



(12) **PATENT**

(11) **341844**

(13) **B1**

NORGE

(19) NO

(51) Int Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20065542	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2005.05.10 PCT/US2005/16357
(22)	Inng.dag	2006.12.01	(85)	Videreføringsdag	2006.12.01
(24)	Løpedag	2005.05.10	(30)	Prioritet	2004.05.10, US, 60/569,892
(41)	Alm.tilgj	2007.01.31			
(45)	Meddelt	2018.02.05			
(73)	Innehaver	AbGenomics Cooperatief U.A., Kingsfordweg 103, NL-1043GP AMSTERDAM, Nederland			
(72)	Oppfinner	Rong-Hw a Lin, 7F, No 12, Lane 54, Sec 3, Sinsheng, S. Road Da-an District, TW-106 TAIPEI, Taiw an Chung Nan Chang, 602 Saint Croix Lane, US-CA94404 FOSTER CITY, USA Pei-Jiun Chen, 710 Chung-Cheng Road, TW-234 TAIPEI, Taiw an Chiu-Chen Huang, 4F, No 2 Lane 339, Sec. 2, nei-hu Road, Neihu, TW-114 TAIPEI, Taiw an			
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge			

(54)	Benevnelse	Antistoff som spesifikt bindes til human P-selektin glykoprotein ligand 1 samt anvendelse derav og sammensetning			
(56)	Anførte publikasjoner	LI F et al., Visualization of P-selectin Glycoprotein Ligand-1 as a Highly Extended Molecule and Mapping of Protein Epitopes for Monoclonal Antibodies, Journal of Biological Chemistry, 1996, Vol. 271 (11), side 6342-6348, US 2003049252 A1, MOORE K et al., P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin, The Journal of Cell Biology, 1995, Vol. 128 (4), side 661-671, YANG J et al., The biology of P-selectin glycoprotein ligand-1: its role as a selectin counterreceptor in leukocyte-endothelial and leukocyte-platelet interaction, Thrombosis and Haemostasis, 1999, Vol. 81 (1), side 1-7			
(57)	Sammendrag				

Immunglobulinkjeder eller antistoffer som har lett eller tung kjede komplementaritetsbestemmende regioner av antistoffer som binder til P-selektin glykoprotein ligand-I. Også beskrevet er nukleinsyrer som koder for immunglobulinkjedene, vektorene og vertceller med nukleinsyrene, og fremgangsmåter for å indusere død av en aktivert T-celle og for å modulere en T-cellemediert immunrespons i et subjekt.

BAKGRUNN

Svært aggressive T-celler fører ofte til uønskede immunresponser som, i sin tur, forårsaker forskjellige forstyrrelser, f.eks. autoimmune sykdommer, avstøtning av transplantat, allergiske sykdommer og kreft avledet av T-celler. Derfor er kontroll av de aggressive T-cellene kritisk ved behandling av slike forstyrrelser. Aktiviteten av disse cellene kan holdes tilbake ved immunsuppresjon eller ved induksjon av immunologisk toleranse. En alternativ løsning er induksjon av apoptose, som er antatt å medvirke til fjerning av uønskede celler, omfattende overdrevent aggressive T-celler. Se, f.eks. Kabelitz et al. (1993) *Immunol Today* 14, 338-340; og Raff (1992) *Nature* 356, 397-399.

Journal of Biological Chemistry, 1996, Vol. 271 (11), beskriver visualisering av P-selektin glykoprotein Ligand-1 som et meget omfattende molekyl og kartlegging av proteinepitoper for monoklonale antistoffer.

US 2003049252 A1 beskriver modulatorer av P-selektin glykoproteien ligand.

MOORE K et al., beskriver at P-selektin glycoprotein ligand-1 medierer avrulling av humane neutrofiler på P-selektin, *The Journal of Cell Biology*, 1995, Vol. 128 (4), side 661-671.

YANG J et al., beskriver biologien til P-selektin glykoprotein ligand-1 og dets rolle som en selektin motreseptor i leukocyt-endotelial og leukocyt-plate interaksjon, *Thrombosis and Haemostasis*, 1999, Vol. 81 (1), side 1-7.

20

OPPSUMMERING

Foreliggende oppfinnelse angår antistoff som spesifikt bindes til human P-selektin glykoprotein ligand 1 samt anvendelse derav og sammensetning. Antistoffene og deres derivater induserer apoptose ved binding til P-selektin glykoprotein ligand-1 (PSGL-1) på aktiverte T-celler.

Det er beskrevet en immunglobulinkjede som har tre sekvenser som (i) inneholder, henholdsvis, RSSQSIVHNDGNTYFE, KVSNRFS og FQGSYVPLT (SEKV ID NR: 1-3); (ii) inneholder, henholdsvis, SFGMH, YINGGSSTIFYANAVKG og YASYGGGAMDY (SEKV ID NR: 4-6); (iii) inneholder, henholdsvis, RASSTVNSTYLH, GSSNLAS og QQYSGYPLT (SEKV ID NR: 7-9); (iv) inneholder, henholdsvis, AYYIH, VNPNTGGTSYNPKFKG og SGSPYYRYDD (SEKV ID NR: 10-12); (v) inneholder,

25

henholdsvis, RSSQSIVNSNGNTYLE, KVSNRFS og FQGSHPWT (SEKV ID NR: 13-15); eller (vi) inneholder, henholdsvis, TNAMNWRQAPGKGLE, TYYADSVKD og GGSYWYFDV (SEKV ID NR: 16-18).

Hver av de nettopp beskrevne seks settene av sekvenser svarer til de tre lette eller
 5 tunge kjede komplementaritetsbestemmende regionene (CDR'er) av et antistoff som binder til PSGL-1, slik som de fra tre mus 15A7, 43B6 og 9F9-antistoffer beskrevet i eksemplene nedenfor. Vist nedenfor er de lette kjede og tunge kjede variable (V) regionene av disse tre antistoffene (SEKV ID NR: 19-26, CDR'ene er understreket og markert:

10 SEKV ID NR: 19 (Mus 15A7 lett kjede V-region):

```

  1 ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCCTGCTTCCAGCAGTGAT
  1 M K L P V R L L V L M F W I P A S S S D

  61 ATTTTGATGACCCAACTCCACTGTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCAATA
  15 21 I L M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I

  121 TCTTGAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAATGATGGAAACACCTATTTTGAATGGTAC
  41 S C R S S Q S I V H N D G N T Y F E W Y

  20 181 CTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAACCTCTGATCTACAAAGTTTCCAATCGATTTTCT
  61 L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S

  241 GGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACACATTTCACTCAACATCAGC
  81 G V P D R F S G S G S G T H F T L N I S

  25 301 AGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAATTTATTACTGCTTTCAAGGTTTCATATGTTTCTCTC
  101 R V E A E D L G I Y Y C F Q G S Y V P L

  361 ACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA
  30 121 T F G A G T K L E L K
  
```

SEKV ID NR: 20 (Mus 15A7 tung kjede V-region):

```

  1 ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCTTGTCTTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAT
  35 1 M D S R L N L V F L V L I L K G V Q C D

  61 GTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCGAAACTCTCC
  21 V Q L V E S G G G L V Q P G G S R K L S

  40 121 TGTGCAGCCTCTGGATTCACITTCAGTAGCTTTGGAATGCACTGGGTTTCGTCAGGCTCCA
  41 C A A S G F T F S S F G M H W V R Q A P

  181 GAGAAGGGGCTGGAGTGGGTGCATACATTAATGGTGGCAGTAGTACCATCTTCTATGCA
  61 E K G L E W V A Y I N G G S S T I F Y A

  45 241 AACGCAGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATCCCAAGAATACCCTGTTCTCTC
  81 N A V K G R F T I S R D N P K N T L F L

  301 CAAATGACCATTCTAAGGTCTGAGGACACGGCCATTTATTACTGTGGAAGGTATGCTAGT
  50 101 Q M T I L R S E D T A I Y Y C G R Y A S

  361 TACGGAGGGGTGCTATGGACTATTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
  121 Y G G G A M D Y W G Q G T S V T V S S
  
```

SEKV ID NR: 21 (Mus 43B6 lett kjede V-region):

1 ATGGATTTTCTGGTGCAGATTTTCAGCTTCTTGGCTAATCAGTGCCTCAGTTGCAATGTCC
 1 M D F L V Q I F S F L L I S A S V A M S
 5 61 AGAGGAGAAAATGTGCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAAAAG
 21 R G E N V L T Q S P A I M S A S P G E K
 121 GTCACCATGACCTGCAGGGCCAGCTCAACTGTAAATTCACCTTACTTGCCTGGTTCCAG
 41 V T M T C R A S S T V N A T Y L H W F Q
 10 181 CAGAAGTCAGGTGCCTCCCCAAACTCTGGATTTATGGCTCATCCAATTGGCTTCTGGA
 61 Q K S G A S P K L W I Y G S S N L A S G
 241 GTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGT
 81 V P A R F S G S G S G T S Y S L T I S S
 15 301 GTGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTACAGTGGTTACCCACTCAGC
 101 V E A E D A A T Y Y C Q Q Y S G Y P L T
 20 361 TTCGGTGCTGGGACCACGCTGGAGCTGAAA
 121 F G A G T T L E L K

SEKV ID NR: 22 (Mus 43B6 tung kjede V-region):

1 ATGGAATGGAGCTGGGTCTTTCTCTTCTCCTCTGTCAGTCACTACAGGTGTCCACTCTGAG
 1 M E W S W V F L F L L S V T T G V H S E
 25 61 GTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGACCTGGTGAAGCCTGGGGCTTTAGTGAAGATATCC
 21 V Q L Q Q S G P D L V K P G A L V K I S
 30 121 TGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGCCTACTACATTCACTGGGTGAAGCAGAGCCAT
 41 C K A S G Y S F T A Y Y I H W V K Q S H
 181 GGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGACGTGTTAATCCTAATACTGGTGGTACTAGCTACAAC
 61 G K S L E W I G R V N P N T G G T S Y N
 35 241 CCGAAGTTCAAGGGCAAGGCCATATTAATGTAGATAAGTCATCCAGCACAGCCTACATG
 81 P K F G K K A I L N V D K S S S T A Y M
 40 301 GAGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATCGGGATCC
 101 E L R S L T S E D S A V Y Y C A R S G S
 361 CCCTACTATAGGTACGACGACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
 121 P Y Y R Y D D W G Q G T T L T V S S

SEKV ID NR: 23 (Mus 9F9 lett kjede V-region):

1 ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCTGCTTCCAGCAGTGAT
 1 M K L P V R L L V L M F W I P A S S S D

5 61 GTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATC
 21 V L M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I

121 TCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTAATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGTAC
 41 S C R S S Q S I V N S N G N T Y L E W Y

10 181 CTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCT
 61 L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S

15 241 GGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTCACTCAAGATCAGC
 81 G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S

301 AGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTTACATGTTCCGTGG
 101 R V E A E D L G V Y Y C F Q G S H V P W

20 361 ACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA
 121 T F G G G T K L E I K

SEKV ID NR: 24 (Mus 9F9 tung kjede V-region):

25 1 ATGCTGTTGGGGCTGAAGTGGGTTTTCTTTGTTGTTTTTATCAAGGTGTGCATTGTGAG
 1 M L L G L K W V F F V V F Y Q G V H C E

61 GTGCAGCTTGTGAGACTGGTGGAGGATTGGTGCAGCCTAAAGGGTCATTGAAACTCTCA
 21 V Q L V E T G G G L V Q P K G S L K L S

30 121 TGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAATACCAATGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCA
 41 C A A S G F T F N T N A M N W V R Q A P

181 GGAAAGGGTTTGGAAATGGGTTGCTCGCATAAGAAGTAAAAGTAATAATTATGCAACATAT
 61 G K G L E W V A R I R S K S N N Y A T Y

35 241 TATGCCGATTCAAGTAAAAGACAGGTTTACCATCTCCAGAGATGATACACAAAGCATGATC
 81 Y A D S V K D R F T I S R D D T Q S M I

40 301 TATCTGCAAATGAACAACCTTGA AAAACTGAGGACACAGGCATGTATTACTGTGTGAGAGGG
 101 Y L Q M N N L K T E D T G M Y Y C V R G

361 GGAAGCTACTGGTACTTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
 121 G S Y W Y F D V W G A G T T V T V S S

45

Ettersom et antistoff's antigenbindende spesifisitet blir bestemt ved dens lette og tunge kjede CDR'er, kan de ovenfor beskrevne CDR'ene anvendes for å fremstille antistoff-derivater som beholder den antigenbindende spesifisiteten. Eksempler på antistoffderivater omfatter kimære antistoffer, humaniserte antistoffer og deres funksjonelle ekvivalenter. Vist nedenfor er lett kjede V-regionen (SEKV ID NR: 25) og tung kjede V-regionen (SEKV ID NR: 26) av et humanisert 15A7 antistoff, som omfatter SEKV ID NR: 1-3 og SEKV ID NR: 4-6, henholdsvis:

SEKV ID NR: 25 (humanisert 15A7 lett kjede V-region):

55 DIQMTQSPSSLSASVGVDRVITTCRSSQSIVHNDGNTYFEWYQQKPKAPKLLIYKVSNRFSGVPSRFSGG

SGTHFTLTISSLQPEDFATYYCFQGSYVPLTFGQGTKVEIK

SEKV ID NR: 26 (humanisert 15A7 tung kjede V-region):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVAYINGGSSTIFYANAVKGRFTIS
 5 RDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYASYGGGAMDYWGQGTLLVTVSS

Betegnelsen “antistoff” eller “immunglobulinkjede” refererer til et isolert polypeptid, dvs. et polypeptid som har blitt hovedsakelig separert fra andre proteiner, lipider og nukleinsyrer med hvilke det naturlig er forbundet. Polypeptidet kan utgjøre minst 50, 70
 10 eller 95% med hensyn til tørrvekt av det rensede preparatet. En “isolert nukleinsyre” refererer til en nukleinsyre for hvilken strukturen ikke er identisk med den av noen som helst naturlig forekommende nukleinsyre eller med den av noe som helst fragment av en naturlig forekommende genomisk nukleinsyre. Betegnelsen omfatter derfor, for eksempel
 15 (a) et DNA som har sekvensen av del av et naturlig forekommende genomisk DNA-molekyl men ikke er flankert av begge de kodende sekvensene som flankerer denne delen av molekylet i genomet til organismen hvor det naturlig forekommer; (b) en nukleinsyre inkorporert i en vektor eller inn i det genomiske DNA av en prokaryot eller eukaryot på en slik måte at det resulterende molekylet ikke er identisk med noen som helst naturlig
 20 forekommende vektor eller genomisk DNA; (c) et separat molekyl slik som et cDNA, et genomisk fragment, et fragment fremstilt ved polymerasekjedereaksjon (PCR) eller et restriksjonsfragment; og (d) en rekombinant nukleotidsekvens som er del av et hybridgen, dvs. et gen som koder for et fusjonsprotein. Nukleinsyren beskrevet kan anvendes for å uttrykke et polypeptid beskrevet heri. For dette formål kan en operativt forbinde nukleinsyren til egnede regulatorsekvenser for å fremstille en ekspresjonsvektor.

En vektor refererer til et nukleinsyremolekyl som er i stand til å transportere en annen nukleinsyre som det har blitt bundet til og som også er i stand til autonom replikasjon eller integrering inn i et verts DNA. Eksempler omfatter en plasmid, kosmid og viral vektor. En vektor ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter en nukleinsyre i en form egnet for ekspresjon av nukleinsyren i en vertscelle. Foretrukket omfatter vektoren én eller flere reguleringssekvenser operativt bundet til nukleinsyresekvensen som skal uttrykkes. Eksempler på en reguleringssekvens omfatter promotere, enhancere og andre ekspresjonskontrollelementer (f.eks. polyadenyleringssignaler). Regulatoriske sekvenser omfatter også de som kontrollerer konstitutiv ekspresjon av en nukleotidsekvens, så vel som vevsspesifikke regulatoriske og/eller induserbare sekvenser. Utforming av en slik ekspresjonsvektor er basert på betraktninger omfattende valg av vertscellen som skal transformeres og det ønskede ekspresjonsnivået. En ekspresjonsvektor kan innføres i vertsceller for å produsere et polypeptidet . En vertscelle kan inneholde den ovenfor beskrevne nukleinsyren. En vertscelle refererer til en celle inneholdende en eksogen kodende sekvens eller ikke-kodende sekvens. En eksogen sekvens kan innføres i en celle ved kalsiumfosfat-transfeksjon, DEAE-Dekstran mediert transfeksjon eller elektroporering. Egnede vertsceller omfatter bakterieceller (f.eks. E. coli, Bacillus subtilis og Salmonella typhimurium), gjærceller (f.eks. Saccharomyces cerevisiae og Schizosaccharomyces pombe), planteceller (f.eks. Nicotiana tabacum og Gossypium hirsutum) og pattedyrceller (f.eks. murine hybridomceller, CHO-celler og 3T3 fibroblaster).

For å fremstille en immunoglobulinkjede som beskrevet, kan en anbringe en vertscelle i en kultur under betingelser som tillater ekspresjon av et polypeptid kodet for av en nukleinsyre beskrevet ovenfor og isolere polypeptidet fra kulturen. Alternativt kan en nukleinsyre transkriberes og translateres in vitro, for eksempel ved anvendelse av T7 promoter reguleringssekvenser og T7 polymerase.

Foreliggende oppfinnelse omfatter følgelig antistoff som spesifikt bindes til human P-selektin glykoprotein ligand 1 uten å interferere med bindingen mellom P-selektin glykoprotein ligand 1 og P-Selektin, idet antistoffet, ved binding til P-selektin glykoprotein ligand 1 på en aktivert T-celle, induserer død av den aktiverte T-cellen og hvor antistoffet omfatter en første immunoglobulinkjede, som er en lett kjede, som inneholder SEKV ID NR: 1-3 og en andre kjede, som er en tungkjede, som inneholder SEKV ID NR: 4-6. Idet den lette kjeden og den tunge kjeden inneholder, henholdsvis SEKV ID NR: 19 og 20, eller 25 og 26.

Foreliggende oppfinnelse omfatter videre antistoff som bindes spesifikt til human P-selektin glykoprotein ligand 1 uten interferering med bindingen mellom P-selektin glykoprotein ligand 1 og P-Selektin, idet antistoffet, ved binding til P-selektin glykoprotein ligand 1 på en aktivert T-celle induserer død av den aktiverte T-cellen og hvor antistoffet bindes spesifikt til aminosyreresidene 115-126 av human P-selektin glykoprotein ligand 1. Antistoffet blir dannet av en første immunoglobulinkjede og en andre immunoglobulinkjede, som inneholder, henholdsvis, lett kjede CDR'er og tung kjede CDR'er fra mus 15A7, 43B6 eller 9F9-antistoff nevnt ovenfor. Foretrukket blir dette antistoffet dannet av de lette og tunge kjedene av 15A7.

Foretrukket binder antistoffet spesifikt til aminosyrerestene 117-123. Mer foretrukket binder det spesifikt til aminosyrerestene 119-121, en konsensussekvens for alle testede epitoper. Mutasjon av én eller flere av disse tre aminosyrerestene opphever faktisk antistoffbinding. I ett eksempel induserer dette antistoffet, ved binding til P-selektin glykoprotein ligand 1 på en aktivert T-celle, død av den aktiverte T-cellen.

I én utførelsesform blir ett av de to antistoffene nevnt umiddelbart ovenfor dannet av en lett kjede og en tung kjede som inneholder, henholdsvis, SEKV ID NR: 1-3 og SEKV ID NR: 4-6 (f.eks. SEKV ID NR: 19 og 20 eller SEKV ID NR: 25 og 26).

Foreliggende oppfinnelse omfatter videre anvendelse av en effektiv mengde av et antistoff ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene ved fremstilling av et medikament for modulering av en T-celle-mediert immunrespons i et individ som har eller har risiko for å ha en tilstand relatert til en omfattende celle-mediert immunrespons, idet tilstanden er en inflammatorisk sykdom, en autoimmun sykdom, en allergisk sykdom eller en T-cellecancer.

Foreliggende oppfinnelse omfatter videre anvendelse av en effektiv mengde av et antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7 for fremstillingen av et medikament for behandling eller forebygging av allogen eller xenogen transplantatavstøtning.

Foreliggende oppfinnelse omfatter videre sammensetning omfattende et antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7 eller 10 til 15.

Foreliggende oppfinnelse omfatter videre isolert antistoff ifølge krav 1, idet antistoffet omfatter (i) en lett kjede omfattende en variabel region som har aminosyresekvensen ifølge SEKV ID NR: 25 koblet til en human kappa lett kjede konstant region, og (ii) en tungkjede omfattende en variabel region som har aminosyresekvensen ifølge SEKV ID NR: 26 koblet til en human IgG4 tungkjede konstant region.

Foreliggende oppfinnelse omfatter videre antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7 eller 10 til 15 for anvendelse for modulering av en T-celle-mediert immunrespons i et individ som har eller har risiko for å ha en tilstand relatert til en omfattende cellemediert immunrespons, idet tilstanden er en inflammatorisk sykdom, en autoimmun sykdom, en allergisk sykdom eller en T-cellecancer.

Foreliggende oppfinnelse omfatter videre antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7 eller 10 til 15, for anvendelse for behandling eller forebygging av allogen eller xenogen transplantatavstøtning.

Det er mulig å indusere død av en aktivert T-celle. Fremgangsmåten omfatter å bringe ett av de tre antistoffene beskrevet ovenfor i kontakt med en aktivert T-celle, hvor binding av antistoffet til den aktiverte T-cellen induserer celledød.

Det er videre mulig å modulere en T-cellemediert immunrespons i et subjekt. Fremgangsmåten omfatter (1) identifisere et subjekt som har eller som er med risiko for en lidelse relatert til en for høy T-cellemediert immunrespons og (2) administrere til subjektet en effektiv mengde av ett av de tre antistoffene beskrevet ovenfor. En "for høy T-cellemediert immunrespons" refererer til en respons forårsaket av et for høyt nivå av aktiverte T-celler. Et for høyt nivå refererer til (1) et nivå høyere enn et normalt nivå og (2) et nivå høyere enn ønsket i et individ, selv om det ikke er høyere enn et normalt nivå. Eksempler på lidelsen omfatter en inflammatorisk sykdom, en autoimmun sykdom, en allergisk sykdom eller en T-celle kreft, så vel som et tilfelle hvor et subjekt har mottatt eller er forventet å motta et allogent eller xenogent transplantat.

Detaljene for én eller flere utførelsesformer ifølge oppfinnelsen er angitt i den ledsagende beskrivelsen nedenfor. Andre trekk, formål og fordeler ifølge oppfinnelsen vil fremgå av den detaljerte beskrivelsen.

DETALJERT BESKRIVELSE

Foreliggende oppfinnelse er basert, i det minste delvis, på et uventet funn angående at aktiverte T-celler kan induseres til å gjennomgå apoptose og depleteres ved binding av antistoffer eller deres derivater til PSGL-1 på de aktiverte cellene. Antistoffene og derivatene er anvendelige for behandling av lidelser forbundet med en for høy eller uønsket T-cellemediert immunrespons eller T-celleproliferasjon.

En immunglobulinkjede kan oppnås som et syntetisk polypeptid eller et rekombinant polypeptid. For å fremstille et rekombinant polypeptid, kan en nukleinsyre som koder for det bindes til en annen nukleinsyre som koder for en fusjonspartner, f.eks.

Glutation-S-Transferase (GST), 6x-His epitop-merke ("tag"), M13 Gen 3-protein eller en immunglobulin tung kjede konstant region. Den resulterende fusjonerte nukleinsyren kan innføres i en celle for proteinekspresjon. Fusjonsproteinet kan isoleres fra vertscellen ved metoder velkjent på området. Det isolerte fusjonsproteinet kan videre behandles, f.eks.

5 ved enzymatisk kløyving, for å fjerne fusjonspartneren og oppnå det rekombinante polypeptidet av interesse. Alternativt kan en immunglobulinkjede oppnås fra en egnet vertscelle ved å aktivere endogen ekspresjon av en nukleinsyre som koder for kjeden.

Aminosyreblandingen av en immunglobulinkjede heri kan variere uten å forstyrre evnen til å danne et antistoff i stand til å binde til PSGL-1. For eksempel kan en slik

10 variant inneholde én eller flere konservative aminosyresubstitusjoner. En "konservativ aminosyresubstitusjon" er én hvor aminosyreresten

blir erstattet med en aminosyrerest som har en lignende sidekjede. Familier av aminosyrerester som har lignende sidekjeder er definert på området. Disse familiene omfatter aminosyrer med basiske sidekjeder (f.eks. lysin, arginin, histidin), sure sidekjeder (f.eks. asparaginsyre, glutaminsyre), uladede polare sidekjeder (f.eks. glysin, asparagin, glutamin, serin, treonin, tyrosin, cystein), ikke-polare sidekjeder (f.eks. alanin, valin, leucin, isoleucin, prolin, fenylalanin, metionin, tryptofan), beta-forgrenede sidekjeder (f.eks. treonin, valin, isoleucin) og aromatiske sidekjeder (f.eks. tyrosin, fenylalanin, tryptofan, histidin). Følgelig blir en predikert ikke-essensiell aminosyrerest i et polypeptid foretrukket erstattet med en annen aminosyrerest fra samme sidekjede-familie. Alternativt kan mutasjoner innføres tilfeldig langs hele eller del av et polypeptid heri, for eksempel ved saturation mutagenese og de resulterende mutantene kan screenes for evne til å danne et antistoff i stand til å binde til PSGL-1 for å identifisere varianter heri som beskrevet nedenfor i eksemplene. Følgelig omfatter, som et eksempel, betegnelsen “en immunglobulinkjede inneholdende SEKV ID NR: 19” immunglobulinkjeder inneholdende varianter av SEKV ID NR: 19.

De ovenfor beskrevne immunglobulinkjedene og variantene kan anvendes for fremstilling av et antistoff ifølge foreliggende oppfinnelse eller derivater derav. Et “antistoff” omfatter intakte molekyler så vel som fragmenter derav, slik som Fab, F(ab')₂, Fv, scFv (enkeltkjede antistoff) og dAb (domene-antistoff; Ward, et. al. (1989) Nature, 341, 544). Et derivat av et antistoff refererer til et protein eller et proteinkompleks som har en polypeptidvariant ifølge foreliggende oppfinnelse. Et antistoff eller derivat ifølge foreliggende oppfinnelse kan fremstilles ved koekspresjon av korresponderende lett og tung kjede CDR-inneholdende polypeptider i en egnet vertscelle som beskrevet i eksemplene nedenfor. Alternativt kan de fremstilles ved metoder kjent på området angående fremstilling av monoklonale og polyklonale antistoffer og fragmenter. Se, f.eks. Harlow og Lane, (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

For å fremstille et antistoff ifølge foreliggende oppfinnelse, kan PSGL-1 eller antigen fragment derav kobles til et bærerprotein, slik som KLH, blandes med en adjuvans og injiseres inn i et vertsdyr. Antistoffer produsert i dette dyret kan deretter renses ved peptidaffinitetskromatografi. Vanlig anvendte vertsdyr omfatter kaniner, mus, marsvin

og rotter. Forskjellige adjuvantia som kan anvendes for å øke den immunologiske responsen avhenger av type av vert og omfatter Freund's adjuvans (complete og incomplete), mineral geler slik som aluminiumhydroksid, overflateaktive substanser slik som lysolecitin, pluronic polyoler, polyanioner, peptider, oljeemulsjoner, keyhole limpet hemocyanin og dinitrofenol. Anvendelige humane adjuvantia omfatter BCG (Bacille Calmette-Guerin) og *Corynebacterium parvum*.

Polyklonale antistoffer, heterogene populasjoner av antistoffmolekyler, er til stede i sera fra de immuniserte subjektene. Monoklonale antistoffer, homogene populasjoner av antistoffer mot et bestemt antigen, kan fremstilles ved anvendelse av standard hybridomteknologi. Se, f.eks. Kohler et al. (1975) *Nature* 256, 495; Kohler et al. (1976) *Eur. J. Immunol.* 6, 511; Kohler et al. (1976) *Eur. J. Immunol.* 6, 292; og Hammerling et al. (1981) *Monoclonal antibodies and T Cell Hybridomas*, Elsevier, N.Y. Spesielt kan monoklonale antistoffer oppnås ved hvilken som helst teknikk som omfatter fremstilling av antistoffmolekyler ved kontinuerlige cellelinjer i kultur slik som beskrevet i U.S. Patent nr. 4,376,110; human B-celle hybridomteknikk (Kosbor et al. (1983) *Immunol Today* 4, 72; Cole et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 2026) og EBV-hybridomteknikken (Cole et al. (1983) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., s. 77-96). Slike antistoffer kan være av hvilken som helst immunglobulinklasse omfattende IgG, IgM, IgE, IgA, IgD og hvilken som helst subklasse derav. Hybridomene som produserer de monoklonale antistoffene ifølge oppfinnelsen kan dyrkes *in vitro* eller *in vivo*. Evnen til å produsere høye titere av monoklonale antistoffer *in vivo* gjør at den er spesielt anvendelig fremstillingsmetode.

I tillegg kan teknikker utviklet for fremstilling av "kimære antistoffer" anvendes. Se, f.eks. Morrison et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6851; Neuberger et al. (1984) *Nature* 312, 604; og Takeda et al. (1984) *Nature* 314, 452. Et kimært antistoff er et molekyl hvor forskjellige andeler er avledet fra forskjellige dyrearter, for eksempel slike som har en variabel region avledet fra et murint monoklonalt antistoff og en human immunglobulin konstant region. Alternativt kan teknikker beskrevet for fremstilling av enkeltkjede antistoffer (U.S. Patent nr. 4,946,778 og 4,704,692) tilpasses for å fremstille et fagbibliotek av enkeltkjede Fv-antistoffer. Enkeltkjede antistoffer blir dannet ved å binde de tunge og lette kjede fragmentene av Fv-regionen via en aminosyre-bro. Videre kan antistoffragmenter fremstilles ved kjente teknikker. For eksempel omfatter slike fragmenter, men er ikke begrenset til, F(ab')₂-fragmenter som kan fremstilles ved pepsin-kløyving av et antistoffmolekyl og Fab-fragmenter som kan fremstilles ved å redusere

disulfidbroene av F(ab')₂-fragmenter. Antistoffer kan også humaniseres ved metoder beskrevet i eksemplene nedenfor eller kjent på området. For eksempel kan monoklonale antistoffer med en ønsket bindingsspesifisitet være kommersielt humanisert (Scotgene, Skotland; og Oxford Molecular, Palo Alto, Calif.). Fullstendig humaniserte antistoffer, slik som de uttrykt i transgene dyr er beskrevet heri (se f.eks. Green et al. (1994) Nature Genetics 7, 13; og U.S. Patent nr. 5,545,806 og 5,569,825).

Det er mulig med en fremgangsmåte for å indusere død av aktiverte T-celler, f.eks. ved å bringe aktiverte T-celler i kontakt med et antistoff ifølge oppfinnelsen in vitro og ved å administrere til et subjekt med behov for dette en effektiv mengde av antistoffet.

10 Subjekter som skal behandles kan identifiseres som å ha eller være med risiko for å ha en lidelse forbundet med en for høy eller uønsket T-cellemediert immunrespons, f.eks. pasienter som lider av autoimmune sykdommer, avstøtning av transplantat, allergiske sykdommer eller T-celle-avledet kreft. Denne fremgangsmåten kan utføres alene eller sammen med andre medikamenter eller behandlinger.

15 Betegnelsen “behandling” refererer til administrering av en blanding til et subjekt med det formål å kurere, lindre, lette, helbrede, forebygge eller forbedre en forstyrrelse, symptomet på forstyrrelsen, sykdomstilstanden etter forstyrrelsen eller predisponering for forstyrrelsen. En “effektiv mengde” er en mengde av blandingen som er i stand til å frembringe et medisinsk ønskelig resultat i et behandlet subjekt.

20 Eksempler på sykdommer som kan behandles omfatter diabetes mellitus, artritt (omfattende revmatoid artritt, juvenil revmatoid artritt, osteoartritt og psoriatisk artritt), multippel sklerose, encefalomyelitt, myasthenia gravis, systemisk lupus erythematosus, autoimmun tyreoiditt, dermatitt (omfattende atopisk dermatitt og eksematøs dermatitt), psoriasis, Sjogrens syndrom, Crohns sykdom, aftøst sår, iritt, konjunktivitt, keratokonjunktivitt, type I diabetes, inflammatoriske tarmsykdommer, colitis ulcerosa, astma, allergisk astma, kutan lupus erythematosus, skleroderma, vaginitt, proktitt, legemiddelutslett, reversal leprareaksjoner, erythema nodosum

leprosum, autoimmun uveitt, allergisk encefalomyelitt, akutt nekrotiserende hemoragisk encefalopati, idiopatisk bilateralt progressivt sensorineuralt hørselstap, aplastisk anemi, pure red cell anemi, idiopatisk trombocytopeni, polykondritt, Wegeners granulomatose, kronisk aktiv hepatitt, Stevens-Johnson syndrom, idiopatisk sprue, lichen ruber planus, Graves sykdom, sarkoidose, primær biliær cirrhose, uveitis posterior, interstitiell lungefibrose, graft-versus-host sykdom, tilfeller av transplantasjon (omfattende transplantasjon ved anvendelse av allogent eller xenogent vev) slik som benmargtransplantasjon, levertransplantasjon eller transplantasjon av hvilket som helst organ eller vev, allergier slik som atopisk allergi, AIDS og T-celle neoplasmer slik som leukemier eller lymfomer.

I én in vivo-metode, blir en terapeutisk blanding (f.eks. en blanding inneholdende et antistoff ifølge oppfinnelsen) administrert til subjektet. Generelt blir antistoffet suspendert i en farmasøytisk akseptabel bærer (f.eks. fysiologisk saltoppløsning) og administrert oralt eller ved intravenøs infusjon eller injisert eller implantert subkutant, intramuskulært, intratekalt, intraperitonealt, intrarektalt, intravaginalt, intranasalt, intragastrisk, intratrakealt eller intrapulmonal.

Dosen nødvendig avhenger av valg av administreringsvei; type formulering; karakteren av subjektets sykdom; subjektets størrelse, vekt, overflateareal, alder og kjønn; andre medikamenter som administreres; og vurdering ved behandlende lege. Egnede doser er i området 0,01-100,0 mg/kg. Variasjoner i nødvendig dosering kan forventes i betraktning av mangfoldet av blandinger tilgjengelige og de forskjellige effektivitetene av de ulike administreringsmetodene. For eksempel ville oral administrering forventes å kreve høyere doser enn administrering ved intravenøs injeksjon. Variasjoner i disse doseringsnivåene kan reguleres ved anvendelse av standard empiriske rutiner for optimalisering som er velkjent på området. Innkapsling av blandingen i en egnet leveringskonstituent (f.eks. polymere mikropartikler eller implanterbare anordninger) kan øke effektiviteten av levering, spesielt for oral levering.

Innenfor omfanget av foreliggende oppfinnelse er følgelig også en farmasøytisk sammensetning som inneholder en farmasøytisk akseptabel bærer og en effektiv mengde av et antistoff ifølge oppfinnelsen. Den farmasøytiske blandingen kan anvendes for å behandle sykdommer beskrevet ovenfor. Den farmasøytisk akseptable bæreren omfatter et løsningsmiddel, et dispersjonsmedium,

et belegg, et antibakterielt og antifungalt middel og et isotonisk og absorpsjonsforsinkende middel.

Den farmasøytiske blandingen ifølge oppfinnelsen kan formuleres i doseringsformer for forskjellige administreringsmetoder ved anvendelse av konvensjonelle metoder. For eksempel kan den formuleres i en kapsel, en gel seal eller en tablett for oral administrering. Kapsler kan inneholde hvilke som helst standard farmasøytisk akseptable materialer slik som gelatin eller cellulose. Tabletter kan formuleres i henhold til konvensjonelle metoder ved sammenpressing av blandinger av sammensetningen med en fast bærer og et glattemiddel. Eksempler på faste bærere omfatter stivelse og sukker bentonitt. Sammensetningen kan også administreres i en form av en tablett med hardt skall eller en kapsel inneholdende et bindemiddel, f.eks. laktose eller mannitol, et konvensjonelt fyllmiddel og et tabletteringsmiddel. Den farmasøytiske sammensetningen kan administreres via den parenterale ruten. Eksempler på parenterale doseringsformer omfatter vandige løsninger, isotonisk saltløsning eller 5% glukose av det aktive midlet eller andre velkjente farmasøytisk akseptable tilsetningsmidler. Cyklodekstriner eller andre solubiliseringmidler velkjent for fagfolk på området, kan anvendes som farmasøytiske tilsetningsmidler for levering av det terapeutiske midlet.

Effektiviteten av en blanding ifølge foreliggende oppfinnelse kan evalueres både in vitro og in vivo. Se, f.eks. eksemplene nedenfor. I korthet kan blandingen undersøkes for dens evne til å indusere død av aktiverte T-celler in vitro. For in vivo-undersøkelser, kan blandingen injiseres inn i et dyr (f.eks. en musemodell) og dens terapeutiske effekter blir deretter bedømt. Basert på resultatene kan passende doseringsområde og administreringsrute bestemmes.

EKSEMPEL 1: Mus monoklonale antistoffer 15A7, 43B6 og 9F9

Fremstilling av anti-PSGL-1-antistoffer

Standardteknikker ble anvendt for å fremstille mus monoklonale antistoffer som spesifikt bindes til human PSGL-1 (hCD162). Nærmere bestemt ble mus immunisert med membranfraksjon av PHA-aktiverte humane T-celler og avlivet for å fremstille hybridomcellelinjer. Supernatanter fra resulterende hybridomcellelinjer ble screenet for binding til CHO-celler som stabilt uttrykte hCD 162. De linjene som produserer antistoffer som bindes til hCD162-uttrykkende CHO-celler, men ikke de parentale CHO-cellene, ble identifisert, subklonet og videre analysert som beskrevet nedenfor.

Blant linjene identifisert var m152-15A7, m166-43B6 og m128-9F9. De produserte IgG1-antistoffene 15A7, 43B6 og 9F9, henholdsvis. Immunblotting analyse viste at disse tre antistoffene trakk ned fra lysat av aktiverte T-celler et protein som kunne detekteres ved anti-hCD 162-antistoff (kpl-1, PharMingen, San Diego, CA).

De nettopp beskrevne tre antistoffene ble testet for deres evner til å indusere apoptose av aktiverte T-celler. Kultursupernatanter inneholdende monoklonale antistoffer sekretert av de tre hybridom cellelinjene ble henholdsvis inkubert med enten ikke-aktiverte humane T-celler (Dag 0) eller in vitro-aktiverte humane T-celler (Dag 7) i 6 timer. Cellene ble deretter merket med annexin V og underlagt FACS-analyse. CD3-positive celler ble gatet for å sikre telling av enten in vitro aktiverte humane T-celler eller hvilende humane T-celler. De apoptotiske cellene var annexin V merking-positive. Tabell 1 oppsummerer prosentdelen av apoptotiske T-celler av alle T-cellene scannet.

Tabell 1 Prosentandel av apoptotiske T-celler

	Ubehandlet	Anti-myc	m128-9F9	Ubehandlet	Anti-myc	m152-15A7	M166-43B6
Dag 0	4,17	6,67	5,82	18,18	15,52	5,23	6,57
Dag 7	12,63	13,36	28,71	24,18	23,08	51,66	49,44

Disse resultatene indikerer at mus 15A7, 43B6 og 9F9 antistoffer (1) er hCD162-spesifikke og (2) kan binde til humane aktiverte T-celler og indusere apoptose av aktiverte T-celler, men ikke hvilende humane T-celler.

Apoptose-analyse ble også utført for PHA-aktiverte humane perifere blod mononukleære celler (PBMC). Det ble funnet at antistoffene kun induserte apoptose i aktiverte T-celler, men ikke i hvilende T-celler, B-celler eller i nøytrofiler.

Det er kjent at T-celle-deleterende antistoffer, slik som anti-CD3, er i stand til å
5 indusere produksjon av oppløselige faktorer. Behandling ved anvendelse av slike antistoffer fører vanligvis til et skadelig cytokin syndrom. For å undersøke om anti-PSGL-1-antistoff også forårsaket cytokin-assosierte bivirkninger, ble nylig isolerte humane PBMC dyrket med 15A7 i 24, 48 eller 72 timer. Nivåene av cytokiner i supernatanten ble deretter bestemt. Vesentlige mengder av IL-2, TNF- α og IFN- γ ble produsert i PHA-
10 aktiverte PBMC (positiv kontroll), mens nivåer av disse cytokinene fra 15A7-behandlede celler ikke var detekterbare. Disse resultatene underbygget at anti-PSGL-1 ikke har noen eller liten effekt på hvilende perifere blodceller, i begge aspektene av apoptotisk induksjon og celleaktivering.

Siden de ovenfor beskrevne antistoffene selektivt induserer apoptose av aktiverte
15 T-celler uten å forårsake ugunstige effekter på hvilende T- eller andre immunceller, er det lite trolig at administrering av dem til et subjekt vil føre til lymfopeni eller generell immundefekt hvilket er tilfelle med anti-CD3 eller immunosuppressivt middel.

Epitop-kartlegging av anti-CD162-antistoffer

For å kartlegge de bindende epitopene av mus 15A7, 43B6 og 9F9 på human
20 CD162, ble en serie av fusjonsproteiner som dekker forskjellige regioner av human CD162 uttrykt og rensset. Interaksjoner mellom fusjonsproteinene og disse monoklonale antistoffene ble undersøkt ved Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

I korthet ble fragmenter som dekker forskjellige regioner av humant CD162-gen uttrykt som fusjonsproteiner med human immunglobulin gamma 1 tung kjede konstant region i *E. coli*. cDNA som koder for den humane immunglobulin gamma 1 tung kjede
25 konstante regionen ble amplifisert ved PCR med primere som har et *Bgl*III-sete og et *Bam*HI-sete. PCR-produktet ble kuttet med *Bgl*III og *Bam*HI, og subklonet inn i en pET-32a vektor (Novagen) som var kløyyvet med de samme enzymene. Deretter ble cDNA'er som koder for forskjellige regioner av hCD162 amplifisert ved PCR med primere som har
30 et *Nde*I-sete ved 5'-enden og et *Bgl*III-sete ved 3'-enden. PCR-produktene ble kuttet med de tilsvarende enzymene og fusjonert i leseramme til sekvensen som koder for den humane immunglobulin gamma 1 tung

kjede konstante regionen i pET-32a-vektoren. Primere anvendt i hver konstruksjon er listet opp i Tabell 2 og sekvensene av primerene er listet opp i Tabell 3.

Tabell 2. Navn på primere anvendt i hvert forsøk.

For amplifisering av sekvenser som koder for:	Forover primer	Revers primer
E. coli-uttrykte hCD162-fragmenter		
42-119	AB1001	AB1005
42-80	AB1001	AB1008
61-99	AB1003	AB1009
81-119	Ab1004	AB1005
42-70	AB1001	AB1007
42-60	AB1001	AB1006
50-80	AB1002	AB1008
50-70	AB1002	Ab1007
42-319	AB1001	Ab1010
115-126	AB1022	AB1023
115-126EtoR	AB1024	AB1025
V region av cDNA'er		
Lett kjede	AB1058	AB1059
Tung kjede	AB1058	AB1060
Mammalsk uttrykte hCD162-fragmenter		
1-119	AB1011	AB1013
1-319	AB1011	AB1012
110-319	AB1058	AB1059
94-148	AB1020	AB1021
119-222	AB1018	AB1019
174-269	AB1016	AB1017
214-317	AB1014	AB1015
Kimære kjeder		
15A7 lett kjede	AB1030	AB1031
15A7 tung kjede	AB1032	AB1033
9F9 lett kjede	AB1026	A131027
9F9 tung kjede	AB1028	AB1029
43B6 lett kjede	AB1034	AB1035
43B6 tung kjede	AB1036	AB1037
Humaniserte kjeder		
15A7 lett kjede	AB1048	AB1057
15A7 lett kjede 1. par	AD1049	AB1050
15A7 lett kjede 2. par	AB1051	AB1052
15A7 lett kjede 3. par	AB1053	AB1054
15A7 lett kjede 4. par	AB1055	Ab1056
15A7 tung kjede	AB1038	AB1047
15A7 tung kjede 1. par	AB1039	AB1040
15A7 tung kjede 2. par	AB1041	AB1042

5

15A7 tung kjede 3. par	AB1043	AB1044
15A7 tung kjede 4. par	AB1045	AB1046

Tabell 3. Primer-sekvenser.

Navn	Sekvens
AB1001	cccgggacCATATGcaggccaccgaatatgagtacc
AB1002	tatgagCATATGgattatgatttccctgccagaaacgg
AB1003	aaacggagCATATGgaaatgctgaggaacagcaactgacacc
AB1004	aacccctCATATGaccactgtggagcctgctgcaaggcg
AB1005	gtggtcAGATCTtccatagctgctgaatccgtggacagg
AB1006	GTTCCCTCAGATCTTCTGGAGGCTCCGTTTCTGGCAGG
AB1007	AGGCCCAAGATCTGGAGTGGTGTCACTGCTGTTCCTC
AB1008	ggctccAGATCTgtagactcaggggttccaggccc
AB1009	gtggtcAGATCTgtgactgcccctcctgcatccaggcc
AB1010	GCCAGCAGATCTTGCTTCACAGAGATGTGGTCTGGGG
AB1011	cgcggatccatgcctctgcaactcctcctgttgc
AB1012	GCCAGCCTCGAGCTTCACAGAGATGTGGTCTGGGG
AB1013	GGTCTGctcgagCATAGCTGCTGAATCCCTGGACAGGTTT
AB1058	agacaggccaccgaagggaacctgtccacg
AB1059	cgtggacaggttcccttcgggtggcctgtct
AB1014	ccgctcgagcgccaagattaggatggc
AB1015	cgggatccactcaaccacagccatgg
AB1016	ccgctcgagtggttagtaggttccatgg
AB1017	cgggateaactcaaccacaggcctg
AB1018	ctgtgcctcgagggctgtggtttgagtg
AB1019	cgggatccatggagatacagaccactcaac
AB1020	cgggatccgatgcaggaggggcagtcac
AB1021	ggccgtcactcgagttgtctgtgctc
AB1022	TatgGATTcAGCAGCTATGGAGATACAGACCACTCAACCagcA
AB1023	GATCTgcTGGTTGAGTGGTCTGTATCTCCATAGCTGCTGAATCCA
AB1024	TatgGATTcAGCAGCTATGCGGATACAGACCACTCAACCagcA
AB1025	GATCTgcTGGTTGAGTGGTCTGTATCCGCATAGCTGCTGAATCCA
AB1026	CTAGTCTAGATGAUCCAAACTCCACTCTCCC
AB1027	CTAGTCTAGAATTAGGAAAGTGCACCTTAGCATCAGCCCGTTTGATTTC
AB1028	TAACATTctagATGCTGTTGGGGCTGAAGTGGG
AB1029	GGATAGTCTAGAGGTTGTGAGGACTCACCTGAGGAGACGGTGACCGTGG
AB1030	CTAGTCTAGATGGAGACAGACACTCCTGTTATGGG
AB1031	CTAGTCTAGAATTAGGAAAGTGCACCTTTTCCAGCTTGGTCCCCCTCC
AB1032	CTAGTCTAGATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCC
AB1033	CTAGTCTAGAGGTTGTGAGGACTCACCTGAGGAGACGGTGACTGAGSttcc
AB1034	CTAGTCTAGATGGATTTTCTGGTGCAGATTTTCAGC
AB1035	CTAGTCTAGAATTAGGAAAGTGCACCTTAGCATCAGCCCGTTTCAGCTCC
AB1036	CTAGTCTAGATGGAAATGGAGCTGGGTCTTTCTC
AB1037	CTAGTCTAGAGGTTGTGAGGACTCACAGCTTCCAGTGGATAGACTGATGG
AB1038	TCTATCTAGATGAACTTCGGGTCCAGCTTGATTTTTCTTGTCTTGTTTTAAAAGGTGTCCAGTG
AB1039	CCTTGTTTTAAAAGGTGTCAGTGTGAAGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCTGG
AB1040	CTGAAAGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAAGCTTCCTCCAGGCTGCACTAAGCCTCC
AB1041	GCCTCTGGATTCACTTCAGTAGCTTTGGAATGCACTGGGTTCCCCAGGCTCCAGGGAAAGGACTCCGAG

```

AB1042 GCATAGAAGATGGTACTACTGCCACCATTAATGTATGCGACCCACTCGAGTCCCTTCCCTGGAGCC
AB1043 GTAGTACCATCTTCTATGCRAACGCAGTGAAGGGCCGATTCCACCATCTCCAGAGATAATGCC
AB1044 CCTCAGCCCTCAGAGAATTCATTTGCAGGTACAGGGTGTCTTGGCATTATCTCTGGAGATGG
AB1045 GAATTCCTCTGAGGGCTGAGGACACGGCCGTGTATTTACTGTGCAAGATATGCTAGTTACGGAGG
AB1046 CTGTGACCAGGGTGCCTTGGCCCCAATAGTCCATAGCACCCCTCCGTAAGTACATATC
AB1047 ACCCTCTAGAGGTTGTGAGGACTCACCTGAGGAGACTGTGACCAGGGTGCCTTGGCC
AB1048 TCTATCTAGATGGAGACAGACACAATCCTGCTATGGGTGCTGCTGCTCTGGGTTCCAGGC
AB1049 GCTGCTCTGGGTTCCAGGCTCCACTGGTGACATTCAGATGACCCAATCTCCGAGCTCTTTG
AB1050 GATCTGCAGGTGATAGTGACCCTATCCCCTACAGACCGCAGACAAAGAGCTCGGAGATTGG
AB1051 CACTATCACCTGCAGATCTAGTCAGAGCATTTGTACATAATGATGGAAACACCTATTTTGAATG
AB1052 GATGAGAAGCTTGGGTGCCTTTCCCTGGTTTCTGTTGGTACCATTCAAATAGGTGTTTC
AB1053 GCACCAAGCTTCTCATCTATAAAGTTTCCAATCGATTTTCTGGTGTCCCATCCAGGTTTAGTGGC
AB1054 GCAGAGAAGAGATGGTGAGGGTGAAGTGTGTCCCAGACCCACTGCCACTAAACCTGGATGG
AB1055 CTCACCATCTCTTCTCTGCAGCCGGAGGATTCGCAACCTATTACTGTTTTCAAG
AB1056 CCTTGGTGCCTTGACCGAACGTGAGAGGAACATATGAACCTTGAAAACAGTAATAGG
AB1057 ACCCTCFAGAATTAGGAAAGTGCACITACGTTTGATTTCCACCTTGGTGCCTTGACCC
AB1058 TATATCTAGAATTCCCCCCCCCCCCCCCCC
AB1059 TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTGGTGC
AB1060 TATAGAGCTCAAGCTTCCAGTGGATAGAC (C/A/T) GATGGGG (C/G) TGT (C/T) GTTTTGGC

```

De ovenfor beskrevne ekspresjonskonstruksjonene ble transformert inn i *Escherichia coli*-stamme BL21 (DE3). De transformerte cellene ble høstet etter 6 timers IPTG (2 mM)-induksjon og resuspendert i PBS. Etter at cellene var sonikerte og spunnet ned ved 14,000g i 10 minutter, ble de resulterende supernatantene oppsamlet for rensning av fusjonsproteinene. Nærmere bestemt ble supernatantene først inkubert med protein G eller protein A-kuler i 3 timer ved 4°C. Kulene ble deretter spunnet ned ved 3,000g og vasket med vaskebuffer I (0,05% Triton X-100, 50mM Tris-HCl, pH 8,5, 400 mM NaCl, 1mM CaCl₂ og 1 mg/ml OVA) og vaskebuffer II (0,05% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, pH 8,5 og 150 mM NaCl) 5 ganger hver. Bundne proteiner ble deretter eluert med en elueringsbuffer inneholdende 0,1M glysin-HCl, pH 2,7 og nøytralisert med 1 M Tris-HCl, pH 8,6. Alle rensede fusjonsproteiner ble kvantifisert ved Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories, Kat. nr. 500-0006) og verifisert ved SDS-PAGE.

En sandwich ELISA ble utført for å undersøke interaksjonen mellom hCD162-fragmentene og hver av 15A7, 9F9 og 43B6. 96-brønners mikrotiterplater ble belagt med geit anti-human IgG (Southern Biotechnology, Kat. nr. 2040-01) antistoff (2 µg/ml, 50 µl/brønn) natten over ved 4°C. Plater ble blokkert ved inkubering med 0,25% BSA i PBS (150 µl/brønn) i 1 time ved 37°C. De blokkerte platene ble deretter inkubert med

fusjonsproteiner inneholdende forskjellige fragmenter av human CD162 (2 µg/ml) i 2 timer ved romtemperatur. Etter vasking 4 ganger med PBS inneholdende 0,05% Tween 20 (PBST), ble platene inkubert med testing antistoffer (2 µg/ml) i 1,5 time ved romtemperatur. Etter inkubering ble platene vasket 4 ganger med PBST. 50 µl av 1 til 3000
5 forynnet geit anti-mus IgG konjugert med alkalisk fosfatase (Southern Biotechnology, Kat. nr. 1031-04) ble deretter tilsatt til hver brønn og platene ble inkubert i 1 time ved 37°C. Enzymreaksjon ble utført ved tilsetning av 50 µl av en alkalisk fosfatase substratløsning (1 alkalisk fosfatase substrat-tablett oppløst i 5 ml substratbuffer inneholdende 0,012 M Na₂CO₃, 0,16 M NaHCO₃ og 1 mM MgCl₂ ved pH 8,6) og absorbans ved 405
10 nm ble bestemt.

Det ble funnet at 43B6 og 9F9 var i stand til å interagere med alle fusjonsproteinene inneholdende restene 50 til 60 av moden human CD162, hvilket indikerer at epitoper av 43B6 og 9F9 var lokalisert mellom restene 50-60. Til forskjell fra 9F9 og 43B6, bandt 15A7 bare til fusjonsproteinet som omfatter restene 42 til 319, men
15 ikke fusjonsproteinet som omfatter restene 42-119, hvilket indikerer at epitopen av 15A7 var lokalisert mellom restene 119 til 319. Lokaliseringen av epitopen av 15A7 ble deretter innsnevret til mellom restene 115 til 126. Endring av én aminosyre i posisjon 120 (Glu →Arg) reduserte interaksjon mellom 15A7 og fusjonsproteinet, hvilket indikerer at det primære kontakt domenet for 15A7 på human CD162 er lokalisert ved eller i umiddelbar
20 nærhet til posisjon 120 og resten Glu er essensiell for interaksjonen.

Fusjonsproteiner som omfatter forskjellige humane CD162-regioner ble også uttrykt i mammalske celler og ble testet for deres interaksjon med 15A7. Fragmenter som dekker disse regionene ble uttrykt som fusjonsproteiner med human immunglobulin gamma 1 tung kjede konstant region i mammalske celler. Først ble cDNA som koder for
25 human immunglobulin gamma 1 tung kjede konstant region insertert inn i en pcDNA3-vektor (Invitrogen). Deretter ble cDNA'er som koder for forskjellige regioner av hCD162 amplifisert ved PCR med primere som innfører et *Bam*HI-sete ved 5'-enden og et *Xho*I-sete ved 3'-enden. Disse PCR-produktene ble kløvyet med de korresponderende enzymene og subklonet inn i den human immunglobulin gamma 1 tung kjede konstant region-
30 inneholdende pcDNA3-vektoren. Navnet og sekvensen for hver primer er listet opp i Tabellene 2 og 3 ovenfor.

De nettopp beskrevne mammalske ekspresjonsvektorene ble transient transfektert inn i COS-7-celler ved Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Kat. nr. 11668-027) etter produsentens veiledning. De transfekterte cellene ble dyrket i ultra low-Ig medium (Invitrogen, Kat. nr. 16250-078). De uttrykte proteinene ble rensset og underlagt Sandwich
5 ELISA på samme måte som beskrevet ovenfor.

ELISA-resultatene viser at kun fusjonsproteinene inneholdende restene 94 til 148 var i stand til å interagere med 15A7. Disse resultatene er i overensstemmelse med idéen om at epitopen av 15A7 er lokalisert mellom restene 115 til 126.

Alle resultatene ovenfor indikerer at epitopene av 9F9, 43B6 og 15A7 er protein-
10 avhengige, istedenfor karbohydrat modifikasjon-avhengige, siden alle tre antistoffene binder bakterielt uttrykte fusjonsproteiner. De indikerer også at, selv om 15A7, 9F9 og 43B6 oppviser lignende egenskaper når det gjelder bindingsspesifisitet og funksjon med hensyn til å indusere apoptose i aktiverte T-celler, fungerer de gjennom forskjellige domener av human CD 162 og fungerer ulikt.

15

EKSEMPEL 2: Kimære antistoffer 15A7, 43B6 og 9F9

Kloning av lett og tung kjede variable regioner av anti-CD162-antistoffer

cDNA'er som koder for de lette og tunge kjede variable regionene (V_L og V_H) av antistoffene 15A7, 43B6 og 9F9 ble amplifisert ved en anchored PCR-metode. 3'-
20 primerene hybridiserte til C-regionene og 5'-primerene hybridiserte til G-haler bundet til cDNA ved anvendelse av terminal deoksytransferase. PCR-fragmentene ble klonet inn i en pCRII-vektor (Invitrogen). Mange uavhengige kloner for hver kjede ble sekvensert og sammenlignet. En sekvens representert ved majoriteten av de uavhengige klonene ble plukket. Den translaterte aminosyresekvensen ble deretter analysert for å bekrefte at den
25 valgte sekvensen hadde egenskapene av typisk mus lett eller tung kjede V-region og tilhørte en spesifikk subtype. De komplementaritetsbestemmende regionene (CDR'ene) ble deretter identifisert ved å sammenligne de translaterte aminosyresekvensene med konsensussekvens av hver subtype. Navnet og sekvensen for hver primer anvendt er listet opp i Tabellene 2 og 3 ovenfor. De deduserte aminosyresekvensene av de lette og tunge
30 kjede V-regionene av 15A7, 43B6 og 9F9 (SEKV ID NR: 19-24) er vist i oppsummeringen.

Kimære antistoffer

For å fremstille vektorer for ekspresjon av kimære antistoffer, ble cDNA'er som koder for V_L og V_H -regionene av 15A7, 43B6 og 9F9 amplifisert ved PCR ved anvendelse av primere for å inkludere 5'-signalpeptidsekvensen og 3' splice donor-signalet. Primerene innførte også *XbaI*-seter ved begge endene av PCR-produktene, som deretter ble kløvyet med *XbaI*-enzym og ligert inn i *XbaI*-kløvyet pVk, pVgl, pVg2 eller pVg4-vektor.

Nærmere bestemt ble V_L region cDNA'ene av 15A7, 43B6 og 9F9 subklonet inn i plasmidet pVk. Dette plasmidet inneholdt en CMV-promoter og en sekvens som koder for den humane lett kjede konstante regionen. V_H -region cDNA'ene av 15A7, 43B6 og 9F9 ble subklonet inn i plasmidene pVgl, pVg2 eller pVg4. Hver av de tre plasmidene hadde en CMV-promoter. De inneholdt også, henholdsvis, de humane tung kjede konstante regionene av IgG1, IgG2 og IgG4.

Hver av de ovenfor beskrevne lett kjede-kodende plasmidene ble kotransfektet med en tung kjede-kodende plasmid inn i COS-7-celler. Supernatantene av de transfektete cellene ble oppsamlet. Kimære antistoffer i supernatantene ble analysert for evne til å binde til human CD162 og til å indusere apoptose av aktiverte T-celler.

Det ble funnet at alle kimære antistoffer fremstilt fra 15A7, 43B6 og 9F9 ble bundet til Sp2/0 transfektanter som stabilt uttrykker human CD162, men ikke til parentale Sp2/0-celler, hvilket indikerer at de beholdt den human CD162-bindende evne spesifisiteten. Videre ble det funnet at de kimære antistoffene induserte apoptose i T-celler som hadde blitt aktivert i 7 dager, hvilket indikerer at de i tillegg beholdt denne funksjonen fra deres mus-motstykker.

Humaniserte antistoffer

Mus 15A7 ble anvendt for å fremstille humaniserte antistoffer ved å binde ("grafting") dens CDR'er til en human struktur ("framework"). For å beholde bindingsaffinitet og spesifisitet, er det nødvendig å bevare V region-konformasjonen ved binding av CDR'ene til den humane strukturen ("framework"). For å selektere en egnet struktur ("framework")-donor, ble aminosyresekvensene av mus 15A7 lett og tung kjede V-regioner sammenlignet med de fra 50 museantistoffer som hadde blitt humanisert.

Det ble funnet at et museantistoff, mDREG-55, hadde høy sekvenshomologi med mus 15A7 V-region i både lette og tunge kjeder. Nedenfor er det listet opp en sekvenssammenstilling av mus 15A7 mot dette mDREG-55-antistoffet (CDR'er er markert):

Lett kjede sammenstilling:

	mDREG-55	DIVLTQSPASLSVSLGERASISCKASQSDY-DGDSYMNWYQKPGQPPKLLIYAASNLES DI++TQ+P SL VSLG++ASISC++SQS+ + DG++Y WY QKPGQ PKLLIY SN S
5	m15A7	DILMTQTPLSLPVSLGDAQASISCRSSQSIHNDGNTYFEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFS
	mDREG-55	GIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNEDPWTFGGGTKLEIK G+P RFSGSGSGT FTLNI VE ED YYC Q + P TF GGTKLE+K
	m15A7	GVPDRFSGSGSGTHFTLNISRVEAEDLGIYYCFQGSYVPLTFGAGTKLELK
10	Tung kjede sammenstilling:	
	MDREG-55	EVKLVEGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMSWVRQTPEKRLEWVASISTGGST-YYPDSVKG +V+LVESGGGLV+PGGS KLSCAASGFTFS++ M WVRQ PEK LEWVA I+ G ST +Y ++VKG
	m15A7	DVQLVEGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSSFGMHWRQAPEKLEWVAYINGGSSTIFYANAVKG
15	MDREG-55	RFTISRDNARNILYLQMSLSRSEDAMYYCAR--DY-DGYFDYWGQGTTLTVSS RFTISRDN +N L+LQM+ LRSEDAMYYC R Y G DYWGQGT++TVSS
	m15A7	RFTISRDNPKNTLFLQMTILRSEDAMYYCGRYASGGGAMDYWGQGTSVTVSS

Mus DREG-55 er et monoklonalt IgG1-antistoff mot L-selektin. Sekvensene av
 20 mus 15A7 V_L og V_H -regionene var henholdsvis 64,3% (struktur ("framework") kun:
 73,8%) og 70% (struktur ("framework") kun: 81,6%) homologe med de av mus DREG55.
 Humanisert DREG-55(HuDREG-55) hadde blitt konstruert ved anvendelse av struktur
 ("framework")-sekvenser av V_L og V_H -regioner fra et humant antistoff Gal. Derfor, for å
 humanisere mus 15A7, ble struktur ("framework")-sekvensene av human Gal lette og
 25 tunge kjeder anvendt for å erstatte motstykkene av mus 15A7.

De humaniserte 15A7 lette og tunge variable regionene ble hver satt sammen ved 4
 par av syntetiske oligonukleotider (~ 80 baser i lengde). Oligonukleotidene av hvert par ble
 overlappet ved ca. 20 nukleotider. Nukleotidsekvensene ble selektert og syntetisert til å
 kode for proteinsekvensene av de humaniserte variable regionene omfattende
 30 signalpeptider. Sammensettingen og amplifiseringen av genene ble utført i fire trinn: (1) de
 fire parene av komplementære oligonukleotider ble hybridisert og forlenget med Klenow-
 fragment i 4 separate reaksjoner; (2) de resulterende 4 dsDNA-fragmentene ble blandet
 parvis, denaturert, underlagt rehybridisering og forlenget i to separate reaksjoner; (3) de
 resulterende to dsDNA-fragmentene ble blandet, denaturert, underlagt rehybridisering og
 35 forlenget for å frembringe den endelige fullengde dsDNA; og (4) det resulterende DNA ble
 amplifisert ved PCR

med primere for å innføre et *XbaI*-sete ved begge endene. PCR-fragmentet ble deretter kuttet med *XbaI* og insertert inn i de respektive *XbaI*-kløyvede pVκ og pVg4-vektorene. Deretter, ved posisjoner hvor interaksjonene mellom CDR og strukturen ("framework") ble ansett som viktig, ble Gal's restene endret tilbake til de fra mus 15A7 (dvs. I62V og

5 D74H). Nedenfor er det listet opp sammenstillinger av mus 15A7 og humanisert 15A7 (Hu15A7) mot mDREG-55, hvor V62 og H74 er understreket.

Lett kjede sammenstilling:

10 hDREG-55 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASQSVDY-DGDSYMNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLES
 mus 15A7 DILMTQTPLSLPLVSLGDQASISCRSSQSIVHNDGNTYFEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFS
 Hu15A7 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRSSQSIVHNDGNTYFEWYQQKPGKAPKLLIYKVSNRFS

15 hDREG-55 GIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQSNEDPWTFGQGTKVEIK
 m15A7 GVPDRFSGSGSGTHFTLNISRVEAEDLGIYYCFQGSYVPLTFGAGTKLELK
 Hu15A7 GVPSRFSGSGSGTHFTLTISSLPEDFATYYCFQGSYVPLTFGQGTKVEIK

Tung kjede sammenstilling:

20 hDREG-55 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWVRQAPGKGLEWVASISTGGST-YYPDSVKG
 m15A7 DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSAASGFTFSSFGMHWVRQAPEKGLEWVAYINGGSSTIFYANAVKG
 Hu15A7 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVAYINGGSSTIFYANAVKG

25 hDREG-55 RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR--DY-DGYFDYWGQGTILVTVSS
 m15A7 RFTISRDNPKNTLFLQMTILRSEDTAIYYCGRYASYGGGAMDYWGQGTISVTVSS
 Hu15A7 RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYASYGGGAMDYWGQGTILVTVSS

Plasmider oppnådd på denne måten kodet for humaniserte 15A7 tunge og lette kjeder. Disse plasmidene ble deretter kotransfektet inn i COS-7-celler. De uttømte supernatantene fra dyrkede celler ble deretter oppsamlet. Humanisert 15A7 i supernatantene ble testet for dets evne til å binde til CHO-transfektanter som stabilt

30 uttrykker hCD162 og til å indusere apoptose i T-celle aktivert i 7 dager. Resultatene viser at det beholder disse evnene.

Fremstilling av kimære og humaniserte antistoffer

Celler som produserer humaniserte og kimære antistoffer ble fremstilt. Nærmere bestemt ble Sp2/0-celler (Sp2/0-Ag14; ATCC CRL 1581) stabilt transfektet med de

35 passende plasmidene ved elektroporering ved anvendelse av et Gene Pulser apparat (Bio-Rad Laboratories) ved 360 V og 25 µF kapasitans i henhold til produsentens instruksjoner. Før transfeksjon ble plasmidene linearisert ved kløyving med *BamHI*-enzym. Alle transfeksjoner ble utført ved anvendelse av 10⁷ celler i PBS og 20 µg hver av

plasmid-DNA. Cellene fra hver transfeksjon ble platet ut i 96-brønners vevskulturplater. Etter 48 timer ble et selektivt medium (DMEM 10% FBS/hypoxantin/tymidin media supplement) og 1µg/ml mykofenolsyre applisert. Antistoffproduserende celler ble screenet og isolert ved undersøkelse av tilstedeværelsen av antistoff i kultursupernatanten ved

5 ELISA.

Isolerte celler ble dyrket i serumfritt eller lavt-Ig medium og de kultiverte supernatantene ble oppsamlet. Antistoffer ble rensset ved passasje over en kolonne av stafylokokk protein A-Sepharose CL-4B. Etter vasking 5 ganger hver med vaskebuffer I (0,05% Triton X-100, 50mM Tris-HCl, pH 8,5, 400 mM NaCl, 1 mM CaCl₂ og 1 mg/ml
10 OVA) og vaskebuffer II (0,05% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, pH 8,5 og 150 mM NaCl), ble de bundne antistoffene eluert med en elueringsbuffer inneholdende 0,1 M glysin-HCl, pH 2,7 og nøytralisert med 1 M Tris-HCl, pH 8,6.

Affinitetsmålinger

15 Bindingsaffiniteter av de ovenfor beskrevne mus, kimære og humaniserte 15A7-antistoffene ble bestemt ved kompetitiv binding.

Mus 15A7 ble biotinyllert ved et EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin system (Pierce Biotechnology, Kat. nr. 21217). I korthet ble 0,5 mg ($3,3 \times 10^{-6}$ nmol) mus 15A7 oppløst i 187 µl PBS og blandet med $6,8 \times 10^{-5}$ nmol av Sulfo-NHS-biotin. Blandingen ble deretter inkubert på is i 2 timer før frie biotiner ble fjernet ved dialysering ved 4°C over natten mot
20 PBS. Det Biotin-merkede mus 15A7 oppnådd på denne måten ble lagret ved 4°C inntil anvendelse.

Sp2/0-transfektanter som stabilt uttrykker human CD162 ble anvendt som kilde for humant CD162-antigen. Biotin-merket mus 15A7 ble anvendt som tracer. Økende mengder av konkurrerende antistoffer (mus, kimær eller humanisert 15A7) ble blandet med 35 ng
25 Biotin-merket mus 15A7 og inkubert med 1×10^5 CD162-uttrykkende Sp2/0-celler i 1,5 time ved 4°C med konstant risting. Etter vasking ble sekundært antistoff, Streptavidin-PE (Becton Dickinson Immunocytometry System Inc. Kat. nr. 349023) tilsatt til blandingen. Etter inkubering i 45 minutter ved 4°C, ble cellene vasket igjen, resuspendert i 300 µl PBS-1% av FBS og underlagt FACS-analyse.

30

Det ble funnet at den halvt maksimale konkurrerende konsentrasjonen av mus 15A7 var 3,72 µg/ml mens de for kimær og humanisert 15A7 var ca. 5,71 µg/ml og 4,51 µg/ml, henholdsvis. Disse resultatene indikerer at affinitetene av mus, kimær og humanisert 15A7 er komparable. Med andre ord er bindingsaffiniteten (K_a) for mus 15A7 4,03 x 10⁷ M⁻¹ mens de for kimær og humanisert 15A7 er 2,62 x 10⁷ M⁻¹ og 3,33 x 10⁷ M⁻¹, henholdsvis.

Konkurransforsøk

Konkurransforsøk ble utført for å undersøke interaksjon mellom de ovenfor beskrevne tre mus antistoffene, PSGL-1 og P-selektin.

10 P-selektin er en viktig høy-affinitets ligand for PSGL-1 på de fleste leukocytter. For å undersøke hvorvidt de tre antistoffene forhindrer binding av P-selektin til PSGL-1, ble binding av rensset human P-selektin til aktiverte T-celler målt i nærvær av de tre antistoffene. KPL-1, kjent for å blokkere interaksjon av P-selektin og PSGL-1, ble anvendt som en positiv kontroll.

15 Human PBMC ble aktivert med 1 % PHA i 2 dager og opprettholdt i IL-2-inneholdende medium i 3 dager. Cellene ble inkubert med titrert 9F9, 15A7, 43B6, KPL-1 (en PSGL-1 antagonist) eller et kontroll-antistoff (9E10) i 30 minutter, etterfulgt av tilsetning av rekombinant human P-selektin (1,25 µg/ml). Binding av P-selektin til aktiverte T-celler ble målt ved anti-P-selektin-FITC analysert på FACS.

20 I overensstemmelse med tidligere redegjørelser, opphevet KPL-1 nesten fullstendig P-selektin's binding for å aktivere T-celler ved en lav konsentrasjon (0,31 µg/ml). 43B6 blokkerte binding av P-selektin til aktiverte T-celler like effektivt som KPL-1, mens en høyere konsentrasjon av 9F9 var nødvendig for å oppnå samme effekt. Faktisk var 0,08 µg/ml KPL eller 43B6 nødvendig for å oppheve 50% av bindingen. I motsetning til dette 25 var 5 µg/ml 9F9 nødvendig. Videre hadde ikke 15A7 noen inhibitorisk effekt på P-selektin-binding selv ved 20 µg/ml. Overraskende forbedret den binding av P-selektin til PSGL-1. Disse resultatene indikerer at 15A7 og P-selektin binder til forskjellige motiver av PSGL-1 på aktiverte T-celler.

30 Det faktum at 15A7 ikke konkurrerte med P-selektin om PSGL-1 indikerer at in vivo administrering av 15A7 ikke antas å påvirke innat immunitet ved å interferere med P-selektin-avhengig rekruttering av leukocytter.

Det har blitt angitt at PSGL-1 uttrykkes ved lave nivåer i blodplater. Virkningene av 15A7-antistoffer på blodplater ble undersøkt. Det ble funnet at antistoffene ikke økte eller hemmet aggregering av humane blodplater.

EKSEMPEL 3: Monoklonalt hamster antistoff TAB4 mot mus PSGL-1

5 Et monoklonalt antistoff mot mus PSGL-1, TAB4, ble fremstilt på en måte lik metoden beskrevet i Eksempel 1. Det induserte T-celle apoptose in vitro og depleterte T-celler in vivo. For å bestemme om det interfererte med binding mellom mus PSGL-1 og mus P-selektin, ble konkurranseforsøk utført på en måte lik metoden beskrevet i Eksempel 2. Det ble funnet at TAB4 ikke hemmet mus P-selektin-binding til mus PSGL-1 selv ikke
10 ved en konsentrasjon så høy som 20 µg/ml.

EKSEMPEL 4: Mus monoklonale antistoffer 4B7, 5C4, 12E7,14B3, 17E5 og 18D12

Ytterligere monoklonale antistoffer mot human PSGL-1, 4B7, 5C4, 12E7, 14133, 17E5 og 18D12, ble karakterisert. Ved binding til en aktivert T-celle, induserte de alle død
15 av de aktiverte T-cellene. Konkurranseforsøk ble utført på den måten som er beskrevet i Eksempel 2 for å bestemme om de blokkerte interaksjonen mellom PSGL-1 og P-selektin. Det ble funnet at disse antistoffene har liten, om noen, hemmende effekt på human P-selektin binding til human PSGL-1, selv ved den høyeste konsentrasjonen testet (5 µg/ml).

Patentkrav

1. Antistoff som spesifikt bindes til human P-selektin glykoprotein ligand 1 uten å interferere med bindingen mellom P-selektin glykoprotein ligand 1 og P-Selektin, idet
5 antistoffet, ved binding til P-selektin glykoprotein ligand 1 på en aktivert T-celle, induserer død av den aktiverte T-cellen og hvor antistoffet omfatter en første immunoglobulinkjede, som er en lettkjede, som inneholder SEKV ID NR: 1-3 og en andre kjede, som er en tungkjede, som inneholder SEKV ID NR: 4-6.
- 10 2. Antistoff ifølge krav 1, idet den lette kjeden og den tunge kjeden inneholder, henholdsvis SEKV ID NR: 19 og 20, eller 25 og 26.
3. Antistoff ifølge krav 2, idet den lette kjeden og den tunge kjeden inneholder, henholdsvis SEKV ID NR: 25 og 26.
- 15 4. Antistoff som bindes spesifikt til human P-selektin glykoprotein ligand 1 uten interferering med bindingen mellom P-selektin glykoprotein ligand 1 og P-Selektin, idet antistoffet, ved binding til P-selektin glykoprotein ligand 1 på en aktivert T-celle induserer død av den aktiverte T-cellen og hvor antistoffet bindes spesifikt til aminosyreresidene
20 115-126 av human P-selektin glykoprotein ligand 1.
5. Antistoff ifølge krav 4, idet antistoffet bindes spesifikt til aminosyreresidene 117-123.
6. Antistoff ifølge krav 5, idet antistoffet bindes spesifikt til aminosyreresidene 119-121.
- 25 7. Antistoff ifølge krav 4, idet antistoffet inkluderer en lettkjede og en tungkjede inneholdende, henholdsvis SEKV ID NR: 1-3 og SEKV ID NR: 4-6.
8. Anvendelse av en effektiv mengde av et antistoff ifølge et hvilket som helst av de
30 foregående kravene ved fremstilling av et medikament for modulering av en T-celle-mediert immunrespons i et individ som har eller har risiko for å ha en tilstand relatert til en omfattende celle-mediert immunrespons, idet tilstanden er en inflammatorisk sykdom, en

autoimmun sykdom, en allergisk sykdom eller en T-cellecancer.

5 9. Anvendelse av en effektiv mengde av et antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7 for fremstillingen av et medikament for behandling eller forebygging av allogen eller xenogen transplantatavstøtning.

10. Antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7, idet antistoffet er et kimært antistoff.

10 11. Antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7, idet antistoffet er et humanisert antistoff.

12. Antistoff ifølge krav 3, idet antistoffet omfatter en tungkjede konstant region av humant IgG1.

15

13. Antistoff ifølge krav 3, idet antistoffet omfatter en tungkjede konstant region av humant IgG2.

14. Antistoff ifølge krav 3, idet antistoffet omfatter en tungkjede konstant region av humant IgG4.

20

15. Isolert antistoff ifølge krav 1, idet antistoffet omfatter (i) en lettjede omfattende en variabel region som har aminosyresekvensen ifølge SEKV ID NR: 25 koblet til en human kappa lettjede konstant region, og (ii) en tungkjede omfattende en variabel region som har aminosyresekvensen ifølge SEKV ID NR: 26 koblet til en human IgG4 tungkjede konstant region.

25

16. Sammensetning omfattende et antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7 eller 10 til 15.

30

17. Antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7 eller 10 til 15 for anvendelse for modulering av en T-celle-mediert immunrespons i et individ som har eller har risiko for å ha en tilstand relatert til en omfattende cellemediert immunrespons, idet tilstanden er en

inflammatorisk sykdom, en autoimmun sykdom, en allergisk sykdom eller en T-cellecancer.

- 5 18. Antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7 eller 10 til 15, for anvendelse for behandling eller forebygging av allogen eller xenogen transplantatavstøtning.

A0871 70002W000ST25

SEQUENCE LISTING

<110> AbGenomics Corporation

<120> ANTIBODIES

<130> 13062-011W01

<140> PCT/US2005/016357

<141> 2005-05-10

<150> US 60/569,892

<151> 2004-05-10

<160> 100

<170> FastSEQ for windows Version 4.0

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Asn Asp Gly Asn Thr Tyr Phe Glu
1 5 10 15

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Phe Gln Gly Ser Tyr Val Pro Leu Thr
1 5

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Ser Phe Gly Met His
1 5

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Tyr Ile Asn Gly Gly Ser Ser Thr Ile Phe Tyr Ala Asn Ala Val Lys
1 5 10 15

A0871 70002W000ST25

Gly

<210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 6
 Tyr Ala Ser Tyr Gly Gly Gly Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 7
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 7
 Arg Ala Ser Ser Thr Val Asn Ser Thr Tyr Leu His
 1 5 10

<210> 8
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 8
 Gly Ser Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5

<210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 9
 Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 10
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 10
 Ala Tyr Tyr Ile His
 1 5

<210> 11
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 11
 Val Asn Pro Asn Thr Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Pro Lys Phe Lys Gly
 1 5 10 15

<210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

A0871 70002W000ST25

<400> 12

Ser Gly Ser Pro Tyr Tyr Arg Tyr Asp Asp
1 5 10

<210> 13

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 13

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Asn Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 14

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 15

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 16

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 16

Thr Asn Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
1 5 10 15

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 17

Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp
1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 18

Gly Gly Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5

<210> 19

<211> 131

A0871 70002W000ST25

<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 19

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

<210> 20
<211> 139
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 20

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

<210> 21
<211> 130
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 21

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

A0871 70002W000ST25

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

<210> 22
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

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

<210> 23
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 23
 Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
 1 5 10 15
 Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30
 Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile
 35 40 45
 Val Asn Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 50 55 60
 Gly Gln Ser Pro Lys Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110
 Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 115 120 125
 Glu Ile Lys
 130

<210> 24
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 24
 Met Leu Leu Gly Leu Lys Trp Val Phe Phe Val Val Phe Tyr Gln Gly
 1 5 10 15

A0871 70002W000ST25

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

<210> 25
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> synthetically generated peptide

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

<210> 26
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> synthetically generated peptide

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

A0871 70002W000ST25

<210> 27
<211> 393
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(393)

<400> 27
atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct gct 48
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
1 5 10 15
tcc agc agt gat att ttg atg acc caa act cca ctg tcc ctg cct gtc 96
Ser Ser Ser Asp Ile Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
20 25 30
agt ctt gga gat caa gcc tca ata tct tgc aga tct agt cag agc att 144
Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile
35 40 45
gta cat aat gat gga aac acc tat ttt gaa tgg tac ctg cag aaa cca 192
Val His Asn Asp Gly Asn Thr Tyr Phe Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
50 55 60
ggc cag tct cca aaa ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aat cga ttt tct 240
Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
65 70 75 80
ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca cat ttc aca 288
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr His Phe Thr
85 90 95
ctc aac atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga att tat tac tgc 336
Leu Asn Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys
100 105 110
ttt caa ggt tca tat gtt cct ctc acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg 384
Phe Gln Gly Ser Tyr Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu
115 120 125
gag ctg aaa 393
Glu Leu Lys
130

<210> 28
<211> 417
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(417)

<400> 28
atg gac tcc agg ctc aat tta gtt ttc ctt gtc ctt att tta aaa ggt 48
Met Asp Ser Arg Leu Asn Leu Val Phe Leu Val Leu Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15
gtc cag tgt gat gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc tta gtg cag 96
Val Gln Cys Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30
cct gga ggg tcc cgg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc 144

A0871 70002w000ST25

Pro Gly Gly Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

agt agc ttt gga atg cac tgg gtt cgt cag gct cca gag aag ggg ctg 192
 Ser Ser Phe Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu
 50 55 60

gag tgg gtc gca tac att aat ggt ggc agt agt acc atc ttc tat gca 240
 Glu Trp Val Ala Tyr Ile Asn Gly Gly Ser Ser Thr Ile Phe Tyr Ala
 65 70 75 80

aac gca gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat ccc aag aat 288
 Asn Ala Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn
 85 90 95

acc ctg ttc ctg caa atg acc att cta agg tct gag gac acg gcc att 336
 Thr Leu Phe Leu Gln Met Thr Ile Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile
 100 105 110

tat tac tgt gga agg tat gct agt tac gga ggg ggt gct atg gac tat 384
 Tyr Tyr Cys Gly Arg Tyr Ala Ser Tyr Gly Gly Gly Ala Met Asp Tyr
 115 120 125

tgg ggt caa gga acc tca gtc acc gtc tcc tca 417
 Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 29
 <211> 390
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(390)

<400> 29
 atg gat ttt ctg gtg cag att ttc agc ttc ttg cta atc agt gcc tca 48
 Met Asp Phe Leu Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
 1 5 10 15

gtt gca atg tcc aga gga gaa aat gtg ctc acc cag tct cca gca atc 96
 Val Ala Met Ser Arg Gly Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
 20 25 30

atg tct gca tct cca ggg gaa aag gtc acc atg acc tgc agg gcc agc 144
 Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45

tca act gta aat tcc act tac ttg cac tgg ttc cag cag aag tca ggt 192
 Ser Thr Val Asn Ser Thr Tyr Leu His Trp Phe Gln Gln Lys Ser Gly
 50 55 60

gcc tcc ccc aaa ctc tgg att tat ggc tca tcc aac ttg gct tct gga 240
 Ala Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Gly Ser Ser Asn Leu Ala Ser Gly
 65 70 75 80

gtc cct gct cgc ttc agt ggc agt ggg tct ggg acc tct tac tct ctc 288
 Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu
 85 90 95

aca atc agc agt gtg gag gct gaa gat gct gcc act tat tac tgc cag 336
 Thr Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 100 105 110

cag tac agt ggt tac cca ctc acg ttc ggt gct ggg acc acg ctg gag 384
 Gln Tyr Ser Gly Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Thr Leu Glu

A0871 70002wo00ST25
120 125

115

ctg aaa 390
Leu Lys
130

<210> 30
<211> 414
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(414)

<400> 30
atg gaa tgg agc tgg gtc ttt ctc ttc ctc ctg tca gtc act aca ggt 48
Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Thr Gly
1 5 10 15

gtc cac tct gag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gac ctg gtg aag 96
Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys
20 25 30

cct ggg gct tta gtg aag ata tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc 144
Pro Gly Ala Leu Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
35 40 45

act gcc tac tac att cac tgg gtg aag cag agc cat gga aag agc ctt 192
Thr Ala Tyr Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu
50 55 60

gag tgg att gga cgt gtt aat cct aat act ggt ggt act agc tac aac 240
Glu Trp Ile Gly Arg Val Asn Pro Asn Thr Gly Gly Thr Ser Tyr Asn
65 70 75 80

ccg aag ttc aag ggc aag gcc ata tta aat gta gat aag tca tcc agc 288
Pro Lys Phe Lys Gly Lys Ala Ile Leu Asn Val Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

aca gcc tac atg gag ctc cgc agc ctg aca tct gag gac tct gcg gtc 336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

tat tac tgt gca aga tcg gga tcc ccc tac tat agg tac gac gac tgg 384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Ser Pro Tyr Tyr Arg Tyr Asp Asp Trp
115 120 125

ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc tca 414
Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 31
<211> 393
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(393)

<400> 31
atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct gct 48
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
1 5 10 15

A0871 70002wo00st25

tcc agc agt gat gtt ttg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc	96
Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val	
	20 25 30
agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc att	144
Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile	
	35 40 45
gta aat agt aat gga aac acc tat tta gaa tgg tac ctg cag aaa cca	192
Val Asn Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro	
	50 55 60
ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct	240
Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser	
	65 70 75 80
ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca	288
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr	
	85 90 95
ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat tac tgc	336
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys	
	100 105 110
ttt caa ggt tca cat gtt ccg tgg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg	384
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu	
	115 120 125
gaa atc aaa	393
Glu Ile Lys	
	130
<210> 32	
<211> 417	
<212> DNA	
<213> Mus musculus	
<220>	
<221> CDS	
<222> (1)...(417)	
<400> 32	
atg ctg ttg ggg ctg aag tgg gtt ttc ttt gtt gtt ttt tat caa ggt	48
Met Leu Leu Gly Leu Lys Trp Val Phe Phe Val Val Phe Tyr Gln Gly	
	1 5 10 15
gtg cat tgt gag gtg cag ctt gtt gag act ggt gga gga ttg gtg cag	96
Val His Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln	
	20 25 30
cct aaa ggg tca ttg aaa ctc tca tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc	144
Pro Lys Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe	
	35 40 45
aat acc aat gcc atg aac tgg gtc cgc cag gct cca gga aag ggt ttg	192
Asn Thr Asn Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu	
	50 55 60
gaa tgg gtt gct cgc ata aga agt aaa agt aat aat tat gca aca tat	240
Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr	
	65 70 75 80
tat gcc gat tca gtg aaa gac agg ttc acc atc tcc aga gat gat aca	288
Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Thr	
	85 90 95
caa agc atg atc tat ctg caa atg aac aac ttg aaa act gag gac aca	336

A0871 70002W000ST25

Gln Ser Met Ile Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr
100 105 110

ggc atg tat tac tgt gtg aga ggg gga agc tac tgg tac ttc gat gtc 384
Gly Met Tyr Tyr Cys Val Arg Gly Gly Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
115 120 125

tgg ggc gca ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 417
Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 33
<211> 111
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 33
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
20 25 30
Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45
Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80
Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95
Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 34
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

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

<210> 35
<211> 116
<212> PRT
<213> Mus musculus

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

A0871 70002wo00ST25

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

<210> 36
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

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

<210> 37
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 37
 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 Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
 20 25 30
 Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 35 40 45
 Lys Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 85 90 95
 Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 38
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 38
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30

A0871 70002w000ST25

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

<210> 39
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 39
 cccgggacca tatgcaggcc accgaatatg agtacc 36

<210> 40
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 40
 tatgagcata tggattatga tttcctgcca gaaacgg 37

<210> 41
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 41
 aaacggagca tatggaaatg ctgaggaaca gcactgacac c 41

<210> 42
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 42
 aacccctcat atgaccactg tggagcctgc tgcaaggcg 39

<210> 43
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 43
 gtggtcagat cttccatagc tgctgaatcc gtggacagg 39

A0871 70002W000ST25

<210> 44
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 44
 gttcctcaga tcttctggag gtcctcgttc tggcagg

37

<210> 45
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 45
 aggcccaaga tctggagtgg tgtcagtgct gttcctc

37

<210> 46
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 46
 ggctccagat ctgtagactc aggggttcca ggccc

35

<210> 47
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 47
 gtggtcagat ctgtgactgc cctcctgca tccaggcc

38

<210> 48
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 48
 gccagcagat cttgcttcac agagatgtgg tctgggg

37

<210> 49
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 49
 cgcgatcca tgcctctgca actcctcctg ttgc

34

<210> 50

A0871 70002W000ST25

<211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primer

 <400> 50
 gccagcctcg agcttcacag agatgtggtc tgggg 35

 <210> 51
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primer

 <400> 51
 ggtctgctcg agcatagctg ctgaatccgt ggacaggttc 40

 <210> 52
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primer

 <400> 52
 agacaggcca ccgaaggaa cctgtccacg 30

 <210> 53
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primer

 <400> 53
 cgtggacagg ttccttcgg tggcctgtct 30

 <210> 54
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primer

 <400> 54
 ccgctcgagc gccaaagatta ggatggc 27

 <210> 55
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primer

 <400> 55
 cgggatccac tcaaaccaca gccatgg 27

 <210> 56
 <211> 27
 <212> DNA

A0871 70002wo00st25

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 56

ccgctcgagt gtagtaggt tccatgg

27

<210> 57

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 57

cgggatcaac tcaaccaca ggcctg

26

<210> 58

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 58

ctgtgcctcg agggctgtgg ttgagtg

28

<210> 59

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 59

cgggatccat ggagatacag accactcaac

30

<210> 60

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 60

cgggatccga tgcaggaggg gcagtcac

28

<210> 61

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 61

ggccgtcact cgagttgtct gtcctc

27

<210> 62

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

A0871 70002W000ST25

<220>
 <223> Primer

 <400> 62
 tatggattca gcagctatgg agatacagac cactcaacca gca 43

 <210> 63
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primer

 <400> 63
 gatctgctgg ttgagtggtc tgtatctcca tagctgctga atcca 45

 <210> 64
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primer

 <400> 64
 tatggattca gcagctatgc ggatacagac cactcaacca gca 43

 <210> 65
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primer

 <400> 65
 gatctgctgg ttgagtggtc tgtatccgca tagctgctga atcca 45

 <210> 66
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primer

 <400> 66
 ctagtctaga tgacccaaac tccactctcc c 31

 <210> 67
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primer

 <400> 67
 ctagtctaga attaggaaag tgcacttagc atcagcccgt ttgatttcc 49

 <210> 68
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primer

A0871 70002W000ST25

<400> 68
 taacattcta gatgctgttg gggctgaagt ggg 33

<210> 69
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 69
 ggatagtcta gaggttgga ggactcacct gaggagacgg tgaccgtgg 49

<210> 70
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 70
 ctagtctaga tggagacaga cacactcctg ttatggg 37

<210> 71
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 71
 ctagtctaga attaggaaag tgcacttttt ccagcttggg cccccctcc 49

<210> 72
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 72
 ctagtctaga tggactccag gctcaattta gttttcc 37

<210> 73
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 73
 ctagtctaga ggttgagg actcacctga ggagacggtg actgaggttc c 51

<210> 74
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 74

A0871 70002w000ST25

ctagtctaga tggattttct ggtgcagatt ttcagc 36

<210> 75
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 75
 ctagtctaga attaggaaag tgcacttagc atcagcccgt ttcagctcc 49

<210> 76
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 76
 ctagtctaga tggaatggag ctgggtcttt ctc 33

<210> 77
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 77
 ctagtctaga ggttgtgagg actcaccagc ttccagtgga tagactgatg g 51

<210> 78
 <211> 65
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 78
 tctatctaga tgaacttcgg gtccagcttg attttccttg tccttgtttt aaaaggtgtc 60
 cagtg 65

<210> 79
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 79
 ccttgtttta aaaggtgtcc agtgtgaagt gcaactggtg gagtctgggg gaggcttagt 60
 gcagcctgg 69

<210> 80
 <211> 65
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 80

A0871 70002wo00ST25

ctgaaagtga atccagaggc tgcacaggag agtctcaagc ttcctccagg ctgcactaag 60
cctcc 65

<210> 81
<211> 69
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 81
gcctctggat tcactttcag tagctttgga atgcactggg ttcgccaggc tccagggag 60
ggactcgag 69

<210> 82
<211> 66
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 82
gcatagaaga tggactact gccaccatta atgtatgcga cccactcgag tcccttcct 60
ggagcc 66

<210> 83
<211> 62
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 83
gtagtaccat cttctatgca aacgcagtga agggccgatt caccatctcc agagataatg 60
cc 62

<210> 84
<211> 63
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 84
cctcagccct cagagaattc atttgcaggt acaggggtgtt cttggcatta tctctggaga 60
tgg 63

<210> 85
<211> 63
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 85
gaattctctg agggctgagg acacggccgt gtattactgt gcaagatatg ctagttacgg 60
agg 63

<210> 86
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial sequence

A0871 70002W000ST25

<220>

<223> Primer

<400> 86

ctgtgaccag ggtgccttgg cccaatagt ccatagcacc cctccgtaa ctagcatatc 60

<210> 87

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 87

accctctaga ggttgtgagg actcacctga ggagactgtg accagggtgc cttggcc 57

<210> 88

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 88

tctatctaga tggagacaga cacaatcctg ctatgggtgc tgctgctctg ggttccaggc 60

<210> 89

<211> 61

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 89

gctgctctgg gttccaggct cactgggtga cattcagatg acccaatctc cgagctcttt 60
g 61

<210> 90

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 90

gatctgcagg tgatagtgac cctatcccct acagacgcag acaagagct cggagattgg 60

<210> 91

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 91

cactatcacc tgcagatcta gtcagagcat tgtacataat gatggaaca cctattttga 60
atg 63

<210> 92

<211> 59

A0871 70002W000ST25

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 92
gatgagaagc ttgggtgcct ttcttggttt ctggtgttac cattcaaaat aggtgtttc 59

<210> 93
<211> 66
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 93
gcaccaagc ttctcatcta taaagtttcc aatcgatttt ctggtgtccc atccaggttt 60
agtggc 66

<210> 94
<211> 61
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 94
gcagagaaga gatggtgagg gtgaagtgtg tcccagacct actgccacta aacctggatg 60
g 61

<210> 95
<211> 55
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 95
ctcaccatct cttctctgca gccggaggat ttcgcaacct attactgttt tcaag 55

<210> 96
<211> 57
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 96
ccttggtgcc ttgaccgaac gtgagaggaa catatgaacc ttgaaaacag taatagg 57

<210> 97
<211> 58
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 97
accctctaga attaggaaag tgcaacttac tttgatttcc accttggtgc cttgaccg 58

<210> 98
<211> 30

A0871 70002wo00ST25

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 98
tatatctaga attccccccc ccccccccc 30

<210> 99
<211> 46
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 99
tatagagctc aagcttggat ggtgggaaga tggatacagt tgggtc 46

<210> 100
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<220>
<221> misc_feature
<222> 30
<223> n = c, a or t

<220>
<221> misc_feature
<222> 38
<223> n = c or g

<220>
<221> misc_feature
<222> 42
<223> N = c or t

<400> 100
tatagagctc aagcttccag tggatagacn gatggggntg tngttttggc 50