

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ



(19) **BG**

ОПИСАНИЕ КЪМ ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

(11) **66270 B1**

(51) **Int.Cl.**

C 07 K 14/52 (2006.01)

C 07 K 14/525 (2006.01)

C 12 N 15/28 (2006.01)

A 61 K 38/19 (2006.01)

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Заявителски № 108349
(22) Заявено на 12.11.2003
(24) Начало на действие
на патента от: 13.05.2002

Приоритетни данни

(31) 290196 (32) 11.05.2001 (33) US

(41) Публикувана заявка в
бюлетин № 11 на 30.11.2004

(45) Отпечатано на 30.11.2012

(46) Публикувано в бюлетин № 11
на 30.11.2012

(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег. №

(73) Патентоприитежател(и):
**AMGEN INC., 91320 THOUSAND OAKS,
ONE AMGEN CENTER DRIVE,
CALIFORNIA (US)**

(72) Изобретател(и):
**Hosung Min,
91320 Newbury Park
Hailing Hsu
93021 Moorpark, California (US)**

(74) Представител по индустриална
собственост:
**Виолета Върбанова Шентова,
1606 София, ул. "Дамян Груев" 11**

(86) № и дата на РСТ заявка:
PCT/US2002015273, 13.05.2002

(87) № и дата на РСТ публикация:
WO2002/092620, 21.11.2002

(54) СЪСТАВИ, СЪДЪРЖАЩИ ПЕПТИДИ И СРОДНИ МОЛЕКУЛИ, КОИТО СЕ СВЪРЗВАТ С TALL-1

(57) Настоящото изобретение се отнася до терапевтични агенти, които модулират активността на TALL-1. Примерни молекули съдържат последователност с формули

$b^1b^2b^3Cb^5b^6Db^8Lb^{10}b^{11}b^{12}b^{13}b^{14}Cb^{16}b^{17}b^{18}$ (SEQ ID № 104)

$d^1d^2d^3Cd^5d^6d^7WDd^{10}Ld^{13}d^{14}Cd^{16}d^{17}d^{18}$ (SEQ ID № 106)

$f^1f^2Kf^3Df^4Lf^5Qf^6f^7f^8f^9f^{10}f^{11}f^{12}f^{13}f^{14}$ (SEQ ID № 109),

в които заместителите са както е дефинирано в описанието. Изобретението се отнася и до състав с формула

$(X^1)_a-V^1-(X^2)_b$,

в която V^1 е носител, ковалентно свързан към един или повече от горните TALL-1 модулиращи състави. Носителят и TALL-1 модулиращият състав могат да бъдат свързани през N- или C-края на TALL-1 модулиращата част. Предпочитаният носител е Fc домен и предпочитаният Fc домен е IgG Fc домен.

43 претенции, 16 фигури

BG 66270 B1

(54) СЪСТАВИ, СЪДЪРЖАЩИ ПЕПТИДИ И СРОДНИ МОЛЕКУЛИ, КОИТО СЕ СВЪРЗВАТ С TALL-1

Предшестващо състояние на техниката

След многогодишни изследвания на туморната некроза през 1984 г. бяха клонирани туморните некротични фактори (TNF) алфа и бета. През последвалите години беше засвидетелствана появата на суперсемејство от TNF цитокини, включващо fas лиганд (FasL), CD27 лиганд (CD27L), CD30 лиганд (CD30L), CD40 лиганд (CD40L), TNF-сроден лиганд, индуциращ апоптоза (TRAIL, означаван също като AGP-1), остеопротегерин свързващ протеин (OPG-BP или OPG лиганд), 4-1BB лиганд, LIGHT, APRIL и TALL-1. Smith et al. (1994), Cell 76: 959-962; Lacey et al. (1998), Cell 93: 165-176; Chichepotiche et al. (1997), J. Biol. Chem. 272: 32401-32410; Mauri et al. (1998), Immunity 8: 21-30; Hahne et al. (1998), J. Exp. Med. 188: 1185-90; Shu et al. (1999), J. Leukocyte Biology 65: 680-3. Това семејство се обединява от структурата си, поспециално в С-края. Освен това повечето известни до момента членове се експресират в имунни отделения, макар че някои членове се експресират също и в други тъкани или органи. Smith et al. (1994), Cell 76: 959-62. Всички членове лиганди, с изключение на LT-алфа, са трансмембранни протеини от тип II, характеризиращи се с консервативна област от 150 аминокиселини вътре в С-терминален извънклетъчен домен. Макар че се ограничава само до 20-25 % идентичност, консервативният домен от 150 аминокиселини се нагъва в характерен бета-листов сандвич и се тримеризира. Тази консервативна област може да бъде отцепена протеолитично, като така се генерира разтворима функционална форма. Banner et al. (1993), Cell 73: 431-445.

Много членове от това семејство лиганди се експресират в тъкани, богати на лимфни съдове, и играят важна роля в развитието и модулирането на имунната система. Smith et al. (1994). Например TNFалфа се синтезира главно от макрофаги и е важен медиатор на възпалителните ответни реакции и имунната защита. Tracey & Cerami (1994), Ann. Rev. Med. 45: 491-503. Fas-L, който преобладаващо се експресира

в активирана Т-клетка, модулира TCR-медирана апоптоза на тимоцити. Nagata, S. & Suda, T. (1995) Immunology Today 16: 39-43; Castrim et al. (1996), Immunity 5: 617-27. CD40L, който също се експресира от активирани Т клетки, осигурява съществен сигнал за оцеляването, пролиферацията и смяната на имуноглобулиновия изотип на В клетки. Noelle (1996), Immunity 4: 415-9.

Вече са идентифицирани сходните рецептори за повечето от членовете на семейството TNF лиганди. Тези рецептори споделят характерни, многобройни, богати на цистеини повторения вътре в извънклетъчните си домени и не притежават каталитични мотиви в цитоплазмените участъци. Smith et al. (1994). Рецепторите сигнализират чрез пряко взаимодействие с протеини от мъртвия домен (примерно TRADD, FADD и RIP) или с TRAF протеините (примерно TRAF2, TRAF3, TRAF5 и TRAF6), като задействат разклоняващи се и припокриващи се сигнални пътища, примерно апоптоза, NF-kB активиране или JNK активиране. Wallach et al. (1999), Annual Review of Immunology 17: 331-67. Тези сигнални събития водят до клетъчна смърт, пролиферация, активиране или диференциация. Профилът на експресия на всеки рецепторен член е различен. Например TNFR1 се експресира в широк спектър от тъкани и клетки, докато клетъчният повърхностен рецептор на OPGL е ограничен главно до остеокластите. Hsu et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 3540-5.

Голям брой изследователски групи идентифицираха напоследък лиганди от TNF семейството с еднаква или съществено сходна последователност. Лигандът беше наречен с различни имена: неутрокин алфа (WO 1998/018921, публикуван на 7 май 1998), 63954 (WO 1998/027114, публикуван на 25 юни 1998), TL5 (EP 869 180, публикуван на 7 октомври 1998), NTN-2 (WO 1998/055620 и WO 1998/055621, публикуван на 10 декември 1998), TNRL1-alpha (WO 1999/011791, публикуван на 11 март 1999), кау лиганд (WO 1999/012964, публикуван на 18 март 1999) и AGP-3 (US предварителни заявки съответно № № 60/119,906, подадена на 12 февруари 1999, и 60/166,271, подадена на 18 ноември 1999); и TALL-1 (WO 2000/068378, публикуван на 16 ноември 2000). Всеки от тези източници

се включва към настоящия текст чрез позоваването. Оттук нататък описаните там лиганди са наричани общо TALL-1.

TALL-1 е член на суперсемејството TNF лиганди, които са функционално ангажирани в оцеляването и пролиферацията на В клетки. При трансгенни мишки с хиперекспресия на TALL-1 е наблюдавана тежка В клетъчна хиперплазия и лупус-подобно аутоимунно заболяване. Khare et al. (2000) PNAS 97 (7): 3370-3375. И TACI, и BCMA служат като клетъчни повърхностни рецептори на TALL-1. Gross et al. (2000), Nature 404: 995-999; Ware (2000), J. Exp. Med. 192 (11): F35-F37; Ware (2000), Nature 404: 949-950; Xia et al. (2000), J. Exp. Med. 192 (1): 137-143; Yu et al. (2000), Nature Immunology 1 (3): 252-256; Marsters et al. (2000), Current Biology 10: 785-788; Hatzoglou et al. (2000) J. of Immunology 165: 1322-1330; Shu et al. (2000) PNAS 97 (16): 9156-9161; Thompson et al. (2000) J. Exp. Med. 192 (1): 129-135; Mukhopadhyay et al. (1999) J. Biol. Chem. 274 (23): 15978-81; Shu et al. (1999) J. Leukocyte Biol. 65: 680-683; Gruss et al. (1995) Blood 85 (12): 3378-3404; Smith et al. (1994), Cell 76: 959-962; US патент № 5,969,102, издаден на 19 октомври 1999; WO 2000/067034, публикуван на 9 ноември 2000; WO 2000/040716, публикуван на 13 юли 2000; WO 1999/035170, публикуван на 15 юли 1999. И двата рецептора се експресират върху В клетки и сигнализируют чрез взаимодействие с TRAF протеини. Освен това TACI и BCMA се присъединяват също така към друг член от семейството TNF лиганди - APRIL. Yu et al. (2000), Nature Immunology 1 (3): 252-256. За APRIL също е показано, че индуцира В-клетъчна пролиферация.

До момента не са открити рекомбинантни или модифицирани протеини, които си служат с пептидни модулатори на TALL-1. Рекомбинантните и модифицираните протеини са новопоявяващ се клас от терапевтични агенти. Полезни модификации на протеинови терапевтични агенти включват комбиниране с "Fc" домена на антитяло и свързване към полимери, като например полиетиленгликол (PEG) и декстран. Такива модификации са дискутирани подробно в заявка за патент, с наименование "Modified Peptides as Therapeutic Agents" (Модифицирани пептиди като терапевтични агенти), публикация WO 2000/024782, който източник се включва като част от

това описание чрез отпратката към неговата цялост.

Един доста по-различен подход към разработването на терапевтични агенти е посредством скрининг на пептидна библиотека. Взаимодействието на белтъчен лиганд с неговия рецептор често протича през относително обширна гранична повърхност. Обаче, както е показано за човешки растежен хормон и негов рецептор, за енергията на присъединяване допринасят главно само няколко ключови остатъка в граничната повърхност. Clackson et al. (1995), Science 267: 383-6. Преобладаващата част от белтъчния лиганд само експонира присъединителните епитопи в правилната топология или изпълнява функции, които не са свързани с присъединяването. Следователно, молекули със само "пептидна" дължина (2 до 40 аминокиселини) могат да се присъединят към рецепторния протеин на даден голям белтъчен лиганд. Такива пептиди могат да имитират биоактивността на голям белтъчен лиганд ("пептидни агонисти") или, чрез конкурентно присъединяване, да инхибират биоактивността на голям белтъчен лиганд ("пептидни антагонисти").

Библиотеки от пептиди за експониране на бактериофаги се наложили като мощен метод за идентифициране на такива пептидни агонисти и антагонисти. Виж например Scott et al. (1990), Science 249: 386; Devlin et al. (1990), Science 249: 404; US патент № 5,223,409, издаден на 29 юни 1993; US патент № 5,733,731, издаден на 31 март 1998; US патент № 5,498,530, издаден на 12 март 1996; US патент № 5,432,018, издаден на 11 юли 1995; US патент № 5,338,665, издаден на 16 август 1994; US патент № 5,922,545, издаден на 13 юли 1999; WO 1996/040987, публикуван на 19 декември 1996; и WO 1998/015833, публикуван на 16 април 1998 (всеки от които се включва тук чрез отпратката към неговата цялост). В такива библиотеки случайно генерирани пептидни последователности се индикират чрез сливане с протеини в обвивката на нишковиден бактериофаг. Обикновено индикираните пептиди са афинитетно елуирани срещу имобилизиран протеин - цел. Ангажираните бактериофаги могат да се обогатят чрез редуващи се цикли на афинитетно пречистване и ново размножаване. От най-добре присъединяващите се пептиди може да се направи последователност, която да идентифицира

ключови остатъци в рамките на едно или повече структурно сродни семейства от пептиди. Виж например Cwirla et al. (1997), *Science* 276: 1696-9, където са идентифицирани две обособени семейства. Пептидните последователности могат също да подсказват кои остатъци е безопасно да се заместят чрез аланин сканиране или чрез мутагенеза на ниво ДНК. За да се оптимизира по-нататък последователността от най-добрите присъединители, могат да се създадат и да се подложат на скрининг мутагенезисни библиотеки. Lowman (1997), *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26: 401-24.

Структурният анализ на взаимодействието протеин-протеин също може да се използва, за да подсказва кои пептиди имитират присъединителната активност на големи белтъчни лиганди. При такъв анализ кристалната структура може да подсказват идентичността и относителната ориентация на критични остатъци от големия белтъчен лиганд, от които може да се изгради пептид. Виж например Takasaki et al. (1997), *Nature Biotech.* 15: 1266-70. Тези аналитични методи могат да се използват и за да се изследва взаимодействието между рецепторен протеин и пептиди, подбрани чрез бактериофагово експониране, което може да подсказва по-нататъшна модификация на пептидите, за да се повиши афинитетът на присъединяване.

И други методи конкурират бактериофаговото експониране в пептидните изследвания. Пептидна библиотека може да се кондензирана към карбоксилния край на лас репресора и да се експресира в *E. coli*. Друг основаващ се на *E. coli* метод позволява експониране върху външната мембрана на клетката чрез сливане с липопротеин, асоцииран с пептидогликан (PAL). Оттук нататък тези и сродните им методи са наричани общо "Е. coli експониране". В друг метод транслацията на случайно подбрана РНК се преустановява преди освобождаването на рибозома, в резултат на което се получава библиотека от полипептиди, като асоциираните с тях РНД остават прикрепени към тях. Оттук нататък този и сродните му методи са наричани общо "рибозомно експониране".

Други методи използват пептиди, свързани към РНК; например PROфузийна технология, Phylos, Inc. Виж например Roberts & Szostak (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 12297-303.

Оттук нататък този и сродните му методи са наричани общо "РНК-пептиден скрининг". Разработени са получени по химически път пептидни библиотеки, в които пептиди са имобилизирани върху стабилен, небиологичен материал, примерно полиетиленови пръчки или пропускащи разтворител смоли. Друга получена по химически път пептидна библиотека използва фотолитография за сканиране на пептиди, имобилизирани върху предметни стъкла. Оттук нататък тези и сродните им методи са наричани общо "химическо-пептиден скрининг". Химическо-пептидният скрининг може да има предимство, поради това, че позволява използването на D-аминокиселини и други неприродни аналози, както и непептидни елементи. Както биологичните, така и химическите методи са разглеждани в Wells & Lowman (1992), *Curr. Opin. Biotechnol.* 3: 355-62. Концептуално, чрез използване на бактериофагово експониране, РНК-пептиден скрининг и другите гореспоменати методи е възможно да се открият пептидни имитации на произволен протеин.

Техническа същност на изобретението

Настоящото изобретение се отнася до терапевтични агенти, които модулират активността на TALL-1. Съгласно настоящото изобретение, модулатори на TALL-1 могат да съдържат аминокиселинна последователност Dz²Lz⁴ (SEQ ID №: 108), в която z² е аминокиселинен остатък и z⁴ е треонил или изолевцил. Такива модулатори на TALL-1 съдържат молекули със следните формули:

I (a)

a¹a²a³CDa⁶La⁸a⁹a¹⁰Ca¹²a¹³a¹⁴

(SEQ ID №: 100)

в която:

a¹, a², a³ независимо едно от друго липсват или са аминокиселинни остатъци;

a⁶ е аминокиселинен остатък;

a⁹ е основен или хидрофобен остатък;

a⁸ е треонил или изолевцил;

a¹² е полярно неутрален остатък; и

a¹³ и a¹⁴ независимо едно от друго липсват или са аминокиселинни остатъци.

I (b)

b¹b²b³Cb⁵b⁶Db⁸Lb¹⁰b¹¹b¹²b¹³b¹⁴Cb¹⁶b¹⁷b¹⁸

(SEQ ID № 104)

в която:
 b^1 и b^2 независимо едно от друго липсват
или са аминокиселинни остатъци;
 b^3 е киселинен или амиден остатък;
 b^5 е аминокиселинен остатък;
 b^6 е ароматен остатък;
 b^8 е аминокиселинен остатък;
 b^{10} е Т или I;
 b^{11} е основен остатък;
 b^{12} и b^{13} независимо едно от друго са ами-
нокиселинни остатъци;
 b^{14} е полярно неутрален остатък; и
 b^{11} е основен остатък;
 b^{12} и b^{13} независимо едно от друго са ами-
нокиселинни остатъци;
 b^{14} е неутрален хидрофобен остатък; и
 b^{16} , b^{17} и b^{18} независимо едно от друго лип-
сват или са аминокиселинни остатъци.
I (c)
 $c^1c^2c^3Cc^5Dc^7Lc^9c^{10}c^{11}c^{12}c^{13}c^{14}Cc^{16}c^{17}c^{18}$
(SEQ ID № 105)
в която:
 c^1 , c^2 и c^3 независимо едно от друго лип-
сват или са аминокиселинни остатъци;
 c^5 е аминокиселинен остатък;
 c^7 е аминокиселинен остатък;
 c^9 е Т или I;
 c^{10} е основен остатък;
 c^{11} и c^{12} независимо едно от друго са ами-
нокиселинни остатъци;
 c^{13} е неутрален хидрофобен остатък;
 c^{14} е аминокиселинен остатък;
 c^{16} е аминокиселинен остатък;
 c^{17} е неутрален хидрофобен остатък; и
 c^{18} е аминокиселинен остатък или липсва.
I (d)
 $d^1d^2d^3Cd^5d^6d^7WDd^{10}Ld^{12}d^{13}d^{14}Cd^{16}d^{17}d^{18}$
(SEQ ID № 106)
в която:
 d^1 , d^2 и d^3 независимо едно от друго лип-
сват или са аминокиселинни остатъци;
 d^5 , d^6 и d^7 независимо едно от друго са
аминокиселинни остатъци;
 d^{10} е аминокиселинен остатък;
 d^{13} е Т или I;
 d^{14} е аминокиселинен остатък; и
 d^{16} , d^{17} и d^{18} независимо едно от друго лип-
сват или са аминокиселинни остатъци.
I (e)
 $e^1e^2e^3Ce^5e^6e^7De^9Le^{11}Ke^{13}Ce^{15}e^{16}e^{17}e^{18}$

(SEQ ID № 107)
в която:
 e^1 , e^2 и e^3 независимо едно от друго липс-
ват или са аминокиселинни остатъци;
 e^5 , e^6 , e^7 , e^9 и e^{13} независимо едно от друго
са аминокиселинни остатъци;
 e^{11} е Т или I; и
 e^{15} , e^{16} и e^{17} независимо едно от друго лип-
сват или са аминокиселинни остатъци.
I (f)
 $f^1f^2f^3Kf^5Df^7Lf^9Qf^{12}f^{13}f^{14}$
(SEQ ID № 109)
в която:
 f^1 , f^2 и f^3 липсват или са аминокиселинни
остатъци (като се предпочита едно от f^1 , f^2 и f^3 да
бъде С, когато едно от f^{12} , f^{13} и f^{14} е С);
 f^5 е W, Y или F (за предпочитане W);
 f^7 е аминокиселинен остатък (за предпо-
читане L);
 f^9 е Т или I (за предпочитане Т);
 f^{10} е K, R или H (за предпочитане K);
 f^{12} е С, неутрален хидрофобен остатък или
основен остатък (за предпочитане W, С или R);
 f^{13} е С, неутрален хидрофобен остатък или
липсва (за предпочитане V); и
 f^{14} е произволен аминокиселинен остатък
или липсва;
при условие, че само едно от f^1 , f^2 и f^3
може да бъде С и само едно от f^{12} , f^{13} и f^{14} може
да бъде С.
Последователността I (f) е получена като
консенсусна последователност, както е описано
в Пример 1 по-долу. От съединенията, обхвана-
ти от формула I (f), тези обхванати от формула
I (f')
 $f^1f^2f^3KWd^5f^7Lf^9KQf^{12}f^{13}f^{14}$
(SEQ ID № 125)
са за предпочитане. Съединения, попада-
щи във формула I (f'), включват SEQ ID № №:
32, 58, 60, 62, 63, 66, 67, 69, 70, 114, 115, 122,
123, 124, 147-150, 152-177, 179, 180, 187.
В съответствие с настоящото изобретение
са също и съединения, които имат консенсусния
мотив:
PFPWE
(SEQ ID № 110)
които също се присъединяват към TALL-1.
В съответствие с настоящото изобретение
са още и съединения с формули:
I (g)

$g^1g^2g^3Cg^5PFg^8Wg^{10}Cg^{11}g^{12}g^{13}$
 (SEQ ID № 101)
 в която:
 g^1 , g^2 и g^3 независимо едно от друго липсват или са аминокиселинни остатъци;
 g^5 е неутрален хидрофобен остатък;
 g^8 е неутрален хидрофобен остатък;
 g^{10} е киселинен остатък;
 g^{12} и g^{13} независимо едно от друго са аминокиселинни остатъци; и
 g^{14} липсва или е аминокиселинен остатък.
 I (h)
 $h^1h^2h^3CWh^6h^7WGH^{10}Ch^{12}h^{13}h^{14}$
 (SEQ ID № 102)
 в която:
 h^1 , h^2 и h^3 независимо едно от друго липсват или са аминокиселинни остатъци;
 h^6 е хидрофобен остатък;
 h^7 е хидрофобен остатък;
 h^{10} е киселинен или полярен хидрофобен остатък; и
 h^{12} , h^{13} и h^{14} независимо едно от друго отсъстват или са аминокиселинни остатъци.
 I (i)
 $i^1i^2i^3Ci^5i^6i^7i^8i^9i^{10}Ci^{12}i^{13}i^{14}$
 (SEQ ID № 103)
 в която:
 i^1 липсва или е аминокиселинен остатък;
 i^2 е полярно неутрален остатък;
 i^3 е аминокиселинен остатък;
 i^5 , i^6 , i^7 и i^8 независимо едно от друго са аминокиселинни остатъци;
 i^9 е киселинен остатък;
 i^{10} е аминокиселинен остатък;
 i^{12} и i^{13} независимо едно от друго са аминокиселинни остатъци; и
 i^{14} е полярно неутрален остатък.
 Съединенията, дефинирани чрез формули от I (g) до I (i), също се присъединяват към TALL-1.
 Освен това съгласно настоящото изобретение модулатори на TALL-1 включват:
 а) TALL-1 модулиращ домен (примерно аминокиселинна последователност с формули от I (a) до I (i)), за предпочитане аминокиселинната последователност Dz^2Lz^4 , или последователности, произлезли от тях чрез бактериофагово експониране, РНК-пептиден скрининг или другите споменати по-горе техники; и
 б) носител, примерно полимер (например

PEG или декстран) или Fc домен, което е за предпочитане;

като носител е ковалентно свързан към TALL-1 модулиращия домен. Носителят и TALL-1 модулиращият домен могат да бъдат свързани през N- или C-края на TALL-1 модулиращия домен, както е описано по-нататък. Предпочитаният носител е Fc домен и предпочитаният Fc домен е IgG Fc домен. Такива Fc-свързани пептиди оттук нататък са наричани "пептитела". Предпочитани TALL-1 модулиращи домени включват аминокиселинните последователности, описани по-нататък в таблици 1 и 2. Други TALL-1 модулиращи домени могат да бъдат генерирани чрез бактериофагово експониране, РНК-пептиден скрининг и другите споменати тук техники.

Настоящото изобретение се отнася и до процес за получаване на TALL-1 модулатори, който включва:

а. подбиране на поне един пептид, който се присъединява към TALL-1; и

б. ковалентно свързване на посочения пептид към носител.

Предпочитаният носител е Fc домен. Стъпка (а) се изпълнява за предпочитане чрез подбор на пептидните последователности от дадената по-нататък таблица 2 или чрез бактериофагово експониране, РНК-пептиден скрининг или другите споменати тук техники.

Съединенията от това изобретение могат да бъдат получени чрез стандартни методи за синтез, рекомбинантни ДНК техники или произволни други методи за приготвяне на пептиди и кондензирани протеини. Съединения от това изобретение, които включват непептидни части, могат да се синтезират чрез стандартни реакции от органичната химия, като допълнение към стандартните реакции от пептидната химия, когато те са приложими.

Основното използване, предвиждано за съединенията от това изобретение, е като терапевтични или профилактични агенти. Свързаният към носител пептид може да има активност, сравнима или дори по-висока от естествения лиганд, имитиран от пептида.

Съединенията от това изобретение могат да бъдат използвани за терапевтични или профилактични цели чрез включването им в рецептури с подходящи фармацевтични носещи ма-

териали и прилагането им в ефективно количество на пациент, примерно човек (или друг бозайник), който се нуждае от тях. Други сродни аспекти са също включени в настоящото изобретение.

Многобройни допълнителни аспекти и предимства на настоящото изобретение ще станат очевидни след разглеждане на фигурите и подробното описание на изобретението.

Пояснение на приложените фигури

Фигура 1 показва примерни Fc димери, които могат да бъдат получени като производни от IgG1 антитяло. На фигурата "Fc" представлява произволен от Fc вариантите, съответстващи на влагания тук смисъл на термина "Fc домен". "X¹" и "X²" представляват пептиди или комбинации линкер-пептид, както са дефинирани по-нататък. Специфичните димери са, както следва:

A, D: Димери с единична дисулфидна връзка. IgG1 антителата типично имат две дисулфидни връзки в участъка на присъединяване на антитялото. Fc доменът на фиг. 1A и 1D може да бъде образуван чрез отсичане между местата на двете дисулфидни връзки или чрез заместване на цистеинов остатък с неактивен остатък (примерно аланил). На фиг. 1A Fc доменът е свързан при аминокрая на пептидите; на фиг. 1D - при карбоксилния край.

B, E: Димери с двойна дисулфидна връзка. Този Fc домен може да бъде образуван чрез отсичане на родителското антитяло, за да се запазят и двата цистеинови остатъка във веригите на Fc домена, или чрез експресия от конструкция, която включва последователност, кодираща такъв Fc домен. На фиг. 1B Fc доменът е свързан при аминокрая на пептидите; на фиг. 1E - при карбоксилния край.

C, F: Нековалентни димери. Този Fc домен може да бъде образуван чрез елиминиране на цистеиновите остатъци или чрез отсичане, или чрез заместване. Възможно е да се желае елиминиране на цистеиновите остатъци, за да се избегнат замърсявания, образувани от реакцията на цистеиновия остатък с цистеинови остатъци от други, присъстващи в клетката гостоприемник протеини. Нековалентното свързване на Fc домените е достатъчно, за да се запази целостта на димера. Други димери могат да се

образуват чрез използване на Fc домени, произхождащи от различни типове антитела (примерно IgG2, IgM).

Фигура 2 показва структурата на предпочитани съединения съгласно изобретението, която охарактеризира тандемните повторения на фармакологично активния пептид. Фигура 2A показва едноверижна молекула, а може да представлява и ДНК построение за молекулата. Фигура 2B показва димер, в който участъкът линкер-пептид присъства само в една верига на димера. Фигура 2C показва димер, който има пептидният участък и в двете вериги. Димерът от фиг. 2C се образува спонтанно в определени клетки гостоприемници при експресия на ДНК построение, кодиращо единичната верига, показана на фиг. 3A. В други клетки гостоприемници клетките могат да се поставят при условия, благоприятстващи образуването на димери, или димерът може да образува *in vitro*.

Фигура 3 показва примерни последователности от нуклеинови киселини и аминокиселинни последователности (съответно SEQ ID №№: 1 и 2) от човешки IgG1 Fc, които могат да се използват в това изобретение.

Фигури от 4A до 4F показват нуклеотидните и аминокиселинните последователности (SEQ ID № №: 3-27) S от NdeI до SalI фрагменти, кодиращи пептид и линкер.

Фигури от 5A до 5M показват нуклеотидната последователност (SEQ ID №: 28) от rAMG21-RANK-Fc вектор, използван за конструирането на Fc-свързани молекули съгласно настоящото изобретение. Тези фигури идентифицират голям брой характеристики на нуклеиновата киселина, включително:

промоторни участъци P_{copB}, P_{repA}, R_{NAI}, A_{PHII}, lux_{PR} и lux_{PL};
mRNA за A_{PHII}, lux_R;
кодиращи последователности и аминокиселинни последователности за протеините copB протеин, copT, repA1, repA4, A_{PHII}, lux_R, RANK и Fc;

места за присъединяване на протеините
copB, CRP;
"фиби" T1, T2, T7 и loop;
място за опериране за lux протеин;
места за ензимна рестрикция за Pfl11081, BglII, Scal, BmnI, DrdII, DraIII, BstBI, AceIII, AflIII, PflMI, BglI, SfiI, BstEII, BspLullI, NspV,

BpII, EagI, BcgI, NsiI, BsaI, PspI406I, AatII, BsmI, NruI, NdeI, ApaLI, Acc65I, KpnI, SalI, AccI, BspEI, AhdI, BspHI, EcoNI, BsrGI, BmaI, SmaI, SexAI, BamHI и BlnI.

Фигури 6А и 6В показват ДНК последователността (SEQ ID № 97), вмъкната в pCFM1656 между местата за рестрикция на уникалните AatII (позиция #4364 в pCFM1656) и SacII (позиция #4585 в pCFM1656), за да се образува експресионния плазмид pAMG21 (депозирани в Колекцията от американски култури - American Type Culture Collection - под номер ATCC № 98113).

Фигура 7 показва, че TALL-1 пептиятло (SEQ ID № 70) инхибира TALL-1-медирана В-клетъчна пролиферация. Пречистени В клетки (10^5) от мишки В6 бяха култивирани в триплети в планшет с 96 гнезда с посочените количества от TALL-1 консенсусно пептиятло в присъствието на 10 ng/ml TALL-1 плюс 2 microg/ml анти-IgM антитяло. Пролиферацията беше измерена чрез всмукването на радиоактивен [3 H]тимидин в последните 18 h с пулс. Показаните данни представляват средноаритметичните $\pm$ SD триплетни гнезда.

Фигура 8 показва, че TALL-1 N-терминални тандемни димерни пептители (SEQ ID №: 123, 124 в таблица 5В по-нататък) са предпочитани за инхибиране на TALL-1 медирана В-клетъчна пролиферация. Пречистени В клетки (10^5) от мишки В6 бяха култивирани в триплети в планшет с 96 гнезда с посочените количества от TALL-1 12-3 пептиятло и TALL-1 консенсусно пептиятло (SEQ ID № №: 115 и 122 от таблица 5В) или сродните димерни пептители (SEQ ID № №: 123, 124) в присъствието на 10 ng/ml TALL-1 плюс 2 microg/ml анти-IgM антитяло. Пролиферацията беше измерена посредством всмукването на радиоактивен [3 H]тимидин в последните 18 h с пулс. Показаните данни представляват средноаритметичните $\pm$ SD триплетни гнезда.

Фигура 9. AGP3 пептиятло се присъединява към AGP3 с висок афинитет. Константата на дисоциативно равновесие (K_D) беше получена чрез нелинейна регресия на конкурентните криви чрез използване на модел с двойна крива на хомогенно присъединяване в една точка (KinExTM софтуер). K_D е около 4 pM за AGP3 пептиятло, присъединяващо се към човешки AGP3 (SEQ ID №: 123).

Фигури 10А и 10В. AGP3 пептиятло блокира както човешки, така и миши AGP3 при Биакор конкурентно изследване. Разтворим човешки TACI протеин беше имобилизиран към чип В1. 1 nM от рекомбинантен човешки AGP3 протеин (горния панел) или 5 nM от рекомбинантен миши AGP3 протеин (долния панел) бяха инкубирани с посоченото количество AGP3 пептиятло, преди да бъдат инжектирани върху повърхността на рецептор. Беше показана ответна реакция на относително присъединяване на човешки AGP3 и миши AGP3 (SEQ ID №: 123).

Фигури 11А и 11В. AGP3 пептиятло блокира присъединяването на AGP3 към всичките три рецептора TACI, BCMA и BAFFR при Биакор конкурентно изследване. Рекомбинантни разтворими протеини на рецептори TACI, BCMA и BAFFR бяха имобилизирани към чип CM5. 1 nM от рекомбинантен човешки AGP3 (горния панел) беше инкубиран с посоченото количество AGP3 пептиятло, преди да бъде инжектиран върху повърхността на всеки рецептор. Беше измерено относителното присъединяване на AGP3. По подобен начин 1 nM от рекомбинантен APRIL протеин беше инкубиран с посоченото количество AGP3 пептиятло, преди да бъде инжектиран върху повърхността на всеки рецептор. AGP3 пептиятло не инхибира присъединяването към всичките три рецептора (SEQ ID № 123).

Фигури 12А и 12В. AGP3 пептиятло инхибира повишаването на нивото на миши серумен имуноглобулин, предизвикано от човешки AGP3. Мишки Balb/c бяха инжектирани интраперитонеално в продължение на 7 дни с по 1 mg/kg човешки AGP3 протеин, заедно с физиологичен разтвор, човешки Fc или AGP3 пептиятло в посочените дози и на 8-ия ден им беше взета кръв. Серумните нива общо за IgM и IgA бяха измерени посредством ELISA (SEQ ID №: 123).

Фигура 13. Третиране с AGP3 пептиятло понижава тежестта на артрит при CIA модел за изследване на мишки. 8- до 12-седмични мъжки мишки DBA/1 бяха имунизирани интрадермално в основата на опашката с говежди колаген тип II (bCII), емулгиран в пълна настойка на Фройндс, и 3 седмици след първоначалното имунизирание им бяха дадени допълнителни дози bCII, емулгиран в непълна настойка на Фройндс. Третирането с посочената дозировка

от AGP3 пептиятло започна от деня на допълнителното имунизирание и продължи 4 седмици. Както вече е описано (Khare et al., J. Immunol., 155: 3653-9, 1995), и четирите лапи бяха оценявани поотделно по скала 0-3 за тежестта на артритата (SEQ ID №: 123).

Фигура 14. Третиране с AGP3 пептиятло инхибира генерирането на антиколагеново антиятло при CIA модел за изследване на мишки. Една седмица след последното третиране (ден 35) бяха взети серумни проби, както е описано по-горе. Нивото на серумен антиколаген II антиятло беше определено посредством ELISA анализ (SEQ ID №: 123).

Фигури 15A и 15B. Третирането с AGP3 пептиятло забави началото на протеинурия и подобри оцеляването на мишки с NZB/NZW лупус. Петмесечни мишки, предразположени към NZBx NZBWF1, бяха третирани i. p. 3X/седмично в продължение на 8 седмици с PBS или с посочените дози от AGP3 пептиятло (SEQ ID №: 123) или човешки Fc протеини. Наличието на протеин в урината беше оценявано един път месечно по време на експеримента с реагентни лентички Albustix (Bayer AG).

Фигури 16A и 16B показват последователности от нуклеинови киселини и аминокиселинни последователности на предпочитано присъединяващо се към TALL-1 пептиятло (SEQ ID №: 189 и 123).

Примерно изпълнение на изобретението

Дефиниции на термините

Термините, използвани в това описание, са дефинирани по следния начин, освен ако в конкретни случаи не е посочено друго ограничение.

Общи дефиниции

Терминът “съдържащ” означава, че едно съединение може да включва допълнителни аминокиселини на всеки от или на двата от N- или C-краищата на дадена последователност. Разбира се, тези допълнителни аминокиселини не бива да влияят значително на активността на съединението.

В допълнение тук са обхванати също и физиологично приемливи соли на съединенията от това изобретение. Терминът “физиологично приемливи соли” се отнася до всички соли, за ко-

ито е известно или е открито по-късно, че са фармацевтично приемливи. Някои специфични примери са: ацетат; трифлуороацетат; хидрохалиди, примерно хидрохлорид и хидробромид; сулфат; цитрат; тартарат; гликолат; и оксалат.

Аминокиселини

Терминът “киселинен остатък” се отнася до аминокиселинни остатъци в D- или L-форма със странични вериги, съдържащи киселинни групи. Примерните киселинни остатъци включват D и E.

Терминът “амиден остатък” се отнася до аминокиселини в D- или L-форма със странични вериги, съдържащи амидни производни на киселинни групи. Примерните остатъци включват N и Q.

Терминът “ароматен остатък” се отнася до аминокиселинни остатъци в D- или L-форма със странични вериги, съдържащи ароматни групи. Примерните ароматни остатъци включват F, Y и W.

Терминът “основен остатък” се отнася до аминокиселинни остатъци в D- или L-форма със странични вериги, съдържащи основни групи. Примерните основни остатъци включват H, K и R.

Терминът “хидрофилен остатък” се отнася до аминокиселинни остатъци в D- или L-форма със странични вериги, съдържащи полярни групи. Примерните хидрофилни остатъци включват C, S, T, N и Q.

Терминът “нефункционален остатък” се отнася до аминокиселинни остатъци в D- или L-форма със странични вериги, в които липсват киселинни, основни или ароматни групи. Примерните нефункционални аминокиселинни остатъци включват M, G, A, V, I, L и норлевцин (Nle).

Терминът “нефункционален остатък” се отнася до аминокиселинни остатъци в D- или L-форма със странични вериги, в които липсват киселинни, основни или ароматни групи. Примерните нефункционални аминокиселинни остатъци включват M, G, A, V, I, L и норлевцин (Nle).

Терминът “неутрален хидрофобен остатък” се отнася до аминокиселинни остатъци в D- или L-форма със странични вериги, в които липсват основни, киселинни или полярни групи. Примерните неутрални хидрофобни аминокисе-

линни остатъци включват A, V, L, I, P, W, M и F.

Терминът “полярен хидрофобен остатък” се отнася до аминокиселинни остатъци в D- или L-форма със странични вериги, съдържащи полярни групи. Примерните полярни хидрофобни аминокиселинни остатъци включват T, G, S, Y, C, Q и N.

Терминът “хидрофобен остатък” се отнася до аминокиселинни остатъци в D- или L-форма със странични вериги, в които липсват основни или киселинни групи. Примерните хидрофобни аминокиселинни остатъци включват A, V, L, I, P, W, M, F, T, G, S, Y, C, Q и N.

Пептиди

Терминът “пептид” се отнася до молекули с от 1 до 40 аминокиселини, като молекули с от 5 до 20 аминокиселини са предпочитани. Примерните пептиди могат да съдържат TALL-1 модулираща домен на природно срещана молекула или да съдържат случайно избрани последователности.

Терминът “случайно избрани”, така както се използва относно пептидни последователности, се отнася до напълно случайни последователности (например подбрани чрез методи за бактериофагово експониране или РНК-пептиден скрининг) и последователности, в които един или повече остатъка от природно срещана молекула са заменени от аминокиселинен остатък, който не се появява в тази позиция в природно срещаната молекула. Примерните методи за идентифициране на пептидни последователности включват бактериофагово експониране, *E. coli* експониране, рибозомно експониране, РНК-пептиден скрининг, химически скрининг и други подобни.

Терминът “TALL-1 модулиращ домен” се отнася до произволна аминокиселинна последователност, която се присъединява към TALL-1 и съдържа природно срещани последователности или случайни последователности. Примерните TALL-1 модулиращи домени могат да бъдат идентифицирани или добити чрез бактериофагово експониране или посредством другите споменати тук методи.

Терминът “TALL-1 антагонист” се отнася до молекула, която се присъединява към TALL-1 и повишава или намалява един или повече изследвани параметъра, обратно на ефекта, който предизвиква върху тези параметри нативен TALL-1 с пълна дължина. Такава активност мо-

же да бъде определена например чрез такива изследвания, като описаните в подсекцията, озаглавена “Биологична активност на AGP-3” в секцията “Материали & Методи” на заявка за патент, озаглавена “TNF-Related Proteins” (TNF-свързани протеини), WO 2000/047740, публикувана на 17 август 2000.

Носители и пептитела

Терминът “носител” се отнася до молекула, която предотвратява деградацията и/или увеличава периода на полуразграждане, намалява токсичността, намалява имуногенността или увеличава биологичната активност на терапевтичен протеин. Сред примерните носители са Fc домен (който е за предпочитане), както и линеен полимер (примерно полиетиленгликол (PEG), полилизин, декстран и т. н.); полимер с разклонена верига (виж например US патенти № 4,289,872 на Denkenwaller et al., издаден на 15 септември 1981; № 5,229,490 на Tam, издаден на 20 юли 1993; WO 1993/021259 на Frechet et al., публикуван на 28 октомври 1993); липид; холестеролна група (примерно стероид); въгледрихидрат или олигозахарид (примерно декстран); произволен натурален или синтетичен протеин, полипептид или пептид, който се присъединява към спасяващ рецептор; албумин, включително човешки серумен албумин (HSA), левцин zipper домен и други подобни протеини и протеинови фрагменти. Носители са описани допълнително по-нататък.

Терминът “нативен Fc” (“присъщ Fc”) се отнася до молекула или последователност, съдържаща последователността от неприсъединяващи се към антиген фрагменти, получени в резултат на поглъщане на цяло антитяло, било в мономерна, било в мултимерна форма. Оригиналният имуноглобулинен източник на нативния Fc е за предпочитане от човешки произход и може да бъде всеки от имуноглобулините, макар че IgG1 и IgG2 са за предпочитане. Нативни Fc са изградени от мономерни полипептиди, които могат да бъдат свързани в димерни или мултимерни форми чрез ковалентно (т. е. с дисулфидни връзки) и нековалентно асоцииране. Броят на вътрешно молекулярните дисулфидни връзки между мономерни субединици на нативни Fc молекули варира в диапазона от 1 до 4 в зависимост от класа (примерно IgG, IgA, IgE) или подкласа (примерно IgG1,

IgG2, IgG3, IgA1, IgGA2). Пример за нативен Fc е димер с дисулфидна връзка, получен в резултат на папаиново поглъщане на IgG (виж Ellison et al. (1982), Nucleic Acids Res. 10: 4071-9). Терминът "нативен Fc", така както е използван тук, е генеричен за мономерните, димерните и мултимерните форми.

Терминът "Fc вариант" се отнася до молекула или последователност, която е модифицирана от нативен Fc, но продължава да включва място за присъединяване на спасяващ рецептор, FcRn. Международни заявки WO 1997/034631 (публикувана на 25 септември 1997) и WO 1996/032478 описват примерни Fc варианти, както и взаимодействие със спасяващия рецептор, и се включват тук чрез отпратката към тяхната цялост. Следователно терминът "Fc вариант" означава молекула или последователност, която е хуманизирана от нечовешки нативен Fc. Освен това един нативен Fc съдържа места, които могат да бъдат отстранени, защото те осигуряват структурни характеристики или биологична активност, които не са необходими за кондензираните молекули от настоящото изобретение. Следователно терминът "Fc вариант" включва молекула или последователност, лишена от едно или повече нативни Fc места, или остатъци, които оказват влияние или са ангажирани в (1) образуване на дисулфидна връзка, (2) несъвместимост с избрана клетка гостоприемник (3) N-терминална хетерогенността върху експресията в избрана клетка гостоприемник, (4) гликозилиране, (5) взаимодействие с добавка, (6) присъединяване към Fc рецептор, различен от спасяващ рецептор, или (7) зависима от антитяло клетъчна цитотоксичност (ADCC). Fc варианти са описани в подробности по-нататък.

Терминът "Fc домен" обхваща молекули и последователности на нативен Fc и на Fc вариант, както са дефинирани по-горе. Както и при Fc вариантите и нативните Fc, терминът "Fc домен" включва молекули в мономерна или мултимерна форма, както асимилирани от цяло антитяло, така и произведени чрез други средства.

Терминът "мултимер", употребен за Fc домени или молекули, съдържащи Fc домени, се отнася до молекули с две или повече полипептидни вериги, асоциирани ковалентно, нековалентно или едновременно чрез ковалентно и нековалентно взаимодействие. IgG молекули обик-

новено образуват димери; IgM - пентамери; IgD - димери; и IgA - мономерни, димери, тримери или тетрамери. Мултимери могат да се образуват чрез използване на последователността и резултатната активност на нативния Ig източник на Fc или чрез дериватизиране (както е дефинирано по-долу) на нативен Fc.

Терминът "димер", така както се прилага за Fc домени или молекули, включващи Fc домени, се отнася до молекули с две полипептидни вериги, асоциирани ковалентно или нековалентно. Следователно примерните димери в обхвата на това изобретение са като показаните на фиг. 1.

Термините "дериватизиране" (добиване на производно) и "дериват" (производно съединение) или "дериватизиран" (обработен до получаване на производно) включват процеси и съответно получените в резултат съединения, в които (1) съединението има цикличен участък; например кръстосано свързване между цистеинилови остатъци вътре в съединението; (2) съединението е кръстосано свързано или има място за кръстосано свързване; например съединението има цистеинилов остатък и следователно образува кръстосано свързани димери в култура или *in vivo*; (3) една или повече пептидилови връзки са заменени с непептидилова връзка; (4) N-краят е заменен с $-NRR^1$, $NRC(O)R^1$, $-NRC(O)OR^1$, $-NRS(O)_2R^1$, $-NHC(O)NHR$, сукцинамидна група или заместен или незаместен бензилоксикарбонил-NH-, където R и R^1 и пръстеновидните заместители са както е дефинирано по-нататък; (5) C-краят е заменен с $-C(O)R^2$ или $-NR^3R^4$, където R^2 , R^3 и R^4 са както е дефинирано по-нататък; и (6) съединения, в които отделни аминокиселинни части са модифицирани чрез третиране с агенти, способни да реагират с подбрани странични вериги или терминални остатъци. Производни са описани допълнително по-нататък.

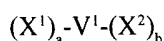
Термините "пептитяло" и "пептитела" се отнасят до молекули, съдържащи Fc домен и поне един пептид. Такива пептитела могат да бъдат мултимери или димери или техни фрагменти и те могат да се дериватизират. В настоящото изобретение молекулите с посочените оттук нататък формули от II до VI са пептитела, когато V^1 е Fc домен.

Структура на съединения

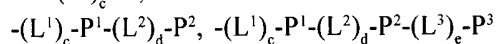
Общо. Авторите на настоящото изобретение идентифицираха последователности, способни да се присъединяват към TALL-1 и да модулират биологичната му активност. Тези последователности могат да бъдат модифицирани чрез споменатите по-горе техники, чрез които една или повече аминокиселини могат да бъдат променени, като същевременно се запазва и дори се подобрява афинитетът на присъединяване на пептида.

В съставите от вещество, приготвени съгласно това изобретение, пептидът (пептидите) може да бъде прикрепен към носителя през N-края или през C-края на пептида. Всеки от тези пептиди може да бъде свързан в тандем (т. е. секвентно) със или без линкери. Следователно молекулите носител-пептид, съгласно изобретението, могат да се опишат чрез следната формула:

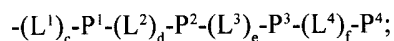
II



в която:

V¹ е носител (за предпочитане Fc домен);X¹ и X² независимо едно от друго са под-брани от -(L¹)_c-P¹,

и



P¹, P², P³ и P⁴ независимо едно от друго са последователности от TALL-1-модулиращи домени, като например тези с формули от I (a) до I (i);

L¹, L², L³ и L⁴ независимо едно от друго са линкери; и

a, b, c, d, e и f независимо едно от друго

имат стойност 0 или 1, при условие че поне едно от a и b е 1.

Следователно съединение II съдържа предпочитани съединения с формула

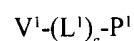
III

и техни мултимери, в която формула V¹ еFc домен и е прикрепен към C-края на A¹;

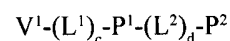
IV

и техни мултимери, в която формула V¹ еFc домен и е прикрепен към N-края на A²;

V

и техни мултимери, в която формула V¹ еFc домен и е прикрепен към N-края на -(L¹)с-P¹; и

VI

и техни мултимери, в която формула V¹ еFc домен и е прикрепен към N-края на -L¹-P¹-L²-P².

Пептиди

Пептидите от това изобретение са полезни като TALL-1 модулиращи пептиди или като TALL-1 модулиращи домени в молекулите с формули от II до VI. Молекулите от това изобретение, които съдържат тези пептидни последователности, могат да бъдат получени чрез методи, познати на специалистите в тази област.

Предпочитани пептидни последователности са онези с горепосочената формула I (a), които имат идентифицираните по-долу заместители.

Таблица 1. Предпочитани пептидни заместители

Формула I (a)	a^3 е T; a^9 е основен остатък (най-предпочитано K); и a^{12} е неутрален хидрофобен остатък (най-предпочитано F).
Формула I (b)	b^3 е D, Q или E; b^6 е W или Y; b^{10} е T; b^{11} е K или R; и b^{14} е V или L.
Формула I (c)	c^9 е T; c^{10} е K или R; c^{13} е I, L или V; и c^{17} е A или L.
Формула I (d)	d^{12} е T.
Формула I (e)	e^{11} е T.
Формула I (f)	f^9 е T; f^{10} е K; и f^{13} е V.
Формула I (g)	g^5 е W; g^8 е P; g^{10} е E; и g^{13} е основен остатък.
Формула I (h)	h^1 е G; h^6 е A; h^7 е неутрален хидрофобен остатък; и h^{10} е киселинен остатък.
Формула I (i)	i^2 е W; и i^{14} е W.

Предпочитаните пептидни последователности са показани в таблица 2 по-долу.

Таблица 2. Предпочитани TALL-1 модулиращи домени

Sequence	SEQ ID NO:
PGTCFPFPWECHTA	29
WGACWFPFPWECHKE	30
VPFCGLLTKHCFFEA	31
GSRCYKXNDVLTKQCFHH	32
LEGLKWDLLTKQWVCDL	33
SADCYFDLLTKSDVCTSS	34
SDDCMYDQLTRMFICSNL	35
DLNCKYDELTYKEWCQFN	36
FHDCKYDILLTROMVCHGL	37
RNHCFTWDHLLKODICPSP	38
ANQCWWDELTKKNVCEFF	39
YKGRMWDLILTRSWVSL	126
QDVGLWWDITLRAWMPNI	127
QNAQRVWDLILRTWVPO	128
GWNEAWWDILTKTWLEQ	129
RTTCDTWDSLKKCVPOS	130
GAINQFWDSLTKTWROS	131
WLHSCWWDPLTKIWLOKV	132
SENFTWFDPILTRAQLKFR	133
GVWFWEFDTTKQWTOAG	134
HQCKCYDILTKWCVTNG	135
LWSKEVWDLILTKSWVSOA	136
KAAGWFPDILTKVWVPAP	137
AYQTWFWDILTRLWLEST	138
SCQHFWDLLTRSWTPST	139
LEVGQKWDPLTKQWVSRG	140
VGNMCQWDPLIKRTVCVG	141
CROGAKFDLLTKQCLLGE	142
GQALXHWDLILTKQWVDEQ	143
RGPCGSWDLILTKHCLDSQ	144
WQWKQWDLILTKQMWVVG	145
PTICRKDLILTKQVVCLD	146
KTENGKWDLLTKQCLQQA	147
KCLKGKWDILTKQCVTEV	148
RCWNGKWDLLTKQCIHPW	149
NRDMRKWDPLIKQWTVRP	150
QAAAAWDLILTKQWLVPF	151
PEGGPKWDPLTKQFLFPV	152
QTPQKKWDLLTKQWFTRN	153
IGSPCKWDLLTKQMICQT	154
CTAAGKWDLLTKQCIQEK	155
VSOQMKWDLLTKQCLQGW	156
VWGTWKWDLLTKQYLPPO	157
GWWEHKWDLLTKQWYRPQ	158
TAQVSKWDLLTKQWLPLA	159
QLWGTAWDLILTKQYIQIM	160
WATSOKWDLLTKQWVQNM	161
QRQCAKWDILTKQCVLPY	162

KTTDCKWDLLTKQRICQV	163
LLCQGKWDLLTKQCLKLR	164
LMWFWKWDLLTKQLVPTF	165
QTWAWKWDLLTKQWIGPM	166
NKELLKWDLLTKQCRGRS	167
GQKDLKWDLLTKQYVRQS	168
PKPCQKWDLLTKQCLGSV	169
GQIGWKWFLLLTKQWIQTR	170
VWLDWKWDLLTKQWIHPQ	171
QEWYKWDLLTKQWGWLR	172
HWDSWKWDLLTKQWVQA	173
TRPLQKWDLLTKQWLRVG	174
SDQWQKWDLLTKQWFDV	175
QCTFMKWDLLTKQWIRRH	176
QGECKWDLLTKQCFPGO	177
GQMGWRWDPLIKMCLGPS	178
QLDGCKWDLLTKQKVCIP	179
HGYWQKWDLLTKQWVSSE	180
HQGQCGWDLLTRIYLPCH	181
LHKACKWDLLTKQCWPMO	182
GPPGSVWDLLTKIWIQNG	183
ITQDWRFDTLRLWLPLR	184
QGGFAAWDVLTKMWITVP	185
GHGTPWWDALTRIWIIGV	186
VWFWQKWDLLTKQFVPQD	187
WQWSWKWDLLTRQYISS	188
NQTLWKWDLLTKQFITYM	60
PVYQGWDTLTKLYIWDG	61
WLDGGWRDPLIKRSVQLG	62
GHQQFKWDLLTKQWQSN	63
QRVGQFWDVLTkMFITGS	64
QAQGWSYDALIKTWIRWP	65
GWMHWKWDPLTKQALPWW	66
GHPTYKWDLLTKQWILQM	67
WNNWSLWDPLTKLWLQON	68
WQWGKWDLLTKQWVQQC	69
GQMGWRWDPLTKMWLGTS	70

Констатирано е, че известните рецептори за TALL-1 носят определена хомология на последователностите с предпочитани пептиди:

12-3	LPGCKWDLLIKQWVCDPL
BAFFR	MRRGPRSLRGRDAPVPTPCVPTECYDLLVRKCVDCLL
TACI	TICNHQSQRTCAAFCSRSLSCRKEQGKFYDHLRLDCISCASI
BCMA	FVSPSQEIRGRFRMLQMAGQCSQNEYFDSLHACIPCQLRC

(съответно SEQ. ID. № №: 33, 195, 196 и 197).

15

Всеки пептид, съдържащ цистеинов остатък, може да бъде кръстосано свързан с друг Cys-съдържащ пептид, като кой да е от остатъците или и двата могат да бъдат свързани към носител. Всеки пептид с повече от един Cys остатък може да образува също и вътрешно пептидна дисулфидна връзка. Всеки от тези пептиди може да бъде дериватизиран, както ще бъде описано по-нататък.

Допълнителни полезни пептидни последователности могат да са резултат от консервативни и/или неконсервативни модификации на аминокиселинните последователности на последователностите в таблица 2.

Консервативни модификации ще произведат пептиди, които имат функционални и химически характеристики, подобни на тези на пептида, от който са направени такива модификации. За разлика от това съществени модификации във функционалните и/или химическите характеристики на пептидите могат да бъдат осъществени чрез подбор на заместители в аминокиселинната последователност, които се различават значително по своя ефект върху запазването на (а) структурата на молекулния гръбнак в областта на заместването, например като листова или спираловидна конформация, (б) заряда или хидрофобността на молекулата в мястото-цел,

или (с) големината на молекулата.

Например "консервативно аминокиселинно заместване" може да обхваща заместване на нативен аминокиселинен остатък с ненативен остатък, такъв, че да има малък или никакъв ефект върху полярността или заряда на аминокиселинния остатък в тази позиция. Освен това всеки нативен остатък в полипептида може също да бъде заместен с аланин, както беше описано по-горе за "аланин сканираща мутагенеза" (виж например MacLennan et al., 1998, Acta Physiol. Scand. Suppl. 643: 55-67; Sasaki et al., 1998, Adv. Biophys. 35: 1-24, където се дискутира аланин сканираща мутагенеза).

Желаните аминокиселинни замествания (било то консервативни или неконсервативни) могат да бъдат определени от специалистите в областта в момента, когато такива замествания са желани. Например, аминокиселинни замествания могат да бъдат използвани за идентифициране на важни остатъци от пептидната последователност или за да се увеличи или намали афинитетът на пептидните молекули или на молекулите носител-пептид (виж предходните формули), описани тук. Примерни аминокиселинни замествания са дадени в следващата таблица 3.

Таблица 3. Аминокиселинни замествания

Оригинални остатъци	Примерни замествания	Предпочитани замествания
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro, Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Норлевцин	Leu
Leu (L)	Норлевцин, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, 1,4 Диамино-бутирова киселина, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Gly
Ser (S)	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Норлевцин	Leu

В определени реализации консервативните аминокиселинни замествания включват също и несрещащи се в природата аминокиселинни остатъци, които обикновено са инкорпорирани по-скоро чрез химически пептиден синтез, отколкото чрез синтези в биологични системи.

Както беше отбелязано в предходната секция "Дефиниране на термините", природно срещани остатъци могат да бъдат разделени в класове въз основа на общите странично верижни свойства, които могат да бъдат полезни за модификации на последователност. Например, неконсервативни замествания могат да обхващат размяната на един член от тези класове с член от друг клас. Такива заместени остатъци могат да бъдат интродуцирани в области на пептида, които са хомоложни с нечовешки ортолози, или в нехомоложните области на молекулата. В допълнение възможни са и модификации с използване на Р или G с цел да се окаже влияние върху ориентацията на веригата.

При направата на такива модификации може да се взема предвид хидропатичния индекс на аминокиселините. На всяка аминокиселина е присвоен индекс въз основа на нейната хидрофобност и характеристиките на заряда, които са: изолевцин (+4,5); валин (+4,2); левцин (+3,8); фенилаланин (+2,8); цистеин/цистин (+2,5); метионин (+1,9); аланин (+1,8); глицин (-0,4); треонин (-0,7); серин (-0,8); триптофан (-0,9); тирозин (-1,3); пролин (-1,6); хистидин (-3,2); глутамат (-3,5); глутамин (-3,5); аспартат (-3,5); аспарагин (-3,5); лизин (-3,9); и аргинин (-4,5).

Важността на хидропатичния аминокиселинен индекс при придаването на интерактивна биологична функция на протеин е понятна за специалистите в тази област. Kyte et al., J. Mol. Biol., 157: 105-131 (1982). Известно е, че определени аминокиселини могат да бъдат заместени с други аминокиселини с подобен хидропатичен индекс или резултат и пак да се запази сходна биологична активност. При извършването на промени, основаващи се на хидропатичния индекс, заместването на аминокиселини, чиито хидропатични индекси са до стойност ± 2 , е предпочитано, тези, които са до стойност ± 1 , са специално предпочитани и тези в границите $\pm 0,5$ са дори още по-специално предпочитани.

За специалистите в тази област е ясно още, че заместването на подобните аминокиселини

може да бъде направено ефективно въз основа на хидрофилността. Най-високата местна средна хидрофилност на протеин, обусловена от хидрофилността на неговите съседни аминокиселини, е в корелация с неговата имуногеничност и антигеничност, т. е. с биологично свойство на протеина.

Следните стойности на хидрофилност са присвоени на аминокиселинни остатъци: аргинин (+3,0); лизин (+3,0); аспартат (+3,0 ± 1); глутамат (+3,0 ± 1); серин (+0,3); аспарагин (+0,2); глутамин (+0,2); глицин (0); треонин (-0,4); пролин (-0,5 ± 1); аланин (-0,5); хистидин (-0,5); цистеин (-1,0); метионин (-1,3); валин (-1,5); левцин (-1,8); изолевцин (-1,8); тирозин (-2,3); фенилаланин (-2,5); триптофан (-3,4). При извършването на промени, основаващи се на подобни стойности на хидрофилност, заместването на аминокиселини, чиито стойности на хидрофилност са в границите ± 2 , е предпочитано, тези, които са в границите ± 1 , са специално предпочитани, и тези в границите $\pm 0,5$ са дори още по-специално предпочитани. Възможно е да се идентифицират епитопи от първични аминокиселинни последователности въз основа на хидрофилността. Тези области са наричани още "епитопни ядрени участъци".

Специалистът в тази област ще бъде в състояние да установи с помощта на познати техники подходящи варианти на полипептида, както е зададено в предходните последователности. За идентифициране на подходящи области от молекулата, които могат да бъдат променени, без да се нарушава активността, специалистът в тази област може да избере като цел области, за които не се смята, че са важни за активността. Например, когато са известни сходни полипептиди със сходна активност от същия биологичен вид или от друг биологичен вид, специалистът в тази област може да сравни аминокиселинната последователност на пептид със сходни пептиди. Чрез такова сравнение могат да се идентифицират остатъци и участъци от молекулите, които могат да бъдат запазени сред сходни полипептиди. Ще бъде оценено, че е по-малко вероятно промени в областите на пептид, които са неконсервативни по отношение на такива сходни пептиди, да окажат неблагоприятно влияние върху биологичната активност и/или структура на пептида. Специалистът в тази област знае също, че дори

в относително консервативни области е възможно срещане в природата остатъци да се заместят с химически сходни аминокиселини, като се съхрани активността (консервативни замествания на аминокиселинен остатък). Следователно, дори области, които може да са важни за биологичната активност или за структурата, могат да бъдат подложени на консервативни аминокиселинни замествания, без да се разрушава биологичната активност или без неблагоприятно влияние върху пептидната структура.

Освен това специалистът в тази област може да направи обзор на изследванията върху структура-функция, при които са идентифицирани остатъци в сходни пептиди, които са важни за активност или структура. Като се има предвид такова сравнение е възможно да се предскаже важноста на аминокиселинни остатъци в пептид, които съответстват на аминокиселинни остатъци, важни за активността или структурата в сходни пептиди. Специалистът в тази област може да установи химически сходни аминокиселинни замествания за такива предсказани важни аминокиселинни остатъци от пептидите.

Специалистът в областта може да анализира триизмерна структура и аминокиселинна последователност по отношение на тази структура в сходни полипептиди. Благодарение на тази информация специалистът в областта може да предскаже подреждането на аминокиселинни остатъци на пептид по отношение на неговата триизмерна структура. Специалистът в тази област може да предпочете да не прави радикални промени на аминокиселинни остатъци, за които е предсказано, че ще са на повърхността на протеина, тъй като такива остатъци могат да са обвързани във важни взаимодействия с други молекули. Нещо повече, специалистът в областта може да генерира тестови варианти, съдържащи единичен аминокиселинен заместител, при всеки желан аминокиселинен остатък. Вариантите могат след това да бъдат подложени на скрининг, като се използват анализи за активност, познати на специалистите в тази област. Такива данни могат да се използват за събиране на информация за подходящи варианти. Например, ако се открие, че промяна в конкретен аминокиселинен остатък води до нарушена, нежелано намалена или неподходяща активност, варианти с такава промяна

на следва да се избягват. С други думи, на базата на информация, събрана от такива рутинни експерименти, всеки специалист в тази област може лесно да определи аминокиселините, където следва да се избегнат по-нататъшни замествания както самостоятелни, така и в комбинация с други мутации.

Голям брой научни публикации са посветени на предвиждането на вторична структура. Виж Moulton J., *Curr. in Biotech.*, 7 (4): 422-427 (1996); Chou et al., *Biochemistry*, 13 (2): 222-245 (1974); Chou et al., *Biochemistry*, 113 (2): 211-222 (1974); Chou et al., *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 47: 45-148 (1978); Chou et al., *Ann. Rev. Biochem.*, 47: 251-276 и Chou et al., *Biophys. J.*, 26: 367-384 (1979). Нещо повече, понастоящем съществуват компютърни програми, които подпомагат предвиждането на вторичната структура. Един метод за предвиждане на вторичната структура се основава на хомоложното моделиране. Например, два полипептида или протеина, които имат идентичност на последователността, по-голяма от 30 %, или сходство, по-голямо от 40 %, често имат сходни структурни топологии. Благодарение на нарасталия напоследък обем на базата данни с протеинови структура (PDB) доказано се повиши предсказуемостта на вторичната структура, включително на потенциалния брой нагъвания в структурата на полипептид или протеин. Виж Holm et al., *Nucl. Acid. Res.*, 27(1): 244-247 (1999). Предполага се (Brenner et al., *Curr. Opin. Struc. Biol.*, 7 (3): 369-376 (1997)), че в даден полипептид или протеин има ограничен брой нагъвания и щом бъдат проанализирани определен критичен брой структури, точността на предвиждането на структурата драматично ще нарасне.

Допълнителните методи за предсказване на вторичната структура включват "проследяване" - "threading" (Jones, D., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 7 (3): 377-87 (1997); Sippl et al., *Structure*, 4(1): 15-9 (1996)), "профилен анализ" (Bowie et al., *Science*, 253: 164-170 (1991); Gribskov et al., *Meth. Enzym.*, 183: 146-159 (1990); Gribskov et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 84 (13): 4355-8 (1987)), и "еволюционно свързване" (Виж Home, *supra* и Brenner, *supra*).

Носители

Това изобретение изисква присъствието

на поне един носител (V^1), прикрепен към пептид през N-края, C-края или странична верига на един от аминокиселинните остатъци. Могат да се използват няколко носителя; примерно Fc при всеки край или Fc при един край и една PEG група при другия край или при странична верига. Сред примерните носители са:

- Fc домен;
- друг протеин, полипептиди или пептиди, способни да се присъединяват към спасяващ рецептор;
- човешки серумен албумин (HSA);
- левцин зипер (LZ) домен;
- полиетиленов гликол (PEG), включително 5 kD, 20 kD и 30 kD PEG, както и други полимери;
- декстран;
- и други молекули, известни на специалистите в областта, за да осигурят удължен период на полуразграждане и/или защита от протеолитична деградация или пречистване.

Един Fc домен е предпочитан носител. Fc доменът може да бъде кондензиран към N- или C-края на пептидите или едновременно към N- и C-краищата. Кондензирането към N-края е за предпочитане.

Както беше отбелязано по-горе, Fc варианти са подходящи носители в обхвата на това изобретение. Нативен Fc може да бъде екстензивно модифициран, за да образува Fc вариант съгласно изобретението, при условие, че е запазено присъединяването към спасяващия рецептор; виж примерно WO 1997/034631 и WO 1996/032478. В такива Fc варианти могат да бъдат премахнати едно или няколко места на един нативен Fc, които осигуряват структурни особености или функционална активност, които не се изискват от кондензираните молекули от това изобретение. Премахването на тези места може да се извърши примерно чрез заместване или заличаване на остатъци, вмъкване на остатъци в мястото или отсичане на участъците, съдържащи мястото. Вмъкнатите или заместените остатъци могат да бъдат също променени аминокиселини, примерно пептидоимитации или D-аминокиселини. Fc вариантите са желани по редица причини, някои от които са описани по-долу. Примерните Fc варианти включват молекули и последователности, в които:

1. Места, ангажирани в образуването на

дисулфидна връзка, са премахнати. Чрез такова премахване може да се избегне реакция с други цистеин-съдържащи протеини, присъстващи в клетката гостоприемник, използвана, за да се произведат молекулите от изобретението. За тази цел цистеин-съдържащият сегмент в N-края може да се отсече или цистеиновите остатъци могат да бъдат заличени или заместени с други аминокиселини (примерно аланил, серил). По-специално, N-терминалният сегмент от 20 аминокиселини в SEQ ID № 2 може да се отсече или да се заличи или да се заместят цистеиновите остатъци в позиции 7 и 10 от SEQ ID №: 2. Дори когато цистеинови остатъци са премахнати, едноверижните Fc домени пак могат да образуват димерен Fc домен, чиято цялост се удържа нековалентно.

2. Нативен Fc е модифициран, за да бъде направен по-съвместим с избрана клетка гостоприемник. Например, може да се премахне PA последователност близо до N-края на типичен нативен Fc, който може да бъде разпознат от храносмилателен ензим в *E. coli*, примерно пролин иминопептидаза. Възможно е също да се добави N-терминален метионинов остатък, особено когато молекулата се експресира рекомбинантно в бактериална клетка, примерно *E. coli*. Fc доменът на SEQ ID №: 2 е един такъв Fc вариант.

3. Участък от N-края на нативен Fc е премахнат, за да се предотврати N-терминална хетерогенност, когато се експресира в избрана клетка гостоприемник. За тази цел може да се заличи произволен от първите 20 аминокиселинни остатъка при N-края, и по-специално тези в позиции 1, 2, 3, 4 и 5.

4. Едно или повече места за гликозилиране са премахнати. Остатъци, които обикновено се гликозилират (примерно аспарагин), могат да дадат цитолитична ответна реакция. Такива остатъци могат да бъдат заличени или заместени с негликозилирани остатъци (примерно аланин).

5. Премахнати са места, ангажирани във взаимодействие с добавка, примерно C1q свързващото място. Например може да се изтрие или замени ЕКК последователността от човешки IgG1. Ангажирането на добавка може да не води до предимство за молекулите от това изобретение и следователно може да се избягва при такъв Fc вариант.

6. Премахнати са места, които влияят на

присъединяването към Fc рецептори, различни от спасяващ рецептор. Нативен Fc може да има места за взаимодействие с определени бели кръвни телца, които не се изискват за кондензираните молекули от настоящото изобретение, и следователно могат да се премахнат.

7. Премахнато е ADCC мястото. ADCC места са познати на специалистите в тази област; виж например *Molec. Immunol.* 29 (5): 633-9 (1992) относно ADCC места в IgG1. Тези места също не се изискват за кондензираните молекули от настоящото изобретение и следователно могат да бъдат премахнати.

8. Когато нативният Fc произхожда от нечовешко антитяло, нативният Fc може да бъде хуманизиран. Обикновено, за да се хуманизира нативен Fc, подбрани остатъци в нечовешкия нативен Fc се заместват с остатъци, които нормално се намират в човешки нативен Fc. Техниките за хуманизиране на антитяло са добре познати на специалистите в тази област.

Предпочитаните Fc варианти включват следното. В SEQ ID №: 2 (фиг. 3) левцинът в позиция 15 може да бъде заместен с глутамат; глутаматът в позиция 99 - с аланин; и лизините в позиции 101 и 103 - с аланини. Освен това един или повече тирозинови остатъка могат да бъдат заменени с фенилаланинови остатъци.

Алтернативен носител би могъл да бъде протеин, полипептид, пептид, антитяло, фрагмент от антитяло или малка молекула (примерно пептидоимитиращо съединение), способни да се присъединят към спасяващ рецептор. Например в качеството на носител може да се използва полипептид, както е описано в US патент № 5,739,277, издаден на 14 април 1998 на Presta et al. Пептиди могат да бъдат подбрани и чрез бактериофагово експониране или РНК-пептиден скрининг за присъединяване към FcRn спасяващ рецептор. Такива присъединяващи се към спасяващ рецептор съединения също се включват в смисъла на термина "носител" и са в обхвата на това изобретение. Такива носители следва да се подбират според удължения период на полуразграждане (примерно като се избягват последователности, разпознавани от протозои) и понижена имуногеничност (примерно като се дава предимство на неимуногенични последователности, открити при хуманизирането на антитяло).

Както беше отбелязано по-горе, за V¹ мо-

гат да се използват също и полимерни носители. Понастоящем са достъпни различни средства за прикрепяне на химическите части, полезни като носители, виж примерно PCT (Patent Cooperation Treaty - Договор за патентно коопериране) международна публикация № WO 1996/011953, озаглавена "N-Terminally Chemically Modified Protein Compositions and Methods" - "Състави от N-терминално химически модифицирани протеини и методи", която се включва тук чрез позоваването в нейната цялост. Тази PCT публикация показва, наред с другите неща, селективното прикрепяне на водоразтворими полимери към N-края на протеина.

Предпочитан полимерен носител е полиетиленовият гликол (PEG). PEG групата може да бъде с всякакво подходящо молекулно тегло и може да бъде линейна или разклонена. Предпочита се средното молекулно тегло на PEG да бъде в диапазона от около 2 килоДалтона (kD) до около 100 kD, повече се предпочита от около 5 kD до около 50 kD, най-много се предпочита от около 5 kD до около 10 kD. PEG групите най-често ще се прикрепят към съединенията от изобретението посредством ацилатиране или редуктивно алкилиране през реактивна група в PEG частта (примерно алдехидна, amino, тиолова или естерна група) към реактивна група в съединение съгласно изобретението (примерно алдехидна, amino или естерна група).

Една полезна стратегия за полиетиленово гликолиране (PEG-иране) на синтетични пептиди се състои в комбиниране - посредством образуване на спрегнато съединяване в разтвор - на пептид и PEG част, като всяка съставка носи специфична функционалност, която е взаимно реактивна по отношение на другата съставка. Пептидите могат да бъдат приготвени лесно чрез конвенционален твърдофазов синтез. Пептидите са "предварително активирани" с подходяща функционална група на специфично място. Прекурсорите са пречистени и напълно охарактеризирани преди да реагират с PEG частта. Лигирането на пептида с PEG обикновено се провежда във водна фаза и може лесно да се наблюдава чрез обратно-фазова аналитична високоефективна течна хроматография (ВТХ). PEG-ираните пептиди могат лесно да бъдат пречистени чрез подготвителна ВТХ и охарактеризирани чрез аналитична ВТХ, аминокиселинен ана-

лиз и лазерна десорбционна масспектрометрия.

Полизахаридните полимери са друг тип разтворими във вода полимери, които могат да бъдат използвани за модифициране на протеини. Декстраните са полизахаридни полимери, съставени от отделни субединици от глюкоза, предимно свързани чрез алфа1-6 връзки. Самият декстран е наличен в широк диапазон на молекулното тегло, като най-често е наличен с молекулни тегла от около 1 kD до около 70 kD. Декстранът е разтворим във вода полимер, подходящ за използване в настоящото изобретение като носител - самостоятелно или в комбинация с друг носител (примерно Fc). Виж например WO 1996/011953 и WO 1996/005309. Има сведения за използването на декстран, спрегнат към терапевтични или диагностични имуноглобулини; виж например публикация на европейски патент № 0 315 456, който се включва тук в неговата цялост чрез позоваването. Когато се използва декстран като носител съгласно настоящото изобретение, за предпочитане е декстран с около 1 kD до около 20 kD.

Линкери.

Всяка "линкер" група е опционална. Когато присъства, химическата структура на линкера не е критична, тъй като той служи предимно като разделител. Предпочита се линкерът да бъде направен от аминокиселини, съединени заедно чрез пептидни връзки. Следователно, в предпочитаните реализации линкерът е направен от 1 до 30 аминокиселини, съединени чрез пептидни връзки, като аминокиселините са подбрани от 20-те природно срещани аминокиселини. Някои от тези аминокиселини могат да бъдат гликозилирани, което е ясно за специалистите в тази област. В една повече предпочитана реализация тези 1 до 20 аминокиселини са подбрани от глицин, аланин, пролин, аспарагин, глутамин и лизин. Дори повече за предпочитане е линкер, изграден от мнозинство от аминокиселини, които не са пространствено възпрепятствани, примерно глицин и аланин. Следователно, предпочитани линкери са полиглицини (и особено $(\text{Gly})_4$, $(\text{Gly})_3$), поли(Gly-Ala) и полиаланини. Други специфични примери за линкери са:

$(\text{Gly})_3\text{Lys}(\text{Gly})_4$ (SEQ ID №: 40);

$(\text{Gly})_3\text{AsnGlySer}(\text{Gly})_2$ (SEQ ID №: 41);

$(\text{Gly})_3\text{Cys}(\text{Gly})_4$ (SEQ ID №: 42); и

GlyProAsnGlyGly (SEQ ID №: 43).

Поясняване на горната номенклатура - нап-

5 пример $(\text{Gly})_3\text{Lys}(\text{Gly})_4$ означава $\text{Gly-Gly-Gly-Lys-Gly-Gly-Gly-Gly}$ (SEQ ID №: 40). Комбинации от Gly и Ala са също предпочитани. Показаните тук линкери са примерни; линкерите, попадащи в обхвата на това изобретение, могат да бъдат много по-дълги и може да включват други оста-

10 тъци. Предпочитани линкери са аминокиселини линкери, съдържащи повече от 5 аминокиселини, с подходящи линкери, които имат до около 500 аминокиселини, подбрани от глицин, аланин, пролин, аспарагин, глутамин, лизин, треонин, серин или аспартат. Линкери от около 20 до 50 аминокиселини са предпочитани най-много. Една група от предпочитани линкери са тези с формули

$\text{GSGSATGGSGSTASSGSGSATx}^1\text{x}^2$

(SEQ ID №: 193)

и

$\text{GSGSATGGSGSTASSGSGSATx}^1\text{x}^2\text{GSGSATGGS}$

25 $\text{GSTASSGSGSATx}^3\text{x}^4$

(SEQ ID №: 194)

в които x^1 и x^3 независимо едно от друго са основни или хидрофобни остатъци и x^2 и x^4 независимо едно от друго са хидрофобни остатъци. Специфични предпочитани линкери са:

$\text{GSGSATGGSGSTASSGSGSATHM}$

(SEQ ID №: 59)

$\text{GSGSATGGSGSTASSGSGSATGM}$

(SEQ ID №: 190)

35 $\text{GSGSATGGSGSTASSGSGSATGS}$

(SEQ ID №: 191) и

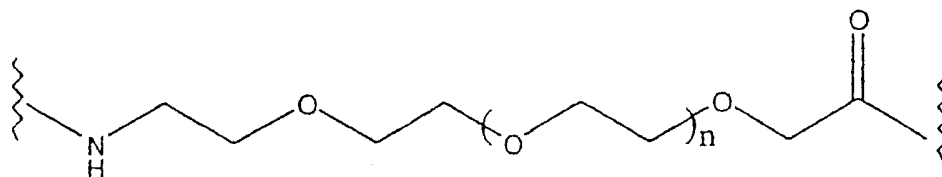
$\text{GSGSATGGSGSTASSGSGSATHMGSGSATGG}$

SGSTASSGSGSATHM

(SEQ ID №: 192).

40 Възможни са и непептидни линкери. Например алкилни линкери, примерно $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_s-\text{C}(\text{O})-$, където би могло да се използва $s = 2-20$. Тези алкилни линкери могат да бъдат по-нататък заместени от непространствено възпрепятстваща група, например на нисш алкил (примерно C_1-C_6) нисш ацил, халоген (примерно Cl, Br), CN, NH_2 , фенил и т. н. Примерен непептиден линкер е PEG линкер.

VII



където n има такава стойност, че линкерът да бъде с молекулно тегло от 100 до 5000 kD, за предпочитане от 100 до 500 kD. Пептидните линкери могат да бъдат подложени на промени, за да образуват производни по същия начин, както беше описано по-горе.

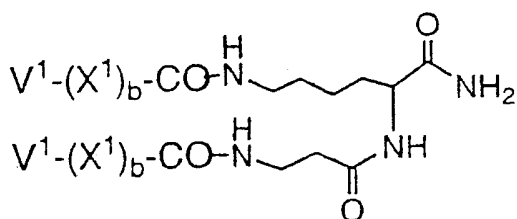
Производни

Настоящото изобретение предвижда също и дериватизиране на пептидния участък и/или на участък от носителя на съединенията. Такива производни (деривати) могат да подобрят разтворимостта, абсорбцията, периода на биологично полуразграждане и други подобни характеристики на съединенията. Частите могат алтернативно да елиминират или да отслабят някакъв нежелан страничен ефект на съединенията и други подобни. Примерните производни включват съединения, в които:

1. Съединението или някаква негова част са циклични. Например, пептидната част може да бъде модифицирана така, че да съдържа два или повече Cys остатъка (примерно в линкера), които могат да станат циклични чрез образуване на дисулфидна връзка.

2. Съединението е кръстосано свързано или му е придадена способност за кръстосани връзки между молекули. Например, пептидната част може да бъде модифицирана така, че да съдържа един Cys остатък и по този начин да е способно да образува вътрешно молекулярна дисулфидна връзка с подобна молекула. Съединението може да бъде също кръстосано свързано през неговия C-край, както в показаната по-долу молекула.

VIII



Във формула VIII всяко "V¹" може обик-

новено да представлява една нишка от Fc домена.

3. Една или повече пептидил [-C(O)NR-] връзки са заместени с непептидилна връзка. Примерни непептидилни връзки са -CH₂-карбамат [-CH₂-OC(O)NR-], фосфонат, -CH₂-сулфонамид [-CH₂-S(O)₂NR-], урея [-NHC(O)NH-], -CH₂-вторичен амин и алкилиран пептид [-C(O)NR⁶-, където R⁶ е нисш алкил].

4. N-краят е дериватизиран. Обикновено N-краят може да се ацилатира или да се модифицира до заместен амин. Примерните N-терминални производни групи включват -NRR¹ (различно от -NH₂), -NRC(O)R¹, -NRC(O)OR¹, -NRS(O)₂R¹, -NHC(O)NHR¹, сукцинимид или бензилоксикарбонил-NH-(CBZ-NH), където R и R¹ независимо едно от друго са водород или нисш алкил и където фениловият пръстен може да бъде заместен с 1 до 3 заместители, подбрани от групата, състояща се от C₁-C₄ алкил, C₁-C₄ алкокси, хлоро и бром.

5. Свободният C-край е дериватизиран. Обикновено C-краят се естерифицира или амидира. Примерните C-терминални производни групи включват -C(O)R², където R² е нисш алкокси или -NR³R⁴, където R³ и R⁴ са независимо водород или C₁-C₈ алкил (за предпочитане C₁-C₄ алкил).

6. Дисулфидна връзка е заменена с друга, за предпочитане по-стабилна, кръстосано свързана част (примерно алкилен). Виж например Bhatnagar et al. (1996), J. Med. Chem. 39: 3814-9; Alberts et al. (1993) Thirteenth Am. Pep. Symp., 357-9.

7. Един или повече отделни аминокиселинни остатъка са модифицирани. Известни са разнообразни дериватизиращи агенти, които реагират специфично с подбрани странични вериги или терминални остатъци, както подборно е описано по-долу.

Лизинилови остатъци и аминотерминални остатъци могат да бъдат подложени на реакция с анхидриди на сукцинова или друга кар-

боксилна киселина, което обръща електрическият заряд на лизиниловите остатъци. Други подходящи реагенти за дериватизиране на алфа-аминосъдържащи остатъци включват имидоестери, например метил; пиколонимидат; пиридоксал фосфат; пиридоксал; хлороборохидрид; тринитробензенсулфонова киселина; О-метилизоурея; 2,4 пентандион; и катализирана с трансаминаза реакция с глиоксилат.

Аргинилови остатъци могат да се модифицират чрез реакция с произволен единичен реагент или комбинация от няколко конвенционални реагента, включително фенилглиоксал, 2,3-бутандион, 1,2-циклохександион и нинхидрин. Дериватизирането на аргинилови остатъци изисква реакцията да протече при алкални условия, поради високото рКа на гванидиновата функционална група. По-нататък тези реагенти могат да реагират с групите от лизин, както и аргинин епсилон-амино групата.

Специфични модификации на тирозинови остатъци са подробно изучени, като е обърнат специален интерес на интродуцирането на спектрални етикети в тирозиновите остатъци чрез реакция с ароматни диазониеви съединения или тетранитрометан. Най-често се използват N-ацетилимидазол и тетранитрометан, за да се образуват съответно О-ацетил тирозинови видове и 3-нитро производни.

Карбоксилни странично верижни групи (аспартил или глутамил) могат да бъдат селективно модифицирани чрез реакция с карбодиимиди ($R'-N=C=N-R'$), например 1-циклохексил-3-(2-морфолинил-(4-етил) карбодиимид или 1-етил-3-(4-азония-4,4-диметилпентил) карбодиимид. По-нататък аспартилови и глутамилови остатъци могат да бъдат преобразувани в аспарагинилови и глутаминилови остатъци чрез реакция с амониеви йони.

Глутаминилови и аспарагинилови остатъци могат да бъдат деамидирани до съответните глутамилови и аспартилови остатъци. Като друга възможност тези остатъци се деамидират при слабо киселинни условия. И двете форми на тези остатъци попадат в обхвата на това изобретение.

Цистеинилови остатъци могат да бъдат заменени с аминокиселинни остатъци или други части или за да се елиминира дисулфидното свързване, или, обратното, за да се стабилизира

кръстосаното съединяване. Виж например Bhatnagar et al. (1996), J. Med. Chem. 39: 3814-9.

Дериватизиране с бифункционални агенти е полезно за постигане на кръстосано свързване на пептидите или техни функционални производни до неразтворима във вода опорна матрица или до други макромолекулни носители. Обикновено използваните агенти за постигане на кръстосано свързване включват примерно 1,1-бис(диазоацетил)-2-фенилетан, глутаралдехид, N-хидроксисукцинимид естери, например, естери с 4-азидосалицилова киселина, хомобифункционални имидоестери, включително дисукцинимидил естери, примерно 3,3'-дитиобис(сукцинимидилпропионат) и бифункционални малимидами, примерно бис-N-малимида-1,8-октан. Дериватиращите агенти, примерно метил-3-[(p-азидофенил)дитио]пропиоимидат дават фотоактивируеми междинни съединения, които са способни да образуват кръстосани връзки в присъствието на светлина. Друга възможност е реактивни неразтворими във вода матрици, примерно цианоген бромид-активирани въглехидрати и реактивните субстрати, описани в US патенти № № 3,969,287; 3,691,016; 4,195,128; 4,247,642; 4,229,537; и 4,330,440, да се използват за имобилизиране на протеин.

Въглехидратни (олигозахаридни) групи могат удобно да се прикрепят към места, за които е известно, че са места за гликозилиране в протеини. Най-често О-свързани олигозахариди се прикрепят към серинови (Ser) или треонинови (Thr) остатъци, докато N-свързани олигозахариди се прикрепят към аспарагинови (Asn) остатъци, когато те са част от последователността Asn-X Ser/Thr, където X може да бъде произволна аминокиселина, освен пролин. За предпочитане X е една от 19-те природно срещани аминокиселини, различни от пролин. Структурите на N-свързани и О-свързани олигозахариди и захарните остатъци, откривани във всеки тип, са различни. Един вид захар, която обикновено се открива и при двата, е N-ацетилнеураминова киселина (наричана сиалова киселина). Сиаловата киселина обикновено е терминалният остатък както на N-свързани, така и на О-свързани олигозахариди и, благодарение на отрицателния си заряд, може да придаде киселинни свойства на гликозилираното съединение. Такова място (места) може да се инкорпорира в линке-

ра на съединенията от това изобретение и за предпочитане е гликозилирано чрез клетка по време на рекомбинантното производство на полипептидните съединения (примерно в клетки от бозайници, например CHO, BHK, COS). Такива места обаче могат да бъдат по-нататък гликозилирани чрез синтетични или полусинтетични процедури, познати на специалистите в тази област.

Други възможни модификации включват хидрозилиране на пролин и лизин, фосфоризиране на хидроксилни групи от серилни или треонилни остатъци, окисляване на серния атом в Cys, метилиране на алфа-амино групи от лизинови, аргининови и хистидинови странични вериги. Creighton, *Proteins: Structure and Molecule Properties* (Протеини: структура и молекулни свойства), W. H. Freeman & Co., San Francisco), с. 79-86 (1983).

Съединения от настоящото изобретение могат да бъдат променени също така и на ниво ДНК. ДНК последователността на произволна част от съединението може да бъде променена в кодони, които са по-съвместими с избраната клетка гостоприемник. За *E. coli*, което представява предпочитаната клетка гостоприемник, оптимизирани кодони са известни на специалистите в тази област. Кодони могат да бъдат заместени, за да се елиминират рестриктивните места, или за да се включат заглушени рестриктивни места, което може да подпомогне обработването на ДНК в избраната клетка гостоприемник. ДНК последователностите на носител, линкер и пептид могат да бъдат модифицирани, за да се включи всяка от преждеописаните промени на последователността.

Методи за получаване

Съединенията от това изобретение могат да бъдат направени предимно в трансформирани клетки гостоприемници чрез използване на рекомбинантни ДНК техники. За да се извърши това, се приготвя рекомбинантна ДНК молекула, кодираща пептида. Методи за получаване на такива ДНК молекули са добре познати на специалистите в тази област. Например, последователности, кодиращи пептидите, могат да бъдат изрязани от ДНК, като се използват рестриктивни ензими. Като друга възможност ДНК молекулата би могла да се синтезира посредством техники за химически синтез, примерно фосфорамид-

датен метод. Би могло да се използва също и комбинация от тези техники.

Изобретението се отнася също и до вектор, способен да експресира пептидите в подходящ гостоприемник. Векторът съдържа ДНК молекулата, която кодира пептидите, оперативно свързана към подходящи последователности за контрол на експресията. Методи да се въздейства върху това оперативно свързване, преди или след като ДНК молекулата е вмъкната във вектора, са добре познати. Последователностите за контрол на експресията включват промотори, активатори, подобрители, оператори, рибозомални присъединителни места, стартови сигнали, стоп сигнали, запущащи сигнали, сигнали за полиаденилиране и други сигнали, ангажирани при контрола на транскрибирането или тълкуването.

Резултантният вектор, имащ в себе си ДНК молекулата, се използва, за да се трансформира подходящ гостоприемник. Тази трансформация може да се осъществи посредством методи, които са добре познати на специалистите в тази област.

Всяка от многобройните налични и добре познати клетки гостоприемници може да се използва в практиката на това изобретение. Подбирането на конкретен гостоприемник зависи от множество фактори, признати от специалистите. Те включват например съвместимост с избрания вектор на експресия, токсичност на пептидите, кодирани чрез ДНК молекулата, степен на трансформиране, лекота на възстановяване на пептидите, характеристики на експресията, биобезопасност и разходи. Балансът на тези фактори трябва да бъде намерен с отчитане на факта, че не всички гостоприемници могат да са еднакво ефективни за експесиране на специфична ДНК последователност. В рамките на тези общи указания сред полезните микробни гостоприемници са бактерии (примерно *E. coli* sp.), дрожди (примерно *Saccharomyces* sp.) и други клетки от гъбички, насекоми, растения, бозайници (включително от човек) в култура, както и други известни на специалистите гостоприемници.

След това трансформираният гостоприемник се култивира и пречиства. Клетки гостоприемници могат да бъдат култивирани при конвенционални ферментационни условия, така че

да се експресират желаните съединения. Такива ферментационни условия са добре познати на специалистите в областта. Накрая пептидите се пречистват от културата чрез общоизвестни за специалистите методи.

Съединенията могат да се направят и чрез синтетични методи. Могат например да се използват техники за твърдофазов синтез. Подходящи техники са добре познати на специалистите в тази област и включват тези, описани в Merrifield (1973), *Chem. Polipeptides*, с. 335-61 (Katsoyannis and Panayotis eds.); Merrifield (1963), *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149; Davis et al. (1985), *Biochem. Intl.* 10: 394-414; Stewart and Young (1969), *Solid Phase Peptide Synthesis*: US патент № 3,941,763; Finn et al. (1976), *The Protein* (3rd ed.) 2: 105-253; и Erickson et al. (1976), *The Proteins* (3rd ed.) 2: 257-527. Твърдофазовият синтез е предпочитаната техника за получаване на отделни пептиди, тъй като той е най-рентабилният метод за направа на малки пептиди.

Съединения, които съдържат производни пептиди или които съдържат непептидни групи, могат да бъдат синтезирани чрез добре познати техники от органичната химия.

Използване на съединенията

Съединения от това изобретение могат да бъдат особено полезни за лечението на автоимунни заболявания, медирани от В клетки. По-специално, съединенията от това изобретение могат да бъдат полезни за лечение, превенция, подобрене, диагностика или прогнозиране на лупус, включително системна лупусна еритематоза (SLE), и свързани с лупус заболявания и състояния. Други предпочитани индикации включват медирани от В клетка ракови заболявания, включително В-клетъчна лимфома.

Съединенията от това изобретение могат също така да са полезни за лечение на възпалителни състояния на ставите. Възпалителните състояния на става са хронични ставни заболявания, които засягат и ограничават в различна степен дееспособността на милиони хора по света. Ревматоидният артрит е заболяване на ставните връзки, при което хрущялът и костта бавно еродират от пролиферативна инвазионна съединителна тъкан, наречена панус, която произхожда от синовиалната мембрана. Заболяването може да засяга пери-ставни структури, примерно бурси, сухожилийни капсули и сухожилия, как-

то и извънставни тъкани, като подкожни тъкани, сърдечносъдовата система, белите дробове, далака, лимфни възли, скелетни мускули, нервната система (централната и периферната) и очите (Silberberg (1985), *Anderson's Pathology*, Kissane (ed.), 11: 1828). Остеоартритът е разпространено ставно заболяване, за което са характерни дегенеративни промени в ставния хрущял и реактивна пролиферация на кост и хрущял около ставата. Остеоартритът е клетъчно-медиран активен процес, който може да е резултат от неподходящата ответна реакция на хондроцити към катаболни и анаболни стимули. Има данни за настъпване на промени в някои молекули на матрикса на ставния хрущял при ранния остеоартрит (Thonar et al. (1993), *Rheumatic disease clinics of North America*, Moskowitz (ed.), 19: 635-657 и Shinmei et al. (1992), *Arthritis Rheum.*, 35: 1304-1308). Смята се, че TALL-1, TALL-1R и техни модулатори са полезни при лечението на тези и сродни състояния.

Съединенията от това изобретение могат да са полезни също така при лечението на голям брой допълнителни заболявания и разстройства, включително:

- остър панкреатит;
- амиотрофна латерална склероза (ALS);
- болест на Алцхаймер;
- астма;
- атеросклероза;
- автоимунна хемолитична анемия;
- ракови заболявания, по-специално ракови заболявания, свързани с В клетките;
- кахексия/анорексия;
- синдром на хронична умора;
- цироза (примерно първична жлъчна цирроза);
- диабет (примерно инсулинов диабет);
- треска;
- гломерунефрит, включително IgA гломерунефрит и първичен гломерунефрит;
- синдром на добрите пасища;
- синдром на Гилиан-Бар;
- отхвърляне на присаден орган;
- тироидит на Хашимото;
- хеморагичен шок;
- хипералгезия;
- вътрешни възпалителни болести;
- възпалителни състояния на ставите, включително остеоартрит, псориазисен артрит и рев-

матоиден артрит;

възпалителни състояния в резултат на навяхвания, изкълчвания, увреждане на хрущяла, травма, ортопедична хирургия, инфекция или други болестни процеси;

инсулино-зависим диабет мелитус;

ишемични поражения, включително церебрална исхемия (примерно увреждане на мозъка в резултат на травма, епилепсия, кръвоизлив или удар, всяко от които може да доведе до невродегенерация);

намалена способност за заучаване;

белодробни заболявания (примерно остър респираторен дистрес-синдром (ARDS));

множествена миелома;

множествена склероза;

Миастения гравис;

миелогенозни (примерно остра миелоидна левкемия (AML) и хронична миелоцитна левкемия (CML)) и други левкемии;

миопатии (примерно мускулен белтъчен метаболизъм, и по-специално при сепсис);

невротоксичност (примерно предизвикана от HIV);

остеопороза;

болка;

болест на Паркинсон;

пемфигус;

полимиозит/дерматомиозит;

белодробни възпаления, включително автоимунни белодробни възпаления;

преждевременни родилни болки;

псориазис;

болест на Райтер;

реперфузионни увреждания;

септичен шок;

странични ефекти отлъчева терапия;

синдром на Съогрен;

смущения в съня;

заболяване на слепоочната челюстна става;

тромбоцитопения, включително идиопатична тромбоцитопения и автоимунна неонатална тромбоцитопения;

туморни метастази;

увейт; и

васкулит.

Съединенията от това изобретение могат да се прилагат самостоятелно или в комбинация с терапевтично ефективно количество от други лекарствени средства, включително обезболяващи

агенти, модифициращи заболяването противоревматични лекарствени средства (DMARDs), нестероидни противовъзпалителни медикаменти (NSAIDs) и произволни имунни и/или възпалителни модулатори. Следователно съединенията от това изобретение могат да бъдат прилагани със:

Модулатори на други членове на семейството TNF/TNF рецептори, включително TNF антагонисти, примерно етанерцепт (Enbrel™), sTNF-RI, онерцепт, D2E7 и Remicade™.

Модулатори на фактора на растежа на нервите (NGF).

IL-1 инхибитори, включително IL-1ra молекули, примерно анакинра и откритите насоро IL-1ra-подобни молекули, примерно IL-1Hu1 и IL-1Hu2; IL-1 молекули "капани", каквито са описани в US патент № 5,844,099, издаден на 1 декември 1998; IL-1 антитела; IL-1 рецептор с подобрена разтворимост и други подобни.

IL-6 инхибитори (примерно антитела на IL-6).

IL-8 инхибитори (примерно антитела на IL-8).

IL-18 инхибитори (примерно присъединяващ се към IL-18 протеин, IL-18 рецептор с подобрена разтворимост или IL-18 антитела).

Модулатори на интерлевкин-1 преобразуващ ензим (ICE).

Инсулиноподобни фактори на растежа (IGF-1, IGF-2) и техни модулатори.

Трансформиращ растежен фактор-бета (TGF-бета), членове на семейството TGF-бета и TGF-бета модулатори.

Модулатори на фибробластни растежни фактори от FGF-1 до FGF-10 и FGF.

Остеопротегерин (OPG), OPG аналози, остеопротектиращи агенти и антитела на OPG-лиганд (OPG-L).

Костни анаболни агенти, примерно паратироиден хормон (PTH), PTH фрагменти и молекули, инкорпориращи PTH фрагменти (примерно PTH (1-34)-Fc).

PAF антагонисти.

Кератиноцитен растежен фактор (KGF), KGF-сродни молекули (примерно KGF-2) и KGF модулатори.

COX-2 инхибитори, примерно Celebrex™ и Vioxx™.

Простагландинови аналози (примерно Е серийни простагландини).

Модулатори на матриксна металопротеиназа (MMP).

Модулатори на синтез на азотен оксид (NOS), включително модулатори на NOS, който може да се предизвика.

Модулатори на глюкокортикоиден рецептор.

Модулатори на глутаматен рецептор.

Модулатори на липополизахаридни (LPS) нива.

Противоракови агенти, включително инхибитори на онкогени (примерно fos, jun) и интерферони.

Норадреналин и модулатори и техни имитации.

Фармацевтични състави

Общо. Настоящото изобретение се отнася също до методи за използване на фармацевтични състави от съединенията съгласно изобретението. Такива фармацевтични състави могат да се предназначени за прилагане чрез инжектиране или за орално, пулмонално, назално, трансдермално или други форми на приложение. Най-общо казано, изобретението обхваща фармацевтични състави, съдържащи ефективни количества от съединение съгласно изобретението заедно с фармацевтично приемливи разредители, консерванти, подобрители на разтворимостта, емулгатори, помощни вещества и/или носители. Такива състави включват разредители с различно буферно съдържание (примерно Tris-HCl, ацетат, фосфат), рН и йонна сила; добавки, примерно детергенти и повишаващи разтворимостта агенти (солубилизиращи агенти) (примерно Tween 80, Polysorbate 80), антиоксиданти (примерно аскорбинова киселина, натриев метабисулфат), консерванти (примерно Тимерсол, бензилов алкохол) и увеличаващи обема вещества (примерно лактоза, манитол); смесване на материали в състоящи се от отделни частици препарати от полимерни съединения, примерно полиактинова киселина, полигликолна киселина и т. н., или в липозоми. Може да се използва и хиалуронова киселина и това може да има ефект, изразяващ се в удължаване на времетраенето на циркулация. Такива състави могат да окажат влияние върху физическото състояние, стабилността, скоростта на отделянето *in vivo* и ско-

ростта на прочистването *in vivo* на присъстващите протеини и производни съединения. Виж примерно Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042) с. 1435-1712, който източник се включва към настоящия текст чрез отпратката към неговата цялост. Съставите могат да са приготвени в течна форма или могат да бъдат във вид на подсушен прах, примерно лиофилизирана форма. Предвидени са също и имплантируеми рецептури за забавено освобождаване, каквито са трансдермалните рецептури.

Орални дозирани форми. Тук са предвидени твърди орални дозирани форми, описани най-общо в глава 89 на Remington's Pharmaceutical Sciences (1990), 18th Ed., Mack Publishing Co. Easton PA 18042, който източник се включва към този текст чрез отпратката към неговата цялост. Твърдите дозирани форми включват таблетки, капсули, хапчета, дражета или таблетки за смучене, вулинки или пелети. За включване в рецептури на съединенията съгласно изобретението могат да се използват и липозомално или протеиноидно капсулиране (като например протеиноидни микросфери, докладвани в US патент № 4,925,673). Може да се използва липозомално капсулиране и липозомите могат да се дериватизират с различни полимери (примерно US патент № 5,013,556). Описание на възможни твърди дозирани форми за терапевтика е дадено в глава 10 на Marshall, K., Modern Pharmaceutics (Модерна фармация), 1979, под редакцията на G. S. Banker и C. T. Rhodes, който източник се включва към настоящия текст чрез позоваването в неговата цялост. Най-общо казано, рецептурата ще включва съединение съгласно изобретението и инертни съставки, които позволяват защита срещу стомашната среда и освобождаване на активния материал в червата.

Специално са предвидени и орални дозирани форми на гореописаните съединения съгласно изобретението. Ако е необходимо, съединенията могат да бъдат химически модифицирани така, че оралното приемане да е ефикасно. Най-общо казано, предвиденото химическо модифициране представлява прикрепяне на поне една част към самата молекула от съединението, като въпросната част позволява (а) инхибиране на протеолиза; и (б) всмукване в кръвния поток от стомаха или червата. Желателно е също уве-

личаването на общата стабилност на съединението и удължаване на времетраенето на циркулация в тялото. За тази цел могат да бъдат използвани също и части, полезни като ковалентно свързани носители в това изобретение. Примерите на такива части включват: PEG, кополимери на етиленов гликол и пропиленов гликол, карбоксиметилцелулоза, декстран, поливинилалкохол, поливинилпиридон и полипролин. Виж например Abuchowski and Davis, *Soluble Polymer-Enzyme Adducts, Enzymes as Drugs* (1981), Hocenberg and Roberts, eds., Wiley-Interscience, New York, NY, с. 367-83; Newmark, et al. (1982), *J. Appl. Biochem.* 4: 185-9. Други полимери, които могат да се използват, са поли-1,3-диоксолан и поли-1,3,6-тиоксокан. Предпочитани за фармацевтична употреба, както бе посочено по-горе, са PEG части.

За дозиращи форми за орално приложение е възможно да се използва също сол на модифицирана алифатна аминокиселина, примерно натриев N-(8-[2-хидроксibenзоил]амино)каприлат (SNAC), в качеството на носител, който да повиши абсорбцията на терапевтичните съединения съгласно изобретението. Клиничната ефикасност на хепаринова рецептура, използваща SNAC, е демонстрирана в изпитание на Phase II, проведено от Emisphere Technologies. Виж US патент № 5,792,451 "Oral drug delivery composition and methods" (Състав за орално приемани таблетки и методи).

Съединенията от това изобретение могат да бъдат включени в рецептурата като смес от множество фини частици под формата на гранули или хапчета от частици с големина около 1 mm. Рецептурата на материала за приложение чрез капсули може да бъде също прах, леко компресирани вложки или дори като таблетки. Терапевтикът може да бъде приготвен чрез компресиране.

Оцветители и ароматизиращи агенти също могат да бъдат включени. Например протеинът (или производното съединение) може да бъде включено в рецептура (примерно чрез липозомно или микросферично капсулиране) и след това да бъде поместено в ядивен продукт, примерно замразени напитки, съдържащи оцветители и ароматизиращи агенти.

Възможно е съединението съгласно изобретението да се разрежи или да се увеличи обе-

мът му с инертен материал. Такива разредители биха могли да включват въглехидрати, и по-специално манитол, алфа-лактоза, безводна лактоза, целулоза, цукроза, модифицирани декстрини и скорбяла. Определени неорганични соли, сред които са калциев трифосфат, магнезиев карбонат и натриев хлорид, могат да се използват също като филтри. Някои предлагани в търговската мрежа разредители са Fast-Flo, Emdex, STA-Rx 1500, Emcompress и Avicell.

Дезинтегратори могат да бъдат включени в рецептурата на терапевтика в твърдите дозиращи форми. Материалите, използвани като дезинтегратори, включват, но без да се изчерпват с тях, скорбяла, включително предлаганият в търговската мрежа дезинтегратор на базата на скорбяла Explotab. Могат да се използват натриев нишестен гликолат, Амберлит, натриева карбоксиметилцелулоза, ултрамилопектин, натриев алгинат, желатин, портокалова кора, киселинна карбоксиметилцелулоза, естествен сунгер и бентонит. Друга форма на дезинтегратори са неразтворимите катионообменни смоли. Разпрашени клейове също могат да се използват в качеството на дезинтегратори или свързващи вещества, като тези разпрашени клейове могат да са примерно агар-агар, Карайа или трагант. Алгинова киселина и нейни натриеви соли са също полезни като дезинтегратори.

Свързващи вещества могат да се използват, за да поддържат целостта на терапевтичния агент при направата на твърди таблетки, и включват материали от естествени продукти, примерно акация, трагант, скорбяла и желатин. Други включват метилова целулоза (MC), етилова целулоза (EC) и карбоксиметилова целулоза (CMC). Поливинилов пиридон (PVP) и хидроксипропилметилова целулоза (HPMC) могат да се използват в алкохолни разтвори, за да се гранулира терапевтикът.

Антифрикционен агент също може да бъде включен в рецептурата на терапевтика, за да предотврати сцепването в процеса на изпълнение на рецептурата. Смазващи вещества (лубриканти) могат да бъдат използвани като слой между терапевтика и сляпа стена и те могат да включват, но без да се изчерпват с тях: стеаринова киселина, включително нейните магнезиеви и калциеви соли, политетрафлуоретилен (PTFE), течен парафин, растителни масла и

восьци. Могат да се използват и разтворими смазки, примерно натриев лаурил сулфат, магнезиев лаурил сулфат, полиетиленов гликол с различни молекулни тегла, Carbowax 4000 и 6000.

С цел да се подобри пренареждането на съставките при компресиране могат да се добавят глйданти, които подобряват пластичните свойства на лекарството при изпълнението на рецептурата. Глйдантите могат да включват скорбяла, талк, пирогенен кварц и хидратиран силикоалуминат.

За да се подпомогне разтварянето на съединението от това изобретение във водна среда, би могло да се добави повърхностно активно вещество като омекрящ агент. Повърхностно активни вещества могат да включват анионни детергенти, примерно натриев лаурил сулфат, диоктил натриев сулфосукцинат и диоктил натриев сулфонат. Могат да се използват катионни детергенти, сред които бензалкониев хлорид или бензетониев хлорид. В списъка от потенциални нейонни детергенти, които могат да се включат в рецептурата като повърхностно активни вещества, са лауромакрогол 400, полиоксил 40 стеарат, полиоксиетилен хидрогенирана боброва мас 10, 50 и 60, глицеролов моностеарат, полисорбат 40, 60, 65 и 80, естер на цукрозна мастна киселина, метилова целулоза и карбоксиметилова целулоза. Тези повърхностно активни вещества могат да присъстват в рецептурата на протеина или производното съединение както самостоятелно, така и като смеси в различни съотношения.

За да се подобри всмукването на съединението в рецептурата могат да се включат и добавки. Добавки, които потенциално имат това свойство, са например масните киселини олеинова киселина, линолеова киселина и линоленова киселина.

Могат да са желателни рецептури с контролирано отделяне. Съединението от това изобретение може да бъде инкорпорирано в инертна матрица, която позволява освобождаване или посредством дифузия, или чрез механизми на разтопяване; примерно дъвки. В рецептурата могат да се инкорпорират също бавно разграждащи се матрици, примерно алгинати, полизахариди. Друга форма за контролирано освобождаване на съединенията от това изобретение е метод, основаващ се на Орос терапевтичната система (Alza Corp.), т. е., лекарството е затво-

рено в полупропусклива мембрана, която позволява на водата да влиза в нея и да изтласква лекарството през единствен малък отвор благодарение на осмотичните ефекти. Някои ентерични покрития също имат ефект на забавено освобождаване.

В рецептурите могат да се използват и други покрития. Те включват разнообразие от захари, които могат да се нанасят в съд за покрития. Терапевтичният агент може също да се дава като таблетки с филм-покритие, като използваните в този случай материали са разделени в 2 групи. Първата са неентеричните материали и включват метилова целулоза, етилова целулоза, хидроксиметилова целулоза, метилхидроксиметилова целулоза, хидроксипропилова целулоза, хидроксипропил-метилова целулоза, натриево-карбокси-метилова целулоза, провидон и полиетиленовите гликоли. Втората група се състои от ентерични материали, които обикновено са естери на фталова киселина.

За да се осигури оптимално филм-покритие може да се използва смес от материали. Нанасянето на филм-покритието може да се осъществи в тава за покрития или във флуидно легло или чрез компресорно покриване.

Форми за пулмонално доставяне. В това описание се има предвид и пулмонално доставяне на настоящия протеин (или негови производни). Протеинът (или производно) се доставя в белите дробове на бозайник като се вдишва и преминава през епителния слой на белия дроб в кръвния поток. (Други доклади върху това са: Adjei et al., *Pharma. Res.* (1990) 7: 565-9; Adjei et al. (1990), *Internatl. J. Pharmaceutics* 63: 135-44 (левпролид ацетат); Braquet et al. (1989), *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 13 (suppl. 5): s. 143-146 (ендотелин-1); Hubbard et al. (1989), *Annals Int. Med.* 3: 206-12 (алфа1-антитрипсин); Smith et al. (1989), *J. Clin. Invest.* 84: 1145-6 (алфа1-протеиназа); Oswein et al. (March 1990), "Aerosolization of Proteins", *Proc. Symp. Resp. Drug Delivery II*, Keystone, Colorado (рекомбинантен човешки хормон на растежа); Debs et al. (1988), *J. Immunol.* 140: 3482-8 (интерферон-гама и туморен некрозисен фактор алфа) и Platz et al., US патент № 5,284,656 (фактор, стимулиращ гранулоцитни колонии).

Практическото приложение на това изобретение предвижда използването на широка га-

ма от механични устройства, проектирани за пулмонално внасяне на терапевтични продукти, включително, но без да се изчерпват с тях, пулверизатори, дозиметриращи инхалатори и прахови инхалатори, всички от които са познати на специалистите в тази област. Някои специални примери за предлагани на пазара устройства, които са подходящи за практическото приложение на това изобретение, са: пулверизаторът Ultravent, произведен от Mallinckrodt, Inc., Сейнт Луис, Мисури; пулверизаторът Acorn II, произведен от Marquest Medical Products, Йигълууд, Колорадо; дозиметриращият инхалатор Ventolin, произведен от Glaxo Inc., Research Triangle Park, Северна Каролина; и прахов инхалатор Spinhaler, произведен от Fisons Corp., Бедфорд, Масачузетс.

Всички тези устройства изискват използването на рецептури, подходящи за дозирането на съединението съгласно изобретението. Обикновено всяка рецептура е специфична според типа на употребяваното устройство и може да включва използване на подходящ изхвърлящ материал, в допълнение към разреждатели, помощни вещества и/или носители, полезни за терапията.

Най-благоприятно е съединението съгласно изобретението да се приготвя във форма на частици със средна големина, по-малка от 10 μm (или микрона), най-предпочитано от 0,5 до 5 μm , за най-ефективно доставяне до крайните участъци на белия дроб.

Фармацевтично приемливите носители включват въглехидрати, примерно трехалоза, манитол, ксилитол, сукроза, лактоза и сорбитол. Други съставки за използване в рецептурите могат да са DPPC, DOPE, DSPC и DOPC. Могат да се използват естествени или синтетични повърхностно активни вещества. Може да се използва PEG (независимо от неговото използване при дегидратизирането на протеин или аналог). Могат да се използват декстрирани, примерно циклодекстрирани. Могат да се използват жлъчни соли и други сродни подобрители. Могат да се използват целулоза и целулозни производни. Могат да се използват аминокиселини, примерно да се използват в буферни рецептури.

Предвижда се също така употребата на липозоми, микрокапсули или микросфери, примесни комплекси или други видове носители.

Рецептури, подходящи за употреба с пул-

веризатори - реактивни, или ултразвукови, обикновено биха съдържали съединението съгласно изобретението, разтворено във вода при концентрация от около 0,1 до 25 mg от биологично активен протеин на ml от разтвора. Рецептурата може да включва също буфер и проста захар (примерно за стабилизиране на протеин и регулиране на осмотичното налягане). Пулверизаторната рецептура може също да съдържа повърхностно активно вещество с цел да се намали или предотврати повърхностно предизвикваното струпване, причинено от атомизиране на разтвора при образуването на аерозол.

Рецептурите за използване с дозиметриращо инхалаторно устройство по принцип съставляват фин прах, съдържащ изобретеното съединение, суспензирано в задвижващо вещество с помощта на повърхностно активно вещество. Задвижващото вещество може да бъде всеки конвенционален материал, употребяван за целта, примерно хлорофлуоровъглерод, хидрохлорофлуоровъглерод, хидрофлуоровъглерод или въгледород, включително трихлорофлуорометан, дихлородифлуорометан, дихлоротетрафлуороетанол, 1,1,1,2-тетрафлуороетан или техни комбинации. Сред подходящите повърхностно активни вещества са сорбитан триолеат и соев лецитин. Олеиновата киселина също може да е полезна като повърхностно активно вещество.

Рецептури за разпръскване от прахов инхалатор ще включват фин подсушен прах, съдържащ изобретеното съединение, и могат също да включват увеличаващ обема агент, примерно лактоза, сорбитол, сукроза, манитол, трехалоза или ксилитол в количества, които улесняват разпръскването на праха от устройството, примерно от 50 до 90 % тегловни от рецептурата.

Форми за назално доставяне. Предвижда се и назално доставяне на съединението съгласно изобретението. Назалното доставяне позволява преминаването на протеина в кръвния поток директно след прилагането на терапевтичния продукт в носа, без да е необходимо достигането на продукта до белия дроб. Рецептурите за назално доставяне включват тези с декстран или циклодекстран. Има се предвид също и доставяне посредством пренасяне през друга лигавица.

Дозировки. Режимът на дозиране, обхва-

нат в метод за лечение на гореописаните състояния, ще бъде определен от лекуващия лекар, като се вземат под внимание разнообразни фактори, които модифицират действието на медикаментите, примерно възрастта, кондицията, телесното тегло, полът и диетата на пациента, тежестта на инфекцията, продължителността на прилагане и други клинични фактори. По принцип дневният режим следва да бъде в обхвата 0,1-1000 microg от изобретеното съединение на kg телесно тегло, за предпочитане 0,1-150 microg/kg.

Специфични предпочитани реализации

Изобретателите са определили предпочитани структури за предпочитаните пептиди, изброени в таблица 4 по-долу. Символът "Λ" може да бъде произволен от тук описаните линкери или може просто да представлява нормална пептидна връзка (примерно такава, че да не присъства никакъв линкер). За яснота тандемните повторения и линкерите са разделени с тирета.

Таблица 4. Предпочитани реализации

Последователност/структура	SEQ. ID. №:
LPGCKWDLLIKQWVCDPL-Λ-V ¹	44
V ¹ -Λ-LPGCKWDLLIKQWVCDPL	45
LPGCKWDLLIKQWVCDPL-Λ-LPGCKWDLLIKQWVCDPL-Λ-V ¹	46
V ¹ -Λ-LPGCKWDLLIKQWVCDPL-Λ-LPGCKWDLLIKQWVCDPL	47
SADCYFDILTKSDVCTSS-Λ-V ¹	48
V ¹ -Λ-SADCYFDILTKSDVCTSS	49
SADCYFDILTKSDVTSS-Λ-SADCYFDILTKSDVTSS-Λ-V ¹	50
V ¹ -Λ-SADCYFDILTKSDVTSS-Λ-SADCYFDILTKSDVTSS	51
FHDCKWDLLTKQWVCHGL-Λ-V ¹	52
V ¹ -Λ-FHDCKWDLLTKQWVCHGL	53
FHDCKWDLLTKQWVCHGL-Λ-FHDCKWDLLTKQWVCHGL-Λ-V ¹	54
V ¹ -Λ-FHDCKWDLLTKQWVCHGL-Λ-FHDCKWDLLTKQWVCHGL	55

“V¹” е Fc домен, както вече беше описано тук. В допълнение към изброените в таблица 4, изобретателите по-нататък предвиждат хетеродимери, в които всяка нишка от Fc димер е свързана към различна пептидна последователност; например, в която всеки Fc е свързан към различна последователност, подбрана от таблица 2.

Всички съединения от това изобретение могат да бъдат получени чрез методи, описани в РСТ заявка № WO 1999/025044.

Изобретението ще бъде описано по-подробно чрез следните работни примери, които са по-скоро илюстративни, отколкото ограничителни.

Пример 1

Пептиди

Пептидно бактериофагово експониране

1. Приготвяне на магнитни перли

A. Имобилизирание на Fc-TALL-1 върху магнитни перли

Рекомбинантният Fc-TALL-1 протеин беше имобилизиран върху Протеин А Дайнабийдс (Dynal) при концентрация 8 µg от Fc-TALL-1 на 100 µl от общия запас перли, доставени от производителя. Чрез притегляне на перлите към единия край на епруветката с помощта на магнит и отстраняване на течността чрез пипета перлите бяха промити двукратно с фосфатния буферен солен разтвор (PBS) и отново разтворени в PBS. Fc-TALL-1 протеинът беше добавен към промитите перли в горепосочената концентрация и инкубиран с въртене в продължение на 1 h при стайна температура. Покритите с Fc-TALL-1 перли бяха след това блокирани чрез добавяне на говежди серум албумин (BSA) до 1 % крайна концентрация и инкубирани до следващия ден при 4°C с въртене. Резултатните покрити с Fc-TALL-1 перли бяха след това промити двукратно с PBST (PBS с 0,05 % Tween-20), преди да бъдат подложени на процедурите за подбор (селекция).

B. Приготвяне на перли за отрицателен подбор

Бяха приготвени допълнителни перли за отрицателен подбор. За всяко условие на обработване по 250 µl от запаса от перли, доставен от производителя, бяха подложени на горната процедура (секция 1A) с изключение на това, че стъпката за инкубиране с Fc-TALL-1 беше пропусната. При последната стъпка на промиване перлите бяха разделени на пет аликвоти по 50

µl.

2. Подбиране на присъединяващ се към TALL-1 бактериофаг

A. Цялостна стратегия

Бяха използвани две библиотеки от нишкови бактериофаги, TN8-IX (5×10^9 независими трансформанти) и TN12-I ($1,4 \times 10^9$ независими трансформанти) (Duax Corp.), за да се подбере присъединяващ се към TALL-1 бактериофаг. Всяка библиотека беше подложена или на pH2 елуиране, или на “перлено елуиране” (секция 2E). Следователно, четири различни условия на обработване бяха изпълнени за TALL-1 проекта (TN8-IX с използване на метод за pH2 елуиране, TN8-IX с използване на метод за перлено елуиране, TN12-I с използване на метод за pH2 елуиране и TN12-I с използване на метод за перлено елуиране). За всяко условие на обработване бяха проведени три цикъла на подбор.

B. Отрицателен подбор

За всяко условие на обработване по около 100 случайни библиотечни еквивалента (5×10^{11} pfu за TN8-IX и $1,4 \times 10^{11}$ pfu за TN12-I) бяха отделени в аликвоти от общия библиотечен запас и разреждени до 300 µl с PBST. След като течността от последното промиване беше изтеглена от първата аликвота от 50 µl от перлите, приготвени за отрицателен подбор (секция 1B), към перлите бяха добавени 300 µl от разреждения библиотечен запас. Резултатната смес беше инкубирана в продължение на 10 min при стайна температура с ротация. Фаговата супернатанта беше изтеглена посредством магнит и прибавена към втората аликвота от 50 µl за друга стъпка на отрицателен подбор. По този начин бяха проведени пет стъпки за отрицателен подбор.

C. Подбор с използване на перлите с покритие от Fc-TALL-1 протеин

Фаговата супернатанта, получена след последната стъпка на отрицателен подбор (секция 1B), беше прибавена към покритите с Fc-TALL-1 протеин перли, получени след последната стъпка на промиване (секция 1A). Тази смес беше инкубирана с ротиране в продължение на 2 h при стайна температура, за да се позволи на специфичен фаг да се присъедини към протеина-цел. След отстраняването на супернатанта перлите бяха промити седем пъти с PBST.

D. pH2 елуиране на присъединения фаг

След последната стъпка на промиване (секция 2C) присъединените фаги бяха елуирани от магнитните перли чрез добавяне на 200 μ l CBST (50 mM натриев цитрат, 150 mM натриев хлорид, 0,05 % Tween-20, pH2). След 5-минутно инкубиране при стайна температура течността, съдържаща елуирания бактериофаг, беше изтеглена и преместена в друга епруветка. Стъпката на елуиране беше повторена отново, като бяха прибавени 200 μ l от CBST и беше инкубирано в продължение на 5 min. Течностите от двете стъпки на елуиране бяха събрани заедно и бяха прибавени 100 μ l от 2 M Tris разтвор (pH 8) за неутрализиране на pH. Бяха добавени 500 μ l разтвор от Min A соли (60 mM K_2HPO_4 , 33 mM KH_2PO_4 , 7,6 mM $(NH_4)_2SO_4$ и 1,7 mM натриев цитрат), за да се получи краен обем 1 ml.

E. "Перлено елуиране"

След като течността от последното промиване беше изтеглена (секция 2C), към перлите беше добавен 1 ml разтвор от Min A соли. Тази смес от перли беше добавена директно към концентрирана бактериална проба за инфектиране (секции 3A и 3B).

3. Увеличаване

A. Приготвяне на клетки за посевка

Прясна *E. coli* (XL-1 Blue MRF') култура беше отгледана до $OD_{600} = 0,5$ в LB среда, съдържаща 12,5 μ g/ml тетрациклин. За всяко условие на обработване по 20 ml от тази култура бяха изстудени върху лед и центрофугирани. Бактериалната пелета беше ресуспендирана в 1 ml разтвор от Min A соли.

B. Трансдукция

Всяка смес от различните методи за елуиране (секции 2D и 2E) беше прибавена към концентрирана бактериална проба (секция 3A) и инкубирана при 37°C в продължение на 15 min. Към всяка смес бяха прибавени по 2 ml от NZCYM средата (2 x NZCYM, 50 μ g/ml ампицилин) и беше инкубирано при стайна температура в продължение на 15 min. Резултатният разтвор с обем 4 ml беше разстлан върху голяма NZCYM агарова плочка, съдържаща 50 μ g/ml ампицилин, и инкубиран до следващия ден при 37°C.

C. Обиране на бактериофага

Всяка от смесите бактерия/фаг, отгледана

през нощта върху голямата NZCYM агарова плочка (секция 3B), беше изстъргана в 35 ml от LB среда и агаровата плочка беше допълнително промита с още 35 ml от LB средата. Резултатната смес бактерия/фаг в LB среда беше центрофугирана така, че бактерията да се отдели в пелета. 50 ml от бактериофаговата супернатанта бяха преместени в нова епруветка, бяха добавени 12,5 ml от PEG разтвор (20 % PEG 8000, 3,5 M амониев ацетат) и беше инкубирана върху лед за 2 h, за да преципитират бактериофагите. Преципитираните бактериофаги бяха центрофугирани до утаяване и ресуспендирани в 6 ml от фаговия ресуспензионен буфер (250 mM NaCl, 100 mM Tris pH8, 1 mM EDTA). Този фагов разтвор беше след това допълнително пречистен чрез отцентрофугиране на останалите бактерии и преципитиране за втори път на фага посредством добавяне на 1,5 ml от PEG разтвора. След центрофугиране фаговата пелета беше отново суспендирана в 400 μ l PBS. Този разтвор беше подложен на финално центрофугиране за отстраняване на бактериалните останки. Полученият фагов препарат беше титруван посредством стандартен анализ за образуване на плака (Molecular Cloning, Maniatis et al., 3rd Edition).

4. Два допълнителни цикъла на подбор и увеличаване.

Във втория цикъл увеличеният фаг (10^{10} rfu) от първия цикъл (секция 3C) беше използван като изходен фаг за провеждане на стъпките на подбор и увеличаване (секции 2 и 3). Увеличеният фаг (10^{10} rfu) от втория цикъл беше използван като изходен фаг за провеждане на трети цикъл на подбор и увеличаване (секции 2 и 3). След стъпките на елуиране (секции 2D и 2E) в третия цикъл малка фракция от елуирания фаг беше разстлана върху плочка, както при анализа за образуване на плака (секция 3C). Отделните плаки бяха откъснати и поставени в микротитърни плочки с 96 гнезда, съдържащи по 100 μ l от TE буфер във всяко гнездо. Тези контролни плочки бяха инкубирани в инкубатор с температура 37°C в продължение на 1 h, за да се даде възможност на фагите да елуират в TE буфера.

5. Клонален анализ (фагова ELISA и определяне на последователностите)

Фаговите клонове бяха анализирани посредством фагова ELISA и методи за определяне

на последователностите. Последователностите бяха класирани въз основа на комбинираните резултати от тези две изследвания.

А. Фагова ELISA

XL-1 Blue MRF⁺ култура беше отгледана, докато OD₆₀₀ достигне 0,5. По 30 µl от тази култура бяха разпределени на аликвоти във всяко гнездо на микротитърна плочка с 96 гнезда. Към всяко гнездо бяха добавени по 10 µl от елуирания фаг (секция 4) и той бе оставен да инфицира бактерията за 15 min при стайна температура. Към всяко гнездо бяха прибавени по 130 µl от LB средата, съдържаща 12,5 µg/ml тетрациклин и 50 µg/ml ампицилин. Микротитърната плочка беше инкубирана до следващия ден при температура 37°C. Рекombинантният TALL-1 протеин (1 µg/ml в PBS) беше оставен да образува покритие върху Maxisorp плочки с 96 гнезда (NUNC) до следващия ден при температура 4°C. За контрол отделна Maxisorp плочка беше покрита с рекombинантния Fc-Trail протеин със същата моларна концентрация като TALL-1 протеина.

На следващия ден течности в покритите с протеин Maxisorp плочки бяха отстранени и всяко гнездо беше блокирано с 300 µl от 2 % BSA разтвор при 37°C в продължение на 1 h. BSA разтворът беше отстранен и гнездата бяха промити трикратно с PBST разтвора. След последното промиване към всяко гнездо на покритите с протеин Maxisorp плочки бяха прибавени по 50 µl от PBST. Всяка от 50-микролитровите отгледани през нощта култури в микротитърната

плочка с 96 гнезда беше прехвърлена в съответното гнездо на плочките с покритие от TALL-1, както и контролните покрити с Fc-Trail плочки. 100-микролитровите смеси в двата вида плочки бяха инкубирани в продължение на 1 h при стайна температура. Течността беше отстранена от Maxisorp плочките и гнездата бяха промити 5 пъти с PBST. HRP-спрегнатото анти-M13 антитяло (Pharmacia) беше разрежено до 1:7,500 и по 100 µl от разрежения разтвор бяха прибавени към всяко гнездо на Maxisorp плочките за 1-часово инкубиране при стайна температура. Течността отново беше отстранена и гнездата бяха промити седем пъти с PBST. Към всяко гнездо бяха добавени по 100 µl от тетраметилбензидинов (TMB) субстрат (Sigma) за предизвикване на оцветителна реакция и реакцията беше спряна с 50 µl от 5 N H₂SO₄ разтвор. OD₄₅₀ беше разчетен върху четец за микротитърни плочки (Molecular Devices).

В. Определяне на последователностите на бактериофаговите клонове.

За всеки бактериофагов клон темплейтът за определяне на последователностите беше приготвен чрез PCR метод. За да се увеличат около 500 нуклеотидни фрагмента, беше използвана следната олигонуклеотидна двойка:

праймер # 1 (5'-CGGCGCAACTATCGG TATCAAGCTG-3') (SEQ ID №: 56)

и праймер # 2 (5'-CATGTACCGTAAC ACTGAGTTTCGTC-3') (SEQ ID №: 57)

За всеки клон бяха приготвени следните смеси.

Реагенти	обем (µL)/епруветка
dH ₂ O	26,25
50 % глицерол	10
10B PCR буфер (без MgCl ₂)	5
25 mM MgCl ₂	4
10 mM dNTP смес	1
100 µM праймер 1	0,25
100 µM праймер 2	0,25
Taq полимераза	0,25
Бактериофаг в ТЕ (секция 4)	3
Краен реакционен обем	50

Термоциклерът (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) беше използван за провеждане на следната програма: 94°C в продължение на 5 min; [94°C в продължение на 30 s, 55°C в продължение на 30 s, 72°C в продължение на 45 s] x 30 цикъла; 72°C в продължение на 7 min; охлаждане до 4°C. PCR продуктът беше проверен посредством прокаране на 5 microl от всяка PCR реакция върху 1 % агарозен гел. PCR продуктът в останалите 45 microl от всяка реакция беше пречистен чрез използване на пречистващия комплект QIAquick Multiwell PCR Purification kit (Qiagen), следвайки протокола на производителя. След това последователностите на резултатния продукт бяха определени посредством апаратурата ABI 377 Sequencer (Perkin-Elmer), следвайки препоръчания от производителя протокол.

6. Класиране на последователностите и определяне на консенсусна последователност

А. Класиране на последователностите

Пептидните последователности, които бяха транслирани от различни нуклеотидни последователности (секция 5B), бяха корелирани към данните от ELISA. Клоновете, които показаха висок OD₄₅₀ в гнездата с TALL-1 обвивка и нисък OD₄₅₀ в гнездата с Fc-Trail обвивка, бяха оценени като по-важни. Последователностите, които се срещаха многократно, бяха също оценени като важни. Въз основа на тези критерии бяха избрани последователности-кандидати за по-нататъшен анализ като пептиди или пептитела. От TN8-IX и TN12-I библиотеките бяха подбрани съответно пет и девет пептидни последователности-кандидати.

В. Определяне на консенсусна последователност

Повечето последователности, подбрани от TN12-I библиотеката, съдържаха много консервиран DBL мотив. Този мотив беше наблюдаван също и в последователности, подбрани от TN8-IB библиотеката. Друг мотив - PFPWE (SEQ ID №: 110) беше също наблюдаван в последователности, получени от TN8-IB библиотеката.

Консенсусен пептид - FHDCKWDLTKQ WVCHGL (SEQ ID №: 58), беше построен въз

основа на DBL мотива. Тъй като пептидите, произхождащи от TN12-I библиотеката, бяха най-активните, първите 26 пептидни последователности, класирани съгласно гореописания критерий за класиране (секции А), бяха подредени по DBL мотива. Подчертаната "ядрена аминокиселинна последователност" беше получена чрез определяне на аминокиселината, която се среща най-често във всяка позиция. Двата цистеина, съседни на ядрените последователности на ядрото, бяха фиксирани аминокиселини в TN12-I библиотеката. Останалата част от аминокиселинната последователност в консенсусния пептид е взета от един от пептидите-кандидати - TALL-1-12-10 (таблица 2, SEQ ID №: 37). Пептидът и пептитялото, които произхождат от тази консенсусна последователност, бяха най-активни в изследването на В-клетъчната пролиферация.

Пример 2

Пептитела

Беше изграден набор от 12 TALL-1 инхибиторни пептитела (таблица 5), в които мономер на всеки пептид беше кондензиран към скелета на Fc областта на човешки IgG1. Всяко TALL-1 инхибиторно пептитяло беше изградено чрез закаляване на двойките от олигонуклеотиди, показани в таблица 6, за да се генерира дуплекс, кодиращ пептида, и линкер, съставен от 5 глицинови остатъка и един валинов остатък като NdeI до SalI фрагмент. Тези дуплексни молекули бяха лигирани във вектор (тук описания pAMG21-RANK-Fc), съдържащ човешкия Fc ген, също асимилиран с NdeI и SalI. Резултатните смеси от легиращи добавки бяха трансформирани чрез електрофореза в клетки на E. coli шам 2596 (описания тук GM221). Беше извършен скрининг на клоновете за способност да произвеждат рекомбинантен белтъчен продукт и за притежаване на генната фузия с правилната нуклеотидна последователност. Такъв единичен клон беше подбран за всяко от пептителата. Нуклеотидната и аминокиселинната последователност на кондензираните протеини са показани на фигури от 4A до 4F.

Таблица 5. Пептидни последователности и олигонуклеотиди, използвани за генериране на TALL-1 инхибиторни пептитела

Пептиятло	Пептиятло SEQ. ID. №	Пептидна последователност	Сенс олиго- нуклеотид	Антисенс олиго- нуклеотид
TALL-1-8-1-a	29	PGTCFPFPWECTHA	2517-24	2517-25
TALL-1-8-2-a	30	WGACWPFPWECFKE	2517-26	2517-27
TALL-1-8-4-a	31	VPFCDLLTKHCFEA	2517-28	2517-29
TALL-1-12-4-a	32	GSRCYKWDVLTKQCFHH	2517-30	2517-31
TALL-1-12-3-a	33	LPGCKWDLLIKQWCDPL	2517-32	2517-33
TALL-1-12-5-a	34	SADCYFDILTKSDVCTSS	2517-34	2517-35
TALL-1-12-8-a	35	SDDCMYDQLTRMFICSNL	2517-36	2517-37
TALL-1-12-9-a	36	DLNCKYDELTYKEWCQFN	2521-92	2521-93
TALL-1-12-10-a	37	FHDCKYDLLTRQMVCHGL	2521-94	2521-95
TALL-1-12-11-a	38	RNHCFWDHLLKQDICPSP	2521-96	2521-97
TALL-1-12-14-a	39	ANQCWWDSLTKKNVCEFF	2521-98	2521-99
TALL-1- консенсусен	58	FHDCKWDLLTKQWVCHGL	2551-48	2551-49

Таблица 5В. TALL-1 ингибиторни пептитела

Пепти- тяло	SEQ.ID.№ на пепти- тяло	Пептидна последователност			
TALL-1-8- 1-a	111	MPGTCTFPFPW	ECTHAGGGGG	VDKTHTCPPC	PAPELLGGPS
		VFLFPKPKD	TLMISRTPEV	TCVVVDVSHE	DPEVKFNWYV
		DGVEVHNAKT	KPREEQYNST	YRVVSVLTVL	HQDWLNGKEY
		KCKVSNKALP	APIEKTISKA	KGQPREPQVY	TLPPSRDELT
		KNQVSLTCLV	KGFYPDIAV	EWESNGQPEN	NYKTTTPVLD
		SDGSFFLYSK	LTVDKSRWQQ	GNVFSCSVMH	EALHNHYTQK
		SLSLSPGK			
TALL-1-8- 2-a	112	MWGACWFPFW	ECFKEGGGGG	VDKTHTCPPC	PAPELLGGPS
		VFLFPKPKD	TLMISRTPEV	TCVVVDVSHE	DPEVKFNWYV
		DGVEVHNAKT	KPREEQYNST	YRVVSVLTVL	HQDWLNGKEY
		KCKVSNKALP	APIEKTISKA	KGQPREPQVY	TLPPSRDELT
		KNQVSLTCLV	KGFYPDIAV	EWESNGQPEN	NYKTTTPVLD
		SDGSFFLYSK	LTVDKSRWQQ	GNVFSCSVMH	EALHNHYTQK
		SLSLSPGK			
TALL-1-8- 4-a	113	MVPFCDLLTK	HCFEAGGGGG	VDKTHTCPPC	PAPELLGGPS
		VFLFPKPKD	TLMISRTPEV	TCVVVDVSHE	DPEVKFNWYV
		DGVEVHNAKT	KPREEQYNST	YRVVSVLTVL	HQDWLNGKEY
		KCKVSNKALP	APIEKTISKA	KGQPREPQVY	TLPPSRDELT
		KNQVSLTCLV	KGFYPDIAV	EWESNGQPEN	NYKTTTPVLD
		SDGSFFLYSK	LTVDKSRWQQ	GNVFSCSVMH	EALHNHYTQK
		SLSLSPGK			
TALL-1-12- 4-a	114	MGRCKYKWD	VLTKQCFHHG	GGGGVDKTHT	CPPCPAPELL
		GGPSVFLFPP	KPKDTLMISR	TPEVTCVVVD	VSHEDPEVKF
		NWYVDGVEVH	NAKTKPREEQ	YNSTYRVVSV	LTVLHQDWLN
		GKEYKCKVSN	KALPAPIEKT	ISKAKGQPRE	PQVYTLPPSR
		DELTKNQVSL	TCLVKGFYPS	DIAVEWESNG	QPENNYKTTP
		PVLDSGDSFF	LYSKLTVDKS	RWQQGNVFSC	SVMHEALHNH
		YTQKSLSLSP	GK		
TALL-1-12- 3-a	115	MLPGCKWDL	IKQWVCDPLG	GGGGVDKTHT	CPPCPAPELL
		GGPSVFLFPP	KPKDTLMISR	TPEVTCVVVD	VSHEDPEVKF
		NWYVDGVEVH	NAKTKPREEQ	YNSTYRVVSV	LTVLHQDWLN
		GKEYKCKVSN	KALPAPIEKT	ISKAKGQPRE	PQVYTLPPSR
		DELTKNQVSL	TCLVKGFYPS	DIAVEWESNG	QPENNYKTTP
		PVLDSGDSFF	LYSKLTVDKS	RWQQGNVFSC	SVMHEALHNH
		YTQKSLSLSP	GK		
TALL-1-12- 5-a	116	MSADCYFDIL	TKSDVCTSSG	GGGGVDKTHT	CPPCPAPELL
		GGPSVFLFPP	KPKDTLMISR	TPEVTCVVVD	VSHEDPEVKF
		NWYVDGVEVH	NAKTKPREEQ	YNSTYRVVSV	LTVLHQDWLN
		GKEYKCKVSN	KALPAPIEKT	ISKAKGQPRE	PQVYTLPPSR
		DELTKNQVSL	TCLVKGFYPS	DIAVEWESNG	QPENNYKTTP
		PVLDSGDSFF	LYSKLTVDKS	RWQQGNVFSC	SVMHEALHNH
		YTQKSLSLSP	GK		
TALL-1-12- 8-a	117	MSDDCMYDQL	TRMFICSNLG	GGGGVDKTHT	CPPCPAPELL
		GGPSVFLFPP	KPKDTLMISR	TPEVTCVVVD	VSHEDPEVKF
		NWYVDGVEVH	NAKTKPREEQ	YNSTYRVVSV	LTVLHQDWLN
		GKEYKCKVSN	KALPAPIEKT	ISKAKGQPRE	PQVYTLPPSR
		DELTKNQVSL	TCLVKGFYPS	DIAVEWESNG	QPENNYKTTP

		PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNNH YTQKSLSLSP GK
TALL-1-12-9-a	118	MDLNCKYDEL TYKEWCQFNG GGGGVDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTT PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNNH YTQKSLSLSP GK
TALL-1-12-10-a	119	MFHDCKYDLL TRQMCHGLG GGGGVDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTT PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNNH YTQKSLSLSP GK
TALL-1-12-11-a	120	MRNHCFWDHL LKQDICPSPG GGGGVDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTT PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNNH YTQKSLSLSP GK
TALL-1-12-14-a	121	MANQCWWDLS TKKNVCEFFG GGGGVDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTT PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNNH YTQKSLSLSP GK
TALL-1-consensus	122	MFHDCKWDL TLKQVCHGLG GGGGVDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTT PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNNH YTQKSLSLSP GK
TALL-1 12-3 tandem dimer	123	MLPGCKWDL ILKQWCDPLG SGSATGGSGS TASSGSGSAT HMLPGCKWDL LKQWCDPL GGGGVDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS RDELTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSGDSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK
TALL-1 consensus tandem dimer	124	MFHDCKWDL TLKQVCHGLG SGSATGGSGS TASSGSGSAT HMFHDCKWDL LTKQVCHGL GGGGVDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS RDELTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSGDSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK

**Таблица 6. Последователности от олигонуклеотиди, използвани за
конструирание на пептидало**

Олиго- нуклеотид ID №	SEQ. ID.№	Последователност
2517-24	71	TAT GCC GGG TAC TTG TTT CCC GTT CCC GTG GGA ATG CAC TCA CGC TGG TGG AGG CGG TGG GG
2517-25	72	TCG ACC CCA CCG CCT CCT GGA GCG TGA GTG CAT TCC CAC GGG AAG CCG AAA CAA GTA CCC GGC A
2517-26	73	TAT GTG GGG TGC TTG TTG GCC GTT CCC GTG GGA ATG TTT CAA AGA AGG TGG AGG CGG TGG GG
2517-27	74	TCG ACC CCA CCG CCT CCA CCT TCT TTG AAA CAT TCC CACGGG AAC GGC CAA CAAGCA CCC CAC A
2517-28	75	TAT GGT TCC GTT CTG TGA CCT GCT GAC TAA ACA CTG TTT CGA AGC TGG TGG AGG CGG TGG GG
2517-29	76	TCG ACC CCA CCG CCT CCA CCA GCT TCG AAA CAG TGT TTA GTC AGC AGG TCA CAGAAC GGA ACC A
2517-30	77	TAT GGG TTC TCG TTG TAA ATA CAA ATG GGA CGT TCT GAC TAA ACA GTG TTT CCA CCA CGG TGG AGG CGG TGG GG
2517-31	78	TCG ACC CCA CCG CCT CCA CCG TGG TGG AAA CAC TGT TTA GTC AGA ACG TCC CAT TTG TAT TTA CAA CGA GAA CCC A
2517-32	79	TAT GCT GCC GGG TTG TAA ATG GGA CCT GCT GAT CAA ACA GTG GGT TTG TGA CCC GCT GGG TGG [*] AGG CGG TGG GG
2517-33	80	TCG ACC CCA CCG CCT CCA CCC AGC GGG TCA CAA ACC CAC TGT TTG ATC AGC AGG TCC CAT TTA CAA CCC GGC AGC A
2517-34	81	TAT GTC TGC TGA CTG TTA CTT CGA CAT CCT GAC TAA ATC TGA CGT TTG TAC TTC TTC TGG TGG AGG CGG TGG GG
2517-35	82	TCG ACC CCA CCG CCT CCA CCA GAA GAA GTA CAA ACG TCA GAT TTA GTC AGG ATG TCG AAG TAA CAG TCA GCA GAC A
2517-36	83	TAT GTC TGA CGA CTG TAT GTA CGA CCA GCT GAC TCG TAT GTT CAT CTG TTC TAA CCT GGG TGG AGG CGG TGG GG
2517-37	84	TCG ACC CCA CCG CCT CCA CCC AGG TTA GAA CAG ATG AAC ATA CGA GTC AGC TGG TCG TAC ATA CAG TCG TCA GAC A
2521-92	85	TAT GGA CCT GAA CTG TAA ATA CGA CGA ACT GAC TTA CAA AGA ATG GTG TCA GTT CAA CGG TGG AGG CGG TGG GG
25221-93	86	TCG ACC CCA CCG CCT CCA CCG TTG AAC TGA CAC CAT TCT TTG TAA GTC AGTTGG TCG TAT TTA CAG TTC AGG TCC A
2521-94	87	TAT GTT CCA CGA CTG TAA ATA CGA CCT GCT GAC TCG TCA GAT GGT TTG TCA CCG TCT GGG TGG AGG CGG TGG GG
2521-95	88	TCG ACC CCA CCG CCT CCA CCC AGA CCG TGA CAA ACC ATC TGA CGA GTC AGC AGG TCG TAT TTA CAG TCG TGG AAC A
2521-96	89	TAT GCG TAA CCA CTG TTT CTG GGA CCA CCT GCT GAA ACA

		GGA CAT CTG TCC GTC TCC GGG TGG AGG CGG TGG GG
2521-97	90	TCG ACC CCA CCG CCT CCA CCC GGA GAC GGA CAG ATG TCC TGT TTC AGC AGG TGG TCC CAG AAA CAG TGG TTA CGC A
2521-98	91	TAT GGC TAA CCA GTG TTG GTG GGA CTC TCT GCT GAA AAA AAA CGT TTG TGA ATT CTT CGG TGG AGG CGG TGG GG
2521-99	92	TCG ACC CCA CCG CCT CCA CCG AAG AAT TCA CAA ACG TTT TTT TTC AGC AGA GAG TCC CAC CAA CAC TGG TTA GCC A
2551-48	93	TAT GTT CCA CGA CTG CAA ATG GGA CCT GCT GAC CAA ACA GTG GGT TTG CCA CGG TCT GGG TGG AGG CGG TGG GG
2551-49	94	TCG ACC CCA CCG CCT CCA CCC AGA CCG TGG CAA ACC CAC TGT TTG GTC AGC AGG TCC CAT TTG CAG TCG TGG AAC A

рAMG21-RANK-Fc вектор
рAMG21. Експресионният плазмид рAMG21 (депозирен в ATCC под № 98113) може да бъде добит от Amgen вектора на експресия рCFM1656 (ATCC # 69576), който от своя страна да бъде добит от Amgen векторната система на експресия, описана в US патент № 4,710,473. рCFM1656 плазмидът може да бъде добит от описания рCFM836 плазмид (US патент № 4,710,473) чрез:

- разрушаване на двете ендогенни места за NdeI рестрикция посредством крайно запълване с T4 полимеразен ензим, последвано от не-

утрализиращо крайно лигиране;

- заместване на ДНК последователността между уникалните места за AatII и ClaI рестрикция, съдържащи синтетичния P_L промотор, със сходен фрагмент, получен от рCFM636 (патент № 4,710,473), съдържащ P_L промотора (виж SEQ ID №: 95 по-долу); и

- заместване на малката ДНК последователност между уникалните места за ClaI и KpnI рестрикция с олигонуклеотида, който има последователността от SEQ ID №: 96.

SEQ. ID. №: 95:

AatII

5' CTAATTCGCTCTCACCTACCAAACAATGCCCCCTGCAAAAAATAAATTCATAT-
3' TGCAGATTAAGCGAGAGTGGATGGTTTGTACGGGGGACGTTTTTATTTAAGTATA-

-AAAAAACATACAGATAACCATCTGCGGTGATAAATTATCTCTGCGGTTGTGACATAAA-
-TTTTTGTATGTCTATTGGTAGACGCCACTATTTAATAGAGACCGCCACAACGTGATTT-

-TACCACTGGCGGTGATACTGAGCACAT 3'
-ATGGTGACCGCCACTATGACTCGTGTAGC 5'
ClaI

SEQ. ID. №: 96:

5' CGATTTGATTCTAGAAGGAGGAATAACATATGGTTAACGCGTTGGAATTCGGTAC
3'
3' TAAACTAAGATCTTCCTCCTTATTGTATACCAATTGCGCAACCTTAAGC 5'
ClaI KpnI

Експресийният плазмид рАМG21 може да бъде добит от рCFM1656 посредством серия от насочени към местата базови промени, извършени чрез PCR припокриване на олигонуклеотидната мутагенеза и замествания на ДНК последователността. Започвайки от BglII място-

то (плазмидна БД # 180), веднага 5' към плазмидния репликативен промотор $P_{\text{сopB}}$ и продължавайки към плазмидните репликативни гени, промените на базова двойка (БД) са както е показано в таблица 7 по-долу.

Таблица 7. Промени на базовата двойка (БД), резултиращи в рАМG21

<u>рАМG21 БД #</u>	<u>БД в рCFM1656</u>	<u>БД, променена в рАМG21</u>
# 204	T/A	C/G
# 428	A/T	G/C
# 509	G/C	A/T
# 617	--	вмъкване на две G/C БД
# 679	G/C	T/A
# 980	T/A	C/G
# 994	G/C	A/T
# 1004	A/T	C/G
# 1007	C/G	T/A
# 1028	A/T	T/A
# 1047	C/G	T/A
# 1178	G/C	T/A
# 1466	G/C	T/A
# 2028	G/C	заличаване на БД
# 2187	C/G	T/A
# 2480	A/T	T/A
# 2499-2502	<u>AGTG</u> TCAC	<u>GTCA</u> CAGT
# 2642	<u>TCCGAGC</u> AGGCTCG	заличаване на 7 БД
# 3435	G/C	A/T
# 3446	G/C	A/T
# 3643	A/T	T/A

ДНК последователността между уникалните AatII (позиция # 4364 в PCFM1656) и SacII ((позиция # 4585 в PCFM1656) места за рестрикция е заместена с дадената по-долу ДНК последователност (SEQ ID №: 97):

```

[AatII sticky end]          5'      GCGTAACGTATGCATGGTCTCC-
(position #4358 in pAMG21)  3'      TGCACGCATTGCATACGTACCAGAGG-

5  -CCATGCGAGAGTAGGGAACTGCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACT-
   -GGTACGCTCTCATCCCTTGACGGTCCGTAGTTTATTTTGCTTTCCGAGTCAGCTTTCTGA-

   -GGGCCCTTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTCTGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGC-
   -CCCGGAAAGCAAAATAGACAACAAACAGCCACTTGCGAGAGGACTCATCTGTTTAGGCG-

10  -CGGGAGCGGATTTGAACGTTGCGAAGCAACGGCCCGGAGGGTGGCGGGCAGGACGCCCGC-
   -GCCCTCGCCTAAACTTGCAACGCTTCGTTGCCGGGCCCTCCACCGCCCGTCTGCGGGCG-

   -CATAAACTGCCAGGCATCAAATTAAGCAGAAGGCCATCCTGACGGATGGCCTTTTTGCGT-
   -GTATTTGACGGTCCGTAGTTTAATTCGCTTCCGGTAGGACTGCCTACCGGAAAAACGCA-

15  -TTCTACAAACTCTTTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGGACGTCGTACTTAAC-
   -AAGATGTTTGAGAAAAACAAATAAAAAGATTTATGTAAGTTTATACCTGCAGCATGAATTG-

                                     AatII
20  -TTTTAAAGTATGGGCAATCAATTGCTCCTGTAAATTTGCTTTAGAAATACTTTGGCAGC-
   -AAAATTCATACCCGTTAGTTAACGAGGACAATTTAACGAAATCTTTATGAAACCGTCG-

   -GGTTTGTGTTGATTGAGTTTCATTTGCGCATTGGTTAAATGGAAGTGACCGTGCGCTTAC-
   -CCAAACAACATAACTCAAAGTAAACGCGTAACCAATTTACCTTTCCTGACGCGCAATG-

25  -TACAGCCTAATATTTTTGAAATATCCCAAGAGCTTTTTCTTCGATGCCACGCTAAAC-
   -ATGTCGGATTATAAAACTTTATAGGGTTCTCGAAAAAGGAAGCGTACGGGTGCGATTG-

   -ATTCTTTTTCTCTTTTGGTTAAATCGTTGTTTGATTATTATTGCTATATTTATTTTC-
30  -TAAGAAAAAGAGAAAAACCAATTTAGCAACAACTAAATAATAAACGATATAAAATAAAG-

   -GATAATTATCAACTAGAGAAGGAACAATTAATGGTATGTTATACACGCATGTAAAAATA-
   -CTATTAATAGTTGATCTCTTCCTTGTTAATTACCATACAAGTATGTGCGTACATTTTAT-

35  -AACTATCTATATAGTTGCTTTCTCTGAATGTGCAAACTAAGCATTCCGAAGCCATTAT-
   -TTGATAGATATATCAACAGAAAGAGACTTACACGTTTTGATTTCGTAAGGCTTCGGTAATA-

   -TAGCAGTATGAATAGGGAACTAAACCCAGTGATAAGACCTGATGATTTGCTTCTTTAA-
40  -ATCGTCATACTTATCCCTTTGATTTGGGTCACTATTCTGGACTACTAAAGCGAAGAAAT-

   -TTACATTTGGAGATTTTTTATTTACAGCATTGTTTTCAAATATATTCCAATTAATCGGTG-
   -AATGTAAACCTCTAAAAAATAAATGTCGTAACAAAAGTTTATATAAGGTAAATAGCCAC-

45  -AATGATTGGAGTTAGAATAATCTACTATAGGATCATATTTTATTAAATTAGCGTCATCAT-
   -TTACTAACCTCAATCTTATTAGATGATATCCTAGTATAAAATAATTTAATCGCAGTAGTA-

   -AATATTGCCTCCATTTTTTAGGGTAATTATCCAGAATTGAAATATCAGATTTAACCATAG-
   -TTATAACGGAGGTAAAAATCCCATTAATAGGTCTTAACCTTATAGTCTAAATGGTATC-

50  -AATGAGGATAAATGATCGCGAGTAAATAATATTCACAATGTACCATTTTAGTCATATCAG-
   -TTACTCCTATTTACTAGCGCTCATTTATTATAAGTGTTACATGGTAAATCAGTATAGTC-

   -ATAAGCATTGATTAATATCAATTATTGCTTCTACAGGCTTTAATTTTATTAATTATTCTGT-
55  -TATTCGTAACCTAATTATAGTAATAACGAAGATGTCCGAAATTAATAATAAATAAGACA-

   -AAGTGTCGTCGGCATTTATGCTTTTCATACCCATCTCTTTATCCTTACCTATTGTTTGTG-
   -TTCACAGCAGCCGTAATACAGAAAGTATGGGTAGAGAAATAGGAATGGATAACAAACAG-

   -GCAAGTTTTGCGTGTTATATATCATTAAAACGGTAATAGATTGACATTTGATTCTAATAA-
60  -CGTTCAAAACGCACAATATATAGTAATTTTGCCATTATCTAACTGTAAACTAAGATTATT-

   -ATTGGATTTTTGTACACTATTATATCGCTTGAAATACAATTGTTTAACATAAGTACCTG-
   -TAACCTAAAAACAGTGTGATAATATAGCGAACTTTATGTTAACAAATTGTATTTCATGGAC-

```

-TAGGATCGTACAGGTTTACGCAAGAAAATGGTTTGTATAGTCGATTAATCGATTTGATT-
 -ATCCTAGCATGTCCAAATGCGTTCCTTTTACCAAACAATATCAGCTAATTAGCTAAACTAA-
 -CTAGATTTGTTTAACTAATTAAAGGAGGAATAACATATGGTTAACGCGTTGGAATTCGA-
 5 -GATCTAAACAAAATTGATTAATTTCTCTCTTATTGTATACCAATTGCGCAACCTTAAGCT-
SacII
 -GCTCACTAGTGTGACCTGCAGGGTACCATGGAAGCTTACTCGAGGATCCGCGGAAAGAA-
 -CGAGTGATCACAGCTGGACGTCCCATGGTACCTTCAATGAGCTCCTAGGCGCCTTCTCT-
 10 -GAAGAAGAAGAAGAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATA-
 -CTTCTTCTTCTTCTTTCGGGCTTTCCTTCGACTCAACCGACGACGGTGGCGACTCGTTAT-
 -ACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGG-
 15 -TGATCGTATTGGGGAACCCCGAGATTTGCCCAGAACTCCCCAAAAACGACTTTCCTCC-
 -AACCGCTCTTCACGCTCTTCACGC 3' [SacII sticky end]
 -TTGGCGAGAAGTGCAGAGAAGTG 5' (position #5904 in pAMG21)

При лигирането на прилепващите краища на тази заместваща ДНК последователност външните AatII и SacII места се разрушават. В заместената ДНК са налице уникални AatII и SacII места.

Ген, кодиращ човешки RANK, кондензиран към N-края на Fc, беше лигиран в pAMG21 като фрагмент от NdeI до BamHI, за да се генерира Amgen шам # 4125. Това построение беше модифицирано, за да се вмъкне валинов кодон при мястото на свързване на RANK и Fc. Съседните валинови и аспаратови кодони създават уникално SalI място. Това позволява кондензирането на пептиди при N-края на Fc3 между уникалните NdeI и SalI места. RANK последователността се изтрива при вмъкването на нов NdeI-SalI фрагмент. Последователността на вектора е показана на фигури от 5A до 5M.

GM221 (Amgen #2596). Гостоприемащият Amgen шам #2596 е E. coli K-12 шам, добит от Amgen шам #393, който е произведен на E. coli W1485, доставен от E. coli генетичния център (E.

coli Genetic Stock Center) при Йелския университет, Ню хейвън, Кънектикът (CGSC шам 6159). Той беше модифициран така, че да съдържа както температурно чувствителния ламбда репресор cI857s7 в ранния ebg участък, така и lacI^q репресор в късния ebg участък (68-а минута). Присъствието на тези два репресорни гена позволява използването на този гостоприемник с разнообразие от експресийни системи, но и двата репресора нямат значение за експресията от luxP_R. Нетрансформираният гостоприемник няма антибиотична резистентност.

Рибозомното присъединително място в ген cI857s7 беше модифицирано, за да се включи подобрен RBS. Той беше вмъкнат в ebg оперона между нуклеотидни позиции 1170 и 1411, според номерацията на Генбанк депозитен номер M64441Gb_Va, с изтриване на интервениращата ebg последователност. Последователността на вмъкнатата подложка е показана по-долу, като ebg последователностите на фланговете на подложката са означени с малки букви (SEQ ID №: 98).

ttattttcgtGCGGCCGACCATTTATCACGCCAGAGGTAACTAGTCAACACGCACGGTGTTAGATAT
 TTATCCCTTTCGGGTGATAGATTGAGCACATCGATTTGATTCTAGAAAGGAGGGATAATATATGAG
 CAAAAAAGAAACCATTAACACAAGAGCAGCTTGAGGACGCACGTCGCCTTAAAGCAATTTA
 TGAAGAAAGAAAGAAATGAACTTGGCTTATCCCAGGAATCTGTCGCAGACAAGATGGGGATGGG
 GCAGTCAGGCGTTGGTGCTTTATTTAATGGCATCAATGCATTAAATGCTTATAACGCCGCAATTGC
 TTACAAAAATTTCTCAAAGTTAGCGTTGAAGAATTTAGCCCTTCAATCGCCAGAGAATCTACGAG
 ATGTATGAAGCGGTAGTATGCAGCCGTCACCTTAGAAGTGAGTATGAGTACCCTGTTTTTCTCA
 TGTTACAGGCAGGGATGTTCTACCTAAGCTTAGAACCTTTACCAAAGGTGATGCGGAGAGATGG
 GTAAGCACAAACCAAAAAAGCCAGTGATTCTGCACTTCTGGCTTGAGGTTGAAGGTAATTCCATGA
 CCGCACCAACAGGCTCCAAGCCAAGCTTTCCTGACGGAATGTTAATTCTCGTTGACCTTGAGCA
 GGCTGTTGAGCCAGGTGATTTCTGCATAGCCAGACTTGGGGGTGATGAGTTTACCTTCAAGAAA
 CTGATCAGGGATAGCGGTCAGGTGTTTTTACAACCACTAAACCCACAGTACCCAATGATCCCAT
 GCAATGAGAGTTGTTCCGTTGTGGGGAAGTTATCGCTAGTCAGTGGCCTGAAGAGACGTTTGG
 CTGATAGACTAGTGGATCCACTAGTgtttctgcc

Построението беше доставено в хромозома като беше използван рекомбинантен бактериофаг, наречен MMeBg-cl857s7 подобрен RBS #4, в F'tet/393. След рекомбинацията и разлагането на компоненти в клетката остава само описаната по-горе хромозомна подложка. Тя беше преименувана на F'tet/GM101. След това F'tet/GM101 беше модифицирана чрез доставянето на

IacI⁰ конструкция в *ebg* оперона между нуклеотидни позиции 2493 и 2937, съгласно номерацията в Генбанк депозитен номер M64441Gb_Ba, с изтриването на интервениращата *ebg* последователност. Последователността на вмъкнатата подложка е показана по-долу, като *ebg* последователностите на фланговете на подложката са дадени с малки букви (SEQ ID №: 99).

```
ggcggaaaccGACGTCCATCGAATGGTGCAAAACCTTTCGCGGTATGGCATGATAGCGCCCGGAAGA
GAGTCAATTACGGGTGGTGAATGTGAAACCAGTAACGTTATACGATGTCGAGAGTATGCCGGT
GTCTCTTATCAGACCGTTTCCCGCGTGGTGAACCAGGCCAGCCACGTTTCTGCGAAAACGCGGG
AAAAAGTCGAAGCGGCGATGGCGGAGCTGAATTACATTCCCAACCGCGTGGCACAACAACCTGG
CGGGCAAAACAGTCCGCTCCTGATTGGCGTTGCCACCTCCAGTCTGGCCCTGCACGCGCGCTCGCA
AATTGTGCGCGCGATTAAATCTCGCGCCGATCAACTGGGTGCCAGCGTGGTGGTGTTCGATGGTA
GAACGAAGCGGCGTGAAGCCTGTAAAGCGGCGGTGCACAACTCTTCTCGCGCAACGCGTCAATG
GGTGATCAATTAATACTCCGCTGGATGACCAAGGATGCCATTGCTGTGGAAGCTGCCTGCACTAA
TGTTCGCGCGTTATTCTTGTATGTTCTCTGACAGACACCCATCAACAGTATTATTTTCTCCCATGA
AGACGGTACCGGACTGGGCGTGGAGCATCTGGTCCGATTGGGTCAACCAACAAATCGCGCTGTTA
GCGGGCCCCATTAAAGTTCTGTCTCGCGCGCTCTGCGTCTGGCTGGCTGGCATAAATACTCACTCG
CAATCAAAATTCAGCCGATAGCGGAACGGGAAGGCGACTGGAAGTGCCATGTCCGGTTTTCAACAA
ACCATGCAAAATGCTGAATGAGGGCATCGTTCCCACTGCGATGCTGGTTGCCAACGATCAGATGG
CGTGGGCGCAATGCGCGCCATTACCGAGTCCGGGCTGCGCGTTGGTGGCGGATACTCGGTAAT
GGGATACGACGATACCGAAGACAGCTCATGTTATATCCCGCCGTTAACCAACCATCAAAACAGGAT
TTTCOCCTGCTGGGGCAAACCAAGCGTGGACCGCTTCTGCAACTCTCTCAGGGCCAGGCGGTGA
```

```
AGGGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTGAAGAAAGAAAACCAACCTGGCGCCCAATACGCA
AACCGCCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGG
AAAGCGGACAGTAAGGTACCATAGGATCCaggcacagga
```

Построението беше доставено в хромозома, като беше използван рекомбинантен бактериофаг, наречен AGebg-LacI Q#5, в F'tet/GM101. След рекомбинацията и разлагането на компоненти в клетката остава само описаната по-горе хромозомна подложка. Тя беше преименувана на F'tet/GM221. F'tet епизомата беше премахната от щама чрез използване на акридиново оранжево багрило при концентрация от 25 µmol/l в LB. Изчистеният шам беше идентифициран като чувствителен към тетрациклин и беше съхранен като GM221.

Експресия в *E. coli*. Бяха отгледани култури от всяко rAMG21-Fc-кондензирано построение в *E. coli* GM221 при 37°C в Luria Broth среда. Беше постигната индукция на експресия на генен продукт от luxPR промотора, след като към средата на културата беше прибавен синтетичният аутоиндуктор N-(3-оксохексаноил)-DL-хомосерин лактон до крайна концентрация 20 ng/ml. Културите бяха инкубирани при 37°C в продължение на още 3 h. След 3 h бактериалните култури бяха изследвани чрез микроскопия за наличие на инклузийни тела и след това бяха съб-

рани чрез центрофугиране. В индуцираните култури бяха наблюдавани рефракторни инклузийни тела, което сочи, че Fc-фузиите най-вероятно са произведени в неразтворимата фракция в *E. coli*. Клетъчни пелети бяха лизирани директно чрез ресуспендиране в Ламли еталонен буфер, съдържащ 10 % бета-меркаптоетанол, и бяха анализирани посредством SDS-PAGE. Във всеки случай беше наблюдавана интензивна Кумаси-оцветена ивица на подходящото молекулно тегло върху SDS-PAGE гел.

Пример 3

TALL-1 пептитяло инхибира TALL-1-медирана B-клетъчна пролиферация

Миши В левкоцити бяха изолирани от далаци на C57BL/6 чрез отрицателен подбор (MACS CD43 (Ly-48) Microbeads, Miltenyi Biotec, Обърн, Калифорния). Пречистени (10⁵) В клетки бяха култивирани в MEM, 10 % топлоинно дезактивиран FCS, 5 x 10⁻⁵ M 2-меркаптоетанол, 100 U/ml пеницилин, 100 microg/ml стрептомицин на триплети в плоско-дънни блюда за тъканни култури с 96 гнезда с 10 ng/ml TALL-1 протеин и 2 microg/ml от Goat

F(ab')₂ анти-миши IgM (Джаксънова имуноизследователска лаборатория, Уест Гроув, Пенсилвания) с посоченото количество рекомбинантно TALL-1 пептидало за период от 4 дни при 37°C, 5% CO₂. Пролиферацията беше измерена посредством поглъщането на радиоактивен ³[H] тимидин след 18-часов инкубационен период.

Пример 4

TALL-1 пептидало блокира присъединяването на TALL-1 към неговите рецептори

Reacti-Gel 6x (Pierce) беше предварително покрит с човешки AGP3 (известен също и като TALL-1, Khare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 97: 3370-3375, 2000) и блокиран с BSA. 100 pM и 40 pM от проби от AGP3 пептидало бяха инкубирани с посочените различни концентрации от човешки AGP3 при стайна температура в продължение на 8 h, преди да бъдат прекарани през покритите с човешки AGP3 перли. Количеството от присъединеното към перлите пептидало беше определено чрез флуоресцентно (Cy5) белязано козе анти-човешко Fc пептидало (Jackson Immuno Research). Присъединителният сигнал е пропорционален на концентрацията на свободно пептидало при равновесие на присъединяването. Константата на дисоциативно равновесие (K_D) беше определена чрез нелинейна регресия на конкурентните криви, като беше използван модел на двойни криви на хомогенно присъединяване към едно място (KinEx™ софтуер). K_D е около 4 pM за AGP3 пептидало (SEQ ID №: 123), присъединяващо се към човешки AGP3 (фиг. 9).

За да се определи дали това AGP3 пептидало може да неутрализира присъединяване на миши AGP3, както и на човешки AGP3, беше използвано BIAcore неутрализиращо изследване. Всички експерименти бяха проведени на BIAcore 3000 при стайна температура. Човешки TACI-Fc протеин (Xia et al., J. Exp. Med. 192, 137-144, 2000) беше имобилизиран към чип B1, като бяха използвани 10 mM ацетат, pH 4,0, до ниво 2900 RU. Като фонов контрол беше използвана клетка с нулев поток. Чрез използване на протичащ буфер от PBS (без калций или магнезий), съдържащ 0,005 % P20, беше инкубиран 1 nM рекомбинантен човешки AGP3 (в протичащ буфер плюс, 0,1 mg/ml BSA) без и със посочените различни количества от AGP3 пептидало (оста х), преди да бъде инжектиран върху повърхността на рецептора. Беше извършено регенериране чрез

използване на 8 mM глицин, pH 1,5, в продължение на 1 min, 25 mM 3-[циклохексиламино]-1-пропансулфонова киселина (CAPS), pH 10,5, 1 M NaCl в продължение на 1 min. За определяне на присъединяването на миши AGP3 човешки TACI с his-етикет беше имобилизиран до 1000 RU в горепосочения буфер. 5 nM рекомбинантен миши AGP3 (в протичащ буфер плюс, 0,1 mg/ml BSA) бяха инкубирани без и със различните количества, посочени на фиг. 10, от AGP3 пептидало (оста х), преди да бъдат инжектирани върху повърхността на рецептора. Беше извършено регенериране с 10 mM HCl, pH 2 - двукратно за 30 s. Беше измерено (оста у) относителното присъединяване на човешки AGP3 и на миши AGP3 в присъствие срещу отсъствие на AGP3 пептидало (SEQ ID №: 123). Относителната отговорна реакция на присъединяване беше определена като (RU-RU бланк/RUo-RU бланк). AGP3 пептидалото (SEQ ID №: 123) инхибира присъединяването и на човешки, и на миши AGP3 към неговия рецептор TACI (фиг. 10A и 10B).

За да се изследва дали това AGP3 пептидало блокира присъединяването на AGP3 и към трите рецептора (TACI, BCMA и BUFR), рекомбинантни разтворими протеини на рецептори TACI, BCMA и BUFR бяха имобилизирани към чип CM5. Чрез използване на 10 mM ацетат, pH 4, човешки TACI-Fc беше имобилизиран до 6300 RU, човешки BCMA-Fc - към 5000 RU и BUFR-Fc - към 6000 RU. 1 nM от рекомбинантен човешки AGP3 (в протичащ буфер, съдържащ 0,1 mg/ml BSA и 0,1 mg/ml хепарин) или 1 nM рекомбинантен APRIL протеин (Yu, et al., Nat. Immunol., 1: 252-256, 2000) бяха инкубирани с посоченото количество от AGP3 пептидало, преди да бъдат инжектирани върху повърхността на всеки рецептор. Регенерирането на AGP3 експеримента беше направено с 8 mM глицин, pH 1,5, в продължение на 1 min, след което с 25 mM CAPS, pH 10,5, 1 M NaCl в продължение на 1 min. Беше измерено относителното присъединяване на AGP3 или APRIL. AGP3 пептидалото (SEQ ID №: 123) блокира AGP3 присъединяването и към трите рецептора (фиг. 11A). AGP3 пептидалото не оказва влияние на APRIL присъединяването към рецепторите (фиг. 11B).

Пример 5

AGP3 пептидало блокира AGP3-медирана В-клетъчна пролиферация

Миши В левкоцити бяха изолирани от далаци на C57BL/6 чрез отрицателна селекция (MACS CD43 (Ly-48) Microbeads, Miltenyi Biotec, Обърн, Калифорния). Пречистени (10^5) В клетки бяха култивирани в минимална съществена среда (MEM), 10 % топлинно дезактивиран телешки ембрионален серум (FCS), 5×10^{-5} М 2-меркаптоетанол, 100 U/ml пеницилин, 100 microg/ml стрептомицин, на триплети в плоскодънни блюда за тъканни култури с 96 гнезда, заедно с 10 ng/ml AGP3 (TALL-1) протеин и 2 microg/ml от Goat F(ab')₂ анти-миши IgM (Джаксънова имуноизследователска лаборатория, Уест Гроув, Пенсилвания) с посоченото количество от рекомбинантно AGP3 пептиятло (SEQ ID №: 123) за период от 4 дни при температура 37°C, 5% CO₂. Пролиферацията беше измерена чрез поглъщането на радиоактивен ³[H] тимидин след 18-часов инкубационен период.

Пример 6

AGP3 пептиятло върху AGP3-стимулирано производство на Ig при мишки

Мишки (Balb/c, женски, на възраст от 9 до 14 седмици и с тегло от 19 до 21 g) бяха закупени от Charles River Laboratories, Wilmington, MA. Мишките (n = 10) бяха третирани i.p. с по 1 mg/kg от човешки AGP3 един път на ден в продължение на пет последователни дни, а след това с по 5 mg/kg или по 0,5 mg/kg от AGP3 пептиятло (SEQ ID №: 123) или с физиологичен разтвор, или с по 5 mg/kg човешки Fc. Други мишки бяха оставени, без да бъдат третирани. Мишките бяха умъртвени на шестия ден, за да се измерят серум IgM и IgA, които бяха измерени посредством ELISA. Накратко казано, плочките бяха покрити с прихващащи антитела, специфични за IgM или IgA (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL), блокирани и допълнени с разреждания от стандартни проби (IgM от Calbiochem, Сан Диего, Калифорния, и IgA от Southern Biotechnology Associates) или тестови проби. Уловеният Ig беше проявен чрез използ-

ване на биотинилирани антитела, специфични за IgM или IgA (Southern Biotechnology Associates), неутравидин-спрегната пероксидаза (Pierce, Rockford, IL) и тетраметилбензидин (TMB) микротитърен пероксидазен сустрат (KPL, Gaithersburg, MD). Оптичните плътности бяха определени количествено посредством апаратура Thermomax ELISA reader (Molecular Devices, Menlo Park, CA).

Стимулираното от човешки AGP3 повишаване на серумните нива на IgM и IgA беше блокирано чрез 5 mg/kg от анти-AGP3 пептиятло (SEQ ID №: 123), а не чрез 0,5 mg/kg (фигури 12A и 12B).

Пример 7

AGP3 пептиятло понижи броя на далачните В клетки при мишки

Мишки (както по-горе, n = 7) бяха третирани i.p. в продължение на седем последователни дни с по 5 mg/kg или по 1,5 mg/kg от AGP3 пептиятло (SEQ ID №: 123) или с физиологичен разтвор, или с по 5 mg/kg от човешки Fc. На осмия ден мишките бяха умъртвени, за да се отчете броят на далачните В клетки. Далаците бяха събрани във физиологичен разтвор и внимателно разкъсани чрез ръчно хомогенизиране, за да се получи клетъчна суспензия. Общият брой на клетките беше отчетен посредством брояч HIE (Technicon, Tarrytown, NY). Процентното съотношение на В клетки беше изведено чрез имунофлуоресцентно двойно оцветяване и поточна цитометрия, като бяха използвани флуоресцентен изотиоцианат (FUTC)-спрегнат и фикоеритрин (PE)-спрегнат Ab спрямо CD3 и B220, съответно (Pharmingen, Сан Диего, Калифорния) и анализатор FACScan (Becton and Dickson, Маунтин вю, Калифорния). В клетките бяха идентифицирани като CD3-B220+. При всички дози AGP3 пептиятлото (SEQ ID №: 123) намали броя на далачните В клетки по съответстващ на дозата начин (фигури 12A и 12B) (SEQ ID №: 123).

Таблица 8.

AGP3 пептитяло намалява броя на В клетките у нормални мишки

n=7	доза (1/дневно x 7)	В клетка от далак (1 x 10 ⁶)	SD	t тест
физиологичен разтвор		51,3	9,6	
Fc	5 mg/Kg	45,5	7,1	
Пептитяло	5 mg/Kg	20,1	3,8	1,37856E-05
	1,5 mg/Kg	22,6	6,9	5,10194E-05
	0,5 m/Kg	25,8	3,6	0,000111409

Пример 8

AGP3 пептитяло понижи тежестта на артрит при CIA модел за изследване на мишки

Мишки DBA/1 на възраст от 8 до 12 седмици (доставени от Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) бяха имунизирани интрадермално в основата на опашката с говежди колаген тип II (bCII) (закупен от Университета в Ута), емулгиран в пълна настойка на Фройндс (Difco). Всяка инжекция беше по 100 microl, съдържащи 100 microg bCII. Мишките бяха подсилени 3 седмици след първоначалното имунизирание с bCII, емулгиран в непълна настойка на Фройндс. Третирането започна в деня на подсилващата имунизация и продължи 4 седмици. Мишките бяха прегледани за развитие на артрит. Както е описано преди (Khare et al., J. Immunol. 155: 3653-9, 1995), четирите лапи бяха оценявани поотделно от 0 до 3. Следователно тежестта на артритите можеше да варира от 0 до 12 за всяко животно. Третирането с AGP3 (SEQ ID №: 123) пептитяло значително намали тежестта на артритните оценки (фиг. 13).

Една седмица след последното третиране (на 35-ия ден) бяха взети серумни проби за анализ на нивото на анти-колагеново антитяло. Силно присъединяващи се ELISA плочки (Immunol., Nunc) бяха покрити с 50 microl от разтвор с концентрация 4 microg/ml от говежди CII в карбонатен буфер и бяха държани до следващия ден на студено в хладилник. Плочките бяха промити три пъти със студена вода. Бяха използвани 75 microl от блокиращ разтвор, направен от PBS / 0,05 % Tween 20 / 1 % BSA, за да се блокира

неспецифичното присъединяване за 1 h. Пробите бяха разреждени (в блокиращ буфер) в разреждателни блюда в съотношения 1:25, 1:100, 1:400 и 1:1600 и по 25 microl от тези проби бяха прибавени към всяко гнездо на ELISA плочките за окончателно разреждане до 100, 400, 1600 и 6400 с финален обем 100 microl/гнездо. След инкубиране при стайна температура за 3 h плочките бяха отново промити три пъти. Към всяко гнездо бяха добавени по 100 microl от вторичното антитяло, разреждено в блокиращ буфер (анти-миши IgM, IgG2a, IgG2b, IgG1, IgG3-HRP от плъх) и плочките бяха инкубирани в продължение поне на 2 h. Плочките бяха промити четири пъти. Към всяко гнездо бяха добавени по 100 microl от TMB разтвор (Sigma) и реакцията беше спряна чрез използване на 50 microl от 25 % сярна киселина. Плочките бяха разчетени с апаратура ELISA plate reader при 450 nm. OD беше сравнено със стандартен пул, представящ единици/ml. Третирането с AGP3 пептитяло (SEQ ID №: 123) понижи нивата на серум анти-колаген II IgG1, IgG3, IgG2a и IgG2b в сравнение с контролните групи, третирани с PBS или Fc (фиг. 14).

Пример 9

Третиране с AGP3 пептитяло при лупусни мишки NZB/NZW

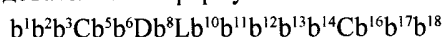
Петмесечни предразположени към лупус мишки NZBx NZBWF1 бяха третирани i.p. 3X/седмично в течение на 8 седмици с PBS или с посочените дози от AGP3 пептитяло или човешки Fc протеин. Преди да започне третирането на

животните, беше направен предварителен скрининг за протеин в урината с реактивни лентички Albustix (Bayer AG). Мишките, които имаха повече от 100 mg/dl протеин в урината, не бяха включени в изследването. Протеинът в урината беше оценяван всеки месец през цялата продължителност на експеримента. Третирането с AGP3 пептидало (SEQ ID №: 123) доведе до забавяне на началото на протеинурията и подобри оцеляването (фигури 15A и 15B).

Третирането с AGP3 пептидало намали броя на В клетките у мишки. На мишки Balb/c в течение на седем дни беше инжектирано интраперитонеално посоченото количество AGP3 пептидало (SEQ ID №: 123) или човешки Fc протеин. На осмия ден техните далаци бяха събрани и подложени на FACS анализ за B220+ В клетки, както е посочено в таблица 8.

Патентни претенции

1. Състав, съдържащ аминокиселинна последователност с формула



(SEQ. ID. № 104)

в която:

b^1 и b^2 независимо едно от друго липсват

или са аминокиселинни остатъци;

b^3 е киселинен или амиден остатък;

b^5 е аминокиселинен остатък;

b^6 е ароматен остатък;

b^8 е аминокиселинен остатък;

b^{10} е Т или I;

b^{11} е основен остатък;

b^{12} и b^{13} независимо едно от друго са аминокиселинни остатъци;

b^{14} е полярно неутрален остатък; и

b^{16} , b^{17} и b^{18} независимо едно от друго липсват или са аминокиселинни остатъци.

2. Състав съгласно претенция 1, в който:

b^3 е D, Q или E;

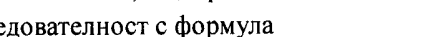
b^6 е W или Y;

b^{10} е T;

b^{11} е K или R; и

b^{14} е V или L.

3. Състав, съдържащ аминокиселинна последователност с формула



(SEQ. ID. № 106)

в която:

d^1 , d^2 и d^3 независимо едно от друго липсват или са аминокиселинни остатъци;

d^5 , d^6 и d^7 независимо едно от друго са аминокиселинни остатъци;

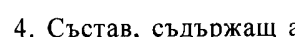
d^{10} е аминокиселинен остатък;

d^{13} е T или I;

d^{14} е аминокиселинен остатък; и

d^{16} , d^{17} и d^{18} независимо едно от друго липсват или са аминокиселинни остатъци.

4. Състав, съдържащ аминокиселинна последователност с формула



(SEQ. ID. № 109)

в която:

f^1 , f^2 и f^3 липсват или са аминокиселинни остатъци;

f^5 е W, Y или F;

f^7 е аминокиселинен остатък;

f^9 е T или I;

f^{10} е K, R или H;

f^{12} е C, полярно неутрален остатък или основен остатък (за предпочитане W, C или R);

f^{13} е C, полярно неутрален остатък или липсва; и

f^{14} е произволен аминокиселинен остатък или липсва;

при условие, че само едно от f^1 , f^2 и f^3 може да бъде C и само едно от f^{12} , f^{13} и f^{14} може да бъде C.

5. Състав съгласно претенция 4, в който f^5 е W.

6. Състав съгласно претенция 4, в който f^7 е L.

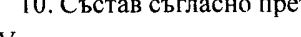
7. Състав съгласно претенция 4, в който f^9 е T.

8. Състав съгласно претенция 4, в който f^{10} е K.

9. Състав съгласно претенция 4, в който f^{12} е C и едно от f^1 , f^2 и f^3 е C.

10. Състав съгласно претенция 4, в който f^{13} е V.

11. Състав съгласно претенция 4, съдържащ аминокиселинна последователност с формула



(SEQ ID №: 125).

12. Състав съгласно претенция 11, съдържащ аминокиселинна последователност, подбрана от групата, състояща се от SEQ ID № №: 32, 33, 58, 60, 63, 66, 67, 69, 114, 115, 122, 123, 124, 147-150, 152-177, 179, 180 и 187.

13. Състав съгласно претенция 12, съдържащ аминокиселинна последователност с формула

LPGCKWDLLIKQWVCDPL (SEQ ID №: 33).

14. Състав съгласно претенция 4, съдържащ аминокиселинна последователност с формула

MLPGCKWDLLIKQWVCDPLGGGGG
(SEQ ID №: 12)

15. Състав съгласно претенция 4, съдържащ аминокиселинна последователност от SEQ ID №: 44.

16. Състав, съдържащ аминокиселинна последователност с формула

$h^1h^2h^3CWh^6h^7Wgh^{10}Ch^{12}h^{13}h^{14}$
(SEQ. ID. № 102)

в която:

h^1 , h^2 и h^3 независимо едно от друго липсват или са аминокиселинни остатъци;

h^6 е хидрофобен остатък;

h^7 е хидрофобен остатък;

h^{10} е киселинен или полярен хидрофобен остатък; и

h^{12} , h^{13} и h^{14} независимо едно от друго отсъстват или са аминокиселинни остатъци.

17. Състав съгласно претенция 16, в който:

h^1 е G;

h^6 е A;

h^7 е полярно неутрален остатък; и

h^{10} е киселинен остатък.

18. Състав с формула

$(X^1)_a-V^1-(X^2)_b$

и нейни мултимери, в която:

V^1 е носител;

X^1 и X^2 са подбрани независимо едно от друго от $-(L^1)_c-P^1$, $-(L^1)_c-P^1-(L^2)_d-P^2$, $-(L^1)_c-P^1-(L^2)_d-P^2-(L^3)_e-P^3$ и $-(L^1)_c-P^1-(L^2)_d-P^2-(L^3)_e-P^3-(L^4)_f-P^4$;

едно или повече от P^1 , P^2 , P^3 и P^4 независимо едно от друго включват аминокиселинна последователност, избрана от групата, състояща се от SEQ ID NOS: 104, 106, 109 и 102;

L^1 , L^2 , L^3 и L^4 независимо едно от друго са линкери; и

a , b , c , d , e и f независимо едно от друго имат стойност 0 или 1, при условие, че поне едно от a и b е 1; и

b^1 и b^2 независимо едно от друго отсъстват или са аминокиселинни остатъци;

b^3 е киселинен или амиден остатък;

b^5 е киселинен остатък;

b^6 е ароматен остатък;

b^8 е аминокиселинен остатък;

b^{10} е T или I;

b^{11} е основен остатък;

b^{12} и b^{13} независимо едно от друго са аминокиселинни остатъци;

b^{14} е неутрален хидрофобен остатък;

b^{16} , b^{17} и b^{18} независимо едно от друго липсват или са аминокиселинни остатъци;

d^1 , d^2 и d^3 независимо едно от друго липсват или са аминокиселинни остатъци;

d^5 , d^6 и d^7 независимо едно от друго са аминокиселинни остатъци;

d^{10} е аминокиселинен остатък;

d^{12} е T или I;

d^{13} е аминокиселинен остатък;

d^{14} е аминокиселинен остатък;

d^{16} , d^{17} и d^{18} независимо едно от друго липсват или са аминокиселинни остатъци;

f^1 , f^2 и f^3 липсват или са аминокиселинни остатъци;

f^5 е W, Y или F;

f^7 е аминокиселинен остатък;

f^9 е T или I;

f^{10} е K, R или H;

f^{12} е C, неутрален хидрофобен остатък или основен остатък;

f^{13} е C, неутрален хидрофобен остатък или липсва; и

f^{14} е произволен аминокиселинен остатък или липсва;

при условие, че само едно от f^1 , f^2 и f^3 може да бъде C и само едно от f^{12} , f^{13} и f^{14} може да бъде C;

h^1 , h^2 и h^3 независимо едно от друго липсват или са аминокиселинни остатъци;

h^6 е хидрофобен остатък;

h^7 е хидрофобен остатък;

h^{10} е киселинен или полярен хидрофобен остатък; и

h^{12} , h^{13} и h^{14} независимо едно от друго липсват или са аминокиселинни остатъци.

19. Състав съгласно претенция 18 с формула

$P^1-(L^1)_c-P^2-(L^2)_d-V^1$ или $V^1-(L^2)_d-P^2-(L^1)_c-P^1$.

20. Състав съгласно претенция 18 с формула

$V^1-(L^1)_c-P^1-(L^2)_d-P^2$ или $P^2-(L^2)_d-P^1-(L^1)_c-V^1$.

21. Състав съгласно претенция 18, в който V¹ е Fc домен.

22. Състав съгласно претенция 18, в който V¹ е IgG Fc домен.

23. Състав съгласно претенция 18, в който V¹ е IgG1 Fc домен.

24. Състав съгласно претенция 18, в който V¹ съдържа последователността от SEQ ID №: 2.

25. Състав съгласно претенция 18, в който: 10

b³ е D, Q или E;

b⁶ е W или Y;

b¹¹ е K или R; и

b¹⁴ е V или L;

f⁵ е W;

f⁷ е L;

f¹⁰ е K; и

f¹³ е V.

26. Състав съгласно претенция 18, в който едно или повече от P¹, P², P³ и P⁴ независимо 20

f¹f²f³PKWDF¹L¹f⁴PKQf²f³f⁴

(SEQ ID №: 125).

27. Състав съгласно претенция 26, където едно или повече от P¹, P², P³ и P⁴ всяко независимо съдържа 25

LPGCKWDLLIKQWVCDPL (SEQ ID №:

33).

28. Състав съгласно претенция 26, съдържащ аминокиселинна последователност с формула 30

MLPGCKWDLLIKQWVCDPLGGGGG

(SEQ ID №:12).

29. Състав съгласно претенция 26, който има аминокиселинна последователност, подбрана 35

30. Състав съгласно претенция 26, в който L² е повече от 5 аминокиселини.

31. Състав съгласно претенция 30, в който L² е подбрано от 40

GSGSATGGSGSTASSGSGSATx¹x²

(SEQ ID №: 193)

и

~~CGSATCCGSAASCGSATx¹CGSATCCGSAASCGSATx²~~

(SEQ ID №: 194),

където x¹ и x³ независимо едно от друго са основни или хидрофобни остатъци и x² и x⁴ независимо едно от друго са хидрофобни остатъци.

32. Състав съгласно претенция 31, в който L² е подбрано от 50

33. Състав съгласно претенция 22, съдържащ последователност, подбрана от SEQ ID № №: 44-49 и 52-55.

34. ДНК, кодираща състав съгласно претенция 18.

35. Вектор на експресия, съдържащ ДНК съгласно претенция 34.

36. Клетка гостоприемник, съдържаща вектора на експресия съгласно претенция 35.

37. Клетка съгласно претенция 36, която клетка е E. coli клетка.

38. Използване на състав съгласно която и да е от претенции 1, 3, 4, 16 или 18, за приготвяне на медикамент за лечение на медирано от В клетки автоимунно заболяване.

39. Използване на състав съгласно която и да е от претенции 1, 3, 4, 16 или 18 за приготвяне на медикамент за лечение на лупус.

40. Използване на състав съгласно която и да е от претенции 1, 3, 4, 16 или 18 за приготвяне на медикамент за лечение на медиран от В клетки рак.

41. Използване на състав съгласно която и да е от претенции 1, 3, 4, 16 или 18 за приготвяне на медикамент за лечение на В-клетъчна лимфома.

42. Състав съгласно претенция 18 с формула

V¹-(L¹)_c-P¹-(L²)_d-P² или P²-(L²)_d-P¹-(L¹)_c-V¹ където:

P² съдържа аминокиселинна последователност от SEQ ID №: 125;

L² съдържа аминокиселинна последователност от SEQ ID №: 59;

P¹ съдържа аминокиселинна последователност от SEQ ID №: 33;

f¹ е Met или отсъства;

f² е Gly;

f³ е Cys;

f⁷ е Leu;

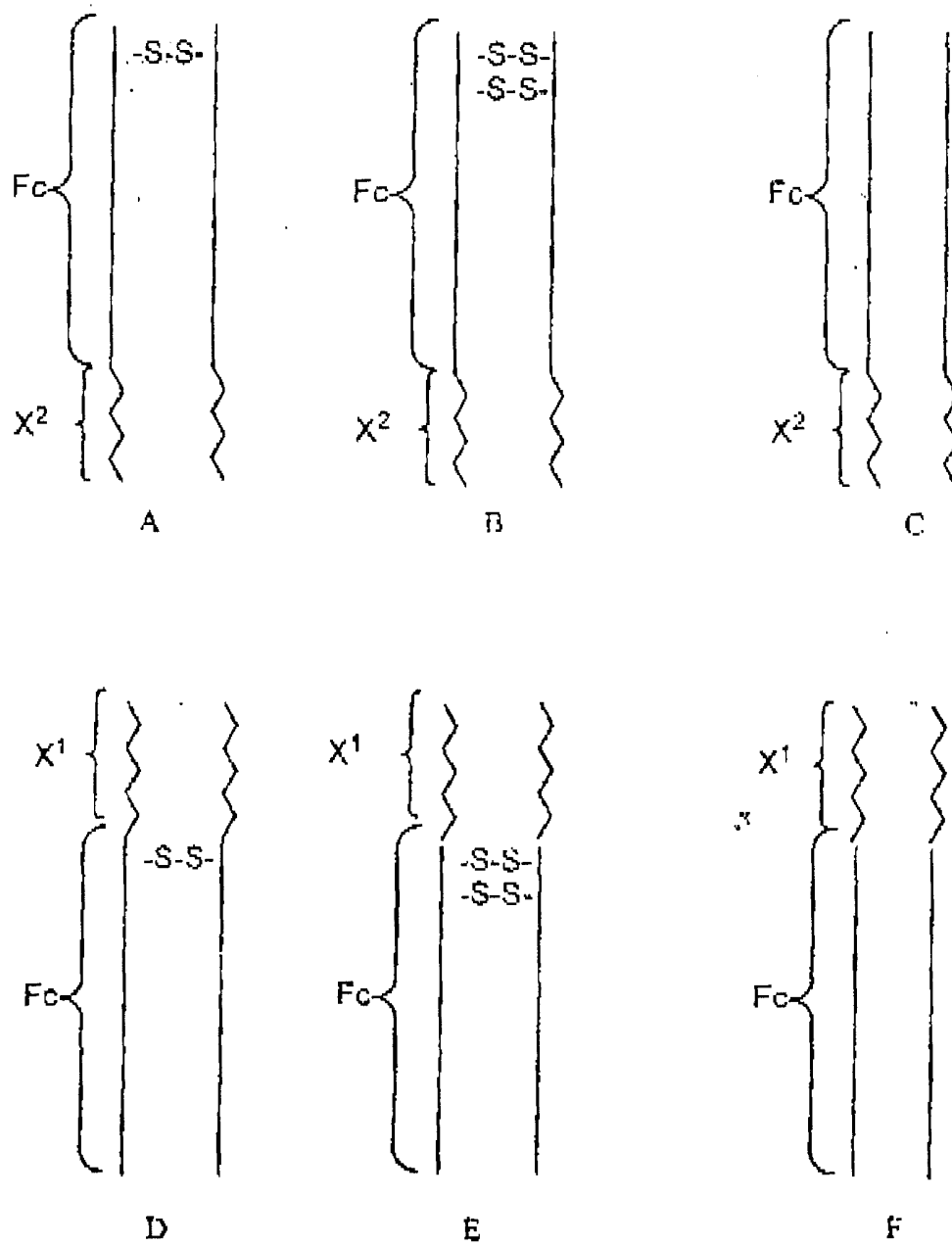
f⁹ е Ile;

f¹² е Trp;

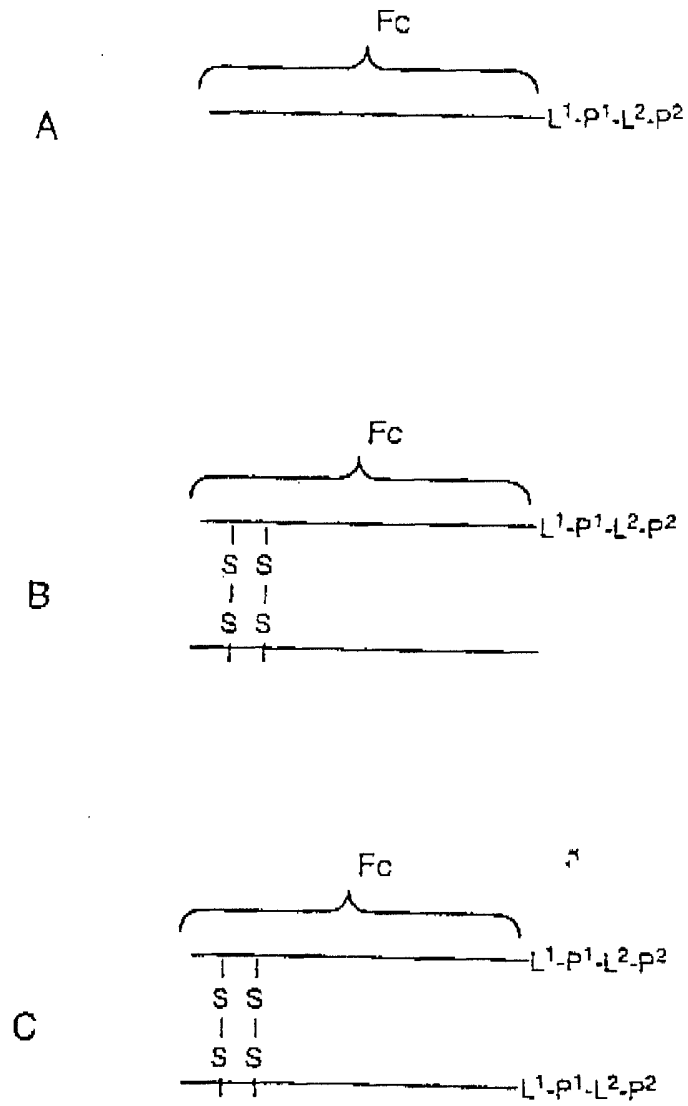
f¹³ е Val; и

f¹⁴ е Cys.

43. Състав съгласно претенция 42, където P¹-L¹-V¹ съдържа аминокиселинна последователност от SEQ ID №: 44.



ФИГ. 1



Фиг. 2

Фиг. 3

3) ACP3-8-4-a

NdeI

TATCGTTCCGTTCTGTGACCTGCTGACTAAACACTGTTTCGAAACCTGGTGGAGCCCGT

-----+-----+-----+-----+-----+ 60

ACCAAGGCACACACTGGAGGACTGATTTGTGACAAAGCTTCGACCACCTCCGCCA

M V P F C D L L T K H C F E A G C C C -

SalI

|

GGGC

61 ----- 69

CCCCAGCT

G V D -

4) ACP3-12-4-a

November 6, 2000 12:53 ..

NdeI

|

TATCGGTTCTCGTTGTAAATACAAATGGGACGTTCTCACTAAACAGTGTTCACACAC

1 -----+-----+-----+-----+-----+ 60

ACCCAAGAGCAACATTTATGTTTACCCCTGCAAGACTGATTTCACAAAGCTGGTG

M G S R C K Y K W D V L T K Q C F H H -

SalI

|

CGTGGAGGCCGCTGGGG

61 -----+-----+ 81

CCACCTCCGCCACCCACGCT

G G G G G V D -

Фиг. 4В

7) AGP3-12-8-a

NdeI

|

TATGTCCTGACGACTGTATGTACGACCAGCTGACTCGTATGTTTCATCTCTTCTAACCTG

1 - -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 50

ACAGACTGCTGACATACATCTCTGCTCGACTGACCATACAGTAGACAAGATTGGAC

a M S D D C M Y D Q L T R M F I C S N L -

SalI

|

GCTGGACGGCGGTGGG

61 -----+-----+-----+-----+-----+ B1

CCACCTCCGCCACCCAGCT

a G G G G G V D -

8) AGP3-12-9-a

NdeI

|

TATGGACCTGAACTGTAAATACGACGAACTGACTTACAAGCAATCGTGTCACTTCAAC

1 - -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60

ACCTGGACTTGACATTTATGCTGCTTGACTGAATGTTCTTACCACAGTCAAGTTG

a M D I N C K Y D E I T Y K E W C Q F N -

SalI

|

GCTGGACGGCGGTGGG

61 -----+-----+-----+-----+-----+ B1

CCACCTCCGCCACCCAGCT

a G G G G G V D -

Фиг. 4D

9) AGP3-12-10-a

NdeI

|

TATGTTCCACGACTGTAAATACGACCTGCTGACTCGTCAGATGGTTTGTCCAGGTCTG

1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60

ACAACGCTGCTGACATTTATGCTGGACGACTGAGCAGTCTACCAACAGTCCCAGAC

a M F H D C K Y D L L T R Q M V C H G L -

Sall

|

CCTCGAGGCGGTGGGG

61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 81

CCACCTCCGCCACCCCAGCT

a G G G G G V D -

10) AGP3-12-11-a

NdeI

|

TATGGCTAACCACTGTATTCTGGACCCACTGCTGAAACAGGACATCTGTCCCTCTCCG

1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60

ACGCATTGCTGACAAAGACCCCTGGTGGACCACTTGTCCCTGTAGACAGGCAGAGGC

a M R N H C F W D H L L K Q D I C F S F -

Sall

|

GGTGGAGCGGTGGGG

61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 81

CCACCTCCGCCACCCCAGCT

a G G G G G V D -

Фиг. 4Е

11) AGP3-12-14-a

```

      NdeI
      |
TATGGCTAACCAGTGTGGTGGGACTCTCTGCTGAAAAAAAAACGTTTGTGAATTCTTC
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
      ACCGATTGGTCACAACCACCCCTGAGAGACGACTTTTTTTTGCAAACACTTAAGAAG
a      M A N Q C W W D S L L K K N V C E F F -

      Sali
      |
GGTGGAGGCGGTGGGG
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 81
      CCACCTCCGCCACCCCAGCT
a      G G G G G V D -

```

12) AGP3 Consensus

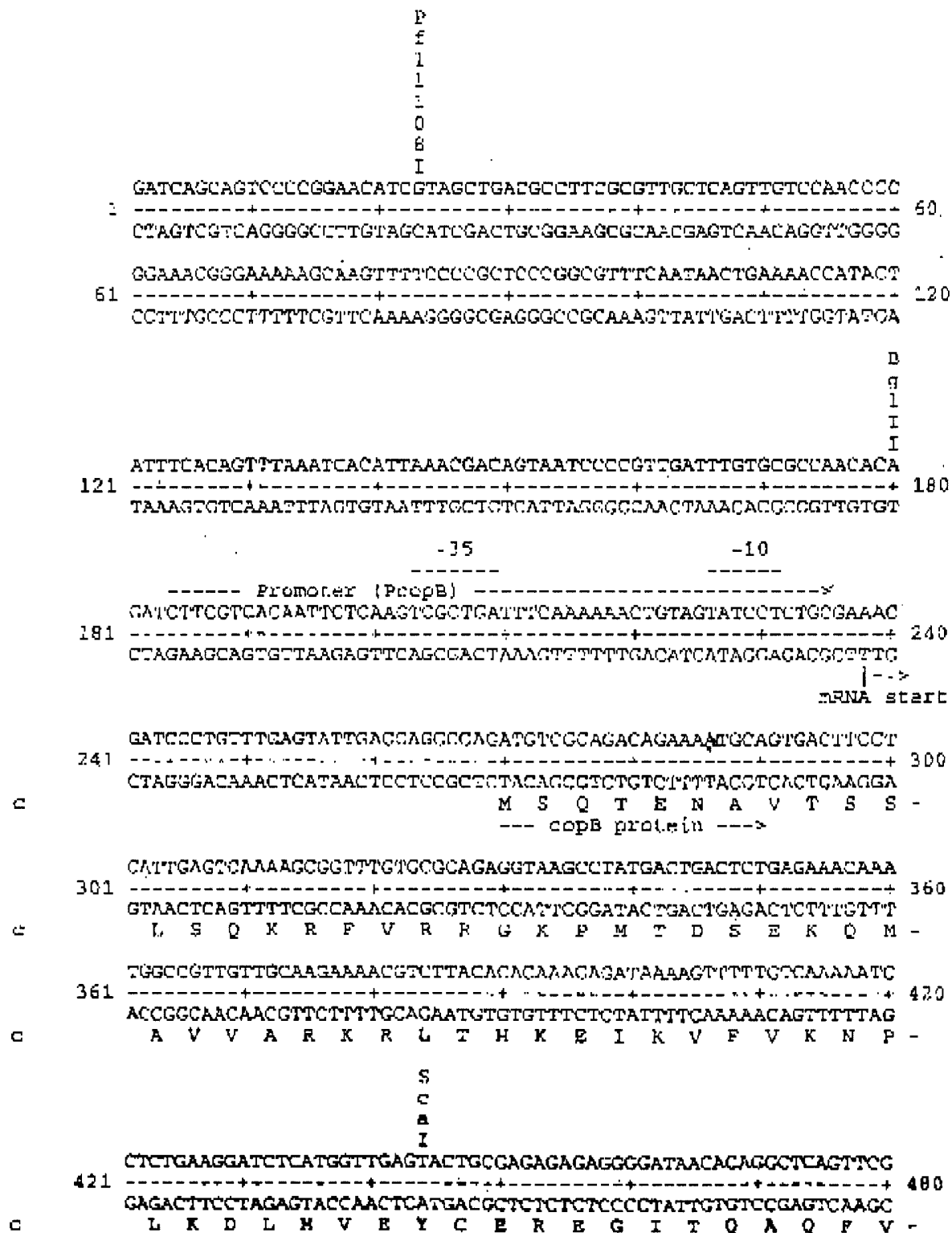
```

      NdeI
      |
TATGTTCCACGACTGCAAATGGGACCTGCTGACCAAACAGTGGGTTTGCCACGGTCTG
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
      gLATAACAAGGTGCTGACGTTTACCCTGGACGACTGGTTTGTACCCAAACGGTGCCAGAC
a      M F H D C K W D L L T K Q W V C H G L -

      Sali
      |
GGTGGAGGCGGTGGGG
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 81
      CCACCTCCGCCACCCCAGCT
a      G G G G G V D -

```

Фиг. 4F



Фиг. 5А

```

                                     -35
                                     -----
                                     <----- Promoter (PrepA) ----->
                                     |--- copB binding site ---|
481 TTGAGAAATCATCAAACTCAACTGCCAAAGACTGGATATACTAAAGTAAAGACTTTACT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AACCTCTTTTAGTAGTTTCTACTTTGACGTTTCTGACCTATATGATTTTCATTCTGAAATGA 540
c   E K I T K D E L Q R L D I L K +

                                     -10
                                     -----
541 TTGTGGCGTAGCATGCTAGATTACTCATCGTTTAAGGAATTTTCGCGCTGGCCACGCCST
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AACACCGCATCGTACGATCTAATGACTAGCAAAATTCCTTAAACACCCACCGGTCCGSCA 600
                                     |--- mRNA --->

                                     D
                                     B r
                                     m d
                                     n i
                                     I I
AAGGTGGCAACGAACCTGGTTCTGATGTGGATTTCACAGCCAGCCAGAAAAGCAAAAACCCCG
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTCCACCGTTTCCTTGACCAAGACTACACCTAAATGTCTCTCGGTCTTTTCGTTTCTGGGGC 660
c   M W I Y R S Q K S K N P D -
                                     --- copT (ORF) --->

<----- copA RNAI ----->
661 ATAATCTTCTTCAACTTTTGCCACTACGAAAAGATTACCGGGGGCCACTTAAACCGTATA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TATTAGAAAGAGTTGAAAACGCTCATGCTTTTCTAAATGGCCCCGGGTGAATTTGCAATAT 720
c   N L L Q L L R V R K D Y R G P L K P Y S -

                                     <----- Promoter (RNAI) ----->
                                     -10                                     -35
                                     -----
                                     <-----|----->
721 GCCAACAATTCAGCTATGCGGGGACTATAGTTATATGCCCGGAAAAGTTCAAGACTTCTT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGGTTGTTAAGTCGATAACGCCCTCATATCAATATACGGGGCTTTTCAAGTTCTCAAGAA 780
c   Q Q F S Y A G S I V I C P E K F K T S F -

TCTGTGCTCGCTCTCTTCTGCGCATTGTAAGTGCAGGATGGTGTGACTGATCTTCACCAAA
781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGACACGAGCGAGGAAGACCCGTAACATTACCGTCTTACCACACTGACTAGAAGTGGTTT 840
c   C A R S F C A L + M T D L H Q T -
                                     --- repA1 protein --->

                                     D
                                     F
                                     a
                                     I
                                     I
                                     I
CGTATTACCGCCAGGTAAAGAACCCGAATCCGGTGTTTACACCCCGTGAAGGTGCAGGAA
841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GCATAATGGCGGTCCATTCTTGGGCTTAGGCCACAAATGTGGGGCACTTCCACGTCCTT 900
c   Y Y R Q V K N P N P V F T P R E G A G T -

CGCTGAAGTTCTGCGAAAAACTGATGGAAGAGCGGTGGGCTTCACTTCCCGTTTTGATT
901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGCACTTCAAGACGCTTTTGTACTACCTTTTCCGCCACCCGAAGTGAAGGGCAAACTAA 960
c   L K F C E K L N E K A V G F T S R F D F -

```

Фиг. 5B

63

```

ACAGGGAACGTCAGCATATTCTCACCCCTGGTGAAACGCCAGCTGACGGCGGAAATCGGCG
1501 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1560
TGTCCCTTGCAGTCCTATAACAGTGGGACCACCTTGGCCCTGGACTGGCGGCTTTAGCGCC
c R E R Q D I V T L V K R Q L T R E J A E -

AAAGGGCGCTTCACTGUCCAATCGGTGAGCGGGTAAAGCCCGAAGTTGAGCGTCTGTGTGAAGG
1561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1620
TTCCCGCGAAGTACCGGTAGCACTCCGCCATTTTGGCGTTCAACTCGCAGCACACTTCC
c G R F T A N R E A V K R E V E R R V K E -

AGCGCATGATTCTGTCAAGTAACCGTAATTACAGCCGGCTCGCCACAGCTTCCCCCTGAA
1621 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1680
TCGGCTACTAAGACAGTGCAATTGGCATTAAATGTCGCCGACCGGTGTGGAAGGGGGACTT
c R M I L S R N R N Y S R L A T A S P *

AGTGACCTCCTCTGAATAATCGCGCCGTGGCGCCGAGGCTTCCGCACGTTCTGAAGCCCGAC
1681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1740
TCACTGGAGGAGACTTATTAGGCGCGACCGCGGCTCCGAAGGCCCTCCAGACTTCCGGGCTC

P
L
L
M
I

AGCGCACAAAAAATCAGCACCCACATACAAAAAACACCTCATCATCCAGTTCTCGTGCA
1741 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1800
TCCCGTGTCTTTTATGTCGTGGTGTATCTTTTTTCTGGAGTAGTAGGTCCAGAACCCAGT

TCCGGCCCCCCCCCTGTTTTCGATACAAAACAGGCTCACAGACGGGCAATTTTCTTATCC
1801 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1860
AGGCCGGGGGGGACAAAAGCTATCTTTTGTGGGAGTGTCTGCCCTTAAACCAATAGG

|----- gfi -----
ACATTAAACTCCAGGGACTTCCCATTAAGGTTACAAACCTTCATGTATATAAGGGCCAT
1861 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1920
TGTAAATTTGACGTTCCCTGAAGGGGATTTCCAATCTTGGCAAGTAACTATTTGGGGTA

----- gfi -----
CCGCCAGCGTTACAGGGTGCAATGTATCTTTTAAACACCTGTTTATATCTCCTTTAAACT
1921 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1980
GGCGGTGCAATGTCTCCACGTTACATAGAAAAATTTGTGACAAATATAGAGCAAAATTTCA

----- | -----
ACTTAATTACATTUATTTAAAAAGAAAACCTATTCACTGCCCTCTCCTTGGACAGACAT
1981 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2040
TGAATTAATGTAAAGTAAATTTTCTTTTGGATAAGTGACCGACAGCAACCTGTCTGTCTA

ATGCACCTCCACCGCAAGCGCGGGGGCCCTACCGGAGCCGCTTTAGTTACAACACTCAG
2041 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2100
TACGTGGAGCGTGGCTTCCGCCCGCGGGGATGGCCTCGGCGAAATCAATGTTGTGAGTC
a M H L P P Q A A G P Y R S R P S Y N T Q -
--- repA4 protein ---> |----->

ACACAACCACAGAAAAACCCCGGTCCAGCCAGAACTGAAACCAAAAGCCCTCCCTC
2101 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2160
TGTGTTGGTGCTCTTTTGGGGCCAGGTGCGCTCTTGACTTTGGTGTTCGGGGAGGGAG
a T Q P P E K P R S S A E L K P Q S P S L -

ATAACTGAAAAGCGCCCCCGCCCGGTCCGAAGGGCCCGAACAGAGTCCCTTTTAATFAT
2161 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2220
TATTGACTTTTCGCCGGGGCGGCGCCAGGCTTCCCGGCTTGTCTCAGCGAAAATTAATA
a I T E K R P R P G P K G R N R V A F N Y -

```

Фиг. 5D

```

      GAATGTTGTAACCTACCTCATCATCGGTGTAGTCTTCTCGCTGGAAGTTCTCAGTACACG
2221 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2280
      CTTACAACATTGATGAAGTAGTAGCGACAGTCAGAAAGAGCGACCTTCAAGAGTCATGTGC
a      E C C N Y F I I A V S L L A G S S Q Y T -

      BS
      gf
      ii
      II
      /
      CTGTAAGCGGCCCTGACGGCCCGCTAACGGCGAGATACGCCCGACTTGGGGTAAACCC
2281 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2340
      GAGCATTCCCGGGGACTGCGGGGCGATTGCGCCCTCTATGCGGGCGCTGAAGCCCAATTGGG
a      L V S G P D G P L T R R Y A P T S G K P -

      TCGTCGGGACCACTCCGACCGGSCACAGAAGCTCTCTCATGGCTCAAAGCGGCTATGGTC
2341 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2400
      AGCAGCCCTGCTGAGGCTGGCGGCTGTCTTTCGAGAGAGTACCGACTTTCCGCCATACCCAG
a      S S G P L R P R T E A L S W L K A G M V -

      TGGCAGGGCTGGCGAGGGSTAAGGTGAATCTATCAATCACTACCGGCTTACGCCCGGGCT
2401 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2460
      ACCGTCCCGACCCCTACCCATTCCACTTTAGATAGTTAGTCATGCCCGAATGCCGCCCGA
a      W Q G W G W V R -

      B
      S
      L
      E
      I
      I
      TGGCGGCTTTTACTCCTGTTTCATATATCAAAACAACAGGTCACCCCTTCCATGCCCGCTG
2461 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2520
      AGCCGCCCAAAATGAGGACAAAGTATATACTTTCTTGTCCAGTCCCGGAAGGTACGCCGAC

      B
      S
      P
      L
      U
      L
      I
      I
      ATCGGUCATATCCTGCTAACGATATCTGAATTGTTATACATCTGTATATACGTGGTAATG
2521 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2580
      TACGCCGTATAGGACCATTCCTATAGACTTAAUAATATCTACACATATATGCACCATTAC

      ACAAATAAGGACAAGTTAAATTTTACAGGCCATGCAATGATTCAAACACGTAATCAAT
2581 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2640
      TGTTTTTTATCCTGTTCAATTTTTAAATGTCCGCTACGTTACTAAGTTTGTGCATTAGTTA

      ATCGGGGGTGGGCGAAGAACTCCAGCATGAGATCCCGGCGCTGGAGGATCATCCAGCCGG
2641 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2700
      TAGCCCCACCCGCTTCTTCAGGTCTACTCTAGGGGCGCGACCTCTAGTAGGTCCGGC

      CGTCCCGGAAAACGATTCCGAAGCCCAACCTTTCATAGAGGGGGCGGTGGAATCGAAAT
2701 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2760
      GCAGGCCCTTTTGTAAAGCTTCCGGTTGGAAAGTATCTTCCCGCGCCACCTTAGCTTTA

```

Фиг. 5Е

Фиг. 5F

```

F      A E D Q L E N L V G S L D T K V F L V P .
3451  GCGCCCCCTGCGCTGACAGCCGGAACACCGCCGCATCAGAGCAGCCGATTGCTCTGTTTGTGC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3540
CGCCGGGAGCGGACTGTGCGGCTTTGTCGCGCGTAGTCTCGTCGGCTAACAGACAAACAG
F      R G Q A S L R F V A A D S C G I T Q Q A
                                     E
                                     a
                                     g
                                     I
3541  CCACTCATAGCCGAATAGCCCTCTCCACCCAAAGCGCCCGAGAACCTGCGTGCAATCCATC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3600
GGTCAGTATCCGCTTATCCGAGAGGTGGGTTCCCGGCTCTCTGGACGCACGTTAGGTAG
F      W D Y G F L R E V W A A P S G A H L G D -
3601  TTGTTCAATCATGCGAAACGATCCCTCATCCCTGCTCTCTTGAATCTGATCTTGATCCCTTGCG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3660
AACAAAGTTAGTACCTTTGCTAGGAGTAGGACACAGAACTAGACTAGAACTAGGCGACGE
F      Q E I M
-- APHII (kanamycin resistance) protein --
                                     -10
                                     <--- mRNA APHII ---|
3661  CCATCAGATCCCTTGCGCGCAAGAAAGCCATCCAGTTTACTTTGCAAGGCTTCCCAACCTT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3720
GCTAGTCTAGGAACCGCCGTTCTTTTCGTTAGGTCAAATGAACGTCGCCCAAGGGTTCCAA
                                     -35
                                     -----
                                     <----- Promoter (APHII) -----
3721  ACCAGAGGGCGCGCCGAGCTGCAATTCGCGTTGCTGTCCATAAAACCGCCCGAGTC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3780
TGCTCTCCCGCGCGCTCGACCGTTAAGCCCAAGCGAACGACAGGTATTTTGCGCGCTCAG
3781  TAGCTATCGCCATGTAAGCCCACTGCAAGCTACCTGCTTTTCTCTTTGCGCTTGCGTTTTC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3840
ACCGATAGCGGTACATTCCGGTGACGTTGATGGACCAAGAGAAACGCGAACGCCAAAG
3841  CCTTGTCAGATAGCCCACTAGCTGACATTCTATCCCGGTCAGCACCGTTTCTCCGGACT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3900
GGAACAGGCTTATCCGGTCATCGACTGTAAGTAGGCCCACTCTGTGGCAAGACGCCCTGA
3901  CGCTTTCTACCTGTTCCGCTTCTTTTAGTAGCCCTTCCGCGCTCAGTGCTTCCGCGACGCG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3960
CCGAAAGATGCACAAGGCGAAGGAAATCCTCGGAAACGCGGACTCACGAAGCCCTCGC
                                     |----- par locus -----
3961  TGAAGCTACATAATGTGATCCGGGCAATCGCTCAATATTCCTTTGTCGCCAGCCATC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4020
ACTTCGATGTATATACACTAGGCCCGTTTAGCGACTTATAAGGAAAACAGAGGTTGGTAG
                                     B
                                     C
                                     G
                                     I
                                     ----- par locus -----
4021  AGGCACCTGAGTCCCTGCTTTTTTCGTGACATTCAAGTTCCGCTCCGCTCACGGCTCTGCCA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4080
TCCGTGCACTCAGCGACAGAAAAAGCACTGTAAAGTCAAGCGACCGGAGTCCCGAGACCCCT
                                     ----- par locus -----

```

```

4081 GTGAATGGGGTAAATGCCACTACAGGGCGCTTTTATGCAATTCATCCAAGCAAACCTACCU 4140
      +-----+-----+-----+-----+-----+
      CACTTACCCCCATTTACCGTGATGTCGGGGGAAAATACCTAAGTACGTTCTTTTGATGGG

      ----- par locus -----
4141 ATAATACAAGAAAAGCCCGTCACGGGCTTCTCAGGGCGTTTATGGCGGGTCTGCTATGT 4200
      +-----+-----+-----+-----+-----+
      TATTATGTTCTTTTGGGCAGTGCCCGAAGAGTCCCGCAAAATACCGCCCCAGACGATACA

      ----- par locus -----
4201 GGTGCTATCTGACTTTTGTCTGTTTCAGCAGTTCCCTGGCCCTCTGATTTTCCAGTCTGACCA 4260
      +-----+-----+-----+-----+-----+
      CCACGATAGACTGAAAAACGACAAGTCTCAAGGACGCCAGACTAAAAGGTCAGACTGGT

      ----- par locus -----
4261 CTTUGGATTATCCCGTGACAGGTCAATTCAGACTGGCTAATCCACCCAGTAAGTCAGCGGT 4320
      +-----+-----+-----+-----+-----+
      GAAGCCCAATAGGGCACTGTCCAGTAAGTCTGACCGATTACG/GGGTCAATCCGTCGCCA

      N      B
      s      s
      i      s
      I      I
4321 ATCATCAACAGGGCTTACCCGTCCTTACTGTCCGAAGACGTGCGTAACGTATGCATGCTCTCC 4380
      +-----+-----+-----+-----+-----+
      TAGTACTTGTCCGAATGGGCAGAAATGACAGCTTCTGCAAGCATTGCATACGTACCAGAGG

      T1 hairpin
      -----> <-----
4381 CCATGCGACAGTAGGCAACTGCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCCGAAGACT 4440
      +-----+-----+-----+-----+-----+
      GSTACGCTCTCATCCCTTGACGGTCCGTAAGTTAATTTGCTTTCCAGTCAGCTTTCTCA

      -----|
4441 GGGCCTTTCTGTTTATCTGTTGTTTGTCCGTCGAACGGCTCTCTCTCACTAGGACAAATCCCC 4500
      +-----+-----+-----+-----+-----+
      CCCGGAAACGAAAATAGACAACAAACAGCCACTTGGGACAGGACTCATCCCTGTTAGGGC
      -- T1 stop -->|

      F
      B
      S
      l
      4
      0
      6
      I
4501 CGGGAGCGGATTTGAACGTTGCCAAGCAACGGCCCCGGAGGGTGGCGGGCAGGACGCCCCC 4560
      +-----+-----+-----+-----+-----+
      GCCCTCGCCTAAACTTGCAACGCTTCGTTCCCGGGCCTCCACCGCCCGTCTCTGCGGGC

      T2 hairpin
      -----> <-----
4561 CATAAACTGCCAGGCATCAAATTAAGCAGAAGGCCATCTGACGGATGGCCTTTTTCGGT 4620
      +-----+-----+-----+-----+-----+
      GTATTGACGGTCCGTAAGTTAATTCGTCTTCCGGTAGGACTGCCCTACCGCAAAAACGCA
      ----- T2 stop ----->|

```

Фиг. 5H

A
a
t
I
I

4621 TTCTACAAACTCTTTTGTATTATTTTCTAAATACATTCAAATATGGACGTCGTACTTAAC 4680
-----+-----+-----+-----+-----+
AAGATGTTTGAGAAAACAAATAAAAAGATTTATGTAAGTTTATACCTGCAGCATGAATTG
* -

4681 TTTTAAAGTATGGGCAATCAATTGCTCCTGTAAATGCTTTAGAAATACTTTGGCAGC 4740
-----+-----+-----+-----+-----+
AAAATTTCATACCCGTTAGTTAACGAGGACAATTTTAACGAAATCTTTATGAAACCGTCG
d * S K F Y P C D I A G T L I A K S I S Q C -
|<--- luxR protein ---

4741 GGTTTGTGTATTGAGTTTCATTTGCGCATTGGTTAAATGGAAAGTGACCGTGCGCTTAC 4800
-----+-----+-----+-----+-----+
CCAAACAACATAACTCAAAGTAAACGCGTAACCAATTTACCTTTCACTGGCACGCGAATG
d R N T T N L K M Q A N T L H F T V T R K -

4801 TACAGCCTAATATTTTTGAAATATCCCAAGAGCTTTTTTCCTTCGCATGCCCACGCTAAAC 4860
-----+-----+-----+-----+-----+
ATGTCGGATTATAAAAACCTTTATAGGGTCTCGAAAAAGGAAGCGTACGGGTGCGATTG
d S C G L I K S I D W S S K G E C A W A L -

4861 ATTCTTTTTCTCTTTTGGTTAAATCGTTGTTGATTATTATTGCTATATTTATTTTTC 4920
-----+-----+-----+-----+-----+
TAAGAAAAAGAGAAAACCAATTTAGCAACAACTAAATAATAAACGATATAAATAAAAAG
d C E K E R K T L D N N S K N N A I N I K -

4921 GATAATTATCAACTAGAGAAGGAACAATTAATGGTATGTTTCATACACGCATGTAAAAATA 4980
-----+-----+-----+-----+-----+
CTATTAATAGTTGATCTCTTCCTTGTTAATTACCATACAAGTATGTGCGTACATTTTAT
d R Y N D V L S P V I L P I N M C A H L F -

B
S
m
I

4981 AACTATCTATATAGTTGTCTTTCTCTGAATGTGCAAACTAAGCATTCCGAAGCCATTAT 5040
-----+-----+-----+-----+-----+
TTGATAGATATATCAACAGAAAGAGACTTACACGTTTTGATTTCGTAAGGCTTCGGTAATA
d L S D I Y N D K E S H A F S L M G F G N -

5041 TAGCAGTATGAATAGGGAACTAAACCCAGTGATAAGACCTGATGATTTTCGCTTCTTTAA 5100
-----+-----+-----+-----+-----+
ATCGTCATACTTATCCCTTTGATTTGGGTCACTATTCTGGACTACTAAAGCGAAGAAATT
d N A T H I P F S F G T I L G S S K A E K -

5101 TTACATTTGGAGATTTTTTATTTACAGCATTGTTTTCAAATATATTCCAATTAATCGGTG 5160
-----+-----+-----+-----+-----+
AATGTAAACCTCTAAAAAATAAATGTCGTAACAAAAGTTTATATAAGGTTAATTAGCCAC
d I V N P S K K N V A N N E F I N W N I P -

5161 AATGATTGGAGTTAGAATAATCTACTATAGGATCATATTTTATTAAATTAGCGTCATCAT 5220
-----+-----+-----+-----+-----+
TTACTAACCTCAATCTTATTAGATGATATCCTAGTATAAATAATTTAATCGCAGTAGTA
d S H N S N S Y D V I P D Y K I L N A D D -

Фиг. 5I

5221 AATATTCCTCCATTCTTTTAGGGTAATTATCCAGAATTGAAATATCAGATTAAACCATAG 5280
 TTATAACGGCAGGTAAAAAATCCATTAAATAGGTCTTAACCTTTATAGTCTAAATTGGTATC
 Y Y Q R W K K P Y N D L I S I D S K V M -
 N
 E
 D
 I
 5281 AATGAGGATAAATCATCGCGAGTAAATAATATTCACAATGTACCATTCTTAGTCATATCAG 5340
 TTACTUCTATTTACTAGCGCTCATCTATTATAAGTGTTCACATGGTAAATCAGTATAGTC
 S H P Y I I A L L Y Y E C H V M K T M D -
 5341 ATAAGCATTGATTAATATCATTTATGCTTCTACAGGCTTTAATTTTATTAATTATTCTCT 5400
 TATTTCGTAACATAATTATAGTAATAACGAAGATGTCCGAAATTAATAATTAAATAAGACA
 S D C Q N I D N N S R C A K I K N I I R -
 5401 AAGTGTCTGTCGGCATTCTTATGCTCTTTCATACCCATCTCTTTATCCTTACCTATCTGTTCTC 5460
 TTCACAGCAGCGCTAAATAACAGAAAGTATCGGGTAGAGAAATAGGAATGGGATAACAAACAG
 Y T Q D A N I D K M
 <---- luxR protein ---->
 5401 GCAAGTTTTTCGGTGTATATATCATTAATAACGGTAATAGATTGACATTTGATTCTAATAA 5520
 CGTTCAAAACGACAAATATATAGTAATTTTGGCATTAATCTAAGTGAACCTAAGATTATTT
 <-----|<-----|<-----|<----- Promoter (luxPR) ----->
 luxR mRNA start sites
 CRP Binding Site
 5521 ATTGGATTTTGTGCACACTACTATATCGCTTGAATACAATTGTTTAAACATAAGTAAGTCTG 5580
 TACCTTAAAAACAGTGTGATAATATAGCGAATTTTATGTTAACAATTTGTATTCATGGAC
 ----- Promoter (luxPR) ----->
 lux operator site -35 -10 C B
 1 a a
 I I
 5581 TAGGATCGTACAGGTTTACGCAAGAAATGGTTTGTATAGTTCGATTATTCGATTTCATT 5640
 ATCCTAGCATGTCCAAATGCGTTCTTTTACCAACAATATCAGCTAATTAGCTAAACTAA
 |---- 1209-85 -----> |--- mRNA start --->
 NdeI
 5641 CTAGATTTGTTTTAACTAATTAAAGGAGCAATAACATATGATCGCTCCACCATGCCACCAG 5700
 GATCTAAACAAAATTGATTAAATTTCTCTTATTGTATACTAGCGAGGTGGTACGTGGTC
 M I A P P C T S -
 |--- RANK --->
 5701 TGAGAAGCATTATGAGCATCTGGGACCGTGGTGTAAACAATGTGAACCAGGAAAGTACAT 5760
 ACTCTTCGTAATACTCGTAGACCTGCGCAGGACATTGTTTACACTTGGTCTCTTCATGTA
 E K H Y E H L G R C C N K C E P G K Y M -

Фиг. 5J

```

5861  GTTTCTAAATGCACTACTACCTCTGACACGTATGTCTGCCCCGTGGCCCTGGATGAATA 5920
      CAGAAGATTTACGTGATGATCGAGACTGTACATACAGACGGGACACCGGGCTTACTTAT
b    S S K C T T T S D S V C L P C G P D E Y
5881  CTTGGATAGCTGGAATGAAGAAGATAAATGCTTGCTGCATAAAGTTTGTGATACAGGCAA 5940
      GAACCTATCGACCTTACTTCTTCTATTTACGAACGACGTATTTCAAAACACTATGTCCGTT
b    L D S W N E E D K C L L H K V C D T G K -
                                     ApaLI
5881  CGCCCTGGTGGCCGTGGTCCCGGCAACAGTACGACCCCGGGCGGTGGGGGTGCACGGC 5940
      CCGGGACCAACCGCAGCAGCGCTTGTCTATGCTGGGGGCTCGGAGCGGCACGTGCCC
b    A L V A V V A C N S T T P R K C A C T A -
                                     KpnI
                                     Acc65I
5941  TCGGTACCACTGAGCCAGGACTGCCAGTGGTGGCGCCGCAACACCGAGTGGGGCCCGCG 6000
      ACCCATGGTGACCTGGTTCCTGACGCTCAGCAGCGCGGGCGTGTGTGCTCAGCGCGGCC
b    G Y H W S Q D C E C C R R N T E C A P C
6001  CCTGGGCGCCAGCACCCGTTCCAGCTCAACAAGGACACAGTGTGCAAACTGTGGCTTGC 6060
      GGAACCCCGGGCTGTGGCAACGTCCAGTGTGTCTGTCTACACGTTTGGGAACGGAACG
b    L G A Q H P L Q I N K D T V C K P C L A -
6061  AGGCTACTTCTCTGATGCCCTTTCTCCACCGACAAATGACAGACCTTGGACCAACTGTAC 6120
      TCCGATCAAGAGACTACGGAAAACGAGCTGCTCTTTACGTCCTGGGACCTGCTGACATG
b    G Y F S D A F S S T D K C R P W T N C T -
6121  CTCTCTTGGAAAGACAGTAGAACATCATGGGACAGACAAATCCGATCTGCTTGGACGTC 6180
      GAAGGAACCTTTCTCTCATCTTGTAGTACCTGTCTCTTTAGGCTACACAAACGTCAGG
b    F L G K E V E H H G T E K S D V V C S S -
                                     AccI
                                     Sall
6181  TTCTCTCCAGCTAGAAAAACCAACAAATGAACCCCATGTTACGTCGACAAAACTCACAC 6240
      AAGAGACGCTCGATCTTTTGGTGGTTTACTTGGGGTACAAATGCAGCTGTTTGGAGTGTG
b    S L P A R K P P N E P H V Y V D K T H T -
      <--- end RANK ---||---start FC--->

```

Фиг. 5K

72

L Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F -
 6781 CCTCTACAGCAAGCTCACCCTGACAAAGAGCAGGTGTCAGCAAGGGAAACGTCTTCTCATG 6840
 CGAGATGTCCTTGGAGTGGCACCTGTTCCTCGTCCACCTCTCTCCCTTGCAGAAGACTAC
 h L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C -
 6841 UTCCTGATGCAATGAGGCTCTGCACAACTACTACAGGCAGAAGAGCTCTCTCCCTTCTCTCC 6900
 GAGGCACCTACGTACTCCGAGACGTCTTGGTGTATGTGCGTCTCTCTCGAGAGGGACAGAGG
 b S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P -
 BamHI
 6901 GGGTAAATAATGGATCCGGCGGAAGAAGAACAGAGAAAGAAAGCCCGAAAGGAAGCTCA 6960
 CCCATTATATACCTAGGCGCTTTCTTCTCTCTCTCTCTCTCTTTTGGGCTTTCCTTCGACT
 b G K *
 SlpI
 6961 GATGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCTCTAAACGGGT 7020
 TTTTCTGACTCGTATTGATCGTATGGGGAACCCCGGAGATTTCCTCA
 7021 CTTGAGGGGCTTTTCTGCTGAAAGGAGGAACCGCTCTTTCACGCTCTTCAACCGCATAAAATA 7080
 GAATCCGCCAAAAAACGACTTTCTCTCTTGGGGAGAAAGTGGGAGAACTTCGCTTATTTAT
 -T7 stop -->|
 loop hairpin
 7081 AGTAACGATCCGGTTCAGTAATGACCTCAGAACTCCATCTCGATTCTTTCAGAACCGCTCG 7140
 TCATTCTTAGGCCAGGTCAATTAUTGGAGTCTTCAGGTAGACCTAAACAAGTCTTCGGAGC
 loop hairpin
 7141 GTTCCCGCCGGGCTTTTATTGCTGACAAATCGGAGCAACTTGTCCCGCCAAATCGAGCC 7200
 CAACGGCGGCCCGCAAAAAATAACCACTCTTAGCGTCTGTTGAAACAGCGCGTTACCTCGG
 -- loop stop -->|
 7201 ATGTCTCGTCAACGACCCCCUATTCAAGAACAGCAAGCAGCAATTCAGAACTTTTGAATC 7260
 TACAGCAGCAATTGCTGGGGGGTAAGTCTCTCTGCTTCTGCTAACTCTTGAACCTTAG
 7261 CAGTCCCTCTTCCACCTGCTGACCG 7285
 GTCAGCGGAGAACGTGGACCACTGGC

Фиг. 5М

(AalII sticky end) 5' GCGTAACGTATGCATGGTCTCC-
(position #4359 in pAMG21) 3' TGCACCGCATTGCATACGTACGAGAGC-

-CCATGCGAGAGTAGGGAACCTCCAGGCATCAAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACT-
-GGTACGCTCTCAACCCCTTGACGGTCCGTAGTTTATTTTGGCTTTCCGAGTCAGCTTTCTGA-

-GGCCCTTTTGGTTTATCTGTTTGGTTTGTGGTGAACGCTCTCTCTGAGTAGGACAAATCCGC-
-CCCGGAAAGCAAAATAGACAACAAACAGCCACTTGGAGAGGACTCATCTGTTTAGGCG-

-CGGAGCGGATTGTAACGTTGCGAAGCAACGGCCCCGAGCGTGGCGGGCAGGACGCCCGC-
-GCCCTCGCCTAAACTTGCACCGCTTCGTTGCCCGGCTCCACCGCCCGTCTCTCGGCGC-

-CATAAACTGCCAGGCATCAAAATTAAGCAGAAAGGCCATCCTGACGGATGGCCCTTTTGGCT-
-GTATTTGACGGTCCGTAGTTTAACTCGTCTTCCCTAGGACTGCCCTACCGGAAAAACGCA-

AclII

-TTCTACAAACTCTTTTGGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGGACGTCGTACTTAAC-
-AGATCTTTTGAGAAAACAAATAAAGCAATTTATGTAAGTTTATACCTGCAGCATCAATTG-

-TTTTAAAGTATGGGCAATCAATTGCTCCCTGTAAAACTGCTTTAGAAATACCTTTGGCAGC-
-AAAATTTTATACCGTTAGTTTACGAGGCAATTTTAAAGAAATCTTTATGAAACCGTCC-

-GCTTTGTTGTATTGAGTTTCAATTGCGCATTTGTTAAATCGAAAGTGACCGTGGCGTTAC-
-CCAAACAACATAACTCAAAGTAAACGCGTAACCAATTTACCTTTCACTGGCAGCGCAATG-

-TACAGCTTAATATTTTGAATATCCCAAGAGCTTTTCCCTCGCATGCCACCGCTAAAC-
-ATTTTCTTTTAAACCTTTATAGCGTTCTCGAAAAGGAAGCGTACCGGTGGGATTTG-

-ATTCTTTTCTCTTTTGGTTAAATCGTTGTTGATTTATTTTGGTATATTTATTTTTC-
-TAAGAAAAAGAGAAAACCAATTTAGCAACAACTAAATAAAGCATATAAAATAAAAC-

-GATAATTATCAACTAGAGAAAGGAACAATTAATGGTATGTTTATACACCCATGTAAAAATA-
-CTATTAATAGTTGATCTCTTCCCTGTTAATTACCATACAACTATGTGGGTACATTTTAT-

-AACTATCTATATAGTTGCTTTCTCTCAATGTTGCAAACTAAGCATTCGGAAGCATTTAT-
-TGATAGATATATCAACAGAAAGCACTTACACGTTTGGATTGTTAAGGCTTCGGTAATA-

-TAGCAGTATGAATACGGAACTAAACCCAGTGATAAGACCTGATGATTTGGCTTCTTTAA-
-ATCGTACATACTTATCCCTTTGATTTTGGTCACTATTCTGGACTACTAAAGCGAAGAAATT-

-TTACATTTGGAGATTTTATTTTACAGCATTTTTCAAATATATTCCAATTAATCGGTG-
-AATGTAALCTCTAAAAAATAAATCTCGTAACAAAGTTTATATAAGGTTAATTAGCCAC-

-AATCATTCGAGTTAGAATAATCTACTATAGCATCATATTTTATTAATTAGCCTCATCAT-
-TTACTAACCTCAATCTTATTAGATGATATCCTACTATAAATAAATTAAATCGCAGTAGTA-

-AATATTGCGTCCATTTTMTAGGTAATTATCCAGAAATGAATATCAGATTTAACCATAG-
-TTATAACGGAGGIAAAAAATCCCATTAATAGGCTCTTAAGTTTATAGTCTAAATGGTATC-

-AATGAGGATAAAATGATCGCGACTAAATAATATTCACAAATGTACCATTTTAGTCTATTCAG-
-TTACTCTATTACTAGCGCTCATTTATATAAGTGTACATGGTAAATCAGTATAGTC-

-ATAAGCATTCGATTAAATATCATTATTGCTTCTACAGGCTTTAATTTTATTAATATCTGT-
-TATTCTGAAGTAATTATAGTAATAACGAAGATGTCCGAAATTAATAAATTAATAAGACA-

-AAGTGTGCTCGGCATTTATGCTTTTCAATCCCATCTCTTTATCTTACCTATTGTTTGT-
-TTCACAGCCAGCCGTAAATACAGAAAGTATGGTAGACAAATAGGAATGGATAACAAACAG-

-GCAAGTTTTCGGTGTATATATCATTAACCGGTAATAGATTGACATTTGATTCTAATAA-
-GTTTCAAAACGCACAATATATAGTAATTTTCCATTATCTAACTGTAAACTAAGATTAAT-

Фиг. 6А

```

-ATTGGATTTTGTGCACACTATTATATCGCTTGAAATACAATTGTTTAAACATAAGTACCTG-
-TAACCTAAAAACAGTGTGATAATATAGCGAACTTTATGTTAACAAATTGTATTCATGGAC-

-TAGGATCGTACAGGTTTACGCAAGAAAATGGTTTGTATAGTCGATTAATCGATTTGATT-
-ATCCTAGCATGTCCAAATGCGTTCTTTACCAAACAATATCAGCTAATTAGCTAAACTAA-

-CTAGATTTGTTTTAACTAATTAAAGGAGGAATAACATATGTTTAAACGCCGTTGGAATTCCA-
-GATCTAAACAAAATTGATTAATTTCTCTCTTATTGTATACCAATTGCGCAACCTTAAGCT-

                                     SacII
-GCTCACTAGTGTTCGACCTGCACGGTACCATGGAAGCTTACTCGAGGATCCGCGGAAAGAA-
-CGAGTGATCACAGCTGGACGTCCCATGGTACCTTCGAATGAGCTCCTAGGCGCCTTCTT-

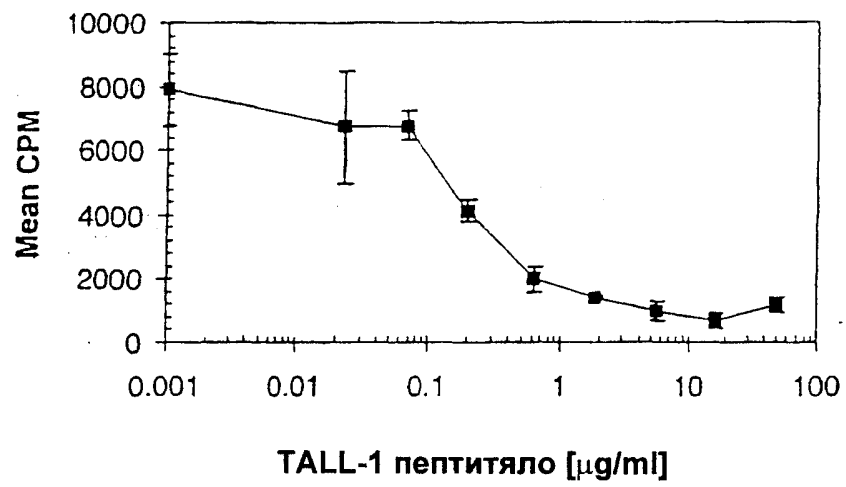
-SAAGAAGAAGAAGAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATA-
-CTTCTTCTTCTCTTTTCGGGCTTTCTCTCGACTCAACCGACGACGGTGGCGACTCGTTAT-

-ACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTTGCTGAAAGGAGG-
-TGATCGTATTGGGGAACCCCGAGATTTGCCCGAAGCTCCCCAAAAAACGACTTTCTCTCC-

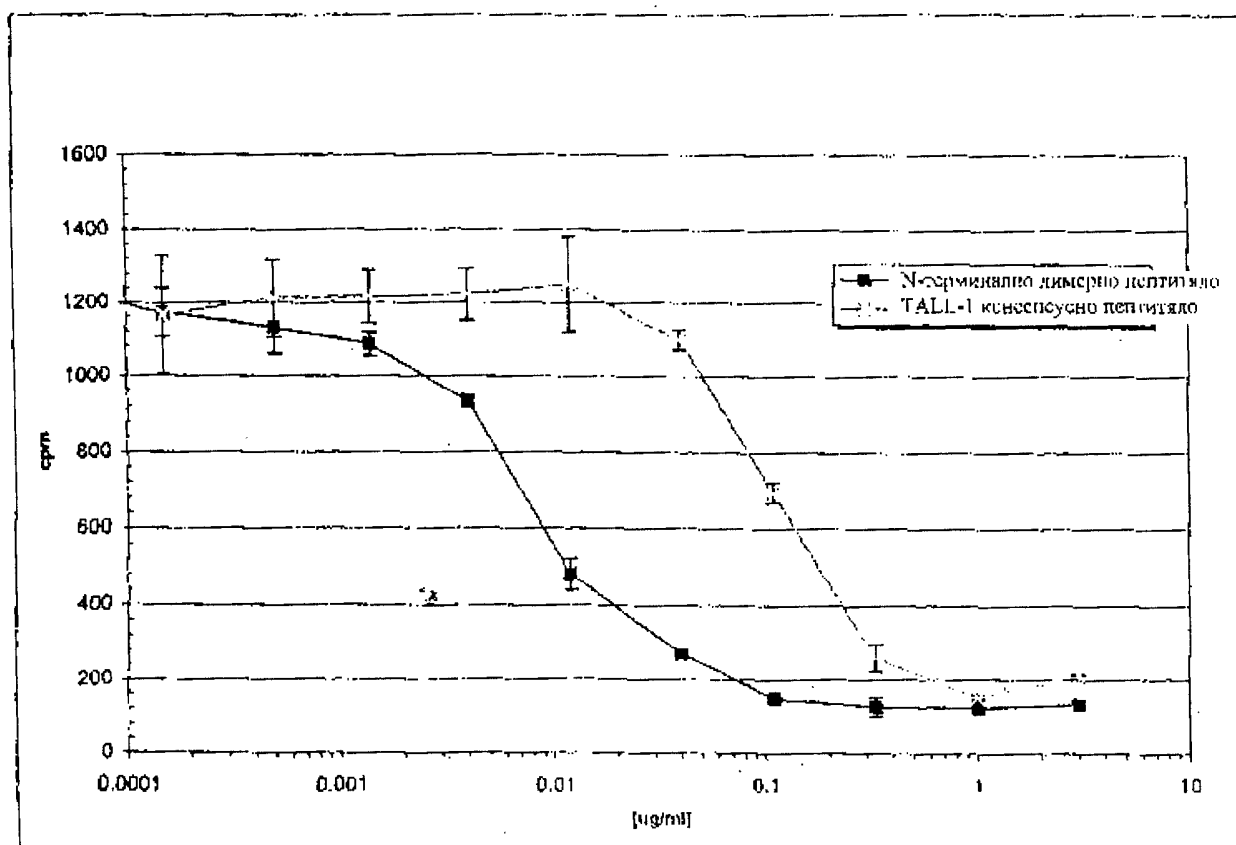
-AACCGCTCTTCAAGCTCTTCACGC 3'           [SacII sticky end]
-TTGGCGAGAAAGTGGGAGAAAGTG 5'         (position #5904 in pAMG21)

```

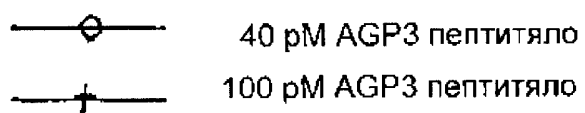
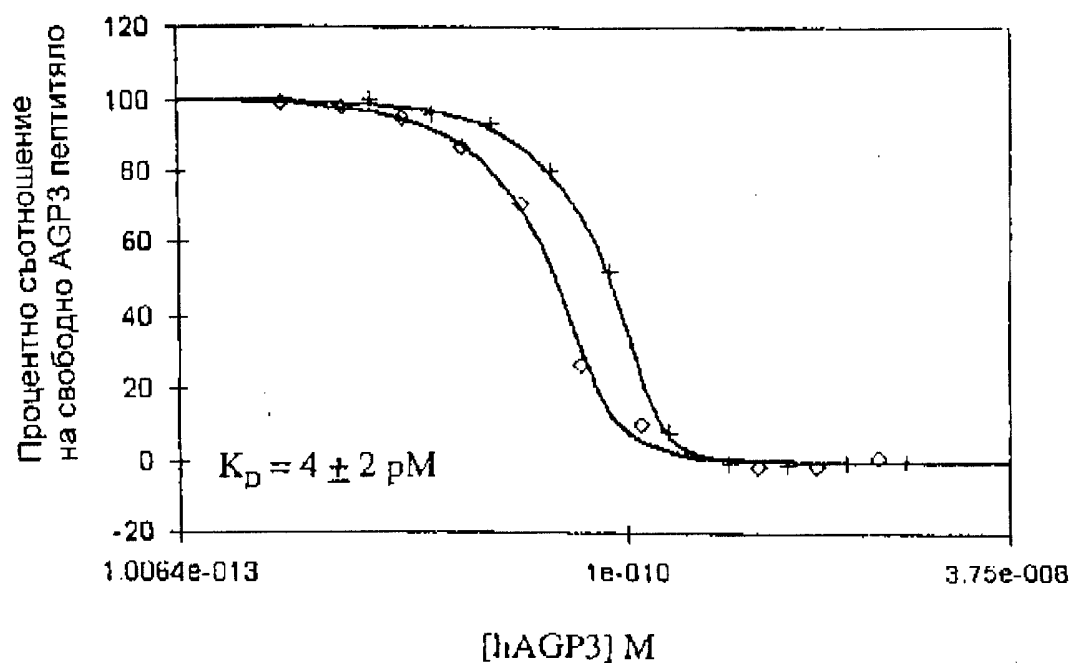
Фиг. 6В



Фиг. 7

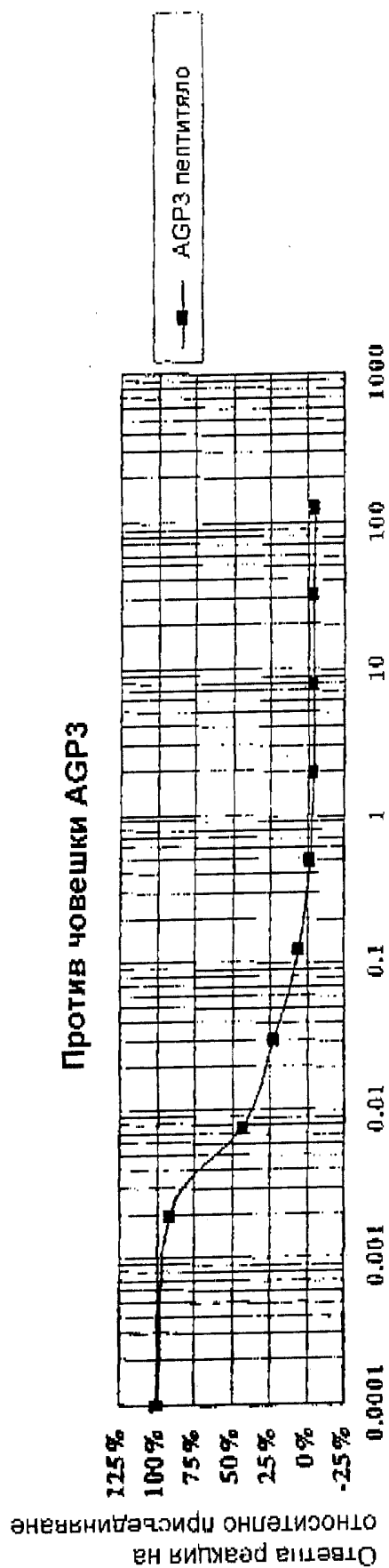


Фиг. 8

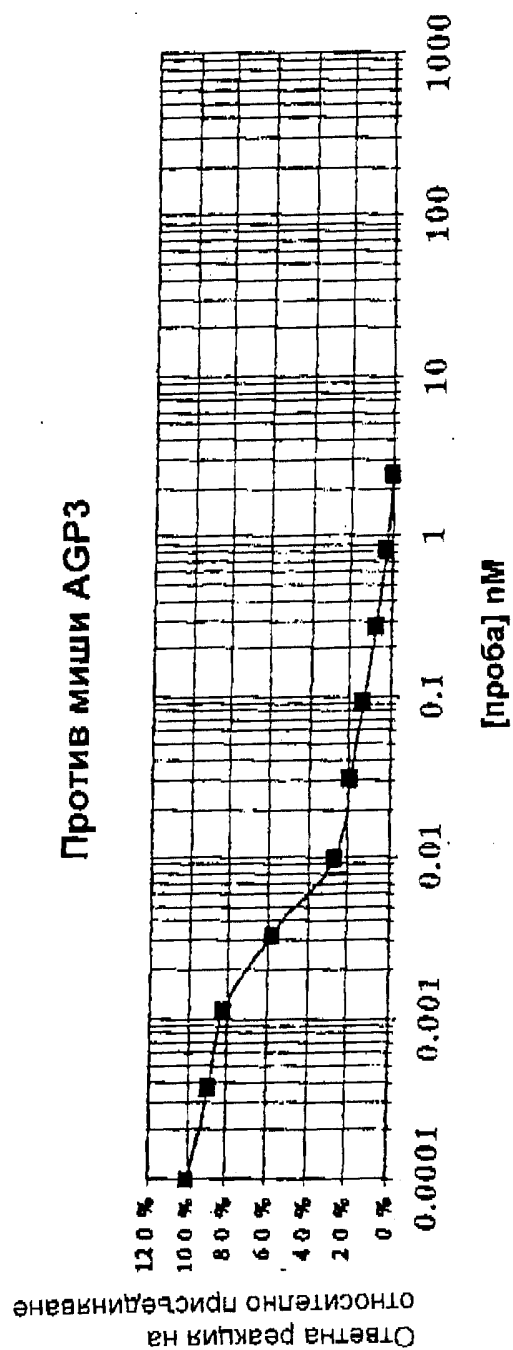


Фиг. 9

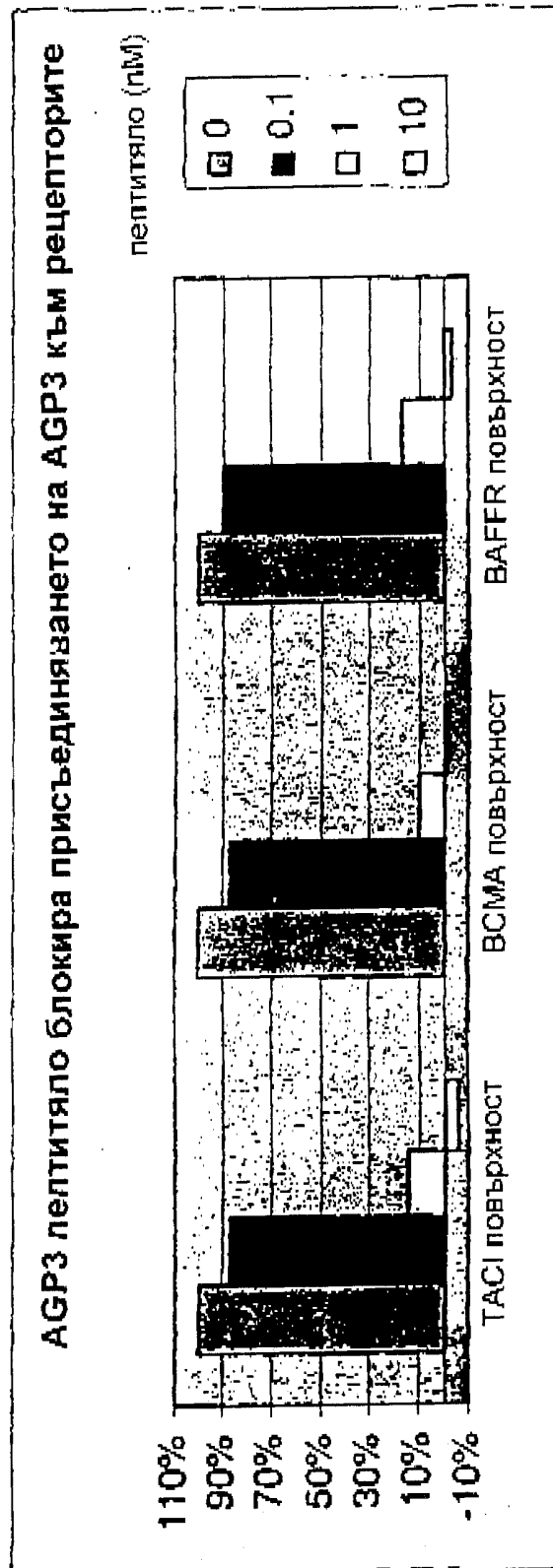
Вх. № 10834'



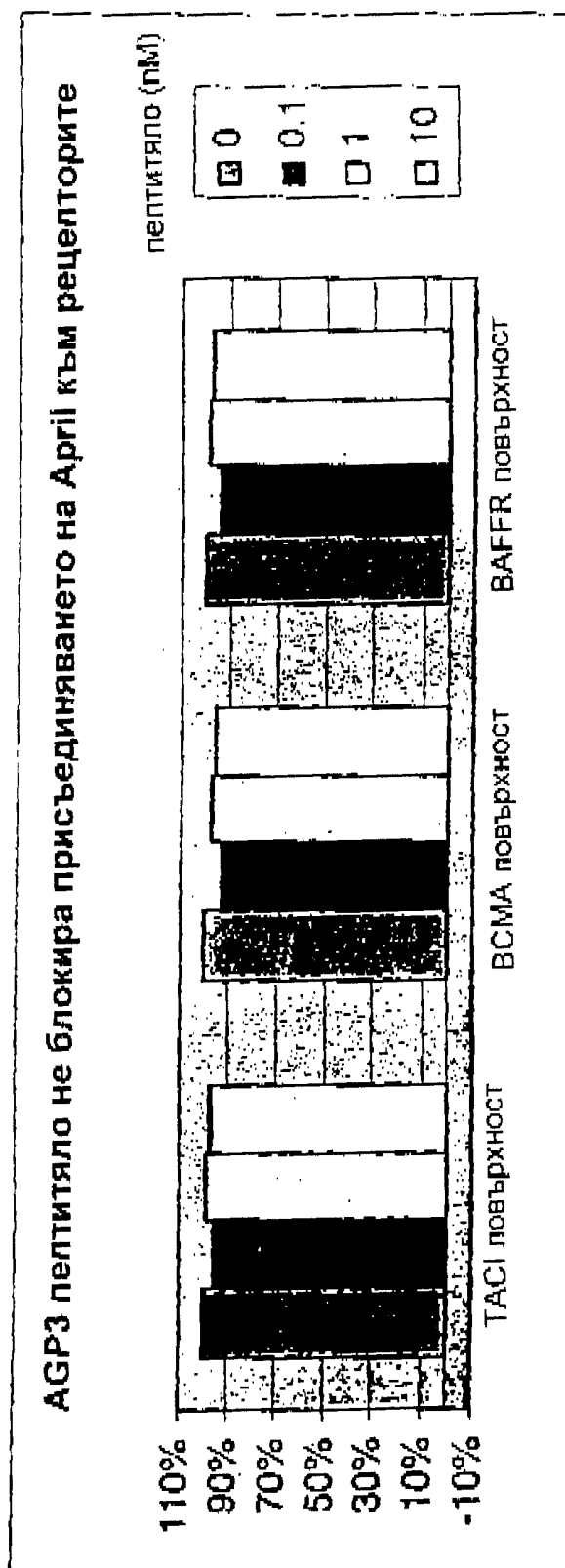
Фиг. 10А



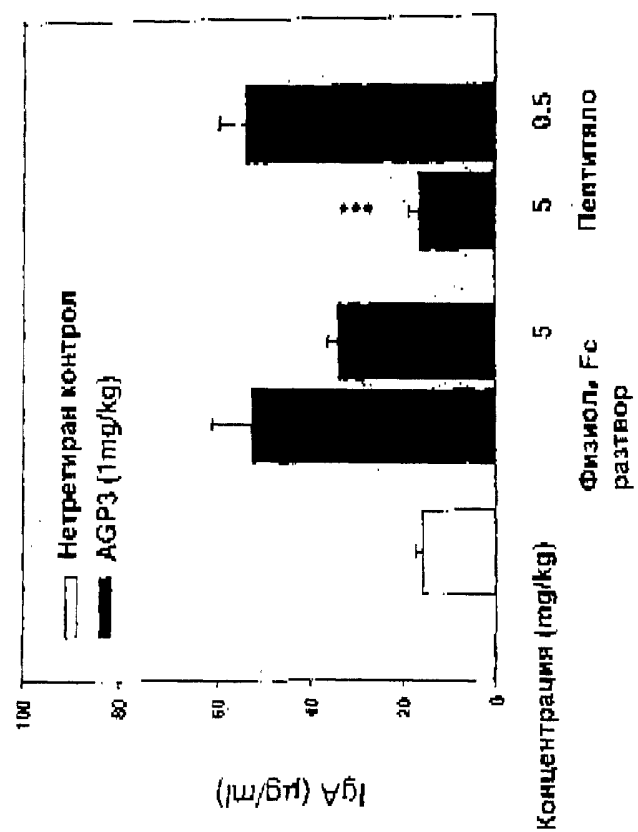
Фиг. 10В



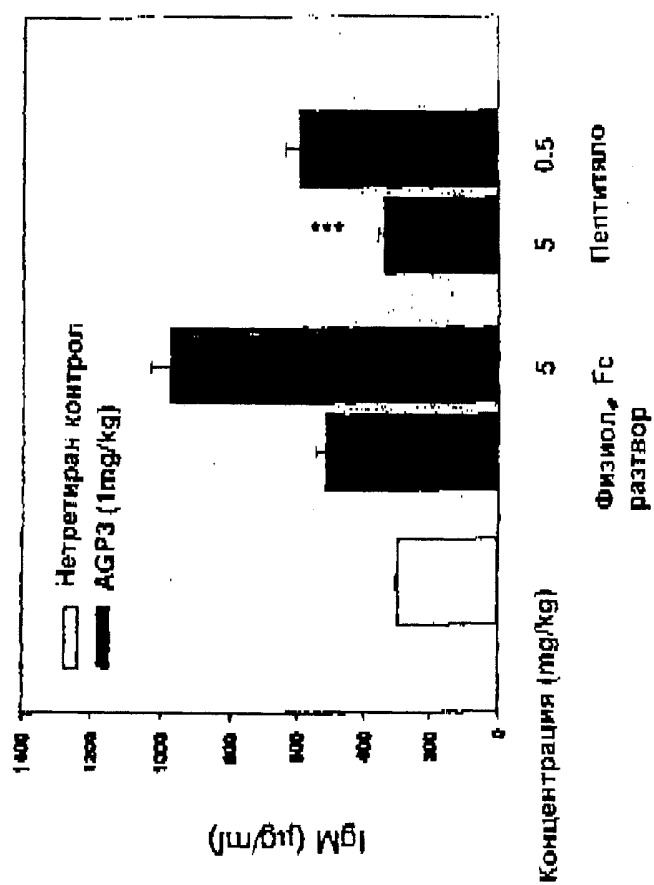
Фиг. 11А



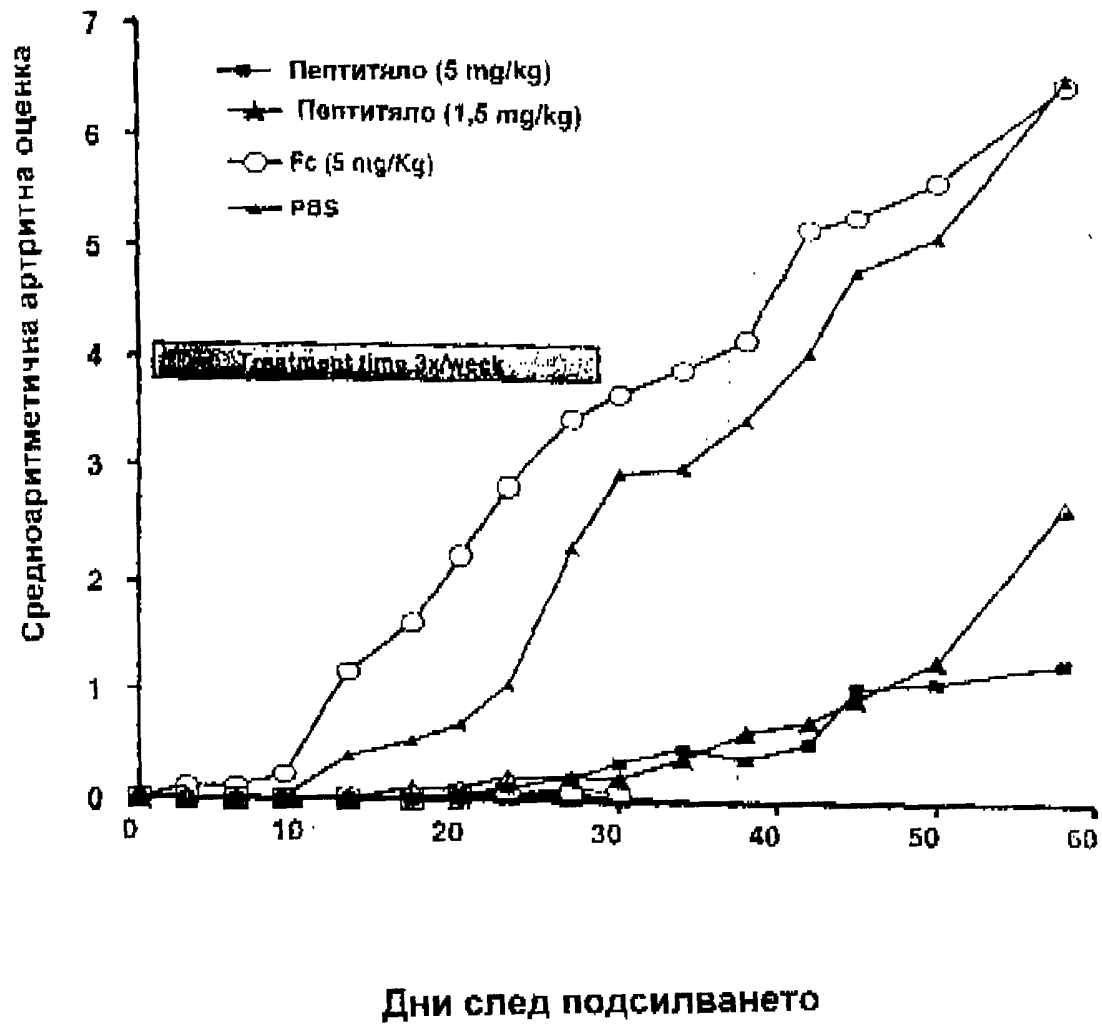
Фиг. 11В



Фиг. 12В



Фиг. 12А

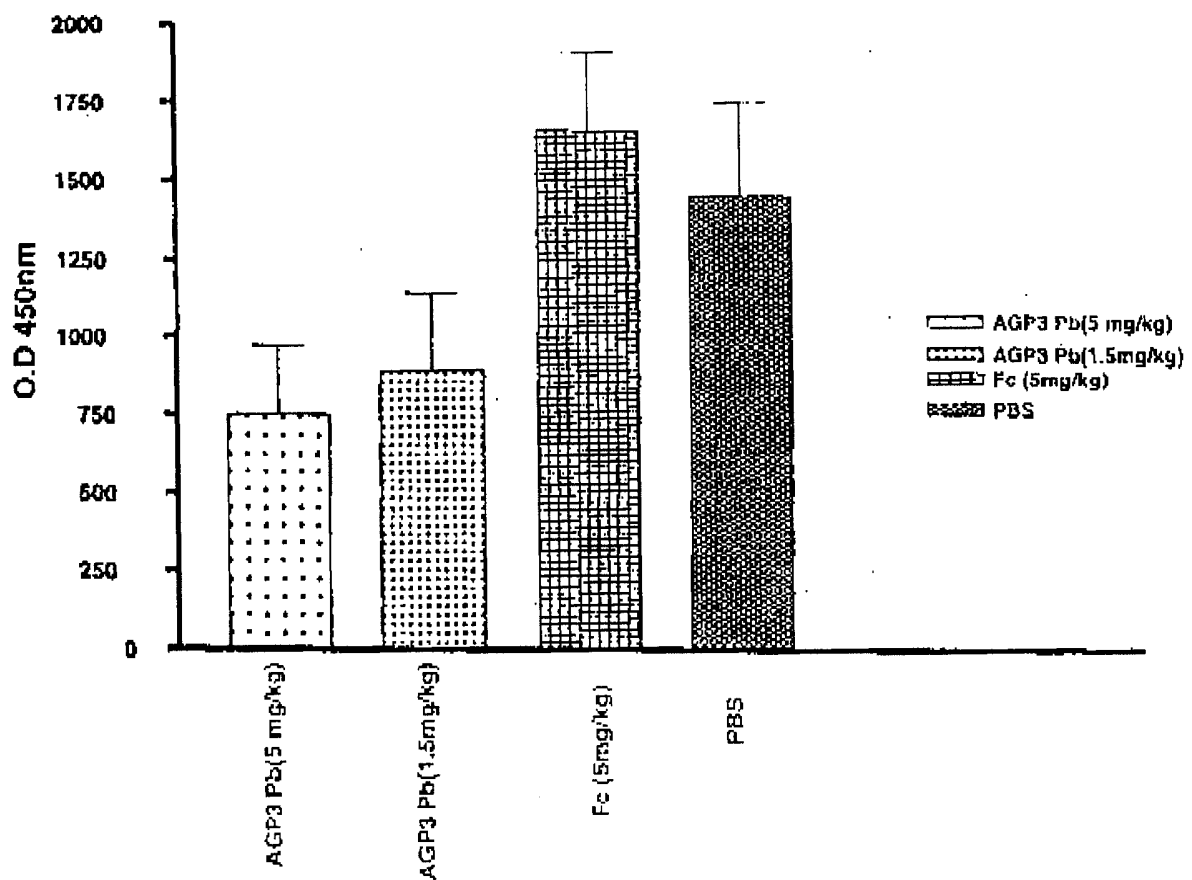


Време до заболяване	Pb (5 mg/kg)	Pb (1,5 mg/kg)
P-стойност vs PBS	< 0,0001	0,0001
P-стойност vs Fc	< 0,0001	0,0001

Забележка: р-стойността се базира на log-rank тест

Фиг. 13

Понижен анти-колаген IgG2b
при третиране с AGP3 пептиятло

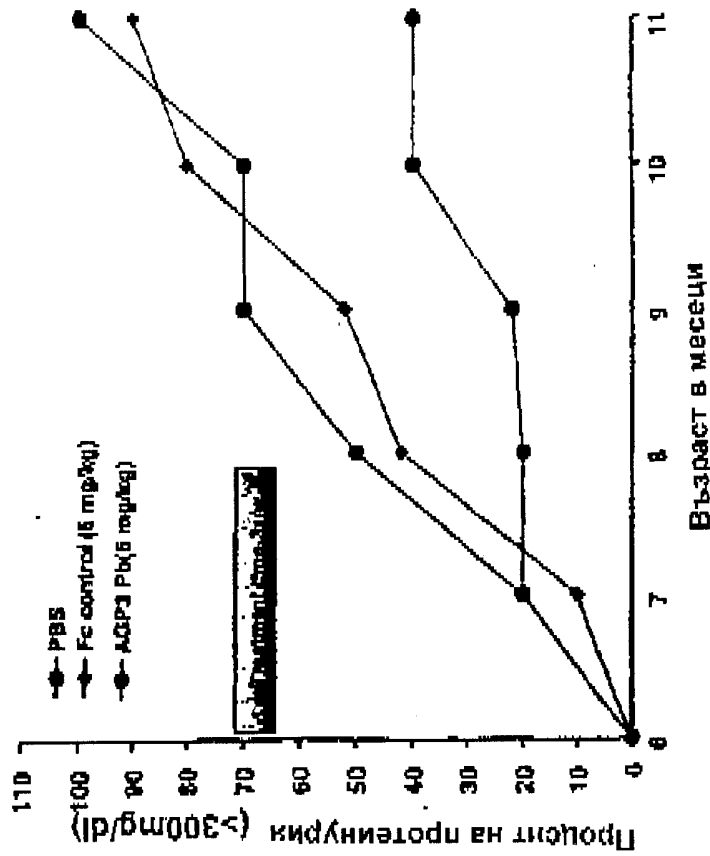


Серумните проби бяха взети една седмица след финалното третиране на реакцията (на 35-ия ден)

Горният диаграма е представителна снимка за IgG1, IgG3 и IgG2b.

Фиг. 14

Забавена протеинурия с AGR3 протеин блокери

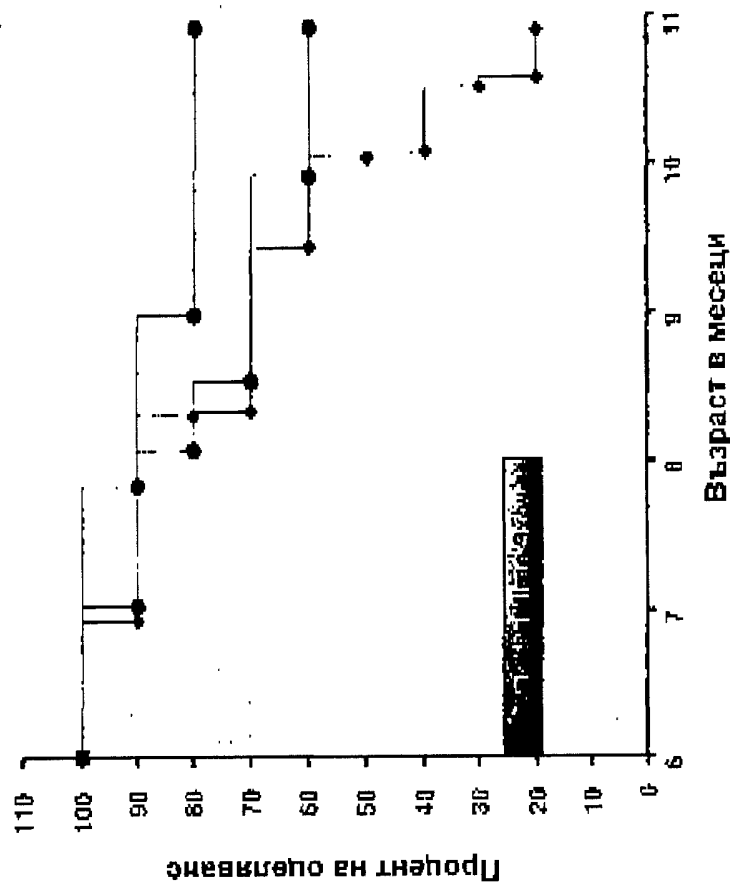


Заболенае мост от протеинурия	Pb
P-стойност vs PBS	0,0108
P-стойност vs Fe	0,0573

P-стойността се базира на Fisher's Extract test

Фиг. 15A

Удължаване на оцеляването с AGR3 блокери



Време до смъртта	Pb
P-стойност vs PBS	0,3685
P-стойност vs Fe	0,0159

P-стойността се базира на log-rank test

Фиг. 15B

BamHI
|

1 ATGCTTCCAGGCTGCAAGTGGGATCTTCTTATTAAAGCAATGGGTATGCCATCCACTTGGG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
TACGAAGGTCCGACGTTCCACCCCTAGAACATAATTEGTTACCCATACGCTAGGTGAACCT

M L P G C K W D L L I K Q W V C D P L G -

61 TCCGTTCTGCTACTCGTGTGTTCCGGTCCACCGCAAGCTCTGGTTCCAGGCACGTGGAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
AGGCCAAGACGATGACCCACCAAGGCCGAGGTGCGGTTCCAGACCAAGTCCGTCACGGTGA

S G S A T G G S G S T A S S G S S A T -

NheI
|

121 CATATGCTGCCGGTGTAAATGGGACCTGCTGATCAAAACAGTGGGTTTGGACCCCGCTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
GTATACGACGGCCCAACATTTACCCCTGGACGACTAGTTTGTCACCCAAACTGGGGGAC

H M L P G C K W D L L I K Q W V C D P L -

Sall
|

181 CGTCCAGGCGGTGCGCTCGACAAAACCTCACACATGTCCACCTTGTCCAGCTCCGGAACTC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
CCACCTCCGGCACTCCAGGTGTTTTCAGTGTGTACAGGTGGAACAGGTCCGAGGCCTTGAG

G G G G G V D K T H T C P P C P A P E L -

241 CTGGGCGGACGTCAGTCTTCCCTCTTCCCGCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
CAACCCCTCTGACGTCAGAAGGAGAACGGGGGTTTTGCGTTCCCTGTGGGAGTACTAGAGG

L G G P S V F L F P P K P K D T L M T S -

301 CGAACCCCTGACGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTTGAGGTCAAG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
CCCTGGGGACTCCAGTGTACGCCACCACTACCTGCACTCGGTGCTTTCTGGGACTCCAGTTC

R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K -

361 TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
AAGTTGACCATGCACCTGCCCCACCTCCACGTATTACGTTCTGTCTTCCGCGCCCTCTCT

F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E -

421 CAGTACAACAGCAGGTACCGTGTGCTCAGCGTCTCTACCGTCTCTGCACCAGGACTGGCTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
GTCAATGTTGTGTGCATGGCACACCACTGACAGAGTGGCAGGACGTGGTCTCTGACCGAC

Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L -

Фиг. 16А

```

AATGCCAAGCAGTACAAGTGCAAGTCTCTCCAAACAAGCCCTCCACAGTCCCATCAGAAA
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
TTACCGTTCTCTCATGTTCACTTCCACAGAGTTCTTTCCGGAGGCTCGGGGGTAGCTCTTT

N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K -

ACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAAGCTGTACACCCCTGCCCCCATCC
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
TGGTAGAGGTTTCGCTTTCCCGTCGGGGCTCTTGCTGTCCACATCTCGGACGGGGTAGG

T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S -

CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCCTGACCTGCTGTCAAAGGCTTCTATCC
501 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
GCCCCTACTCCACTGCTTCTTGCTCCAGTCCGACTCGACCGACCAAGTTTCCCAAGATAGGG

R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P

AOCGACATCCCGTGGAGTGGGAGAGCAATCGGCAGCCCGAGAACCACTACAAGACCACG
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
TCGCTGTAGCGGCACCTCACCCCTCTCGTTACCCCTCGGGCTTCTTCTTGATGTTCTGGTGC

S D I A V E W E S N G Q P E N N V K T T -

CCTCCCGTCTGGACTCCGACGCTCTCTTCTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAG
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
GGAGGGCAGGACCTGAGGCTCCCGAGCAAGAGAGGARNCTGCTTCCAGTGGCACCTGTTC

P F V L D S D G S F P L Y S K I T V D K -

AGCAAGTGGCAGCAGGGAACGTCTTCTCATGCTCTGGTCAATGAGGCTCTCCACAAC
781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
TCGTCCACCGTCTCTCTCTTGCAGAGAGTACGAGGCACTACCTACTCCGAGACGCTGTC

S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N -

CACTACAGGCAGAGAGGCTCTCTCTGTCTCCGGGTAAATAA
841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 882
GTGATGTCCGTCTTCTCCAGAGGGACAGAGGCCCATTTATT

H Y T Q K S L S L S P G K * -

```

Фиг. 16В

66270 B1

A-743 PCT.ST25.txt
SEQUENCE LISTING

<110> AMGEN INC.
 <120> PEPTIDES AND RELATED MOLECULES THAT BIND TO TALL-1
 <130> A-743
 <140> NOT YET ASSIGNED
 <141> 2002-05-13
 <150> US 60/290,196
 <151> 2001-05-11
 <160> 197
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 684
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CD3
 <222> (1)...(684)
 <223>

<400> 1
 atg gac aaa act cgc aca tct cca cct tgt aca gct cgg gaa ctc ctg 48
 Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 1 5 10 15
 ggg gga cgg tca gtc ttc ctg tcc ccc cca aaa acc aag gac acc ctc 96
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 20 25 30
 atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc 144
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 35 40 45
 cgc gaa gac cct gag gtc aag ttc acc tgg tac gtc gac ggc gtc gag 192
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 50 55 60
 gtg cct aat gcc aag aca aag ccc cgg gag gag cag tac aac agc acc 240
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 65 70 75 80
 : cgt gtg gtc agc gtc ctg acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat 288
 : Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 85 90 95
 ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctg cca gcc ccc 336
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 100 105 110
 atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag 384
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 115 120 125
 gtg tac acc ctg ccc cca tcc¹ cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc 432
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 130 135 140
 agc ctg acc tgc ctg gtc aaa gcc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg 480
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val

Page 1

66270 B1

A-743 DDT-8725.1x1

145	150	155	160	
gag tgg gag agc aat ggt gag ccc gag aac aac tac agc aac aac aac	528			
Gln Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Gln Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro				
165	170	175		
acc gtc ctc gag aac gac ggc tcc ttc ttc ctc tcc agc aac ctc aac	536			
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr				
180	185	190		
gtt gac aag agc aac tgg gag gag ggt aac gtc ttc tcc aac tcc gta	544			
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val				
195	200	205		
atg aat gag gct atg aac aac aac tgc agc cag aag agc ctc tcc atg	552			
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu				
210	215	220		
tct aag ggt aac	560			
Ser Pro Gly Lys				
225				

<210> 2
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu	
1	5
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu	
	20
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser	
	35
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Gln	
	50
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Gln Gln Tyr Asn Ser Thr	
65	70
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Glu Asp Trp Leu Asn	
	85
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro	
	100
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln	
	115
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val	
	130
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val	
145	150

Page 2

A-243 POT.SU25.LNR

Glu Thr Glu Ser Asp Gly Glu Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
185 170 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Glu Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Glu Lys Ser Leu Ser Leu
210 215 220

Ser Pro Gly Lys
225

<210> 3
<211> 62
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Ndel to SalI fragment

<220>
<221> CDS
<222> 121..161
<223>

<400> 3
1 atg aag agt acc tgg tgg aag ttc acc tag gaa tgc acc cag ggt ggt 48
Met Pro Gly Thr Cys Phe Arg Phe Pro Trp Glu Cys Thr His Ala Gly
1 5 10 15

ggc ggc ggt ggc g
Gly Gly Gly Gly 62
20

<210> 4
<211> 20
<212> DMT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Ndel to SalI fragment

<400> 4

Met Pro Gly Thr Cys Phe Pro Phe Pro Trp Glu Cys Thr His Ala Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly
20

<210> 5
<211> 62
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

Page 3

66270 B1

A-743 PCT.ST25.txt

<220>
<223> NdeI to SalI fragment

<220>
<221> CDS
<222> (2)..(61)
<223>

<400> 5
1 atg tgg ggt gct tgt tgg acg ttc acc tgg gaa tgt ttc aac gaa ggt 49
Met Trp Gly Ala Cys Trp Pro Phe Pro Trp Glu Cys Phe Lys Glu Gly
2 5 10 15
gga ggc ggt ggg g 62
Gly Gly Gly Gly
20

<210> 6
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> NdeI to SalI fragment

<400> 6
Met Trp Gly Ala Cys Trp Pro Phe Pro Trp Glu Cys Phe Lys Glu Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Gly
20

<210> 7
<211> 62
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> NdeI to SalI fragment

<220>
<221> CDS
<222> (2)..(61)
<223>

<400> 7
1 atg gtt cgg ttc tgt gac cgg ctg act aac cac tgt ttc gaa gct ggt 49
Met Val Pro Phe Cys Asp Leu Leu Thr Lys His Cys Phe Glu Ala Gly
1 5 10 15
gga ggc ggt ggg g 62
Gly Gly Gly Gly
20

<210> 8
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

0223. Note: to edit documents

4400- 6

Met Val Pro Phe Cys Asp Ser Ser Thr Cys His Cys Phe Glu Ala Gly
3 10 15

Gly Gly Gly Gly
20

```

>210> 9
>211> 74
>212> DNA
>213> Apri[16:0] Sequence

```

720
723 NdeI to SalI fragments

220-
 221- CP5
 222- (2) (73)
 223-

4406- 0
Met Arg Ser Lys Tyr Lys Thr Asp Val Ileu Thr Cys Glu Cys 19
1 5 10 15

His was her gut egg got got got d
The his his Gly Gly Gly Gly

20

74

```

<210> 10
<211> 24
<212> DRT
<213> Artificial Sequence

```

223 NMEI to SUI (re:memoranda)

400 20

Met Gly Ser Arg Cys Lys Tyr Lys Trp Asp Val Leu Thr Pys Gln Cys
1 5 10 15

4 H3x H3x Gly Gly Gly Gly Gly
20

```
<210> 11
<211> 74
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
```

<220>
<273> New! on Salt fragments

```

<220>
<221> CDS
<222> (2) .. (73)
<223>

```

66270 B1

A-745 PCT-ST25.txt

<400> 11
 1 atg cag cag ggc tgt aaa tgg gac cag cag atc aaa cag tgg gtc tga 49
 Met Leu Pro Gly Cys Lys Trp Asp Leu Leu Ile Lys Gln Trp Val Cys
 1 5 10 15

gac cag cag ggt gga ggc ggt ggc g
 Asp Pro Leu Gly Gly Gly Gly Gly 74
 20

<210> 12
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> NdeI to SalI fragments

<400> 12
 1 Met Leu Pro Gly Cys Lys Trp Asp Leu Leu Ile Lys Gln Trp Val Cys
 1 5 10 15

Asp Pro Leu Gly Gly Gly Gly Gly
 20

<210> 13
 <211> 74
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> NdeI to SalI fragments

<220>
 <221> CDS
 <222> 121..173
 <223>

<400> 13
 1 atg tca ggt gac tgt ccc ttc gac atc cag acc aaa cct gac ggt tgt 49
 Met Ser Ala Asp Cys Tyr Phe Asp ile Leu Thr Lys Ser Asp Val Cys
 1 5 10 15

acc tct tct ggt gga ggc ggt gga g
 Thr Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gly 74
 20

<210> 14
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> NdeI to SalI fragments

<400> 14
 1 Met Ser Ala Asp Cys Tyr Phe Asp ile Leu Thr Lys Ser Asp Val Cys
 1 5 10 15

Thr Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gly
 20

A 743 INT.0725.txt

<210> 15
 <211> 74
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> NdeI to SalI fragments

<220>
 <221> CDS
 <222> (2)...(73)
 <223>

<400> 15
 U ACG GCG GAC GGC GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG 49
 Met Ser Asp Asp Cys Met Tyr Asp Gln Leu Thr Arg Met Phe Ile Cys
 1 5 10 15

CGG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG 74
 Ser Arg Leu Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 20

<210> 16
 <211> 74
 <212> PRN
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> NdeI to SalI fragments

<400> 16
 Met Ser Asp Asp Cys Met Tyr Asp Gln Leu Thr Arg Met Phe Ile Cys
 1 5 10 15

Ser Arg Leu Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 20

<210> 17
 <211> 75
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> NdeI to SalI fragments

<220>
 <221> CDS
 <222> (2)...(73)
 <223>

<400> 17
 C ACG GAC CCG AAC TGT AAA TCG GAC GAA ATG AAT TAC AAA GAG TGG TGT 49
 Met Asp Leu Asn Cys Lys Tyr Asp Gln Leu Thr Tyr Lys Glu Trp Cys
 1 5 10 15

CAG TTC AAC GGG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG 76
 Gln Phe Asn Gly Val Glu Ala Val
 20

A 743 (CT18025) 1st

<210> 16
 <211> 71
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> NdeI to SalI fragments

<400> 16

Met Asp Leu Asn Cys Lys Tyr Asp Glu Leu Thr Tyr Lys Glu Val Cys
 1 5 10 15

Glu Phe Asn Gly Val Glu Ala Val
 20

<210> 19
 <211> 74
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> NdeI to SalI fragments

<220>
 <221> CDS
 <222> (7) (73)
 <223>

<400> 19
 Met Thr Phe Leu Asp Lys Asn Phe Asp Ala Ala Met Cys Asp Asp Lys Lys 49
 Met Phe His Asp Cys Lys Tyr Asp Leu Leu Thr Asp Glu Met Val Cys
 1 5 10 15

Asp Gly Lys Ser Asp Asp Gly Ser G 94
 His Gly Leu Gly Gly Gly Gly Gly
 20

<210> 20
 <211> 76
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> NdeI to SalI fragments

<400> 20

Met Phe His Asp Cys Lys Tyr Asp Leu Leu Thr Asp Glu Met Val Cys
 1 5 10 15

His Gly Leu Gly Gly Gly Gly Gly
 20

<210> 21
 <211> 77
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> NdeI to SalI fragments

66270 B1

A-743 P0018T25.txt

<220>
 <221> CDS
 <222> (2)..(73)
 <223>

<400> 21
 Met Arg Cys Asn His Cys Phe Trp Asp His Leu Leu Lys Gln Asp Ile Cys 49
 1 5 10 15

Gly Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly 74
 20

<210> 22
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> NdeI to SalI fragments

<400> 22

Met Arg Asn His Cys Phe Trp Asp His Leu Leu Lys Gln Asp Ile Cys
 1 5 10 15

Pro Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly
 20

<210> 23
 <211> 74
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> NdeI to SalI fragments

<220>
 <221> CDS
 <222> (2)..(73)
 <223>

<400> 23
 Met Arg Cys Asn Cys Trp Trp Asp Ser Leu Leu Lys Lys Asn Val Cys 49
 1 5 10 15

Gln Phe Phe Gly Gly Gly Gly Gly 74
 20

<210> 24
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> NdeI to SalI fragments

<400> 24

A-743 PCT.8025 LXC

Met Ala Arg Gln Gys Trp Trp Asp Ser Leu Ileu Lys Lys Arg Val Cys
 1 5 10 15

Gln Phe Phe Gly Gly Gly Gly Gly
 20

<210> 25
 <211> 74
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <222> NdeI to SalI fragments

<230>
 <231> CDS
 <232> (2) (73)
 <233>

<400> 25
 5 atg taa taa gac taa aaa taa gac cta cta acc aac cag taa gtt tgc 45
 Met Phe His Asp Gys Lys Trp Asp Leu Leu Thr Lys Gln Trp Val Cys
 1 5 10 15

aaa ggt cta ggt aaa gaa ggt aaa g
 His Gly Leu Gly Gly Gly Gly Gly 74
 20

<210> 26
 <211> 24
 <212> FRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <222> NdeI to SalI fragments

<400> 26

Met Phe His Asp Gys Lys Trp Asp Leu Leu Thr Lys Gln Trp Val Cys
 1 5 10 15

His Gly Leu Gly Gly Gly Gly Gly
 20

<210> 27
 <211> 7745
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> pAMGPI-RANK-ko vector

<400> 27
 gatcagcagt aacagggaac tggagctga cgaattggc ttgctcagtt gtaaacccc 60
 ggaacacgaaa aaagacaggt ttccacaggt ccaggaggt cattaactga aaacacacat 120
 atcttcagct taaatcaca taaacagac gtaatccccc ttgatttgta ggtcaacaca 180
 gatcttcagc acaattctca agtcgctgat ttcaaaaaac tglagtatgc tctgagaaa 240
 gatccctggt taagtatrac ggaaggaga tggagcagac agaaattgca gtagcttctt 300

Page 10

66270 B1

A-743 2011.0725.1.xls

առնալուծա ճանցոյտի ճիշդագոյն ձեռնարկի ճիշդագոյն զննանքի	360
կոյոյտից իջնադրնա՝ քրէտեան առաւելոյն ճանցոյտի ճիշդագոյն	420
ժողովարար ընտնողի զգուշացոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն	480
ժողովարար ընտնողի ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն	540
Լեւոնայի ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն	600
ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն	660
առնալուծա ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն	720
յոսանքի ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն	780
ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն	840
ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն	900
ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն	960
ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն	1020
ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն	1080
ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն	1140
ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն	1200
ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն	1260
ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն	1320
ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն	1380
ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն	1440
ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն	1500
ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն	1560
ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն	1620
ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն	1680
ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն	1740
ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն	1800
ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն	1860
ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն	1920
ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն	1980
ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն	2040
ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն	2100
ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն	2160
ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն	2220
ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն	2280
ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն ճիշդագոյն	2340

66270 B1

A-743 PCT.ST25.txt

tcgtcgggac cactccgacc gcgcacagaa gctctctcat ggctgaaagc gggatatggtc	2400
tggcagggct ggggatgggt aaggtgaaat ctatcaatca gtaccggctt acgccgggct	2460
tccggcggttt tactcctgtt tcatatatga aacaacaggt caccgccttc catgccgctg	2520
atgcggcata tcctggtaac gatatctgaa ttgttataca tgtgtatata cgtggtaatg	2580
acaaaaatag gacaagttaa aaatttacag gcgatgcaat gattcaaaca cgtaatcaat	2640
atcggggggtg ggcgaagaac tccagcatga gatccccgcg ctggaggatc atccagccgg	2700
cgtcccgga aacgattccg aagcccaacc ttctatagaa ggcggcggtg gaatcgaaat	2760
ctcgtgatgg cagggtgggc gtcgcttggg cggtcatttc gaaccccaga gtcccgtca	2820
gaagaactcg tcaagaaggc gatagaaggc gatgcgctgc gaatcgggag cggcgatacc	2880
gtaaagcacg aggaagcgt cagccatttc gccgccaagc tcttcagcaa tatcacgggt	2940
agccaacgct atgtcctgat agcgggtccgc cacaccagc cggccacagt cgatgaatcc	3000
agaaaagcgg ccattttcca ccatgatatt cggcaagcag gcctcgccat gaggcacgac	3060
gagatcctcg ccgtcgggca tgcgcgcctt gagcctggcg aacagttcgg ctggcgcgag	3120
cccctgatgc tcttcgtcca gatcatctg atcgacaaga ccggcttcca tccgagtagc	3180
tgcctcgctcg atgcgatgtt tcgcttgggt gtcgaatggg caggtagccg gatcaagcgt	3240
atgcagccgc cgcattgcat cagccatgat ggatactttc tcggcaggag caagggtgaga	3300
tgacaggaga tctgccccg gcacttcgcc caatagcagc cagtcccttc ccgcttcagt	3360
gacaacgtcg agcacagctg cgcaaggaac gcccgctcgt gccagccacg atagccgcgc	3420
tgcctcgtec tgcaattcat tcaggacacc ggacaggctc gtcttgacaa aaagaaccgg	3480
gcgcccctgc gctgacagcc ggaacacggc ggcatcagag cagccgattg tctgttgtgc	3540
ccagtcatag ccgaatagcc tctccacca agcggccgga gaacctgcgt gcaatccatc	3600
ttgttcaatc atgcgaaacg atcctcatcc tgtctcttga tctgatcttg atccccgcg	3660
ccatcagatc cttggcgga agaaagccat ccagtttact ttgcagggt tcccaacctt	3720
accagagggc gccccagctg gcaattccgg ttcgcttgcgt gtccataaaa ccgcccagtc	3780
tagctatcgc catgtaagcc cactgcaagc tacctgcttt ctctttgcgc ttgcgttttc	3840
ccttgteccg atagcccagt agctgacatt catecgggggt cagcaccggt tctgcggact	3900
ggctttctac gtgttccgct tccttttagc gcccttgcgc cctgagtgc tgcggcagcg	3960
tgaagctaca tatatgtgat ccgggcaaat cgctgaatat tccttttgc tccgaccatc	4020
aggcacctga gtcgctgtct ttttcgtgac attcagttcg ctgcgctcac ggctctggca	4080
gtgaatgggg gtaaatggca ctacaggcgc cttttatgga ttcattgcaag gaaactaccc	4140
ataatacaag aaaagccgt caggggcttc tcagggcggt ttatggcggg tctgctatgt	4200
ggtgctatct gactttttgc tgttcagcag ttctgccc ctgattttcc agtctgacca	4260
cttcggatta tcccgtaga ggtcattcag actggctaata gcaaccagta aggcagcggt	4320
atcatcaaca ggcttaccgg tcttactgtc gaagacgtgc gtaacgtatg catggctctc	4380

Page 12

Page 13

66270 B1

```

taatgcccacg aaaaagccgc gggaggagca ggggggggac accgacggcg tgggcaggg 6480
cctcaccctc agggccagc actgctgaa tggccaggag tccaaatgca aggtctccca 6540
caagagccca cagggcccca tggagaaaa cctctcccaa gcccagaagg agcggcgagg 6600
accacaggcg tacaccctgc ccccatcccg ggtgagctc accaagaacc aggttagctc 6660
gacctggcag gtcacaggct tatatcccg cgcacccgc gggagtgagg agagcaatcg 6720
ggagccggag acaactaca agaccagcg tccctgctc cactccgag gctctctct 6780
cctccacagc aggtccacc tggacagag caggctgctc caggagagc tctctctct 6840
ctcgtgctc caggggctc tgcacaccc ctcacagcg aagagctct cctgctctc 6900
gggtacataa cggatcccg ggggagcaa gaagagagc aagggccga aggaagcga 6960
gltggcctct ggcacggcg agcaaaact agcatcccc ctgggggct ctacacggct 7020
cttgagggtt ctctggcg aaggagcaac cgtctctcc gctctccag cggagccta 7080
agtacagcag cggccagta agcactccg aactccctc ggaatcttc agaacgctc 7140
gttcgcccac cggcctctt cttggtgaga atggcagca cttgctgag cactcagcc 7200
atgctgctc cagggcccc cactccagc aagcagcga gcaatgagc cttggaac 7260
aggtccctct tccacctct gagg 7385

```

```

<210> 25
<211> 7285
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pAMG21-PANK-Fc vector

<220>
<221> misc_feature
<223> Xaa (Pos1,2,3,15,16,17) are each independently absent or amino acid residues;
Xaa (Pos5,6,7,9,13) are each independently amino acid residues.

```

```

<400> 25
Gly Ala Thr Cys Ala Gly Cys Ala Gly Thr Cys Cys Cys Gly Gly
1          5          10          15
Ala Ala Cys Ala Thr Cys Gly Thr Ala Gly Cys Thr Gly Ala Cys Gly
20          25          30
Cys Cys Thr Thr Cys Gly Cys Gly Thr Thr Gly Cys Thr Cys Ala Gly
35          40          45
Thr Thr Gly Thr Cys Cys Ala Ala Cys Cys Cys Gly Gly Ala Ala
50          55          60
Ala Cys Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Cys Ala Ala Gly Thr
65          70          75          80

```

66270 B1

A-743 PCT-ST25-EX1

Thr Thr Thr Cys Cys Cys Cys Gly Cys Thr Cys Cys Cys Gly Gly Cys
 85 90 95
 Gly Thr Thr Thr Cys Ala Ala Thr Ala Ala Cys Thr Gly Ala Ala Ala
 100 105 110
 Ala Cys Cys Ala Thr Ala Cys Thr Ala Thr Thr Thr Cys Ala Cys Ala
 115 120 125
 Gly Thr Thr Thr Ala Ala Ala Thr Cys Ala Cys Ala Thr Thr Ala Ala
 130 135 140
 Ala Cys Gly Ala Cys Ala Gly Thr Ala Ala Thr Cys Cys Cys Cys Gly
 145 150 155 160
 Thr Thr Gly Ala Thr Thr Thr Gly Thr Gly Cys Gly Cys Cys Ala Ala
 165 170 175
 Cys Ala Cys Ala Gly Ala Thr Cys Thr Thr Cys Gly Thr Cys Ala Cys
 180 185 190
 Ala Ala Thr Thr Cys Thr Cys Ala Ala Gly Thr Cys Gly Cys Thr Gly
 195 200 205
 Ala Thr Thr Thr Cys Ala Ala Ala Ala Ala Cys Thr Gly Thr Ala
 210 215 220
 Gly Thr Ala Thr Cys Cys Thr Cys Thr Gly Cys Gly Ala Ala Ala Cys
 225 230 235 240
 Gly Ala Thr Cys Cys Cys Thr Gly Thr Thr Thr Gly Ala Gly Thr Ala
 245 250 255
 Thr Thr Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Cys Gly Ala Gly Ala Thr Gly
 260 265 270
 Thr Cys Gly Cys Ala Gly Ala Cys Ala Gly Ala Ala Ala Ala Thr Gly
 275 280 285
 Cys Ala Gly Thr Gly Ala Cys Thr Thr Cys Cys Thr Cys Ala Thr Thr
 290 295 300
 Gly Ala Gly Thr Cys Ala Ala Ala Ala Gly Cys Gly Gly Thr Thr Thr
 305 310 315 320
 Gly Thr Gly Cys Gly Cys Ala Gly Ala Gly Gly Thr Ala Ala Gly Cys
 325 330 335
 Cys Thr Ala Thr Gly Ala Cys Thr Gly Ala Cys Thr Cys Thr Gly Ala
 340 345 350

66270 B1

Gly Ala Ala Ala Cys Ala Ala Ala Thr Gly Gly Cys Cys Gly Thr Thr
 355 360 365
 Gly Thr Thr Gly Cys Ala Ala Gly Ala Ala Ala Cys Gly Thr Cys
 370 375 380
 Thr Thr Ala Cys Ala Cys Ala Cys Ala Ala Gly Ala Gly Ala Thr
 385 390 395 400
 Ala Ala Ala Ala Gly Thr Thr Thr Thr Thr Gly Thr Cys Ala Ala Ala
 405 410 415
 Ala Ala Thr Cys Cys Thr Cys Thr Gly Ala Ala Gly Gly Ala Thr Cys
 420 425 430
 Thr Cys Ala Thr Gly Gly Thr Thr Gly Ala Gly Thr Ala Cys Thr Gly
 435 440 445
 Cys Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Thr Ala
 450 455 460
 Ala Cys Ala Cys Ala Gly Gly Cys Thr Cys Ala Gly Thr Thr Cys Gly
 465 470 475 480
 Thr Thr Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala Thr Cys Ala Thr Cys Ala Ala
 485 490 495
 Ala Gly Ala Thr Gly Ala Ala Cys Thr Gly Cys Ala Ala Ala Gly Ala
 500 505 510
 Cys Thr Gly Gly Ala Thr Ala Thr Ala Cys Thr Ala Ala Ala Gly Thr
 515 520 525
 Ala Ala Ala Gly Ala Cys Thr Thr Thr Ala Cys Thr Thr Thr Gly Thr
 530 535 540
 Gly Gly Cys Gly Thr Ala Gly Cys Ala Thr Gly Cys Thr Ala Gly Ala
 545 550 555 560
 Thr Thr Ala Cys Thr Gly Ala Thr Cys Gly Thr Thr Thr Ala Ala Gly
 565 570 575
 Gly Ala Ala Thr Thr Thr Thr Gly Thr Gly Gly Cys Thr Gly Gly Cys
 580 585 590
 Cys Ala Cys Gly Cys Cys Gly Thr Ala Ala Gly Gly Thr Gly Gly Cys
 595 600 605
 Ala Ala Gly Gly Ala Ala Cys Thr Gly Gly Thr Thr Cys Thr Gly Ala
 610 615 620

66270 B1

Thr Gly Thr Gly Gly Ala Thr Thr Thr Ala Cys Ala Gly Gly Ala Gly
625 630 635 640

Cys Cys Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly Cys Ala Ala Ala Ala Ala Cys
645 650 655

Cys Cys Cys Gly Ala Thr Ala Ala Thr Cys Thr Thr Cys Thr Thr Cys
660 665 670

Ala Ala Cys Thr Thr Thr Thr Gly Cys Gly Ala Gly Thr Ala Cys Gly
675 680 685

Ala Ala Ala Ala Gly Ala Thr Thr Ala Cys Cys Gly Gly Gly Gly Cys
690 695 700

Cys Cys Ala Cys Thr Thr Ala Ala Ala Cys Cys Gly Thr Ala Thr Ala
705 710 715 720

Gly Cys Cys Ala Ala Cys Ala Ala Thr Thr Cys Ala Gly Cys Thr Ala
725 730 735

Thr Gly Cys Gly Gly Gly Gly Ala Gly Thr Ala Thr Ala Gly Thr Thr
740 745 750

Ala Thr Ala Thr Gly Cys Cys Cys Gly Gly Ala Ala Ala Ala Gly Thr
755 760 765

Thr Cys Ala Ala Gly Ala Cys Thr Thr Cys Thr Thr Thr Cys Thr Gly
770 775 780

Thr Gly Cys Thr Cys Gly Cys Thr Cys Cys Thr Thr Cys Thr Gly Cys
785 790 795 800

Gly Cys Ala Thr Thr Gly Thr Ala Ala Gly Thr Gly Cys Ala Gly Gly
805 810 815

Ala Thr Gly Gly Thr Gly Thr Gly Ala Cys Thr Gly Ala Thr Cys Thr
820 825 830

Thr Cys Ala Cys Cys Ala Ala Ala Cys Gly Thr Ala Thr Thr Ala Cys
835 840 845

Cys Gly Cys Cys Ala Gly Gly Thr Ala Ala Ala Gly Ala Ala Cys Cys
850 855 860

Cys Gly Ala Ala Thr Cys Cys Gly Gly Thr Gly Thr Thr Thr Ala Cys
865 870 875 880

Ala Cys Cys Cys Cys Gly Thr Gly Ala Ala Gly Gly Thr Gly Cys Ala
885 890 895

66270 B1

Gly Gly Ala Ala Cys Gly Cys Thr Gly Ala Ala Gly Thr Thr Cys Thr
 900 905 910
 Gly Cys Gly Ala Ala Ala Ala Cys Thr Gly Ala Thr Gly Gly Ala
 915 920 925
 Ala Ala Ala Gly Gly Cys Gly Gly Thr Gly Gly Gly Cys Thr Thr Cys
 930 935 940
 Ala Cys Thr Thr Cys Cys Cys Gly Thr Thr Thr Thr Gly Ala Thr Thr
 945 950 955 960
 Thr Cys Gly Cys Cys Ala Thr Thr Cys Ala Thr Gly Thr Gly Gly Cys
 965 970 975
 Gly Cys Ala Cys Gly Cys Cys Cys Gly Thr Thr Cys Gly Cys Gly Thr
 980 985 990
 Gly Ala Thr Cys Thr Gly Cys Gly Thr Cys Gly Cys Cys Gly Thr Ala
 995 1000 1005
 Thr Gly Cys Cys Ala Cys Cys Ala Gly Thr Gly Cys Thr Gly Cys
 1010 1015 1020
 Gly Thr Cys Gly Thr Cys Gly Gly Gly Cys Thr Ala Thr Thr Gly
 1025 1030 1035
 Ala Thr Gly Cys Gly Cys Thr Cys Thr Thr Gly Cys Ala Gly Gly
 1040 1045 1050
 Gly Gly Cys Thr Gly Thr Gly Thr Thr Thr Cys Cys Ala Cys Thr
 1055 1060 1065
 Ala Thr Gly Ala Cys Cys Cys Gly Cys Thr Gly Gly Cys Cys Ala
 1070 1075 1080
 Ala Cys Cys Gly Cys Gly Thr Cys Cys Ala Gly Thr Gly Cys Thr
 1085 1090 1095
 Cys Cys Ala Thr Cys Ala Cys Cys Ala Cys Gly Cys Thr Gly Gly
 1100 1105 1110
 Cys Cys Ala Thr Thr Gly Ala Gly Thr Gly Cys Gly Gly Ala Cys
 1115 1120 1125
 Thr Gly Gly Cys Gly Ala Cys Gly Gly Ala Gly Thr Cys Thr Gly
 1130 1135 1140
 Cys Thr Gly Cys Cys Gly Gly Ala Ala Ala Ala Cys Thr Cys Thr
 1145 1150 1155

66270 B1

A-743 PCT.8725.001

Cys Cys	Ala Thr Cys Ala Cys	Cys Cys Gly Thr Gly	Cys Cys Ala
1160	1165	1170	
Cys Cys	Cys Gly Thr Gly Cys	Cys Cys Thr Gly Ala	Cys Gly Thr
1175	1180	1185	
Thr Cys	Cys Thr Gly Thr Cys	Ala Gly Ala Gly Cys	Thr Gly Gly
1190	1195	1200	
Gly Ala	Cys Thr Gly Ala Thr	Thr Ala Cys Cys Thr	Ala Cys Cys
1205	1210	1215	
Ala Gly	Ala Cys Gly Gly Ala	Ala Thr Ala Thr Gly	Ala Cys Cys
1220	1225	1230	
Cys Gly	Cys Thr Thr Ala Thr	Cys Gly Gly Gly Thr	Gly Cys Thr
1235	1240	1245	
Ala Cys	Ala Thr Thr Cys Cys	Gly Ala Cys Cys Gly	Ala Thr Ala
1250	1255	1260	
Thr Cys	Ala Cys Gly Thr Thr	Cys Ala Cys Ala Thr	Cys Thr Gly
1265	1270	1275	
Cys Ala	Cys Thr Gly Thr Thr	Thr Gly Cys Thr Gly	Cys Cys Cys
1280	1285	1290	
Thr Cys	Gly Ala Thr Gly Thr	Ala Thr Cys Ala Gly	Ala Gly Gly
1295	1300	1305	
Ala Gly	Gly Cys Ala Gly Thr	Gly Gly Cys Cys Gly	Cys Cys Gly
1310	1315	1320	
Cys Gly	Cys Gly Cys Cys Gly	Cys Ala Gly Cys Cys	Gly Thr Gly
1325	1330	1335	
Thr Gly	Gly Thr Ala Thr Gly	Gly Gly Ala Ala Ala	Ala Cys Ala
1340	1345	1350	
Ala Ala	Cys Ala Ala Cys Gly	Cys Ala Ala Ala Ala	Ala Gly Cys
1355	1360	1365	
Ala Gly	Gly Gly Gly Cys Thr	Gly Gly Ala Thr Ala	Cys Cys Cys
1370	1375	1380	
Thr Gly	Gly Gly Cys Ala Thr	Gly Gly Ala Thr Gly	Ala Ala Cys
1385	1390	1395	
Thr Gly	Ala Thr Ala Gly Cys	Gly Ala Ala Ala Gly	Cys Cys Thr
1400	1405	1410	

66270 B1

Gly Gly Cys Gly Thr Thr Thr Thr Gly Thr Thr Cys Gly Thr Gly
 1415 1420 1425
 Ala Gly Cys Gly Thr Thr Thr Thr Cys Gly Cys Ala Gly Thr Thr
 1430 1435 1440
 Ala Thr Cys Ala Gly Ala Cys Ala Gly Ala Gly Cys Thr Thr Ala
 1445 1450 1455
 Ala Gly Thr Cys Cys Cys Gly Thr Gly Gly Ala Ala Thr Ala Ala
 1460 1465 1470
 Ala Gly Cys Gly Thr Gly Cys Cys Cys Gly Thr Gly Cys Gly Cys
 1475 1480 1485
 Gly Thr Cys Gly Thr Gly Ala Thr Gly Cys Gly Gly Ala Cys Ala
 1490 1495 1500
 Gly Gly Gly Ala Ala Cys Gly Thr Cys Ala Gly Gly Ala Thr Ala
 1505 1510 1515
 Thr Thr Gly Thr Cys Ala Cys Cys Cys Thr Gly Gly Thr Gly Ala
 1520 1525 1530
 Ala Ala Cys Gly Gly Cys Ala Gly Cys Thr Gly Ala Cys Gly Cys
 1535 1540 1545
 Gly Cys Gly Ala Ala Ala Thr Cys Gly Cys Gly Gly Ala Ala Gly
 1550 1555 1560
 Gly Gly Cys Gly Cys Thr Thr Cys Ala Cys Thr Gly Cys Cys Ala
 1565 1570 1575
 Ala Thr Cys Gly Thr Gly Ala Gly Gly Cys Gly Gly Thr Ala Ala
 1580 1585 1590
 Ala Ala Cys Gly Cys Gly Ala Ala Gly Thr Thr Gly Ala Gly Cys
 1595 1600 1605
 Gly Thr Cys Gly Thr Gly Thr Gly Ala Ala Gly Gly Ala Gly Cys
 1610 1615 1620
 Gly Cys Ala Thr Gly Ala Thr Thr Cys Thr Gly Thr Cys Ala Cys
 1625 1630 1635
 Gly Thr Ala Ala Cys Cys Gly Thr Ala Ala Thr Thr Ala Cys Ala
 1640 1645 1650
 Gly Cys Cys Gly Gly Cys Thr Gly Gly Cys Cys Ala Cys Ala Gly
 1655 1660 1665

66270 B1

A-743 POSTED 1st

Cys Thr Thr Cys Cys Cys Cys Cys Thr Gly Ala Ala Ala Gly Thr
 1670 1673 1680
 Gly Ala Cys Cys Thr Cys Cys Thr Cys Thr Gly Ala Ala Thr Ala
 1685 1690 1695
 Ala Thr Cys Cys Gly Gly Cys Cys Thr Gly Cys Gly Cys Cys Gly
 1700 1705 1710
 Gly Ala Gly Gly Cys Thr Thr Cys Cys Gly Cys Ala Cys Gly Thr
 1715 1720 1725
 Cys Thr Gly Ala Ala Gly Cys Cys Cys Gly Ala Cys Ala Gly Cys
 1730 1735 1740
 Gly Cys Ala Cys Ala Ala Ala Ala Ala Ala Thr Cys Ala Gly Cys
 1745 1750 1755
 Ala Cys Cys Ala Cys Ala Thr Ala Cys Ala Ala Ala Ala Ala Ala
 1760 1765 1770
 Cys Ala Ala Cys Cys Thr Cys Ala Thr Cys Ala Thr Cys Cys Ala
 1775 1780 1785
 Gly Cys Thr Thr Cys Thr Gly Gly Thr Gly Cys Ala Thr Cys Cys
 1790 1795 1800
 Gly Gly Cys Cys Cys Cys Cys Cys Cys Thr Gly Thr Thr Thr Thr
 1805 1810 1815
 Cys Gly Ala Thr Ala Cys Ala Ala Ala Ala Cys Ala Cys Gly Cys
 1820 1825 1830
 Cys Thr Cys Ala Cys Ala Gly Ala Cys Gly Gly Gly Gly Ala Ala
 1835 1840 1845
 Thr Thr Thr Thr Gly Cys Thr Thr Ala Thr Cys Cys Ala Cys Ala
 1850 1855 1860
 Thr Thr Ala Ala Ala Cys Thr Gly Cys Ala Ala Gly Gly Gly Ala
 1865 1870 1875
 Cys Thr Thr Cys Cys Cys Cys Ala Thr Ala Ala Gly Gly Thr Thr
 1880 1885 1890
 Ala Cys Ala Ala Cys Cys Gly Thr Thr Cys Ala Thr Gly Thr Cys
 1895 1900 1905
 Ala Thr Ala Ala Ala Gly Cys Gly Cys Cys Ala Thr Cys Cys Gly
 1910 1915 1920

66270 B1

Cys 1925	Cys	Ala	Gly	Cys	Gly	Thr 1930	Thr	Ala	Cys	Ala	Gly 1935	Gly	Gly	Thr
Gly 1940	Cys	Ala	Ala	Thr	Gly	Thr 1945	Ala	Thr	Cys	Thr	Thr 1950	Thr	Thr	Ala
Ala 1955	Ala	Cys	Ala	Cys	Cys	Thr 1960	Gly	Thr	Thr	Thr	Ala 1965	Thr	Ala	Thr
Cys 1970	Thr	Cys	Cys	Thr	Thr	Thr 1975	Ala	Ala	Ala	Cys	Thr 1980	Ala	Cys	Thr
Thr 1985	Ala	Ala	Thr	Thr	Ala	Cys 1990	Ala	Thr	Thr	Cys	Ala 1995	Thr	Thr	Thr
Ala 2000	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Ala 2005	Ala	Ala	Ala	Cys	Cys 2010	Thr	Ala	Thr
Thr 2015	Cys	Ala	Cys	Thr	Gly	Cys 2020	Cys	Thr	Gly	Thr	Cys 2025	Cys	Thr	Thr
Gly 2030	Gly	Ala	Cys	Ala	Gly	Ala 2035	Cys	Ala	Gly	Ala	Thr 2040	Ala	Thr	Gly
Cys 2045	Ala	Cys	Cys	Thr	Cys	Cys 2050	Cys	Ala	Cys	Cys	Gly 2055	Cys	Ala	Ala
Gly 2060	Cys	Gly	Gly	Cys	Gly	Gly 2065	Gly	Cys	Cys	Cys	Cys 2070	Thr	Ala	Cys
Cys 2075	Gly	Gly	Ala	Gly	Cys	Cys 2080	Gly	Cys	Thr	Thr	Thr 2085	Ala	Gly	Thr
Thr 2090	Ala	Cys	Ala	Ala	Cys	Ala 2095	Cys	Thr	Cys	Ala	Gly 2100	Ala	Cys	Ala
Cys 2105	Ala	Ala	Cys	Cys	Ala	Cys 2110	Cys	Ala	Gly	Ala	Ala 2115	Ala	Ala	Ala
Cys 2120	Cys	Cys	Cys	Gly	Gly	Thr 2125	Cys	Cys	Ala	Gly	Cys 2130	Gly	Cys	Ala
Gly 2135	Ala	Ala	Cys	Thr	Gly	Ala 2140	Ala	Ala	Cys	Cys	Ala 2145	Cys	Ala	Ala
Ala 2150	Gly	Cys	Cys	Cys	Cys	Thr 2155	Cys	Cys	Cys	Thr	Cys 2160	Ala	Thr	Ala
Ala 2165	Cys	Thr	Gly	Ala	Ala	Ala 2170	Ala	Gly	Cys	Gly	Gly 2175	Cys	Cys	Cys

66270 B1

A-743 PCT.ST2b.txt

Cys Gly	Cys Cys Cys Cys Gly	Gly Thr Cys Cys Gly	Ala Ala Gly
2180	2185	2190	
Gly Gly	Cys Cys Gly Gly Ala	Ala Cys Ala Gly Ala	Gly Thr Cys
2195	2200	2205	
Gly Cys	Thr Thr Thr Thr Ala	Ala Thr Thr Ala Thr	Gly Ala Ala
2210	2215	2220	
Thr Gly	Thr Thr Gly Thr Ala	Ala Cys Thr Ala Cys	Thr Thr Cys
2225	2230	2235	
Ala Thr	Cys Ala Thr Cys Gly	Cys Thr Gly Thr Cys	Ala Gly Thr
2240	2245	2250	
Cys Thr	Thr Cys Thr Cys Gly	Cys Thr Gly Gly Ala	Ala Gly Thr
2255	2260	2265	
Thr Cys	Thr Cys Ala Gly Thr	Ala Cys Ala Cys Gly	Cys Thr Cys
2270	2275	2280	
Gly Thr	Ala Ala Gly Cys Gly	Gly Cys Cys Cys Thr	Gly Ala Cys
2285	2290	2295	
Gly Gly	Cys Cys Cys Gly Cys	Thr Ala Ala Cys Gly	Cys Gly Gly
2300	2305	2310	
Ala Gly	Ala Thr Ala Cys Gly	Cys Cys Cys Cys Gly	Ala Cys Thr
2315	2320	2325	
Thr Cys	Gly Gly Gly Thr Ala	Ala Ala Cys Cys Cys	Thr Cys Gly
2330	2335	2340	
Thr Cys	Gly Gly Gly Ala Cys	Cys Ala Cys Thr Cys	Cys Gly Ala
2345	2350	2355	
Cys Cys	Gly Cys Gly Cys Ala	Cys Ala Gly Ala Ala	Gly Cys Thr
2360	2365	2370	
Cys Thr	Cys Thr Cys Ala Thr	Gly Gly Cys Thr Gly	Ala Ala Ala
2375	2380	2385	
Gly Cys	Gly Gly Gly Thr Ala	Thr Gly Gly Thr Cys	Thr Gly Gly
2390	2395	2400	
Cys Ala	Gly Gly Gly Cys Thr	Gly Gly Gly Gly Ala	Thr Gly Gly
2405	2410	2415	
Gly Thr	Ala Ala Gly Gly Thr	Gly Ala Ala Ala Thr	Cys Thr Ala
2420	2425	2430	

66270 B1

Thr	Cys	Ala	Ala	Thr	Cys	Ala	Gly	Thr	Ala	Cys	Cys	Gly	Gly	Cys	
2435						2440					2445				
Thr	Thr	Ala	Cys	Gly	Cys	Cys	Gly	Gly	Gly	Cys	Thr	Thr	Cys	Gly	
2450						2455					2460				
Gly	Cys	Gly	Gly	Thr	Thr	Thr	Thr	Ala	Cys	Thr	Cys	Cys	Thr	Gly	
2465						2470					2475				
Thr	Thr	Thr	Cys	Ala	Thr	Ala	Thr	Ala	Thr	Gly	Ala	Ala	Ala	Cys	
2480						2485					2490				
Ala	Ala	Cys	Ala	Gly	Gly	Thr	Cys	Ala	Cys	Cys	Gly	Cys	Cys	Thr	
2495						2500					2505				
Thr	Cys	Cys	Ala	Thr	Gly	Cys	Cys	Gly	Cys	Thr	Gly	Ala	Thr	Gly	
2510						2515					2520				
Cys	Gly	Gly	Cys	Ala	Thr	Ala	Thr	Cys	Cys	Thr	Gly	Gly	Thr	Ala	
2525						2530					2535				
Ala	Cys	Gly	Ala	Thr	Ala	Thr	Cys	Thr	Gly	Ala	Ala	Thr	Thr	Gly	
2540						2545					2550				
Thr	Thr	Ala	Thr	Ala	Cys	Ala	Thr	Gly	Thr	Gly	Thr	Ala	Thr	Ala	
2555						2560					2565				
Thr	Ala	Cys	Gly	Thr	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Thr	Gly	Ala	Cys	Ala	
2570						2575					2580				
Ala	Ala	Ala	Ala	Thr	Ala	Gly	Gly	Ala	Cys	Ala	Ala	Gly	Thr	Thr	
2585						2590					2595				
Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Thr	Thr	Thr	Ala	Cys	Ala	Gly	Gly	Cys	Gly	
2600						2605					2610				
Ala	Thr	Gly	Cys	Ala	Ala	Thr	Gly	Ala	Thr	Thr	Cys	Ala	Ala	Ala	
2615						2620					2625				
Cys	Ala	Cys	Gly	Thr	Ala	Ala	Thr	Cys	Ala	Ala	Thr	Ala	Thr	Cys	
2630						2635					2640				
Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Thr	Gly	Gly	Gly	Cys	Gly	Ala	Ala	Gly	Ala	
2645						2650					2655				
Ala	Cys	Thr	Cys	Cys	Ala	Gly	Cys	Ala	Thr	Gly	Ala	Gly	Ala	Thr	
2660						2665					2670				
Cys	Cys	Cys	Cys	Gly	Cys	Gly	Cys	Thr	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	
2675						2680					2685				

66270 B1

A-743 FET.3725.txt

Thr Cys 2690	Ala Thr Cys Cys 2695	Ala Gly Cys Cys Gly Gly Cys Gly Thr 2700
Cys Cys 2705	Cys Gly Gly Ala Ala 2710	Ala Ala Cys Gly Ala Thr Thr Cys 2715
Cys Gly 2720	Ala Ala Gly Cys Cys 2725	Cys Ala Ala Cys Cys Thr Thr Thr 2730
Cys Ala 2735	Thr Ala Gly Ala Ala 2740	Gly Gly Cys Gly Gly Cys Gly Gly 2745
Thr Gly 2750	Gly Ala Ala Thr Cys 2755	Gly Ala Ala Ala Thr Cys Thr Cys 2760
Gly Thr 2765	Gly Ala Thr Gly Gly 2770	Cys Ala Gly Gly Thr Thr Gly Gly 2775
Gly Cys 2780	Gly Thr Cys Gly Cys 2785	Thr Thr Gly Gly Thr Cys Gly Gly 2790
Thr Cys 2795	Ala Thr Thr Thr Cys 2800	Gly Ala Ala Cys Cys Cys Cys Ala 2805
Gly Ala 2810	Gly Thr Cys Cys Cys 2815	Gly Cys Thr Cys Ala Gly Ala Ala 2820
Gly Ala 2825	Ala Cys Thr Cys Gly 2830	Thr Cys Ala Ala Gly Ala Ala Gly 2835
Gly Cys 2840	Gly Ala Thr Ala Gly 2845	Ala Ala Gly Gly Cys Gly Ala Thr 2850
Gly Cys 2855	Gly Cys Thr Gly Cys 2860	Gly Ala Ala Thr Cys Gly Gly Gly 2865
Ala Gly 2870	Cys Gly Gly Cys Gly 2875	Ala Thr Ala Cys Cys Gly Thr Ala 2880
Ala Ala 2885	Gly Cys Ala Cys Gly 2890	Ala Gly Gly Ala Ala Gly Cys Gly 2895
Gly Thr 2900	Cys Ala Gly Cys Cys 2905	Cys Ala Thr Thr Cys Gly Cys Cys 2910
Gly Cys 2915	Cys Ala Ala Gly Cys 2920	Thr Cys Thr Thr Cys Ala Gly Cys 2925
Ala Ala 2930	Thr Ala Thr Cys Ala 2935	Cys Gly Gly Gly Thr Ala Gly Cys 2940

66270 B1

Cys	Ala	Ala	Cys	Gly	Cys	Thr	Ala	Thr	Gly	Thr	Cys	Cys	Thr	Gly
2945						2950					2955			
Ala	Thr	Ala	Gly	Cys	Gly	Gly	Thr	Cys	Cys	Gly	Cys	Cys	Ala	Cys
2960						2965					2970			
Ala	Cys	Cys	Cys	Ala	Gly	Cys	Cys	Gly	Gly	Cys	Cys	Ala	Cys	Ala
2975						2980					2985			
Gly	Thr	Cys	Gly	Ala	Thr	Gly	Ala	Ala	Thr	Cys	Cys	Ala	Gly	Ala
2990						2995					3000			
Ala	Ala	Ala	Gly	Cys	Gly	Gly	Cys	Cys	Ala	Thr	Thr	Thr	Thr	Cys
3005						3010					3015			
Cys	Ala	Cys	Cys	Ala	Thr	Gly	Ala	Thr	Ala	Thr	Thr	Cys	Gly	Gly
3020						3025					3030			
Cys	Ala	Ala	Gly	Cys	Ala	Gly	Gly	Cys	Ala	Thr	Cys	Gly	Cys	Cys
3035						3040					3045			
Ala	Thr	Gly	Ala	Gly	Thr	Cys	Ala	Cys	Gly	Ala	Cys	Gly	Ala	Gly
3050						3055					3060			
Ala	Thr	Cys	Cys	Thr	Cys	Gly	Cys	Cys	Gly	Thr	Cys	Gly	Gly	Gly
3065						3070					3075			
Cys	Ala	Thr	Gly	Cys	Gly	Cys	Gly	Cys	Cys	Thr	Thr	Gly	Ala	Gly
3080						3085					3090			
Cys	Cys	Thr	Gly	Gly	Cys	Gly	Ala	Ala	Cys	Ala	Gly	Thr	Thr	Cys
3095						3100					3105			
Gly	Gly	Cys	Thr	Gly	Gly	Cys	Gly	Cys	Gly	Ala	Gly	Cys	Cys	Cys
3110						3115					3120			
Cys	Thr	Gly	Ala	Thr	Gly	Cys	Thr	Cys	Thr	Thr	Cys	Gly	Thr	Cys
3125						3130					3135			
Cys	Ala	Gly	Ala	Thr	Cys	Ala	Thr	Cys	Cys	Thr	Gly	Ala	Thr	Cys
3140						3145					3150			
Gly	Ala	Cys	Ala	Ala	Gly	Ala	Cys	Cys	Gly	Gly	Cys	Thr	Thr	Cys
3155						3160					3165			
Cys	Ala	Thr	Cys	Cys	Gly	Ala	Gly	Thr	Ala	Cys	Gly	Thr	Gly	Cys
3170						3175					3180			
Thr	Cys	Gly	Cys	Thr	Cys	Gly	Ala	Thr	Gly	Cys	Gly	Ala	Thr	Gly
3185						3190					3195			

66270 B1

Thr Thr Thr Cys Gly Cys Thr Thr Gly Gly Thr Gly Gly Thr Cys
 3200 3205 3210
 Gly Ala Ala Thr Gly Gly Gly Cys Ala Gly Gly Thr Ala Gly Cys
 3215 3220 3225
 Cys Gly Gly Ala Thr Cys Ala Ala Gly Cys Gly Thr Ala Thr Gly
 3230 3235 3240
 Cys Ala Gly Cys Cys Gly Cys Cys Gly Cys Ala Thr Thr Gly Cys
 3245 3250 3255
 Ala Thr Cys Ala Gly Cys Cys Ala Thr Gly Ala Thr Gly Gly Ala
 3260 3265 3270
 Thr Ala Cys Thr Thr Thr Cys Thr Cys Gly Gly Cys Ala Gly Gly
 3275 3280 3285
 Ala Gly Cys Ala Ala Gly Gly Thr Gly Ala Gly Ala Thr Gly Ala
 3290 3295 3300
 Cys Ala Gly Gly Ala Gly Ala Thr Cys Cys Thr Gly Cys Cys Cys
 3305 3310 3315
 Cys Gly Gly Cys Ala Cys Thr Thr Cys Gly Cys Cys Cys Ala Ala
 3320 3325 3330
 Thr Ala Gly Cys Ala Gly Cys Cys Ala Gly Thr Cys Cys Cys Thr
 3335 3340 3345
 Thr Cys Cys Cys Gly Cys Thr Thr Cys Ala Gly Thr Gly Ala Cys
 3350 3355 3360
 Ala Ala Cys Gly Thr Cys Gly Ala Gly Cys Ala Cys Ala Gly Cys
 3365 3370 3375
 Thr Gly Cys Gly Cys Ala Ala Gly Gly Ala Ala Cys Gly Cys Cys
 3380 3385 3390
 Cys Gly Thr Cys Gly Thr Gly Gly Cys Cys Ala Gly Cys Cys Ala
 3395 3400 3405
 Cys Gly Ala Thr Ala Gly Cys Cys Gly Cys Gly Cys Thr Gly Cys
 3410 3415 3420
 Cys Thr Cys Gly Thr Cys Cys Thr Gly Cys Ala Ala Thr Thr Cys
 3425 3430 3435
 Ala Thr Thr Cys Ala Gly Gly Ala Cys Ala Cys Cys Gly Gly Ala
 3440 3445 3450

66270 B1

Cys Ala Gly Gly Thr Cys Gly Gly Thr Cys Thr Thr Gly Ala Cys
 3455 3460 3465
 Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ala Ala Cys Cys Gly Gly Gly Cys Gly
 3470 3475 3480
 Cys Cys Cys Cys Thr Gly Cys Gly Cys Thr Gly Ala Cys Ala Gly
 3485 3490 3495
 Cys Cys Gly Gly Ala Ala Cys Ala Cys Gly Gly Cys Gly Gly Cys
 3500 3505 3510
 Ala Thr Cys Ala Gly Ala Gly Cys Ala Gly Cys Cys Gly Ala Thr
 3515 3520 3525
 Thr Gly Thr Cys Thr Gly Thr Thr Gly Thr Gly Cys Cys Cys Ala
 3530 3535 3540
 Gly Thr Cys Ala Thr Ala Gly Cys Cys Gly Ala Ala Thr Ala Gly
 3545 3550 3555
 Cys Cys Thr Cys Thr Cys Cys Ala Cys Cys Cys Ala Ala Gly Cys
 3560 3565 3570
 Gly Gly Cys Cys Gly Gly Ala Gly Ala Ala Cys Cys Thr Gly Cys
 3575 3580 3585
 Gly Thr Gly Cys Ala Ala Thr Cys Cys Cys Ala Thr Cys Thr Thr Gly
 3590 3595 3600
 Thr Thr Cys Ala Ala Thr Cys Ala Thr Gly Cys Gly Ala Ala Ala
 3605 3610 3615
 Cys Gly Ala Thr Cys Cys Thr Cys Ala Thr Cys Cys Thr Gly Thr
 3620 3625 3630
 Cys Thr Cys Thr Thr Gly Ala Thr Cys Thr Gly Ala Thr Cys Thr
 3635 3640 3645
 Thr Gly Ala Thr Cys Cys Cys Cys Thr Gly Cys Gly Cys Cys Ala
 3650 3655 3660
 Thr Cys Ala Gly Ala Thr Cys Cys Thr Thr Gly Gly Cys Gly Gly
 3665 3670 3675
 Cys Ala Ala Gly Ala Ala Ala Gly Cys Cys Ala Thr Cys Cys Ala
 3680 3685 3690
 Gly Thr Thr Thr Ala Cys Thr Thr Thr Gly Cys Ala Gly Gly Gly
 3695 3700 3705

66270 B1

A-143 PPT.8025.txt

Cys	Thr	Thr	Cys	Cys	Cys	Ala	Ala	Cys	Cys	Thr	Thr	Ala	Cys	Cys
3710						3715					3720			
Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	Cys	Gly	Cys	Cys	Cys	Cys	Ala	Gly	Cys
3725						3730					3735			
Thr	Gly	Gly	Cys	Ala	Ala	Thr	Thr	Cys	Cys	Gly	Gly	Thr	Thr	Cys
3740						3745					3750			
Gly	Cys	Thr	Thr	Gly	Cys	Thr	Gly	Thr	Cys	Cys	Ala	Thr	Ala	Ala
3755						3760					3765			
Ala	Ala	Cys	Cys	Gly	Cys	Cys	Cys	Ala	Gly	Thr	Cys	Thr	Ala	Gly
3770						3775					3780			
Cys	Thr	Ala	Thr	Cys	Gly	Cys	Cys	Ala	Thr	Gly	Thr	Ala	Ala	Gly
3785						3790					3795			
Cys	Cys	Cys	Ala	Cys	Thr	Gly	Cys	Ala	Ala	Gly	Cys	Thr	Ala	Cys
3800						3805					3810			
Cys	Thr	Gly	Cys	Thr	Thr	Thr	Cys	Thr	Cys	Thr	Thr	Thr	Gly	Cys
3815						3820					3825			
Gly	Cys	Thr	Thr	Gly	Cys	Gly	Thr	Thr	Thr	Thr	Cys	Cys	Cys	Thr
3830						3835					3840			
Thr	Gly	Thr	Cys	Cys	Ala	Gly	Ala	Thr	Ala	Gly	Cys	Cys	Cys	Ala
3845						3850					3855			
Gly	Thr	Ala	Gly	Cys	Thr	Gly	Ala	Cys	Ala	Thr	Thr	Cys	Ala	Thr
3860						3865					3870			
Cys	Cys	Gly	Gly	Gly	Gly	Thr	Cys	Ala	Gly	Cys	Ala	Cys	Cys	Gly
3875						3880					3885			
Thr	Thr	Thr	Cys	Thr	Gly	Cys	Gly	Gly	Ala	Cys	Thr	Gly	Gly	Cys
3890						3895					3900			
Thr	Thr	Thr	Cys	Thr	Ala	Cys	Gly	Thr	Gly	Thr	Thr	Cys	Cys	Gly
3905						3910					3915			
Cys	Thr	Thr	Cys	Cys	Thr	Thr	Thr	Ala	Gly	Cys	Ala	Gly	Cys	Cys
3920						3925					3930			
Cys	Thr	Thr	Gly	Cys	Gly	Cys	Cys	Cys	Thr	Gly	Ala	Gly	Thr	Gly
3935						3940					3945			
Cys	Thr	Thr	Gly	Cys	Gly	Gly	Cys	Ala	Gly	Cys	Gly	Thr	Gly	Ala
3950						3955					3960			

66270 B1

Ala Gly Cys Thr Ala Cys Ala Thr Ala Thr Ala Thr Gly Thr Gly
3985 3990 3995

Ala Thr Cys Cys Gly Gly Gly Cys Ala Ala Ala Thr Cys Gly Cys
3980 3985 3990

Thr Gly Ala Ala Thr Ala Thr Thr Cys Cys Thr Thr Thr Thr Gly
3995 4000 4005

Thr Cys Thr Cys Cys Gly Ala Cys Cys Ala Thr Cys Ala Gly Gly
4010 4015 4020

Cys Ala Cys Cys Thr Gly Ala Gly Thr Cys Gly Cys Thr Gly Thr
4025 4030 4035

Cys Thr Thr Thr Thr Thr Cys Gly Thr Gly Ala Cys Ala Thr Thr
4040 4045 4050

Cys Ala Gly Thr Thr Cys Gly Cys Thr Gly Cys Gly Cys Thr Cys
4055 4060 4065

Ala Cys Gly Gly Cys Thr Cys Thr Gly Gly Cys Ala Gly Thr Gly
4070 4075 4080

Ala Ala Thr Gly Gly Gly Gly Gly Thr Ala Ala Ala Thr Gly Gly
4085 4090 4095

Cys Ala Cys Thr Ala Cys Ala Gly Gly Cys Gly Cys Cys Thr Thr
4100 4105 4110

Thr Thr Ala Thr Gly Gly Ala Thr Thr Cys Ala Thr Gly Cys Ala
4115 4120 4125

Ala Gly Gly Ala Ala Ala Cys Thr Ala Cys Cys Cys Ala Thr Ala
4130 4135 4140

Ala Thr Ala Cys Ala Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly Cys Cys Cys
4145 4150 4155

Gly Thr Cys Ala Cys Gly Gly Gly Cys Thr Thr Thr Cys Thr Cys Ala
4160 4165 4170

Gly Gly Gly Cys Gly Thr Thr Thr Thr Ala Thr Gly Gly Cys Gly
4175 4180 4185

Gly Gly Thr Cys Thr Gly Cys Thr Ala Thr Gly Thr Gly Gly Thr
4190 4195 4200

Gly Cys Thr Ala Thr Cys Thr Gly Ala Cys Thr Thr Thr Thr Thr
4205 4210 4215

66270 B1

A-743 PCT.ST2b.txt

Gly Cys Thr Gly Thr Thr Cys Ala Gly Cys Ala Gly Thr Thr Cys
 4220 4225 4230
 Cys Thr Gly Cys Cys Cys Thr Cys Thr Gly Ala Thr Thr Thr Thr
 4235 4240 4245
 Cys Cys Ala Gly Thr Cys Thr Gly Ala Cys Cys Ala Cys Thr Thr
 4250 4255 4260
 Cys Gly Gly Ala Thr Thr Ala Thr Cys Cys Cys Gly Thr Gly Ala
 4265 4270 4275
 Cys Ala Gly Gly Thr Cys Ala Thr Thr Cys Ala Gly Ala Cys Thr
 4280 4285 4290
 Gly Gly Cys Thr Ala Ala Thr Gly Cys Ala Cys Cys Cys Ala Gly
 4295 4300 4305
 Thr Ala Ala Gly Gly Cys Ala Gly Cys Gly Gly Thr Ala Thr Cys
 4310 4315 4320
 Ala Thr Cys Ala Ala Cys Ala Gly Gly Cys Thr Thr Ala Cys Cys
 4325 4330 4335
 Cys Gly Thr Cys Thr Thr Ala Cys Thr Gly Thr Cys Gly Ala Ala
 4340 4345 4350
 Gly Ala Cys Gly Thr Gly Cys Gly Thr Ala Ala Cys Gly Thr Ala
 4355 4360 4365
 Thr Gly Cys Ala Thr Gly Gly Thr Cys Thr Cys Cys Cys Cys Ala
 4370 4375 4380
 Thr Gly Cys Gly Ala Gly Ala Gly Thr Ala Gly Gly Gly Ala Ala
 4385 4390 4395
 Cys Thr Gly Cys Cys Ala Gly Gly Cys Ala Thr Cys Ala Ala Ala
 4400 4405 4410
 Thr Ala Ala Ala Ala Cys Gly Ala Ala Ala Gly Gly Cys Thr Cys
 4415 4420 4425
 Ala Gly Thr Cys Gly Ala Ala Ala Gly Ala Cys Thr Gly Gly Gly
 4430 4435 4440
 Cys Cys Thr Thr Thr Cys Gly Thr Thr Thr Thr Ala Thr Cys Thr
 4445 4450 4455
 Gly Thr Thr Gly Thr Thr Thr Gly Thr Cys Gly Gly Thr Gly Ala
 4460 4465 4470

66270 B1

Ala Cys Gly Cys Thr Cys Thr Cys Cys Thr Gly Ala Gly Thr Ala	4475	4480	4485
Gly Gly Ala Cys Ala Ala Ala Thr Cys Cys Gly Cys Cys Gly Gly	4490	4495	4500
Gly Ala Gly Cys Gly Gly Ala Thr Thr Thr Gly Ala Ala Cys Gly	4505	4510	4515
Thr Thr Gly Cys Gly Ala Ala Gly Cys Ala Ala Cys Gly Gly Cys	4520	4525	4530
Cys Cys Gly Gly Ala Gly Gly Gly Thr Gly Gly Cys Gly Gly Gly	4535	4540	4545
Cys Ala Gly Gly Ala Cys Gly Cys Cys Cys Gly Cys Cys Ala Thr	4550	4555	4560
Ala Ala Ala Cys Thr Gly Cys Cys Ala Gly Gly Cys Ala Thr Cys	4565	4570	4575
Ala Ala Ala Thr Thr Ala Ala Gly Cys Ala Gly Ala Ala Gly Gly	4580	4585	4590
Cys Cys Ala Thr Cys Cys Thr Gly Ala Cys Gly Gly Ala Thr Gly	4595	4600	4605
Gly Cys Cys Thr Thr Thr Thr Thr Gly Cys Gly Thr Thr Thr Cys	4610	4615	4620
Thr Ala Cys Ala Ala Ala Cys Thr Cys Thr Thr Thr Thr Gly Thr	4625	4630	4635
Thr Thr Ala Thr Thr Thr Thr Thr Cys Thr Ala Ala Ala Thr Ala	4640	4645	4650
Cys Ala Thr Thr Cys Ala Ala Ala Thr Ala Thr Gly Gly Ala Cys	4655	4660	4665
Gly Thr Cys Gly Thr Ala Cys Thr Thr Ala Ala Cys Thr Thr Thr	4670	4675	4680
Thr Ala Ala Ala Gly Thr Ala Thr Gly Gly Gly Cys Ala Ala Thr	4685	4690	4695
Cys Ala Ala Thr Thr Gly Cys Thr Cys Cys Thr Gly Thr Thr Ala	4700	4705	4710
Ala Ala Ala Thr Thr Gly Cys Thr Thr Thr Ala Gly Ala Ala Ala	4715	4720	4725

66270 B1

A-743 PCT.S125.txt

Thr Ala Cys Thr Thr Thr Gly Gly Cys Ala Gly Cys Gly Gly Thr
 4739 4735 4740
 Thr Thr Gly Thr Thr Gly Thr Ala Thr Thr Gly Ala Gly Thr Thr
 4745 4750 4755
 Thr Cys Ala Thr Thr Thr Gly Cys Gly Cys Ala Thr Thr Gly Gly
 4760 4765 4770
 Thr Thr Ala Ala Ala Thr Gly Gly Ala Ala Ala Gly Thr Gly Ala
 4775 4780 4785
 Cys Cys Gly Thr Gly Cys Gly Cys Thr Thr Ala Cys Thr Ala Cys
 4790 4795 4800
 Ala Gly Cys Cys Thr Ala Ala Thr Ala Thr Thr Thr Thr Thr Gly
 4805 4810 4815
 Ala Ala Ala Thr Ala Thr Cys Cys Cys Ala Ala Gly Ala Gly Cys
 4820 4825 4830
 Thr Thr Thr Thr Thr Cys Cys Thr Thr Cys Gly Cys Ala Thr Gly
 4835 4840 4845
 Cys Cys Cys Ala Cys Gly Cys Thr Ala Ala Ala Cys Ala Thr Thr
 4850 4855 4860
 Cys Thr Thr Thr Thr Thr Cys Thr Cys Thr Thr Thr Thr Gly Gly
 4865 4870 4875
 Thr Thr Ala Ala Ala Thr Cys Gly Thr Thr Gly Thr Thr Thr Gly
 4880 4885 4890
 Ala Thr Thr Thr Ala Thr Thr Ala Thr Thr Thr Thr Gly Cys Thr Ala
 4895 4900 4905
 Thr Ala Thr Thr Thr Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Cys Gly Ala Thr
 4910 4915 4920
 Ala Ala Thr Thr Ala Thr Cys Ala Ala Cys Thr Ala Gly Ala Gly
 4925 4930 4935
 Ala Ala Gly Gly Ala Ala Cys Ala Ala Thr Thr Ala Ala Thr Gly
 4940 4945 4950
 Gly Thr Ala Thr Gly Thr Thr Cys Ala Thr Ala Cys Ala Cys Gly
 4955 4960 4965
 Cys Ala Thr Gly Thr Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ala Ala Ala Cys
 4970 4975 4980

66270 B1

Thr	Ala	Thr	Cys	Thr	Ala	Thr	Ala	Thr	Ala	Gly	Thr	Thr	Gly	Thr
4985						4990					4995			
Cys	Thr	Thr	Thr	Cys	Thr	Cys	Thr	Gly	Ala	Ala	Thr	Gly	Thr	Gly
5000						5005					5010			
Cys	Ala	Ala	Ala	Ala	Cys	Thr	Ala	Ala	Gly	Cys	Ala	Thr	Thr	Cys
5015						5020					5025			
Cys	Gly	Ala	Ala	Gly	Cys	Cys	Ala	Thr	Thr	Ala	Thr	Thr	Ala	Gly
5030						5035					5040			
Cys	Ala	Gly	Thr	Ala	Thr	Gly	Ala	Ala	Thr	Ala	Gly	Gly	Gly	Ala
5045						5050					5055			
Ala	Ala	Cys	Thr	Ala	Ala	Ala	Cys	Cys	Cys	Ala	Gly	Thr	Gly	Ala
5060						5065					5070			
Thr	Ala	Ala	Gly	Ala	Cys	Cys	Thr	Gly	Ala	Thr	Gly	Ala	Thr	Thr
5075						5080					5085			
Thr	Cys	Gly	Cys	Thr	Thr	Cys	Thr	Thr	Thr	Ala	Ala	Thr	Thr	Ala
5090						5095					5100			
Cys	Ala	Thr	Thr	Thr	Gly	Gly	Ala	Gly	Ala	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr
5105						5110					5115			
Thr	Ala	Thr	Thr	Thr	Ala	Cys	Ala	Gly	Cys	Ala	Thr	Thr	Gly	Thr
5120						5125					5130			
Thr	Thr	Thr	Cys	Ala	Ala	Ala	Thr	Ala	Thr	Ala	Thr	Thr	Cys	Cys
5135						5140					5145			
Ala	Ala	Thr	Thr	Ala	Ala	Thr	Cys	Gly	Gly	Thr	Gly	Ala	Ala	Thr
5150						5155					5160			
Gly	Ala	Thr	Thr	Gly	Gly	Ala	Gly	Thr	Thr	Ala	Gly	Ala	Ala	Thr
5165						5170					5175			
Ala	Ala	Thr	Cys	Thr	Ala	Cys	Thr	Ala	Thr	Ala	Gly	Gly	Ala	Thr
5180						5185					5190			
Cys	Ala	Thr	Ala	Thr	Thr	Thr	Thr	Ala	Thr	Thr	Ala	Ala	Ala	Thr
5195						5200					5205			
Thr	Ala	Gly	Cys	Gly	Thr	Cys	Ala	Thr	Cys	Ala	Thr	Ala	Ala	Thr
5210						5215					5220			
Ala	Thr	Thr	Gly	Cys	Cys	Thr	Cys	Cys	Ala	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr
5225						5230					5235			

66270 B1

A-743 PCT.BT25.txt

Thr Ala Gly Gly Gly Thr Ala Ala Thr Thr Ala Thr Cys Cys Ala
 5240 5245 5250
 Gly Ala Ala Thr Thr Gly Ala Ala Ala Thr Ala Thr Cys Ala Gly
 5255 5260 5265
 Ala Thr Thr Thr Ala Ala Cys Cys Ala Thr Ala Gly Ala Ala Thr
 5270 5275 5280
 Gly Ala Gly Gly Ala Thr Ala Ala Ala Thr Gly Ala Thr Cys Gly
 5285 5290 5295
 Cys Gly Ala Gly Thr Ala Ala Ala Thr Ala Ala Thr Ala Thr Thr
 5300 5305 5310
 Cys Ala Cys Ala Ala Thr Gly Thr Ala Cys Cys Ala Thr Thr Thr
 5315 5320 5325
 Thr Ala Gly Thr Cys Ala Thr Ala Thr Cys Ala Gly Ala Thr Ala
 5330 5335 5340
 Ala Gly Cys Ala Thr Thr Gly Ala Thr Thr Ala Ala Thr Ala Thr
 5345 5350 5355
 Cys Ala Thr Thr Ala Thr Thr Thr Gly Cys Thr Thr Cys Thr Ala Cys
 5360 5365 5370
 Ala Gly Gly Cys Thr Thr Thr Ala Ala Thr Thr Thr Thr Ala Thr
 5375 5380 5385
 Thr Ala Ala Thr Thr Ala Thr Thr Cys Thr Gly Thr Ala Ala Gly
 5390 5395 5400
 Thr Gly Thr Cys Gly Thr Cys Gly Gly Cys Ala Thr Thr Thr Ala
 5405 5410 5415
 Thr Gly Thr Cys Thr Thr Thr Cys Ala Thr Ala Cys Cys Cys Ala
 5420 5425 5430
 Thr Cys Thr Cys Thr Thr Thr Ala Thr Cys Cys Thr Thr Ala Cys
 5435 5440 5445
 Cys Thr Ala Thr Thr Gly Thr Thr Thr Gly Thr Cys Gly Cys Ala
 5450 5455 5460
 Ala Gly Thr Thr Thr Thr Gly Cys Gly Thr Gly Thr Thr Ala Thr
 5465 5470 5475
 Ala Thr Ala Thr Cys Ala Thr Thr Ala Ala Ala Ala Cys Gly Gly
 5480 5485 5490

66270 B1

Thr Ala Ala Thr Ala Gly Ala Thr Thr Gly Ala Cys Ala Thr Thr
 5495 5500 5505
 Thr Gly Ala Thr Thr Cys Thr Ala Ala Thr Ala Ala Ala Thr Thr
 5510 5515 5520
 Gly Gly Ala Thr Thr Thr Thr Thr Gly Thr Cys Ala Cys Ala Cys
 5525 5530 5535
 Thr Ala Thr Thr Ala Thr Ala Thr Cys Gly Cys Thr Thr Gly Ala
 5540 5545 5550
 Ala Ala Thr Ala Cys Ala Ala Thr Thr Gly Thr Thr Thr Ala Ala
 5555 5560
 Cys Ala Thr Ala Ala Gly Thr Ala Cys Cys Thr Gly Thr Ala Gly
 5570 5575 5580
 Gly Ala Thr Cys Gly Thr Ala Cys Ala Gly Gly Thr Thr Thr Ala
 5585 5590 5595
 Cys Gly Cys Ala Ala Gly Ala Ala Ala Ala Thr Gly Gly Thr Thr
 5600 5605 5610
 Thr Gly Thr Thr Ala Thr Ala Gly Thr Cys Gly Ala Thr Thr Ala
 5615 5620 5625
 Ala Thr Cys Gly Ala Thr Thr Thr Gly Ala Thr Thr Cys Thr Ala
 5630 5635 5640
 Gly Ala Thr Thr Thr Gly Thr Thr Thr Thr Ala Ala Cys Thr Ala
 5645 5650 5655
 Ala Thr Thr Ala Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Ala Thr Ala
 5660 5665 5670
 Ala Cys Ala Thr Ala Thr Gly Ala Thr Cys Gly Cys Thr Cys Cys
 5675 5680 5685
 Ala Cys Cys Ala Thr Gly Cys Ala Cys Cys Ala Gly Thr Gly Ala
 5690 5695 5700
 Gly Ala Ala Gly Cys Ala Thr Thr Ala Thr Gly Ala Gly Cys Ala
 5705 5710 5715
 Thr Cys Thr Gly Gly Gly Ala Cys Gly Gly Thr Gly Cys Thr Gly
 5720 5725 5730
 Thr Ala Ala Cys Ala Ala Ala Thr Gly Thr Gly Ala Ala Cys Cys
 5735 5740 5745

66270 B1

Ala Gly Gly Ala Ala Ala Gly Thr Ala Cys Ala Thr Gly Thr Cys
5750 5755 5760

Thr Thr Cys Thr Ala Ala Ala Thr Gly Cys Ala Cys Thr Ala Cys
5765 5770 5775

Thr Ala Cys Cys Thr Cys Thr Gly Ala Cys Ala Gly Thr Gly Thr
5780 5785 5790

Ala Thr Gly Thr Cys Thr Gly Cys Cys Cys Thr Gly Thr Gly Gly
5795 5800 5805

Cys Cys Cys Gly Gly Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Cys Thr Thr
5810 5815 5820

Gly Gly Ala Thr Ala Gly Cys Thr Gly Gly Ala Ala Thr Gly Ala
5825 5830 5835

Ala Gly Ala Ala Gly Ala Thr Ala Ala Ala Thr Gly Cys Thr Thr
5840 5845 5850

Gly Cys Thr Gly Cys Ala Thr Ala Ala Ala Gly Thr Thr Thr Gly
5855 5860 5865

Thr Gly Ala Thr Ala Cys Ala Gly Gly Cys Ala Ala Gly Gly Cys
5870 5875 5880

Cys Cys Thr Gly Gly Thr Gly Gly Cys Cys Gly Thr Gly Gly Thr
5885 5890 5895

Cys Gly Cys Cys Gly Gly Cys Ala Ala Cys Ala Gly Thr Ala Cys
5900 5905 5910

Gly Ala Cys Cys Cys Cys Cys Cys Gly Gly Cys Gly Cys Thr Gly
5915 5920 5925

Cys Gly Cys Gly Thr Gly Cys Ala Cys Gly Gly Cys Thr Gly Gly
5930 5935 5940

Gly Thr Ala Cys Cys Ala Cys Thr Gly Gly Ala Gly Cys Cys Ala
5945 5950 5955

Gly Gly Ala Cys Thr Gly Cys Gly Ala Gly Thr Gly Cys Thr Gly
5960 5965 5970

Cys Cys Gly Cys Cys Gly Cys Ala Ala Cys Ala Cys Cys Gly Ala
5975 5980 5985

Gly Thr Gly Cys Gly Cys Gly Cys Cys Gly Gly Gly Cys Cys Thr
5990 5995 6000

66270 B1

Gly Gly Gly Cys Gly Cys Cys Cys Ala Gly Cys Ala Cys Cys Cys
 6005 6010 6015
 Gly Thr Thr Gly Cys Ala Gly Cys Thr Cys Ala Ala Cys Ala Ala
 6020 6025 6030
 Gly Gly Ala Cys Ala Cys Ala Gly Thr Gly Thr Gly Cys Ala Ala
 6035 6040 6045
 Ala Cys Cys Thr Thr Gly Cys Cys Thr Thr Gly Cys Ala Gly Gly
 6050 6055 6060
 Cys Thr Ala Cys Thr Thr Cys Thr Cys Thr Gly Ala Thr Gly Cys
 6065 6070 6075
 Cys Thr Thr Thr Thr Cys Cys Thr Cys Cys Ala Cys Gly Gly Ala
 6080 6085 6090
 Cys Ala Ala Ala Thr Gly Cys Ala Gly Ala Cys Cys Cys Thr Gly
 6095 6100 6105
 Gly Ala Cys Cys Ala Ala Cys Thr Gly Thr Ala Cys Cys Thr Thr
 6110 6115 6120
 Cys Cys Thr Thr Gly Gly Ala Ala Ala Gly Ala Gly Ala Gly Thr
 6125 6130 6135
 Ala Gly Ala Ala Cys Ala Thr Cys Ala Thr Gly Gly Gly Ala Cys
 6140 6145 6150
 Ala Gly Ala Gly Ala Ala Ala Thr Cys Cys Gly Ala Thr Gly Thr
 6155 6160 6165
 Gly Gly Thr Thr Thr Gly Cys Ala Gly Thr Thr Cys Thr Thr Cys
 6170 6175 6180
 Thr Cys Thr Gly Cys Cys Ala Gly Cys Thr Ala Gly Ala Ala Ala
 6185 6190 6195
 Ala Cys Cys Ala Cys Cys Ala Ala Ala Thr Gly Ala Ala Cys Cys
 6200 6205 6210
 Cys Cys Ala Thr Gly Thr Thr Thr Ala Cys Gly Thr Cys Gly Ala
 6215 6220 6225
 Cys Ala Ala Ala Ala Cys Thr Cys Ala Cys Ala Cys Ala Thr Gly
 6230 6235 6240
 Thr Cys Cys Ala Cys Cys Thr Thr Gly Thr Cys Cys Ala Gly Cys
 6245 6250 6255

66270 B1

A-743 PCT.ST25.txt

Thr Cys Cys Gly Gly Ala Ala Cys Thr Cys Cys Thr Gly Gly Gly
 6260 6265 6270
 Gly Gly Gly Ala Cys Cys Gly Thr Cys Ala Gly Thr Cys Thr Thr
 6275 6280 6285
 Cys Cys Thr Cys Thr Thr Cys Cys Cys Cys Cys Ala Ala Ala
 6290 6295 6300
 Ala Cys Cys Cys Ala Ala Gly Gly Ala Cys Ala Cys Cys Cys Thr
 6305 6310 6315
 Cys Ala Thr Gly Ala Thr Cys Thr Cys Cys Cys Gly Gly Ala Cys
 6320 6325 6330
 Cys Cys Cys Thr Gly Ala Gly Gly Thr Cys Ala Cys Ala Thr Gly
 6335 6340 6345
 Cys Gly Thr Gly Gly Thr Gly Gly Thr Gly Gly Ala Cys Gly Thr
 6350 6355 6360
 Gly Ala Cys Cys Ala Cys Gly Ala Ala Gly Ala Cys Cys Cys
 6365 6370 6375
 Thr Gly Ala Gly Gly Thr Cys Ala Ala Gly Thr Thr Cys Ala Ala
 6380 6385 6390
 Cys Thr Gly Gly Thr Ala Cys Gly Thr Gly Gly Ala Cys Gly Gly
 6395 6400 6405
 Cys Gly Thr Gly Gly Ala Gly Gly Thr Gly Cys Ala Thr Ala Ala
 6410 6415 6420
 Thr Gly Cys Cys Ala Ala Gly Ala Cys Ala Ala Ala Gly Cys Cys
 6425 6430 6435
 Gly Cys Gly Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Cys Ala Gly Thr Ala
 6440 6445 6450
 Cys Ala Ala Cys Ala Gly Cys Ala Cys Gly Thr Ala Cys Cys Gly
 6455 6460 6465
 Thr Gly Thr Gly Gly Thr Cys Ala Gly Cys Gly Thr Cys Cys Thr
 6470 6475 6480
 Cys Ala Cys Cys Gly Thr Cys Cys Thr Gly Cys Ala Cys Cys Ala
 6485 6490 6495
 Gly Gly Ala Cys Thr Gly Gly Cys Thr Gly Ala Ala Thr Gly Gly
 6500 6505 6510

66270 B1

Cys Ala Ala Gly Gly Ala Gly Thr Ala Cys Ala Ala Gly Thr Gly
 6514 6520 6525
 Cys Ala Ala Gly Gly Thr Cys Thr Cys Cys Ala Ala Cys Ala Ala
 6530 6535 6540
 Ala Gly Cys Cys Cys Thr Cys Cys Cys Ala Gly Cys Cys Cys Cys
 6545 6550 6555
 Cys Ala Thr Cys Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala Cys Cys Ala Thr
 6560 6565 6570
 Cys Thr Cys Cys Ala Ala Ala Gly Cys Cys Ala Ala Ala Gly Gly
 6575 6580 6585
 Gly Cys Ala Gly Cys Cys Cys Cys Gly Ala Gly Ala Ala Cys Cys
 6590 6595 6600
 Ala Cys Ala Gly Gly Thr Gly Thr Ala Cys Ala Cys Cys Cys Thr
 6605 6610 6615
 Gly Cys Cys Cys Cys Cys Ala Thr Cys Cys Cys Gly Gly Gly Ala
 6620 6625 6630
 Thr Gly Ala Gly Cys Thr Gly Ala Cys Cys Ala Ala Gly Ala Ala
 6635 6640 6645
 Cys Cys Ala Gly Gly Thr Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly Ala Cys
 6650 6655 6660
 Cys Thr Gly Cys Cys Thr Gly Gly Thr Cys Ala Ala Ala Gly Gly
 6665 6670 6675
 Cys Thr Thr Cys Thr Ala Thr Cys Cys Cys Ala Gly Cys Gly Ala
 6680 6685 6690
 Cys Ala Thr Cys Gly Cys Cys Gly Thr Gly Gly Ala Gly Thr Gly
 6695 6700 6705
 Gly Gly Ala Gly Ala Gly Cys Ala Ala Thr Gly Gly Gly Cys Ala
 6710 6715 6720
 Gly Cys Cys Gly Gly Ala Gly Ala Ala Cys Ala Ala Cys Thr Ala
 6725 6730 6735
 Cys Ala Ala Gly Ala Cys Cys Ala Cys Gly Cys Cys Thr Cys Cys
 6740 6745 6750
 Cys Gly Thr Gly Cys Thr Gly Gly Ala Cys Thr Cys Cys Gly Ala
 6755 6760 6765

66270 B1

A: 743 PPT-ST25.Lx1

Cys Gly Gly Cys Thr Cys Cys Thr Thr Cys Thr Thr Cys Cys Thr
 6770 6775 6780

Cys Thr Ala Cys Ala Gly Cys Ala Ala Gly Cys Thr Cys Ala Cys
 6785 6790 6795

Cys Gly Thr Gly Gly Ala Cys Ala Ala Gly Ala Gly Cys Ala Gly
 6800 6805 6810

Gly Thr Gly Gly Cys Ala Gly Cys Ala Gly Gly Gly Gly Ala Ala
 6815 6820 6825

Cys Gly Thr Cys Thr Thr Cys Thr Cys Ala Thr Gly Cys Thr Cys
 6830 6835 6840

Cys Gly Thr Gly Ala Thr Gly Cys Ala Thr Gly Ala Gly Gly Cys
 6845 6850 6855

Thr Cys Thr Gly Cys Ala Cys Ala Ala Cys Cys Ala Cys Thr Ala
 6860 6865 6870

Cys Ala Cys Gly Cys Ala Gly Ala Ala Gly Ala Gly Cys Cys Thr
 6875 6880 6885

Cys Thr Cys Cys Cys Thr Gly Thr Cys Thr Cys Cys Gly Gly Gly
 6890 6895 6900

Thr Ala Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Ala Thr Cys Cys Gly
 6905 6910 6915

Cys Gly Gly Ala Ala Ala Gly Ala Ala Gly Ala Ala Gly Ala Ala
 6920 6925 6930

Gly Ala Ala Gly Ala Ala Gly Ala Ala Ala Gly Cys Cys Cys Gly
 6935 6940 6945

Ala Ala Ala Gly Gly Ala Ala Gly Cys Thr Gly Ala Gly Thr Thr
 6950 6955 6960

Gly Gly Cys Thr Gly Cys Thr Gly Cys Cys Ala Cys Cys Gly Cys
 6965 6970 6975

Thr Gly Ala Gly Cys Ala Ala Thr Ala Ala Cys Thr Ala Gly Cys
 6980 6985 6990

Ala Thr Ala Ala Cys Cys Cys Cys Thr Thr Gly Gly Gly Gly Cys
 6995 7000 7005

Cys Thr Cys Thr Ala Ala Ala Cys Gly Gly Gly Thr Cys Thr Thr
 7010 7015 7020

66270 B1

Gly Ala	Gly Gly Gly Gly	Thr	Thr Thr Thr Thr	Thr	Gly Cys Thr
7025		7030		7035	
Gly Ala	Ala Ala Gly Gly	Ala	Gly Gly Ala Ala	Cys	Cys Gly Cys
7040		7045		7050	
Thr Cys	Thr Thr Cys Ala	Cys	Gly Cys Thr Cys	Thr	Thr Cys Ala
7055		7060		7065	
Cys Gly	Cys Gly Gly Ala	Thr	Ala Ala Ala Thr	Ala	Ala Gly Thr
7070		7075		7080	
Ala Ala	Cys Gly Ala Thr	Cys	Cys Gly Gly Thr	Cys	Cys Ala Gly
7085		7090		7095	
Thr Ala	Ala Thr Gly Ala	Cys	Cys Thr Cys Ala	Gly	Ala Ala Cys
7100		7105		7110	
Thr Cys	Cys Ala Thr Cys	Thr	Gly Gly Ala Thr	Thr	Thr Gly Thr
7115		7120		7125	
Thr Cys	Ala Gly Ala Ala	Cys	Gly Cys Thr Cys	Gly	Gly Thr Thr
7130		7135		7140	
Gly Cys	Cys Gly Cys Cys	Gly	Gly Gly Cys Gly	Thr	Thr Thr Thr
7145		7150		7155	
Thr Thr	Ala Thr Thr Gly	Gly	Thr Gly Ala Gly	Ala	Ala Thr Cys
7160		7165		7170	
Gly Cys	Ala Gly Cys Ala	Ala	Cys Thr Thr Gly	Thr	Cys Gly Cys
7175		7180		7185	
Gly Cys	Cys Ala Ala Thr	Cys	Gly Ala Gly Cys	Cys	Ala Thr Gly
7190		7195		7200	
Thr Cys	Gly Thr Cys Gly	Thr	Cys Ala Ala Cys	Gly	Ala Cys Cys
7205		7210		7215	
Cys Cys	Cys Cys Ala Thr	Thr	Cys Ala Ala Gly	Ala	Ala Cys Ala
7220		7225		7230	
Gly Cys	Ala Ala Gly Cys	Ala	Gly Cys Ala Thr	Thr	Gly Ala Gly
7235		7240		7245	
Ala Ala	Cys Thr Thr Thr	Gly	Gly Ala Ala Thr	Cys	Cys Ala Gly
7250		7255		7260	
Thr Cys	Cys Cys Thr Cys	Thr	Thr Cys Cys Ala	Cys	Cys Thr Gly
7265		7270		7275	

Cys Thr Gly Ala Cys Cys Gly
7280 7285

<210> 29
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Preferred TALL-1 Modulating Domains

<400> 29

Pro Gly Thr Cys Phe Pro Phe Pro Trp Glu Cys Thr His Ala
1 5 10

<210> 30
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Preferred TALL-1 Modulating Domains

<400> 30

Trp Gly Ala Cys Trp Pro Phe Phe Trp Glu Cys Phe Lys Glu
5 10

<210> 31
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Preferred TALL-1 Modulating Domains

<400> 31

Val Pro Phe Cys Asp Leu Leu Thr Lys His Cys Phe Glu Ala
1 5 10

<210> 32
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Preferred TALL-1 Modulating Domains

<400> 32

Gly Ser Arg Cys Lys Tyr Lys Trp Asp Val Leu Thr Lys Glu Cys Phe
1 5 10 15

His His

<210> 33
<211> 18
<212> PRT

66270 B1

A-743 PRT.SU25.txt

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Preferred TALL-1 Modulating Domains

<400> 33

Leu	Pro	Gly	Cys	Lys	Trp	Asp	Leu	Leu	Ile	Lys	Gln	Trp	Val	Cys	Asp
1				5					10					15	

Pro Leu

<210> 34

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Preferred TALL-1 Modulating Domains

<400> 34

Ser	Ala	Asp	Cys	Cys	Phe	Asp	Ile	Leu	Thr	Lys	Ser	Asp	Val	Cys	Thr
1				5					10					15	

Ser Ser

<210> 35

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Preferred TALL-1 Modulating Domains

<400> 35

Ser	Asp	Asp	Cys	Met	Tyr	Asp	Gln	Leu	Thr	Arg	Met	Phe	Ile	Cys	Ser
1				5					10					15	

Asn Leu

<210> 36

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Preferred TALL-1 Modulating Domains

<400> 36

Asp	Leu	Asn	Cys	Lys	Tyr	Asp	Glu	Leu	Thr	Tyr	Lys	Glu	Trp	Cys	Gln
1				5					10					15	

Phe Asn

66270 B1

A-743 PC01,8725.txt

<210> 37
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Preferred TALL-1 Modulating Domains
<400> 37

Phe His Asp Cys Lys Tyr Asp Leu Leu Thr Arg Gln Met Val Cys His
1 5 10 15

Gly Leu

<210> 38
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Preferred TALL-1 Modulating Domains
<400> 39

Arg Asn His Cys Phe Trp Asp His Leu Leu Lys Gln Asp Ile Cys Pro
1 5 10 15

Ser Pro

<210> 39
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Preferred TALL-1 Modulating Domains
<400> 39

Ala Asn Gln Cys Trp Trp Asp Ser Leu Thr Lys Lys Asn Val Cys Glu
1 5 10 15

Pro Phe

<210> 40
<211> 8
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Polyglycine linkers

<400> 40
gggkgggg

<210> 41

66270 B1

A-743 PCT.STR5.txt

<211> 8
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Polyglycine linkers

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> N is Asparagine

<400> 41
gggnqsgg

3

<210> 42
<211> 8
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Polyglycine linkers

<400> 42
gggctggg

8

<210> 43
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Polyglycine linkers

<400> 43

Gly Pro Asn Gly Gly
1 5

<210> 44
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Peptide Bond

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(19)
<223> Xaa = a peptide bond
Fc domain attached at Position 19 to C-terminus

<400> 44

Leu Pro Gly Cys Lys Trp Asp Leu Leu Ile Lys Gln Trp Val Cys Asp
1 5 10 15

Pro Leu Xaa

66270 B1

A-743 PCT.ST25.txt

<210> 45
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Peptide bond

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa = a peptide bond
 Fc domain attached at Position 1 to N-terminus

<400> 45

Xaa Leu Pro Gly Cys Lys Trp Asp Leu Leu Ile Lys Gln Trp Val Cys
 1 5 10 15

Asp Pro Leu

<210> 46
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Peptide bond

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (38)..(38)
 <223> Xaa = a peptide bond
 Fc domain attached at Position 38 to C-terminus

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> Xaa = a peptide bond

<400> 46

Leu Pro Gly Cys Lys Trp Asp Leu Leu Ile Lys Gln Trp Val Cys Asp
 1 5 10 15

Pro Leu Xaa Leu Pro Gly Cys Lys Trp Asp Leu Leu Ile Lys Gln Trp
 20 25 30

Val Cys Asp Pro Leu Xaa
 35

<210> 47
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Peptide bond

66270 B1

A-243 P07.8725.txt

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Xaa = a peptide bond
 Fc domain attached at Position 1 to N-terminus

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(20)
 <223> Xaa = a peptide bond

<400> 47

Xaa Leu Pro Gly Cys Lys Trp Asp Leu Leu Ile Lys Gln Trp Val Cys
 1 5 10 15

Asp Pro Leu Xaa Leu Pro Gly Cys Lys Trp Asp Leu Leu Ile Lys Gln
 20 25 30

Trp Val Cys Asp Pro Leu
 35

<210> 48
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Peptide bond

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> Xaa = a peptide bond
 Fc domain attached at Position 19 to C-terminus

<400> 48

Ser Ala Asp Cys Tyr Phe Asp Ile Leu Thr Lys Ser Asp Val Cys Thr
 1 5 10 15

Ser Ser Xaa

<210> 49
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Peptide bond

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa = a peptide bond
 Fc domain attached at Position 1 to N-terminus

<400> 49

Page 48

66270 B1

A743 PCT ST25.Lxt

Xaa Ser Ala Asp Cys Tyr Phe Asp Ile Leu Thr Lys Ser Asp Val Cys
 1 5 10 15

Thr Ser Ser

<210> 50
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Peptide bond

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (36)..(36)
 <223> Xaa = a peptide bond
 Fc domain attached at Position 36 to C-terminus

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> Xaa = a peptide bond

<400> 50

Ser Ala Asp Cys Tyr Phe Asp Ile Leu Thr Lys Ser Asp Val Thr Ser
 1 5 10 15

Ser Xaa Ser Ala Asp Cys Tyr Phe Asp Ile Leu Thr Lys Ser Asp Val
 20 25 30

Thr Ser Ser Xaa
 35

<210> 51
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Peptide bond

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa = a peptide bond
 Fc domain attached at Position 1 to N-terminus

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> Xaa = a peptide bond

<400> 51

Xaa Ser Ala Asp Cys Tyr Phe Asp Ile Leu Thr Lys Ser Asp Val Thr
 Page 49

66270 B1

A-743 PCT.ST25.txt

1	5	10	15
Ser Ser Xaa Ser Ala Asp Cys Tyr Phe Asp Ile Leu Thr Lys Ser Asp			
	20	25	30

Val Thr Ser Ser
35

<210> 52
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Peptide bond

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> Xaa = a peptide bond
 Pe domain attached at Position 19 to C-terminus

<400> 52

Phe His Asp Cys Lys Trp Asp Leu Leu Thr Lys Gln Trp Val Cys His
1 5 10 15

Gly Leu Xaa

<210> 53
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Peptide bond

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa = a peptide bond
 Pe domain attached at Position 1 to N-terminus

<400> 53

Xaa Phe His Asp Cys Lys Trp Asp Leu Leu Thr Lys Gln Trp Val Cys
1 5 10 15

His Gly Leu

<210> 54
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Peptide bond

66270 B1

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> Xaa = a peptide bond

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (38)..(38)
 <223> Xaa = a peptide bond
 Fc domain attached at Position 38 to C-terminus

<400> 54

Phe His Asp Cys Lys Trp Asp Leu Leu Thr Lys Gln Trp Val Cys His
 1 5 10 15

Gly Leu Xaa Phe His Asp Cys Lys Trp Asp Leu Leu Thr Lys Gln Trp
 20 25 30

Val Cys His Gly Leu Xaa
 35

<210> 55
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Peptide bond

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa = a peptide bond
 Fc domain attached at Position 1 to N-terminus

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(20)
 <223> Xaa = a peptide bond

<400> 55

Xaa Phe His Asp Cys Lys Trp Asp Leu Leu Thr Lys Gln Trp Val Cys
 1 5 10 15

His Gly Leu Xaa Phe His Asp Cys Lys Trp Asp Leu Leu Thr Lys Gln
 20 25 30

Trp Val Cys His Gly Leu
 35

<210> 56
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

66270 B1

<220>
 <223> Oligonucleotide
 <400> 56
 cggcgcaact atcggtatca agctg 25

<210> 57
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Oligonucleotide
 <400> 57
 catgtaccgt aacactgagt ttcgtc 26

<210> 58
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Consensus peptide

<400> 58
 Phe His Asp Cys Lys Trp Asp Leu Leu Thr Lys Gln Trp Val Cys His
 1 5 10 15

Gly Leu

<210> 59
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Preferred linker sequence

<400> 59
 Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Ala Ser Ser Gly
 1 5 10 15

Ser Gly Ser Ala Thr His Met
 20

<210> 60
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 60
 Asn Gln Thr Leu Trp Lys Trp Asp Leu Leu Thr Lys Gln Phe Ile Thr
 1 5 10 15

66270 B1

A-143 PCT.ST25.txt

Tyr Met

<210> 61
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 61

Pro Val Tyr Gln Gly Trp Trp Asp Thr Leu Thr Lys Leu Tyr Ile Trp
1 5 10 15

Asp Gly

<210> 62
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 62

Trp Leu Asp Gly Gly Trp Arg Asp Pro Leu Ile Lys Arg Ser Val Gln
1 5 10 15

Leu Gly

<210> 63
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 63

Gly His Gln Gln Phe Lys Trp Asp Leu Leu Thr Lys Gln Trp Val Gln
1 5 10 15

Ser Asn

<210> 64
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 64

66270 B1

Gln Arg Val Gly Gln Phe Trp Asp Val Leu Thr Lys Met Phe Ile Thr
1 5 10 15

Gly Ser

<210> 65
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 65

Gln Ala Gln Gly Trp Ser Tyr Asp Ala Leu Ile Lys Thr Trp Ile Arg
1 5 10 15

Trp Pro

<210> 66
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 66

Gly Trp Met His Trp Lys Trp Asp Pro Leu Thr Lys Gln Ala Leu Pro
1 5 10 15

Trp Met

<210> 67
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 67

Gly His Pro Thr Tyr Lys Trp Asp Leu Leu Thr Lys Gln Trp Ile Leu
1 5 10 15

Gln Met

<210> 68
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

66270 B1

A-743 PCT.ST25.txt

<220>

<223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 68

Trp Asn Asn Trp Ser Leu Trp Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Gln
1 5 10 15

Gln Asn

<210> 69

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 69

Trp Gln Trp Gly Trp Lys Trp Asp Leu Leu Thr Lys Gln Trp Val Gln
1 5 10 15

Gln Gln

<210> 70

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 70

Gly Gln Met Gly Trp Arg Trp Asp Pro Leu Thr Lys Met Trp Leu Gly
1 5 10 15

Thr Ser

<210> 71

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotides

<400> 71

tatgccgggt acttgtttcc cgttcccgtg ggaatgcact cacgctggtg gagggcgggtgg 60

gg

62

<210> 72

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

66270 B1

A-743 PCT.ST25.txt

```

<220>
<223> Oligonucleotides

<400> 72
tcgacccac cgctcctgg agcgtgagtg cattcccacg ggaagccgaa acaagtaccc 60
ggca 64

<210> 73
<211> 62
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotides

<400> 73
tatgtggggg gcttggtggc cgttcccgtg ggaatgtttc aaagaagggtg gaggcggtgg 60
gg 62

<210> 74
<211> 64
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotides

<400> 74
tcgacccac cgctccacc ttctttgaaa cattcccacg ggaacggcca acaagcacc 60
caca 64

<210> 75
<211> 62
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotides

<400> 75
tatggttccg ttctgtgacc tgctgactaa acactgtttc gaagctgggtg gaggcggtgg 60
gg 62

<210> 76
<211> 64
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotides

<400> 76
tcgacccac cgctccacc agcttcgaaa cagtgtttag tcagcaggtc acagaacgga 60
acca 64

<210> 77
<211> 74
<212> DNA

```

66270 B1

A-143 FOR SIZING

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotides

<400> 77
tatgggttct cgttgtaa at acaa atggga cgttctgact aaacagtgtt tccaccacgg 60
tggaggcggt gggg 74

<210> 78
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotides

<400> 78
tcgacccac cgcctccacc gtggtggaaa cactgtttag tcagaacgtc ccatttgtat 60
ttacaacgag aacca 76

<210> 79
<211> 74
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotides

<400> 79
tatgctgccg ggttgtaa at gggacctgct gatcaaacag tgggtttgtg acccgctggg 60
tggaggcggt gggg 74

<210> 80
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotides

<400> 80
cgacccac cgcctccacc cagcgggtca caaacccact gtttgatcag cagggtccat 60
ttacaacccg gcagca 76

<210> 81
<211> 74
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotides

<400> 81
tatgtctgct gactgttact tcgacatcct gactaaatct gacgtttgta cttcttctgg 60
tggaggcggt gggg 74

<210> 82

66270 B1

```

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

<220>
<223> Oligonucleotides

<400> 82
tcgacccac cgctccacc agaagaagta caaacgtcag atttagtcag gatgtcgaag 60
taacagtcag cagaca 76

<210> 83
<211> 74
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotides

<400> 83
tatgtctgac gactgtatgt acgaccagct gactcgtatg ttcattctgtt ctaacctggg 60
tggaggcggt gggg 74

<210> 84
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotides

<400> 84
tcgacccac cgctccacc caggtagaa cagatgaaca tacgagtcag ctggtcgtac 60
atacagtcgt cagaca 76

<210> 85
<211> 74
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotides

<400> 85
tatggacctg aactgtaaat acgacgaact gacttacaaa gaatgggtgtc agttcaacgg 60
tggaggcggt gggg 74

<210> 86
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotides

<400> 86
tcgacccac cgctccacc gttgaactga caccattctt tgtaagtcag ttcgtcgtat 60
ttacagttca ggtcca 76

```

66270 B1

<210> 87
 <211> 74
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotides

<400> 87
 tatgttccac gactgtaaat acgacctgct gactcgtcag atggtttgct acggtctggg 60
 tggaggcggt gggg 74

<210> 88
 <211> 76
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotides

<400> 88
 tcgacccac cgctccacc cagaccgtga caaacctct gacgagtcag caggctctat 60
 ttacagtcgt ggaaca 76

<210> 89
 <211> 74
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotides

<400> 89
 tatgctaac cactgtttct gggaccacct gctgaaacag gacatctgtc cgtctccggg 60
 tggaggcggt gggg 74

<210> 90
 <211> 76
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotides

<400> 90
 tcgacccac cgctccacc cggagacgga cagatgtcct gtttcagcag gtgggtccag 60
 aaacagtggg tacgca 76

<210> 91
 <211> 74
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotides

<400> 91
 tatggctaac cagtgttggt gggactctct gctgaaaaaa aacgtttgtg aattcttcgg 60

66270 B1

tgaggggggg gggg 74

<210> 92
 <211> 76
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotides

<400> 92
 tcgacccac cgctccacc gaagaattca caaacgtttt ttttcagcag agagtccac 60
 caacactggt tagcca 76

<210> 93
 <211> 74
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotides

<400> 93
 tatgttccac gactgcaaat gggacctgct gaccaaacag tgggtttgcc acggtctggg 60
 tggaggcggt gggg 74

<210> 94
 <211> 76
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotides

<400> 94
 tcgacccac cgctccacc cagacctgg caaacccact gtttggtcag caggtccat 60
 ttgcagtcgt ggaaca 76

<210> 95
 <211> 141
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> pAMG21-RANK-Fc vector

<400> 95
 ctaattccgc tctcacctac caaacaatgc cccctgcaa aaaataaatt catataaaaa 60
 acatacagat aaccatctgc ggtgataaat tatctctggc ggtgttgaca taaataccac 120
 tggcggtgat actgagcaca t 141

<210> 96
 <211> 55
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> pAMG21-RANK-Fc vector

66270 B1

<400> 96
cgatttgatt ctagaaggag gaataacata tgggtaacgc gttggaattc ggtac 55

<210> 97
<211> 1546
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pAMG21

<400> 97
gcgtaacgta tgcattggtct ccccatgcga gagtagggaa ctgccaggca tcaataaaaa 60
cgaaaggctc agtcgaaaga ctgggccttt cgttttatct gttgtttgtc ggtgaacgct 120
ctcctgagta ggacaaatcc gccgggagcg gatttgaacg ttgcgaagca acggcccggg 180
gggtggcggg caggacgccc gccataaact gccaggcatc aaattaagca gaaggccatc 240
ctgacgggatg gcctttttgc gtttctacaa actcttttgc ttatttttct aaatacatc 300
aaatatggac gtcgtactta acttttaaaag tatgggcaat caattgctcc tgttaaaatt 360
gcttttagaaa tactttggca gcggtttggt gtattgagtt tcatttgccg attggttaaa 420
tggaagtga ccgtgcgctt actacagcct aatatttttg aaatatccca agagcttttt 480
ccttcgcatg cccacgctaa acattctttt tctcttttgg ttaaactcgt gtttgattta 540
ttatttgcta tattttattt tcgataatta tcaactagag aaggaacaat taatgggatg 600
ttcatacag catgtaaaaa taaactatct atatagttgt ctttctctga atgtgcaaaa 660
ctaagcattc cgaagccatt attagcagta tgaatagga aactaaacc agtgataaga 720
cctgatgatt tcgcttcttt aattacattt ggagattttt tatttacagc attgttttca 780
aatatatcc aattaatcgg tgaatgattg gagttagaat aatctactat aggatcatat 840
tttattaaat tagcgtcatc ataattattgc ctccattttt tagggtaatt atccagaatt 900
gaaatatcag atttaaccat agaattgagga taaatgatcg cgagtaaata atattcacia 960
tgtaccattt tagtcatatc agataagcat tgattaatat cattattgct tctacaggct 1020
_ taattttat taattattct gtaagtgtcg tcggcattta tgtctttcat acccatctct 1080
tctatccttac ctattgtttg tcgcaagttt tgcgtgttat atatcattaa aacggtaata 1140
gattgacatt tgatttctaat aaattggatt tttgtcacac tatttatcgc cttgaaatac 1200
aattgtttta cataagtacc tgtaggatcg tacaggttta cgcaagaaaa tggtttgta 1260
tagtcgatta atcgatttga ttctagattt gttttaacta attaaaggag gaataacata 1320
tgggtaacgc gttggaattc gagctcacta gtgtcgacct gcagggtacc atggaagctt 1380
actcaggat ccgcggaaag aagaagaaga agaagaaagc ccgaaaggaa gctgagttgg 1440
ctgctgccac cgctgagcaa taactagcat aacccttgg ggctctaaa cgggtcttga 1500
ggggtttttt gctgaaagga ggaaccgctc ttcacgctct tcacgc 1546

<210> 98

66270 B1

<211> 873
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> GM221

<400> 98
ttatttttctg ggggcccgcac cattatcacc gccagaggta aactagtcaa cacgcacggg 60
gttagatatt tatcccttgc ggtgatagat tgagcacatc gatttgattc tagaaggagg 120
gataatatat gagcacaaaa aagaaacccat taacacaaga gcagcttgag gacgcacgtc 180
gccttaaagc aatttatgaa aaaaagaaaa atgaacttgg cttatcccag gaatctgtcg 240
cagacaagat ggggatgggg cagtcaggcg ttggtgcttt atttaatggc atcaatgcat 300
taaatgctta taacgccgca ttgcttacaa aaattctcaa agttagcgtt gaagaattta 360
gcccttcaat cgccagagaa tctacgagat gtatgaagcg gttagtatgc agccgtcact 420
tagaagttag tatgagtacc ctgttttttc tcatgttcag gcagggatgt tctcacctaa 480
gcttagaacc tttaccaaag gtgatgcgga gagatgggta agcacaacca aaaaagccag 540
tgattctgca ttctggcttg aggttgaagg taattccatg accgcaccaa caggctccaa 600
gccaagcttt cctgacggaa tgtaattct cgttgaccct gagcaggctg ttgagccagg 660
tgatttctgc atagccagac ttgggggtga tgagtttacc ttcaagaaac tgatcaggga 720
tagcggtcag gtgttttttac aaccactaaa cccacagtac ccaatgatcc catgcaatga 780
gagttgttcc gttgtgggga aagttatcgc tagtcagtgg cctgaagaga cgtttggctg 840
atagactagt ggatccacta gtgtttctgc cc 872

<210> 99
<211> 1197
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> GM221

<400> 99
ggcggaaacc gacgtccatc gaatgggtgca aaacctttcg cggtatggca tgatagcgcc 60
cggaagagag tcaattcagg gtggtgaatg tgaaaccagt aacgttatac gatgtcgcag 120
agtatgccgg tgtctcttat cagaccgttt cccgcgtggg gaaccaggcc agccacgttt 180
ctgcgaaaac gcgggaaaaa gtcgaagcgg cgatggcgga gctgaattac attcccaacc 240
gcgtggcaca acaactggcg ggcaaacagt cgctcctgat tggcgttgcc acctccagtc 300
tggccctgca cgcgccgtcg caaattgtcg cggcgattaa atctcgcgcc gatcaactgg 360
gtgccagcgt ggtggtgtcg atggtagaac gaagcggcgt cgaagcctgt aaagcggcgg 420
tgcacaatct tctcgcgcaa cgcgtcagtg ggctgatcat taactatccg ctggatgacc 480
aggatgccat tgctgtggaa gctgcctgca ctaatgttcc ggcgttattt cttgatgtct 540
ctgaccagac acccatcaac agtattattt tctcccatga agacggtacg cgactgggcg 600

<210> 100
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Modulators of TALL-1

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1, 2, 3, 13)..(14)
 <223> Xaa (Pos1,2,3,13,14) are each independently absent or amino acid residues;

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa (Pos6) is an amino acid residue;

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa (Pos8) is threonyl or isoleucyl;

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa (Pos 9) is a basic or hydrophobic residue;

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa (Pos 10) is an amino acid residue;

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa (Pos12) is a neutral hydrophobic residue.

<400> 100

Xaa Xaa Xaa Cys Asp Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa
 1 5 10

<210> 101
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Modulators of TALL-1

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1, 2, 3, 12 and)..(13)
 <223> xaa (Pos1,2,3,12,13) are each independently absent or amino acid residues;

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5 and)..(8)
 <223> xaa (Pos5,8) is a neutral hydrophobic residue;

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa (Pos10) is an acidic residue;

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa (Pos14) is absent or is an amino acid residue.

<400> 101
 xaa xaa xaa cys xaa pro phe xaa trp xaa cys xaa xaa xaa
 1 5 10

<210> 102
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Modulator of TALL-1

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1, 2, 3, 12, 13 and)..(14)
 <223> xaa (Pos1,2,3,12,13,14) are each independently absent or amino acid residues;

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6 and)..(7)
 <223> xaa (Pos6,7) is a hydrophobic residue;

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa (Pos10) is an acidic or polar hydrophobic residue.

<400> 102
 xaa xaa xaa cys trp xaa xaa trp gly xaa cys xaa xaa xaa
 1 5 10

<210> 103
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Modulator of TALL-1

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa (Pos1) is absent or is an amino acid residue;

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2 and)..(14)
 <223> Xaa (Pos2,14) is a neutral hydrophobic residue;

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3 and)..(10)
 <223> Xaa (Pos3,10) is an amino acid residue;

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5, 6, 7, 8, 12 and)..(13)
 <223> Xaa (Pos5,6,7,8,12,13) are each independently amino acid residues;

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa (Pos9) is an acidic residue.

<400> 103
 Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa
 1 5 10

<210> 104
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Modulator of TALL-1.

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1, 2, 12, 13, 16, 17 and)..(18)
 <223> Xaa (Pos1,2,12,13,16,17,18) are each independently absent or amino acid residues;

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa (Pos3) is an acidic or amide residue;

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5 and)..(8)
 <223> Xaa (Pos5,8) is an amino acid residue;

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa (Pos6) is an aromatic residue;

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa (Pos 10) is R or I;

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa (Pos11) is a basic residue;

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa (Pos14) is a neutral hydrophobic residue.

<400> 104

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Asp Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa
 1 5 10 15

Xaa Xaa

<210> 105
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Modulator of TALL-1

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1, 2 and)..(3)
 <223> Xaa (Pos1,2,3) are each independently absent or amino acid residues;

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5, 7, 14 and)..(16)
 <223> Xaa (Pos5,7,14,16) is an amino acid residue;

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa (Pos 9) is T or I;

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa (Pos10) is a basic residue;

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11 and)..(12)
 <223> Xaa (Pos11,12) are each independently amino acid residues;

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13 and)..(17)
 <223> Xaa (Pos13,17) is a neutral hydrophobic residue;

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> Xaa (Pos18) is an amino acid residue or is absent.

<400> 105

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Asp Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa

1 5 10 15

Xaa Xaa

<210> 106
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Modulator of TALL-1

<220>
<221> misc_feature
<222> (1, 2, 3, 16, 17 and)..(18)
<223> xaa (Pos1,2,3,16,17,18) are each independently absent or amino acid residues;

<220>
<221> misc_feature
<222> (5, 6, 7, 10 and)..(14)
<223> xaa (Pos5,6,7,10,14) are each independently amino acid residues.

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> Xaa (Pos 12) is T or I;

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> Xaa (Pos 13) is an amino acid residue;

<400> 106

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Trp Asp Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Cys Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa

<210> 107
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Modulator of TALL-1

<220>
<221> misc_feature
<222> (1,2,3,15,16,17)..(18)
<223> xaa (Pos1,2,3,15,16,17,18) are each independently absent or amino acid residues;

<220>
<221> misc_feature
<222> (5, 6, 7, 9 and)..(13)
<223> xaa (Pos 5,6,7,9 13) are each independently amino acid residues;

<220>

<221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa (Pos 11) is T or I; and

<400> 107

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Leu Xaa Lys Xaa Cys Xaa Xaa
 1 5 10 15

Xaa Xaa

<210> 108
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Modulator of TALL-1

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> X at (Pos 2) is an amino acid residue

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> X at (Pos 4) is threonyl or isoleucyl

<400> 108

Asp Xaa Leu Xaa
 1

<210> 109
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Modulator of TALL-1

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1, 2 and)..(3)
 <223> X at (Pos 1, 2, 3) are absent or are amino acid residues (with
 one of X1, X2, and X3 preferred to be C when one of X12,
 X13, and X14 is C);

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> X at (Pos 5) is W, Y, or F (W preferred);

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> X at (Pos 7) is an amino acid residue (L preferred);

<220>
 <221> misc_feature

<222> (9)..(9)
 <223> X at (Pos 9) is T or I (T preferred);

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> X at (Pos 10) is K, R, or H (K preferred).

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> X at (Pos 12) is C, a neutral hydrophobic residue, or a basic
 residue (W, C, or R preferred);

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> X at (Post 13) is C, a neutral hydrophobic residue or is absent
 (V preferred);

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> X at (Pos 14) is any amino acid residue or is absent.

<400> 109

Xaa Xaa Xaa Lys Xaa Asp Xaa Leu Xaa Xaa Gln Xaa Xaa Xaa
 1 5 10

66270 B1

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
50 55 60

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
65 70 75 80

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Glu
85 90 95

Pyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Glu
100 105 110

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
115 120 125

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Glu Pro
130 135 140

Arg Glu Pro Glu Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
145 150 155 160

Lys Asn Glu Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
165 170 175

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Glu Pro Glu Asn Asn Tyr
180 185 190

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
195 200 205

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Glu Glu Gly Asn Val Phe
210 215 220

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Glu Lys
225 230 235 240

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
245

<210> 112

<211> 248

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TALL-1 inhibitory peptibodies

<400> 112

Met Trp Gly Ala Cys Trp Pro Phe Pro Trp Glu Cys Phe Lys Glu Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Val Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
Page 70

66270 B1

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

```
<210> 113
<211> 248
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> TALL-1 inhibitory peptibodies

<400> 113
```

66270 B1

Met Val Pro Phe Cys Asp Leu Leu Thr Lys His Cys Phe Glu Ala Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Val Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
20 25 30

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
35 40 45

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
50 55 60

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
65 70 75 80

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
85 90 95

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Glu
100 105 110

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
115 120 125

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
130 135 140

Arg Glu Pro Glu Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
145 150 155 160

Lys Asn Glu Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
165 170 175

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
180 185 190

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
195 200 205

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
210 215 220

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
225 230 235 240

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
245

<210> 114
<211> 252
<212> PRT

66270 B1

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CALL-1 inhibitory peptides

<400> 114

Met Gly Ser Arg Cys Lys Tyr Lys Trp Asp Val Leu Thr Lys Glu Cys
1 5 10 15

Phe His His Gly Gly Gly Gly Gly Val Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
20 25 30

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Pro
35 40 45

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
50 55 60

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Tyr Phe
65 70 75 80

Val Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
85 90 95

Arg Glu Glu Glu Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
100 105 110

Val Leu His Glu Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
115 120 125

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
130 135 140

Lys Gly Glu Pro Arg Glu Pro Glu Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
145 150 155 160

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Glu Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
165 170 175

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Glu Pro
180 185 190

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
195 200 205

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Glu Glu
210 215 220

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
225 230 235 240

Tyr Thr Glu Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

Page 73

66270 B1

245

250

<210> 115
 <211> 252
 <212> FRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> TAIL-1 inhibitory peptidomimetics

<400> 115

Met Leu Pro Gly Cys Lys Trp Asp Leu Leu Ile Lys Gln Trp Val Cys
 1 5 10 15

Asp Pro Leu Gly Gly Gly Gly Val Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 20 25 30

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 35 40 45

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 50 55 60

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 65 70 75 80

Asn Thr Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 85 90 95

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 100 105 110

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 115 120 125

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Phe Ser Lys Ala
 130 135 140

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 145 150 155 160

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 165 170 175

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 180 185 190

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 195 200 205

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 210 215 220

66270 B1

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
235 230 235 240

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
245 250

<210> 116
<211> 257
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> TAIL 1 inhibitory peptibodies

<400> 116

Met Ser Ala Asp Cys Cys Phe Asp Val Leu Thr Lys Ser Asp Val Cys
1 5 10 15

Thr Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
20 25 30

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
35 40 45

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
50 55 60

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
65 70 75 80

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
85 90 95

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
100 105 110

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
115 120 125

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
130 135 140

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
145 150 155 160

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
165 170 175

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
180 185 190

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
Page 75

66270 B1

195

200

205

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
210 215 220

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
225 230 235 240

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
245 250

<210> 117

<211> 252

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> TALL-1 i-inhibitory peptides

<400> 117

Met Ser Asp Asp Cys Met Tyr Asp Gln Leu Thr Arg Met Phe Ile Cys
1 5 10 15

Ser Asn Leu Gly Gly Gly Gly Val Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
20 25 30

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
35 40 45

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
50 55 60

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
65 70 75 80

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
85 90 95

Arg Gln Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
100 105 110

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
115 120 125

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
130 135 140

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
145 150 155 160

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
165 170 175

66270 B1

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
180 198 190

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
195 200 205

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
210 215 220

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
225 230 235 240

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
245 250

<210> 118
<211> 252
<212> FRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> TALL-1 inhibitory peptibodies

<400> 118

Met Asp Leu Asn Cys Lys Tyr Asp Glu Leu Thr Tyr Lys Glu Trp Cys
1 5 10 15

Gln Phe Asn Gly Gly Gly Gly Gly Val Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
20 25 30

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
35 40 45

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
50 55 60

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Gln Val Lys Phe
65 70 75 80

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
85 90 95

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
100 105 110

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
115 120 125

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
130 135 140

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
Page 77

66270 B1

```

145              150              155              160
Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
      165              170              175
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Gln Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
      180              185              190
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
      195              200              205
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
      210              215              220
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
      225              230              235              240
Tyr Thr Glu Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      245              250
<210> 119
<211> 252
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> TAIL-1 inhibitory peptibodies
<400> 119
Met Phe His Asp Cys Lys Tyr Asp Leu Leu Thr Arg Gln Met Val Cys
1      5      10      15
His Gly Leu Gly Gly Gly Gly Gly Val Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
      20      25      30
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
      35      40      45
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
      50      55      60
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
      65      70      75      80
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
      85      90      95
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
      100      105      110
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
      115      120      125

```

66270 B1

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
120 133 140

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
145 150 155 160

Asp Gln Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
165 170 175

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
180 185 190

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
195 200 205

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
210 215 220

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
225 230 235 240

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
245 250

<210> 120

<211> 252

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TALL-1 inhibitory peptibodies

<400> 120

Met Arg Asn His Cys Phe Trp Asp His Leu Leu Lys Gln Asp Ile Cys
1 5 10 15

Pro Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Val Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
20 25 30

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
35 40 45

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
50 55 60

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
65 70 75 80

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
85 90 95

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
Page 29

66270 B1

100 105 110
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 115 120 125
 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Gln Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 130 135 140
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 145 150 155 160
 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 165 170 175
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 180 185 190
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 195 200 205
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 210 215 220
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 225 230 235 240
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 245 250

 <210> 121
 <211> 252
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> TALL-1 inhibitory peptidobodies

 <400> 121
 Met Ala Asn Gln Cys Trp Trp Asp Ser Leu Thr Lys Lys Asn Val Cys
 1 5 10
 Glu Phe Phe Gly Gly Gly Gly Gly Val Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 20 25 30
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 35 40 45
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 50 55 60
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 65 70 75 80

66270 B1

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
85 90 95

Arg Glu Glu Cln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
100 105 110

Val Leu His Glu Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
115 120 125

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
130 135 140

Lys Gly Cln Pro Arg Glu Pro Glu Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
145 150 155 160

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Glu Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
165 170 175

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Cln Pro
180 185 190

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
195 200 205

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Cln Cln
210 215 220

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
225 230 235 240

Tyr Thr Glu Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
245 250

<210> 122
<211> 252
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<20>
<223> TALL-1 inhibitory peptibodies

<400> 122

Met Phe His Asp Cys Lys Trp Asp Leu Leu Thr Lys Glu Trp Val Cys
1 5 10 15

His Gly Leu Gly Gly Gly Gly Gly Val Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
20 25 30

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
35 40 45

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
Page 81

66270 B1

Thr 65	Cys	Val	Val	Val	Asp 70	Val	Ser	His	Glu	Asp 75	Pro	Glu	Val	Lys	Phe 80
Asn	Trp	Tyr	Val	Asp 85	Gly	Val	Gln	Val	His 90	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys 95	Pro
Arg	Gln	Glu	Gln 100	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr 105	Arg	Val	Val	Ser	Val 110	Leu	Thr
Val	Leu	His 115	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn 120	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys 125	Cys	Lys	Val
Ser	Asn 130	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala 135	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr 140	Ile	Ser	Lys	Ala
Lys 145	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu 150	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr 155	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg 160
Asp	Glu	Leu	Thr	Lys 165	Asn	Gln	Val	Ser	Leu 170	Thr	Cys	Leu	Val	Ile 175	Gly
Phe	Tyr	Pro	Ser 180	Asp	Ile	Ala	Val	Glu 185	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly 190	Gln	Pro
Glu	Asn 195	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro 200	Pro	Val	Leu	Asp	Ser 205	Asp	Gly	Ser
Phe 210	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu 215	Thr	Val	Asp	Lys	Ser 220	Arg	Trp	Gln	Gln
Gly 225	Asn	Val	Phe	Ser	Cys 230	Ser	Val	Met	His	Glu 235	Ala	Leu	His	Asn	His 240
Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser 245	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro 250	Gly	Lys				

```
<210> 123
<211> 293
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> TALL-1 inhibitory peptibodies

<400> 123
```

Met Leu Pro Gly Cys Lys Trp Asp Leu Leu Ile Lys Gln Trp Val Cys
1 5 10 15

Asp Pro Leu Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Ala
20 25 30

66270 B1

Ser Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr His Met Leu Pro Gly Cys Lys Trp
15 40 45

Asp Leu Leu Ile Lys Gln Trp Val Cys Asp Pro Leu Gly Gly Gly Gly
50 55 60

Gly Val Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Gln Leu
65 70 75 80

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
85 90 95

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
100 105 110

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
115 120 125

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Glu Tyr Asn Ser
130 135 140

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
145 150 155 160

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Lys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
165 170 175

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Glu Pro Arg Glu Pro
180 185 190

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
195 200 205

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
210 215 220

Al Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
225 230 235 240

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
245 250 255

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
260 265 270

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
275 280 285

Leu Ser Pro Gly Lys
290

66270 B1

<210> 134
 <211> 293
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> TAJL-1 inhibitory peptides

<400> 124

Met Phe His Asp Cys Lys Trp Asp Leu Leu Thr Lys Gln Trp Val Cys
 1 5 10 15

His Gly Leu Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Ala
 20 25 30

Ser Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr His Met Phe His Asp Cys Lys Trp
 35 40 45

Asp Leu Leu Thr Lys Gln Trp Val Cys His Gly Leu Gly Gly Gly Gly
 50 55 60

Gly Val Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 65 70 75 80

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 85 90 95

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 100 105 110

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 115 120 125

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Glu Tyr Asn Ser
 130 135 140

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 145 150 155 160

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 165 170 175

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 180 185 190

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 195 200 205

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 210 215 220

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 Page 84

66270 B1

[illegible]

```
<210> 125
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
```

220
225 Comments Sequence:

```

1220>
<221> misc_feature
<222> 11, 2 and 3
<223> X at (Pos 1, 2, 3) are absent or are amino acid residues (with on
      e of X1, X2, and X3 preferred to be C when one of X12,
      X13, or
      d X14 is C);

```

```
<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> X at (pos 7) is an amino acid residue (C preferred):
```

```
<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> X at pos 9 is T ur l (T preferred);
```

```
<220>      misc_feature
<221>      (13)..(12)
<222>      X at (Pos 12) is C, a neutral hydrophobic residue, or a basic res
<223>      idue (W, U, or R
      preferred);
```

```
<220>
<221> misc_feature
<222> {13}..(13)
<223> X at (Pos 13) is C, a neutral hydrophobic residue or is absent (V
Page 85
```

preferred):

<220>
 <221> misc feature
 <222> (14)..(14)
 <223> X at (Pos 14) is any amino acid residue or is absent.

<400> 125

Xaa Xaa Xaa Lys Trp Asp Xaa Leu Xaa Lys Gln Xaa Xaa Xaa
 1 5 10

<210> 126
 <211> 18
 <212> FRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 126

Tyr Lys Gly Arg Gln Met Trp Asp Ile Leu Thr Arg Ser Trp Val Val
 1 5 10 15

Ser Leu

<210> 127
 <211> 18
 <212> FRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 127

Gln Asp Val Gly Leu Trp Trp Asp Ile Leu Thr Arg Ala Trp Met Pro
 1 5 10 15

Asn Ile

<210> 128
 <211> 18
 <212> FRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 128

Gln Asn Ala Gln Arg Val Trp Asp Leu Leu Ile Arg Thr Trp Val Tyr
 1 5 10 15

Pro Gln

<210> 129
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Preferred TALL-1 modulating domains
 <400> 129

Gly Trp Asn Glu Ala Trp Trp Asp Glu Leu Thr Lys Ile Trp Val Leu
 1 5 10 15

Gln Gln

<210> 130
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Preferred TALL-1 modulating domains
 <400> 130

Arg Ile Thr Cys Asp Thr Trp Asp Ser Leu Ile Lys Lys Cys Val Pro
 1 5 10 15

Gln Ser

<210> 131
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Preferred TALL-1 modulating domains
 <400> 131

Gly Ala Ile Met Gln Phe Trp Asp Ser Leu Thr Lys Thr Trp Leu Arg
 1 5 10 15

Gln Ser

<210> 132
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Preferred TALL-1 modulating domains
 <400> 132

Trp Leu His Ser Gly Trp Trp Asp Pro Leu Thr Lys His Trp Leu Gln
 1 5 10 15

Lys Val

<210> 133
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 133

Ser	Glu	Trp	Phe	Phe	Trp	Phe	Asp	Pro	Leu	Thr	Arg	Ala	Gln	Met	Lys
1			5						10					15	

Phe Arg

<210> 134
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 134

Gly	Val	Trp	Phe	Trp	Trp	Phe	Asp	Pro	Leu	Thr	Lys	Gln	Trp	Thr	Gln
1			5						10					15	

Ala Gly

<210> 135
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 135

Met	Gln	Cys	Lys	Gly	Tyr	Tyr	Asp	Ile	Leu	Thr	Lys	Trp	Cys	Val	Thr
1			5						10					15	

Asn Gly

<210> 136
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 136

Leu Trp Ser Lys Glu Val Trp Asp Ile Leu Thr Lys Ser Trp Val Ser
1 5 10 15

Glu Ala

<210> 137
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 137

Lys Ala Ala Gly Trp Trp Phe Asp Trp Leu Thr Lys Val Trp Val Pro
1 5 10 15

Ala Phe

<210> 138
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 138

Ala Tyr Glu Thr Trp Phe Trp Asp Ser Leu Thr Arg Leu Trp Leu Ser
1 5 10 15

Thr Thr

<210> 139
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 139

Ser Gly Glu His Phe Trp Trp Asp Leu Leu Thr Arg Ser Trp Thr Pro
1 5 10 15

Ser Thr

<210> 140
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 140

Leu Gly Val Gly Gln Lys Trp Asp Pro Leu Thr Lys Gln Trp Val Ser
 1 5 10 15

Arg Gly

<210> 141
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 141

Val Gly Lys Met Cys Gln Trp Asp Pro Leu Ile Lys Arg Thr Val Cys
 1 5 10 15

Val Gly

<210> 142
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 142

Cys Arg Gln Gly Ala Lys Phe Asp Leu Leu Thr Lys Gln Cys Leu Leu
 1 5 10 15

Gly Arg

<210> 143
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 143

Gly Gln Ala Ile Arg His Trp Asp Val Leu Thr Lys Gln Trp Val Asp
 1 5 10 15

Ser Gln

<210> 144

66270 B1

<211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 144

Arg Gly Pro Cys Gly Ser Trp Asp Leu Leu Thr Lys His Cys Leu Asp
 1 5 10 15

Ser Gln

<210> 145
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 145

Trp Gln Trp Lys Gln Gln Trp Asp Leu Leu Thr Lys Gln Met Val Trp
 1 5 10 15

Val Gly

<210> 146
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 146

Pro Ile Thr Ile Cys Arg Lys Asp Leu Leu Thr Lys Gln Val Val Cys
 1 5 10 15

Leu Asp

<210> 147
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 147

Lys Thr Cys Asn Gly Lys Trp Asp Leu Leu Thr Lys Gln Cys Leu Gln
 1 5 10 15

Gln Ala

66270 B1

<210> 148
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 148

Lys Cys Leu Lys Gly Lys Trp Asp Leu Leu Thr Lys Gln Cys Val Thr
 1 5 10 15

Glu Val

<210> 149
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 149

Arg Cys Trp Asn Gly Lys Trp Asp Leu Leu Thr Lys Gln Cys Ile His
 1 5 10 15

Pro Trp

<210> 150
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 150

Asn Arg Asp Met Arg Lys Trp Asp Pro Leu Ile Lys Gln Trp Ile Val
 1 5 10 15

Arg Pro

<210> 151
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 151

Gln Ala Ala Ala Ala Thr Trp Asp Leu Leu Thr Lys Gln Trp Leu Val

1 5 10 15

Pro Pro

<210> 152
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 152

Pro Gln Gly Gly Pro Lys Trp Asp Pro Leu Thr Lys Gln Phe Leu Pro
 1 5 10 15

Pro Val

<210> 153
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 153

Gln Thr Pro Gln Lys Lys Trp Asp Leu Leu Thr Lys Gln Trp Phe Thr
 1 5 10 15

Arg Asn

<210> 154
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 154

Ile Gly Ser Pro Cys Lys Trp Asp Leu Leu Thr Lys Gln Met Ile Cys
 1 5 10 15

Gln Thr

<210> 155
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Preferred TALL-1 modulating domains

Page 93

66270 B1

<400> 155

Cys Thr Ala Ala Gly Lys Trp Asp Leu Leu Thr Lys Gln Cys Ile Gln
1 5 10 15

Glu Lys

<210> 156

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 156

Val Ser Gln Cys Met Lys Trp Asp Leu Leu Thr Lys Gln Cys Leu Gln
1 5 10 15

Gly Trp

<210> 157

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 157

Val Trp Gly Thr Trp Lys Trp Asp Leu Leu Thr Lys Gln Tyr Leu Pro
1 5 10 15

Pro Gln

<210> 158

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 158

Gly Trp Trp Glu Met Lys Trp Asp Leu Leu Thr Lys Gln Trp Tyr Arg
1 5 10 15

Pro Gln

<210> 159

<211> 18

<212> PRT

66270 B1

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 159

Thr	Ala	Gln	Val	Ser	Lys	Trp	Asp	Leu	Leu	Thr	Lys	Gln	Trp	Leu	Pro
1				5					10					15	

Leu Ala

<210> 160

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 160

Gln	Leu	Trp	Gly	Thr	Lys	Trp	Asp	Leu	Leu	Thr	Lys	Gln	Tyr	Ile	Gln
				5					10					15	

Ile Met

<210> 161

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 161

Trp	Ala	Thr	Ser	Gln	Lys	Trp	Asp	Leu	Leu	Thr	Lys	Gln	Trp	Val	Gln
1				5					10					15	

Asn Met

<210> 162

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 162

Gln	Arg	Gln	Cys	Ala	Lys	Trp	Asp	Leu	Leu	Thr	Lys	Gln	Cys	Val	Leu
1				5					10					15	

Phe Tyr

66270 B1

<210> 163
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 163

Lys Thr Thr Asp Cys Lys Trp Asp Leu Leu Thr Lys Gln Arg Ile Cys
 1 5 10 15

Gln Val

<210> 164
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 164

Leu Leu Cys Gln Gly Lys Trp Asp Leu Leu Thr Lys Gln Cys Leu Lys
 1 5 10 15

Leu Arg

<210> 165
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 165

Leu Met Trp Phe Trp Lys Trp Asp Leu Leu Thr Lys Gln Leu Val Pro
 1 5 10 15

Thr Phe

<210> 166
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 166

Gln Thr Trp Ala Trp Lys Trp Asp Leu Leu Thr Lys Gln Trp Ile Gly
 1 5 10 15

66270 B1

Pro Met

<210> 167
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 167

Asn Lys Glu Leu Leu Lys Trp Asp Leu Leu Thr Lys Gln Cys Arg Gly
 1 5 10 15

Arg Ser

<210> 168
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 168

Gly Gln Lys Asp Leu Lys Trp Asp Leu Leu Thr Lys Gln Tyr Val Arg
 1 5 10 15

Gln Ser

<210> 169
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 169

Pro Lys Pro Cys Gln Lys Trp Asp Leu Leu Thr Lys Gln Cys Leu Gly
 5 10 15

Ser Val

<210> 170
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 170

66270 B1

Gly Gln Ile Gly Trp Lys Trp Asp Leu Leu Thr Lys Gln Trp Ile Gln
1 5 10 15

Thr Arg

<210> 171
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 171

Val Trp Leu Asp Trp Lys Trp Asp Leu Leu Thr Lys Gln Trp Ile His
1 5 10 15

Pro Gln

<210> 172
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 172

Gln Glu Trp Glu Tyr Lys Trp Asp Leu Leu Thr Lys Gln Trp Gly Trp
1 5 10 15

Leu Arg

<210> 173
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 173

His Trp Asp Ser Trp Lys Trp Asp Leu Leu Thr Lys Gln Trp Val Val
1 5 10 15

Gln Ala

<210> 174
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

66270 B1

<223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 174

Thr	Arg	Pro	Leu	Gln	Lys	Trp	Asp	Leu	Leu	Thr	Lys	Gln	Trp	Leu	Arg
1				5					10					15	

Val Gly

<210> 175

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 175

Ser	Asp	Gln	Trp	Gln	Lys	Trp	Asp	Leu	Leu	Thr	Lys	Gln	Trp	Phe	Trp
1				5					10					15	

Asp Val

<210> 176

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 176

Gln	Gln	Thr	Phe	Met	Lys	Trp	Asp	Leu	Leu	Thr	Lys	Gln	Trp	Ile	Arg
1				5					10					15	

Arg His

<210> 177

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 177

Gln	Gly	Glu	Cys	Arg	Lys	Trp	Asp	Leu	Leu	Thr	Lys	Gln	Cys	Phe	Pro
1				5					10					15	

Gly Gln

<210> 178

66270 B1

<211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 178

Gly Gln Met Gly Trp Arg Trp Asp Pro Leu Ile Lys Met Cys Leu Gly
 1 5 10 15

Pro Ser

<210> 179
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 179

Gln Leu Asp Gly Cys Lys Trp Asp Leu Leu Thr Lys Gln Lys Val Cys
 1 5 10 15

Ile Pro

<210> 180
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 180

His Gly Tyr Trp Gln Lys Trp Asp Leu Leu Thr Lys Gln Trp Val Ser
 1 5 10 15

Ser Glu

<210> 181
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 181

His Gln Gly Gln Cys Gly Trp Asp Leu Leu Thr Arg Ile Tyr Leu Pro
 1 5 10 15

Cys His

66270 B1

<210> 182
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 182

Leu His Lys Ala Cys Lys Trp Asp Leu Leu Thr Lys Gln Cys Trp Pro
 1 5 10 15

Met Gln

<210> 183
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 183

Gly Pro Pro Gly Ser Val Trp Asp Leu Leu Thr Lys Ile Trp Ile Gln
 1 5 10 15

Thr Gly

<210> 184
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 184

Ile Thr Gln Asp Trp Arg Phe Asp Thr Leu Thr Arg Leu Trp Leu Pro
 5 10 15

Leu Arg

<210> 185
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 185

Gln Gly Gly Phe Ala Ala Trp Asp Val Leu Thr Lys Met Trp Ile Thr
 Page 101

66270 B1

1 5 10 15

Val Pro

<210> 186
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 186

Gly His Gly Thr Pro Trp Trp Asp Ala Leu Thr Arg Ile Trp Ile Leu
1 5 10 15

Gly Val

<210> 187
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 187

Val Trp Pro Trp Gln Lys Trp Asp Leu Leu Thr Lys Gln Phe Val Phe
1 5 10 15

Gln Asp

<210> 188
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Preferred TALL-1 modulating domains

<400> 188

Trp Gln Gln Trp Ser Trp Lys Trp Asp Leu Leu Thr Arg Gln Tyr Ile
1 5 10 15

Ser Ser Ser

<210> 189
<211> 882
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> TALL-1 12-3 tandem dimer

66270 B1

<400> 189
 atgcttccag gctgcaagtg ggatcttctt attaagcaat gggatatgca tccacttgga 60
 tccggttctg ctactgggtg ttccgggtcc accgcaagct ctgggttcagg cagtgcgact 120
 catatgctgc cgggttgtaa atgggacctg ctgatcaaac agtgggtttg tgacccgctg 180
 ggtggaggcg gtggggtcga caaaactcac acatgtccac cttgtccagc tccggaactc 240
 ctgggggggac cgtcagtctt cctcttcccc ccaaaacca aggacaccct catgatctcc 300
 cggacccctg aggtcacatg cgtgggtggtg gacgtgagcc acgaagaccc tgagggtcaag 360
 ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag 420
 cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcttcaccg tctgcacca ggactggctg 480
 aatggcaagg agtacaagtg caaggctctc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa 540
 accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc 600
 cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc 660
 agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccag 720
 cctcccgctg tggactccga cggtctcttc ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag 780
 agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac 840
 cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaat aa 882

<210> 190
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Preferred linker

<400> 190

Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Ala Ser Ser Gly
 1 5 10 15

Ser Gly Ser Ala Thr Gly Met
 20

<210> 191
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Preferred linker

<400> 191

Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Ala Ser Ser Gly
 1 5 10 15

Ser Gly Ser Ala Thr Gly Ser
 20

66270 B1

A-743 PCT.ST23.TXT

<210> 192
<211> 46
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Preferred linker

<400> 192

Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Ala Ser Ser Gly
1 5 10 15

Ser Gly Ser Ala Thr His Met Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly Gly Ser
20 25 30

Gly Ser Thr Ala Ser Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr His Met
35 40 45

<210> 193
<211> 23
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Preferred linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(23)
<223> x at (Pos 22) is independently a basic or hydrophobic residue and
x at (Pos 23) is independently a hydrophobic residue.

<400> 193

Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Ala Ser Ser Gly
1 5 10 15

Ser Gly Ser Ala Thr Xaa Xaa
20

<210> 194
<211> 46
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Preferred linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (22, 23, 45 and)..(46)
<223> x at (Pos 22) and (Pos 45) are each independently basic or
hydrophobic residues and x at (Pos 23) and (Pos 46) are each
independently hydrophobic residues

<400> 194

Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Ala Ser Ser Gly
1 5 10 15

66270 B1

Ser Gly Ser Ala Thr Xaa Xaa Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly Gly Ser
20 25 30

Gly Ser Thr Ala Ser Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr Xaa Xaa
35 40 45

<210> 195
<211> 38
<212> PRT
<213> Human

<400> 195

Met Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Val Pro
1 5 10 15

Thr Pro Cys Val Pro Thr Glu Cys Tyr Asp Leu Leu Val Arg Lys Cys
20 25 30

Val Asp Cys Arg Leu Leu
35

<210> 196
<211> 41
<212> PRT
<213> Human

<400> 196

Thr Ile Cys Asn His Gln Ser Gln Arg Thr Cys Ala Ala Phe Cys Arg
1 5 10 15

Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu
20 25 30

Arg Asp Cys Ile Ser Cys Ala Ser Ile
35 40

<210> 197
<211> 42
<212> PRT
<213> Human

<400> 197

Phe Val Ser Pro Ser Gln Glu Ile Arg Gly Arg Phe Arg Arg Met Leu
1 5 10 15

Gln Met Ala Gly Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser Leu Leu
20 25 30

His Ala Cys Ile Pro Cys Gln Leu Arg Cys
35 40

Page 105

Издание на Патентното ведомство на Република България
1797 София, бул. "Д-р Г. М. Димитров" 52-Б

Експерт: Г. Лъжовска

Пор. № 67655

Тираж: 40 СР