gali išlaikyti iš esmės tą patį arba dalinį biologinį aktyvumą natūraliai pasitaikančios MCP-1 baltymo formos. MCP-1 baltymo antagonistas gali inhibuoti vieną arba daugiau aktyvumų natūraliai pasitaikančio MCP-1 baltymo, pavyzdžiui, pagal konkurencinį susirišimą su nariais, esančiais prieš ir už ląstelinės signalinės kaskados, kuri apima MCP-1 baltymą. Taigi, specifiniai biologiniai efektai gali būti išgauti veikiant su įvairiomis ribotomis funkcijomis. Šiame įgyvendinime subjekto veikimas variantu, turinčiu natūraliai pasitaikančio baltymo formos biologinių aktyvumų dalį, turi mažesnę pašalinį efektą subjekte atitinkamai veikimui su natūraliai pasitaikančia MCP-1 baltymo forma.

MCP-1 baltymo variantai, kurie funkcionuoja arba kaip MCP-1 agonistas (mimetikas) arba kaip MCP-1 antagonistas, gali būti identifikuoti tikrinant MCP-1 baltymo mutantų kombinatorines bibliotekas, pvz. sutrumpinimo mutantų, pagal baltymo agonistinį arba antagonistinį aktyvumą. Šiame įgyvendinime MCP-1 variantų nevienalytė biblioteka yra generuojama kombinatorine mutageneze nukleino rūgščių lygyje ir yra užkoduota nevienalytė genų biblioteka. MCP-1 variantų nevienalytė biblioteka gali būti produkuota, pavyzdžiui, fermentiškai liguojant sintetinių oligonukleotidų mišinį į genų sekas, tokias kaip išsigimęs rinkinys potencialių MCP-1 sekų yra ekspresuojamas kaip individualus peptidas, arba atvirkščiai, kaip rinkinį didesnių sulietų baltymų (pvz. fagų atvaizdavimui) turinčių MCP-1 sekų rinkinį jame. Egzistuoja metodų įvairovė, kurie gali būti naudojami produkavimui potencialių MCP-1 variantų bibliotekų iš išsigimusių nukleotidų sekų. Išsigimusių genų sekų cheminė sintezė gali būti atlikta automatinio DNR sintezatoriumi ir sintetiniai genai gali būti po to suliguoti į atitinkamą ekspresijos vektorių. Išsigimusio genų rinkinio naudojimas įgalina viename mišinyje aprūpinti visomis sekomis, koduojančiomis norimą rinkinį potencialių MCP-1 variantų sekų. Išsigimusių nukleotidų sintezės metodai yra gerai žinomi šioje srityje (žiūr. pvz. Narang, Tetrahedron 39:3 (1983); Itakura ir kt., Annu. Rev. Biochem. 53:323 (1984); Itakura ir kt., Science 198:1056 (1984); Ike ir kt., Nucl Acid Res. 11:477 (1983).

Kitų gydymo metodų numatymas ir sukūrimas

Pagal šio išradimo čia aprašytus įgyvendinimus ir remiantis aktyvumais antikūnų, kurie yra produkuoti ir charakterizuoti čia MCP-1 atžvilgiu, numatymas kitų gydomųjų modalumų, išskyrus antikūnų dalis, yra pagalbinis. Tokie modalumai apima, be išimčių, pažangią antikūnų terapiją, tokius kaip dvispecifinius antikūnus, imunotoksinus ir radioizotopų terapiją, peptidų terapijos generavimą, genų terapiją, ypač intraantikūnus, antiprasmę terapiją ir mažas molekules.

Sąryšyje su pažangios antikūnų terapijos kūrimu, kur komplemento fiksavimas yra norimas požymis, galima išvengti priklausomybės nuo komplemento ląstelių žūties naudojant, pavyzdžiui, dvispecifinius, imunotoksinus arba radioizotopus.

Pavyzdžiui, sąryšyje su dvispecifiniais antikūnais, dvispecifiniai antikūnai gali būti generuoti, kurie apima (i) du antikūnus – vieną su specifiskumu MCP-1 ir kitą su antra molekule, kurios yra konjuguotos kartu, (ii) vieną antikūną, kuris turi vieną grandinę specifinę MCP-1 ir antrą grandinę, specifinę antrajai molekulei, arba (iii) vieną antikūno grandinę, kuri turi specifiskumą MCP-1 ir kitą molekulę. Tokie dvispecifiniai antikūnai gali būti generuoti naudojant gerai žinomas metodikas, pavyzdžiui, sąryšyje su (i) ir (ii) žiūr. pvz., Fanger ir kt. Immunol Methods 4:72-81 (1994) ir Wright ir Harris, aukščiau ir sąryšyje

su (iii) žiūr. pvz. Traunecker ir kt. Int. J. Cancer (Suppl.) 7:51-52 (1992). Kiekvienu atveju, antrasis specifiskumas gali būti gautas sunkiosios grandinės aktyvavimo receptoriais, įskaitant, be apribojimų, CD16 arba CD64 (žiūr. pvz. Deo ir kt. 18:127 (1997)) arba CD89 (žiūr. pvz. Valerius ir kt. Blood 90:4485-4492 (1997)).

Sąryšyje su imunitoksiniais, antikūnai gali būti modifikuoti taip, kad veiktų kaip imunitoksinai, naudojant gerai žinomas šioje srityje metodikas. Žiūr. pvz. Vitetta Immunol. Today 14:252 (1993). Žiūr. taip pat JAV patentą Nr. 5,194,594. Sąryšyje su ruošimu radioizotopais žymėtų antikūnų, tokie modifikuoti antikūnai lengvai gali būti paruošti, naudojant gerai žinomas šioje srityje metodikas. Žiūr. pvz. Junghans ir kt. in Cancer Chemotherapy and Biotherapy 655-686 (2nd edition, Chafner and Longo, eds., Lippincott Raven (1996)). Žiūr. taip pat JAV patentus Nr. 4,681,581, 4,735,210, 5,101,827, 5,102,990, (RE 35,500), 5,648,471 ir 5,697,902.

Terapinis skyrimas ir kompozicijos

Biologiškai aktyvūs anti-MCP-1 antikūnai paruošti pagal čia aprašytą išradimą gali būti naudojami steriliuose farmaciniuose preparatuose arba kompozicijose neutralizuoti MCP-1 produkuoto aktyvumo nesveikuose ir uždegimo paveiktuose audiniuose, tuo užkertant tolimesnį vienbranduolinių ląstelių skverbimąsi į audinius. Tokie nesveiki ir uždegimo paveikti audiniai pasitaiko daugelyje tipų žmogaus vėžio, įskaitant krūties, kiaušidžių ir plaučių vėžį ir esant sąlygoms, tokioms kaip glomeronefritas, arteriosklerozė ir išsėtinė sklerozė. Biologiškai aktyvus šio išradimo anti-MCP-1 antikūnas gali būti naudojamas vienas arba derinyje su kitais terapiniais agentais. Prieš vėžį anti-MCP-1 antikūnai gali būti derinami su tradiciniais chemoterapijos būdais, tokiais kaip taksolas, doksorubicinas, cisplatina, 5-fluoruracilas ir kitais naujais angiogenezės proceso inhibitoriais. Uždegiminių ligų gydymui MCP-1 antikūnai gali būti derinami su steroidais arba antikūnais prieš kitus citokinus ir chemokinus, kurie padeda ligos būklei.

Jeigu naudojama įvedimui in vivo, antikūno kompozicija galėtų būti sterili. Tai gali būti lengvai pasiekama filtruojant per sterilias filtravimo membranas, prieš arba po to sekančios liofilizacijos ir atstatymo. Antikūnai įprastai turėtų būti laikomi liofilizuotoje formoje arba tirpale. Terapinės antikūnų kompozicijos dažniausiai patalpinamos į konteinerį, turintį sterilią priėjimo angą, pavyzdžiui, intraveninių tirpalų maišelis arba buteliukas, turintis kamštį praduriamą su poodinių injekcijų adata.

Antikūno įvedimo kelias gali būti įprastiniais būdais, pvz. injekcija arba intraveninė infuzija, į pilvaplėvę, į smegenis, į raumenis, į akis, į arteriją, į stuburo kanalo ertmę, inhaliacija arba į pažeistus audinius arba nepertraukiamo atpalaidavimo sistemomis, kaip

nurodyta žemiau. Antikūnas geriau įvedamas be perstojo infuzijos būdu arba didelių piliulių injekcijomis.

Efektyvus antikūno kiekis, kuris taikomas terapiškai, turėtų priklausyti, pavyzdžiui, nuo terapinių tikslų, įvedimo būdo, ir paciento būklės. Atitinkamai, terapeutui turėtų būti svarbu nustatyti dozę ir įvedimo būdą, kaip reikalinga nustatyti optimalų terapinį efektą. Tipiškai, gydytojas praktikas turėtų skirti antikūną iki pasiekiamą dozė, kuri duoda norimą efektą. Šios terapijos progresas yra lengvai matuojamas įprastiniais būdais arba čia aprašytais būdais.

Išradimo antikūnai gali būti paruošti mišinyje su farmaciškai priimtinu nešikliu. Ši terapinė kompozicija gali būti įvesta intraveniniu būdu arba per nosį arba plaučius, geriau kaip skystis arba milteliai aerosoliniame pavidale (liofilizuoti). Kompozicija gali būti įvesta parenteraliai arba po oda, jeigu norima. Jeigu paskiriama sistemiškai, terapinė kompozicija turėtų būti sterili, apirogeninė ir parenteraliai priimtinas tirpalas turėtų turėti atitinkamą pH, izotoniškumą ir stabilumą. Šios sąlygos gerai žinomos šios srities specialistui. Trumpai tariant, čia aprašyto išradimo įgyvendinimų dozavimo kompozicijos yra paruoštos saugojimui arba įvedimui sumaišant junginį, turintį norimą švarumo laipsnį su fiziologiškai priimtinu nešikliais, užpildais arba stabilizatoriais. Tokia medžiaga yra netoksiška recipientams taikomomis dozėmis ir koncentracijomis ir apima buferius, tokius kaip Tris HCL, fosfatinį, citratinį, acetatinį ir kitų organinių druskų; antioksidantus, tokius kaip askorbininė rūgštis; žemos molekulinės masės (mažiau negu dešimt liekanų) peptidus, tokius kaip poliargininas, baltymus, tokius kaip serumo albuminas, želatina arba imunoglobulinai; hidrofilinius polimerus, tokius kaip polivinilpirolidonas,; aminorūgštis tokias kaip glicinas, glutamino rūgštis, asparagino rūgštis arba argininas; monosacharidus, disacharidus ir kitus karbohidratus, įskaitant celiuliozę arba jos darinius, gliukozę, manozę arba dekstrinus; chelatininius agentus, tokius kaip EDTA; cukraus alkoholius, tokius kaip manitolis arba sorbitolis; priešjoninius agentus tokius kaip natris ir/arba nejoninės paviršinio aktyvumo medžiagos tokios kaip TWEEN, PLURONICS arba polietilenglikolis.

Sterilios kompozicijos injekcijoms gali būti ruošiamos pagal įprastinę farmacijos praktiką, kaip aprašyta Remington's Pharmaceutical Sciences (18th ed, Mack Publishing Company, Easton, PA (1990)). Pavyzdžiui, aktyvus junginys ištirpinamas arba suspenduojamas nešiklyje tokiame kaip vanduo arba natūraliai pasitaikantis augalinis aliejus, toks kaip sezamo, žemės riešutų, medvilnės sėklų arba sintetiniame nešiklyje kaip etilo oleatas arba panašiam, kuris gali būti reikalingas. Buferiai, konservantai, antioksidantai gali būti įjungiami pagal priimtą farmacinę praktiką.

Atitinkami ilgalaikio atpalaidavimo ruošinių pavyzdžiai apima tirpių hidrofobinių polimerų, turinčių polipeptidus, pusiau pralaidžias matricas, kur matricos yra turintys tam tikrą pavidalą daiktai, plėvelės arba mikrokapsulės. Ilgalaikio atpalaidavimo matricų pavyzdžiai apima poliesterius, hidrogelius (pvz., poli(2-hidroksietil-metakrilatas) kaip aprašyta Langer ir kt., J. Biomed Mater. Res., 15:167-277 (1981) ir Langer, Chem. Tech., 12:98-105 (1982) arba poli(vinilalkoholis)), polilaktidus (JAV patentas Nr. 3,773,919, EP 58481), L-glutamino rūgšties kopolimerus ir gama etil-L-glutamata (Sidman ir kt., Biopolymers, 22:547-556 (1983)), nedegraduojantį etileno vinilacetatą (Langer ir kt., aukščiau), degraduojančius pieno rūgšties – glikolio rūgšties kopolimerus, tokius kaip LUPRON DepotTM (išvirkščiami mikrorutuliukai sudaryti iš pieno rūgšties – glikolio rūgšties kopolimero ir leuprolido acetato) ir poli-D-(-)-3-hidroksisviesto rūgšties (EP 133988).

Kadangi polimerų, tokių kaip etileno vinilacetatas ir pieno rūgštis – glikolio rūgštis negali atpalaiduoti molekulių daugiau kaip per 100 dienų, kai kurie hidrogeliai atpalaiduoja baltymus per trumpesnę laiko periodą. Jeigu įdėti į kapsulę baltymai pasilieka kūne ilgą laiko tarpą, jie gali denatūruotis arba agreguotis nuo buvimo drėgmėje prie 37 °C, rezultate prarasdami biologinį aktyvumą ir galimai pasikeičiant imunogeniškumui. Baltymų stabilizavimui gali būti surasta racionali strategija, priklausomai nuo dalyvaujančio mechanizmo. Pavyzdžiui, jeigu surasta, kad agregacijos mechanizmas yra tarpmolekuliinių S-S jungčių formavimasis apsikeičiant disulfidais, stabilizacija gali būti pasiekta modifikuojant sulfhidrilines grupes, liofilizuojant iš rūgštinio tirpalo, kontroliuojant drėgmės kiekį, naudojant tam tikrus priedus ir tobulinant specifines polimerinės matricos kompozicijas.

Ilgalaikio atpalaidavimo kompozicijos taip pat apima išradimo antikūnus, apgaubtus liposomų. Liposomos, turinčios tokius antikūnus, yra gaunamos pagal žinomus metodus: JAV patentas Nr. DE 3,218,121; Epstein ir kt., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030-4034 (1980); EP 52322; EP 36676; EP 88046; EP 143949; 142641; Japonijos patento paraiška 83-118008; JAV patentai Nr. 4,485,045 ir 4,544,545; ir EP 102324. Antikūno dozė turėtų būti nustatyta gydančio gydytojo atsižvelgiant į įvairius faktorius, žinomai modifikuojančius vaisto veikimą, įskaitant ligos sunkumą ir tipą, kūno svorį, lytį, dietą, įvedimo laiką ir būdą, kitus medikamentus ir kitus svarbius klinikinius faktorius. Terapiškai efektyvi dozė gali būti nustatyta bet kuriais *in vivo* ir *in vitro* metodais.

Antikūno kompozicijos dozė konkrečiam pacientui turėtų būti nustatyta gydančio gydytojo, atsižvelgiant į įvairius faktorius, žinomai modifikuojančius vaisto veikimą, įskaitant ligos sunkumą ir tipą, kūno svorį, lytį, dietą, įvedimo laiką ir būdą, kitus medikamentus ir kitus svarbius klinikinius faktorius. Terapiškai efektyvi dozė gali būti nustatyta bet kuriais *in vivo* ir *in vitro* metodais.

Šioišradimo antikūno taikomas efektyvus kiekis turėtų priklausyti, pavyzdžiui, nuo terapinių tikslų, įvedimo būdo ir paciento būklės. Taigi, gydančiam gydytojui turėtų būti svarbu nustatyti dozę ir modifikuoti įvedimo būdą kaip reikalinga gauti optimalų terapinį efektą. Tipinė dienos dozė galėtų svyruoti nuo maždaug 0,001mg/kg iki 100 mg/kg arba daugiau, priklausomai nuo aukščiau paminėtų faktorių. Tinkamos dozės koncentracijos apima 0,001 mg/kg, 0,005 mg/kg, 0,01 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40 mg/kg, 45 mg/kg, 50 mg/kg, 55 mg/kg, 60 mg/kg, 65 mg/kg, 70 mg/kg, 75 mg/kg, 80 mg/kg, 85 mg/kg, 90 mg/kg, 95 mg/kg ir 100 mg/kg arba daugiau. Tipiškai, gydantis gydytojas turi skirti terapinį antikūną kol pasiekama dozė, duodanti norimą efektą. Šios terapijos progresas yra lengvai matuojamas įprastiniais būdais arba čia aprašytais būdais.

PAVYZDŽIAI

Sekantys pavyzdžiai, apimantys praveistus eksperimentus ir pasiektus rezultatusyra pateikti tik iliustraciniais tikslais ir neturėtų būti vertinami kaip apribojantys čia aprašyto išradimo tolimesnius įgyvendinimus.

1 PAVYZDYS

MCP-1 antigeno paruošimas

Žmogaus MCP-1 peptidas, naudojamas kaip antigenas šiame tyrime turi sekančią aminorūgščių seką:

QPDAINAPVTCCYNFTNRKISVQRLASYRRITSSKCPKEAVIFKTIVAKEICADP
KQKWVQDSMDHLDKQTQTPKT (SEQ ID NO: 149)

Šis peptidas buvo rekombinantiškai ekspresuotas *E. coli* ir įsigytas iš Prepro Tech (Rocky Hill, NJ).

2 PAVYZDYS

Anti-MCP-1 antikūnai

Antikūnų generavimas

Gyvūnų imunizavimas ir atranka surinkimui ELISA. Monokloniniai antikūnai prieš MCP-1 buvo sukurti nuosekliai imunizuojant XenoMouse® peles (XenoMouse® kamienai XMG2, XMG4 (3C-1 kamienas) ir hibridinis kamienas, sukurtas sukryžminus XMG2 su XMG4 (3C-1 kamienas) peles, Abgenix, Inc. Fremont, CA) pagal planą, parodytą 2 lentelėje. Pavyzdžiui, pradinė imunizacija buvo su 10 µg antigeno sumaišyto 1:1 t/t su TiterMax Gold. Nuosekliai keliant buvo atlikta su 5 arba 10 µg antigeno, sumaišyto su 100 µg alūnų geliu apirogeniniame D-PBS. Kai kurie padidėjimai buvo pasiekti su 50 % TiterMax Gold, sekantys po trijų injekcijų su 10 µg antigeno, sumaišyto 1:1 t/t su 10 µg MCP-1 antigeno

alūnų gelyje, ir po to galutinis padidėjimas 10 μg antigeno PBS. Ypatingai, kiekviena pelė buvo imunizuojama injekuojant po oda į papadę. Gyvūnai buvo imunizuojami dienomis: 0, 4, 7, 10, 14, 18, 27, 31, 35 ir 42. Gyvūnams 13 ir 26 dieną buvo nuleistas kraujas serumo išskyrimui ir selekcijos atlikimui, kaip aprašyta žemiau.

2 lentelė

Gru pė	Kamie nas	Pel ės Nr.	1-ma injekcija	2-as padidini mas	3-as padidini mas	4-as padidini mas	Kraujo nuleidi mas	5-as padidini mas	6-as padidini mas
1	xmg2	7	10 $\mu\text{g}/\text{pelei}$	5 $\mu\text{g}/\text{pelei}$	5 $\mu\text{g}/\text{pelei}$	5 $\mu\text{g}/\text{pelei}$		5 $\mu\text{g}/\text{pelei}$	5 $\mu\text{g}/\text{pelei}$
2	3C-1	7	10 $\mu\text{g}/\text{pelei}$	5 $\mu\text{g}/\text{pelei}$	5 $\mu\text{g}/\text{pelei}$	5 $\mu\text{g}/\text{pelei}$		5 $\mu\text{g}/\text{pelei}$	5 $\mu\text{g}/\text{pelei}$
3	3C-1 x xmg2	7	10 $\mu\text{g}/\text{pelei}$	5 $\mu\text{g}/\text{pelei}$	5 $\mu\text{g}/\text{pelei}$	5 $\mu\text{g}/\text{pelei}$		5 $\mu\text{g}/\text{pelei}$	5 $\mu\text{g}/\text{pelei}$
			TiterMa x	Alūnų gelis	Alūnų gelis	Alūnų gelis		Alūnų gelis	TiterMa x
Die nos			0	4	7	10	13	14	18

2 lentelės tęsinys

Gru pė	Kamie nas	Kraujo nuleidi mas	7-as padidini mas	8-as padidini mas	9-as padidini mas	10-as padidini mas	Sulieji mas
1	xmg2		10 $\mu\text{g}/\text{pelei}$	10 $\mu\text{g}/\text{pelei}$	10 $\mu\text{g}/\text{pelei}$	10 $\mu\text{g}/\text{pelei}$	
2	3C-1		10 $\mu\text{g}/\text{pelei}$	10 $\mu\text{g}/\text{pelei}$	10 $\mu\text{g}/\text{pelei}$	10 $\mu\text{g}/\text{pelei}$	
3	3C-1 x xmg2		10 $\mu\text{g}/\text{pelei}$	10 $\mu\text{g}/\text{pelei}$	10 $\mu\text{g}/\text{pelei}$	10 $\mu\text{g}/\text{pelei}$	
			Alūnų gelis	Alūnų gelis	Alūnų gelis	D-PBS	
Die nos		26	27	31	35	42	46

Panašiai kitos XenoMouse® pelės (XenoMouse® kamienai XMG2 ir XMG2L3) buvo nuosekliai imunizuotos pagal planą, parodytą 3 lentelėje.

3 lentelė

Grupe	Kamienas	Pelės Nr.	1-ma injekcija	2-as padidini mas	3-as padidini mas	4-as padidini mas	Kraujo nuleidimas	5-as padidini mas	6-as padidini mas
4	xmg2	4	10 μg/pelei	10 μg/pelei	10 μg/pelei	10 μg/pelei		10 μg/pelei	10 μg/pelei
5	Xmg2 L3	4	10 μg/pelei	10 μg/pelei	10 μg/pelei	10 μg/pelei		10 μg/pelei	10 μg/pelei
			TiterMax	Alūnų gelis	Alūnų gelis	Alūnų gelis		Alūnų gelis	Alūnų gelis
Dienos			0	3	6	10	13	14	17

3 lentelės tęsinys

Grupe	Kamienas	Pelės Nr.	Suliejimas
4	xmg2	4	
5	xmg2L3	4	
Dienos			21

Anti-MCP-1 antikūno titras buvo nustatytas netiesiogine ELISA. Titro reikšmė yra atvirkštinė didžiausiam serumo praskiedimui su dvigubu OD rodmenimi, kaip pagrindas. Trumpai, MCP-1 (84 narių; 1 μg/ml) buvo padengtas ant Costar Labcoat Universal Binding Polystyrene 96 šulinėlių plokštelės per naktį prie keturių laipsnių. Tirpalas turintis nesurištą MCP-1 buvo pašalintas ir plokštelės buvo veikiamos UV šviesa (365 nm) 4 minutes (40000 mikrodžauliai). Plokštelės buvo 5 kartus plaunamos dH₂O. XenoMouse® serumas iš MCP-1 imunizuotų gyvūnų, arba sveikų XenoMouse® gyvūnų buvo titruotas 2 % pienas/PBS, esant praskiedimui 1:2 atitinkančiam iš 1:100 pradinio praskiedimo. Paskutinis šulinėlis buvo paliktas tuščias. Plokštelės buvo plautos penkis kartus dH₂O. Ožkos anti-žmogaus IgG Fc-spezifinis HRP-konjuguotas antikūnas buvo pridėtas galinėje koncentracijoje 1 μg/ml 1 val. esant kambario temperatūrai. Plokštelės buvo plautos penkis kartus dH₂O. Plokštelės buvo išryškintos pridedant TMB 30 min. Ir ELISA sustabdyta, pridedant 1 M fosforo rūgšties. Individualių XenoMouse® gyvūnų specifinis titras buvo nustatytas iš optinio tankio prie 450 nm ir parodytas 1, 5, 6, 7 ir 8 lentelėse. Titras atitinka atvirkštiniam serumo praskiedimui ir todėl aukščiausias skaičius didžiausiam humoraliniam imuniniam atsakui į MCP-1. Visų imunizuotų XenoMouse® gyvūnų limfiniai mazgai buvo surinkti suliejimui.

4 lentelė

1 grupė, papadė, xmg2, 7 pelės

Pelė ID	Kraujo nuleidimas 13-ą dieną po 4 injekcijų	Kraujo nuleidimas 26-ą dieną po 6 injekcijų	Suliejimas 46-ą dieną po 10 injekcijų
	Reaktyvumas prieš MCP-1 Titrai per hIgG		
N160-1	1000	73000	300000
N160-2	6500	600000	600000
N160-3	2300	250000	125000
N160-4	1400	125000	75000
N160-5	4000	200000	225000
N160-6	250	2400	18000
N160-7	60	1600	35000
NC	175	<100	200

5 lentelė

1 grupė, papadė, 3c-1, 7 pelės

Pelės ID	Kraujo nuleidimas 13-ą dieną po 6 injekcijų	Suliejimas 46-ą dieną po 10 injekcijų
	Reaktyvumas prieš MCP-1 Titrai per hIgG	
M724-1	35000	24000
M724-3	8000	7500
M724-5	8000	20000
N600-4	9000	7500
N600-5	1800	75000
N600-6	2200	20000
N600-7	8000	25000
NC	<100	<100

6 lentelė

3 grupė, papadė, 3c-1/xmg2(F1), 7 pelės

Pelės ID	Kraujo nuleidimas 13-ą dieną po 4 injekcijų	Kraujo nuleidimas 26-ą dieną po 6 injekcijų	Suliejimas 46-ą dieną po 10 injekcijų
	Reaktyvumas prieš MCP-1 Titrai per hIgG		
M219-1	50	2200	8000
M219-2	<100	9000	18000
M246-3	800	7000	18000
M246-5	850	18000	65000

M246-9	<100	18000	55000
M344-6	<100	800	12000
M344-10	<100	6000	25000
NC	200	225	175

7 lentelė

4 grupė, XMG2, papadė, 4 pelės

Pelė ID	Kraujo nuleidimas 13-ą dieną po 4 injekcijų		Kraujo nuleidimas 21-ą dieną po 6 injekcijų	
	Žmogaus MCP-1	Žmogaus MCP-1	Žmogaus MCP-1	Žmogaus MCP-1
	Reaktyvumas prieš MCP-1 Titrai per hIgG	Reaktyvumas prieš MCP-1 Titrai per hL	Reaktyvumas prieš MCP-1 Titrai per hIgG	Reaktyvumas prieš MCP-1 Titrai per hL
N493-1	<100	<100	2500	<100
N493-2	<100	<100	1000	<100
N493-3	300	<100	4500	<100
N493-4	800	<100	10000	<100
NC	900	100	600	<100
*PC	8000		3000	

8 lentelė

5 grupė, XMG2L3, papadė, 4 pelės

Pelė ID	Kraujo nuleidimas po 4 injekcijų		Kraujo nuleidimas po 6 injekcijų	
	Žmogaus MCP-1	Žmogaus MCP-1	Žmogaus MCP-1	Žmogaus MCP-1
	Reaktyvumas prieš MCP-1 Titrai per hIgG	Reaktyvumas prieš MCP-1 Titrai per hL	Reaktyvumas prieš MCP-1 Titrai per hIgG	Reaktyvumas prieš MCP-1 Titrai per hL
N259-12	300	300	2000	700
N259-14	100	400	2500	650
N269-2	700	200	2800	500
N263-3	900	900	24000	8000
NC	900	100	600	<100
*PC	8000		3000	

*4-8 lentelėse, NC (neigiama kontrolė) = XMG2 KLH 1 grupė, papadė L627*6

PC (teigiama kontrolė) = XMG2 MCP-1 1 grupė, papadė N160-1

Limfocitų atstatymas, B ląstelių išskyrimas, suliejimas ir hibridomų generavimas.
Imunizuotos pelės buvo skerdžiamos pagal kaklo dislokaciją ir limfiniai mazgai surenkami iš kiekvienos grupės. Limfoidinės ląstelės atskiriamos sutrinant DMEM, kad ląstelės būtų išlaisvintos iš audinių ląstelės būtų suspenduotos DMEM. Ląstelės buvo suskaičiuotos, ir į ląstelių nuosėdas prideėta 0,9 ml DMEM 100-ai milijonų limfocitų, ląstelės buvo atsargiai, bet pilnai suspenduotos. Naudojant 100 µl CD90⁺ magnetinių rutuliukų 100-ai milijonų ląstelių, ląstelės buvo pažymėtos

inkubuojant su magnetiniais rutuliukais 15 min. prie 4 °C. Magnetiškai pažymėta ląstelių suspensija, turinti iki 10^8 teigiamų ląstelių (arba iki 2×10^8 ląstelių iš viso) buvo užnešta ant LS+ kolonėlės ir kolonėlė plauta su DMEM. Ištekantis skystis buvo surinktas kaip CD90 neigiama frakcija (dauguma šių ląstelių yra B ląstelės).

P3 mielomos ląstelės ir B ląstelėmis praturtintos limfinių mazgų ląstelės buvo sumaišytos santykiu 1:1 (mieloma : limfiniai mazgai) 50 ml kūgio pavidalo mėgintuvėlyje DMEM. Sumaišytos ląstelės buvo centrifuguojamos prie 800xg (2000 aps.) 5-7 minutes ir supernatantas tuojau pašalinamas nuo susidariusių nuosėdų. Buvo pridedama du arba keturi ml pronazės tirpalo (CalBiochem, Kat. Nr.53702; 0,5 mg/ml PBS) ir ląstelių nuosėdos atsargiai resuspenduojamos. Fermentui buvo leidžiama veikti ne ilgiau, kaip dvi minutes ir reakcija stabdoma pridedant 3-5 ml FBS. Pakankamai ECF tirpalo buvo pridėta iki bendro tūrio 40 ml ir mišinys centrifuguojamas prie 800xg (2000 aps.) 5-7 minutes. Supernatantas pašalintas ir ląstelių nuosėdos atsargiai resuspenduotos mažame ECF tūryje, pakankamame, kad bendras tūris būtų 40 ml. Ląstelės buvo gerai sumaišomos ir suskaičiuojamos, po to centrifuguojamos prie 800xg (2000 aps.) 5-7 minutes. Supernatantas pašalintas ir ląstelės resuspenduojamos mažame ECF tirpalo tūryje. Buvo pridedamas tam tikras tūris ECF tirpalo, kad būtų suderinta koncentracija iki 2×10^6 ląstelių/ml.

Po to ląstelės buvo patalpintos į Electro-Cell-Fusion (ECF) generatorių (Modelis ECM2001, Genetronic, Inc., San Diego, CA) ir sulietos pagal gamintojų instrukcijas. Po ECF, ląstelių suspensija atsargiai pašalinta iš suliejimo kameros, esant sterilioms sąlygoms, ir perkeltos į sterilų mėgintuvėlį, turintį tą patį tūrį Hybridoma Medium DMEM. Ląstelės buvo inkubuotos 15-30 minučių prie 37 °C, po to centrifuguotos prie 400xg (1000 aps) penkias minutes. Ląstelės buvo atsargiai resuspenduotos mažame tūryje $\frac{1}{2}$ HA terpės (1 flakonas 50X HA Sigma, Kat. Nr. A9666 ir 1 litras Hybridoma Medium) ir tūris atitinkamai pakoreguotas su daugiau $\frac{1}{2}$ HA terpės (remiantis tuo, kad 5×10^6 B ląstelių 96 šulinėlių plokštei ir 200 μ l/šulinėliui). Ląstelės buvo gerai sumaišomos, pipete užnešamos į 96 šulinėlių plokšteles ir auginamos. 7-tą arba 10-tą dieną pusė terpės buvo pašalinta ir ląstelės iš naujo pamaitintos $\frac{1}{2}$ HA terpe.

Tiriamų antikūnų atrinkimas ELISA-ai. Po 14 dienų auginimo, hibridomos supernatantas buvo tikrinamas dėl MCP-1 specifinių monokloninių antikūnų. ELISA plokštelės (Fisher, Kat. Nr. 12-565—136) buvo padengtos 50 μ l/šulinėliui MCP-1 (2 μ g/ml) padengimo buferyje (0,1 M karbonatinis buferis, pH 9,6, NaHCO_3 8,4 g/l), po to inkubuojamos per naktį prie 4 °C. Po inkubavimo ląstelės buvo tris kartus plaunamos plovimo buferiu (0,05 % Tween 20 PBS). Buvo pridėta 200 μ l/šulinėliui blokavimo buferio (0,5 % BSA, 0,1 % Tween 20, 0,01 % Thimerosal 1-kartiniame PBS) ir ląstelės inkubuotos kambario temperatūroje 1 valandą. Po inkubavimo plokštelės tris kartus plaunamos plovimo buferiu. 50 μ l/šulinėliui hibridomos supernatantas ir

teigiama bei neigiama kontrolė buvo pridedama ir plokštelės inkubuojamos kambario temperatūroje 2 valandas.

Teigiama kontrolė visą laiką buvo XMG2 MCP-1 1 grupė, imunizuota į papades N160-7 ir neigiama kontrolė buvo XMG2 KLH 1 grupė, imunizuota į papades L627-6. Po inkubacijos plokštelės buvo tris kartus plaunamos plovimo buferiu. 100 µl/šulinėliui nustatomo antikūno ožkos anti žmogaus IgGfc-HRP (Caltag, Kat. Nr. H10507), (ir ožkos anti-hIgkappa-HRP (Southern Biotechnology, Kat. Nr. 2060-05) ir ožkos anti-hIglambda (Southern Biotechnology, Kat. Nr. 2070-05) antriniame patikrinime) buvo pridėta ir plokštelės inkubuotos kambario temperatūroje 1 valandą. Antriniame patikrinime buvo patikrinti trys pavyzdžių rinkiniai (teigiami pirmame patikrinime), vienas rinkinys dėl hIgG nustatymo, vienas rinkinys dėl hKappa nustatymo ir vienas rinkinys dėl hlamba nustatymo. Po inkubavimo plokštelės tris kartus buvo plaunamos plovimo buferiu. Buvo pridėta 100 µl/šulinėliui TMB (BioFX Lab. Kat. Nr. TMSK-0100-01) ir plokštelėms leista vystytis maždaug 10 minučių (iki neigiamos kontrolės šulinėliai vos tik pradės rodyti spalvą), po to pridėta 50 µl/šulinėliui stop tirpalo (TMB Stop Solution (BioFX Lab. Kat. Nr. STPR-0100-01) ir plokštelės skaitomos ELISA plokštelių skaitytuvu esant bangos ilgiui 450 nm. Teigiamų šulinėlių OD reikšmės pateiktos 9 lentelėje.

9 lentelė

mAb klonas	ELISA OD-MCP-1	IC50 Ca ⁺⁺ srautas (µg/ml)	IC50 chemotaksis (µg/ml)	Giminingumas (pMol)	Kryžminis reaktyvumas
1.1.1	3,638	0,24+0,034	0,27+0,034	2,7	
1.2.1	3,466	0,18+0,008	0,24+0,034	77	
1.3.1	4	0,12+0,012	0,24+0,059	55	
1.4.1	4	0,11+0,005	0,51+0,035	96	
1.5.1	0,51	0,21+0,027	0,34+0,054	4,2	
1.5.1	3,918	1+0,24	12+5,8	228	
1.7.1	3,521	0,11+0,013	0,35+0,064	4,9	
1.8.1	3,472	0,26+0,076	0,88+0,21	4	
1.9.1	3,6561	1,2+0,38	35+54	96	
1.10.1	3,845	0,18+0,11	1,2+0,55	9,6	
1.11.1	3,905	0,098+0,008	0,81+0,24	4,2	
1.12.1	4	0,13+0,02	0,35+0,039	13	
1.13.1	4	0,11+0,015	0,5+0,091	71	
1.14.1	2,064	0,41+0,1	0,58+0,18	6	
1.18.1	0,9984	0,18+0,055	0,29+0,07	3,8	
2.3.1	3,876	0,14+0,021	0,58+0,085	96	
2.4.1	3,892	0,26+0,18	>5	14	pelės JE
3.2	3,96			ND	MCP-2, MCP-3, eotaksinas

3.4.1	3,86	0,24+0,019	0,51+0,1	45	
3.5.1	3,765	0,58+0,29	3,1+1,1	100	
3.6.1	3,593	0,17+0,04	0,52+0,18	15	
3.7.1	4	0,094+0,023	0,98+0,019	4,8	
3.8.1	3,603	0,27+0,0280	0,7+0,19	3,4	
3.10.1	3,634	0,3+0,4	0,25+0,1	90	MCP-2, MCP-3 eotaksinas
3.11.1	4	0,092+0,023	0,33+0,47	3,3	MCP-2, MCP-3, MCP-4, eotaksinas
3.14.1	4	1,3+0,3	1,4+0,47	ND	
3.15.1	4	0,12+0,034	0,89+0,1	3,4	
3.16.1	3,921	0,16+0,08	0,4+0,081	25	
4.5.1	3,38	0,27+0,74	0,75+0,18	61	
4.6.1	3,51	0,31+0,06	0,4+0,056	330	
4.7.1	3,843	0,390,063	0,45+0,11	280	
4.8.1	4	0,22+0,77	0,29+0,032	102	
4.9.1	3,415	0,083+,0094	0,21+0,035	ND	
5.1	4	3,5+2,1	1,3+1,2	1610	
5.2.1	3,714	2,5+0,66	2,1+1,7	319	rantes
5.3.1	4	1,8+0,56	2,6+0,31	450	

ND = neatlikta

Anti-MCP-1 antikūnų biologinio aktyvumo charakterizavimas.

MCP-1 bioaktyvumo neutralizavimas anti- MCP-1 antikūnų-FLIPR būdu. DMSO ir pliuroninė rūgštis (20 % DMSO tirpalas) buvo pridėta į flakoną Fluo-4 (molekuliniai pavyzdžiai), kad būtų gauta galutinė 5 mM Fluo-4 koncentracija. THP-1 ląstelės buvo resuspenduotos pašildytame (37 °C) paleidimo buferyje prie 3×10^6 /ml ir pridėta 1 μ l Fluo-4 dažų vienam ml ląstelių iki galinės dažo koncentracijos 5 μ M. Ląstelės buvo inkubuotos tamsoje prie 37 °C 45-50 minučių. Po inkubavimo ląstelės buvo centrifuguotos prie 1000 aps. 5-10 min. Ląstelės buvo resuspenduotos prie 1,667 $\times 10^6$ /ml. Esant 200000 ląstelių/šulinėlyje koncentracijai, ląstelės buvo dedamos ant 96 šulinėlių plokštelės ir atsargiai centrifuguojamos. Užrašius pagrindiniu parodymus, antrieji rodmenys buvo užrašyti po nuoseklaus pridėjimo 3,5 nM MCP-1 esant arba nesant anti-MCP-1 antikūnų įvairioms koncentracijoms. Pridėjus MCP-1 į THP-1 ląsteles, pakyla viduląstelinis kalcis, vedantis į Fluo-4 dažo fluorescavimo intensyvumo sustiprėjimą. Pridėjus didėjančią koncentraciją neutralizuojančio antikūno, fluorescuojančio dažo intensyvumas ląstelėje mažėjo, tuomet reiškė, kad tiriamas antikūnas buvo neutralizuojamas. Išskiriamo antikūno koncentracija 50 % sumažino MCP-1 indukuotos fluorescencijos intensyvumą, kaip pavaizduota 9 lentelėje.

MCP-1 indukuotos ląstelių migracijos nuslopinimas. 96 šulinėlių chemotaksio automatizuotas bandymas buvo išvystytas naudojant THP-1 ląsteles ir Beckman Biomek F/X

automatinę sistemą. Naudojant specialiai pritaikytą 96 šulinėlių plokštelę, įremitas filtras su su filtro membrana, surištas su tvirtu rėmu, buvo nukreiptas į NeuroProbe 96 šulinėlių vienkartinę mikroplokštelę su šulinėlių tūriu arba 30 μ l arba 300 μ l ir porų diametru svyruojančiu tarp 2-14 μ m. Neuroprobe 96 šulinėlių plokštelė suteikia giluminius šulinėlius MCP-1 chemotaksio ir kitų reagentų išdėstymui, tokių kaip anti-MCP-1 antikūnai, ląstelių migracijos bandyme. Viršutiniai šulinėliai nebuvo reikalingi, kadangi įremiti filtrai buvo padengti hidrofobine kauke, kuri izoliuoja kiekvieną ląstelių suspensijos pavyzdį nuo viršutinės filtro pusės.

Optimalios sąlygos šiam bandymui buvo: 100000 ląstelių/šulinėlyje su 90 min inkubacija prie 37 °C. THP-1 ląstelių suspensijos, kurios buvo iš anksto pakrautos dažais iš Molecular Probes, buvo pipete užneštos tiesiog ant apatinės filtro pusės ir inkubuotos prie 37 °C 1-2 valandas. Po inkubacijos ląstelės, kurios migravo į filtro apačią ir į mikroplokštelę buvo suskaičiuotos ir patalpinant mikroplokštelę į FMAT, įsigytą iš Applied Biosystems.

MCP-1 indukuota ląstelių migracija prieš THP-1 ląsteles ir maksimali ląstelių migracija buvo pasiekta prie 1nM esant 10-15-kartiniui signalo santykiui su triukšmu. Naudojant bet kokią hibridomos supernatantą arba šviežią hibridomos terpę buvo nustatyta MCP-1 priklausoma migracija. Bandymo variantiškumas buvo minimalus (C.V~15). Migruojančių į filtro apačią ląstelių skaičius mažėjo nuo dozės priklausomu būdu, jeigu antikūnai prieš MCP-1 buvo įtraukti su chemotaksium.

Anti-MCP-1 antikūno giminingumo nustatymas, naudojant Biacore analizę. Antikūnas/MCP-1 sąveikos analizė buvo atlikta prie 25 °C, naudojant du CM5 čipus, sujungtus į Biacore 3000 optinį biosensorių. Individualios tekančios ląstelės ant kiekvieno čipo buvo aktyvuotos 7-minute NHS/EDC injekcija, karbohidratas buvo sujungtas per NHS esterį, naudojant 7-minutę injekciją ir galutinai aktyvuotos grupės buvo blokuotos 7-minute etanolamino injekcija. Kiekvieno antikūno monosacharido liekanos buvo oksiduotos, naudojant 1 mM natrio perjodatą 100 mM-iame natrio acetate, pH 5,5 prie 4 °C 30 min. Oksiduotas antikūnas buvo demineralizuotas į 10 mM natrio acetatą, pH 5,0, kad būtų sujungtas antikūnas su karbohidrazidu modifikuotu paviršiumi. mAb paviršius buvo stabilizuotas susilpninant hidrazono jungtį su 0,1 M natrio cianoborohidratu. Antigeno/antikūno sąveika buvo tirama injekuojant 0, 0,049, 0,15, 0,4, 1,3, 4 ir 12 nM MCP-1 (Peprotech, N. J.) elektroforezės buferyje (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,005 % paviršinio aktyvumo medžiagos, 200 μ g/ml BSA, pH 7,4). Paviršius buvo regeneruotas 12-sekundiniu impulsu 15 mM H₃PO₄. Antigeno/antikūno sąveika buvo tirama injekuojant dvigubus antigeno pavyzdžius, praskiestus elektroforezės buferiu (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,005 % paviršinio aktyvumo medžiagos, 200 μ g/ml BSA, pH 7,4), 300-kartiniam koncentracijos diapazone. Paviršius buvo regeneruotas 12-sekundiniu impulsu 15 mM H₃PO₄. Norint nustatyti kiekvienos

sąveikos kinetiką, duomenų rinkiniai buvo visuotinai pritaikyti prie sąveikos modelio 1:1, kuris apima masės pernešimo parametrus. Išskaičiuoti sąveikos giminumai pateikti 9 lentelėje.

Anti-MCP-1 antikūnų kryžminio reaktyvumo nustatymas su kitais chemokinais. ELISA plokštelės (Fusher Kat. Nr. 12-565-136) buvo padengtos su 50 µl/šulinėliui MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, RANTES, GRO-alfa, MIP-1 alfa eotaxin, žiurkių MCP-1 ir pelių JE (2 µg/ml) padengimo buferyje (0,1 M karbonatinis buferis, pH 9,6, NaHCO₃ 8,4 g/l), po to inkubuotos per naktį prie 4 °C. Po inkubacijos plokštelės buvo praplautos plovimo buferiu (0,05 % Tween 20 PBS) tris kartus. Buvo pridėta 200 µl/šulinėliui blokuojančio buferio (0,5 % BSA, 0,1 % Tween 20, 0,01 % Thimerosal 1-kartiname PBS) ir plokštelės inkubuotos kambario temperatūroje 1 valandą. Po inkubacijos plokštelės buvo praplautos plovimo buferiu tris kartus. 50 µl/šulinėliui hibridomos supernatantas ir buvo pridėta teigiama bei neigiama kontrolės (teigiama kontrolė buvo anti-MCP-1 antikūnas, pirktas iš R&D Sciences, ir neigiama kontrolė buvo antikūnas prieš sraigės limfos hemocianiną, produkuotas Abgenix) ir plokštelės inkubuotos kambario temperatūroje 2 valandas. Po inkubacijos plokštelės buvo praplautos plovimo buferiu tris kartus. Buvo pridėta 100 µl/šulinėliui nustaomo ožkos antikūno anti-huIgGfc-HRp (Caltag, Kat. Nr. H10507), (ožkos anti-hIgkappa-HRP (Southern Biotechnology, Kat. Nr. 2060-05) ir ožkos anti-hIglambda (Southern Biotechnology, Kat. Nr. 2070-05) antriniame tikrinime) ir plokštelės buvo inkubuotos kambario temperatūroje 1 valandą. Po inkubacijos plokštelės buvo praplautos plovimo buferiu tris kartus ir pridėta 100 µl/šulinėliui TMB (BioFX Lab. Kat. Nr. TMSK-0100-01) ir plokštelėms leista vystytis apie 10 minučių. Tuo metu buvo pridėta 50 µl/šulinėliui stop tirpalo (TMB Stop Solution (BioFX Lab. Kat. Nr. STPR-0100-01) ir plokštelės skaitomos ELISA plokštelių skaitytuvu esant bangos ilgiui 450 nm. Rezultatai pavaizduoti 10 lentelėje rodo, kad kai kurie anti-MCP-1 antikūnai kryžmiškai reaguoja su giminigais chemokinais.

10 lentelė

mAb	rmJE/MCP-1 2 µg/ml	Žiurkių MCP-1 1 µg/ml	rhMCP-2 2 µg/ml	rhMCP-3 2 µg/ml	rhMCP-4 2 µg/ml
1.1.1	0,045	0,051	0,051	0,064	0,052
1.2.1	0,041	0,044	0,056	0,048	0,055
1.3.1	0,046	0,048	0,065	0,052	0,048
1.4.1	0,042	0,05	0,046	0,049	0,045
1.5.1	0,043	0,045	0,047	0,069	0,05
1.6.1	0,042	0,062	0,042	0,046	0,044
1.7.1	0,041	0,042	0,044	0,053	0,041
1.8.1	0,045	0,049	0,048	0,054	0,046
1.9.1	0,053	0,065	0,04	0,044	0,042
1.10.1	0,041	0,059	0,04	0,047	0,052
1.11.1	0,041	0,052	0,041	0,043	0,043

1.12.1	0,042	0,062	0,042	0,046	0,044
1.13.1	0,043	0,06	0,046	0,047	0,045
1.14.1	0,042	0,062	0,042	0,046	0,044
1.18.1	0,044	0,058	0,04	0,045	0,045
2.3.1	0,054	0,058	0,052	0,059	0,064
2.4.1	0,129	0,077	0,045	0,066	0,06
3.4.1	0,044	0,053	0,042	0,05	0,047
3.5.1	0,042	0,053	0,042	0,045	0,044
3.6.1	0,047	0,046	0,052	0,045	0,048
3.7.1	0,046	0,048	0,043	0,048	0,048
3.8	0,042	0,062	0,042	0,046	0,044
3.10.1	0,054	0,045	0,845	0,167	0,042
3.11.1	0,063	0,057	0,336	1,317	0,981
3.14.1	0,044	0,046	0,045	0,05	0,045
3.15.1	0,041	0,05	0,043	0,046	0,051
3.16.1	0,042	0,046	0,049	0,043	0,043
4.5.1	0,049	0,055	0,042	0,046	0,046
4.6.1	0,049	0,05	0,047	0,05	0,047
4.7.1	0,042	0,062	0,042	0,046	0,044
4.8.1	0,042	0,091	0,041	0,043	0,039
4.9.1	0,05	0,05	0,046	0,049	0,05
5.1	0,044	0,054	0,051	0,05	0,043
5.2.1	0,04	0,054	0,041	0,048	0,041
5.3.1	0,05	0,047	0,043	0,045	0,043
3.2 (neat)	0,059	0,07	0,535	0,449	0,041
nc	0,042	0,134	0,045	0,084	0,074
pc	0,263	ND	ND	1,084	0,215

10 lentelės tęsinys

mAb	hGRO/MGSA 1 µg/ml	hMIP-1-alfa 1 µg/ml	hŽIURKIŲ 1 µg/ml	heotaksino 1 µg/ml	Teigiama kontrolė
					hMCP- 1(MCAF) 2 µg/ml
1.1.1	0,047	0,044	0,044	0,042	0,944
1.2.1	0,044	0,04	0,04	0,044	1,159
1.3.1	0,051	0,049	0,049	0,046	1,158
1.4.1	0,044	0,041	0,046	0,043	0,738
1.5.1	0,048	0,041	0,049	0,043	1,178
1.6.1	0,046	0,046	0,046	0,042	0,375
1.7.1	0,041	0,04	0,039	0,04	1,17
1.8.1	0,06	0,045	0,045	0,047	1,159
1.9.1	0,043	0,044	0,042	0,042	0,446
1.10.1	0,043	0,043	0,042	0,05	1,259
1.11.1	0,042	0,042	0,042	0,049	1,336
1.12.1	0,046	0,046	0,046	0,044	0,933
1.13.1	0,046	0,042	0,046	0,044	1,16
1.14.1	0,046	0,046	0,046	0,042	1,129
1.18.1	0,049	0,043	0,04	0,043	1,228
2.3.1	0,062	0,067	0,055	0,045	0,087

2.4.1	0,048	0,061	0,046	0,084	0,462
3.4.1	0,065	0,055	0,046	0,048	1,153
3.5.1	0,048	0,047	0,044	0,043	0,194
3.6.1	0,047	0,047	0,043	0,043	0,342
3.7.1	0,045	0,049	0,067	0,043	1,276
3.8	0,046	0,046	0,046	0,042	0,275
3.10.1	0,042	0,043	0,04	0,306	0,71
3.11.1	0,054	0,053	0,064	0,339	0,803
3.14.1	0,046	0,046	0,045	0,043	0,549
3.15.1	0,044	0,045	0,049	0,045	0,948
3.16.1	0,043	0,043	0,042	0,043	0,633
4.5.1	0,045	0,046	0,049	0,041	0,957
4.6.1	0,046	0,055	0,053	0,049	0,686
4.7.1	0,046	0,046	0,046	0,042	0,744
4.8.1	0,042	0,041	0,044	0,043	1,136
4.9.1	0,043	0,049	0,057	0,045	0,822
5.1	0,044	0,043	0,043	0,042	0,521
5.2.1	0,045	0,043	0,262	0,043	0,663
5.3.1	0,045	0,042	0,045	0,042	0,272
3.2 (neat)	0,042	0,041	0,043	0,194	0,235
nc	0,357	0,065	0,072	0,063	0,042
pc	1,075	0,794	1,219	0,221	0,281

Apdangalas: Ag @ 2 µg/ml arba 1 µg/ml; O/N

Ak: MCP-1 išvalyti klonai 1:50

Pc: 1 µg/ml; nc: D39,2 IL8 @ 1 µg/ml

Nustatyti pavyzdžiai su gxhG-Fc HRP 1:2K; kontrolės su mišiniu xMIgG1, 2a, 2b, 3 1:1K

Norint nustatyti kuris anti-MCP-1 antikūnas 3.11.2 gali blokuoti kitų šeimos narių funkciją, buvo atliktas migracijos bandymas, kaip aprašyta aukščiau. Pirmiausiai buvo nustatytas THP-1 monocitų gebėjimas migruoti į atsaką prieš MCP-1, MCP-2, MCP-3 ir MCP-4. MCP-1, -2 ir -3 efektyviai indukuoja THP-1 ląstelių migraciją, bet MCP-4 buvo neaktyvus šiame bandyme (žiūr. 1 figūrą). Jeigu 3.11.2 antikūnas buvo pridėtas į šulinėlio apatinę pusę kintamomis koncentracijomis, THP-1 ląstelių sugebėjimas migruoti į atsaką prieš MCP-2 ir MCP-3 buvo inhibuotas nuo dozės priklausomu būdu (2 ir 3 figūros).

3 PAVYZDYS

MCP-1 epitopų kartografavimas

Monocitų chemotaksio baltymas-1 (MCP-1) yra beta chemokinių šeimos narys, kuris veikia specifinius septynis transmembraninius receptorius, kad sugautų monocitus, bazofilus ir T limfocitus uždegimo vietoje. Antigenas, 76 aminorūgščių liekana yra neglikozilinta ir turi numatytą 8,7 kD molekulinę masę. Žmogaus MCP-1, ekspresuotas E. coli, buvo pirktas iš R&D Nr. 279MC/CF. Beždžionių MCP buvo ekspresuotas 293F ląstelėse ir trys beždžionių MCP-1 variantai buvo naudojami analizuoti, kaip nustatyti aminorūgščių pakeitimai veikia susirišimo giminingumą kiekvienam individualiam mAb.

Sekų analizė parodė, kad antikūnai dalinasi į penkias klases. Didžiausia klasė apima 28 antikūnus labai susijusius pagal jų panaudojimą iš VH1-24, iš kurių 24 taip pat naudoja Vk geną B3. Klasė susidedanti iš trijų antikūnų naudoja VH6-1 geną, du iš kurių naudoja Vk B3. Trys kitos klasės reprezentuotos antikūnu kiekviena, naudojant VH1-2, VH3-33 ir VH4-31, iš kurių du iš jų mAb naudoja Vk08 geną. Reikėtų atkreipti dėmesį, kad antikūnų vardai prasidedantys 1, 2, 3 arba 4 atspindi skirtingus hibridomos suliejimus iš nepriklausomų XenoMouse® pelių būrių. Taigi, šie monokloniniai antikūnai atsirado iš nepriklausomų B ląstelių linijų, subrendusių nepriklausomai pirminio arba antrinio imuninio atsako metu XenoMouse® pelėse. Dėl nepriklausomybės, nukleotidų ir aminorūgščių sekos panašumo VH ir Vk antikūnų genai panašiai atspindi konverguojančią evoliuciją ir selekciją panašių kintamų sričių struktūrų, kurios gali prisirišti ir potencialiai neutralizuoti MCP-1 (žiūr. 11 lentelę).

11 lentelė

Pavyzdžiai	Izotipas	VH	DH	JH	VK	JK	Epitopas
1.1.1	$\gamma 2/\kappa$	VH1-24	D3-3(17)	JH4b	VK-B3	JK1	Konform.
1.2.1	$\gamma 2/\kappa$	VH1-24	D3-3(17)	JH4b	VK-L5	JK1	Linijinis
1.3.1	$\gamma 2/\kappa$	VH1-24	D3-3(15)	JH4b	VK-B3	JK1	Konform.
1.4.1	$\gamma 2/\kappa$	VH6-1	D1-26	JH4b	VK-A2	JH4	Linijinis
1.5.1	$\gamma 2/\kappa$	VH1-24	D3-3(17)	JH4b	VK-B3	JK1	Linijinis
1.6.1	$\gamma 2/\kappa$	VH1-24	D1-26(18)	JH3b	VK-A10	JK4	Konform.
1.7.1	$\gamma 2/\kappa$	VH1-24	D3-3(17)	JH4b	VK-B3	JK1	Konform.
1.8.1	$\gamma 2/\kappa$	VH1-24	D3-3(17)	JH4b	VK-B3	JK1	Linijinis
1.9.1	$\gamma 2/\kappa$	VH1-24	D5-12(13)	JH4b	VK-B3	JK1	Nesurišta
1.10.1	$\gamma 2/\kappa$	VH1-24	D3-3(17)	JH4b	VK-B3	JK1	Linijinis
1.11.1	$\gamma 2/\kappa$	VH1-24	D3-3	JH4B	VK-B3	JK1	Linijinis
1.12.1	$\gamma 2/\kappa$	VH1-24	D3-3(16)	JH4b	VK-B3	JK1	Konform.
1.13.1	$\gamma 2/\kappa$	VH1-24	D3-3(17)	JH4b	VK-B3	JK1	Linijinis
1.14.1	$\gamma 2/\kappa$	VH6-1	D1-26	JH6b	VK-B3	JK1	Linijinis
1.18.1	$\gamma 2/\kappa$	VH1-24	D3-3(15)	JH4b	VK-B3	JK4	Linijinis
2.3.1	$\gamma 4/\kappa$	VH1-24	D3-3(16)	JH4b	VK-B3	JK2	Nesurišta
3.2	$\gamma 2/\kappa$	VH1-24	D3-3(17)	JH4b	VK-L16	JK4	Konform.
2.4.1	$\gamma 4/\kappa$	VH1-2	D6-13(15)	JH4b	VK-08	JK5	Nesurišta
3.4.1	$\gamma 2/\kappa$	VH1-24	D3-3(16)	JH4b	VK-B3	JK1	Linijinis
3.5.1	$\gamma 4/\kappa$	VH1-24	D3-3(17)	JH4b	VK-B3	JK1	Nesurišta
3.6.1	$\gamma 4/\kappa$	VH1-24	D3-3(17)	JH4b	VK-B3	JK1	Nesurišta
3.7.1	$\gamma 2/\kappa$	VH1-24	D3-3(16)	JH4b	VK-B3	JK1	Konform.
3.8	$\gamma 4/\kappa$	VH1-24	D3-3	JH4B	VK-B3	JK1	Nesurišta
3.10.1	$\gamma 4/\kappa$	VH1-24	D3-9(12)	JH6b	VK-A30	JK3	Konform.
3.11.1	$\gamma 4/\kappa$	VH4-31	D2-21(10)	JH3b	VK-08	JK2	Konform.
3.14.1	$\gamma 4/\kappa$	VH6-1	D1-26	JH6B	VK-B3	JK1	Konform.
3.15.1	$\gamma 4/\kappa$	VH1-24	D5-12(13)	JH4b	VK-B3	JK1	Linijinis
3.16.1	$\gamma 4/\kappa$	VH1-24	D3-3(17)	JH4b	VK-B3	JK1	Konform.

4.5.1	$\gamma 2/\kappa$	VH1-24	D3-3(16)	JH4b	VK-B3	JK1	Konform.
4.6.1	$\gamma 2/\kappa$	VH1-24	D3-3	JH3B	VK-B3	JK1	ND
4.7.1	$\gamma 2/\kappa$	VH1-24	D3-3(16)	JH4b	VK-B3	JK1	Konform.
4.8.1	$\gamma 2/\kappa$	VH1-24	D3-3	JH4b	VK-B3	JK1	Konf.
4.9.1	$\gamma 2/\kappa$	ND	ND	ND	ND	ND	Konf.
5.1	$\gamma 2/\kappa$	VH3-33	D6-6(15)	JH6B	V1-22	JK2	ND
5.3.1	$\gamma 2/\kappa$	VH1-24	D5-12(13)	JH4b	VK-B3	JK1	Nesurišta

Konf. = konformacinis

ND = neatlikta

Nesurišta = Nesurišta Western blote

Kuris iš antikūnų surištas su linijiniu arba konformaciniu epitopu buvo nustatyta Western blot analize. Norint nustatyti ar molekulių vidinių ryšių suardymas redukcijos agentu pakeitė parinktų anti-MCP-1 antikūnų reaktyvumą, išvalytas MCP-1 buvo užneštas ant SDS/PAGE (4-20 % gelis), esant neredukuojančioms (NR) arba redukuojančioms (R) sąlygoms. SDS/PAGE buvo atlikta pagal Laemmli metodą, naudojant mini gelio sistemą. Atskirti baltymai buvo pernešti ant nitroceliuliozės membranos. Membranos buvo blokuotos, naudojant PBS, turintį 5 % (m/t) beriebalinio sauso pieno, mažiausiai 1 valandą prieš išryškinimą ir zonuotos 1 valandą su kiekvienu antikūnu. Antikūnai buvo aptikti naudojant HRP konjuguotus ožkų anti-žmogaus imunoglobulinus (praskiedimas 1:8000; Sigma Kat. Nr. A-8667). Membranos buvo išryškintos, naudojant sustiprintą chemiliuminescenciją (ECL®; Amersham Bioscience) pagal gamintojų instrukcijas.

Antikūno-MCP-1 kompleksai buvo analizuoti trimis metodais: (1) Linijinių ir konformacinių epitopų paviršiaus sustiprinta lazerine desorbcija jonizacija (SELDI) (baltymų čipų technologija); (2) Linijinių ir konformacinių epitopų kryptinga mutagenezė; ir (3) Linijinių epitopų SPOT peptidų matrica. SELDI yra neseniai atskleistas metodas tiksliam, greitam ir jautriam peptidų ir baltymų molekulinės masės nustatymui. Linijiniai ir konformaciniai epitopai buvo kartografuoti remiantis SELDI baltymų čipų technologija imobilizuoto antikūno surišto fragmento mase. Linijinių epitopų kartografavimas buvo atliktas pagal SELDI trimis pakopomis. Pirmoje pakopoje MCP-1 buvo suskaldytas su aukšto specifiškumo proteolitiniiais fermentais, generuojant polipeptidų fragmentų rinkinį. Antroje pakopoje, peptidų fragmentai, turintys linijinius epitopus, buvo atrinkti pagal jų specifinį susirišimą su ant baltymų čipo imobilizuotais antikūnais. Šioje pakopoje peptidai, kurie turi epitopo formos kompleksus su antikūnu, tuo tarpu kiti peptidai nesusirišę su antikūnu, buvo pašalinti griežtu plovimu. Galinėje pakopoje su antikūnu susišio peptido identiškas buvo nustatytas pagal jo molekulinę masę pagal SELDI ir žinomas specifinių proteazių kirpimo vietas.

Antikūnai 1.4.1, 1.8.1, 1.14.1, 1.18.1 reagavo Western blote vienodai su natyviu ir ant Western bloto denatūruotu MCP-1, parodant, kad jos turi linijinį epitopą. Jų epitopas buvo

kartografuotas SELDI metodu. Eksperimentai buvo atlikti karboksimetilinant MCP-1 antigeną, kad būtų išvengta disulfidinių jungčių formavimosi tarp cisteino liekanų baltyme. Metilintas MCP-1 buvo restriktuojamas su Glu-C, endoproteinaze, kuri specifiskai skaldo peptidines jungtis glutamino rūgšties liekanos C-galinėje pusėje. mAb buvo kovalentiškai sujungti su baltymų čipų matrica PS20. Čipų paviršius buvo blokuotas su 1M etanolaminu ir praplautas su PBS, 0,5 % Triton. Metilinto MCP-1 antigeno Glu-C fragmentai buvo surišti su imobilizuotu antikūnu. Nesurišti fragmentai buvo išplauti su detergentu (PBS, 0,1 % Tween). Surišti Glu-C fragmentai buvo ir identifikuoti SELDI metodu, remiantis jų mase. 12 lentelėje susumuotos tikėtinos masės kiekvieno peptido, generuoto pilnai suskaldžius metilintą MCP-1 su Glu-C. MCP-1 buvo pilnai suskaldytas į tris fragmentus. Teorinis pl buvo: 9,39/Mw (vidutinė masė); 8685,03/Mw (monoizotopinė masė): 8679,44. Po plovimo fragmentai, kurių masė 4635, atitinkantys 1-39 liekanoms, likę surišti su antikūnu, reiškė, kad visų šių antikūnų epitopai gulėjo pirmose 39 liekanose, kadangi toks pat modelis buvo matomas su kiekvienu iš šių antikūnų.

12 lentelė

Masė	Padėtis SEQ ID NO: 149	Nr. MC	Dirbtinė modifikacija(os)	Peptido seka
4458,2591	1-39	0	Cys_CM:11, 12, 36 4632.2755	QPDAINAPVTCCYNFTNRKI SVQRLASYRRITSSKCPKE
3041.4819	51-76	0	Cys_CM:52 3099.4873	ICADPKQKWVQDSMDHLDKQ TQTPKT
1218.7456	40-50	0		AVIFKTIVAKE

SELDI būdas taip pat buvo naudojamas konformacinių epitopų kartografavimui. Šiuo atveju A baltymas kovalentiškai surištas su PS2 baltymo čipų gardelėmis (Cipergen Biosystems) buvo naudojamas sugauti mAb ir paskui inkubuoti su MCP-1. Pašalinus nesurištą medžiagą, kompleksai buvo skaldomi su didelės koncentracijos specifinėmis proteazėmis. MCP-1 antikūnai (1.7.2, 3.11.2 ir 3.7.2) negalėjo rištis su redukuotu, denatūruotu antigenu ant Western bloto, parodydami, kad epitopas tikėtina yra konformacinis. Antikūnai 1.7.2 ir 3.7.2 buvo pirma kovalentiškai sukabinti su PS20 čipu. Gamtinis MCP-1 buvo surištas su antikūnu ir po to skaldytas su endoproteinaze (Lys-C pirmame eksperimente ir Asp-N kitame). Nesurišti fragmentai buvo išplauti su PBS+, 0,2 % Triton po to sekė PBS ir HPLC plovimas vandeniu. Epitopas buvo nustatytas SELDI metodu ir identifikuotas pagal fragmento masę. Abu šie antikūnai 1.7.2 ir 3.7.2 turi 5712 masės fragmentą, atitinkantį liekanoms 3-53 (13 lentelė; teorinis pl: 9,39/Mw (vidutinė masė): 8685,03/Mw (monoizotopinė masė): 8679,44), surištą su juo po plovimo, rodantį, kad epitopas guli gamtiniame MCP-1 antigene tarp 3 ir 53 aminorūgščių liekanų.

13 lentelė

Masė	Padėtis SEQ ID NO: 149	Nr. MC	Peptido seka
57200059	3-53		DAINAPVTCCYNFTNRKISV QRLASYRRITSSKCPKEAVIFKTIVAKEICA
10465476	68-76		DKQTQTPKT
10285523	54-61		DPKQKWVQ

3.11.2 antikūno epitopo kartografavimui surišančio domeno dydis buvo minimizuotas naudojant skirtingas proteazes. A baltymas (Calbiochem, 539202) buvo imobilizuotas kovalentiškai ant PS20 čipo. Likę surišimo vietos buvo blokuotos etanolaminu, pH 8,0. 3.11.2 antikūnas buvo surištas su A baltymu. Čipas buvo plaunamas PBS ir po to 50 mM Hepes, pH 7,5. MCP-1 antigenas buvo surištas su antikūnu. Nesurištas antigenas buvo pašalintas plaunant 0,1 % Tween-PBS, po to 50 mM Hepes, pH 7,5 ir 100 mM amonio bikarbonatu. Buvo atliktas čipo MCP-1 skaldymas su endoproteinaze Lys-C. Čipas buvo plautas su 0,1 % Triton-PBS, kad būtų pašalinti nesurišti fragmentai. Surištas fragmentas, remiantis jo mase, buvo analizuotas SELDI metodu. Tik viena masės smailė 1861.8 buvo surišta su antikūnu, atvaizduota 15 aminorūgščių seka, lokalizuota tarp MCP-1 20 ir 35 liekanų (14 lentelė; teoriškai pI: 9.39/Mw (vidutinė masė): 8685.03/Mw (monoizotopinė masė): 8679,44), kurios masė 1865 ir seka ISVQRLASYRRITSSK (20-35 padėtis sekoje SEQ ID NO.: 149) buvo nustatyta kaip tvirčiausiai surištas fragmentas.

14 lentelė

Masė	Padėtis SEQ ID NO:149	Nr. MC	Peptido seka
21550059	1-19	0	QPDAINAPVTCCYNFTNRK
18650715	20-35	0	ISVQRLASYRRITSSK
13736154	59-69	0	WVQDSMDHLDK
7753654	50-56	0	EICADPK
7064134	39-44	0	EAVIFK
7023781	70-75	0	QTQTPK
5313500	45-49	0	TIVAK

MCP-1 mutagenezė. Anksčiau buvo parodyta, kad du klasteriai svarbiausių pagrindinių liekanų (R24, K35, K38, K49 ir Y13) turi didžiausią indėlį sąveikai tarp MCP-1 ir jo receptorių (Hemmerich ir kt., (1999) Biochemistry 38, 13013-13025). Surišimo duomenys atskleidė, kad N-galinės liekanos mažai prisideda prie surišimo aktyvumo ir kad dvi svarbios liekanos yra svarbios MCP-1 signaliniam aktyvumui: K35 ir R24. K35 yra labiausiai funkciškai svarbi liekana, kadangi K35 mutacija turi žymų efektą surišimui ir aktyvumui, taip kaip ir R24 alanino mutantai (Hemmerich ir kt., (1999) Biochemistry 38, 13013-13025). Arg24 yra išsaugota per skirtingas

MCP-1 rūšis, taip pat kaip ir žmogaus MCP-2-4, bet plačiai kinta kituose CC chemokinuose ir tuo būdu gali būti įtraukta į receptoriaus specifiškumą. Norint identifikuoti individualias liekanas tarp pirmųjų MCP-1 39 liekanų, pateikiant Glu-C skaldymą, kuris būtų svarbus antikūno surišimui, buvo generuoti trys MCP-1 mutantai: trys pagrindinės liekanos R24, K35 ir K38 buvo mutuotos kryptingos mutagenezės būdu ir mutuoti baltymai toliau analizuojami ELISA metodu dėl susirišimo su visais 36 neutralizuojančiais antikūnais. Arg24 buvo mutuota į alaniną (R24A) ir glutamino rūgštį (R24E). Lys35 ir K38 buvo mutuotos į alaniną (K35A, K38A atitinkamai). Visos mutacijos buvo įvestos į beždžionių kilmės MCP-1. Beždžionių MCP-1 konstruktas buvo generuotas atliekant RT-PGR su RNR, išskirta iš beždžionių periferinio kraujo limfocitų (cynomologus MCP-1PGR3.1 dvikryptė). Baltymų sekos palyginimas tarp žmogaus ir beždžionių MCP-1 atskleidžia 99 % homologiją su dviejų aminorūgščių pakeitimais N-gale (71 ir 76 padėtyse). 59-76 C-galinės liekanos nėra įtrauktos į sąveiką tarp receptoriaus ir neveikia visų 36 antikūnų surišimo.

Buvo atliktas ELISA bandymas, naudojant 293 ląstelių supernatantą, transfekuatą skirtingais MCP-1 mutuotais konstruktais. ELISA plokštelės buvo padengtos anti-žmogaus MCP-1 ožkos IgG polikloniniu antikūnu (R&D kat. Nr. AF279NA), praskiestu iki 1 µg/ml ELISA plokštelių padengimo buferiu. MCP-1 mutuotų konstrukto ekspresija 293 ląstelėse buvo patvirtinta nustatant su biotinilintu ožkos anti-žmogaus MCP-1 (R&D kat. Nr. BAF279) vadovaujantis streptavidino HRP. MCP-1 mutanto surišimas su MCP-1 antikūnais buvo nustatytas su HRP konjuguotu ožkos anti-žmogaus IgG (Fc specifinis, Caltag Kat. Nr. H10507). ELISA rezultatai parodė, kad K38 pakeitimas neturėjo jokio efekto visų 36 mutantų surišimo aktyvumui. Visų antikūnų surišimas su MCP-1 R24E ir R24A mutantiniais antigenais buvo pilnai panaikintas (žiūr. 15 lentelę). Tačiau, K35A mutacija inhibavo surišimą tik šešių antikūnų (1.6.1, 1.9.1, 3.6.1, 3.10.1). Visi šie antikūnai pasirodė turintys konformacinius epitopus, susirišimas su kuriais yra veikiamas arba Arg24 arba Lys35 mutacijomis. Šie duomenys reiškia, kad šie keturi antikūnai atpažįsta konformacinius epitopus skirtingai, bet persidengiant su kitais antikūnais.

15 lentelė

mAb	Epitopas	Glu-C skaldy mas	Lys-C	Asp-N skaldym as	Peptidas	Liekana	R24A/E	K35A
1.1.1	Konform.	ND	ND	ND	ND	ND	Inhibicija	Inhibicija
1.2.1	Linijinis	ND	ND	ND	7_11	21-25	Inhibicija	Nėra inhib.
1.3.1	Konform.	ND	ND	ND	ND	ND	Inhibicija	Nėra inhib.
1.4.1	Linijinis	1_39	ND	ND	7_11	21-25	Inhibicija	Nėra inhib.
1.5.1	Linijinis	ND	ND	ND	7_11	21-25	Inhibicija	Nėra inhib.
1.6.1	Konform.	ND	ND	ND	ND	ND	Inhibicija	Inhibicija
1.7.1	Konform.	ND	ND	3-	ND	ND	Inhibicija	Nėra inhib.

				53/5712				
1.8.1	Linijinis	1 39	ND	ND	7 11	21-25	Inhibicija	Nėra inhib.
1.9.1	Nesurištas	ND	ND	ND	ND	ND	Inhibicija	Inhibicija
1.10.1	Linijinis	ND	ND	ND	7 11	21-25	Inhibicija	Nėra inhib.
1.11.1	Linijinis	ND	ND	ND	ND	ND	Inhibicija	Nėra inhib.
1.12.1	Konform.	ND	ND	ND	ND	ND	Inhibicija	Nėra inhib.
1.13.1	Linijinis	ND	ND	ND	7 11	21-25	Inhibicija	Nėra inhib.
1.14.1	Linijinis	1 39	ND	ND	7 11	21-25	Inhibicija	Nėra inhib.
1.18.1	Linijinis	1 39	ND	ND	7 11	21-25	Inhibicija	Nėra inhib.
2.3.1	Nesurištas	ND	ND	ND	ND	ND	Inhibicija	Nėra inhib.
3.2	Konform.	ND	ND	ND	ND	ND	Inhibicija	Nėra inhib.
2.4.1	Nesurištas	ND	ND	ND	ND	ND	Inhibicija	Nėra inhib.
3.4.1	Linijinis	ND	ND	ND	ND	ND	Inhibicija	Nėra inhib.
3.5.1	Nesurištas	ND	ND	ND	ND	ND	Inhibicija	Nėra inhib.
3.6.1	Nesurištas	ND	ND	ND	ND	ND	Inhibicija	Inhibicija
3.7.1	Konform.	ND	ND	3- 53/5712	ND	ND	Inhibicija	Nėra inhib.
3.8	Nesurištas	ND	ND	ND	ND	ND	Inhibicija	Inhibicija
3.10.1	Konform.	ND	20-35 (1864)	ND	ND	ND	Inhibicija	Inhibicija
3.11.1	Konform.	ND	ND	ND	ND	ND	Inhibicija	Nėra inhib.
3.14.1	Konform.	ND	ND	ND	ND	ND	Inhibicija	Nėra inhib.
3.15.1	Linijinis	ND	ND	ND	7 11	21-25	Inhibicija	Nėra inhib.
3.16.1	Konform.	ND	ND	ND	ND	ND	Inhibicija	Nėra inhib.
4.5.1	Konform.	ND	ND	ND	ND	ND	Inhibicija	Nėra inhib.
4.6.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Inhibicija	Nėra inhib.
4.7.1	Konform.	ND	ND	ND	ND	ND	Inhibicija	Nėra inhib.
4.8.1	Konform.	ND	ND	ND	ND	ND	Inhibicija	Nėra inhib.
5.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Inhibicija	Nėra inhib.
5.3.1	Nesurištas	ND	ND	ND	ND	ND	Inhibicija	Nėra inhib.

ND = neatlikta

Nesurištas = Nesurišta Western blote

Šiems antikūnams surišimas su linijiniu epitopu, jų surišimas su peptidiniu epitopu buvo detalai ištirtas, naudojant SPOT technologiją. SPOT yra technologija, kuri leidžia šimtų peptidų kietos fazės sintezę tokiaame formate, kuris tinka antikūnų epitopų sisteminei analizei. Sistema yra paprasta, ypač greita ir ekonomiška naudojamų reagentų požiūriu. Įprastai pagaminta peptidų matrica buvo gauta iš Sigma-Genosys (The Woodlands, Texas). Buvo susintetinta 32-iejų 13-narių peptidų eilė, apimanti MCP-1 sekos 1-76 liekanas. Kiekvienas nuoseklus peptidas buvo kompensuotas dviem aminorūgštimis iš ankstesniojo, gaunant įterptą vienas į kitą, persidengiančią biblioteką. Membrana, turinti 32 peptidus, buvo zonduojama su aštuoniais MCP-1 antikūnais (1 µg/ml) ir stebėta sustiprinta chemiliuminescencija (ECL). Buvo stebima reakcija su penkiais nuosekliais peptidų mėginiais (7-10) atitinkančiais MCP-1 21-25 aminorūgštims. Iš šių rezultatų pasirodė, kad visų tirtų MCP-1 antikūnų, kurie rišasi su linijiniu epitopu, epitopų pagrindas yra SVQRL (21-25). MCP-1 seka :

QPDAINAPVTCCYNFTNRKISVQRLASYRRITSSKCPKEAVIFKTIVAKEICADPKQK
WVQDSMDHDLKQTQTPKT (SEQ ID NO: 149)

Aštuoni antikūnai, kurie atpažįsta linijinį epitopą, reaguoja su tais pačiais SPOT: 1.2.1, 1.4.1, 1.5.1, 1.8.1, 1.10.1, 1.13.1, 1.14.1 ir 1.18.1.

4 PAVYZDYS

Kryžmiškai reaguojančių antikūnų giminingumo nustatymas aukšto atskyrimo Biocore analize

Sąveikos analizė buvo atlikta prie 25 °C, naudojant du CM5 čipus, sujungtus Biocore 2000 optiniame biosensoriuje. Individualios tėkmės kameros kiekviename čipe buvo aktyvuotos 7-minute NHS/EDC injekcija, karbohidrazidas buvo sujungtas per NHS esterį, naudojant 7-minute injekciją, ir likusios aktyvuotos grupės buvo blokuotos etanolamino 7-minute injekcija. mAb 3.11.2 monosacharidų liekanos, praskiestos 1/50, buvo oksiduotos naudojant 1 mM natrio metaperjodatą 100 mM natrio acetate, pH 5,5 prie 4 °C 30 min. Oksiduotas antikūnas buvo nugėlintas 10 mM natrio acetate, pH 5,0, kad būtų sukabinti ant karbohidrazidu modifikuoto paviršiaus. Paviršiaus tankis 250 RU 3.11.2 mAb buvo naudojamas išmatuoti išdėstyti MCP-1 ir MCP-4 sąveikai, kadangi 110RU paviršius buvo naudojamas matuoti MCP-2 ir MCP-3 antigenų sąveikai su 3.11.2 mAb. mAb paviršius buvo stabilizuotas redukuojant hidrazono jungtis 0,1 M natrio cianoborhidridu. Antigeno/antikūno sąveika buvo tirta injekuojant sudvigubintus antigeno pavyzdžius, praskiestus elektroforezės buferiu (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,005 % paviršinio aktyvumo medžiagos, 200 µg/ml BSA, pH 7,4) 300-kartiniame koncentracijos diapazone. Paviršius buvo regeneruotas 12-sekundiniu impulsu 15 mM H₃PO₄.

Norint nustatyti kiekvienos sąveikos kinetiką, duomenų rinkiniai buvo visuotinai pritaikyti 1:1 sąveikos modeliui, kuris apėmė masės transporto parametrus. Nustatytos greičio konstantos ir apskaičiuoti giminingumai 3.11.2 antikūnui yra išdėstyti 16 lentelėje. Duomenys kitiems antikūnams pateikti 8 lentelėje.

16 lentelė

Ag	$K_a(M^{-1}s^{-1})$	$K_d(s^{-1})$	$K_D(pM)$
MCP-1	$3,0 \times 10^8$	1×10^{-3}	3,3
MCP-2	$2,6 \times 10^8$	$1,2 \times 10^{-2}$	46
MCP-3	$1,5 \times 10^8$	$7,4 \times 10^{-3}$	49
MCP-4	$1,5 \times 10^8$	$5,5 \times 10^{-4}$	3,7

5 PAVYZDYS

Angiogenezės prevencija su antikūnais prieš MCP-1

Angiogenezė buvo indukuota pelių modelyje sumaišius Matrigel su žmogaus bFGF (10 ng/ml), žmogaus VEGF165 (100 ng/ml) ir 10 µg/ml heparino arba MCP-1 (250 ng/ml) ir MCP-3 (100 ng/ml). Maždaug 0,5 ml suspensijos buvo injekuota į dešinią šoną po oda 6-8 savaičių amžiaus „plikų“ pelių patelėms. Kiekvienai MCP-1 ir MCP-3 dozei buvo naudojamos penkios pelės. Be to, kaip neigiama kontrolė, buvo įjungtas vien tik Matrigel (be augimo faktorių). Matrigel implantai įtvirtinti *in situ* ir buvo kairėje neliečiami 7 dienas. Pasibaigus 7 dienoms, pelės buvo anestezuojamos ir Matrigel tamponai atsargiai pašalinami, naudojant mikrochirurgijos instrumentus. Peršviesti geliai buvo fotografuojami. Dalis tamponų buvo apdoroti parafine įtvirtintu skrodimu. Skrodimai buvo atliekami dviem skirtingais lygiais ir nudažomi H/E. Kita dalis gelių buvo greitai užšaldoma skystame azote ir pateikti imunocitocheminiam nudažymui su žiurkių monokloniniu antikūnu, nukreiptu, nukreiptu prieš pelių CD31 antigeną, konjuguotą su fikoeritrinu. H+E nudažytos plokštelės buvo stebėti per fluorescentinį mikroskopą (raudonas filtras), sujungtą su Spot kamera. Vaizdai buvo užfiksuoti skaitmeniniu būdu, naudojant Metamorph programinę įrangą. Mikrokraujagyslių tankis buvo nustatytas Wild ir kt. (2000) paskelbtu metodu.

Buvo rasta, kad abu MCP-1 ir MCP-3 rodo lygiavertę angiogenezę, kaip gerai charakterizuoti angiogeniniai faktoriai VEGF ir bFGF. Be to, MCP-1 ir MCP-3 indukuota angiogenezė gyvūnuose ir to pasekoje žmonių augliuose ir nesveikuose audiniuose, gali būti sutrukdyta veikiant antikūnais prieš MCP-1 antikūnais, tokiais kaip 3.11.2, kurie neutralizuoja visos MCP šeimos narių aktyvumą. Todėl, turėtų būti injekuoti anti-MCP antikūnai į gyvulius skirtingomis dozėmis, apimančiomis 0,1-0,5 mg/gyvūnui, kad būtų nustatyta dozės-atsako priklausomybė gydymui.

6 PAVYZDYS

Auglio ląstelių produkuojamas MCP-1

Norint nustatyti, kurios auglio ląstelių linijos produkuoja MCP-1 ląstelių kultūroje, buvo tiriamas ląstelių linijų sąrašas dėl jų sugebėjimo sekretuoti MCP-1 į augimo terpę. Ląstelės buvo auginamos Dulbecco's Modified Eagles terpėje (DMEM), turinčioje 10 % fetalinio jaučio serumo arba ekvivalento ligi susiliejimo. Supernatantas buvo pašalintas ir mėginys testuojamas dėl reaktyvumo prieš MCP-1, naudojant komerciškai prieinamą ELISA rinkinį iš R&D Sciences. 17 lentelė rodo vėžinių ląstelių linijas, kurios konstitutyviai sekretuoja MCP-1 ir jų atitinkamas lygis nustatomas ELISA.

17 lentelė

		Lastelių linija	MCP-1 (pg/ml)
1	Gaubtinės žarnos karcinoma	COLO-205	<10
2	Gaubtinės žarnos karcinoma	HCT-15	60
3	Gaubtinės žarnos karcinoma	HCT-116	122
4	Gaubtinės žarnos karcinoma	HT-29	102
5	Gimdos kaklelio vėžys	HT-3	127
6	Gaubtinės žarnos karcinoma	SW707	31
7	Gaubtinės žarnos karcinoma	SW948	13
8	Gaubtinės žarnos karcinoma	KM-12	6
9	Gaubtinės žarnos karcinoma	HCC-2998	39
10	Skrandžio karcinoma	NCI-N87	37
11	Skrandžio karcinoma	NCI-SNU-1 4	0
12	Skrandžio karcinoma	NCI-SNU-5	<10
13	CNS karcinoma	SF-268	94
14	CNS karcinoma	SF-295	223
15	CNS karcinoma	SF-593	>2500
16	CNS karcinoma	SNB-19	>2500
17	CNS karcinoma	SNB-75	>2500
18	CNS karcinoma	U251	>2500
63	CNS	XF-498(Curg)	>2500
61	Glioblastoma	SF-295(Curg)	>2500
21	Medulloblastoma	TE 671(u)	>2500
25	Leukemija	SR	25
26	Leukemija	A 673	>2501
27	Leukemija	K562	287
28	Leukemija	RPMI-8226	528
29	Leukemija	Jurkats	184
30	Leukemija	THP-1	113
31	Leukemija	HUT 78	35
32	Leukemija	JY	0
33	Leukemija	CEM	0
34	Plaučių karcinoma	MV 522	74
35	Plaučių adenokarcinoma	EKVX	>2500
36	Plaučių adenokarcinoma	HOP-62	>2500
37	Plaučių karcinoma NSC	HOP-92	897
38	Plaučių karcinoma NSC	NCI-H1299	384
39	Plaučių karcinoma NSC	NCI-H2126	107
55	Plaučių adenokarcinoma	NCI-H522	0
42	Plaučių adenokarcinoma	NCI-H322M	0
40	Plaučių fibroblastų IPF	A 549	>2501
57	Plaučių adenokarcinoma	NCI-H292	245
43	Plaučių karcinoma NSC	NCI-H460	118
45	Plaučių plokščialastelinis NSC	Skmes-1	410
44	Plaučių smulkialastelinė karcinoma	SHP-77	1663

58	Plaučių smulkialąstelinė karcinoma	NCI-H510A	>2500
56	Plaučių smulkialąstelinė karcinoma	NCI-H69	
53	Pieno liaukų karcinoma	HCC-2218	129
54	Pieno liaukų karcinoma	HCC-1954	113
46	Pieno liaukų karcinoma	ZR-75-30	357
47	Pieno liaukų karcinoma	MCF-7	0
48	Pieno liaukų karcinoma	MDA-MB-453	40
49	Pieno liaukų karcinoma	MDA-MB-231	>2501
50	Pieno liaukų karcinoma	MDA-MB-468	9
51	Pieno liaukų karcinoma	NCI/ADR	0
52	Pieno liaukų karcinoma	T47D	61
22	Pieno liaukų karcinoma	SK-BR-3	475
20	Pieno liaukų karcinoma	Hs 605T	>2500
53	Melanoma	A431	56
54	Melanoma	LOX IMVI	105
55	Melanoma	M14	786
56	Melanoma	RPMI 7591	>2501
57	Melanoma	SK-MEL-28	29
58	Melanoma	UACC-62	119
59	Melanoma	UACC-257	265
41	Melanoma	Hs 936.T	15
24	Melanoma	SK-mel-5	38
25	Melanoma	Hs 940.T	>2500
26	Melanoma	A375	136
6	Melanoma	WM.266.	>2500
27	Kasos karcinoma	HPAC	73
29	Kasos karcinoma	HPAF II	47
41	Kasos karcinoma	CAPAN-1	>2500
60	Kasos karcinoma	Panc-1	>2500
30	Kiaušidžių karcinoma	ES2	322
31	Kiaušidžių karcinoma	IGROV1	199
32	Kiaušidžių karcinoma	MDAH2774	314
33	Kiaušidžių karcinoma	SK-OV-3	86
34	Kiaušidžių karcinoma	OVCAR-3	126
36	Kiaušidžių karcinoma	OVCAR-5	336
37	Kiaušidžių karcinoma	OVCAR-8	36
38	Prostatos karcinoma	22Rv1	55
39	Prostatos karcinoma	LNCaP	>2500
40	Prostatos karcinoma	DU150	>2500
42	Prostatos karcinoma	PC-3	163
28	Prostatos karcinoma	DU145	68
43	Inkstų karcinoma	A498	>2500
44	Inkstų karcinoma	786-0(35h)	>2500
45	Inkstų karcinoma	SK-RC-01	>2500

46	Inkstų karcinoma	SK-RC-10	>2500
47	Inkstų karcinoma	Caki-1	115
48	Inkstų karcinoma	Caki-2	>2500
49	Inkstų karcinoma	RXF-393	>2500
50	Inkstų karcinoma	SK-RC-52	>2500
51	Inkstų karcinoma	SN12C	>2500
52	Inkstų karcinoma	TK-10	533
62	Inkstų karcinoma	769-P	512
23	Kepenų karcinoma	C3A	0
59	Kepenų karcinoma	HepG2	>2500
19	Epiderminis gimdos kaklelio vėžys	MS 751	>2500
35	Gimdos kaklelio vėžys	Hela	>2501
	Gimdos kaklelio	C-33A	20
1	Gimdos kaklelio	Ca Ski	32
2	Gimdos kaklelio	ME-180	54
3	Gimdos	KLE	>2500
4	Gimdos	RL95-2	28
5	Gimdos	HEC-1-A	47
			MCP-1

7 PAVYZDYS

Anti-MCP-1 antikūnų poveikis pelių auglio modelyje

Norint nustatyti anti-MCP-1 antikūnų poveikį poodinio auglio augimui, eksponentiškai augančios Panc-1 ląstelės buvo išsodintos ir resuspenduotos 0,2 ml Hanko subalansuotame druskų tirpale (HBSS). Augliai buvo produkuoti injekuojant 5×10^6 Panc-1 ląsteles, sumaišytas su augimo faktoriumi redukuotu Matrigel į BALB/c „plikų“ pelių patelių šoną. Pradedant nuo implantacijos dienos, gyvūnai buvo veikiami 0,5 mg anti-MCP-1 1.7.3 antikūnu ir PK antikūnu, kuris buvo nukreiptas prieš KLH arba PBS, laiko tarpais, pažymėtais diagramoje. Auglio augimas buvo matuojamas kas savaitę ir rezultatai pateikti kaip $\pm$ SD reikšmės (4 figūra). Skirtumai tarp kontrolinių ir paveiktų gyvūnų buvo statistiškai svarbūs, jeigu palyginta naudojant Stjudento T testą ($P < 0,002$). Atitinkamai, anti-MCP-1 antikūnai suteikė efektyvų poveikį sumažinant auglio augimą *in vivo*.

8 PAVYZDYS

MCP-1 antikūnų analizė programinės įrangos pagalba

Aukščiau aprašyti MCP-1 antikūnų kalcio srautas (pernešimas), chemotaksis ir giminingumo duomenys buvo analizuojami, naudojant Guided Analytic programinę įrangą, turimą iš Spotfire, Inc., Somerville, MA. Rezultatai parodyti 5 ir 6 figūrose.

9 PAVYZDYS

Anti-MCP-1 antikūnų struktūrinė analizė

Antikūnų kintamos sunkiosios grandinės ir kintamos lengvosios grandinės, parodytos 1 lentelėje, buvo sekvenuotos, norint nustatyti jų DNR sekas. Anti-MCP-1 antikūnų sekų pilna informacija su kiekvieno gama ir kappa grandinės derinio nukleotidų ir aminorūgščių sekomis pateikta sekų sąrašė.

Kintamos sunkiosios sekos buvo analizuotos, norint nustatyti VH šeimą, D-srities seką ir J-srities seką. Sekos buvo perskaičiuotos, norint nustatyti pirminę aminorūgščių seką ir palygintos su pirminėmis VH, D ir J sričių sekomis, kad būtų įvertintos somatinės hipermutacijos. 7 figūroje parodytas anti-MCP-1 sekų palyginimas Clustal W programa, naudojant VH1-24, pažymint CD, CDR1, CDR2 ir CDR3 sritis ir susijusi dendrograma. 8 figūroje parodytas anti-MCP-1 sekų palyginimas Clustal W programa, naudojant VK-B3, pažymint CD, CDR1, CDR2 ir CDR3 sritis ir susijusi dendrograma. 9 figūroje parodytas anti-MCP-1 sekų palyginimas Clustal W programa, naudojant VK-08, pažymint CD, CDR1, CDR2 ir CDR3 sritis ir susijusi dendrograma. 10 figūroje parodytas anti-MCP-1 sekų palyginimas Clustal W programa, naudojant VH6-1, pažymint CD, CDR1, CDR2 ir CDR3 sritis ir susijusi dendrograma.

10 PAVYZDYS

Anti-MCP-1 antikūnų, kaip diagnostikos agentų panaudojimas

A. MCP-1 antigeno nustatymas pavyzdyje

Su fermentais susijęs imunofermentinis metodas (ELISA) MCP-1 antigenų nustatymui pavyzdyje yra paprastas ir išvystytas. Šiuo metodu, mikroplokštelės šulinėliai, tokios kaip 96 šulinėlių mikroplokštelės arba 384 šulinėlių mikroplokštelės, yra adsorbuojami pirmuoju pilnai žmogaus monokloniniu antikūnu, nukreiptu prieš antigeną. Imobilizuotas antikūnas tarnauja kaip sugaunantis antikūnas prieš bet kokią antigeną, kuris gali būti testo pavyzdyje. Šulinėliai yra praplaunami ir paveikiami blokuojančiu agentu, tokiu pieno baltymas arba albuminas, kad būtų išvengta nespecifinės analitės adsorbcijos.

Paskui šulinėliai veikiami testo pavyzdžiais, manoma turinčiais antigeną, arba tirpalu, turinčiu standartinį antigeno kiekį. Toks pavyzdys gali būti, pavyzdžiui, serumo pavyzdys iš objekto, tikėtina turinčio lygį cirkuliuojančio antigeno, manomai turinčio patologinę diagnozę.

Po testo pavyzdžių arba standarto praplovimo, šulinėliai veikiami antruoju pilnai žmogaus monokloniniu anti-MCP-1 antikūnu, kuris yra pažymėtas konjuguojant biotinu. Pažymėtas anti-MCP-antikūnas tarnavo kaip detektuojamas antikūnas. Po antro antikūno pertekliaus praplovimo, šulinėliai veikiami su avidinu konjuguota krienų peroksidaze (HRP) ir atitinkamu chromogeniniu

substratu. Antigeno koncentracija testo pavyzdyje yra nustatoma palyginant su standartine kreive, sudaryta iš standartinių pavyzdžių.

Šis ELISA bandymas duoda didelį specifiškumą ir labai jautrų tyrimą MCP-1 antigeno testo pavyzdyje nustatymui.

B. MCP-1 koncentracijos nustatymas paciento pavyzdžiuose

Sluoksniuota ELISA yra išvystyta nustatyti MCP-1 kiekiui žmogaus serume. Du anti-MCP-1 antikūnai, naudojami sluoksniuotoje ELISA geriau atpažįsta skirtingus MCP-1 molekulės epitopus (duomenys neparodyti). ELISA atliktas sekančiai: 50 µl gaudančiųjų anti-MCP-1 antikūnų padengimo buferyje (0,1 M NaHCO₃, pH 9,6) esant 2 µg/ml koncentracijai padengiamos ELISA plokštelės (Fisher). Po inkubacijos prie 4 °C per naktį, plokštelės veiktos 200 ml blokavimo buferio (0,5 % BSA, 0,1 % Tween 20, 0,01 % Thimerosal PBS-e) 1 val. prie 25 °C. Plokštelės buvo išplautos (3x) naudojant 0,05 % Tween 20 PBS-e (plovimo buferis, WB). Normalus arba paciento serumas (Clinomics, Bioreclamation) yra praskiestas blokavimo buferiu, turinčiu 50 % žmogaus serumo. Plokštelės yra inkubuotos su serumo pavyzdžiais per naktį prie 4 °C, plautos su WB ir po to inkubuotos su 100 µl/šulinėliui biotininilo detektavimo anti-MCP-1 antikūno 1 val. prie 25 °C. Po plovimo plokštelės buvo inkubuotos su HRP streptavidinu 15 min., plautos kaip anksčiau, po to veiktos su 100 µl/šulinėliui o-fenilendiamino vandenilio peroksido (Sigma išryškinimo tirpalas) spalvos generavimui. Reakcija sustabdyta su 50 µl/šulinėliui H₂SO₄ (2M) ir analizuota, naudojant ELISA plokštelių skaitytuvą prie 492 nm. PRO antigeno koncentracija serumo pavyzdžiuose apskaičiuojama palyginant išvalyto MCP-1 antigeno du skiedimus, naudojant keturių parametrų kreivių pritaikymo programą.

C. Vėžio nustatymas pacientams

Reikėtų įvertinti, kad remiantis rezultatų rinkiniu ir 10A-10B aptartais pavyzdžiais, naudojant šiame išradime aprašytus įgyvendinimus, galima nustatyti objektui vėžį, remiantis MCP-1 antigeno ekspresijos lygiu. Tam tikram vėžio tipui, iš objekto imami kraujo pavyzdžiai nustatoma įvairios ligos progresavimo stadijos ir/arba vėžio gydymas įvairiu metu. MCP-1 antigeno koncentracija esanti kraujo pavyzdžiuose yra nustatoma naudojant metodą, kuris specifiškai apibrėžia esančio antigeno kiekį. Toks metodas apima ELISA metodą, tokius metodus, kurie aprašyti 10A-10B pavyzdžiuose. Naudojant pavyzdžių populiaciją, kuri numato kiekvienai progresavimo arba gydymo pakopai statistiškai svarbų rezultatą, diapazoną antigeno, kuris gali būti vertinga charakteristika nustatyta kiekvienai pakopai.

Norint nustatyti objektui vėžio stadiją po tyrimo arba charakterizuoti objekto atsaką į gydymo kursą, iš objekto imamas kraujo pavyzdys ir nustatoma pavyzdyje esančio antigeno koncentracija. Taip nustatyta koncentracija naudojama identifikuoti į kokių reikšmių diapazoną krenta reikšmė. Taip identifikuotas diapazonas koreliuoja su progresijos stadija arba gydymo

stadija, identifikuota įvairiose diagnozuotų subjektų populiacijose, tuo būdu pateikiant subjekto stadiją po tyrimo.

11 PAVYZDYS

Anti-MCP-1 antikūnų naudojimas auglio gydymui

Norint nustatyti anti-MCP-1 antikūno efektą pacientų (žmonių) su augliais gydymui in vivo, tokie pacientai yra injekuojami per tam tikrą laiko tarpą efektyviu anti-MCP-1 antikūno kiekiu. Periodiškais laiko tarpais gydymo metu pacientai (žmonės) tikrinami, nustatant kuris jų auglių progresuoja, ypač, kurie auga ir metastazuoja.

Vėžio pacientai, veikti su anti-MCP-1 antikūnais turi žemesnį lygį auglio augimo ir metastazavimo, palyginus su vėžio pacientais, kurie buvo veikti su kontroliniais antikūnais. Kontroliniai antikūnai, kurie gali būti naudojami, apima to paties izotipo antikūnus, kaip ir testuoti anti-MCP-1 antikūnai, ir tačiau neturi sugebėjimo surišti su MCP-1 auglio antigenus.

Aukščiau aprašytas reikalavimas manoma yra svarbus šios srities specialistui įgyvendinti išradimą praktikoje. Čia aprašyti išradimo įgyvendinimai nėra limituojantys apimtį deponuoto sprendimo, kadangi deponuotas įgyvendinimas yra numatomas kaip išradimo tam tikro aspekto viena iliustracija, ir bet koks sprendimas, kuris yra funkciškai ekvivalentiškas yra šio išradimo apimtyje.

Aukščiau išdėstytas aprašymas ir pavyzdžiai detalizuoja tam tikrus pateiktus išradimo įgyvendinimus ir aprašo geriausiai išradėjų apmąstytus. Reiktų pripažinti, tačiau, nesvarbu kiek yra detalus ankstesnis tekstas, išradimas gali būti taikomas daugeliu būdų ir išradimas turėtų būti interpretuojamas sutinkamai su priedama apibrėžtimi ir bet koku jo ekvivalentu.

Išradimo apibrėžtis

1. Žmogaus monokloninis antikūnas, kuris rišasi su MCP-1 ir apima aminorūgščių sunkiąją grandinę, turinčią seką, parinktą iš grupės, susidedančios iš SEQ ID Nr. 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46, 50, 54, 58, 62, 66, 70, 74, 78, 82, 86, 90, 94, 98, 102, 106, 110, 114, 118, 122, 126, 130, 134, 138, 142 ir 146.
2. Antikūnas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad apima aminorūgščių lengvąją grandinę, turinčią seką, parinktą iš grupės, susidedančios iš SEQ ID Nr. 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68, 72, 76, 80, 84, 88, 92, 96, 100, 104, 108, 112, 116, 120, 124, 128, 132, 136, 140, 144 ir 148.
3. Žmogaus monokloninis antikūnas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad aminorūgščių sunkioji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 2 ir aminorūgščių lengvoji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 4.
4. Žmogaus monokloninis antikūnas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad aminorūgščių sunkioji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 6 ir aminorūgščių lengvoji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 8.
5. Žmogaus monokloninis antikūnas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad aminorūgščių sunkioji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 10 ir aminorūgščių lengvoji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 12.
6. Žmogaus monokloninis antikūnas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad aminorūgščių sunkioji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 14 ir aminorūgščių lengvoji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 16.
7. Žmogaus monokloninis antikūnas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad aminorūgščių sunkioji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 18 ir aminorūgščių lengvoji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 20.
8. Žmogaus monokloninis antikūnas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad aminorūgščių sunkioji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 22 ir aminorūgščių lengvoji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 24.

9. Žmogaus monokloninis antikūnas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad aminorūgščių sunkioji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 26 ir aminorūgščių lengvoji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 28.

10. Žmogaus monokloninis antikūnas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad aminorūgščių sunkioji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 30 ir aminorūgščių lengvoji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 32.

11. Žmogaus monokloninis antikūnas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad aminorūgščių sunkioji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 34 ir aminorūgščių lengvoji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 36.

12. Žmogaus monokloninis antikūnas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad aminorūgščių sunkioji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 38 ir aminorūgščių lengvoji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 40.

13. Žmogaus monokloninis antikūnas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad aminorūgščių sunkioji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 42 ir aminorūgščių lengvoji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 44.

14. Žmogaus monokloninis antikūnas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad aminorūgščių sunkioji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 46 ir aminorūgščių lengvoji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 48.

15. Žmogaus monokloninis antikūnas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad aminorūgščių sunkioji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 50 ir aminorūgščių lengvoji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 52.

16. Žmogaus monokloninis antikūnas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad aminorūgščių sunkioji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 54 ir aminorūgščių lengvoji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 56.

17. Žmogaus monokloninis antikūnas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad aminorūgščių sunkioji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 58 ir aminorūgščių lengvoji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 60.

18. Žmogaus monokloninis antikūnas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad aminorūgščių sunkioji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 62 ir aminorūgščių lengvoji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 64.

19. Žmogaus monokloninis antikūnas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad aminorūgščių sunkioji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 66 ir aminorūgščių lengvoji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 68.

20. Žmogaus monokloninis antikūnas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad aminorūgščių sunkioji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 70 ir aminorūgščių lengvoji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 72.

21. Žmogaus monokloninis antikūnas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad aminorūgščių sunkioji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 74 ir aminorūgščių lengvoji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 76.

22. Žmogaus monokloninis antikūnas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad aminorūgščių sunkioji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 78 ir aminorūgščių lengvoji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 80.

23. Žmogaus monokloninis antikūnas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad aminorūgščių sunkioji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 82 ir aminorūgščių lengvoji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 84.

24. Žmogaus monokloninis antikūnas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad aminorūgščių sunkioji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 86 ir aminorūgščių lengvoji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 88.

25. Žmogaus monokloninis antikūnas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad aminorūgščių sunkioji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 90 ir aminorūgščių lengvoji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 92.

26. Žmogaus monokloninis antikūnas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad aminorūgščių sunkioji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 94 ir aminorūgščių lengvoji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 96.

27. Žmogaus monokloninis antikūnas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad aminorūgščių sunkioji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 98 ir aminorūgščių lengvoji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 100.

28. Žmogaus monokloninis antikūnas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad aminorūgščių sunkioji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 102 ir aminorūgščių lengvoji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 104.

29. Žmogaus monokloninis antikūnas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad aminorūgščių sunkioji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 106 ir aminorūgščių lengvoji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 108.

30. Žmogaus monokloninis antikūnas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad aminorūgščių sunkioji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 110 ir aminorūgščių lengvoji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 112.

31. Žmogaus monokloninis antikūnas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad aminorūgščių sunkioji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 114 ir aminorūgščių lengvoji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 116.

32. Žmogaus monokloninis antikūnas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad aminorūgščių sunkioji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 116 ir aminorūgščių lengvoji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 118.

33. Žmogaus monokloninis antikūnas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad aminorūgščių sunkioji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 118 ir aminorūgščių lengvoji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 120.

34. Žmogaus monokloninis antikūnas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad aminorūgščių sunkioji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 122 ir aminorūgščių lengvoji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 124.

35. Žmogaus monokloninis antikūnas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad aminorūgščių sunkioji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 126 ir aminorūgščių lengvoji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 128.

36. Žmogaus monokloninis antikūnas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad aminorūgščių sunkioji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 130 ir aminorūgščių lengvoji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 132.

37. Žmogaus monokloninis antikūnas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad aminorūgščių sunkioji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 134 ir aminorūgščių lengvoji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 136.

38. Žmogaus monokloninis antikūnas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad aminorūgščių sunkioji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 138 ir aminorūgščių lengvoji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 140.

39. Žmogaus monokloninis antikūnas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad aminorūgščių sunkioji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 142 ir aminorūgščių lengvoji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 144.

40. Žmogaus monokloninis antikūnas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad aminorūgščių sunkioji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 146 ir aminorūgščių lengvoji grandinė apima seką SEQ ID Nr. 148.

41. Antikūnas imobilizuotas ant netirpios matricos, kur antikūnas yra antikūnas pagal 2 punktą.

42. Pagerintas monocitų chemotaksio baltymo-1 (MCP-1) lygio nustatymo paciento pavyzdyje būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas pagerintas būdas apima panaudojimą anti-MCP-1 antikūno pagal 2 punktą MCP-1 lygio nustatymui bandinyje iš žmogaus.

43. Būdas pagal 42 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad paciento bandinys yra kraujas.

44. Kompozicija, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad apima antikūną arba jo fragmentą pagal 2 punktą ir farmaciškai priimtina nešiklį.

45. Antikūno panaudojimas gamyboje vaisto, skirto neoplastinių ligų gydymui gyvūnuose, kur minėtas monokloninis antikūnas specifiskai rišasi su monocitų chemotaksio baltymu-1 (MCP-1).

46. Panaudojimas pagal 45 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas antikūnas yra pilnai žmogaus antikūnas.

47. Panaudojimas pagal 45 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėta neoplastinė liga yra parinkta iš grupės, susidedančios iš: krūties vėžio, kiaušidžių vėžio, pūslės vėžio, plaučių vėžio, glioblastomos, skrandžio vėžio, endometriumo vėžio, inkstų vėžio, gaubtinės žarnos vėžio, kasos vėžio ir prostatos vėžio.

48. Antikūno panaudojimas gamyboje vaisto, skirto uždegiminių būklių efektyviam gydymui gyvūnuose, kur minėtas monokloninis antikūnas specifiskai rišasi su monocitų chemotaksio baltymu-1 (MCP-1).

49. Panaudojimas pagal 48 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas antikūnas yra pilnai žmogaus antikūnas.

50. Panaudojimas pagal 48 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėta uždegiminė būklė parinkta iš grupės, susidedančios iš: reumatoidinio artrito, glomeronefrito, aterosklerozės, psoriazės, restenozės, autoimuninės ligos ir išsėtinės sklerozės.

51. Pilnai žmogaus monokloninis antikūnas, specifiskai susiririantis su monocitų chemotaksio baltymu-1 (MCP-1), skirtas efektyviam neoplastinių ligų gydymui gyvūnuose, kuriems reikalingas neoplastinės ligos gydymas.

52. Pilnai žmogaus monokloninis antikūnas pagal 51 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis skirtas neoplastinių ligų gydymui, kur neoplastinė liga parinkta iš grupės, susidedančios iš: krūties vėžio, kiaušidžių vėžio, pūslės vėžio, plaučių vėžio, glioblastomos, skrandžio vėžio, endometriumo vėžio, inkstų vėžio, gaubtinės žarnos vėžio, kasos vėžio ir prostatos vėžio.

53. Pilnai žmogaus monokloninis antikūnas, specifiskai susiririšantis su monocitų chemotaksio baltymu-1 (MCP-1), skirtas uždegiminių būklių gydymui gyvūnuose, kuriems reikalingas toks gydymas.

54. Pilnai žmogaus monokloninis antikūnas pagal 53 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis skirtas efektyviam uždegiminių būklių gydymui, kur uždegiminė būklė parinkta iš grupės, susidedančios iš: reumatoidinio artrito, glomeronefrito, aterosklerozės, psoriazės, restenozės, autoimuninės ligos ir išsėtinės sklerozės.

55. Žmogaus monokloninis antikūnas, kuris rišasi su MCP-1 ir apima sunkiosios grandinės komplementarumą apsprendžiančią sritį (CDR) CDR1, CDR2 ir CDR3, parinktą iš grupės, susidedančios iš SEQ ID Nr. 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46, 50, 58, 66, 70, 74, 78, 82, 86, 90, 94, 102, 106, 110, 114, 122, 126, 130, 134, 138 ir 142, kaip pavaizduota Fig. 7A ir 10A.

56. Žmogaus monokloninis antikūnas, kuris rišasi su MCP-1 ir apima lengvosios grandinės komplementarumą apsprendžiančią sritį (CDR) CDR1, CDR2 ir CDR3, parinktą iš grupės, susidedančios iš SEQ ID Nr. 4, 8, 12, 16, 20, 28, 32, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68, 72, 80, 84, 88, 92, 96, 104, 108, 112, 116, 124, 128, 136, 140 arba 144, kaip pavaizduota Fig. 8A ir 9A.

57. Žmogaus monokloninis antikūnas, kuris rišasi su MCP-1 ir apima sunkiosios grandinės komplementarumą apsprendžiančią sritį (CDR) CDR1, CDR2 ir CDR3, parinktą iš grupės, susidedančios iš SEQ ID Nr. 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46, 50, 58, 66, 70, 74, 78, 82, 86, 90, 94, 102, 106, 110, 114, 122, 126, 130, 134, 138 ir 142, kaip pavaizduota Fig. 7A ir 10A ir lengvosios grandinės komplementarumą apsprendžiančią sritį (CDR) CDR1, CDR2 ir CDR3, parinktą iš grupės, susidedančios iš SEQ ID Nr. 4, 8, 12, 16, 20, 28, 32, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68, 72, 80, 84, 88, 92, 96, 104, 108, 112, 116, 124, 128, 136, 140 arba 144, kaip pavaizduota Fig. 8A ir 9A.

SEKOS

<110> ABGENIX, INC.

GUDAS, Jean M.

HAAK-FRENDSCHO, Mary

FOORD, Orit

LIANG, Meina L.

AHLUWALIA, Kiran

BHAKTA, Sunil

<120> ANTIKŪNAI, NUKREIPTI PRIEŠ MONOCITŲ

CHEMOTAKSIO BALTYMŲ-1 (MCP-1) IR JŲ PANAUDOJIMAS

<130> ABGENIX.091VPC

<150> US 60/404,802

<151> 2002-08-19

<160> 149

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 1335

<212> DNR

<213> Homosapien

<400> 1

```

cagggtccagc tgggtacagtc tgggggctgag gtgaagaagc ctgggggcctc agtgaagggtc 60
tcctgcaagg tttccggata caccctcact gaattatcca tgcactgggt gcgacagggt 120
cctggaaatg ggcttgagtg gatgggaggt tttgatcctg aagatgggtga gacaatctac 180
gcacagaggt tccagggcag agtcgtcatg accgaggacc catctacaga cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aaccaacgag 300
ttttggagtg gttattttga ctactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctccctcagcc 360
tccaccaagg gcccatcggg cttccccctg gcgccctgct ccaggagcac ctccgagagc 420
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccgggtgac ggtgtcgtgg 480
aactcaggcg ctctgaccag cggcgtgcac accttccag ctgtcctaca gtccctcagga 540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca acttcggcac ccagacctac 600
acctgcaacg tagatcacia gccagcaac accaagggtg acaagacagt tgagcgcaaa 660
tgttgtgtcg agtgcccacc gtgcccagca ccacctgtgg caggaccgtc agtcttctc 720
ttcccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccga cccctgaggt cacgtgcgtg 780
gtgggtgacg tgagccacga agaccocgag gtccagttca actggtacgt ggacggcgtg 840
gaggtgcata atgccaagac aaagccaagg gaggagcagt tcaacagcac gttccgtgtg 900
gtcagcgtcc tcaccgttgt gcaccaggac tggctgaaag gcaaggagta caagtgcagg 960
gtctccaaca aaggcctccc agcccccatc gagaaaacca totccaaaac caaagggcag 1020
ccccgagaac cacaggtgta caccctgcc ccctcccggg aggagatgac caagaaccag 1080
gtcagcctga cctgcctggg caaaggcttc taccacagcg acatcgccgt ggagtgaggag 1140
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacacctc ccagtctgga ctccgacggc 1200
tccttcttcc tctacagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gaggcctctcc 1320
ctgtctccgg gtaaa

```

1335

<210> 2

<211> 445

<212> PRT

<213> Homosapien

<400> 2

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

1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Glu Leu			
20	25	30	
Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Asn Gly Leu Glu Trp Met			
35	40	45	
Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Arg Phe			
50	55	60	
Gln Gly Arg Val Val Met Thr Glu Asp Pro Ser Thr Asp Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Ala Thr Asn Glu Phe Trp Ser Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
100	105	110	
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe			
115	120	125	
Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu			
130	135	140	
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp			
145	150	155	160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu			
165	170	175	
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser			
180	185	190	
Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro			
195	200	205	
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu			
210	215	220	
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu			
225	230	235	240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu			
245	250	255	
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln			
260	265	270	
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys			
275	280	285	
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu			
290	295	300	
Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys			
305	310	315	320
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys			
325	330	335	
Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser			
340	345	350	
Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys			
355	360	365	
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln			
370	375	380	
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly			
385	390	395	400
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln			
405	410	415	
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn			
420	425	430	
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
435	440	445	

<210> 3

<211> 660

<212> DNR

<213> Homosapien

<400> 3

gacatogtga tgaccacagtc tccagaactcc ctggctatgt ctctggggoga gagggccacc 60
 atcaactgta agtccagcca gagtggttta tacagctcca acaataagaa ctacttagtt 120
 tgggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aaactgctca tttactgggc atctatccgg 180
 gaatccgggg tccctgaccg attcagttcc agcgggtctg agacagattt cactctcacc 240
 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttttagtagt 300
 ccgtggacgt tccggccaagg gaccaagggtg gaaatcaaac gaactgtggc tgcaccatct 360
 gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttggtgtg 420
 ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaagggtgga taacgocctc 480
 caatogggta actcccagga gagtgtoaca gaggaggaca gcaaggacag cactacagc 540
 ctcagcagca cctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc 600
 gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt 660

<210> 4

<211> 220

<212> PRT

<213> Homosapien

<400> 4

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

<210> 5

<211> 475

<212> DNR

<213> Homosapien

<400> 5

cagggtccagc tgggtacagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaagggtc 60
 tctctgaagg tttccggata caccctcact gaattatcca tgcactgggt gcgacagggt 120
 cctggaaaag ggcttgagtg gatgggaggt tttgatcctg aagatggtga aacaatctac 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctacaga cacagcctac 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac aaggccgtgt attattgtgc aaccaacgaa 300
 ttttggagtg gttattttga ctactggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctccctcagcc 360
 tccaccaagg gcccatcggt cttcccccctg gcgcctgtct ccaggagcac taattccccc 420
 ggcggtgcaca ctttcccgag tgtcctacag tctcaggac tctactccct cagca 475

<210> 6
 <211> 158
 <212> PRT
 <213> Homosapien

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

<210> 7
 <211> 477
 <212> DNR
 <213> Homosapien

<400> 7
 gacatcgtga tgaccagtc tccagccctcc ctggctgagt ctctgggcca gagggccacc 60
 atcaattgca agtccagcca gagtgtttta tatagtcca acaataagaa ctacttagtt 120
 tgggtaccagc agaaactagg acagccccct aagctgctca tttactgggc atctaccggg 180
 gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcaacaata ttatcgtagt 300
 ccgtggacgt tcggccaagg gaccaagggtg gaaatcaaac gaactgtggc tgcaccatct 360
 gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 420
 ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgcc 477

<210> 8
 <211> 159
 <212> PRT
 <213> Homosapien

<400> 8
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Glu Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Leu Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

LT 5416 B

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

<210> 9

<211> 556

<212> PRT

<213> Homosapien

<400> 9

Cys	Ala	Gly	Gly	Thr	Cys	Cys	Ala	Gly	Cys	Thr	Gly	Gly	Thr	Ala	Cys
1				5					10					15	
Ala	Gly	Thr	Cys	Thr	Gly	Gly	Gly	Gly	Cys	Thr	Gly	Ala	Gly	Gly	Thr
			20					25					30		
Gly	Ala	Ala	Gly	Ala	Ala	Gly	Cys	Cys	Thr	Gly	Gly	Gly	Gly	Cys	Cys
		35				40					45				
Thr	Cys	Ala	Gly	Thr	Gly	Ala	Ala	Gly	Gly	Thr	Cys	Thr	Cys	Cys	Thr
	50					55				60					
Gly	Cys	Ala	Ala	Gly	Gly	Thr	Thr	Thr	Cys	Cys	Gly	Gly	Ala	Thr	Ala
65				70					75					80	
Cys	Ala	Cys	Cys	Cys	Thr	Cys	Ala	Cys	Thr	Gly	Ala	Ala	Thr	Thr	Ala
				85				90					95		
Thr	Cys	Cys	Ala	Thr	Gly	Cys	Ala	Cys	Thr	Gly	Gly	Gly	Thr	Gly	Cys
			100					105					110		
Gly	Ala	Cys	Ala	Gly	Gly	Cys	Thr	Cys	Cys	Thr	Gly	Gly	Ala	Ala	Ala
		115				120					125				
Ala	Gly	Gly	Gly	Cys	Thr	Thr	Gly	Ala	Gly	Thr	Gly	Gly	Ala	Thr	Gly
	130					135					140				
Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Thr	Thr	Thr	Thr	Gly	Ala	Thr	Cys	Cys	Thr	Gly
145					150				155					160	
Ala	Ala	Gly	Ala	Thr	Gly	Gly	Thr	Gly	Ala	Ala	Ala	Cys	Ala	Ala	Thr
			165					170					175		
Cys	Thr	Ala	Cys	Gly	Cys	Ala	Cys	Ala	Gly	Ala	Ala	Gly	Thr	Thr	Cys
			180					185					190		
Cys	Ala	Gly	Gly	Gly	Cys	Ala	Gly	Ala	Gly	Thr	Cys	Ala	Cys	Cys	Ala
		195					200				205				
Thr	Gly	Ala	Cys	Cys	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Cys	Ala	Cys	Ala	Thr	Cys
	210					215					220				
Thr	Ala	Cys	Ala	Gly	Ala	Cys	Ala	Cys	Ala	Gly	Cys	Cys	Thr	Ala	Cys
225					230					235				240	
Ala	Thr	Gly	Gly	Ala	Gly	Cys	Thr	Gly	Ala	Gly	Cys	Ala	Gly	Cys	Cys
			245						250					255	
Thr	Gly	Ala	Gly	Ala	Thr	Cys	Thr	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Cys	Ala	Cys
		260						265					270		
Gly	Gly	Cys	Cys	Gly	Thr	Gly	Thr	Ala	Thr	Thr	Ala	Cys	Thr	Gly	Thr
	275						280				285				
Gly	Cys	Ala	Ala	Cys	Ala	Ala	Ala	Cys	Gly	Ala	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr
	290					295					300				
Gly	Gly	Ala	Gly	Thr	Gly	Gly	Thr	Thr	Ala	Thr	Ala	Thr	Ala	Ala	Ala
305					310					315					320

Cys Thr Ala Cys Thr Gly Gly Gly Gly Cys Cys Ala Gly Gly Gly Ala
 325 330 335
 Ala Cys Cys Cys Thr Gly Gly Thr Cys Ala Cys Cys Gly Thr Cys Thr
 340 345 350
 Cys Cys Thr Cys Ala Gly Cys Cys Thr Cys Cys Ala Cys Cys Ala Ala
 355 360 365
 Gly Gly Gly Cys Cys Cys Ala Thr Cys Gly Gly Thr Cys Thr Thr Cys
 370 375 380
 Cys Cys Cys Cys Thr Gly Gly Cys Gly Cys Cys Cys Thr Gly Cys Thr
 385 390 395 400
 Cys Cys Ala Gly Gly Ala Gly Cys Ala Cys Cys Thr Cys Cys Gly Ala
 405 410 415
 Gly Ala Gly Cys Ala Cys Ala Gly Cys Gly Gly Cys Cys Cys Thr Gly
 420 425 430
 Gly Gly Cys Thr Gly Cys Cys Thr Gly Gly Thr Cys Ala Ala Gly Gly
 435 440 445
 Ala Cys Thr Ala Cys Thr Thr Cys Cys Cys Cys Gly Ala Ala Cys Cys
 450 455 460
 Gly Gly Thr Gly Ala Cys Gly Gly Thr Gly Thr Cys Gly Thr Gly Gly
 465 470 475 480
 Ala Ala Cys Thr Cys Ala Gly Gly Cys Gly Cys Thr Cys Thr Gly Ala
 485 490 495
 Cys Cys Ala Gly Cys Gly Gly Cys Gly Thr Gly Cys Ala Cys Ala Cys
 500 505 510
 Cys Thr Thr Cys Cys Cys Ala Gly Cys Thr Gly Thr Cys Cys Thr Ala
 515 520 525
 Cys Ala Gly Thr Cys Cys Thr Cys Ala Gly Gly Ala Cys Thr Cys Thr
 530 535 540
 Ala Cys Thr Cys Cys Cys Thr Cys Ala Gly Cys Ala
 545 550 555

<210> 10
 <211> 185
 <212> PRT
 <213> Homosapien

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

180

185

<210> 11
 <211> 490
 <212> DNR
 <213> Homosapien

<400> 11
 gacatcgtga tgacccagtc tccagaactcc ctggcgtgtgt ctctggggcga gagggccacc 60
 atcaactgca agtccagcca gagtggttta tacagctcca acaataagaa ctacttagtt 120
 tggtagcaac agaaaccagg acagcctcct aaactgctca ttactgggc atctatccgg 180
 gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcaacagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcagta tttttatagt 300
 cagtggacgt tgggccaagg gaccaagggtg gaaatcaaac gaactgtggc tgcaccatct 360
 gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 420
 ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaagggtgga taacgccctc 480
 caatcgggta 490

<210> 12
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Homosapien

<400> 12
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ile Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Asn Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95
 Tyr Phe Tyr Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 115 120 125
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 130 135 140
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 145 150 155 160
 Gln Ser Gly

<210> 13
 <211> 543
 <212> DNR
 <213> Homosapien

<400> 13
 cagggtccagc tggtagacgtc tggggcgtgag gtgaagaagc ctgggggcctc agtgaaggct 60
 tccctgcaagg ttcccggaaca caccctcact gaattatcca tgcactgggt ggcacaggct 120
 cctggaaaag ggcttgagtg gatgggagggt ttgatcctg aagatgatga aacaatctac 180
 gcacagaagt tccaggacag agtcaccatg accgaggaca catctacaga cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctaag atctgaggac acggcctgt attactgtgc aaccaacgat 300
 ttttgagtg gttattttga ctgctggggc cagggaacc tggtcacgt ctctcagcc 360

tccaccaagg gcccatcggt cttccccctg gagccctgct ccaggagcac ctccgagagc 420
 acagcgcccc tgggtcgctt ggtcaaggac tacttccccg aacgggtgac ggtgtcgctg 480
 aactcaggcg ctctgaccag cggogtgcac aacttcccag cgtccctaca gtctcagga 540
 ctt 543

<210> 14
 <211> 181
 <212> PRT
 <213> Homosapien

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

<210> 15
 <211> 490
 <212> DNR
 <213> Homosapien

<400>*15
 gacatcgctg tgaccacagtc tccagactcc ctggctgtgt gtctgggcga gagggccacc 60
 atcaactgca agtccagcca gagtgcttta tatagtccca acaataagaa cttcttagtt 120
 tggtagcagc agagaccagg acagcctcct aagctgctca tttactgggc atctaccgg 180
 gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagcc tgcaggetga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtagt 300
 ccgtggacgt tggccaagg gaccaaggtg gaaatcaaac gaactgtggc tgcaccatct 360
 gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 420
 ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgccctc 480
 caatcggcta 490

<210> 16
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Homosapien

<400> 16
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Cys Leu Gly
 1 5 10 15

LT 5416 B

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

<210> 17
 <211> 1335
 <212> DNR
 <213> Homosapien

<400> 17
 cagggtccagc tgggtacagtc tgggggctgag gtgaagaagc ctgggggcctc agtgaaggctc 60
 tcttgcaagg tttccggata caccctcact gaattatcca tgcactgggt gcgacaggct 120
 cctggaaaag ggcttgagtg gatgggaggt tttgatcctg aagatgggtga aacaatctac 180
 gcacagaagt tocagggcag agtcaccatg accgaggaca catctacaga cacagtctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccatgt attactgtgc aacacgggag 300
 ttttgactg gttattttga cactgggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctccctcagcc 360
 tocaccaagg gcccatcgtt cttccccctg gcgccttgct ccaggagcac ctccgagagc 420
 acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 480
 aactcaggcg ctctgaccag cggcgtgcac accttcccag ctgtcctaca gtcctcagga 540
 ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccttccagca acttcggcac ccagacctac 600
 acctgcaacg tagatcaciaa gccagcaac accaagggtg acaagacagt tgagcgcaaa 660
 tgttgtgtcg agtgcccacc gtgcccagca ccacctgtgg caggaccgtc agtcttctc 720
 tccccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccga cccctgaggt cacgtgcgtg 780
 gtggtggaag tgagccacga agaccccag gtccagttca actgggtacgt ggacggcgtg 840
 gaggtgcata atgccaagac aaagccacgg gaggagcagt tcaacagcac gttccgtgtg 900
 gtcagcgtcc tcaccgttgt gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgcag 960
 gtctccaaca aaggcctccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaaac caaagggcag 1020
 ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg aggagatgac caagaaccag 1080
 gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc taccocagcg acatcgccgt ggagtgaggag 1140
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacaacct ccatgctgga ctccgacggc 1200
 tcttcttcc tctacagcaa gctcacctg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1320
 ctgtctccgg gtaaa 1335

<210> 18
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> Homosapien

<400> 18
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Glu Leu

<400> 19

```

gacatcgtga tgaaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctggggcga gagggccacc 60
atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagtt 120
tggtatcagc agaaaaccagg acagccctct aaactgctca tttactgggc atctatccgg 180
gaatccgggg tcccggaaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtaact 300
ccgtcactt tggcgaggagg gaccaaggtg gagatcaaac gaactgtggc tgcaccatct 360
gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 420
ctgtgaata acttttatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaagggtga taacgccctc 480
caatcgggta actcccagga gagtgtcaca ggcaggaca gcaaggacag cacctacagc 540
ctcagcagca cctgacgct gagcaaaagc gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc 600
gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga ggttcaacag gggagagtgt 660

```

<210> 20

<211> 220

<212> PRT

<213> Homosapien

<400> 20

```

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

```

<210> 21

<211> 543

<212> DNR

<213> Homosapien

<400> 21

```

caggtcacgc tgggtacagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggggctc agtgaaggtc 60
tcttgcaagg ttccgggata cacttttact gaattatcca tgcactgggt ggcacaggct 120
cctggaaaag ggcttgagtg gatgggaggt tttgatcctg aagatgggtga aacaagctac 180
gcacagaagt tccggggcag agtcaccatg accgaggaca catctacaga cacagccac 240
atggagotga gcagcctgag atctgaggac acggcctgtg attactgtgc aaccaacgat 300
ttttggagtg gttattttga ctattggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctctcagcc 360

```

```

tccaccaaagg gcccatcggt cttccccctg gggccctgct ccaggagcac ctccgagagc 420
acagcggccc tgggtcgctt ggtcaaggac tacttccccg aacgggtgac ggtgtcgttg 430
aatcaggcgg ctctgaccag cggcgtgcac accttcccag ctgtcctaca gtccctcagga 540
ctt
543

```

<210> 22
 <211> 181
 <212> PRT
 <213> Homosapien

<400> 22
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Leu
 20 25 30
 Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Arg Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala His
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Asn Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu
 180

<210> 23
 <211> 460
 <212> DNR
 <213> Homosapien

<400> 23
 gacatccaga tgaccacagtc tocatottcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgct gggcgagtc gggattgac atctacttag cctgggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatcaatgct gcatccagtt tgcaaaacgg ggtccctcca 180
 aggttcggcg gcagtggtatc tgggacagat ttcaactcca ccatcagcgg cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttaacta ttgtcaactg aactactttt tcccgtagac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa acgaactgtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc 460

<210> 24
 <211> 153
 <212> PRT
 <213> Homosapien

<400> 24
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asp Ile Tyr

```
<210> 25
<211> 543
<212> DNR
<213> Homosapien.
```

```
<210> 26
<211> 181
<212> PRT
<213> Homosapien
```

<400> 26															
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Val	Ser	Gly	Tyr	Thr	Leu	Thr	Glu	Leu
			20					25					30		
Ser	Met	His	Trp	Val	Arg	Arg	Ile	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Gly	Phe	Asp	Pro	Glu	Asp	Gly	Glu	Thr	Ile	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
50						55					60				
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Glu	Asp	Thr	Ser	Thr	Asp	Thr	Ala	Tyr
65					70				75						80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85				90					95		
Ala	Thr	Asn	Asp	Phe	Trp	Ser	Gly	Tyr	Trp	Gly	His	Trp	Gly	Gln	Gly
		100						105					110		
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
		115					120					125			
Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu
130						135					140				
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp

```
<400> 29
cagggtccagc tgggtacagtc tgggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg ttcccgata caccctcact gaattatcca tgcactgggt gcgacaggct 120
cctggaaaag ggcttgagtg gatgggaggt tttgatcctg aagatgatga aacaatctac 180
gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctacaga caccgcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt atttctgtgc aaccaacgat 300
```

ttttggagtg gttattttga ctgctgggac caggggaacc ttgtaccgt ctctcagcc 360
 tccaccaagg gcccatcggt ctccccctg ggcctctgt ccaggaacac ctccgagagc 420
 acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aacgggtgac ggtgtctggg 480
 aactcaggcg ctctgaccag cggcgtgac accttcccag ctgt 524

<210> 30
 <211> 174
 <212> PRT
 <213> Homosapien

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

<210> 31
 <211> 490
 <212> DNR
 <213> Homosapien

<400> 31
 gacatcgtga tgaccacgtc tccagactcc ctggctgcgt ctctgggcca gagggccacc 60
 atcaactgca agtccagtcga gagtgtttta tacaggcca acaataagaa ttatttagtt 120
 tggtaaccagc aaaaaccagg acagcctcct aagctgctca tttactgggc atctatccgg 180
 gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttatttct gtcagcaata ttatagttct 300
 ccgtggacgt ttggccaagg gaccaagggtg gaaatcaaac gaactgtggc tgcaccatct 360
 gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 420
 ctgctgaata actttatatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaagggtgga taacgccttc 480
 caatcgggta 490

<210> 32
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Homosapien

<400> 32
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Arg
 20 25 30

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

<210> 33
 <211> 545
 <212> DNR
 <213> Homosapien

<400> 33
 cagggtccagc tgggtacagtc tgggggtgag gtgaagaagc ctgggggcctc agtgaaggtc 60
 tcttgcaagg tttccggata caccctcact gaattatoca tgcactgggt gcgacaggct 120
 cctggaaaag ggcttgagtg gatgggaggt tttgatcctg aagatgggtga aacaatctac 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctacaga cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aacctgggtat 300
 agtgggactct acttagcttt tgatatctgg ggccaaggga caatgggtcac cgtctcttca 360
 gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cactcccgag 420
 agcacagcgg ccttgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgtcg 480
 tggaactcag gcgctctgac cagcggcggtg cacaccttcc cagctgtcct acagtcttca 540
 ggatt 545

<210> 34
 <211> 181
 <212> PRT
 <213> Homosapien

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

LT 5416 B

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly
 180

<210> 35
 <211> 472
 <212> DNR
 <213> Homosapien

<400> 35
 gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc 60
 atcacctgcc gggccagtc gagcattggt agtagcttac actggtacca gcagaaacca 120
 gatcagtcctc caaagctcct catcaagtat gcttcccagt ccttctcagg ggtcccctcg 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcaccctca ccatcaatag cctggaagct 240
 gaagatgctg caacgtatta ctgtcatcag agtagtagtt taactcacac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa acgaactgtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gctgctgaa taacttctat 420
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggt ta 472

<210> 36
 <211> 157
 <212> PRT
 <213> Homosapien

<400> 36
 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 His
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly 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
 145 150 155

<210> 37
 <211> 1335
 <212> DNR
 <213> Homosapien

<400> 37
 cagggtccagt tgggtacagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggct 60
 tectgcaagg ttccgggata caccctcact gaattatcca tgcactgggt gcgacaggct 120
 cctggaaaag ggcttgagtg gatgggaggt tttgatcctg aagatgggtga aacaatctac 180
 Gcacaadaact tccagggcag atccactata accgaggaga catcacaga cacagccctac 240

```

atggagctga gaagccagag atctgaggac aaggccgtgt atttctgtgc aaccaacgaa 300
ttttggagtg gttattttga ctactggggg cagggaaccc tggtaacagt ctctctagcc 360
ccaccaagg gcccatcggt ctcccccttg gggccctgtt ccaggagcac ctccgagagc 420
acagcggccc tgggtgctt ggtcaaggac tacttcccog aacgggtgac ggtgtcgttg 480
aactcaggcg ctctgaccag cggcgtgac aacttcccag ctctctaca gtctcaggga 540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgacgttg ccttccagca aattcggcac ccagacctac 600
aactgcaacg tagatcaca gccccagcac accaagggtg acaagacagt tgagcgcaaa 660
tgttgtgtcg agtgcccacc gtgcccagca ccacctgttg caggacgttc agtcttcttc 720
ttccccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt caagtgcgtg 780
gtggtggacg tgagccacga agaccccgag gtccagttca actggtacgt ggacggcgtg 840
gaggtgcata atgccaagac aaagccacgg gaggagcagt tcaacagcac gttccgtgtg 900
gtcagcgtcc tcaccgttgt gcaccaggac tgggtgaacg gcaaggagta caagtgcag 960
gtctccaaca aaggcctccc agcccccatc gagaaaaaca tctccaaaac caaaggcgag 1020
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccattccggg aggagatgac caagaaccag 1080
gtcagcctga cctgctgtgt caaaggcttc taacccagcg acatcgccgt ggagtggtgag 1140
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacacctc ccattgtgga ctccgacggc 1200
tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260
ttctcatgct cgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1320
ctgtctccgg gtaaa 1335

```

<210> 38

<211> 445

<212> PRT

<213> Homosapien

<400> 38

```

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

```

275	280	285
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu		
290	295	300
Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys		
305	310	315
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys		
	325	330
Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser		
	340	345
Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys		
	355	360
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln		
	370	375
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly		
385	390	395
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln		
	405	410
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn		
	420	425
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
	435	440
		445

<210> 39
 <211> 660
 <212> DNR
 <213> Homosapien

<400> 39
 gacatcgtga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctggggcga gagggccacc 60
 atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagotcca acaataagaa ctatttagtt 120
 tgggtaccagc agagaccagg acagcctcct aagctgtcga tttactgggc atctaccg 180
 gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agogggtctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata tttttattct 300
 ccgtggacgt tccggccaagg gaccaaggta gaaatcaaac gaactgtggc tgcaccatct 360
 gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttggtgtgc 420
 ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaagggtga taacgccctc 480
 caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc 540
 ctcagcagca ccttgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc 600
 gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt 660

<210> 40
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Homosapien

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

	100		105		110
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp					
	115		120		125
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn					
	130		135		140
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu					
	145		150		155
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp					
	165		170		175
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr					
	180		185		190
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser					
	195		200		205
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys					
	210		215		220

<210> 41
 <211> 556
 <212> DNR
 <213> Homosapien

<400> 41
 caggtccagc tggtagagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcttgcaagg ttcccgaca cattttcact gaattatcca tacactgggt gcgacaggct 120
 cctggaaaag ggcctgagtg gatgggaggt tttgatcctg aagatgggtga aacaatctac 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctacaga cacagtctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggcctgtg attactgtgc aaccaacgat 300
 ttttgagtg gttattttga ctactggggc caggggaacc tggtcaccgt ctctcagcc 360
 tccaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcgcctgtc ccaggagcac ctccgagagc 420
 acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccgggtgac ggtgtcgtgg 480
 aactcaggcg ctctgaccag cggcgtgcac accttcccag ctgtcctaca gtcctcagga 540
 ctctactccc tcagca 556

<210> 42
 <211> 185
 <212> PRT
 <213> Homosapien

<400> 42
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly His Ile Phe Thr Glu Leu
 20 25 30
 Ser Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Asn Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

```

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

```

<210> 49
 <211> 476
 <212> DNR
 <213> Homosapien

```

<400> 49
caggtccagc tggtagagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg ttccggata caccctcact gaattatoca tgcactgggt gcgacaggct 120
cctggaaaag ggcttgagt gatgggaggt ttgatcctg aagatgatga aacaatctac 180
gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctacaca cacagcctac 240
atggaactga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aacacacgat 300
ttttggagtg cttattttta ctactggggc caggggaacc ttggtcaccgt ctctcagct 360
tccaccaagg gcccatccgt cttccccctg gcgcctgtgt ccaggagcac ctccgagagc 420
acagccgccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtc 476

```

<210> 50
 <211> 158
 <212> PRT
 <213> Homosapien

```

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

```

LT 5416 B

atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgocgtgt attactgtgc aacagatcct 300
 ggtggatata gtggctactt tgaccactgg ggcacgggaa ccttggtcac cgtctcctca 360
 gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag caacctccag 420
 agcacagcgg ccttgggctg cctgggtaag gactacttcc ccgaacgggt gacgggtgtcg 480
 tggaactcag gcgctctgac cagcggcgtg cacacottcc cagctgtcct acagtctcca 540
 ggactctact ccttcagca 559

<210> 46
 <211> 186
 <212> PRT
 <213> Homosapien

<400> 46
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Glu Leu
 20 25 30
 Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Asn Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Gly Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Asp Pro Gly Gly Tyr Ser Gly Tyr Phe Asp His Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 180 185

<210> 47
 <211> 464
 <212> DNR
 <213> Homosapien

<400> 47
 gacatcgtga tgaccacgtc tccagatttc ctggctgtgt ctctggcgca gaggcacc 60
 atcaactgca agtccagcca gagtgttttt tacagctoca acaataagaa ctacttagtt 120
 tggtaccagc agaaacccgg acagcctcct aagctgtctc tttactgggc atctaccogg 180
 gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagttct 300
 ccgtggacgt tcggccaagg gaccaagggt gaaatcaaac gaaatgtggc tgcaccatct 360
 gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaaatgcctc tgttgtgtgc 420
 ctgctgaata actcttatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaa 464

<210> 48
 <211> 154
 <212> PRT
 <213> Homosapien

<400> 48
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Phe Leu Ala Val Ser Leu Gly

```

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

```

<210> 49
 <211> 476
 <212> DNR
 <213> Homosapien

```

<400> 49
caggtccagc tgggtacagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg tttccgggata caccctcact gaattatcca tgcactgggt gcgacaggct 120
cctggaaaag ggcttgagtg gatgggaggt tttgatcctg aagatgatga aacaatctac 180
gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctacaca cacagcctac 240
atggaactga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aacacacgat 300
ttttggagtg cttattttta ctactggggc caggggaacc tggtcacogt ctccctcagct 360
tccaccaagg gcccatccgt cttccccctg ggcgcctgct ccaggagcac ctccgagagc 420
acagccgccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtc 476

```

<210> 50
 <211> 158
 <212> PRT
 <213> Homosapien

```

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

```

145

150

155

<210> 51
 <211> 490
 <212> DNR
 <213> Homosapien

<400> 51
 gacatogtga tgacccagtc tccagaactcc ctggctgtgt ctctggggcga gagggccacc 60
 atcaactgca agtccagcca gagtggttta tacggctcca acaataagag ctacttagct 120
 tgggtaccagc agaaaccagg acagcctoct aagctgotca tttactgggc atctaccggg 180
 gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagcc tgcaggctgc agatgtggca gtttattact gtcagcaaca ttatagtact 300
 ccgtgcagtt ttggccaggg gaccaaactg gagatcaaac gaactgtggc tgcaccatct 360
 gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 420
 ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgcctc 480
 caatcgggta 490

<210> 52
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Homosapien

<400> 52
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Gly
 20 25 30
 Ser Asn Asn Lys Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Ala Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95
 His Tyr Ser Thr Pro Cys Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 115 120 125
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 130 135 140
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 145 150 155 160
 Gln Ser Gly

<210> 53
 <211> 550
 <212> DNR
 <213> Homosapien

<400> 53
 cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tectgcaagg ctctcgata caccttcacc ggctactatc tgcactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaaccott acaatgatgg cacaaactat 180
 gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 240
 atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggcggttt attactgtgc gagagatata 300
 gccgcagctg gagccgtcta ctttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360

tcagcttcca ccaagggccc atccgtcttc cccctgggc cctgctccag gagcaactcc 420
 gagagcacag ccgcccctggg ctgcccgggc aaggactact ttccccgaac cggtagcggc 480
 gtcgtggaac tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tccacagtc 540
 ctcaggactt 550

<210> 54
 <211> 183
 <212> PRT
 <213> Homosapien

<400> 54
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Ile Ala Ala Ala Gly Ala Val Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Arg Thr Gly Asp Gly
 145 150 155 160
 Val Val Glu Leu Arg Arg Pro Asp Gln Arg Arg Ala His Leu Pro Gly
 165 170 175
 Cys Pro Thr Val Leu Arg Thr
 180

<210> 55
 <211> 458
 <212> DNR
 <213> Homosapien

<400> 55
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc aggcgagtc ggacattacc acctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctacgat gcaccaatt tggaaacagg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gaagtggatc tgggacagat ttactttca ccacagcag cctgcagcct 240
 gaagatattg caacatatta ctgtcaacaa tatgataatc tcccgatcac cttcggccaa 300
 gggacacgac tggagattaa acgaactgtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt goctgotgaa taacttctat 420
 cccagagagg ccaaagtaca gggaagggtg ataacgcc 458

<210> 56
 <211> 152
 <212> PRT
 <213> Homosapien

<400> 56
 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 Gln Ala Ser Gln Asp Ile Thr Thr Tyr

20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Ile
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu 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 Gly Arg Trp Ile Thr
 145 150

<210> 57
 <211> 571
 <212> DNR
 <213> Homosapien

<400> 57
 caggtccagc tgggtacagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggggcctc agtgaagggtc 60
 tcttgcaagg ttcccgata caccctcact gaattatcca tgcactgggt gcgacaggct 120
 cctggaaaag ggcttgagt gatgggaggt ttgatcctg aagatgggtga aacaatctac 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcattgat accgaggaca catctacaga cacagccttc 240
 atggacctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aacagacgat 300
 atgttgaccc ctactacct ctacttcgggt atggacgtot gggggccaagg gaccaagggtc 360
 accgtctcct cagcttccac caagggccca tccgtcttcc ccttgggcgcc ctgctccagg 420
 agcacctccg agagcacagc cgccctgggc tgccctggtea aggactactt ccccgaaaccg 480
 gtgacgggtgt cgtggaactc aggcgccttg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc 540
 ctacagtcct caggactcta ctccctcagc a 571

<210> 58
 <211> 190
 <212> PRT
 <213> Homosapien

<400> 58
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Glu Leu
 20 25 30
 Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Met Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Phe
 65 70 75 80
 Met Asp Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Asp Asp Met Leu Thr Pro His Tyr Leu Tyr Phe Gly Met Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 115 120 125
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
 130 135 140
 Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro

```
<400> 61
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctcaggttg ctccatcagc agtgggtggt actactggaa ctggatccgc 120
cagcaccagc ggaagggcct ggagtggatt gggtacatct attacagtgg aaacacctac 180
tacaaccgct cctcaagag tcgaattacc atatcaatag acacgtctaa gaaccagttc 240
tccctgaccc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagat 300
```

```

ggtggagacg atgcttttga tatctggggc caagggacaa tggtaacgt ctcttcagct 360
ccaccaaggy gcccatcgt ctcccccgt ggccttgc ccaggagcac ctccgagagc 420
acagccgccc tgggtgcct ggtaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtgtgg 480
aactcaggog cctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtctaca gtctcagga 540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg cctccagca gcttgggcac gaagacctac 600
acctgcaacg tagatcacia gccagcaac accaagggtg acaagagagt tgagtccaaa 660
tatggtcccc catgccatc atgcccagca cctgagttcc tggggggacc atcagtcttc 720
ctgttcccc caaaacccaa ggacaacttc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc 780
gtggtggtgg acgtgagcca ggaagacccc gaggtccagt tcaactggtg cgtggatggc 840
gtggaggtgc ataattgcaa gacaaagccg cgggaggagc agttcaacag cacgtaccgt 900
gtggtcagcg tcctcacgt cctgcaccag gactggctga accgcaagga gtacaagtgc 960
aaggtctcca acaaaggcct cccgtctcc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 1020
cagccccgag agccacaggt gtacacctg ccccatccc aggaggagat gaccaagaac 1080
caggtcagcc tgacctgct ggtcaaaggc ttctacccca gcgacatgc cgtggagtgg 1140
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccagc ctcccggtg gactccgac 1200
ggctccttct tcctctacag caggctaacc gtggacaaga gcaggtggca ggaggggaat 1260
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacaca gaagagcctc 1320
tccctgtctc tgggtaaa 1338

```

<210> 62

<211> 446

<212> PRT

<213> Homosapien

<400> 62

```

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

```

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 63
 <211> 642
 <212> DNR
 <213> Homosapien

<400> 63
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc aggcgagtc ggacattagc aactatttaa attggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaaactcct gatctacgat gcatccaatt tggaaacagg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gaagtggatc tgggacagat ttacttttca ccatcaacag cctgcagcct 240
 gaagatatgg caacatatta ctgtcaagaa tataataatc tccogtacag ttttggccag 300
 gggaccaagt tggagatcaa acgaactgtg gctgcacccat ctgtcttcat cttcccgcga 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gctgtgtgaa taacttctat 420
 ccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcaactaca gctcagcag caccctgacg 540
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642

<210> 64
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Homosapien

<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 Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Glu Tyr Asn Asn Leu Pro Tyr
 85 90 95
 Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu 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> 65
 <211> 1341
 <212> DNR
 <213> Homosapien

<400> 65
 caggtccagc tgggtacagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgcaggtc 60
 tcctgcaagg tttccggaga caccctcact gaattatcca tgcactgggt gcgacaggct 120
 cctggaaaag ggcttgagtg gatgggaggt tttgatcctg aagatggtga aacaatctac 180
 gcacggaagt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctacaga cacagtttac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac aaggccgtgt atttctgtgc aacagattca 300
 cgtggatata gtggctactt tgacaactgg ggccaggga cctgggtcac cgtctcctca 360
 gcttccacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccaggag caccctcgag 420
 agcacagccg cctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg 480
 tggaaactcag gcgcctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 540
 ggactctact cctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caogaagacc 600
 tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtc 660
 aaatatggtc ccccatgccc atcatgccc gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc 720
 ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg 780
 tgcgtgggtg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 840
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac 900
 cgtgtgggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 960
 tgcaagggtc ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1020
 gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag 1080
 aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 1140
 tgggagagca atgggagacc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt gctggactcc 1200
 gacggctcct tcttctctca cagcaggcta accgtggaca agagcagggt gcaggagggg 1260
 aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 1320
 ctctccctgt ctctgggtaa a 1341

<210> 66
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Homosapien

<400> 66
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Gln Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Asp Thr Leu Thr Glu Leu
 20 25 30
 Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Arg Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Val Tyr
 65 70 75 80

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

<210> 67

<211> 660

<212> DNR

<213> Homosapien.

<400> 67

gacatcgtga tgaccagctc tccagactcc ctggctgtgt ctctggggcga gagggccacc 60
 atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataacaa ctacttagtt 120
 tgggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aaattgotca tttactgggc atctaccggg 180
 gaattcggggg ttcttgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatttttct 300
 ccgtggacgt tcggccaagg gaccaagggtg gaaatcaaac gaactgtggc tgcaccatct 360
 gtcttcatct tcccgcacac tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 420

ctgctgaata aatttatatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaagggtgga taacggccctc 480
 caatcgggga aatcccagga gagtctcaca gagcaggaca gcaaggacag cacttacagc 540
 ctcagcagca ccttgacgct gagcaaaaga gactacgaga aacacaaaagt ctacggctgc 600
 gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gttcaacag gggagagtgt 660

<210> 68
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Homosapien

<400> 68
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Ser Asn Asn Asn Asn Tyr Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Phe Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95
 Tyr Tyr Phe Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 115 120 125
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 130 135 140
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 145 150 155 160
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 165 170 175
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 180 185 190
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 195 200 205
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220

<210> 69
 <211> 556
 <212> DNR
 <213> Homosapien

<400> 69
 caggtcacgc tggtagagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggccctc agtgaaggtc 60
 tcttgcaagg ttccgggata caccctcact gatttatcca tgcactgggt ggcacaggct 120
 cctggaaaag ggcttgagtg gatgggaggt tttgatcctg aagatgggtga aacaatctac 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catcttcaga cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggcctgtg attactgtgc aacccaagaa 300
 ttttgagtg gttattttga ctactggggc cagggaaacc tggtcacgt ctctcagct 360
 tccaccaagg gccatccgt cttccccctg ggcctgtgct ccaggagcac ctccgagagc 420
 acagccgccc tgggtgctt ggtcaaggac taattccccg aacgggtgac ggtgtcgtgg 480
 aactcaggcg cctgaccag cggcgtgcac accttcccg ctgtctctaca gtctcaggaa 540
 ctctactccc tcagca 556

<210> 70
 <211> 185

<212> PRT

<213> Homosapien

<400> 70

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

<210> 71

<211> 476

<212> DNR

<213> Homosapien

<400> 71

gacatcgtga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctggggcga gagggccacc 60
 atcaactgca agtccagcca gagggtttta ttcagctcca acaataagag ctacttaact 120
 tgggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aaattactca tttctctgggc atctatccgg 180
 gaatccgggg tccctgaacc aatcagtggc agcgggtctg ggacagatct cactctcacc 240
 atcagcagcc tgcaggctga agatgaggca gtttattact gtcagcaata ttatagtagt 300
 ccgtggacgt tccggccaagg gaccaagggtg gaaatcaaac gaactgtggc tgcaccatct 360
 gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 420
 ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaagggtgga taacgc 476

<210> 72

<211> 158

<212> PRT

<213> Homosapien

<400> 72

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

```

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

```

<210> 73
 <211> 546
 <212> DNR
 <213> Homosapien

<400> 73
 caggtccagc tggtagagtc tgggggtgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaagggtc 60
 tcctgcaagg tttccggata caccctcagt gaattatoca tgcactgggt gcgacagggt 120
 cctggaaaag ggcttgagtg gatgggaggt tttgatcctg aagatgggtga aataatccac 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctacaga cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggcogtgt attactgtgc aacaggcgat 300
 ttttggagtg gttattacct tgactgggtgg ggccagggaa ccctgggtcac cgtctcctca 360
 gcttccacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 420
 agcacagccg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 480
 tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctcct 540
 ggactt 546

<210> 74
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> Homosapien

<400> 74
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Ser Glu Leu
 20 25 30
 Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Ile Ile His Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Gly Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Tyr Leu Asp Trp Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu
 180

<210> 75
 <211> 457
 <212> DNR
 <213> Homosapien

<400> 75
 gaaatagtga tgatgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagggttaac agcaacttag cctgggtacca gcagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggctcct catcaacggg gcatccacca gggccaactgg catcccagcc 180
 aggttcagtg gcagtggtgc tgggacagag ttccacctca ccatcagcag cctgcagtc 240
 gaagattttg caatttatta ctgtcagcag tataatgact ggcctacgtt cactttcggc 300
 ggagggacca aggtggagat caatcgaact gtggtgcac catctgtctt catcttcccg 360
 ccatctgatg agcagttgaa atctggaact ggcctgtgtg tgtgcctgct gaataacttc 420
 tatccagag aggcacaagt acagtgggaa ggtggat 457

<210> 76
 <211> 152
 <212> PRT
 <213> Homosapien

<400> 76
 Glu Ile Val Met Met Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asn Ser Asn
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Asn Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asp Trp Pro Thr
 85 90 95
 Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Asn Arg Thr Val Ala
 100 105 110
 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125
 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140
 Ala Lys Val Gln Trp Glu Gly Gly
 145 150

<210> 77
 <211> 470
 <212> DNR
 <213> Homosapien

<400> 77
 cagggtccagc tgggtacagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggggctc agtgaaggtc 60
 tcttgcaagg tttccggata caccctcact gaattatcca tgcactgggt ggcacaggct 120
 cctggaaaag ggttgagtg gatgggaggt tttgatcctg aagatggtga aacaatgtac 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctacaga cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aaccgacgat 300
 ttttggagtg gttattttga ctactggggc cagggaaccc tgggcaccgt ctctcagcc 360
 tccaccaagg gcccatcggg ctccccctg ggcgcctgct ccaggagcac ctccgagagc 420
 acagcggccc tgggctgct ggtcaaggac tacttccccg aaccggcagg 470

<210> 78
 <211> 156
 <212> PRT

<213> Homosapien

<400> 78

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

<210> 79

<211> 490

<212> DNR

<213> Homosapien

<400> 79

gacatcgtga tgaccocagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctggacga gagggccacc 60
 atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagtccca accaaaagaa ctacttagtt 120
 tggatcagc agaagccagg acagcctcct aagctgctcc ttactgggc atctatccgg 180
 gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcaacaaag ttattttact 300
 ccgtggacgt tcggccaagg gaccaagggtg gaaatcaaac gaactgtggc tgcaccatct 360
 gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 420
 ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgcctc 480
 caatcgggta 490

<210> 80

<211> 163

<212> PRT

<213> Homosapien

<400> 80

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

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

<210> 81
 <211> 556
 <212> DNR
 <213> Homosapien

<400> 81
 cagggtccagc tgggtacagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggggcctc agtgaaggctc 60
 tcctgcaagg ttcccgata caccctcagt gaattatcca tgcactgggt gcgacaggct 120
 cctggaaaag ggcttgagt gatgggaggt tttgatcctg aagatgatga aacaatctac 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctacaga cacagccttc 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aaccacgat 300
 ttttgagtg gttattttca ctactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctccctcagct 360
 tccaccaagg gcccatcctg cttccccctg gcgccttgc ccaggagcac ctccgagagc 420
 acagccgccc tgggctgct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 480
 aactcaggcg cctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtccctcagga 540
 ctctactccc tcagca 556

<210> 82
 <211> 185
 <212> PRT
 <213> Homosapien

<400> 82
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Ser Glu Leu
 20 25 30
 Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asp Asp Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Phe
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr His Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Phe His Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 180 185

<210> 83
 <211> 476

<212> DNR
<213> Homosapien

<400> 83

```

gacatcgtga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctggggcga gagggccacc 60
atcaactgca agtccagcca gagtgcttta tacagctccg acaataagag ctacttagtt 120
tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aaggtgctca tttactgggc atctattcgg 180
gaatccgggg tccctgaccc attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
atcagcagcc tgcaggctga agatgaggca gtttattact gtcagcaata ttatactagt 300
ccgtggacgt tcggccaagg gaccaagggt gaaatcaaac gaactgtggc tgcaccatct 360
gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttggtgtg 420
ctgctgaata actttatatc cagagaggcc aaagtacagt ggaagggtgga taacgc 476

```

<210> 84
<211> 158
<212> PRT
<213> Homosapien

<400> 84

```

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

```

<210> 85
<211> 543
<212> DNR
<213> Homosapien

<400> 85

```

caggtccagc tggtacagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgtaagg ttccggata caccctcact gaattatcca tgcactgggt gcgacaggct 120
cctggaaaag ggcttgagtg gatgggaggt tttgatcctg aagatgggtg aacaatctac 180
gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctacaga cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aatccacgag 300
ttttggagtg gttattttga ctactggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctcttcagct 360
tccaccaagg gcccatccgt cttccccctg gcgcacctgt ccaggagcac ctccgagagc 420
acagccgccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 480
aactcaggcg cctgaccag cggcgtgcac accttcccg ctgtcctaca gtcctcagga 540
ctt

```

543

<210> 86
<211> 181
<212> PRT

<213> Homosapien

<400> 86

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

<210> 87

<211> 477

<212> DNR

<213> Homosapien

<400> 87

gacatcgtga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcca gagggccacc 60
 atcaactgca agtccagcct gagtggttta tacagctcca acaataagaa ctatttagtt 120
 tggtagcttc agaaaccagg acagcctcct aagttgctca tttactgggc atctaccgg 180
 gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagcc tgcaggccga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagttct 300
 ccgtggacgt tccgccaagg gaccaagggtg gaaatcaaac gaactgtggc tgcaccatct 360
 gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 420
 ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgcc 477

<210> 88

<211> 159

<212> PRT

<213> Homosapien

<400> 88

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

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

<210> 89
 <211> 1335
 <212> DNR
 <213> Homosapien

<400> 89
 caggtccagc tgggtacagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggggectc agtgaagggtc 60
 tcttgcaagg tttccggata caccctcact gaattatcca tgcactgggt gcgacagact 120
 cctggaaaag ggcttgagtg gatgggaggt tttgatcctg aagatgggtga aacaatctac 180
 gcacagaagt tccaggacag agtcaccatg accgaggaca catctacaga cacagcctac 240
 atggaactga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aacaaacgat 300
 ttttggaactg gttattatga ctactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctccctcagcc 360
 tccaccaagg gcccatcggt ctccccctg gggccctgct ccaggagcac ctccgagagc 420
 acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccgggtgac ggtgtcgtgg 480
 aactcaggcg ctctgaccag cggcgtgcac accttcccag ctgtcctaca gtcctcagga 540
 ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg cctccagca acttcggcac ccagacctac 600
 acctgcaacg tagatcacia gccagcagc accaagggtg acaagacagt tgagcgcaaa 660
 tgttgtgtcg agtgcccacc gtgcccagca ccacctgtgg caggaccgtc agtcttcctc 720
 ttcccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccga cccctgaggt cagctgcgtg 780
 gtggtggacg tgagccacga agaccccgag gtccagttca actggtacgt ggacggcgtg 840
 gaggtgcata atgccaagac aaagccacgg gaggagcagt tcaacagcac gttccgtgtg 900
 gtcagcgtcc tcaccgttgt gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgcaag 960
 gtctccaaca aaggcctccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaaac caaagggcag 1020
 ccccgagaac cacagggtga caccctgcc ccctccggg aggagatgac caagaaccag 1080
 gtcagcctga cctgcctggg caaaggcttc taccocagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacacctc ccatgctgga ctccgacggc 1200
 tccttcttcc tctacagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260
 ttctcatgct cctgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gaggctctcc 1320
 ctgtctccgg gtaaa 1335

<210> 90
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> Homosapien

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

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

<210> 91

<211> 660

<212> DNR

<213> Homosapien

<400> 91

gacatcgtga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
 atcaactgca agtccagcca gagtggttta tacagctcca acaataagaa ctacttagtt 120
 tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagacgctca tttactgggc atctaccgg 180
 gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggga gtttattact gtcaacaata ttatactagt 300
 ccgtggacgt tgggccaagg gaccaagggtg gaaatcaagc gaactgtggc tgcaccatct 360
 gtcttcatct tccggccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tggtgtgtgc 420
 ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaagggtgga taacgccctc 480
 caatcgggta actccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cactacagc 540
 ctcagcagca cctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc 600
 gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt 660

<210> 92
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Homosapien

<400> 92
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Thr Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95
 Tyr Tyr Thr Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 115 120 125
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 130 135 140
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 145 150 155 160
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 165 170 175
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 180 185 190
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 195 200 205
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220

<210> 93
 <211> 560
 <212> DNR
 <213> Homosapien

<400> 93
 caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cgtcacagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtgggtggtt actactggag ctggatccgc 120
 cagcaccag ggaagggcct ggagtggatt gggtagatctt attacagtgg gagcacctac 180
 tacaaccctg cctcaagag tcgagttatc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
 tccctgaagc tgacctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagatca 300
 tatagcagct cgtccccact ggttcgaccc ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc 360
 ctcagcttcc accaagggcc catccgtctt cccctggcg cctgtctcca ggagcacctc 420
 cgagagcaca gcgcctctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cgggtgacgg 480
 gtcgtggaac tcaggcgcgc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc 540
 ctcaggactc tactccctca 560

<210> 94
 <211> 186
 <212> PRT
 <213> Homosapien

<400> 94

LT 5416 B

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

<210> 95
 <211> 458
 <212> DNR
 <213> Homosapien

<400> 95
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aatgatttag gctggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagcgct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtctacag cataatagtt acccattcac ttctggccct 300
 gggaccaaag tggatatcaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgc 458

<210> 96
 <211> 152
 <212> PRT
 <213> Homosapien

<400> 96
 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 Gly Ile Arg Asn Asp
 20 25 30
 Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg 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 Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp 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
 145 150

<210> 97
 <211> 559
 <212> DNR
 <213> Homosapien

<400> 97
 caggtccagc tgggtacagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg ttcccgata caccctcact gaattatcca tgcactgggt gcgacaggct 120
 cctggaaaag ggcttgagtg gatgggaggt tttgatcctg aagatgggtga aacaatctac 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctacaga cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aacagatcgc 300
 gagttttgga gtggttatatt ctaccactgg ggccagggaa ccttggtcac cgtctcctca 360
 gcctccacca agggcccata ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 420
 agcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgtcg 480
 tggaactcag gcgctctgac cagcggcgtg cacaccttcc cagctgtcct acagtctcctca 540
 ggaactctact ccctcagca 559

<210> 98
 <211> 186
 <212> PRT
 <213> Homosapien

<400> 98
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Glu Leu
 20 25 30
 Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Asp Arg Glu Phe Trp Ser Gly Tyr Phe Tyr His Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 180 185

<210> 99
 <211> 491
 <212> DNR
 <213> Homosapien

LT 5416 B

<400> 99

```

gacatcgtga tgaccacagtc tccagactcc ctggtgtgtgt ctctggggcga gagggccacc 60
atcaactgca agtccagcca gagtggtttta tacagotcca acaatgagaa cttcttagor 120
tggtaccago agaaaccagg acagcctcct aaaactgctca tttactgggc atctaccogg 180
gaatccgggg tcccagacog cttcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttataatagt 300
ccgtggacgt tcggccaagg gaccaaggtg gaaatcaaac gaactgtggc tgcaccatct 360
gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 420
ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaagggtgga taacgcctcc 480
ccaatcgggt a 491

```

<210> 100

<211> 163

<212> PRT

<213> Homosapien

<400> 100

```

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

```

<210> 101

<211> 543

<212> DNR

<213> Homosapien

<400> 101

```

caggtccagc tgggtacagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcttgcaagg ttcccgata caccctcact gaattatcca tgcactgggt ggcacaggct 120
cctggaaaag ggcttgagtg gatgggagggt ttgatcctg aagatgggtga aacaatctac 180
gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctacaga cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggcctgtt attactgtgc aaaggacgat 300
ttttggagtg gttattttga ctactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctctcagcc 360
tccaccaagg gccatcgggt cttccccctg ggcctctgct ccaggagcac ctccgagacc 420
acagcggccc tgggtgcct ggtaaggac tacttccccg aaccgggtgac ggtgtcgtgg 480
aactcaggcg ctctgaccag cggcgtgcac accttccag ctgtcctaca gtcctcagga 540
ctt 543

```

<210> 102

<211> 181

<212> PRT

<213> Homosapien

<400> 102

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

<210> 103

<211> 491

<212> DNR

<213> Homosapien

<400> 103

gacatogtga tgaccagtc tocagactcc ctggotgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
 atcaactgca agtccagtc gagtggttta tacaggctca acaataagag ctacttagtt 120
 tggtaaccagc agaaactagg acagtctcct aagctgctca tttactgggc atctaccgg 180
 gaatccggggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattatt gtcaacaata ttatagtact 300
 ccgtggacgt tcggccaagg gaccaagggtg gaaatcaaac gaactgtggc tgcaccatct 360
 gtcttcacatc tccgcacatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 420
 ctgtctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgcctc 480
 ccaatcgggt a 491

<210> 104

<211> 163

<212> PRT

<213> Homosapien

<400> 104

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

```

<400> 106
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1          5          10          15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Glu Leu
          20          25          30
Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
          35          40          45
Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe
          50          55          60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65          70          75          80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95
Ala Thr Asp Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
          100          105          110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
          115          120          125
Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
          130          135          140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145          150          155          160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr
          165

```

<210> 107
 <211> 448
 <212> DNA
 <213> Homosapien

<400> 107
 gacatcgtga tgaaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcca gagggccacc 60
 atcaactgca agtcacagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagtt 120
 tggtaaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca tttactgggc atctaccogg 180
 gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtcct 300
 aogtggacgt tcggccaagg gaccaagggt gaaatcaaac gaactgtggc tgcaccatct 360
 gtcttcactt tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 420
 ctgctgaata acttctatcc cagagagg 448

<210> 108
 <211> 149
 <212> PRT
 <213> Homosapien

<400> 108
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95
 Tyr Tyr Ser Pro Thr Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 115 120 125
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 130 135 140
 Phe Tyr Pro Arg Glu
 145

<210> 109
 <211> 540
 <212> DNR
 <213> Homosapien

<400> 109
 caggctccagc tggtaacagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcttgcaagg ttcccgata caccctcact gaattatcca tgcactgggt gcgacaggct 120
 cctggaaaag gcttgagtg gatgggaggt ttgatcctg aagatgggtga aacaatctac 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctacaga cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac accggcctgt attactgtgc aacggacgat 300
 ttttgagtg gttattttga ctactggggc cagggaaccc tggtaaccgt ctctcagcc 360
 tccaccaagg gccatcgggt cttccccctg gcgcctgtct ccaggagcac ctccgagagc 420
 acagcggccc tgggtgcct ggtcaaggac taattccccg aacgggtgac ggtgtcgtgg 480
 aactcaggcg ctctgaccag cggcgtgcac accttcccag ctgtcctaca gtcctcagga 540

<210> 110

LT 5416 B

<211> 180
 <212> PRT
 <213> Homosapien

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

<210> 111
 <211> 478
 <212> DNR
 <213> Homosapien

<400> 111
 gacatcgtga tgaccocagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctggggoga gagggccacc 60
 atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct 120
 tgggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca tttactggac atctaccgg 180
 gaatcggggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg tgacagattt cactctcacc 240
 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagttct 300
 ccgtggacgt tccggccaagg gaccaaggtg gaaatcaaac gaactgtggc tgcaccatct 360
 gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 420
 ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaagggtga taacgct 478

<210> 112
 <211> 159
 <212> PRT
 <213> Homosapien

<400> 112
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Thr Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65					70					75				80
Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln
				85					90					95
Tyr	Tyr	Ser	Ser	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu
			100					105					110	Ile
Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser
		115					120					125		Asp
Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn
	130					135					140			Asn
Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala
145					150					155				

<210> 113
 <211> 542
 <212> DNR
 <213> Homosapien

<400> 113
 cagggtccagc tgggtacagtc tgggggctgag gtgaagaagc ctgggggctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg tttccggata caccctcagt gaattatcca tgcaactgggt gogacaggct 120
 cctggaaaag ggcttgagtg gatgggaggt tttgatcctg aagatgggtga aacaatctac 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctacaga cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt tttactgtgc aacaaagagg 300
 gaatatagtg gctactttga ctactggggc caggggaacc tggtcacogt ctccctcagcc 360
 tccaccaagg gcccatcggt ctccccctg ggcgcctgct ccaggagcac ctccgagagc 420
 acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 480
 aactcaggcg ctctgaccag cggcgtgcac accttcccag ctgtcctaca gtccctcagga 540
 ct 542

<210> 114
 <211> 180
 <212> PRT
 <213> Homosapien

<400> 114
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Ser Glu Leu
 20 25 30
 Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Phe Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Lys Arg Glu Tyr Ser Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly
 180

<210> 115
 <211> 477
 <212> DNR
 <213> Homosapien

<400> 115
 gacatcgtga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctggggga gagggccacc 60
 atcaactgca agtccagcca gagtggttta tacagctcca acagtaagaa ctaacttagct 120
 tggttccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca tttactgggc atctaccogg 180
 gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt caototcacc 240
 atcagccgcc tgcaggetga agatgtggca gtttattcct gtcagcaata ttttattact 300
 ccgtggacgt tgggccaagg gaaccaagtg gaactcaaac gaactgtggc tgcaccatct 360
 gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttggtgtgc 420
 ctgttgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaagggtga taacgcc 477

<210> 116
 <211> 159
 <212> PRT
 <213> Homosapien

<400> 116
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Ser Asn Ser Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Arg Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Ser Cys Gln Gln
 85 90 95
 Tyr Phe Ile Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Leu
 100 105 110
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 115 120 125
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 130 135 140
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
 145 150 155

<210> 117
 <211> 459
 <212> DNR
 <213> Homosapien

<400> 117
 cagggtgcagc ctgagcagtc ggggtccagga ctgggtgaagc cctcgcagac cctctcactc 60
 acctgtgccca tctcogggga cagtgtctct agcaacagtg ctgcttgga ctggatcagg 120
 cagtcccttt cgagaggcct tgagtggctg ggaaggacat actacaggtc caagtgggtat 180
 agtgatcatg cagtatctgt gagaagtcca ataaccatct aaccagacac atccaagaac 240
 cagtttctcc tgcagctgaa ctctgtgact cccgaggaca cggctgtgta ttactgtgca 300
 agagatcgga ttagtgggac ctatgtcggc atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
 accgtctcct cagcctccac caaggggcca tgggtcttcc ccctggcgcc cctgtctccag 420
 gagcacctcc gagagcacag cggccctggg ctgcctggc 459

<210> 118
 <211> 153

<212> PRT
 <213> Homosapien

<400> 118
 Gln Val Gln Pro Glu Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Ser Asp His Ala
 50 55 60
 Val Ser Val Arg Ser Arg Ile Thr Ile Tyr Pro Asp Thr Ser Lys Asn
 65 70 75 80
 Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
 85 90 95
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Ile Ser Gly Thr Tyr Val Gly Met Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 115 120 125
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Leu Leu Gln Glu His Leu Arg
 130 135 140
 Glu His Ser Gly Pro Gly Leu Pro Gly
 145 150

<210> 119
 <211> 526
 <212> DNR
 <213> Homosapien

<400> 119
 ccagctcagc tctctggggct gctaattgctc tgggtccctg gatccaatga ggatattgtg 60
 atgaccagca ctccactctc cctgcccgtc acccctggag agccggcctc catctcctgc 120
 aggtctagtc agagcctctt ggatagtgat gatggaaaca cctatttgga ctggtagctg 180
 cagaagccag ggcagtctcc acagctcctg atctatacgc tttcctttcg ggcctctgga 240
 gtcccagaca ggttcagtgg cagtgggtca ggcactgatt tcacactgac aatcagcagg 300
 gtggaggctg aggatgttgg agtttattac tgcattgcaac gtatagagtt tcctctcaat 360
 ttccggcggag ggaccaagggt ggagatcaaa cgaactgttg ctgcaccatc tgtcttcac 420
 ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat 480
 aacttctatc ccagagaggc caaagtacag tggaagggtg ataacg 526

<210> 120
 <211> 175
 <212> PRT
 <213> Homosapien

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

```
<210> 123
<211> 536
<212> DNR
<213> Homosapien
```

<400> 123

```

caggtcttca tttctctgtt gctctggatc tctgatgtct atggggacat cgtgatgacc 60
cagtctccag actccctggc tgtgtctctg ggcgagaggg ccaccatcac ctgcaagtc 120
agccagaactg ttttatacag ctccaacaat aagaactact tagtttggtg tcagcagaaa 180
tcaggacagc ctcttaagct gctcattcac tgggcatcta tccgggaatc cggggtccct 240
gaccgattca gtggcagcgg gtctgggaca gatttcacgc tcaccatcag cagcctgcag 300
gctgaagatg tggcagttta ttactgtcag caatattata gtagtccgtg gacgttcggc 360
caagggacca aggtggaaat caaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 420
ccatctgatg agcagttgaa atctggaaat gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 480
tatcccagag aggccaaagt acagtgggaag gtggataacg cccttccaat cgggta 536

```

<210> 124

<211> 178

<212> PRT

<213> Homosapien

<400> 124

```

Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser Asp Val Tyr Gly Asp
1          5          10          15
Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu
20          25          30
Arg Ala Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Thr Val Leu Tyr Ser Ser
35          40          45
Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Pro
50          55          60
Pro Lys Leu Leu Ile His Trp Ala Ser Ile Arg Glu Ser Gly Val 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 Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
100          105          110
Tyr Ser 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 Pro
165          170          175
Ile Gly

```

<210> 125

<211> 414

<212> DNR

<213> homosapien

<400> 125

```

caggtgcagg ctgagcagtc ggggtccagga ctggtgaagc cctcgcagac cctctcactc 60
acctgtgcca tctccgggga cagtgtctct agctacagtg ctgcttgga cttggatcagg 120
cagtccctct cgagaggcct tgagtggctg ggaaggacat actacaggtc caagtgggtat 180
agtgatcatg cagtatctgt gagaagtcga ataaccatct acccagacac atccaagaac 240
cagttctccc tgcagctgaa ctctgtgact cccgaggaca cggctgtgta ttactgtgca 300
agagatcgga ttagtgggac ctatgtcggg atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
accgtctcct cagcctccac caagggcccc atcgggtcttc cccctggccc cctc 414

```

<210> 126

<211> 138

<212> PRT

<213> Homosapien

<400> 126

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

<210> 127

<211> 514

<212> DNR

<213> Homosapien

<400> 127

gtcttcattt	ctctgttgct	ctggatctct	ggtgcctacg	gggacatcgt	gatgacccag	60
tctccagact	ccctggctgt	gtctctgggc	gagagggcc	ccatcaactg	caagtccagc	120
cagagtgttt	tatacagttc	caacaataag	aactacatag	tttggtacca	gcagaaacca	180
gggcagcctc	ctaagttgct	catttactgg	acatctaccc	gggaatcogg	ggccctgac	240
cgattcagtg	gcagcgggtc	tggaacagat	ttcactctca	ctatcagtag	cctgcaggct	300
gaagatgtgg	cagtttatta	ctgtcagcaa	tattttagtt	ctccgtggag	gttcggccaa	360
gggaccaaag	tggacatcaa	acgaactgtg	gctgcaccat	ctgtcttcat	cttcccgcga	420
tctgatgagc	agttgaaatc	tggaaactgcc	tctgttggtg	gcctgtgtgaa	taacttctat	480
cccagagagg	ccaaagtaca	gtggaaggtg	gata			514

<210> 128

<211> 171

<212> PRT

<213> Homosapien

<400> 128

Val	Phe	Ile	Ser	Leu	Leu	Leu	Trp	Ile	Ser	Gly	Ala	Tyr	Gly	Asp	Ile
1				5					10					15	
Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Glu	Arg
			20					25					30		
Ala	Thr	Ile	Asn	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Val	Leu	Tyr	Ser	Ser	Asn
			35					40				45			
Asn	Lys	Asn	Tyr	Ile	Val	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro
	50					55					60				
Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Thr	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Val	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		
Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Phe
			100					105					110		
Ser	Ser	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	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
 165 170

<210> 129
 <211> 444
 <212> DNR
 <213> Homosapien

<400> 129
 cagtcgggtc caggactggt gaagccctcg cagaccctct cactcacctg tgccatctcc 60
 ggggacagtg tctctagcaa cagtgtctgt tggaaactgga tcaggcagtc cccttcgaga 120
 ggccttgagt ggctgggaag gacatactac aggtccaagt ggtatagtga tcatgcagta 180
 tctgtgagaa gtcgaataac catctaccca gacacatcca agaaccagtt ctccctgcag 240
 ctgaactctg tgactcccga ggacacgggt gtgtattact gtgcaagaga tcggattagt 300
 gggacctatg tcggtatgga cgtctggggc caagggacca cggtcaccgt ctccctcagcc 360
 tccaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcgcccctgc tccaggagca cctccgagag 420
 cacagcggcc ctgggctgcc tggc 444

<210> 130
 <211> 148
 <212> PRT
 <213> Homosapien

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

<210> 131
 <211> 505
 <212> DNR
 <213> Homosapien

<400> 131
 gggctgctaa tgctctggat acctggatcc agtgcagata ttgggatgac ccagactcca 60
 ctctctctgt ccgtcacccc tggacagccg gctccatct cctgtaagtc tagtcagagc 120
 ctccctgtata gtgatggaaa gacctatttg tattgggtacc tgcagaagcc aggccagcct 180
 ccacaacacc tgatctatga agtttccaac cggttctctg gagtgcaga taggttcagt 240

LT 5416 B

```

ggcagcgggt ctgggacaga ttccacactg aaaatcagcc gggcggaggo tgatgatgtt 300
ggggttttatt actgoatgca aactatacac cttccgctca ctttcggcgg agggaccaag 360
gtggagatcc aacgaactgt ggcgcacca totgtcttca ttttcccgcc atctgatgag 420
cagttgaaat ctggaactgc ctctgttctg tgccctgctga ataatctcta tcccagagag 480
gccaaagtac agtgggaaggt ggata 505

```

<210> 132

<211> 168

<212> PRT

<213> Homosapien

<400> 132

```

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

```

<210> 133

<211> 447

<212> DNR

<213> Homosapien

<400> 133

```

gagcagtogg gtccaggact ggtgaagccc tcgcagaccc tctcaactcac ctgtgccatc 60
tcgggggaca gtgtctctag caacagtgtc gcttggaact ggatcaggca gtccccttcg 120
agaggccttg agtggctggg aaggacatac tacaggcca agtggatatag tgatcatgca 180
gtatctgtga gaagtogaat aaccatctac ccagacacat ccaagaacca gttctccctg 240
cagctgaact ctgtgactcc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcaag agatcggatt 300
agtgggaact atgtcgggat ggacgtctgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca 360
gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgcccc tgctccagga gcacctccga 420
gagcacagcg gccctgggct gcctggc 447

```

<210> 134

<211> 149

<212> PRT

<213> Homosapien

<400> 134

```

Glu Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu
 1           5           10           15
Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn Ser Ala Ala Trp
          20           25           30

```

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

<210> 135

<211> 520

<212> DNR

<213> Homosapien

<400> 135

cagggtcttca tttctctgtt gctctggatc tctgggtgcct acggggacat cgtgatgacc 60
 cagtctccag actccctggc tgtgtctctg ggcgagaggg ccgccatcaa ctgcaagtcc 120
 agccagactg ttttatacag ctccaacaat aagaactact tggtttggtta ccagcagaaa 180
 ccaggacagc ctcccaagct gctcatttac tgggcatcta cccgggaatc cgggggtccct 240
 gaccgattca gtggcagcgg gtctggggaca gatttcactc tcaccatcag cagcctgcag 300
 gctgaagatg tggcagttta ttactgtcaa caatattata aaagtccgtg gacgttcggc 360
 caagggacca aggtggaaaat caaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 420
 ccactctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 480
 tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg 520

<210> 136

<211> 173

<212> PRT

<213> Homosapien

<400> 136

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

165

170

<210> 137
 <211> 490
 <212> DNR
 <213> Homosapien

<400> 137
 caggtccagc tgggtacagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg tticcggata caccctcact gaattatcca tgcactgggt gcgacaggct 120
 cctggaaaag ggcttgagtg gatgggaggt tttgatectg aaaatgggtga aacaatccac 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcatcatg accgaggaca catctacaga cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aacagatcag 300
 ggtggatata gtggctactt tgactgctgg ggccaggga ccttggtcac cgtctcctca 360
 gcttccacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 420
 agcacagccg ccttgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg 480
 tggaaactcag 490

<210> 138
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Homosapien

<400> 138
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Glu Leu
 20 25 30
 Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asn Gly Glu Thr Ile His Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Ile Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Asp Gln Gly Gly Tyr Ser Gly Tyr Phe Asp Cys Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser

<210> 139
 <211> 540
 <212> DNR
 <213> Homosapien

<400> 139
 agaccacaggt cttcattttct ctgttgctct ggatctcttg tgcctacggg gacatcgtga 60
 tgaccacagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc atcaactgca 120
 agtccagcca gagtatitta tacagctcca ataataagaa ttatttagtt tggtaaccagc 180
 agaaaccagg acagcctcct aagttgctca tttactgggc atctaccggg gaatccgggg 240
 tccttgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc atcagcagcc 300
 tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtagt cctccgacgt 360

tgggccaagg gaccaagggtg gaaatcaaac gaactgtggc tgcaccatct gtcttcatct 420
 tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tcttgtgtgc ctgctgaata 480
 attctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaagggtga taacgcccctc caatcgggta 540

<210> 140
 <211> 179
 <212> PRT
 <213> Homosapien

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

<210> 141
 <211> 518
 <212> DNR
 <213> Homosapien

<400> 141
 accatggagt ggacctggag ggctctcttc ttgggtggcag cagctacagg caccacgccc 60
 cagggtccagc tggtagagtc tgggggtgag gtgaagaagc ctgggggcctc agtgaaggtc 120
 tcttgcaagg tttccggata caccctcact gaattatcca tgcactgggt gcgacaggct 180
 cctggaaaag ggcttgagt gatgggaggt tttgatcctg aagatgggtga aacaatctac 240
 gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctacaga cacagcctac 300
 atggagctga gtagcctgag aactgaggac aoggcogtgt attactgtac aacggacgat 360
 ttttggagt gttattttga ctactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctctcagcc 420
 tccaccaagg gcccatcggt ctccccctg gogccctgct ccaggagcac ctccgagagc 480
 acagcggcct gggctgcctg gtcaaggact acttcccc 518

<210> 142
 <211> 172
 <212> PRT
 <213> Homosapien

<400> 142
 Thr Met Glu Trp Thr Trp Arg Val Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr
 1 5 10 15

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

<210> 143

<211> 519

<212> DNR

<213> Homosapien

<400> 143

caggtcttca tttctctgtt gctctggatc tctggtgcct acggggacat cgtgatgacc 60
 cagtctccag actccctggc tgtgtctctg ggcgagaggg ccaccatcaa ctgcaagtcc 120
 agccagagtc ttttatacag ctccaaaaat aagaactatt tagtttggtg ccagcagaaa 180
 ccaggacagc ctccaaagct gctcattaac tgggcatcta cccgggaatc cggggtcctc 240
 gaccgattca gtggcagcgg gtctgggaca gatttcactc tcaccatcag cagcctgcag 300
 gctgaagatg tggcagttta ttactgtcag caatattata gttctccgtg gacgttcggc 360
 caagggacca aggtggaaat caaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 420
 ccattctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 480
 tatccagag aggcaaagta cagtggaagg tggatacgc 519

<210> 144

<211> 173

<212> PRT

<213> Homosapien

<400> 144

Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser Gly Ala Tyr Gly Asp
 1 5 10 15
 Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu
 20 25 30
 Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ser
 35 40 45
 Lys Asn Lys Asn Tyr Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
 50 55 60
 Pro Lys Leu Leu Ile Asn Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val 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 Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
 100 105 110
 Tyr Ser 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	Tyr Ser Gly Arg Trp	Ile Arg			
	165	170			

<210> 145
 <211> 436
 <212> DNR
 <213> Homosapien

<400> 145
 gagcagtcgg ggggaggcgt ggtccagcct gggagggtccc tgagactctc ctgtgcagcg 60
 tctggattca ccttcagtag ctatggcatg cactgggtcc gccaggctcc aggcaagggg 120
 ctggagtggg tggcagttat atggtatgat ggaaataata aatactatgc agactccgtg 180
 aagggccgat tcaccatctc cagagacact tccaagaaca cgctgtatct gcaaataaac 240
 agcctgagag ccgaggacac ggctgtgtat tactgtgoga gagatagcag ctctgtactac 300
 tactacggta tggacgtctg gggccaaggg accacggta ccgtctctc agcctccacc 360
 aagggcccat cggtcttccc cctggcgccc tgctccagga gcacctccga gagcacagcg 420
 gccctgggct gcctgg 436

<210> 146
 <211> 145
 <212> PRT
 <213> Homosapien

<400> 146
 Glu Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu
 1 5 10 15
 Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp
 20 25 30
 Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Trp
 35 40 45
 Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
 50 55 60
 Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn
 65 70 75 80
 Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Cys Ala Arg Asp Ser
 85 90 95
 Ser Ser Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140
 Leu
 145

<210> 147
 <211> 428
 <212> DNR
 <213> Homosapien

<400> 147
 gctccgctac ttctcaccct cctcgctcac tgcacaggtt cttggggccaa ttttatgctg 60
 actcagcccc actctgtgtc ggagtctccg gggaagacgg taaccatctc ctgcaccgcg 120
 agcagtggca gcattgccag caactatgtg cagtgggtcc agcagcgccc gggcagttcc 180
 cccaccactg taatctatga ggatgaccaa agaccctctg gggctccctga tcggttctgt 240
 ggctccatcg acagctctc caactctgcc tccctcacca tctctggact gaggactgag 300

LT 5416 B

gacgaggctg actaccactg tcagttttat gatagcagca atcatgttgt attcggcgga 360
 gggaccaagc tgaccgtcct aggtcagccc aaggctgccc cctcgggtcac tctgttcccg 420
 cctctctc 428

<210> 148
 <211> 142
 <212> PRT
 <213> Homosapien

<400> 148
 Ala Pro Leu Leu Leu Thr Leu Leu Ala His Cys Thr Gly Ser Trp Ala
 1 5 10 15
 Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
 20 25 30
 Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn
 35 40 45
 Tyr Val Gln Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val
 50 55 60
 Ile Tyr Glu Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Cys
 65 70 75 80
 Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
 85 90 95
 Leu Arg Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser
 100 105 110
 Ser Asn His Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 115 120 125
 Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser
 130 135 140

<210> 149
 <211> 76
 <212> PRT
 <213> Homosapien

<400> 149
 Gln Pro Asp Ala Ile Asn Ala Pro Val Thr Cys Cys Tyr Asn Phe Thr
 1 5 10 15
 Asn Arg Lys Ile Ser Val Gln Arg Leu Ala Ser Tyr Arg Arg Ile Thr
 20 25 30
 Ser Ser Lys Cys Pro Lys Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Ile Val Ala
 35 40 45
 Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Lys Gln Lys Trp Val Gln Asp Ser Met
 50 55 60
 Asp His Leu Asp Lys Gln Thr Gln Thr Pro Lys Thr
 65 70 75

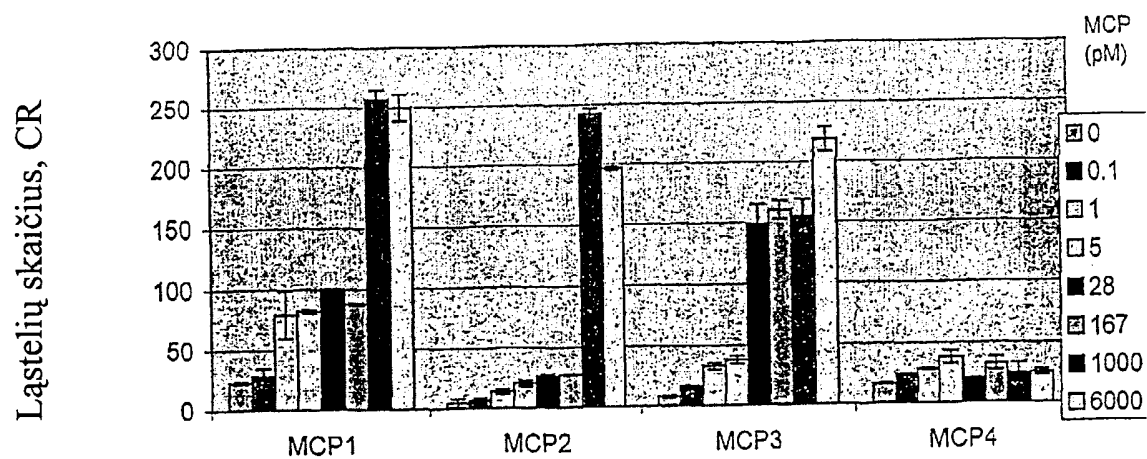


Fig. 1

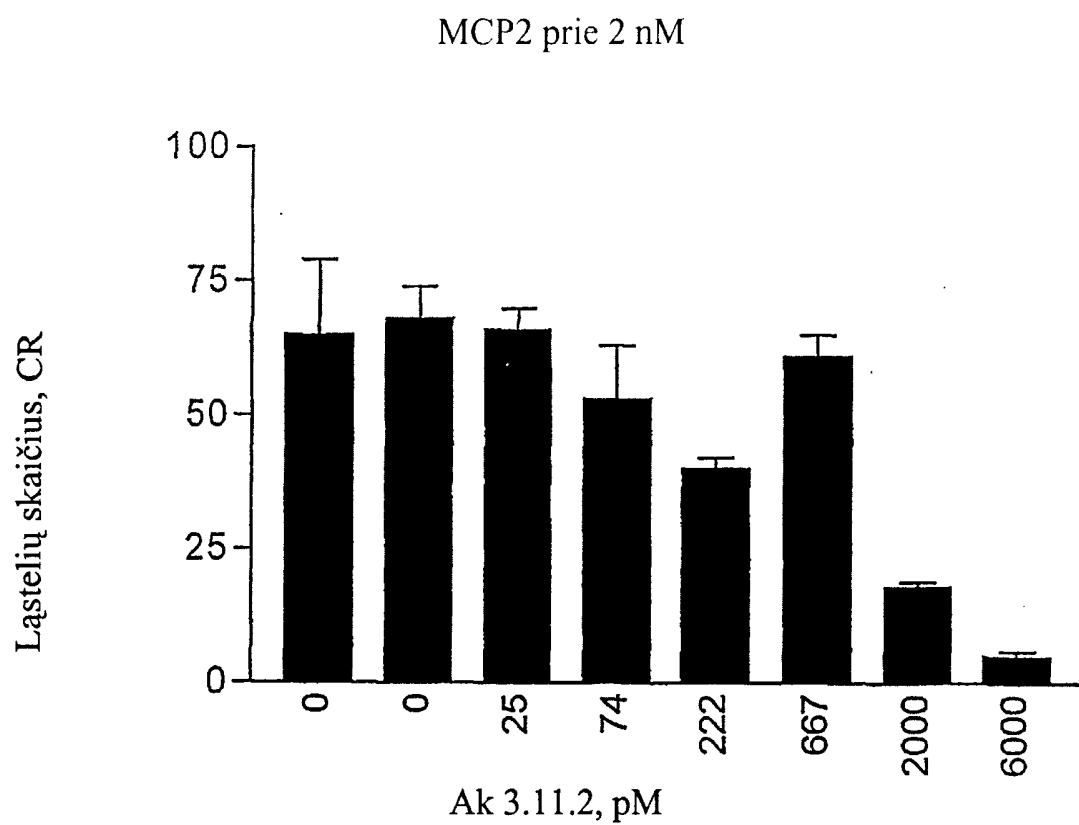


Fig. 2

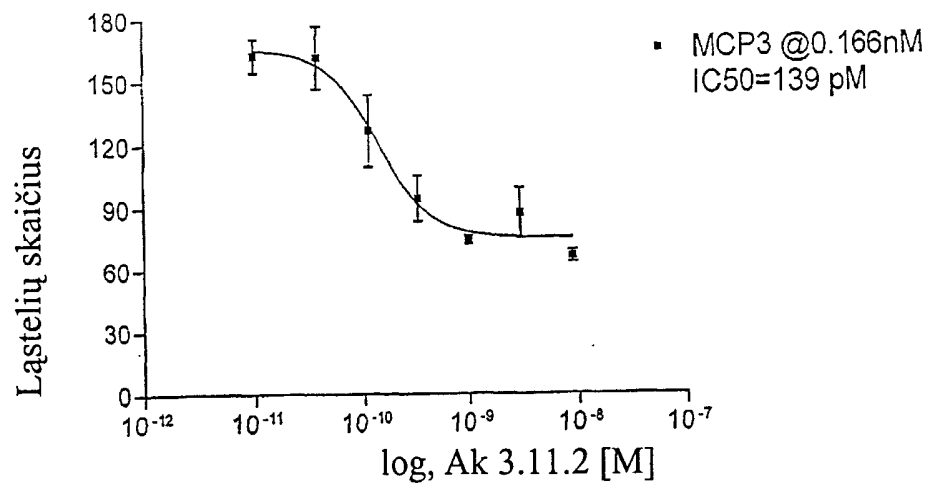


Fig. 3

Anti-MCP-1 1.7.3 antikūno poveikis
kasos auglio Panc-1 vystymuisi

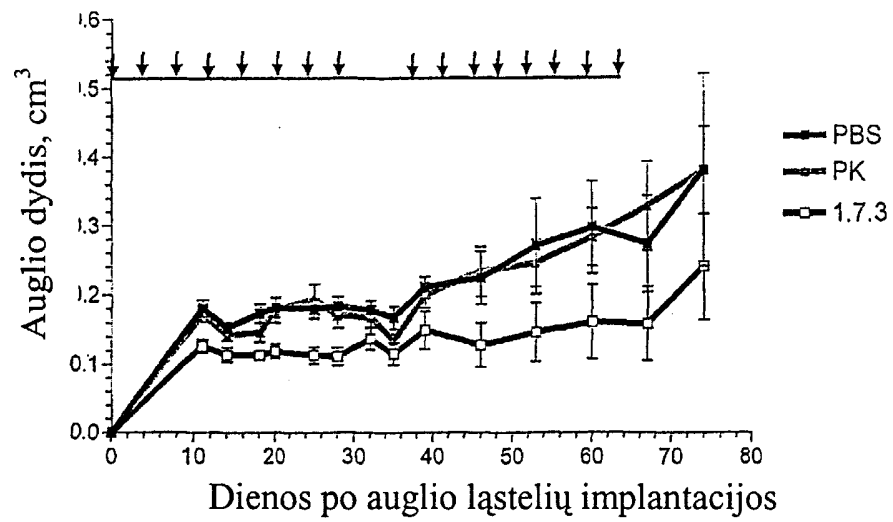


Fig. 4

MCP1 mAb

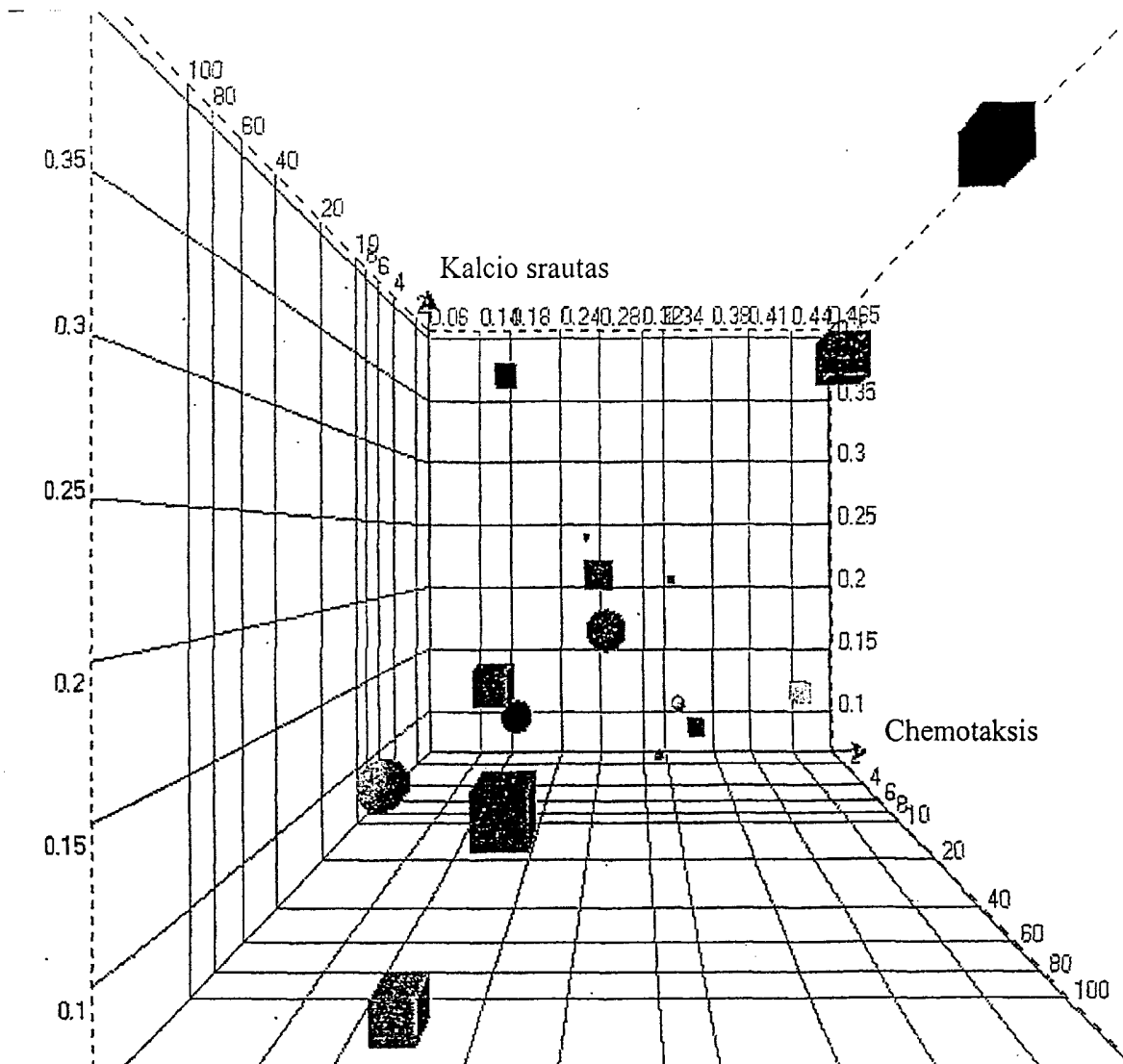


Fig. 5

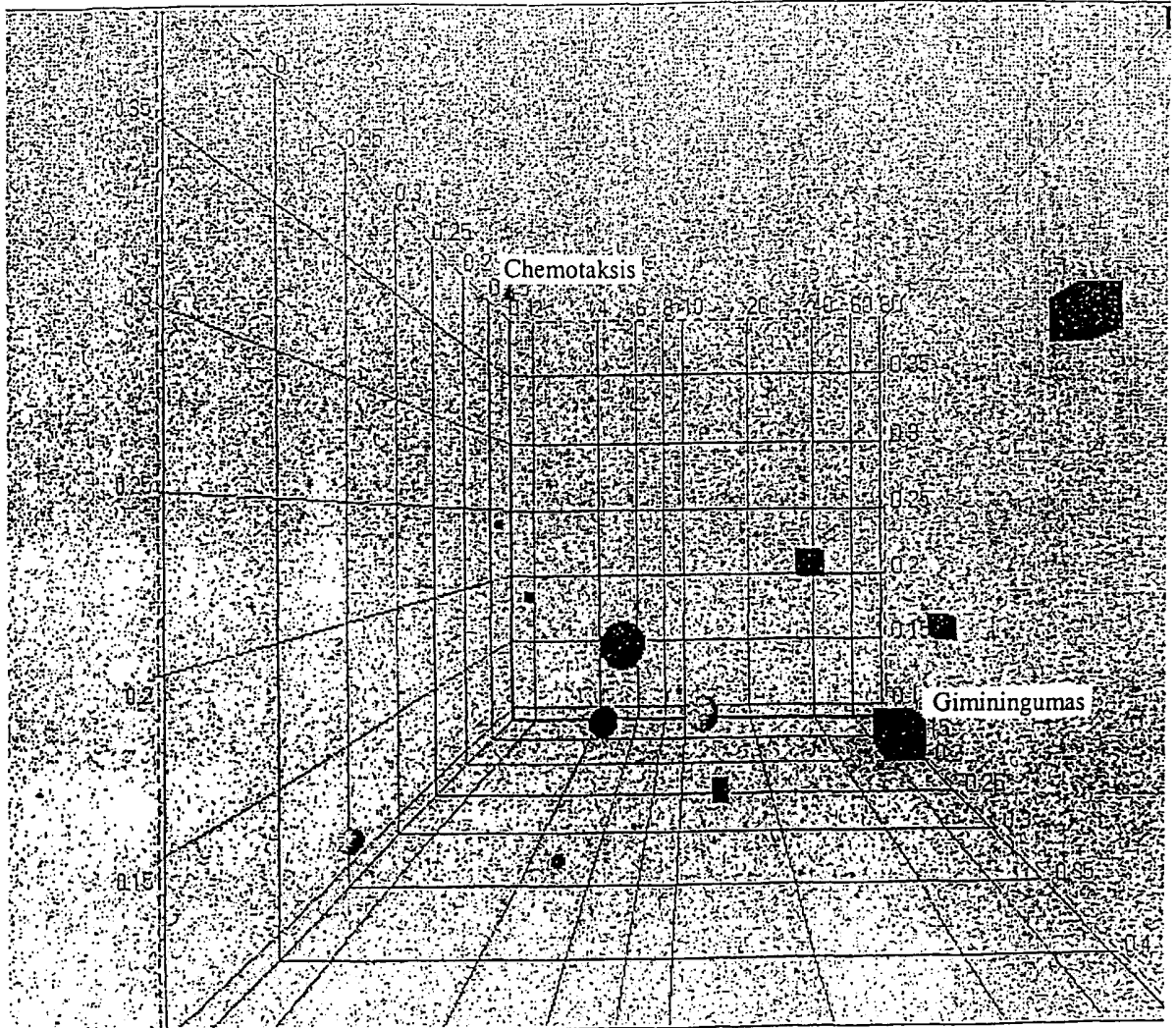


Fig. 6

Seku palyginimas, naudojant VH1-24

	<u>CDR1</u>	<u>CDR2</u>
VH1-24	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIY	
MCP1-1.1.1_HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGNGLWWMGGFDPEDGETIY	
MCP1-1.10_HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIY	
MCP1-1.11_HC	QVQVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIY	
MCP1-1.12_HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIY	
MCP1-1.13_HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDDETIY	
MCP1-1.18_HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIY	
MCP1-1.2_HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTFTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETSY	
MCP1-1.3_HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRRIIPGKGLEWMGGFDPEDGETIY	
MCP1-1.5.1_HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDDETIY	
MCP1-1.6_HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIY	
MCP1-1.7_HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIY	
MCP1-1.8_HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGHIFTELSIHWRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIY	
MCP1-1.9_HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIN	
MCP1-2.3_HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDDETIY	
MCP1-3.10_HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIY	
MCP1-3.15_HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVQVSCVSGDTLSELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIY	
MCP1-3.16_HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTDLSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIY	
MCP1-3.2_HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLSELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIY	
MCP1-3.4_HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETMY	
MCP1-3.5_HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLSELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDDETIY	
MCP1-3.6_HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIY	
MCP1-3.7_HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQTPEGKLEWMGGFDPEDGETIY	
MCP1-3.8_HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPENGETIH	
MCP1-4.5_HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIY	
MCP1-4.6.3_HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIY	
MCP1-4.7_HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIY	
MCP1-5.3_HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLSELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIY	
MCP1-4.8.1_HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIY	

Fig. 7A

	<u>CDR2</u>	<u>CDR3</u>
VH1-24	AQKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSED	TAVYYCAT-----
MCP1-1.1.1_HC	AQRFQGRVMTEDPSTDTAYMELSSLRSED	TAVYYCATNEFWSGYF-----DYWGQGLV
MCP1-1.10_HC	AQKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSED	TAVYYCATNEFWSGYF-----DYWGQGLV
MCP1-1.11_HC	AQKFQGRVTMTEDTSTDTVYMELSSLRSED	TAVYYCATNDFWSGYF-----DYWGQGLV
MCP1-1.12_HC	AQKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSED	TAVYYCATNDFWSGYF-----NYWGQGLV
MCP1-1.13_HC	AQKFQDRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSED	TAVYYCATNDFWSGYF-----DCWGQGLV
MCP1-1.18_HC	AQKFQGRVTMTEDTSTDTVYMELSSLRSED	TAMYYCATREFWTGYF-----DHWGQGLV
MCP1-1.2_HC	AQKFRGRVTMTEDTSTDTAHMELSSLRSED	TAVYYCATNDFWSGYF-----DYWGQGLV
MCP1-1.3_HC	AQKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSED	TAVYYCATNDFWSGYW-----CHWGQGLV
MCP1-1.5.1_HC	AQKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSED	TAVYFCATNDFWSGYF-----DCWDQGLV
MCP1-1.6_HC	AQKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSED	TAVYYCATWYSGIYLA-----DIWGQGLV
MCP1-1.7_HC	AQKFQGRVSMTEDEDTSTDTAYMELSSLRSED	TAVYFCATNEFWSGYF-----DYWGQGLV
MCP1-1.8_HC	AQKFQGRVTMTEDTSTDTVYMELSSLRSED	TAVYYCATNDFWSGYF-----DYWGQGLV
MCP1-1.9_HC	AQKFQGRVTMTEDTSTDTGYMELSSLRSED	TAVYYCATDPGGYSGYF-----DHWGQGLV
MCP1-2.3_HC	AQKFQGRVTMTEDTSTHTAYMELSSLRSED	TAVYYCATHDFWSAYF-----YYWGQGLV
MCP1-3.10_HC	AQKFQGRVMTEDTSTDTAFMDLSSLRSED	TAVYYCATDDMLTPHYLYFGMDVWGQGLV
MCP1-3.15_HC	ARKFQGRVTMTEDTSTDTVYMELSSLRSED	TAVYFCATDSRGYSGYF-----DNWGQGLV
MCP1-3.16_HC	AQKFQGRVTMTEDTSSDTAYMELSSLRSED	TAVYYCATHEFWSGYF-----DYWGQGLV
MCP1-3.2_HC	AQKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSED	TAVYYCATGDFWSGYL-----DWWGQGLV
MCP1-3.4_HC	AQKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSED	TAVYYCATDDFWSGYF-----DYWGQGLV
MCP1-3.5_HC	AQKFQGRVTMTEDTSTDTAFMELSSLRSED	TAVYYCATHDFWSGYF-----HYWGQGLV
MCP1-3.6_HC	AQKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSED	TAVYYCAIHEFWSGYF-----DYWGQGLV
MCP1-3.7_HC	AQKFQDRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSED	TAVYYCATNDFWTGYF-----DYWGQGLV
MCP1-3.8_HC	AQKFQGRVIMTEDEDTSTDTAYMELSSLRSED	TAVYYCATDQGGYSGYF-----DCWGQGLV
MCP1-4.5_HC	AQKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSED	TAVYYCATDDFWSGYF-----DYWGQGLV
MCP1-4.6.3_HC	AQKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSED	TAVYYCATDDFWSGYF-----DYWGQGLV
MCP1-4.7_HC	AQKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSED	TAVYYCATDDFWSGYF-----DYWGQGLV
MCP1-5.3_HC	AQKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSED	TAVYFCATKREYSGYF-----DYWGQGLV
MCP1-4.8.1_HC	AQKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRTED	TAVYYCTTDDFWSGYF-----DYWGQGLV

Fig. 7A(ţesinys)

VH1-24	---
MCP1-1.1.1_HC	VSS
MCP1-1.10_HC	VSS
MCP1-1.11_HC	VSS
MCP1-1.12_HC	VSS
MCP1-1.13_HC	VSS
MCP1-1.18_HC	VSS
MCP1-1.2_HC	VSS
MCP1-1.3_HC	VSS
MCP1-1.5.1_HC	VSS
MCP1-1.6_HC	VSS
MCP1-1.7_HC	VSS
MCP1-1.8_HC	VSS
MCP1-1.9_HC	VSS
MCP1-2.3_HC	VSS
MCP1-3.10_HC	VSS
MCP1-3.15_HC	VSS
MCP1-3.16_HC	VSS
MCP1-3.2_HC	VSS
MCP1-3.4_HC	VSS
MCP1-3.5_HC	VSS
MCP1-3.6_HC	VSS
MCP1-3.7_HC	VSS
MCP1-3.8_HC	VSS
MCP1-4.5_HC	VSS
MCP1-4.6.3_HC	VSS
MCP1-4.7_HC	VSS
MCP1-5.3_HC	VSS
MCP1-4.8.1_HC	VSS

Fig. 7A(tes.)

Dendrograma:

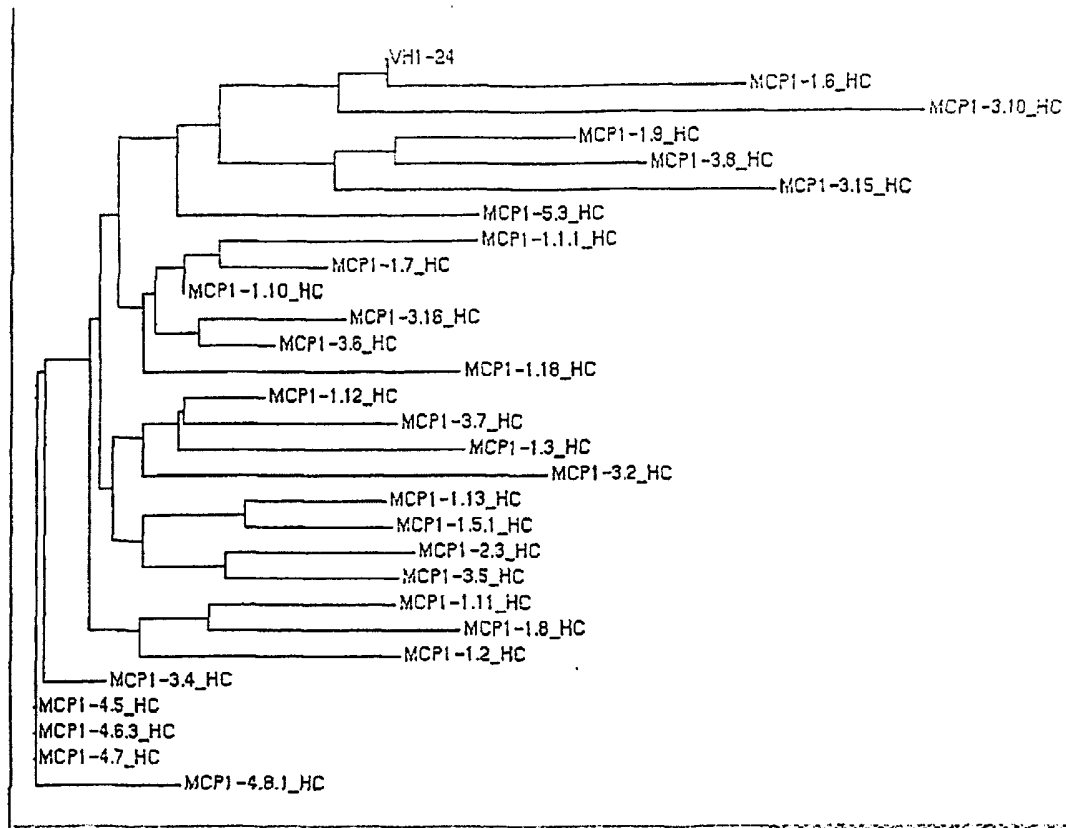


Fig. 7B

Sekų sulyginimas, naudojant VK-B3

	CDR1	CDR2
VK-B3	DIVMTQSPDRLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTR	
MCP1-1.1.1_LC	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLVWYQQKPGQPPKLLIYWASIR	
MCP1-1.10_LC	DIVMTQSPASLAESLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLVWYQQKPGQPPKLLIYWASTR	
MCP1-1.11_LC	DIVMTQSPDRLAVSLGERATITCKSSQTVLYSSNNKNYLVWYQQKSGQPPKLLIHWASIR	
MCP1-1.12_LC	DIVMTQSPDRLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLVWYQQKPGQPPKLLIYWASIR	
MCP1-1.13_LC	DIVMTQSPDRLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLVWYQQKPGQPPKLLIYWASTR	
MCP1-1.14.1.1_LC	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLVWYQQKPGQPPKLLIYWTSTR	
MCP1-1.18_LC	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLVWYQQKPGQPPKLLIYWASIR	
MCP1-1.3_LC	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYXQKPGQPPKLLIYWTYIR	
MCP1-1.5.1_LC	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLVWYQQKPGQPPKLLIYWASIR	
MCP1-1.7_LC	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLVWYQQKPGQPPKLLIYWASIR	
MCP1-1.8_LC	DIVMTQSPGSLAVSLGERATINCKSSQSILFRSNNKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASIR	
MCP1-1.9_LC	DIVMTQSPDFLAVSLGERPTINCKSSQSVFYSSNNKNYLVWYQQKPGQPPKLLIYWASTR	
MCP1-2.3_LC	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKSYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTR	
MCP1-3.14.1.1_LC	DIVMTQSPDSLAVSLGERAAINCKSSQTVLYSSNNKNYLVWYQQKPGQPPKLLIYWASTR	
MCP1-3.15_LC	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLVWYQQKPGQPPKLLIYWASTR	
MCP1-3.16_LC	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLFSSNNKSYLTWYQQKPGQPPKLLIYFASIR	
MCP1-3.4_LC	DIVMTQSPDSLAVSLDERATINCKSSQSVLYSPNQKNYLVWYQQKPGQPPKLLIYWASIR	
MCP1-3.5_LC	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSDNKSYLVWYQQKPGQPPKLLIYWASIR	
MCP1-3.6_LC	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLVWYQQKPGQPPKLLIYWASTR	
MCP1-3.7_LC	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLVWYQQKPGQPPKLLIYWASTR	
MCP1-3.8_LC	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSILYSSNNKNYLVWYQQKPGQPPKLLIYWASTR	
MCP1-4.5_LC	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKSYLVWYQQKPGQPPKLLIYWASTR	
MCP1-4.6.3_LC	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLVWYQQKPGQPPKLLIYWASTR	
MCP1-4.7_LC	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWTSTR	
MCP1-4.8.1_LC	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLVWYQQKPGQPPKLLIYWASTR	
MCP1-5.3_LC	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWFQQKPGQPPKLLIYWASTR	

Fig. 8A

Sekuulyginimas, naudojant VK-08

	<u>CDR1</u>	<u>CDR2</u>
VK-08	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCOASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPS	
MCP1-2.4_LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCOASQDITTYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPS	
MCP1-3.11_LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCOASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPS	
	*****:*****	
	<u>CDR3</u>	
VK-08	RFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYYCQYDNLP-----	
MCP1-2.4_LC	RFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYYCQYDNLPITFGQGTREIK	
MCP1-3.11_LC	RFSGSGSGTDFTFTINSLQPEDIAITYCQYNNKLPYSFGQGTKLEIK	
	*****:***	

Fig. 9A

Dendrograma:

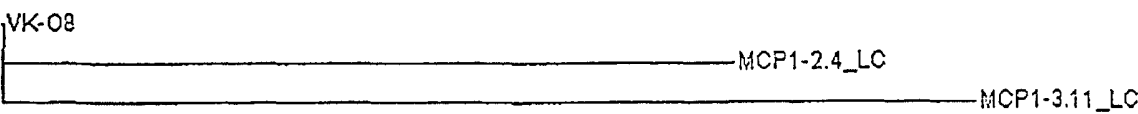


Fig. 9B

CDR2

CDR3

VK-B3
MCP1-1.1.1_LC
MCP1-1.10_LC
MCP1-1.11_LC
MCP1-1.12_LC
MCP1-1.13_LC
MCP1-1.14.1.1_LC
MCP1-1.18_LC
MCP1-1.3_LC
MCP1-1.5.1_LC
MCP1-1.7_LC
MCP1-1.8_LC
MCP1-1.9_LC
MCP1-2.3_LC
MCP1-3.14.1.1_LC
MCP1-3.15_LC
MCP1-3.16_LC
MCP1-3.4_LC
MCP1-3.5_LC
MCP1-3.6_LC
MCP1-3.7_LC
MCP1-3.8_LC
MCP1-4.5_LC
MCP1-4.6.3_LC
MCP1-4.7_LC
MCP1-4.8.1_LC
MCP1-5.3_LC

ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTP-----
ESGVPDRFSSSGSETDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYFSSPWTFGQGTKVEIK
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYRSPWTFGQGTKVEIK
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYSSPWTFGQGTKVEIK
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINSLQAEDVAVYYCQQYFSPWTFGQGTKVEIK
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYSSPWTFGQGTKVEIK
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYFSSPWTFGQGTKVDIK
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYSTPLTFGGGTKVEIK
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQEHYSPWTFGQGTKVEIK
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQYSSPWTFGQGTKVEIK
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYFSPWTFGQGTKVEIK
ESGVPDRFSGSGSGSNFTLTITSLQAEDVAIYYCQQYSSPWTFGQGTKVEIK
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYSSPWTFGQGTKVEIK
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAADVAVYYCQQHYSTPCSFQGTKLEIK
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYKSPWTFGQGTKVEIK
EFGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYFSPWTFGQGTKVEIK
ESGVPDRISGSGSGTDLTLTISSLQAEDAAVYYCQQYSSPWTFGQGTKVEIK
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSYFTPTWTFGQGTKVEIK
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYTSPTWTFGQGTKVEIK
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYSSPWTFGQGTKVEIK
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVGVYYCQQYTSPTWTFGQGTKVEIK
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYSSPTWTFGQGTKVEIK
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYSPWTFGQGTKVEIK
ESGVPDRFSGSGSVTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYSSPWTFGQGTKVEIK
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYSSPWTFGQGTKVEIK
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISRLQAEDVAVYSCQQYFITPWTFGQGTKVELK

Fig. 8B(tesinys)

Sekuulyginimas, naudojant VH6-1

	CDR1	CDR2
VH6-1	QVQLQQSGPGLVKPSQTLTLCAISGDSVSSNSAAWNNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWY	
MCP1-1.4.1.1_HC	QVQAEQSGPGLVKPSQTLTLCAISGDSVSSNSAAWNNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWY	
MCP1-1.14.1.1_HC	QVQAEQSGPGLVKPSQTLTLCAISGDSVSSNSAAWNNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWY	
MCP1-3.14.1.1_HC	QVQAEQSGPGLVKPSQTLTLCAISGDSVSSNSAAWNNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWY	
	CDR2	CDR3
VH6-1	NDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAR-----	
MCP1-1.4.1.1_HC	SDHAVSVRSRITIYPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDRISGTIVGMDVWGQGTIV	
MCP1-1.14.1.1_HC	SDHAVSVRSRITIYPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDRISGTIVGMDVWGQGTIV	
MCP1-3.14.1.1_HC	SDHAVSVRSRITIYPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDRISGTIVGMDVWGQGTIV	
VH6-1	---	
MCP1-1.4.1.1_HC	VSS	
MCP1-1.14.1.1_HC	VSS	
MCP1-3.14.1.1_HC	VSS	

Fig. 10A

Dendrograma:

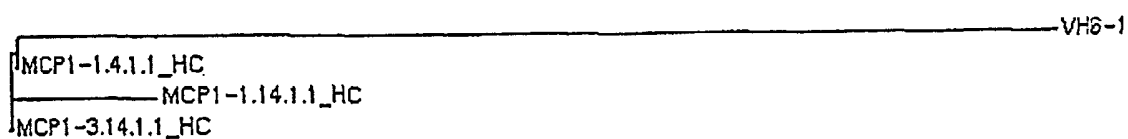


Fig. 10B