



EESTI VABARIIK

PATENDIAMET

(11) **EE-EP 2 814 842 B1**(51) Int. Cl.
C07K 16/18 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)(12) **EESTIS KEHTIVA EUROOPA PATENDI
PATENDIKIRJELDUSE TÕLGE**

(10) Registreeringu number: E016445	(73) Patendiomanik: Novo Nordisk A/S Novo Allé, 2880 Bagsværd, DK
(11) Patendikirjelduse tõlke number: EE-EP 2 814 842 B1	
(30) Prioriteediandmed: 15.02.2012 US 201261598968 P	(72) Leiutise autorid: STENNICKE, Vibeke Westphal Novo Nordisk A/S, Novo Allé, DK-2880 Bagsværd, DK
12.03.2012 EP 12158974	READ, Christine Brender Novo Nordisk A/S, Novo Allé, DK-2880 Bagsværd, DK
18.07.2012 US 201261672799 P	KUIJPER, Joe Novo Nordisk A/S, Novo Allé, DK-2880 Bagsværd, DK
(96) Euroopa patenditaotluse esitamise kuupäev: 30.11.2012	TANG, Xiaoting Novo Nordisk A/S, Novo Allé, DK-2880 Bagsværd, DK
(96) Euroopa patendi-taotluse number: 12795417.0	HEIPEL, Mark Novo Nordisk A/S, Novo Allé, DK-2880 Bagsværd, DK
(97) Euroopa patendi väljaand-misest teatamise kuupäev: 22.08.2018	HJORTH, Siv Annegrethe Novo Nordisk A/S, Novo Allé, DK-2880 Bagsværd, DK
(97) Euroopa patendi number: EP 2 814 842	
Patendikirjelduse tõlke esitamise kuupäev: 07.11.2018	(74) Patendivolinik: Tõnu Nelsas AAA Patendibüroo OÜ Tartu mnt 16, 10117 Tallinn, EE
Patendikirjelduse tõlke avalikustamise kuupäev: 15.01.2019	

(54) **Peptiidglükaani tuvastusvalku 1 siduvad antikehad**

TEHNIKAVALDKOND

5 [0001] Kõnealune leiutis puudutab immunoloogia valdkonda. Täpsemalt puudutab leiutis meetodit, millega tuvastada ligand, mis stimuleeriks müeloidrakkudel avalduvat käivitusretseptorit (TREM-1), ning antikehi, mis TREM-1 ligandit seovad. Sellised antikehad võivad moduleerida müeloidrakkude aktivatsiooni ning seega ka põletikulisi reaktsioone.

LEIUTISE OLEMUS

10

[0002] Peptidoglükaani tuvastusvalk 1 (tuntud ka kui PGLYRP1, PGRP-S, TNFSF3L, PGRP, TAG7 ja PGRPS) ekspresseeritakse neutrofiilides ning see vabaneb nende aktiveerumisel. PGLYRP1 leidub ohtralt haigetes kudedes ning see on immunsüsteemi töös tähtis bakteriaalsete infektsioonide kõrvaldamisel. PGLYRP-valkude perekonna 15 (PGLYRP1, PGLYRP2, PGLYRP3, PGLYRP4) liikmed interakteeruvad bakteriaalsete peptidoglükaanidega (PGNid), kuid valkude PGN-i seondumissaitides on olulisi erinevusi. PGLYRP1-l on lisavagu, mis arvatavasti on seondumissait senitundmatule efektorile või signaalvalgule (*J. Mol. Biol.* 347: 683-691 (2005)). PGLYRP1 on hästi konserveeritud 196 aminohappe pikkune valk, mis koosneb signaalpeptiidist ja peptidoglükaani 20 seondumisdomeenist.

25

[0003] PGLYRP1 vahendatava signaalmehhanismi tuvastamine on oluline, et mõista ning seega muuta selle valgu funktsioone erinevates põletikulistes haigustes ning nakkushaigustes.

[0004] TREM-1-l on hästi teada mõjud immuunmodulatsioonile, kuid seni ei ole TREM-1 vahendatud immuunfunktsioonini viivat mehhanismi mõistetud. TREM-1 on retseptor, mida ekspresseeritakse müeloidrakkudel, nagu monotsüüdid, makrofaagid ja neutrofiilid. Tegu on transmembraanse valguga, mis koosneb 234 aminohapest, kaasa arvatud ühest 30 rakuvälisest immunoglobuliindomeenist ja lühikesest tsütoplasmaatilisest sabast. TREM-1-l puudub selge signaliseerimismotiiv, ent aktiveerumisel moodustab see dimeere/multimeere ning vahendab signaale ITAM-i sisaldava signaaladapervalguga DAP12 assotsieerumise teel. Allavoolu signaliseerimine võib hõlmata Syk-i ja Zap70

fosforüleerimist. Allavoolu signaliseerimine võib hõlmata NFAT, ELK, NK-kappaB transkriptsioonifaktorite aktiveerimist. TREM-1 aktiveerumisel vallandub müeloidrakkudes inflammatoorsete tsütokiinide vabastamine, sealhulgas TNF- α (TNF-alfa), IL-8 ja monotsüütne kemotaktiline valk 1.

5

[0005] TREM-1 on ülesreguleeritud patsientide organismis, kellel on sepsis, reumatoidartriit (RA) ja põletikuline soolehaigus (IBD, ingl *inflammatory bowel disease*), ning üha enam uuringuid toetab teooriat, et TREM-1 soodustab põletikuliste haiguste teket ja arengut. TREM-1 signaalide blokeerimise puhul on *in vivo* hiiremudelites näidatud terapeutilist toimet RA ja IBD ravis.

10

[0006] TREM-1 aktivatsiooni toimet mehhanism on jäänud tundmatuks, kuna TREM-1 aktiveeriv ligand ei ole valdkonna spetsialistidele teada. Seega on valdkonnas vaja meetodit TREM-1 ligandi tuvastamiseks. Valdkonnas on vaja meetodit, mille abil 15 tuvastada molekul, näiteks antikeha, mis võib vähendada, blokeerida või segada TREM-1 interaktsiooni selle ligandiga. Valdkonnas on vaja molekuli, näiteks antikeha, mis võib seonduda TREM-1 ligandiga ja seega vähendada, blokeerida või segada TREM-1 stimuleerimist ligandiga. Valdkonnas on vaja molekuli, näiteks antikeha, mis on võimeline TREM-1 ligandit siduma. Valdkonnas on vaja molekuli, näiteks antikeha, mis on 20 võimeline TREM-1 ligandit siduma ning seega blokeerima TREM-1 aktiveerumist ja signaliseerimist. Valdkonnas on vaja molekuli, näiteks antikeha, mis on võimeline TREM-1 ligandit siduma ning seega vähendada või blokeerima tsütokiinide vabanemist TREM-1 avaldavatest müeloidrakkudest.

20

[0007] Selles dokumendis avaldatakse meetod ja katse, mille abil tuvastada TREM-1 25 ligand ja molekulid, näiteks antikehad, mis on võimelised TREM-1 ligandit siduma. Siin kirjeldatakse antikehi, mis on võimelised TREM-1 aktiveerumist mõjutama. Seega sobivad siin avaldatud antikehad farmatseutiliseks kasutamiseks. Antikehadel, mis seovad TREM-1 ligandit ning mis vähendavad või blokeerivad TREM-1 ja selle ligandi 30 interaktsiooni, võib olla suur mõju krooniliste põletikuliste haigustega, nagu näiteks reumatoidartriidi, psoriaatilise artriidi või põletikuliste soolehaigustega, patsientide elukvaliteedile. Osanai *et al.* on avaldanud polükloonsed antikehad, mis on võimelised PGLYRP1-ga seonduma (*Infection and Immunity*, 2010, 79. kd, nr 2, lk 858–866).

30

Leiutise ulatus on määratletud patendinõudlusega, ja mis tahes teave, mis ei kuulu nõudluse piiresse, on esitatud ainult täiendava infona.

LEIUTISE OLEMUS

5

[0008] Leiutis puudutab meetodit, mille abil tuvastada TREM-1 ligand ja molekulid, näiteks antikehad, mis seonduvad TREM-1 ligandiga ning mis on selles dokumendis tähistatud kui PGLYRP1. Leiutis puudutab ka PGLYRP1-antikehi, mida on võimalik leiutisekohase meetodi abil tuvastada. Seega puudutab leiutis PGLYRP1-antikehi, mis on
10 võimelised muutma TREM-1 aktiveerimist PGLYRP1 abil, nagu näiteks PGLYRP1-antikehad, mis on võimelised vähendama TREM-1 aktiivsust (signaliseerimist ja/või aktiveerumist) PGLYRP1 mõjul. Antikehi, mis vähendavad TREM-1 aktiivsust, võib kasutada põletike ravis.

15 [0009] TREM-1 ligandi tuvastamise meetod hõlmab (a) TREM-1, TREM-1 signaalvalku ja selle signaalvalgu aktiveeritavat reporterkonstrukti ekspresseeriva raku kasvatamist; (b) nimetatud TREM-1 ekspresseeriva raku aktiivsuse tuvastamist ja eelistatavalt kvantifitseerimist selle kontakti viimisel raku, ühendi või vedelikuga, nagu näiteks bioloogiline vedelik või kude, mis vallandab TREM-1 aktiveerumise; (c) kultuuri (b)
20 kontakti viimist TREM-1-aktiveeriva komponendiga; (d) TREM-1 siduva komponendi eraldamist ja (e) eraldatud komponendi iseloomustamist. TREM-1 ligandit, mis leiutise kohaselt on tuvastatud kui PGLYRP1, võib kasutada TREM-1 aktiivsuse muutmiseks.

[0010] Spetsiifiliselt PGLYRP1 siduva ja TREM-1-vahendatud rakuaktiivsust
25 modifitseeriva molekuli tuvastamise meetod hõlmab: (a) raku kasvatamine mis tahes teostuse 1–18 järgi; (b) nimetatud TREM-1 ekspresseeriva raku aktiivsuse tuvastamist ja eelistatavalt kvantifitseerimist selle kontakti viimise korral PGLYRP1-ga ja valikuliselt multimeerainega, nagu PGN; (c) kultuuri (b) kontakti viimist molekuliga, mis spetsiifiliselt seob PGLYRP1; ja (d) tuvastamist ja eelistatavalt kvantifitseerimist, et
30 nimetatud TREM-1 ekspresseeriva raku aktiivsus on suurem või väiksem kui selle etapis (b) mõõdetud aktiivsus.

- [0011] Meetod TREM-1-vahendatud rakuaktiivsust mõjutava PGLYRP1-antikeha tuvastamiseks hõlmab: (a) TREM-1, TREM-1 signaalvalku ja selle signaalvalgu aktiveeritavat reporterkonstrukti ekspresseeriva raku kasvatamist; (b) nimetatud TREM-1 ekspresseeriva raku aktiivsuse tuvastamist ja eelistatavalt kvantifitseerimist selle kontakti viimise korral PGLYRP1-ga ja valikuliselt kombinatsioonis multimeerainega, nagu PGN; (c) kultuuri (b) kontakti viimist molekuliga, mis spetsiifiliselt seob PGLYRP1; ja (d) tuvastamist ja eelistatavalt kvantifitseerimist, et nimetatud TREM-1 ekspresseeriva raku aktiivsus on suurem või väiksem kui selle etapis (b) mõõdetud aktiivsus.
- 10 [0012] Üks meetod TREM-1-vahendatud rakuaktiivsust vähendava PGLYRP1-antikeha tuvastamiseks hõlmab: (a) TREM-1, signaalvalku, nagu DAP12, ja reportergeeni, nagu lutsiferaas või beetagalaktosidaas, ekspresseeriva raku, nagu T-rakk, kultiveerimist; (b) saadud raku inkubeerimist aktiveeritud neutrofiiliga ja valikuliselt kombinatsioonis multimeerainega, nagu PGN; (c) nimetatud raku luminesentsi tuvastamist ja eelistatavalt kvantifitseerimist; (d) rakukultuuri ja aktiveeritud neutrofiili kontakti viimist PGLYRP1-antikehaga; ning (e) tuvastamist ja eelistatavalt kvantifitseerimist, et nimetatud raku luminesents on väiksem kui selle etapis (c).

JOONISTE LÜHIKIRJELDUS

20

[0013]

Joonisel fig 1 on kujutatud neutrofiile aktiveerimas reporterrakuliini BWZ-TREM-1. Reporterrakuliin BWZ ekspresseerib inimese TREM-1 ja vahendab NFAT-seotud beeta-(β)-galaktosidaasi reportergeeni, mida saab kvantifitseerida luminesentsi abil komplektiga Beta-Glo Assay System (Promega, Taanis), aktiveerimist. Joonis kujutab reporterrakuliini aktiveerumist, kui see on kultiveeritud neutrofiilidega kas TNF-alfat (α), IL-6, IFN-gammat (γ) ja GM-CSF-i sisaldavate tsütokiinkokteilide või tollilaadset retseptorit (TLR) aktiveerivate kokteilide (tlr1-kit2hm, Invivogen, Sigma-Aldrich, Taani) juuresolekul, või ka nende aktiveerimissegude eraldi olevate komponentide juuresolekul.

30

Joonisel fig 2 on kujutatud PGN-stimuleeritud neutrofiilide voolutsütomeetrilist märgistamist TREM-1-tetrameeri rekombinantse valguga. Kontrollvalk ei seondu (joonis fig 2A), samal ajal kui TREM-1-tetrameer

(SEQ ID NO: 2) seondub PGN-aktiveeritud neutrofiilide alarühmaga (joonis fig 2B), ning seda võib võrrelda teise TREM-1-valguga (joonis fig 2D), mis ei ole kontrollvalk (joonis fig 2C), kinnitamaks spetsiifilist interaktsiooni.

5 **Joonis fig 3: PGLYRP1 on tuvastatav immunosadestamise (IP, ingl Immunoprecipitation) / massispektromeetria (MS) abil TREM-1-ga.** Lahustuv TREM-Fc inkubeeriti koos PGN-aktiveeritud neutrofiilidega, ristseoti ja immunosadestati, millele järgnes trüpsiiniga lõhustamine ja massispektromeetria. TREM-1 sidevalkude immunosadestamine andis tulemuseks 3 spetsiifilist valku, 73 valku kattusid kontrollvalguga ning 72 sadestusid ainuüksi kontrollvalgu abil
10 (taust). Tabel näitab TREM-1-spetsiifilise immunosadestamise ja järgnenud massispektromeetria tulemusi.

Joonisel fig 4 on kujutatud, et lahustuv TREM-1 seondub PGLYRP1-ga. Seda näitavad nii voolutsütomeetriline värvimine TREM-1-ga rekombinantset PGLYRP1 ekspresseerivatel HEK293 transfektantidel (joonis fig 4A) kui ka
15 Biacore ja Fortebio PGLYRP1 ja TREM-1 tetrameeri analüüsid (SEQ ID NO: 2). Lahustuv inimese PGLYRP1 sidus immobiliseeritud inimese TREM-1 nii 10 µg/ml lahustuva *E. coli* peptidoglükaani juuresolekul kui ka puudumisel (PGN) (joonis fig 4B). PGN eraldi sidus ka immobiliseeritud inimese PGLYRP1 (joonis fig 4C) ja lahustuv inimese TREM-1 seondus immobiliseeritud PGLYRP1-ga enne
20 ja pärast PGLYRP1 pinna paljastamist ja PGN-iga sidumist (joonis fig 4D).

Joonis fig 5 näitab reporterrakuliini TREM-1 aktiveerimist rekombinantse PGLYRP1-ga. Reporterrakuliini TREM-1 stimuleerimine nii rekombinantse PGLYRP1 (kat-nr 2590-PG-050R&D Systems Minneapolis MN, USA), kui ka laboris loodud PGLYRP1-ga (SEQ ID NO: 1) annab PGN juuresolekul annusest
25 sõltuva reaktsiooni (joonis fig 5A). Seda PGLYRP-1 indutseeritud reaktsiooni võib spetsiifiliselt blokeerida TREM-1-Fc liitvalk (joonis fig 5B).

Joonis fig 6 näitab monokloonsete PGLYRP1-vastaste antikehade võimet blokeerida TREM-1 reaktsiooni reporteranalüüsis, stimuleerituna PGN-aktiveeritud neutrofiilidega. Valikut antikehahübridoomide kloonide
30 supernatante analüüsiti erinevatel plaatidel, et tuvastada nende omadus blokeerida aktivatsioonisignaali. Mõned antikehad (loetletud punktiirjoonest allpool, nagu näiteks F10, F95) on võimelised seda signaali blokeerima. Mustad täpid esindavad isotüübikontrolli igal plaadil (joonis fig 6A). Joonis fig 6B illustreerib veel ühe

liitmise katset, mille abil tuvastati veel kaks blokeerivat PGLYRP1-antikeha, M-hPGRPS-2F5 ja -2F7. Kaubanduslikult kättesaadavate PGLYRP1-vastaste mAb-de testimine näitab, et need ei blokeeri signaali isegi suurte annuste korral, ent polükloonsed saadaval olevad PGLYRP1 pAb-d (AF2590, R&D Systems Minneapolis MN, USA) on selleks võimelised. Joonisel fig 6C on kujutatud kaubanduslikult kättesaadava isotüübi kontrolliga (MAB002) PGLYRP1-vastase mAb 188C424 (Thermo Scientific, Waltham MA, USA) ja polükloonse PGLYRP1-vastase pAb (AF2590) võrdlust. Joonisel fig 6D on kujutatud kaubanduslikult kättesaadava isotüübi kontrolliga (MAB002) PGLYRP1-vastase mAb 4H230 (US Biological, Salem MA, USA) ja polükloonse PGLYRP1-vastase pAb (AF2590) võrdlust. Joonis fig 6E illustreerib kaubanduslikult kättesaadava isotüübi kontrolliga (MAB002) PGLYRP1-vastase mAb 9A319 (US Biological, Salem MA, USA) ja polükloonse PGLYRP1-vastase pAb (AF2590) võrdlust, joonis fig 6F illustreerib kaubanduslikult kättesaadava isotüübi kontrolliga (MAB002) PGLYRP1-vastase mAb 6D653 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz CA, USA) ja polükloonse PGLYRP1-vastase pAb (AF2590) võrdlust. mAb SC 6D653 puhul täheldatud väike aktiivsuse langus paistab tulenevat asiidi sisaldavast preparaadist, kuna PGLYRP1 eraldi olev signaalivallandav TREM-1 koos 1 µg/ml TREM-1-vastase mAb-ga plaadil andis sama tulemuse (joonis fig 6G).

Joonis fig 7 illustreerib, et inimese RA puhul liigesevõides esinev TREM-1 ligand on võimeline TREM-1 stimuleerima.

Joonis fig 7 illustreerib, et plaadiga seotud agonistlik TREM-1-vastane mAb (R&D MAB1278, Minneapolis, MN, USA) stimuleerib TREM-1 (täht) ning RA liigesevõide (SF, ingl *synovial fluid*) proovil, millele oli lisatud PGN, ilmnes hTREM-1 ligandi aktiivsus, mida saab neutraliseerida polükloonse PGLYRP1-antikehaga (AF2590), mis osutab TREM-1 aktiivsuse sõltuvusele PGLYRP1-st.

Joonis fig 8 illustreerib II tüüpi PGLYRP1 konstrukti üldist struktuuri. IC (ingl *intracellular*) tähistab rakusisest domeeni, TM transmembraanset domeeni, mis mõlemad tulenevad MDL-1 valgularjendusest, kombinatsioonis EC (ingl *extracellular*, rakuväline) hPGLYRP1 domeeniga.

JÄRJESTUSTE LÜHIKIRJELDUS**[0014]**

- 5 SEQ ID NO: 1 tähistab kypse täispika hPGLYRP1 peptiidjärjestuse aminohappejärjestust.
- SEQ ID NO: 2 tähistab rekombinantset valgujärjestust, mis sisaldab järgnevaid elemente: inimese TREM-1 ECD, linkerpeptiid, inimese TREM-1 ECD, inimese IgG1 Fc allotüüp seitsme metsiktüübist erineva mutatsiooniga. (L15A, L16E, G18A, A111S, P112S, D137E, L139M)
- 10 SEQ ID NO: 3 tähistab inimese IgG1 Fc allotüüpi viie metsiktüübist erineva mutatsiooniga. 5A, L16E, G18A, A111S, P112S.
- SEQ ID NO: 4 tähistab rekombinantset valgujärjestust, mis sisaldab järgnevaid elemente N-terminaalsest otsast kuni C-terminaalse otsani: 6xHIS-märgis, kaks koopiat streptavidiiniga seonduvast valgudomeenist (SBP, ingl *streptavidin binding protein*), GS-linker, kõhre oligomeerse valgu C-ots (COMP, ingl *cartilage oligomeric protein*), GS-linker, hDCIR-ECD.
- 15 SEQ ID NO: 5 tähistab rekombinantset valgujärjestust, mis sisaldab järgnevaid elemente: hTREM-1-ECD, GS-linker, kõhre oligomeerse valgu C-ots (COMP), GS-linker, kaks koopiat streptavidiiniga seonduvast valgudomeenist (SBP), 6xHIS-märgis.
- 20 SEQ ID NO: 6 tähistab rekombinantset valgujärjestust, mis sisaldab järgnevaid elemente järjekorras N-ots kuni C-ots: inimese CD83 ECD, G4Sx3-linkerpeptiid, inimese CD83 ECD, inimese IgG1 Fc allotüübi mutant.
- SEQ ID NO: 7 tähistab täispikka inimese PGLYRP1 kodeerivat cDNA järjestust C-otsas oleva GPI signaaljärjestusega. See järjestus klooniti plasmidi pcDNA3.1zeo(+) (Invitrogen: V860-20, Carlsbad,CA, USA) EcoR1 ja Xho1 restriктаasisaitide kaudu.
- 25 SEQ ID NO: 8 tähistab kypset täispikka hTREM-1 ECD-d (ah 21–200).
- SEQ ID NO: 9 tähistab cDNA-d CD33 liidertandemis hTREM rakuvälistes domeenides, mida eraldab G4Sx3-linker. Sünteetiline cDNA 5' EcoRI restriктаasisaidiga, GCCACC Kozaki järjestus, CD33 liiderjärjestus, millele järgneb inimese TREM-1 (ah 17–200) rakuväline domeen vaheldumisi KpnI restriктаasisaidiga ja kolmes korduses glütsiin-glütsiin-glütsiin-seriin vaheosadega
- 30

(G4Sx3), millele järgneb inimese TREM-1 (ah 17–200) rakuvälise domeeni koopia ning Apa1 sait, et võimaldada kloonimist.

SEQ ID NO: 10 tähistab pentameerset hTREM-COMP-SBP38x2-6HIS-i. EcoR1 sait ja Kozak asetsevad 5'-otsas ja BamH1 sait on 3'-suunas ORF-ist.

5 SEQ ID NO: 11 tähistab hCD83 tetrameeri, mis on kloonitud vektorisse pJSV002-hFc6mut EcoR1 ja Apa1-ga. EcoR1 sait ja Kozak asetsevad 5'-otsas ja Apa1 saidid 3'-suunas ORF-ist.

SEQ ID NO: 12 tähistab pentameerset 6HIS-SBP38x2-COMP-hDCIR-i. EcoR1 sait ja Kozak 5'-otsas ja BamH1 3'-suunas ORF-ist.

10 SEQ ID NO: 13 tähistab monokloonse PGLYRP1-antikeha (1F36, mAb 0182) varieeruva raske ahela nukleiinhappejärjestust.

SEQ ID NO: 14 tähistab monokloonse PGLYRP1-antikeha (1F36, mAb 0182) varieeruva kerge ahela nukleiinhappejärjestust.

15 SEQ ID NO: 15 tähistab monokloonse PGLYRP1-antikeha (1F36, mAb 0182) varieeruva raske ahela aminohappejärjestust.

SEQ ID NO: 16 tähistab monokloonse PGLYRP1-antikeha (1F36, mAb 0182) varieeruva kerge ahela aminohappejärjestust.

SEQ ID NO: 17 tähistab monokloonse PGLYRP1-antikeha (1F10) varieeruva raske ahela nukleiinhappejärjestust.

20 SEQ ID NO: 18 tähistab monokloonse PGLYRP1-antikeha (1F10) varieeruva kerge ahela nukleiinhappejärjestust.

SEQ ID NO: 19 tähistab monokloonse PGLYRP1-antikeha (1F10) varieeruva raske ahela aminohappejärjestust.

25 SEQ ID NO: 20 tähistab monokloonse PGLYRP1-antikeha (1F10) varieeruva kerge ahela aminohappejärjestust.

SEQ ID NO: 21 tähistab monokloonse PGLYRP1-antikeha (1F105, mAb 0184) varieeruva raske ahela nukleiinhappejärjestust.

SEQ ID NO: 22 tähistab monokloonse PGLYRP1-antikeha (1F105, mAb 0184) varieeruva kerge ahela nukleiinhappejärjestust.

30 SEQ ID NO: 23 tähistab monokloonse PGLYRP1-antikeha (1F105, mAb 0184) varieeruva raske ahela aminohappejärjestust.

SEQ ID NO: 24 tähistab monokloonse PGLYRP1-antikeha (1F105, mAb 0184) varieeruva kerge ahela aminohappejärjestust.

- SEQ ID NO: 25 tähistab monokloonse PGLYRP1-antikeha (1F95) varieeruva raske ahela nukleinhappejärjestust.
- SEQ ID NO: 26 tähistab monokloonse PGLYRP1-antikeha (1F95) varieeruva kerge ahela nukleinhappejärjestust.
- 5 SEQ ID NO: 27 tähistab monokloonse PGLYRP1-antikeha (1F95) varieeruva raske ahela aminohappejärjestust.
- SEQ ID NO: 28 tähistab monokloonse PGLYRP1-antikeha (1F95) varieeruva kerge ahela aminohappejärjestust.
- SEQ ID NO: 29 tähistab monokloonse PGLYRP1-antikeha (2F5) varieeruva raske
- 10 ahela nukleinhappejärjestust.
- SEQ ID NO: 30 tähistab monokloonse PGLYRP1-antikeha (2F5) varieeruva kerge ahela nukleinhappejärjestust.
- SEQ ID NO: 31 tähistab monokloonse PGLYRP1-antikeha (2F5) varieeruva raske ahela aminohappejärjestust.
- 15 SEQ ID NO: 32 tähistab monokloonse PGLYRP1-antikeha (2F5) varieeruva kerge ahela aminohappejärjestust.
- SEQ ID NO: 33 tähistab monokloonse PGLYRP1-antikeha (2F7) varieeruva raske ahela nukleinhappejärjestust.
- SEQ ID NO: 34 tähistab monokloonse PGLYRP1-antikeha (2F7) varieeruva kerge
- 20 ahela nukleinhappejärjestust.
- SEQ ID NO: 35 tähistab monokloonse PGLYRP1-antikeha (2F7) varieeruva raske ahela aminohappejärjestust.
- SEQ ID NO: 36 tähistab monokloonse PGLYRP1-antikeha (2F7) varieeruva kerge ahela aminohappejärjestust.
- 25 SEQ ID NO: 37 tähistab II tüüpi 1.0 PGLYRP1 aminohappejärjestust.
- SEQ ID NO: 38 tähistab II tüüpi 2.0 PGLYRP1 aminohappejärjestust.
- SEQ ID NO: 39 tähistab epitoomärgistusega aminohappejärjestust.
- SEQ ID NO: 40 tähistab täispikka inimese PGLYRP2 aminohappejärjestust.
- SEQ ID NO: 41 tähistab täispikka inimese PGLYRP3 aminohappejärjestust.
- 30 SEQ ID NO: 42 tähistab täispikka inimese PGLYRP4 aminohappejärjestust.
- SEQ ID NO: 43 tähistab hCD33-hTrem1 ECD(ah 17–200)-Fc6mut nukleinhappejärjestust.

- SEQ ID NO: 44 tähistab hCD33-hTrem1 ECD(aa17-200)-Fc6mut aminohappejärjestust.
- SEQ ID NO: 45 tähistab hCD33-hTremL1 ECD(aa16-162)-Fc6mut nukleiinhappejärjestust.
- 5 SEQ ID NO: 46 tähistab hCD33-hTremL1 ECD(aa16-162)-Fc6mut aminohappejärjestust.
- SEQ ID NO: 47 tähistab hCD33-hTremL2 ECD(aa19-268)-Fc6mut nukleiinhappejärjestust.
- 10 SEQ ID NO: 48 tähistab hCD33-hTremL2 ECD(aa19-268)-Fc6mut aminohappejärjestust.
- SEQ ID NO: 49 tähistab hCD33-hTREM2-Fc6mut dimeeri nukleiinhappejärjestust.
- SEQ ID NO: 50 tähistab hCD33-hTREM2-Fc6mut dimeeri aminohappejärjestust.
- SEQ ID NO: 51 tähistab praimeri nukleiinhappejärjestust.
- 15 SEQ ID NO: 52 tähistab praimeri nukleiinhappejärjestust.
- SEQ ID NO: 53 tähistab hCD33 aminohappejärjestust.

LEIUTISE KIRJELDUS

- 20 **[0015]** Leiutis puudutab meetodit, mille abil saab tuvastada molekulid, näiteks antikehad, mis on võimelised spetsiifiliselt siduma TREM-1 signaliseerimispartnerit, mis siin on määratletud kui PGLYRP1, ning mõjutama PGLYRP1 seondumist selle signaliseerimispartneri TREM-1-ga. PGLYRP1 võib kasutada TREM-1 aktiivsuse muutmiseks. Seega puudutab leiutis molekule, näiteks antikehi, mis mõjutavad
- 25 PGLYRP1-vahendatud põletikulisi reaktsioone. PGLYRP1-ga seonduvad ning TREM-1 aktiveerumist ja signaliseerimist mõjutavad antikehad on loodud ja määratletud.

- [0016]** TREM-1 ligandi ning molekulide, näiteks antikehade, mis on võimelised spetsiifiliselt siduma PGLYRP1 ja vähendama või blokeerima TREM-1 aktiveerimist
- 30 PGLYRP1-ga, tuvastamiseks mõeldud meetodi või analüüsi võib saada järgnevalt:
- esimene rakk või rakupopulatsioon transfekteeeritakse TREM-1 kodeerivate geenide või nende fragmentide, signaalvalgu ja reporterkonstruktiga. Rakk võib olla vereloomerakk, nagu näiteks müeloidrakk, see võib olla ka T-rakk või mis tahes teist tüüpi rakk, mida võib

transfekteerida ning mis ekspresseerib soovitud molekule. Signaalvalk võib olla mis tahes valk, mis on võimeline kas otseselt või kaudselt edasi andma TREM-1 signaali reporterkonstruktile ning nende hulka võib kuuluda DAP10, DAP12, TCR- ζ , Fc gamma RIII, Fc-retseptor või mis tahes muu valk, mis on võimeline TREM-1 signaali reporterkonstruktile edastama. Teise variandina võib signaalvalk olla ka TREM-1/signaliseeriv kimäärmolekul. Reporterkonstrukt sisaldab transkriptsioonifaktorit ja reportergeeni, mis omakorda kodeerib reportervalgu, mis annab tuvastatava signaali, näiteks kvantifitseeritava signaali. Transkriptsioonifaktor võib olla NFAT või NFkB või mis tahes muu valdkonnas tuntud sobiv transkriptsioonifaktor. Reportergeen võib kodeerida beeta(β)-galaktosidaasi, lutsiferaasi, rohelist fluorestseeruvat valku, klooramfenikooli transferaasi või mis tahes muud reportervalgu, mis on võimeline andma tuvastatava signaali. Üks selleks biotestiks sobiv rakuliin on BWZ.36/hTREM-1:DAP12:NFAT-LacZ T-rakk (siin nimetatakse ka BWZ/hTREM-1-reporterrakuks), mille loomist on detailsemalt kirjeldatud näidetes. Aktiveerimisel toodab BWZ/hTREM-1-reporterrakk beeta(β)-galaktosidaasi, mille tootlikkust on võimalik mõõta valdkonnas tuntud varustuse või komplektiga, näiteks Beta GlowTM (Promega E4720, Madison, WI, USA).

[0017] Esimest raku või esimest rakupopulatsiooni võib aktiveerida PGLYRP1-ga inkubeerimise teel ja valikuliselt ka multimeeraine abil. Valikuline multimeeraine toimib PGLYRP1 toesena ning selleks võib olla peptidoglükaan (PGN), neutrofiili rakuvälised lõksud (NET, ingl *neutrophil extracellular trap*), hüaluroonhape, proteoglükaanstruktuur, nagu versikaan, agrekaan, dekoriin või fibriin või mis tahes muu loomulik maatriksstruktuur või molekul, mis on võimeline multimeriseerima või esitlema PGLYRP1. Esimese raku võib aktiveerida selle inkubeerimise teel koos ühe või enama teise rakuga, mis ekspresseerivad oma pinnal või rakusiseselt PGLYRP1. Näiteks võib rakusisene ekspresseerimine olla PGLYRP1 ladestumine sekretoorsetes graanulites. Teine rakk võib seega olla mis tahes rakk (või rakupopulatsioon), mis ekspresseerib PGLYRP1 kodeerivat geeni või on sellega transfekteeritud ning eksponeerib oma pinnal PGLYRP1. Selline teine rakk võib olla prokarüootne või eukarüootne rakk, näiteks imetaja rakk, nagu CHO-rakk, BHK-rakk või HEK-rakk. Teine rakk võib olla ka aktiveeritud neutrofiil. Neutrofiilid saadakse isendi verest või koest ning kasutatakse kas nende puhastamata kujul või puhastatud neutrofiilidena. Neutrofiili aktiveerimiseks võib kasutada mis tahes ainet,

mis matkib neutrofiilide bakteriaalset aktiveerimist, nagu näiteks peptidoglükaanid (PGN) bakteri rakuseinast, näiteks PGN-SA, PGN-EB, PGN-EC, PGN-BS (InVivogen, tlr1-pgnsa, SanDiego, CA).

5 **[0018]** Seejärel tuvastatakse ning eelistatavalt mõõdetakse esimese raku või rakupopulatsiooni aktiivsus.

[0019] PGLYRP1 ekspresseerivad esimese ja teise raku kultuurid ja/või esimese raku kultuur, mida on inkubeeritud PGLYRP1-ga ja valikuliselt multimeerainega, nagu PGN, viiakse kontakti PGLYRP1-vastase antikehaga. Esimese raku või rakupopulatsiooni aktiivsus tuvastatakse ning eelistatavalt mõõdetakse.

10

[0020] Sel viisil on võimalik tuvastada antikehad, mis on võimelised siduma TREM-1 ligandit, PGLYRP1 ja mis mõjutavad TREM-1 ja PGLYRP1 interaktsiooni. Esimese raku aktiivsust tõstvad PGLYRP1-antikehad võimendavad PGLYRP1 ja TREM-1 interaktsiooni ning on siin määratletud kui „stimuleerivad PGLYRP1-antikehad“. Esimese raku aktiivsust langetavad PGLYRP1-antikehad vähendavad, segavad või blokeerivad PGLYRP1 ja TREM-1 interaktsiooni ning on siin määratletud kui „inhibeerivad PGLYRP1-antikehad“. Inhibeerivad PGLYRP1-antikehad vähendavad või blokeerivad TREM-1 aktiveerumist ja signaliseerimist.

15

20

[0021] Seega puudutab leiutis meetodit PGLYRP1-antikehade funktsiooni iseloomustamiseks. Antikehi, mis on võimelised PGLYRP1 spetsiifiliselt siduma ning mõjutavad TREM-1 aktiivsust ning allavoolu signaliseerimist, nimetatakse siin „funktsionaalseteks PGLYRP1-antikehadeks“. Sellest tulenevalt hõlmab termin „funktsionaalsed PGLYRP1-antikehad“ nii stimuleerivaid PGLYRP1-antikehi kui ka inhibeerivaid PGLYRP1-antikehi.

25

[0022] Lisaks puudutab leiutis antikehi, mis on võimelised PGLYRP1 spetsiifiliselt siduma ning vähendama, segama või blokeerima selle interaktsiooni TREM-1-ga, millega vähendatakse TREM-1 aktiveerumist ja allavoolu signaliseerimist. Leiutisekohastel antikehadel võib olla immunoregulaatorne funktsioon, millega vähendatakse TREM-1 ekspresseerivates müeloidrakkudes tsütokiinide tootmist. Näiteks võivad leiutisekohased

30

antikehad vähendada või takistada TNF-alfa (α), IL-1beeta(b),IL-6, IFN-gamma (γ), MIP-1beeta (b), MCP-1, IL-8 ja/või GM-CSF-i vabanemist müeloidrakkudest, nagu makrofaagid ja/või neutrofiilid ja/või müeloidrakud haigetes kudedes, nagu sünoviaalkude. Leiutisekohased antikehad võivad olla võimelised neutrofiilreaktsioone
5 alla reguleerima.

[0023] Leiutisekohased PGLYRP1-antikehad võivad vähendada või blokeerida TREM-1 aktiveerumist ühe või mitme mehhanismi koosmõjul, mille puhul mõjutavad TREM-1 otseselt või kaudselt. Leiutisekohased antikehad võivad takistada PGLYRP1 ja TREM-1
10 funktsionaalse kompleksi moodustumist.

[0024] Leiutisekohased antikehad võivad PGLYRP1 funktsiooni blokeerida TREM-1 aktiveerumise ning allavoolu signaliseerimise vähendamise või blokeerimise teel.

15 **[0025]** Leiutis puudutab ka inhibeerivaid PGLYRP1-antikehi, mida on võimalik tuvastada ka muul moel kui siin avaldatud meetodi abil.

[0026] Leiutisekohased antikehad võivad olla võimelised siduma nii inimese kui ka inimesest erineva liigi PGLYRP1. Termin „PGLYRP1“ hõlmab siin kasutatuna kõiki looduslikke PGLYRP1 vorme, mida on võimalik saada mis tahes sobivast organismist, näiteks selgrootust või selgroogsest organismist. PGLYRP1 siin kirjeldatud kasutuseks võib olla selgroogse PGLYRP1, muu hulgas näiteks imetajatelt, nagu ahvilised (nagu näiteks inimene, šimpans, jaava makaak või reesusahv); närilised (nagu näiteks hiir või rott); jäneselised (nagu näiteks küülik); või sõralised (nagu näiteks lehm, lammas, siga või
25 kaamel). Eelistatud on inimese PGLYRP1 (SEQ ID NO: 1). PGLYRP1 võib olla PGLYRP1 küps vorm, nagu näiteks PGLYRP1- Valk, mis on sobivas rakus läbinud translatsioonijärgse töötamise. Selline küps PGLYRP1- Valk võib olla näiteks glükosüülitud. PGLYRP1 võib olla täispikk PGLYRP1- Valk. PGLYRP1 võib olla splaissvariant.

30 **[0027]** Leiutisekohased antikehad võivad olla ka võimelised spetsiifiliselt siduma PGLYRP1 variante nagu SEQ ID NO: 37 (II tüüpi 1.0 PGLYRP1) ja/või SEQ ID NO: 38 (II tüüpi 1.0 PGLYRP1).

[0028] Leiutisekohased antikehad võivad olla võimelised mõjutama, näiteks inhibeerima/vähendama/blokeerima nii inimese TREM-1 kui ka teiste liikide TREM-1 aktiivsust (signaaliseerimist ja/või aktivatsiooni). Termin „TREM-1“ hõlmab siin kasutatuna kõiki looduslikke TREM-1 vorme, mida on võimalik saada mis tahes sobivast organismist. Näiteks võib TREM-1 siin kirjeldatud kasutuseks olla selgroogse TREM-1, muu hulgas näiteks imetajate TREM-1, nagu primaatide (nagu näiteks inimene, šimpans, jaava makaak või reesusahv); näriliste (nagu näiteks hiir või rott); jäneseliste (nagu näiteks küülik); või sõraliste (nagu näiteks lehm, lammas, siga või kaamel) TREM-1. Eelistatud TREM-1 on inimese TREM-1. TREM-1 võib olla TREM-1 küps vorm, nagu näiteks TREM-1- Valk, mis on sobivas rakus läbinud translatsioonijärgse töötuse. Selline küps TREM-1- Valk võib olla näiteks glükosüülitud. TREM-1 võib olla täispikk TREM-1- Valk. TREM-1 võib olla splaissvariant.

[0029] Termin „antikeha“ viitab siin kasutatuna immunoglobuliini iduteejärjestusest saadud valgule, mis on võimeline spetsiifiliselt siduma PGLYRP1 või selle osa. Termin hõlmab mis tahes isotüübi (IgA, IgE, IgG, IgM ja/või IgY) täispikki antikehi ning nende üksikahelaid või fragmente. Antikeha, mis seondub spetsiifiliselt PGLYRP1-ga, võib seonduda ainult PGLYRP1 või selle osaga või see võib seonduda piiratud arvu homoloogsete antigeenide või nende osadega.

20

[0030] Leiutisekohased antikehad võivad olla monokloonsed antikehad, kuna need võivad olla otseselt või kaudselt tuletatud ühest ainsast B-lümfotsüüdi kloonist. Leiutisekohane antikeha võib olla monokloonne antikeha tingimusel, et see ei ole 188C424 (Thermo Scientific), 4H230 või 9A319 (US Biological) või kloon 6D653 (Santa Cruz Biotechnology).

25

[0031] Leiutisekohased antikehad võivad olla isoleeritud. Termin „isoleeritud antikeha“ viitab antikehale, mis on eraldatud ja/või saadud selle organismiomase keskkonna teis(t)est komponendist (komponentidest) ja/või saadud selle loomulikust keskkonnast teiste komponentide segust puhastamise teel.

30

[0032] Antikehi võib rekombinantsetl ekspresseerida prokarüootsetes rakkudes, eukarüootsetes rakkudes või rakuekstraktidest saadud rakusüsteemis. Prokarüootne rakk

võib olla *E. coli*. Eukarüootne rakk võib olla pärmi, putuka või imetaja rakk, nagu näiteks rakk, mis on saadud organismidelt, nagu ahvilised (nagu näiteks inimene, šimpans, jaava makaak või reesusahv); närilised (nagu näiteks hiir või rott); jäneselised (nagu näiteks küülik); või sõralised (nagu näiteks lehm, lammas, siga või kaamel). Sobivate imetaja rakuliinide hulka kuuluvad näiteks, kuid mitte ainult, HEK293-rakud, CHO-rakud ja HELA-rakud. PGLYRP1-antikehi võib toota ka teiste valdkonna asjatundjatele teada olevate meetodite abil, näiteks faagikuva või pärmikuva meetodid. Leiutisekohased antikehad võivad olla saadud *in vivo* sobiva imetaja PGLYRP1, seda ekspresseeriva raku või mõlema kombinatsiooniga immuniseerimise teel.

10

[0033] PGLYRP1-antikehi võib toota, sõeluda ja puhastada näiteks näidete osas kirjeldatud meetodite abil. Lühidalt öeldes võib mis tahes sobiva hiire, kaasa arvatud PGLYRP1 nokaudiga (KO, ingl *knockout*) hiire või TREM-1 KO hiire immuniseerida PGLYRP1-ga, seda ekspresseeriva rakuga või kombinatsiooniga mõlemast. Esmase hübridoomide supernatantide sõelumise võib teha ELISA või FMAT-i abil ja teisese sõelumise voolutsütomeetriaga. Positiivseid hübridoomi supernatante ning puhastatud antikehi võib seejärel sõeluda näiteks nende täispika PGLYRP1-ga seondumise suhtes. Positiivseid hübridoomi supernatante või puhastatud antikehi võib seejärel testida, et tuvastada nende võime vähendada või blokeerida TREM-1 kandvate rakkude stimuleerimist PGLYRP1-ga. Sellel eesmärgil võib kasutada leiutisekohast meetodit.

20

[0034] Leiutisekohased täispikad antikehad võivad sisaldada vähemalt nelja polüpeptiidahelat: kaht rasket ahelat (H) ja kaht kerget ahelat (L), mis on üksteisega seotud disulfiidsidemetega. Üks farmatseutilist huvi pakkuv immunoglobuliini alamklass on IgG perekond, mida võib jagada isotüüpideks IgG1, IgG2, IgG3 ja IgG4. IgG molekulid koosnevad kahest raskest ahelast, mis on seotud kahe või enama disulfiidsidemega, ning kahest kergest ahelast, mis on kumbki disulfiidsidemega kinnitunud raske ahela külge. Raske ahel võib sisaldada raske ahela varieeruvat piirkonda (VH) ja kuni kolme raske ahela konstantset piirkonda (CH): CH1, CH2 ja CH3. Kerge ahel võib sisaldada kerge ahela varieeruvat (VL) piirkonda ja kerge ahela konstantset piirkonda (CL). VH- ja VL-piirkondi võib omakorda jaotada hüpervarieeruvateks piirkondadeks, mida nimetatakse komplementaarsust määravateks piirkondadeks (CDR, ingl *complementarity determining region*), mis vahelduvad rohkem konserveerunud

25
30

piirkondadega, mida nimetatakse raamistikupiirkondadeks (FR, ingl *framework region*). VH- ja VL-piirkonnad koosnevad tavaliselt kolmest CDR-ist ja neljast FR-ist, mis paiknevad aminoterminaalset otsast karboksüterminaalset otsani järjekorras: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Raskete ja kergete aheldate hüpervarieeruvad piirkonnad moodustavad (seonduva) domeeni, mis on võimeline antigeeniga (PGLYRP1) interakteeruma, samas kui antikeha konstantne piirkond võib vahendada immunoglobuliini seondumist peremeeskudede või faktoritega, kaasa arvatud (kuid mitte ainult) erinevad immuunsüsteemi rakud (efektorrakud), Fc-retseptorid ja klassikalise komplementsüsteemi esimene komponent (Clq).

10

[0035] Antigeeni siduvate fragmentide hulka kuuluvad näiteks Fab, Fab', F(ab)2, F(ab')2, F(ab)S, Fv (tavaliselt antikeha ühe haru VL- ja VH-domeenid), üksikahela Fv (scFv; vt nt Bird *et al.*, *Science* 1988; 242: 42S–426; ja Huston *et al.* *PNAS* 1988; 85: 5879–5883), dsFv, Fd (tavaliselt VH- ja CHI-domeenid), ja dAb (tavaliselt VH-domeen) fragmendid; VH-, VL-, VhH- ja V-NAR-domeenid; monovalentsed molekulid, mis sisaldavad üksikut VH- ja üksikut VL-ahelat, minikehad, diakehad, trikehad, tetrakehad ja kapakehad (vt, nt, III *et al.* *Protein Eng* 1997; 10: 949–957); kaamli IgG; IgNAR; kui ka üks või enam isoleeritud CDR-i või funktsionaalne paratoop, milles isoleeritud CDR-e või antigeeni siduvaid jääke või polüpeptiide võib assotsieerida või kokku siduda, et moodustuks funktsionaalne antikehafragment. Erinevat tüüpi antikehafragmente on kirjeldatud või uuritud nt Holligeri ja Hudsoni artiklis, *Nat Biotechnol* 2005; 2S: 1126–1136; dokumendis WO2005040219 ja avaldatud USA patenditaotlustes 20050238646 ja 20020161201

15

[0036] Antikehade teatud antigeeni siduvad fragmendid võivad olla leiutise kontekstis sobivad, kuna on teada, et antikeha antigeeni siduvat funktsiooni saavad täita ka täispika antikeha fragmendid. Termin antikeha „antigeeni siduv fragment“ viitab ühele või enamale antikehafragmentile, millel on säilinud võime siinkirjeldatud moel spetsiifiliselt seonduda antigeeniga, nagu inimese PGLYRP1 või mis tahes muu liigi PGLYRP1.

20

Antigeeni siduvate fragmentide hulka kuuluvad näiteks Fab, Fab', F(ab)2, F(ab')2, F(ab)S, Fv (tavaliselt antikeha ühe haru VL- ja VH-domeenid), üksikahelaline Fv (scFv; vt nt Bird *et al.*, *Science* 1988; 242: 42S–426; ja Huston *et al.* *PNAS* 1988; 85: 5879–5883), dsFv, Fd (tavaliselt VH- ja CHI-domeenid), ja dAb (tavaliselt VH-domeen) fragmendid; VH-, VL-,

VhH- ja V-NAR-domeenid; monovalentsed molekulid, mis sisaldavad üksikut VH- ja üksikut VL-ahelat, minikehad, diakehad, trikehad, tetrakehad ja kapakehad (vt, nt, III *et al. Protein Eng* 1997; 10: 949–957); kaamli IgG; IgNAR; kui ka üks või enam isoleeritud CDR-i või funktsionaalne paratoop, milles isoleeritud CDR-e või antigeeni siduvaid jääke
5 või polüpeptiide võib assotsieerida või kokku siduda, et moodustuks funktsionaalne antikehafragment. Erinevat tüüpi antikehafragmente on kirjeldatud või uuritud nt Holligeri ja Hudsoni artiklis, *Nat Biotechnol* 2005; 2S: 1126–1136; dokumendis WO2005040219 ja avaldatud USA patenditaotlustes 20050238646 ja 20020161201 Nende antikehafragmentide saamiseks võib kasutada valdkonna asjatundjatele tuntud
10 tavapäraseid meetodeid ning neid fragmente sõelutakse nende kasulikkuse suhtes samal viisil nagu terviklikke antikehi.

[0037] Leiutisekohane antikeha võib olla inimese antikeha või humaniseeritud antikeha. Termin „inimese antikeha“ hõlmab siin antikehi, millel on varieeruvad piirkonnad, milles
15 vähemalt osa raamistikupiirkonnast ja/või vähemalt osa CDR-piirkonnast on saadud inimese immunoglobuliini iduteejärjestustest. Näiteks võivad inimese antikehal olla varieeruvad piirkonnad, milles raamistikupiirkonnad ja CDR-piirkonnad saadakse inimese immunoglobuliini iduteejärjestustest. Enamgi veel, kui antikeha sisaldab konstantset piirkonda, on ka konstantne piirkond saadud inimese immunoglobuliini iduteejärjestustest.
20 Leiutisekohaste inimese antikehade hulka võivad kuuluda aminohappejäägid, mida inimese iduliini immunoglobuliini järjestused ei kodeeri (nt mutatsioonid, mida on tekitatud juhusliku või saidispetsiifilise mutageneesiga *in vitro* või somaatilise muteerimisega *in vivo*).

25 [0038] Selline inimese antikeha võib olla monokloonne antikeha. Sellise inimese monokloonse antikeha võib toota hübriidoomiga, mis sisaldab immortaliseeritud rakuga liidetud B-rakku, mis on saadud inimesest erinevalt transgeenselt loomalt, nt transgeenselt hiirelt, kelle genoom sisaldab inimese raske ahela transgeeni ja kerge ahela transgeeni.

30 [0039] Inimese antikehad võivad olla eraldatud järjestusraamatukogudest, mis on loodud inimese iduteejärjestustest, mida mitmekesisavad organismiomaste ja sünteetiliste järjestuste mitmekesisus.

[0040] Inimese antikehi saab valmistada inimese lümfotsüütide *in vitro* immuniseerimise teel, millele järgneb lümfotsüütide transformeerimine Epstein-Barri viirusega.

5 [0041] Termin „inimese antikeha derivaadid” tähistab inimese antikeha mis tahes modifitseeritud vormi, näiteks antikeha ja teise aine või antikeha konjugaati.

[0042] Termin „humaniseeritud antikeha“ tähistab siin inimese/inimesest erineva liigi kimäärset antikeha, mis sisaldab üht või enam inimesest erineva liigi immunoglobuliinist saadud järjestust (CDR-piirkonda). Humaniseeritud antikehad on seega inimese
10 immunoglobuliinid (retsipient-antikeha), milles vähemalt vastuvõtja hüpervarieeruvast piirkonnast saadud jäägid asendatakse inimesest erineva liigi, nagu nt hiire, roti, küüliku või inimesest erineva primaadi hüpervarieeruvast piirkonnast saadud jääkidega (doonor-antikeha), millel on soovitud spetsiifilisus, afiinsus ja tõhusus. Osadel juhtudel on inimese immunoglobuliini FR-jäägid asendatud vastavate inimesest erineva liigi jääkidega.
15 Näiteks võib selline modifikatsioon olla ühe või enama niinimetatud tagasimutatsiooni rakendamine.

[0043] Lisaks võivad humaniseeritud antikehad sisaldada jääke, mida ei leidu retsipient-antikehas või doonor-antikehas. Neid modifikatsioone tehakse antikeha tõhususe
20 täiendavaks viimistlemiseks. Üldiselt sisaldab humaniseeritud antikeha vähemalt üht ja üldjuhul kaht varieeruvat domeeni, milles kõik või sisuliselt kõik CDR-piirkonnad vastavad inimesest erinevat päritolu immunoglobuliini omadele ning milles kõik või sisuliselt kõik FR-piirkonnad on inimese immunoglobuliinjärjestuse omad. Humaniseeritud antikeha võib valikuliselt sisaldada ka vähemalt osa immunoglobuliini
25 konstantsest piirkonnast (Fc), tavaliselt inimese immunoglobuliini omast.

[0044] Termin „humaniseeritud antikeha derivaadid” tähistab inimese antikeha mis tahes modifitseeritud vormi, näiteks antikeha ja teise aine või antikeha konjugaati.

30 [0045] Termin „kimäärsed antikehad“ tähistab siin antikehi, mille kerge ja raske ahela geenid on konstrueeritud tavaliselt geenitehnoloogia abil erinevate liikide immunoglobuliini varieeruva ja konstantse piirkonna geenidest. Näiteks võivad hiire

monokloonse antikeha geenide varieeruvad segmendid olla liidetud inimese konstantsete segmentidega.

[0046] Antikeha fragmendi kristalluv piirkond („Fc piirkond“/„Fc-domeen“) on antikeha N-terminaalse otsa piirkond, mis sisaldab konstantseid CH2- ja CH3-domeene. Fc-domeen võib interakteeruda raku pinnaretseptorite ehk Fc-retseptoritega ning ka komplementisüsteemi teatud valkudega. Fc-piirkond võimaldab antikehadel ja immuunsüsteemil interakteeruda. Leiutise ühes aspektis võivad antikehad kanda muudatusi Fc-piirkonnas, tavaliselt ühe või enama funktsionaalse omaduse modifitseerimiseks, näiteks seerumi pooldumisaeg, komplemendi fikseerumine, Fc-retseptori seondumine, valgu stabiilsus ja/või antigeenist sõltuv raku tsütotoksilisus või selle puudumine. Lisaks võib leiutisekohast antikeha keemiliselt modifitseerida (nt saab antikehale lisada ühe või mitu keemilist fragmenti) või modifitseerida selle glükosüülimise muutmiseks, jällegi selleks, et muuta antikeha üht või mitut funktsionaalset omadust. Eelistatult sisaldab modifitseeritud Fc-domeen üht või mitut ja võib-olla kõiki järgnevaid mutatsioone, mille tulemusena väheneb afiinsus teatud Fc-retseptorite suhtes (L234A, L235E ja G237A) ja C1q-vahendatud komplemendi kinnituste (A330S and P331S) suhtes (jäägid nummerdatud EL-i indeksi järgi).

[0047] Leiutisekohase antikeha isotüüp võib olla IgG nagu näiteks IgG1, nagu IgG2, nagu IgG4. Soovi korral võib antikeha klassi vahetada tuntud meetodite abil. Näiteks võib antikeha, mis algselt toodeti IgM-molekulina, klassi vahetada IgG antikehaks. Klassivahetustehnikaid võib kasutada ka ühest IgG alamklassist teiseks muutmiseks, näiteks IgG1-st IgG2-ks või IgG4-ks; IgG2-st IgG1-ks või IgG4-ks; või IgG4-st IgG1-ks või IgG2-ks. Lisaks võib kombineerida erinevate IgG alamklasside piirkondi, et antigeene muundada selliselt, et need toodaksid konstantse piirkonna kimäärseid molekule.

[0048] Ühes teostuses on CH1-liigendpiirkond modifitseeritud selliselt, et muutuks hingepiirkonna tsüsteiinjääkide arv, nt suuremaks või väiksemaks. Seda meetodit on täpsemalt kirjeldatud USA patendis nr 5 677 425 (Bodmer *et al.*).

[0049] Konstantne piirkond võib lisaks olla modifitseeritud antikeha stabiliseerimiseks, nt et vähendada bivalentse antikeha kaheks monovalentseks VH-VL-fragmendiks

jagunemise riski. Näiteks võib IgG4 konstantses piirkonnas olla jääk S241 olla muteerunud proliinijäägiks (P), et võimaldada täieliku disulfiidsilla moodustumist liigendi juures (vt nt Angal *et al.*, *Mollimmunol.* 199S; 30: 105–108).

5 [0050] Antikehad või nende fragmendid võivad olla määratletud ka nende komplementaarsust määravate piirkondade (CDR) järgi. Termin „komplementaarsust määrav piirkond“ või „hüpervarieeruv piirkond“ tähistab siin antikeha piirkondi, milles paiknevad antigeenide sidumises osalevad aminohappejäägid. CDR-id koosnevad tavaliselt aminohappejääkidest 24–34 (L1), 50–56 (L2) ja 89–97 (L3) kerge ahela varieeruv domeenis ning 31–35 (H1), 50–65 (H2) ja 95–102 (H3) raske ahela varieeruv domeenis; (Kabat *et al.* (1991) „Sequences of Proteins of Immunological Interest“, viies trükk, USA tervishoiu- ja sotsiaalteenuste ministeerium, NIH väljaanne nr 10 91-3242) ja/või „hüpervarieeruvast suletud ahelast“ pärinevatest jääkidest (jäägid 26–32 (L1), 50–52 (L2) ja 91–96 (L3) kerge ahela varieeruv domeenis ja 26–32 (H1), 15 53–55 (H2) ja 96–101 (H3) raske ahela varieeruv domeenis; Chothia ja Lesk, *J. Mol. Biol.*, 1987 196: 901–917). Tavaliselt nummerdatakse selle piirkonna aminohappejäägid meetodi abil, mida on kirjeldanud Kabat *et al.*, eespool. Väljendid nagu „Kabati positsioon“ ja „Kabati jääk“ ning „Kabati järgi“ viitavad siin sellele raske ahela varieeruvate domeenide või kerge ahela varieeruvate domeenide numeratsioonisüsteemile. Kabati numeratsiooni 20 abil võib peptiidi tegelik lineaarne aminohappejärjestus sisaldada vähem või rohkem aminohappeid, mis vastavad raamistikku (FR) või varieeruva domeeni CDR-i lühendamisele või sellesse sisestamisele. Näiteks võib raske ahela varieeruv domeen hõlmata aminohappesisestusi (jäägid 52a, 52b ja 52c Kabati järgi) peale CDR H2 jääki 52 ja sisestatud jääke (nt jäägid 82a, 82b, ja 82c jne Kabati järgi) peale raske ahela FR- 25 jääki 82. Konkreetse antikeha jääkide Kabati numeratsiooni määramiseks joondatakse antikeha järjestuse homoloogsed piirkonnad Kabati järgi nummerdatud „standardse“ järjestusega.

[0051] Termin „raamistikupiirkonna“ või „FR-i“ jäägid tähistab VH või VL-i 30 aminohappejääke, mis ei sisaldu CDR-ides siin määratletud juhul.

[0052] Leiutisekohane antikeha võib sisaldada CDR-piirkonda ühest või enamast siin avaldatud spetsiifilisest antikehast, nagu näiteks CDR-piirkond, mis on valitud rühmast, kuhu kuuluvad SEQ ID NO: 15, 16, 19, 20, 23, 24, 27, 28, 31, 32, 35 või 36.

5 [0053] 1F34-antikehal on raske ahel järjestusega SEQ ID NO: 15 ja kerge ahel järjestusega SEQ ID NO: 16. Leiutisekohane antikeha võib sisaldada seda varieeruvat raske ahela järjestust ja/või seda varieeruvat kerge ahela järjestust. 1F36-antikehal on CDR-järjestused, mida esindavad aminohapped 31 kuni 35, 50 kuni 66 ja 98 kuni 108 järjestuses SEQ ID NO: 15 ja aminohapped 24 kuni 34, 51 kuni 56 ja 89 kuni 97
10 järjestuses SEQ ID NO: 16. Leiutisekohane antikeha võib sisaldada 1, 2, 3, 4, 5 või kõiki 6 neist CDR-järjestustest.

[0054] Leiutisekohane antikeha võib sisaldada: CDRH1 järjestust, mis vastab aminohappejääkidele 31 kuni 35 (SYWMN) järjestuses SEQ ID NO: 15, kusjuures üks
15 neist aminohappejääkidest võib olla asendatud teise aminohappejäägiga; ja/või CDRH2 järjestust, mis vastab aminohapetele 50 kuni 66 (MIHPSDSETRLNQKFKD) järjestuses SEQ ID NO: 15, kusjuures üks, kaks või kolm neist aminohappejääkidest võib olla asendatud teise aminohappejäägiga; ja/või CDRH3 järjestust, mis vastab aminohapetele 98 kuni 108 (DYSDYDGFAY) järjestuses SEQ ID NO: 15, kusjuures üks, kaks või kolm
20 neist aminohappejääkidest võib olla asendatud teise aminohappejäägiga.

[0055] Leiutisekohane antikeha võib sisaldada CDRL1 järjestust, mis vastab aminohappejääkidele 24 kuni 34 (RASQISDYLH) järjestuses SEQ ID NO: 16, kusjuures üks, kaks või kolm neist aminohappejääkidest võivad olla asendatud teise
25 aminohappejäägiga; ja/või CDRL2 järjestust, mis vastab aminohapetele 51 kuni 56 (ASQSIG) järjestuses SEQ ID NO: 16, kusjuures üks või kaks neist aminohappejääkidest võivad olla asendatud teise aminohappejäägiga; ja/või CDRL3 järjestust, mis vastab aminohapetele 89 kuni 97 (QNGHSFPLT) järjestuses SEQ ID NO: 16, kusjuures üks või kaks neist aminohappejääkidest võivad olla asendatud teise aminohappejäägiga.

30

[0056] 1F10-antikehal on raske ahel järjestusega SEQ ID NO: 19 ja kerge ahel järjestusega SEQ ID NO: 20. Leiutisekohane antikeha võib sisaldada seda varieeruvat raske ahela järjestust ja/või seda varieeruvat kerge ahela järjestust. 1F10-antikehal on

CDR-järjestused, mida esindavad aminohapped 31 kuni 35, 50 kuni 66 ja 99 kuni 109 järjestuses SEQ ID NO: 19 ja aminohapped 24 kuni 33, 49 kuni 55 ja 88 kuni 96 järjestuses SEQ ID NO: 20. Leiutisekohane antikeha võib sisaldada 1, 2, 3, 4, 5 või kõiki 6 neist CDR-järjestustest.

5

[0057] Leiutisekohane antikeha võib sisaldada CDRH1 järjestust, mis vastab aminohappejääkidele 31 kuni 35 (DYNMY) järjestuses SEQ ID NO: 19, kusjuures üks neist aminohappejääkidest võib olla asendatud teise aminohappejäägiga; ja/või CDRH2 järjestust, mis vastab aminohapetele 50 kuni 66 (YIDPYNGDTSYNQKFKG) järjestuses SEQ ID NO: 19, kusjuures üks, kaks või kolm neist aminohappejääkidest võivad olla asendatud teise aminohappejäägiga; ja/või CDRH3 järjestust, mis vastab aminohapetele 99 kuni 109 (GDYGNPFYLDY) järjestuses SEQ ID NO: 19, kusjuures üks, kaks või kolm neist aminohappejääkidest võivad olla asendatud teise aminohappejäägiga.

15 [0058] Leiutisekohane antikeha võib sisaldada CDRL1 järjestust, mis vastab aminohappejääkidele 24 kuni 33 (SVSSSVNYMY) järjestuses SEQ ID NO: 20, kusjuures üks, kaks või kolm neist aminohappejääkidest võivad olla asendatud teise aminohappejäägiga; ja/või CDRL2 järjestust, mis vastab aminohapetele 49 kuni 55 (DTSKLPS) järjestuses SEQ ID NO: 20, kusjuures üks või kaks neist aminohappejääkidest võivad olla asendatud teise aminohappejäägiga; ja/või CDRL3 järjestust, mis vastab aminohapetele 88 kuni 96 (QQWTSNPPT) järjestuses SEQ ID NO: 20, kusjuures üks või kaks neist aminohappejääkidest võivad olla asendatud teise aminohappejäägiga.

25 [0059] 1F105-antikehal on raske ahel järjestusega SEQ ID NO: 23 ja kerge ahel järjestusega SEQ ID NO: 24. Leiutisekohane antikeha võib sisaldada seda varieeruvat raske ahela järjestust ja/või seda varieeruvat kerge ahela järjestust. 1F105-antikehal on CDR-järjestused, mida esindavad aminohapped 31 kuni 35, 50 kuni 66 ja 99 kuni 108 järjestuses SEQ ID NO: 23 ja aminohapped 24 kuni 33, 49 kuni 55 ja 88 kuni 96 järjestuses SEQ ID NO: 24. Leiutisekohane antikeha võib sisaldada 1, 2, 3, 4, 5 või kõiki 6 neist CDR-järjestustest.

30

- 5 **[0060]** Leiutisekohane antikeha võib sisaldada CDRH1 järjestust, mis vastab aminohappejääkidele 31 kuni 35 (DTYIH) järjestuses SEQ ID NO: 23, kusjuures üks neist aminohappejääkidest võib olla asendatud teise aminohappejäägiga; ja/või CDRH2 järjestust, mis vastab aminohapetele 50 kuni 66 (RIDPANDDTKYDPNFQG) järjestuses SEQ ID NO: 23, kusjuures üks, kaks või kolm neist aminohappejääkidest võivad olla asendatud teise aminohappejäägiga; ja/või CDRH3 järjestust, mis vastab aminohapetele 99 kuni 108 (SDNSDSWFAY) järjestuses SEQ ID NO: 23, kusjuures üks, kaks või kolm neist aminohappejääkidest võib olla asendatud teise aminohappejäägiga.
- 10 **[0061]** Leiutisekohane antikeha võib sisaldada CDRL1 järjestust, mis vastab aminohappejääkidele 24 kuni 33 (SVSSSVNFMN) järjestuses SEQ ID NO: 24, kusjuures üks, kaks või kolm neist aminohappejääkidest võivad olla asendatud teise aminohappejäägiga; ja/või CDRL2 järjestust, mis vastab aminohapetele 49 kuni 55 (DTSKLAP) järjestuses SEQ ID NO: 24, kusjuures üks või kaks neist aminohappejääkidest võivad olla asendatud teise aminohappejäägiga; ja/või CDRL3 järjestust, mis vastab aminohapetele 88 kuni 96 (HQWSSYSLT) järjestuses SEQ ID NO: 24, kusjuures üks või kaks neist aminohappejääkidest võivad olla asendatud teise aminohappejäägiga.
- 20 **[0062]** 1F95-antikehal on raske ahel järjestusega SEQ ID NO: 27 ja kerge ahel järjestusega SEQ ID NO: 28. Leiutisekohane antikeha võib sisaldada seda varieeruvat raske ahela järjestust ja/või seda varieeruvat kerge ahela järjestust. 1F95-antikehal on CDR-järjestused, mida esindavad aminohapped 31 kuni 35, 50 kuni 66 ja 99 kuni 106 järjestuses SEQ ID NO: 27 ja aminohapped 24 kuni 33, 49 kuni 54 ja 87 kuni 95 järjestuses SEQ ID NO: 28. Leiutisekohane antikeha võib sisaldada 1, 2, 3, 4, 5 või kõiki 6 neist CDR-järjestustest.
- 30 **[0063]** Leiutisekohane antikeha võib sisaldada CDRH1 järjestust, mis vastab aminohappejääkidele 31 kuni 35 (DYNMH) järjestuses SEQ ID NO: 27, kusjuures üks neist aminohappejääkidest võib olla asendatud teise aminohappejäägiga; ja/või CDRH2 järjestust, mis vastab aminohapetele 50 kuni 66 (YVDPYDGGTSSNQKFKG) järjestuses SEQ ID NO: 27, kusjuures üks, kaks või kolm neist aminohappejääkidest võivad olla asendatud teise aminohappejäägiga; ja/või CDRH3 järjestust, mis vastab aminohapetele

99 kuni 106 (EVPYYFDY) järjestuses SEQ ID NO: 27, kusjuures üks, kaks või kolm neist aminohappejääkidest võivad olla asendatud teise aminohappejäägiga.

5 **[0064]** Leiutisekohane antikeha võib sisaldada CDRL1 järjestust, mis vastab aminohappejääkidele 24 kuni 33 (VASSSVTYMY) järjestuses SEQ ID NO: 28, kusjuures üks, kaks või kolm neist aminohappejääkidest võivad olla asendatud teise aminohappejäägiga; ja/või CDRL2 järjestust, mis vastab aminohapetele 49 kuni 54 (THPLAS) järjestuses SEQ ID NO: 28, kusjuures üks või kaks neist aminohappejääkidest võivad olla asendatud teise aminohappejäägiga; ja/või CDRL3 järjestust, mis vastab aminohapetele 87 kuni 95 (HQWSSYSLT) järjestuses SEQ ID NO: 28, kusjuures üks või kaks neist aminohappejääkidest võivad olla asendatud teise aminohappejäägiga.

15 **[0065]** 2F5-antikehal on raske ahel järjestusega SEQ ID NO: 31 ja kerge ahel järjestusega SEQ ID NO: 32. Leiutisekohane antikeha võib sisaldada seda varieeruvat raske ahela järjestust ja/või seda varieeruvat kerge ahela järjestust. 2F5-antikehal on CDR-järjestused, mida esindavad aminohapped 31 kuni 35, 50 kuni 66 ja 99 kuni 109 järjestuses SEQ ID NO: 31 ja aminohapped 24 kuni 33, 49 kuni 55 ja 88 kuni 96 järjestuses SEQ ID NO: 32. Leiutisekohane antikeha võib sisaldada 1, 2, 3, 4, 5 või kõiki 6 neist CDR-järjestustest.

20 **[0066]** Leiutisekohane antikeha võib sisaldada CDRH1 järjestust, mis vastab aminohappejääkidele 31 kuni 35 (DYMY) järjestuses SEQ ID NO: 31, kusjuures üks neist aminohappejääkidest võib olla asendatud teise aminohappejäägiga; ja/või CDRH2 järjestust, mis vastab aminohapetele 50 kuni 66 (AISDDSTYTYYPDSVKG) järjestuses SEQ ID NO: 31, kusjuures üks, kaks või kolm neist aminohappejääkidest võivad olla asendatud teise aminohappejäägiga; ja/või CDRH3 järjestust, mis vastab aminohapetele 99 kuni 109 (GGYGNLYAMDY) järjestuses SEQ ID NO: 31, kusjuures üks, kaks või kolm neist aminohappejääkidest võivad olla asendatud teise aminohappejäägiga.

30 **[0067]** Leiutisekohane antikeha võib sisaldada CDRL1 järjestust, mis vastab aminohappejääkidele 24 kuni 35 (TASSSVSSSYLH) järjestuses SEQ ID NO: 32, kusjuures üks, kaks või kolm neist aminohappejääkidest võivad olla asendatud teise aminohappejäägiga; ja/või CDRL2 järjestust, mis vastab aminohapetele 51 kuni 57 (STSNLAS) järjestuses SEQ ID NO: 32, kusjuures üks või kaks neist

aminohappejääkidest võivad olla asendatud teise aminohappejäägiga; ja/või CDRL3 järjestust, mis vastab aminohapetele 90 kuni 98 (HQYHRSPFT) järjestuses SEQ ID NO: 32, kusjuures üks või kaks neist aminohappejääkidest võivad olla asendatud teise aminohappejäägiga.

5

[0068] 2F7-antikehal on raske ahel järjestusega SEQ ID NO: 35 ja kerge ahel järjestusega SEQ ID NO: 36. Leiutisekohane antikeha võib sisaldada seda varieeruvat raske ahela järjestust ja/või seda varieeruvat kerge ahela järjestust. 2F5-antikehal on CDR-järjestused, mida esindavad aminohapped 31 kuni 35, 50 kuni 66 ja 99 kuni 109 järjestuses SEQ ID NO: 35 ja aminohapped 24 kuni 34, 50 kuni 56 ja 89 kuni 96 järjestuses SEQ ID NO: 36. Leiutisekohane antikeha võib sisaldada 1, 2, 3, 4, 5 või kõiki 6 neist CDR-järjestustest.

[0069] Leiutisekohane antikeha võib sisaldada CDRH1 järjestust, mis vastab aminohappejääkidele 31 kuni 35 (NYVMH) järjestuses SEQ ID NO: 35, kusjuures üks neist aminohappejääkidest võib olla asendatud teise aminohappejäägiga; ja/või CDRH2 järjestust, mis vastab aminohapetele 50 kuni 66 (WINPFNDGTNYNENFKN) järjestuses SEQ ID NO: 35, kusjuures üks, kaks või kolm neist aminohappejääkidest võivad olla asendatud teise aminohappejäägiga; ja/või CDRH3 järjestust, mis vastab aminohapetele 99 kuni 109 (SGFITTLIEDY) järjestuses SEQ ID NO: 35, kusjuures üks, kaks või kolm neist aminohappejääkidest võivad olla asendatud teise aminohappejäägiga.

[0070] Leiutisekohane antikeha võib sisaldada: CDRL1 järjestust, mis vastab aminohappejääkidele 24 kuni 34 (KASESVGSFVS) järjestuses SEQ ID NO: 36, kusjuures üks, kaks või kolm neist aminohappejääkidest võivad olla asendatud teise aminohappejäägiga; ja/või CDRL2 järjestust, mis vastab aminohapetele 50 kuni 56 (GASNRYT) järjestuses SEQ ID NO: 36, kusjuures üks või kaks neist aminohappejääkidest võivad olla asendatud teise aminohappejäägiga; ja/või CDRL3 järjestust, mis vastab aminohapetele 89 kuni 96 (GQYYTHPT) järjestuses SEQ ID NO: 36, kusjuures üks või kaks neist aminohappejääkidest võivad olla asendatud teise aminohappejäägiga.

30

[0071] Termin „antigeen“ (Ag) viitab molekulaariüksusele, mida kasutatakse immunokompetentse selgroogse immuniseerimiseks, et toota Ag-d ära tundev antikeha

(Ab). Siin on Ag defineeritud laiemalt ning üldiselt hõlmab sihitud molekule, mida Ab spetsiifiliselt ära tunneb, seega hõlmab ka fragmente või jäljendeid molekulist, mida kasutatakse Ab tootmiseks kasutatavas immuniseerimisprotsessis või muus protsessis, nt faagikuvas.

5

[0072] Termin „epitooop“ on siin kasutatuna defineeritud „antigeeni siduva polüpeptiidi“, nagu antikeha (Ab) ja sellele vastava antigeeni (Ag) vahelise molekulaarse interaktsiooni kontekstis. Üldiselt tähistab „epitooop“ Ag ala või piirkonda, mida Ab spetsiifiliselt seob, st Ab-ga füüsiliselt kokku puutuvat ala või piirkonda. Füüsiline kontakt võib olla defineeritud erinevate kriteeriumite abil (nt kauguspiirang 2–6 Å, nagu 3 Å, nagu 4 Å, nagu 5Å; või solvendi ligipääsetavus), mis kehtivad Ab ja Ag molekulide aatomitele. Valgu epitooop võib sisaldada Ag-s aminohappejääke, mis on otseselt kaasatud Ab-ga seondumisse (tuntud ka kui epitooobi immunodominantne komponent), ja teisi aminohappejääke, mis ei ole seondumisega otseselt seotud, nagu näiteks Ag aminohappejäägid, mida Ab blokeerib, nt Ab „solvendivaba pind“ ja „jalajälje“ aminohappejäägid.

[0073] Termin epitooop hõlmab siin kasutatuna mõlemat tüüpi seondumiskiirkondi mis tahes PGLYRP1 piirkonnas, mis spetsiifiliselt seondub PGLYRP1-antikehaga. PGLYRP1 võib sisaldada erinevaid epitoope, mille hulka võivad näiteks kuuluda (piiranguteta) kinnitavad epitoobid, mis koosnevad ühest või mitmest piirnevast aminohapest, mis paiknevad kypse PGLYRP1 konformatsioonis üksteise lähedal ja mille translatsioonijärgsed epitoobid koosnevad kas osaliselt või täielikult PGLYRP1-ga kovalentselt seotud molekulaarstruktuuridest, näiteks süsivesinikrühmadest. PGLYRP1 võib lisaks sisaldada lineaarseid epitoope.

[0074] Nimetatud antikeha (Ab) / antigeeni (Ag) paari epitooopi võib kirjeldada ja iseloomustada erineva üksikasjalikkusega erinevate katseliste ja arvutuslike epitooobi kaardistamise meetodite abil. Katseliste meetodite hulka kuuluvad mutagenees, röntgenkristallograafia, tuumamagnetresonants spektroopia (TMR), vesiniku deuteriumvahetuse massispektomeetria (HX-MS) ja erinevad konkureeriva seondumise meetodid; meetodid, mis on valdkonnas tuntud. Kuna iga meetod toetub unikaalsele põhimõttele, on epitooobi kirjeldus tugevalt seotud määratlemise meetodiga. Seega võib

Ab/Ag paari epitoopi kirjeldada mitut moodi, olenevalt kasutatud epitoobi kaardistamise meetodist.

5 [0075] Kõige üksikasjalikumal tasandil võib Ag ja Ab vahelise interaktsiooni jaoks vajalikku epitoopi kirjeldada Ag-Ab interaktsiooni aatomikontaktide koordinaatide kaudu ning nende suhtelise panuse kaudu seondumise termodünaamikasse. Vähem üksikasjalikul tasandil võib epitoopi iseloomustada koordinaatide kaudu, mis määravad Ag ja Ab aatomikontakte. Veel vähem üksikasjalikul tasandil võib epitoopi iseloomustada selles sisalduvate aminohappejääkide kaudu, mis on määratletud spetsiifiliste kriteeriumite järgi

10 nagu Ab:Ag kompleksi aatomite vaheline kaugus või solvendi ligipääs selle aatomitele. Veel vähem üksikasjalikul tasandil võib epitoopi iseloomustada funktsiooni kaudu, nt seondumise konkurents teiste Ab-dega. Epitooop võib olla määratletud üldisemalt aminohappejääkide sisalduse kaudu, kus mõne aminohappe asendus muudab Ab ja Ag interaktsiooni tingimusi.

15

[0076] Röntgenmeetodil saadud kristallstruktuuri, mida määratletakse Ab, nt Fab-fragmendi, ja selle Ag vaheliste koordinaatide kaudu, ja juhul, kui kontekst pole vastuolus või pole täpsustatud teisiti, mõistetakse siin epitoopi spetsiifiliselt kui PGLYRP1 jääki, mida iseloomustab raske aatomi (nt muu kui vesiniku aatomi) paiknemine 2–6 Å, näiteks

20 3 Å, näiteks 4 Å, näiteks 5 Å kaugusel Ab raskest aatomist.

25

[0077] Kuna olenevalt epitoobi kaardistamise meetodist saadakse erineva detailsustasemega epitooopide kirjeldused, on võimalik ka sama Ag erinevaid Ab epitoope võrrelda erineva üksikasjalikkusega.

30

[0078] Aminohappetasemel kirjeldatud epitoobid, nt röntgenstruktuuri abil tuvastatud, on identsed, kui need sisaldavad samu aminohappejääke. Epitoobid on kattuvad, kui epitoobid jagavad vähemalt üht aminohapet. Epitoobid on erinevad (unikaalsed), kui need ei jaga ühtegi aminohappejääki.

[0079] Termin „paratooop“ määratlus tuletatakse ülal toodud epitoobi määratlusest vastupidise perspektiiviga. Seega tähistab termin „paratooop“ Ab ala või piirkonda, mida Ag spetsiifiliselt seob, st Ag-ga füüsiliselt kokku puutuvat ala või piirkonda.

[0080] Kui röntgenmeetodil saadud kristallstruktuuri, mida määratletakse Ab, nt Fab-fragmendi, ja selle Ag vaheliste koordinaatide kaudu, ja juhul, kui kontekst pole vastuolus või pole täpsustatud teisiti, mõistetakse siin paratoopi spetsiifiliselt kui Ag jääki, mida iseloomustab raske aatomi (nt muu kui vesiniku aatomi) paiknemine 4 Å kaugusel PGLYRP1 raskest aatomist.

[0081] Antikeha (Ab) / antigeeni (Ag) paari epitoopi ja paratoopi on võimalik kindlaks määrata tavapäraste meetoditega. Näiteks võib epitoobi üldise asukoha kindlaks teha, kui hinnata antikeha võimet seonduda erinevate fragmentide või PGLYRP1 polüpeptiidide variantidega. PGLYRP1 spetsiifilised aminohapped, mis puutuvad kokku antikehaga (epitoobiga) ja spetsiifilised aminohapped antikehas, mis puutuvad kokku PGLYRP1-ga (paratoobiga) on samuti võimalik kindlaks määrata tavapäraste meetoditega. Näiteks võib kombineerida antikeha ja sihtmolekuli ning kristalliseerida Ab:Ag kompleksi. Kompleksi kristallstruktuuri on võimalik kindlaks määrata ning kasutada antikeha ja selle sihtmärgi spetsiifiliste interaktsioonisaitide määratlemiseks.

[0082] Sama antigeeniga seonduvaid antikehi võib iseloomustada lähtudes nende võimest seonduda samal ajal sama antigeeniga ning neid võib analüüsida konkureeriva seondumise / rühmitamise meetoditega. Selles kontekstis viitab „rühmitamine“ meetodile, mille raames rühmitatakse sama antigeeniga seonduvad antikehad. Antikehade „rühmitamine“ võib oleneda nende sama antigeeniga seondumise konkurentsist analüüsidest, mis põhinevad tavapärastel tehnikatel nagu pinna plasmonresonants (SPR, ingl *surface plasmon resonance*), ELISA või voolutsütomeetria.

[0083] Antikeha „rühm“ määratakse võrdlusantikeha järgi. Kui teine antikeha ei saa seonduda antigeeniga samal ajal võrdlusantikehaga, kuulub teine antikeha samasse rühma kui võrdlusantikeha. Sellisel juhul seonduvad võrdlusantikeha ja teine antikeha konkureerivalt antigeeni sama osaga ning neid nimetatakse „konkureerivateks antikehadeks“. Kui teine antikeha saab antigeeniga seonduda samal ajal võrdlusantikehaga, kuulub teine antikeha teise „rühma“. Sellisel juhul ei konkureeri teine antikeha ja võrdlusantikeha üksteisega antigeeni sama osaga seondumisel ning neid nimetatakse „mittekonkureerivateks antikehadeks“.

[0084] Antikeha „rühm“ ei anna otsest informatsiooni epitoobi kohta. Konkureerivatel antikehadel ehk samasse „rühma“ kuuluvatel antikehadel võivad olla identsed epitoobid, kattuvad epitoobid või isegi eraldi epitoobid. Viimasel juhul hõivab epitoobiga seondunud võrdlusantikeha antigeenil ruumi, mis on vajalik teise antikeha ja epitoobi kontaktiks
5 („steriline takistus“). Mittekonkureerivatel antikehadel on üldjuhul eraldi asetsevad epitoobid.

[0085] Leiutisekohane antikeha võib 1F10-ga võistelda PGLYRP1-ga seondumise suhtes. Leiutisekohane antikeha võib 1F36/mAb 0182-ga võistelda PGLYRP1-ga seondumise
10 suhtes. Leiutisekohane antikeha võib 1F95-ga võistelda PGLYRP1-ga seondumise suhtes. Leiutisekohane antikeha võib 1F105/mAb 0184-ga võistelda PGLYRP1-ga seondumise suhtes. Leiutisekohane antikeha võib 2F5-ga võistelda PGLYRP1-ga seondumise suhtes. Leiutisekohane antikeha võib 2F7-ga võistelda PGLYRP1-ga seondumise suhtes. Seega võib leiutisekohane antikeha kuuluda samasse rühma kui mis tahes üks või enam
15 nimetatud antikeha.

[0086] Termin „seondumisafiinsus“ tähistab siin kahe molekuli, nt antikeha või selle fragmendi ning antigeeni vahelise mittekovalentse interaktsiooni tugevust. Terminit „seondumisafiinsus“ kasutatakse monovalentse interaktsiooni (iseloomuliku aktiivsuse)
20 kirjeldamiseks.

[0087] Kahe molekuli, nt antikeha või selle fragmendi ning antigeeni vahelist seondumisafiinsust monovalentse interaktsiooni kaudu on võimalik määrata tasakaalulise dissotsiatsioonikonstandi (K_D) määramise teel. K_D võib omakorda kindlaks määrata
25 kompleksi moodustumise ja dissotsieerimise kineesi teel, nt SPR-meetodi abil. Monovalentse kompleksi moodustumise ning dissotsieerumise konstantidele viidatakse kui assotsieerumise kiiruskonstant k_a (või k_{on}) ja dissotsieerumise kiiruskonstant k_d (või k_{off}). K_D on seotud k_a -ga ja k_d -ga võrrandi $K_D = k_d / k_a$ kaudu.

[0088] Eelnenud definitsiooni kohaselt võib erinevate molekulaarsete interaktsioonidega seotud seondumisafiinsusi, näiteks antigeeni erinevate antikehade seondumisafiinsusi, võrrelda selle antikeha/antigeeni kompleksi K_D väärtustega.

[0089] Leiutisekohasel PGLYLRP1-antikehal võib olla selle sihtmärgi (PGLYRP1) suhtes KD 1×10^{-6} M või väiksem, 1×10^{-7} M või väiksem, 1×10^{-8} M või väiksem, või 1×10^{-9} M või väiksem, või 1×10^{-10} M või väiksem, 1×10^{-11} M või väiksem, 1×10^{-12} M või väiksem või 1×10^{-13} M või väiksem.

5

[0090] Leiutisekohane antikeha võib konkureerida PGLYRP1-ga seondumisel teise molekuliga, nagu loomulikult esinev ligand või retseptor või teine antikeha. Seega võib leiutisekohane antikeha seonduda PGLYRP1-ga suurema afiinsusega kui teine molekul, mis on võimeline PGLYRP1-ga seonduma. Antikeha võimet antigeeniga seondumisel konkureerida loomulikult esineva ligandi/retseptoriga võib hinnata KD väärtuste määramise ja võrdlemise teel huvialuses interaktsioonis, näiteks antikeha ja antigeeni vahelise spetsiifilise interaktsiooni põhul, kusjuures KD väärtus tuleb interaktsioonist, mis pole huvialune.

[0091] Termin „seundumisspetsiifilisus“ tähistab siin molekuli, nagu näiteks antikeha või selle fragmendi interaktsiooni ühe eksklusiivse antigeeni või piiratud arvu kõrge homoloogusega antigeenidega (või epitoopidega). Antikehad, mis on võimelised PGLYRP1-ga spetsiifiliselt seonduma, ei ole võimelised siduma erinevaid molekule. Leiutisekohased antikehad ei pruugi olla võimelised siduma PGLYRP perekonda kuuluvaid molekule, nagu PGLYRP2, PGLYRP3 ja PGLYRP4. Leiutisekohased antikehad ei pruugi olla võimelised siduma inimese PGLYRP perekonda kuuluvaid molekule, nagu inimese PGLYRP2, inimese PGLYRP3 ja inimese PGLYRP4.

[0092] Interaktsiooni spetsiifilisus ja tasakaalulise seundumiskonstandi väärtus on võimalik kindlaks määrata valdkonnas tuntud meetodite abil. Standardsed analüüsid selleks, et hinnata ligandite (nagu antikehade) võimet oma sihtmärki siduda, on valdkonnas tuntud ning nende hulka kuuluvad näiteks ELISA, immunoblotanalüüsid, RIA-d ja voolutsütomeetriaanalüüs. Seundumiskineetikat ja antikeha seundumisafiinsust on samuti võimalik hinnata valdkonnas tuntud standardsete analüüside, näiteks SPR-i abil.

30

[0093] Teha võib konkureeriva seundumise analüüsi, kus võrreldakse antikeha seundumist sihtmärgiga ja sihtmärgi seundumist muu ligandiga, näiteks teise antikehaga.

[0094] Veel ühes aspektis pakutakse leiutisega kompositsioonid ja preparaadid, mis sisaldavad leiutisekohaseid molekule, näiteks eelkirjeldatud PGLYRP1-antikehad, polünukleotiidid, vektorid ja rakud. Näiteks pakutakse leiutisega farmatseutiline kompositsioon, mis sisaldab üht või mitut leiutisekohast PGLYRP1-antikeha koos

5 farmatseutiliselt vastuvõetava kandjaga.

[0095] Seega on leiutise üks eesmärk pakkuda farmatseutilist kompositsiooni, mis sisaldab sellist PGLYRP1-antikeha, mille kontsentratsioon oleks 0,25 mg/ml kuni 250 mg/ml, ja kusjuures nimetatud kompositsiooni pH oleks vahemikus 2,0 kuni 10,0. Preparaat võib

10 lisaks sisaldada üht või mitut puhversüsteemi, säilitusainet, toonilisust reguleerivat ainet, kelaativat ainet, stabilisaatorit või pindaktiivset ainet või nende erinevaid kombinatsioone. Säilitusainete, isotoonsete ainete, kelaativate ainete, stabilisaatorite ja pindaktiivsete ainete kasutus farmatseutilistes kompositsioonides on asjatundjale teada. Viidata võib teosele „Remington: The Science and Practice of Pharmacy“, 19. väljaanne, 1995.

15

[0096] Ühes teostuses on farmatseutiline preparaat veepõhine preparaat. Selline preparaat on tavaliselt lahus või suspensioon, ent nende hulka võivad kuuluda ka kolloidid, dispersioonid, emulsioonid ja mitmefaasilised materjalid. Termin „veepõhine preparaat“ tähistab preparaati, mis sisaldab vähemalt 50 massiprotsenti vett. Samuti tähistab ka

20 termin „vesilahus“ lahust, mis sisaldab vähemalt 50 massiprotsenti vett, ning termin „vesisuspensioon“ suspensiooni, mis sisaldab vähemalt 50 massiprotsenti vett.

25

[0097] Veel ühes teostuses on farmatseutiline preparaat kuivkülmutatud preparaat, millele arst või patsient lisab enne kasutamist lahustit ja/või lahjendusvedelikku.

30

[0098] Ühes täiendavas aspektis sisaldab farmatseutiline kompositsioon sellise antikeha vesilahust ja puhvrit, kusjuures antikeha kontsentratsioon on 1 mg/ml või suurem ning kusjuures preparaadi pH on vahemikus ligikaudu 2,0 kuni 10,0.

[0099] Leiutisekohaseid PGLYRP1-antikehi ja selliseid antikehi sisaldavaid farmatseutilisi kompositsioone võib kasutada põletikuliste haiguse ravis, mille hulka kuuluvad haigused, nagu näiteks põletikuline soolehaigus (IBD), Crohni tõbi (CD, ingl *Crohns disease*), haavandiline koliit (UC, ingl *ulcerative colitis*), sooleärritussündroom,

reumatoidartriit (RA), psoriaas, psoriaatiline artriit, süsteemne erütematoosne luupus (SLE, ingl *systemic lupus erythematosus*), nefriitluupus, I tüüpi diabeet, Gravesi tõbi, polüsklerooos (MS, ingl *multiple sclerosis*), autoimmuunne müokardiit, Kawasaki tõbi, koronaararteri haigus, krooniline obstruktiivne kopsuhaigus, inerstitiaalne kopsuhaigus, autoimmuunne türeoidiit, sklerodermia, süsteemne sklerooos, osteoartriit, atoopiline dermatiit, vitiliigo, hülgamisreaktsioon, Sjögreni tõbi, autoimmuunne nefriit, Goodpasture'i sündroom, krooniline põletikuline demüeliniseeriv polüneuropaatia, allergiad, astma ja teised autoimmuunhaigused, mis tulenevad kas akuutsest või kroonilisest põletikust. Leiutisekohaseid PGLYRP1-antikehi ja neid sisaldavad farmatseutilisi kompositsioone võib kasutada ka südame- ja veresoonkonna haiguste, insuldi, isheemilise reperfusioonivigastuse, kopsupõletiku, sepsise ja vähi ravis.

[0100] Leiutisekohased PGLYRP1-antikehad sobivad kasutamiseks põletikulise soolehaigusega indiviidide ravimiseks. Põletikuline soolehaigus (IBD) on haigus, mis võib mõjutada kõiki seedetrakti osi suust pärakuni ning põhjustada mitmeid sümptomeid. IBD põhjustab peamiselt valu kõhus, kõhulahtisust (võib esineda veritsust), oksendamist, kaalukaotust, kuid võib põhjustada komplikatsioone ka väljaspool seedetrakti, nagu näiteks nahalööbed, artriit, silmapõletik, väsimus ja keskendumisraskused. Patsiendid, kellel on IBD, võib jagada kahte suuremasse rühma: need, kellel on haavandiline koliit (UC) ja need, kellel on Crohni tõbi (CD). Kuigi CD mõjutab üldiselt niudesoolt ja käärsoolt, võib see mõjutada ka soolestiku muid piirkondi, kuid mitte pidevalt (haiguskolded levivad soolestikus), UC mõjutab alati pärakut (käärsool) ja on pidevam. CD puhul on põletik transmuraalne, mis viib mädanike, fistulite ja ahendite tekkeni, ent UC puhul piirdub põletik üldiselt limaskestaga. Crohni tõve välja ravimiseks pole ühtki teadaolevat farmatseutilist või kirurgilist vahendit, ent UC-d on võimalik välja ravida kirurgiliselt käärsoole eemaldamise teel. Ravivõimalused piirduvad sümptomite kontrolli all hoidmise ja haiguse taastekke ennetamisega. Kliinilist efektiivsust põletikulise soolehaiguse ravis võib mõõta Crohni tõve aktiivsuseindeksi (CDAI, ingl *Crohn's Disease Activity Index*) CD skoori languse kaudu, kus tulemus põhineb analüüsidel ja elukvaliteeti puudutaval küsimustikul. Loommudelites mõõdetakse efektiivsust peamiselt kaalutõusu ja haiguse aktiivsuseindeksi (DAI, ingl *disease activity index*) kaudu, kus võetakse arvesse rooja konsistentsi, kaalu ja veritsust roojas.

- [0101]** Leiutisekohased PGLYRP1-antikehad sobivad kasutamiseks reumatoidartriidi ravis. Reumatoidartriit (RA) on süsteemne haigus, mis mõjutab kogu keha ja on kõige levinum artriidi vorm. Seda iseloomustab liigeste põletikulisus, mis põhjustab valu, jäikust, kuumamist, punetust ja paistetust. See põletik tekib põletikuliste rakkude
- 5 pääsemisel liigestesse, kus need vabastavad ensüüme, mis võivad lõhustada luu- ja kõhrkude. Seetõttu võib selline põletik oluliselt kahjustada luid ja kõhre ning põhjustada muu hulgas liigeste seisukorra halvenemist ja tugevat valu. Põletikuline liiges võib kaotada oma kuju ning õige asendi, mille tulemuseks on valu ning liikumisvõime langus.
- [0102]** Valdkonnas tuntakse mitut reumatoidartriidi loomumudelit. Näiteks kollageenindutseeritud artriidi (CIA, ingl *collagen-induced arthritis*) mudeli puhul areneb hiirtel krooniline põletikuline artriit, mis sarnaneb suurel määral inimese reumatoidartriidiga. Kuna CIA-l ja RA-l on sarnased immunoloogilised ja patoloogilised omadused, on CIA sobiv mudel potentsiaalselt ka inimeste põletikuvastaste ühendite sõelumiseks. Mudeli
- 15 efektiivsust hinnatakse liigese paistetuse alanemise põhjal. RA-d mõjutavat kliinilist aktiivsust hinnatakse patsientide sümptomite vähenemise kaudu, sh liigeste paistetuse, erütrotsüütide ladestumise kiirus, C-reaktiivsete valkude tasemed ja seerumifaktorite tasemed, nagu näiteks tsitrulliinitud valgu vastased antikehad.
- [0103]** Leiutisekohased PGLYRP1-antikehad sobivad kasutamiseks psoriaasi ravis. Psoriaas on T-rakkude vahendatud nahapõletik, mis võib põhjustada suuri ebamugavusi. Tegu on haigusega, mida pole võimalik välja ravida ning mis mõjutab igas vanuses inimesi. Kuigi inimesed, kellel on psoriaasi kergem vorm, saavad haigust toopiliste vahenditega kontrolli all hoida, on maailmas üle miljoni patsiendi, kes vajavad
- 25 ultravioletvalgusravi või süsteemset immunosupressioonravi. Kahjuks pole ultravioletvalgusravi ebamugavuse ja riskide tõttu ning paljud teraapiad toksilisuse tõttu sobivad pikaajaliseks kasutamiseks. Lisaks tuleb psoriaas tavaliselt tagasi ning mõnedel juhtudel juba varsti pärast immunosupressioonteraapia lõpetamist. Hiljuti välja arendatud CD4⁺ T-rakkude ülekandel põhinev psoriaasimudel matkib mitmeid inimese psoriaasi
- 30 aspekte ning seega on seda võimalik kasutada psoriaasi ravimiseks sobilike ühendite tuvastamiseks (Davenport *et al.*, *Internat. Immunopharmacol* 2: 653–672, 2002). Selles mudelis hinnatakse efektiivsust naha patoloogiate vähenemise kaudu punktisüsteemi abil. Samuti hinnatakse naha patoloogiate vähenemise kaudu ravi efektiivsust ka patsientides.

[0104] Leiutisekohased PGLYRP1-antikehad sobivad kasutamiseks psoriaatilise artriidi ravis. Psoriaatiline artriit (PA) on põletikuline artriit, mis võib esineda psoriaasiga patsientidel. Nendel patsientidel esineb lisaks naha patoloogiatele/sümptomitele ka liigeste paistetust, mis sarnaneb reumatoidartriidi sümptomile. See põhjustab laigulisi, esilekerkivaid, punaseid põletikulisi laike nahal, mis hakkab kooruma. Psoriaas mõjutab tihti küünarnukke ja põlvi, peanahka, naba, suguelundite või päraku ümbrust. Ligikaudu 10% psoriaasiga patsientidest esineb haigusega seotud liigesepõletik.

[0105] Termin „ravi“ tähistab siin seda vajava inimesele või teist liiki loomale osutatavat meditsiinilist teraapiat. Eeldatakse, et ravialuse on läbi vaadanud arst või veterinaararst, kes on pannud esialgse või kindla diagnoosi, mis näitaks, et nimetatud ravi rakendamine on selle inimese või teist liiki looma tervislikule seisundile kasulik. Ravi aeg ja eesmärk võib olenevalt ravialusest erineda ja sõltub erinevatest teguritest, näiteks ravialuse tervislikust seisundist. Seega võib ravi olla profülaktiline, leevendav, sümptomaatiline ja/või raviv.

[0106] Leiutise kontekstis võivad profülaktilised, leevendavad, sümptomaatilised ja/või ravimeetmed esindada leiutise erinevaid aspekte.

[0107] Leiutisekohast antikeha võib manustada parenteraalselt, näiteks veenisiseselt, näiteks lihasesiseselt, näiteks nahaaluselt. Muul juhul võib leiutisekohast antikeha manustada ka mitte-parenteraalsel teel, näiteks suu kaudu või toopiliselt. Leiutisekohast antikeha võib manustada profülaktiliselt. Leiutisekohast antikeha võib manustada terapeutiliselt (nõudmisel).

25

NÄITED

Näide 1: BWZ.36 inimese REM-1:DAP12 stabiilse rakuliini tootmine

[0108] Rakuliin BWZ.36/hTREM-1:DAP12:NFAT-LacZ (siin ka BWZ/hTREM-1-reporterrakk) saadi BW5147 T-rakkudest (*Mus musculus*'e harknäärme lümfoomi rakuliin, ATCC TIB-47, LGC Standards, Middlessex, UK) ja sisaldab LacZ-i reporterkonstrukti, mida reguleerivad neli NFAT promootorelemendi koopiat (vt Karttunen, J. & Shastri, N.

(1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3972–3976 ja Fiering, S., Northrop, J. P., Nolan, G. P., Matilla, P., Crabtree, G. R. & Herzenberg, L. A. (1990) *Genes Dev.* 4: 1823-1834). Vektor TREM/DAP12/pMX-IRES (mis kodeerib 786 bp TREM-1) Smal saidist BamHI saidini, mille puhul kasutatakse matriitsina TREM-1 cDNA-d (Gene Bank ID:NM_018643.2, Sino Biological Inc., Beijing, Hiina) ning oligonukleotiide 5'-TAGTAGGGATCCGCTGGTGCACAGGAAGG (SEQ ID NO: 51) ja 5'-TAGTAGGCGCCGCTTCGTGGGCCTAGGGTAC (SEQ ID NO: 52) praimeritena, klooniti vektorisse pIRES_{hyg} GenBanki registreerimisnumbriga U89672 (kat-nr 6061-1, Clontech Laboratories, CA, USA), transfekteeeriti PLAT-E pakkimise rakuliini (W. Yokoyama, Washington University; alternatiivselt, kat-nr RV-101, Cell Biolabs Inc, Bio-Mediator KY, Vantaa, Soome) transfekteeerimisreagenti Superfect (kat- no 301305, Qiagen Nordic, Taani) abil. TREM/DAP12/pMX-IRES viirusosi sisaldavaid PLAT-E supernatante kasutati BWZ.36-rakkude nakatamiseks järgnevalt: 2×10^5 BWZ.36-rakku kasvatati 6-süvendilistes plaatides ning sööde asendati 1,5 ml viirusosakesi sisaldava supernatandiga, mis sisaldas 8 mg/ml polübreeni. 6–8 tunni pärast lisati süvendisse 1,5 ml tavapärasest söödelt ning rakke inkubeeriti veel 24 tundi. TREM-1 stabiilselt ekspresseerivad BWZ.36-rakuliinid märgistati TREM-1-vastase monokloonse antikehaga (kloon 21C7; Bouchon *et al.*, 2000, *J.Immunol*vol. 164 lk 4991–4995) ja eraldati raku sortimise teel.

20 Näide 2. Bioanalüüsi loomine TREM-1 ligandit ekspresseerivate rakkude tuvastamiseks

[0109] TREM-1 reporterrakuliin loodi NFAT-lacZ-d kandva BWZ.36 rakuliini hTREM-1 ja DAP12-ga transfekteeerimise teel (Sanderson S, *Int. Immun.* 1994) nagu kirjeldatud näites 1. See BWZ.36/hTREM-1:DAP12:NFAT-LacZ rakuliin (siin ka: BWZ/hTREM-1 reporterrakk) on väga reaktiivne antikeha-vahendatud TREM-1 linkimisele, andes võrreldes kontrollisotüübiga tulemuseks ligikaudu 40-kordse induktsiooni NFAT-aktiveeritud LacZ tootluses, kui seda stimuleeritakse 1-10 µg/ml süvendiga seotud kaubanduslikult saadaoleva anti-TREM-1 antikehaga. NFAT-aktiveeritud LacZ-i tootlust reporterrakkudes võib analüüsida luminesentsil põhineva komplektiga Beta Glow™ (Promega E4720, Madison, WI). Plaadid kaeti kontrollisotüübi või TREM-1 MAB1278-ga (konts. 3 µg/ml PBS-is, 100 µl/süvend) (R&D Systems, Minneapolis, USA) temperatuuril 4 °C 16 tunniks või temperatuuril 37 °C 2 tunniks, 5 % CO₂ juuresolekul, ja

BWZ/hTREM-1-reporterrakud eemaldati 10 ml Versene'i (katalooginumber 15040, Gibco, Carlsbad CA, USA) lisamisega, tsentrifuugiti kiirendusel 400 g 5 minutit ja loputati PBS-is ja söötmes (RPMI-1640 ilma fenoolpunaseta); kat-nr 11835 Gibco, Carlsbad CA, USA) enne kaetud plaatidele lisamist (1×10^6 rakku/ml, 4×10^4 rakku süvendi kohta) kogumahuni 100 μ l ja inkubeeriti üle öö (16–20 tundi) 37 °C, 5 % CO₂ juuresolekul.

[0110] Neid TREM-1-reaktiivseid rakke kasutati TREM-1 ligandit ekspresseerivate rakkude tuvastamiseks. Üks selline rakutüüp on täisverest saadud neutrofiilid. Heas tervislikus seisundis doonoritelt saadud neutrofiilid puhastati Ficolli ja dekstraani sadestusega ning neid stimuleeriti PGN-iga (Invivogen, tlr-pgnsa, SanDiego, CA, USA) üle öö. Põgusalt lisati aktiveeritud neutrofiilikultuuridele BWZ/hTREM-1 reporterrakud, vahekorras 1 : 3, reporterrakk:neutrofiilid. Analüüs tehti polü-D-lüsiiniga kaetud mustadel rakukultuuriplaatidel (nr 356640, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). TREM-1 aktivatsiooni loeti pärast 24-tunnist kultiveerimist reaktiiviga BetaGlo (E4720, Promega, Madison, WI, USA) ja luminesstsents mõõdeti Perkin Elmeri loenduriga TopCount Luminescence.

[0111] *Vitro* stimuleeritud neutrofiilidel oli ligand, mis oli võimeline indutseerima TREM-1 signaliseerimist ning heas tervislikus seisundis doonorite täisverest saadud neutrofiilid puhastati dekstraansadestusega ning neid stimuleeriti üle öö mitmete reaktiividega. Ainus reaktiiv, mis oli võimeline neutrofiilides TREM-1-reaktiivset signaali stimuleerima, oli PGN-SA (Invivogen, tlr-pgnsa, SanDiego,CA,USA), mis matkib rakkude bakteriaalset aktivatsiooni. Neid aktiveeritud neutrofiile kasutati seejärel reporterrakuliini BWZ/hTREM-1 stimuleerimiseks rakkude koos kultiveerimise teel. Põgusalt lisati aktiveeritud neutrofiilikultuuridele BWZ/hTREM-1 reporterrakud, vahekorras 1 : 3, reporterrakk:neutrofiilid. Analüüs tehti polü-D-lüsiiniga kaetud mustadel rakukultuuriplaatidel (nr 356640, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). TREM-1 aktivatsiooni loeti pärast 24-tunnist kultiveerimist reaktiiviga BetaGlo (E4720, Promega, Madison, WI, USA) ja luminesstsentsi mõõdeti loenduriga TopCount Luminescence (Perkin Elmer, Waltham MA, USA). Nagu nähtub jooniselt fig 1, täheldati PGN-stimuleeritud neutrofiilidega kooskultiveeritud BWZ/hTREM-1-rakkudes olulist reporteraktiivsuse indutseerumist. See induktsioon sõltus tugevalt neutrofiili

aktivatsioonist. Puhkeseisundis neutrofiilide (2. tulba neutrofiilid) puhul ei täheldatud reaktsiooni. Samuti ei täheldatud reaktsiooni ka BWZ/hTREM-1-reporterrakkude stimuleerimisel PGN-SA-ga TLRL-kokteilis ilma neutrofiilideta (tulp 1-TLRL), mis näitab, et reaktsioon ei ole ainult PGN-i otsese mõju tulemus. Ka neutrofiilide aktivatsioon 5 tsütokiinkokteilidega (3. ja 4. tulp neutrofiilid + tsütokiinid) ei andnud õiget TREM-1 aktivatsioonisignaali.

Näide 3. Lahustuva TREM-1 seandumine PGN-aktiveeritud neutrofiilidega

10 [0112] PGN-iga stimuleeritud neutrofiilid olid võimelised TREM-1 aktivatsiooni indutseerima, mis tähendab, et PGN-stimuleeritud kultuurides on TREM-1 stimuleeriv faktor. Neutrofiilil TREM-1-ga interaktsioonis oleva valguga olemasolu kinnitamiseks märgistati PGN-stimuleeritud neutrofiilid rekombinantse TREM-1-tetrameerse valguga ning analüüsiti voolutsütomeetria abil. Granulotsüüdid eraldati firmalt Astarte Biologics 15 (Redmond, WA, USA) saadud täisverest Ficoll-dekstraan-sadestamise meetodi abil. Veri kihistati FicollPaque (17-0840-03, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) gradiendis suhtega 3 osa Ficoll ja 4 osa verd 50 ml tuubis ning tsentrifuugiti katkematult kiirendusel $100 \times g$ temperatuuril $22 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 minutit. Vahepealne PBMC võeti eemaldati ettevaatlikult aspiratsiooni teel. Pakitud RBC-l kihistatud granulotsüüdid aspireeriti ning kanti üle 50 ml 20 polüpropüleentuubi. Granulotsüüdid ning saastavad RBC-d lahjendati koguseni 40 ml $1 \times$ PBS-iga ning neile lisati seejärel PBS-i lahuses 10 ml 4% DEXTRAN 500 (Sigma, 31392, St Louis, MO, USA). Pärast tuubi segamist ettevaatlikult ümber pööramise teel kanti granulotsüüdirikas supernatant puhtasse tuubi ning tsentrifuugiti kiirendusega $250 \times g$ temperatuuril $22 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 minutit; supernatant aspireeriti ning visati ära. Saastavad RBC-d 25 eemaldati osmootse lüüsimise teel, rakupellet resuspendeeriti 7,5 ml 0,2% naatriumkloriidis; segati õrnalt 55–60 sekundit ja sellele lisati 17,5 ml 1,2% naatriumkloriidilahust. Seejärel suurendati kogus PBS-iga 50 milliliitriks ning tsentrifuugiti kiirendusega $250 \times g$ 5 minutit, pellet resuspendeeriti 7,5 ml 0,2% naatriumkloriidis, et lüüsimist korrata. Lõplik granulotsüütide pellet resuspendeeriti RPMI-s / 10% FBS-is.

30

[0113] Eraldatud granulotsüüte kultiveeriti tihedusega $3,8 \times 10^6/\text{ml}$ RPMI / 10% FBS + 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PGN-SA (Invivogen tlr1-pgnsa, San Diego, CA, USA) segus 7 päeva. Rakud sadestati tsentrifuugimise teel ning resuspendeeriti väärvimiseks PBS-is / 2% FBS-is.

Resuspendeeritud granulotsüüdid kanti seejärel 96-süvendilisele plaadile (ümara põhjaga) tihedusega 100 000/süvend koos või ilma 2 µg/ml sondita, koos või ilma 100 µg/ml (50×) spetsiifilise või ebaolulise konkureeriva valguta. Rakke inkubeeriti sondi/konkurendiga mahus 50 µl süvendi kohta temperatuuril 4 °C 1 tund. Inkubeerimisaja lõpus lisati 150 µl

5 PBS-i / 2% FBS-i süvendi kohta ja rakud sadestati. Sadestatud rakud resuspendeeriti 50 µl kitse hFc-vastase F(ab')₂/PE konjugaadis süvendi kohta (Jackson ImmunoResearch 109-116-098, West Grove, PA, USA) ja inkubeeriti temperatuuril 4 °C 30 minutit. Lisati 150 µl PBS-i / 2% FBS-i süvendi kohta ning rakud sadestati. Sadestatud rakud loputati 200 µl PBS-is / 2% FBS-is süvendi kohta ja sadestati. Loputatud rakud resuspendeeriti 100 µl

10 fiksaatoris (1 : 1 PBS:Cytofix. 554655, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) ja neid inkubeeriti 5 minutit toatemperatuuril. Fikseeritud rakkudele lisati 100 µl PBS-i / 2% FBS-i ning seejärel rakud sadestati. Märjastatud/fikseeritud rakud resuspendeeriti 100 µl PBS-is / 2% FBS-is voolutsütomeetria analüüsiks voolutsütomeetriga LSR II. (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

15

Proovide komplekt:

Fc mut	5,36 mg/ml)	SEQ ID NO: 3
hTREM-1tet/Fc mut	1,07 mg/ml)	SEQ ID NO: 2

hTREM-1 tet/Fc mut-i konkurendid:

50× DCIR COMP	0,3 mg/ml)	SEQ ID NO: 4
50× TREM COMP	1,14 mg/ml)	SEQ ID NO: 5

20 **[0114]** Voolutsütomeetriast saadud andmete põhjal koostati histogrammid. Kitse hFc-vastase / PE konjugaadi taustfluorestsents oli iga histogrammi taustaks ning tähistati lühendiga „PE“. Igale histogrammile tehti identne tähis, mis näitaks rakkude protsenti, mis seonduisid teisese kitse hFc-vastase / PE konjugeeritud antikehaga. Negatiivse kontrollina kasutatud valgul Fc mut esines 2% positiivseid seonduisrakke, mis oli samaväärne

25 taustfluorestsentsi tulemusega kitse hFc-vastase / PE konjugaadiga üksi (joonis fig 2A). Kui rakud märjastati 2 µg/ml hTREM-1/tetrameeriga, olid need 39% positiivsed (joonis fig 2B). Kui TREM-1 tetrameeriga sidumine toimus 100 µg/ml valgu DCIR COMP kontekstis, olid rakud 41% ulatuses positiivsed, mis kinnitab, et DCIR COMP ei

konkureerinud seandumisel TREM-1 tetrameeriga (joonis fig 2C). Kui TREM-1 tetrameeriga sidumine toimus 100 µg/ml TREM-1 COMP juuresolekul, olid rakud 10% ulatuses positiivsed, mis kinnitab, et valk TREM COMP ei konkureerinud rakkudega seandumisel TREM-1 tetrameeriga (joonis fig 2D).

5

Näide 4. PGLYRP1 tuvastamine neutrofiilide ekspresseeritava TREM-1 ligandina

[0115] PGLYRP1 tuvastati TREM-1 ligandina immunosadestamise ja massispektroskoopia (IP-MS) abil. Ligandi tuvastamiseks kasutati lahustuvat TREM-1 tetrameeri afiinsuse „sööt molekulina“. TREM-1-tetrameer-Fc-d (SEQ ID NO: 2) ja eraldi ka CD83-Fc-d (SEQ ID NO: 5) inkubeeriti lõplikel kontsentratsioonidel 100 µg/ml 270 miljoni inimese neutrofiiliga, mis olid puhastatud dekstraansadestuse abil, nagu eespool kirjeldatud, 1 ml PBS-is temperatuuril 4 °C 90 minutit kerge loksutamise ja pärast sadestamist resuspendeeriti rakud 1 ml PBS-puhvriss ristsidujaga 3,3'-ditiobis[sulfosuktsiinimidüülpropionaat] (DTSSP) (Thermo Scientific: 21578, Rockford, IL, USA) kontsentratsioonil 2 mM ja inkubeeriti 30 minutit toatemperatuuril. Rakke loputati kolm korda 1 ml PBS-iga, millele järgnes lüüsimine 1 ml RIPA puhvriss (Thermo Scientific, 89901, Rockford, IL, USA). Lüsaati tsentrifugeeriti kiirendusega 15 000 × g temperatuuril 4 °C 10 minutit, et eemaldada mittelahustuvad osad. Fc-ga seondunud sondiga ristseondunud neutrofiilide valgud immunosadestati supernatandist kerakestega Protein A Mag Sepharose™ (GE Healthcare Life Sciences, 28-9670-56, Piscataway, NJ, USA). 50 µl kerakesi loputati esmalt 200 µl PBS-iga ning seejärel resuspendeeriti 1 ml rakulüsaadis, inkubeeriti 60 minutit temperatuuril 4 °C, koguti magnetiliselt ning loputati kaks korda 200 µl RIPA puhvriga ning seejärel kolm korda 200 µl PBS-iga. Pärast PBS-i eemaldamist lõplikult magnetsaagisest, elueeriti valgud magnetiliselt helmestelt 200 µl puhvriga, mis sisaldas 8 M uread, 100 mM Tris-i (pH 8,0), ja 15 mM TCEP-i (Thermo Scientific, 77720, Rockford, IL, USA), ja inkubeeriti toatemperatuuril 30 minutit, helmed koguti ning supernatant kanti üle MicroconUltracel YM-30 filtrile (Millipore, 42410, Billerica, MA, USA). Proove tsentrifugeeriti kiirendusega 14 000 × g temperatuuril 20 °C 30–60 minutit kuni filtri membraani pind oli kuiv. Alles jäetud valgud alküülitati 100 µl 50 mM IAA (joodatsetamiid) in 8 M ureas 30 minuti vältel, pimedas ja toatemperatuuril. Filtrit loputati kaks korda 100 µl 50 mM NH₃HCO₃-ga ning viidi üle uude kogumistuubi. Lisati 1 µg trüpsiini (kat-nr V5111, Promega, Madison WI, USA) 60 µl 50 mM

NH₃HCO₃-s, millele järgnes inkubatsioon temperatuuril 37 °C üle öö. Trüpsiini hüdrolüsaat koguti 30-minutilise tsentrifuugimise teel kiirendusel 14 000 × g, misjärel filter loputati 50 µl 50 mM NH₃HCO₃-ga. 10 µl hüdrolüsaati analüüsiti LC/MS/MS-iga LTQ-Orbitrap-XL massispektromeetri abil (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

5 Andmeid kontrolliti IPI inimese andmebaasiga (v3.81) süsteemi SEQUEST-Sorcerer (4.0.4 mudel) (SageN, Milpitas, CA, USA) abil ja järeltöödeldi Scaffold 3 abil (Proteome Software, Portland, OR, USA), et filtrida valgu ID-d valetuvastuste osakaaluga 1%. Pärast negatiivse kontrolli eemaldamist avastati, et PGLYRP1 oli kõrge usaldusväärsusega valk, mis on spetsiifiliselt assotsieeritud hTREM-1 tetrameeriga. Neutrofiilide

10 immunosadestamine näitas, et 148 tuvastatud valgust 72 olid immunosadestatud ainult kontrollkonstruktiga (CD83), 73 valku olid TREM-1 ja CD83-ga identsed ja ainult kolm olid TREM-1-spetsiifilised (joonis fig 3). Seejärel korraldati katsed erinevalt doonorilt saadud neutrofiilidega, ning taaskord avastati, et PGLYRP1 ja hTREM-1 interakteeruvad spetsiifiliselt.

15

Näide 5. HEK293 6E ekspresseeritud inimese PGLYRP1 puhastamine

[0116] Rekombinantne valgujärjestus konstrueeriti, sulandades inimese CD33 signaalpeptiidjärjestus (SEQ ID NO: 53) inimese küpse PGLYRP1 kodeerimisjärjestusega

20 (SEQ ID NO: 1). Selle tulemusel saadud avatud lugemisraam klooniti vektorisse pcDNA 3.1/Zeo(+) (Life Technologies, Carlsbad CA, USA) pärast CMV promootorit. Seejärel transfekteriti konstrukt pcDNA 3.1-hPGLYRP1 rakkudesse HEK293 6E reaktiiviga 293fectinTM (Life Technologies, Carlsbad CA, USA) abil tootja juhiste järgi. 5 päeva pärast transfektsiooni koguti eritatud inimese PGLYRP1-d sisaldavad kultuuri

25 supernatandid kokku tsentrifuugimise teel (15 000 p/min 20 min, 4 °C) ja seejärel puhastati need 0,22 µm tselluloosnitraatmembraaniga filtrimise teel. Puhastatud supernatanti lahjendati esmalt 10 korda 20 nM naatriumtsitraadiga ning kanti siis Hitrap SP HP 5 ml kolonni (17-1151-01 GE Healthcare, Uppsala, Rootsi), millele järgnes kolonni loputamine 20 mM naatriumtsitraadiga, mille pH oli 5,0. Seotud inimese PGLYRP1

30 elueeriti seejärel 0–100% 20 mM pH 5,0 naatriumtsitraadi ja 1 M naatriumkloriidi lineaarse gradiendiga 30 kolonni mahus. Inimese PGLYRP1 dimeerseid ja monomeerseid vorme sisaldavad fraktsioonid koguti eraldi ja konsentreeriti mahuni väiksem kui 4 ml tsentrifugaalseadmetega Amicon ultra 15 (UFC800324 3,000kDa MWCO, Millipore,

Hellerup, Taani). Dimeeride ja monomeeride kogud viimistleti ning puhver vahetati fosfaatpuhverdatud soolalahusesga Hiload 26/60 Superdex 75 abil, 318 ml kolonni kohta (17-1070-01GE Healthcare, Uppsala, Rootsi). Pärast konsentreerimist määrati lõplikud valgukonsentratsioonid kindlaks UV-spektromeetriga NANODROP lainepikkusel 280 nm neelduvuse mõõtmise teel. Valkude puhtust hinnati naatriumdodetsüülsulfaatpolüakrüülamiidi geelelektroforeesi (SDS-PAGE) abil.

Näide 6. *E. coli*'s ekspresseeritud inimese PGLYRP1 uuesti kokkuvoltimine ja puhastamine

10

[0117] Inimese PGLYRP1 ekspresseeriti *Escherichia coli* rakkudes BL21 (DE3) inklusioonkehadena. Bakterid koguti tsentrifuugimise teel, resuspendeeriti 50 mM Tris-HCl-i (pH 8,0), 500 mM NaCl-i, 5 mM EDTA, 0,5% Triton X-100 segus ja purustati ultrahelitöötusega. Lahustumatut pelletit loputati kolm korda 50 mM Tris-i, pH 8,0, 1% TritonX-100, 2 M urea lahuses ning üks kord 50 mM Tris-iga, pH 8,0, ning seejärel muudeti 50 mM Tris-HCl-i, 6 M guanidiinhüdrokloriidi, pH 7,4, 1 mM DTT segus lahustuvaks (lõplik valgukonsentratsioon 20 mg/ml). *In vitro* voltimiseks lahjendati lahustuvaks muudetud inimese PGLYRP1 inklusioonkehad segus, mis koosnes 50 mM Tris-ist, pH 8,0, 2 mM EDTA-st, 5 mM tsüstamiinist, 0,5 mM tsüstamiinist, 0,4 M arginiinist (lõplik valgukonsentratsioon 1 mg/ml). Pärast segus hoidmist üle öö temperatuuril 4 °C, selgendati voltimissegu tsentrifuugimise/filtrimise teel ning seejärel lahjendati 12-kordselt 10 mM MES-is, pH 3,5, et langetada juhtivust ja pH-d (lõplik pH ~ 5,8, juhtivus ~ 6 mS/cm). Lahjendatud voltimissegu kanti seejärel 5 ml kolonnile Hitrap SP HP (17-1151-01 GE Healthcare, Uppsala, Rootsi), millele järgnes 5 kolonni mahus loputamine 50 mM MES-iga, pH 5,8. Seotud inimese PGLYRP1 elueeriti seejärel 20 kolonni mahus 0–60% 50 mM MES-i, pH 5,8, ja 1 M NaCl-i lineaarse gradiendiga. Taasvolditud inimese PGLYRP1 sisaldavad osad koguti ja konsentreeriti mahuni vähem kui 4 ml tsentrifugaalseadmetega Amicon ultra 15 (UFC800324 3,000kDa MWCO, Millipore, Hellerup, Taani). Seejärel valgud viimistleti ja puhver vahetati fosfaatpuhverdatud soolalahusega Hiload 26/60 Superdex 75 abil, 318 ml kolonni kohta (17-1070-01GE Healthcare, Uppsala, Rootsi). Suurem osa taasvolditud inimese PGLYRP1-valkudest olid monomeersel kujul. Pärast konsentreerimist määrati lõplik valgukonsentratsioon kindlaks UV spektromeetriga NANODROP lainepikkusel 280 nm

neelduvuse mõõtmise teel. Valkude puhtust hinnati naatriumdodetsüülsulfaatpolüakrüülamiidi geelelektroforeesi (SDS-PAGE) abil.

Näide 7. Hiirte immuniseerimine ja mAb-de tuvastamine

5

[0118] Antikehade tootmiseks immuniseeriti hiired puhastatud inimese PGLYRP1-ga. Hiiri immuniseeriti 3 korda, 20 µg rekombinantset PGLYRP1 immuniseerimise kohta. Esimene immuniseerimine tehti naha kaudu Freundi täieliku adjuvandi abil (kat-nr 3018, Statens Serum Institut, Kopenhaagen, Taani). Järgmised kaks immuniseerimist olid 10 kõhukelmesisesed Freundi täieliku adjuvandi abil (kat-nr 3016, Statens Serum Institut, Kopenhaagen, Taani). Kümme päeva pärast viimast immuniseerimist võeti põsest verd ning seerumeid testiti PGLYRP1 vastu otseses ELISA-s.

Näide 8. Lahustuva TREM-1 sidumine PGLYRP1-ga

15

[0119] Üks sagedasti kasutatav meetod uue valk-valk interaktsiooni kinnitamiseks on interaktsiooni taasloomine rekombinantsete reaktiividega. Rekombinantset inimese PGLYRP1 ekspresseeritakse C-terminaalse otsa epitoobiga, mis signaliseerib glükosüülfosfaatidüülinositooli (GPI) translatsioonijärgset lisandust. C-terminaalses otsas 20 GPI struktuure sisaldavaid valke sihitakse eksponeerimiseks plasmamembraanil. See tihti kasutatav tehnika võimaldab kuvada tavaliselt lahustuvaid valke, et analüüsida voolutsütomeetria abil nende seondumisvõimet. Joonisel fig 4a, transfekteeriti HEK-2936E-rakud pCDNA 3.1/zeo(+) hPGLYRP1-GPI-ga (SEQ ID NO: 7), 3 µg DNA-d lahjendati 100 µl Optimemis (kat-nr 31985062, Life Technologies, Carlsbad,CA, USA). 25 100 µl Optimemile (kat-nr 31985062, Life Technologies, Carlsbad,CA, USA) lisati 4 µl 293fektiini (kat-nr 51-0031, Life Technologies, Carlsbad,CA, USA) ja inkubeeriti temperatuuril 22 °C 5 minutit. DNA/Optimemi segu ja 293fektiin/Optimemi segu kombineeriti ja inkubeeriti veel 20 minutit toatemperatuuril. HEK-2936E-rakud lahustati 3 ml-ni vahekorras 1e6/ml Freestyle keskkonnas (kat-nr 12338, Life Technologies, 30 Carlsbad,CA, USA) ja kanti 6-süvendilisele plaadile (kat-nr 35-3046, Biosciences San Jose, CA, USA) ning seejärel lisati rakkudele tilkade kaupa DNA/293fektiini segu. Rakke inkubeeriti 48 tundi temperatuuril 37 °C ja samal ajal raputati. 1 µg/ml inimese TREM-1-G4Sx3-TREM-1/Fc6mut (SEQ ID NO: 2) lahjendati PBS-is / 2% FBS-is ning 50 µl sondi

lisati 80 000 transfekteeritud HEK293-6E-rakkudele ümarapõhjalises 96-süvendilises plaadis (kat-nr 3799, Costar, Lowell, MA, USA). Rakke inkubeeriti temperatuuril 4 °C 1 tund ning see järel loputati 2 korda 200 µl PBS-i / 2% FBS-iga. Lisati 50 µl 1 µg/ml PE kitse inimesevastast Fc-d (kat-nr 109-116-098, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) ning inkubeeriti veel üks tund, mille järel loputati 2 korda PBS-is / 2% FBS-is. Rakke fikseeriti 5 minutit 1 : 1 PBS-iga lahjendatud BDCytofix-is (kat-nr 554655, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) ja inkubeeriti 5 minutit, millele järgnes loputamine 200 µl PBS-i / 2% FBS-iga. Rakud suspendeeriti 100 µl PBS-i / 2% FBS-iga enne nende analüüsimist FACS LSRII-ga (BD Biosciences, San Jose, CA). Selle katse tulemused on näidatud joonisel fig 4a, kus värvimata rakud on näidatud pideva musta joonega (G03). Transfekteeritud rakkude mudeli TREM-1-G4Sx3-TREM-1/Fc6mut- märgistamine on tähistatud katkendjoonega ning ei näita märgistamata rakkudega suhtelist seondumist. Inimese PGLYRP1-GPI-ga transfekteeritud TREM-1-G4Sx3-TREM-1/Fc6mut-i robustselt siduvad rakud on näidatud punktiirjoonega. Seondumist väljendatakse keskmise fluorestsentsiintensiivsuse MFI.

[0120] Lisaks voolutsütomeetriale hinnatakse valkude interaktsioone tihti ka pinna plasmonresonantsi järgi (SPR). Inimese *TREM-1* ja inimese *PGLYRP1* vahelise ning inimese *PGLYRP1* ja ultrahelitöödeldud lahustuva *E. coli* peptidoglükaani (kat-nr t1rl-ksspgn, Invivogen, San Diego, CA, USA) vahelise interaktsiooni analüüsimiseks kasutati instrumenti Biacore T200 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). Kõik analüüsid tehti temperatuuril 25 °C voolukiirusel 20–30 µl/min, 1× HBS-P analüüsipuhvril (kat-nr BR-1006-71, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA).

[0121] Joonisel fig 4B on kujutatud 4641.1 RU inimese TREM-1 tetrameeri (SEQ ID NO: 2) amiinühendamist Biacore kiibiga CM5 (kat-nr BR-1005-30, BR-1000-50, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) tootja soovitatud meetoditega. PGLYRP1 (kat-nr 2590-PG, R&D Systems, Minneapolis, USA) lahjendati mahuni 150 nM 1× HBS-P analüüsipuhvril (kat-nr BR-1006-71, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) 10 µg/ml lahustuva *E. coli* peptidoglükaani (kat-nr t1rl-ksspgn, Invivogen, San Diego, CA, USA) juuresolekul või puudumisel ning seejärel sisestati üle TREM-1 pinna. Andmetest lahutatakse võrdlusarvud, võrreldes aktiveeritud ja blokeeritud (etanoolamiiniga)

kontrollpinnaga. Kuigi PGLYRP1 seob TREM-1 nii PGN-i juuresolekul kui ka puudumisel, tundub PGLYRP1 PGN-iga ristsidumisel olevat oluline aviidsusmõju.

5 [0122] Joonisel fig 4C on kujutatud 274.8 RU inimese TREM-1 dimeeri (SEQ ID NO: 1) amiinühendamist Biacore kiibiga CM5 (kat-nr BR-1005-30, BR-1000-50, GE Healthcare, Piscataway, NJ). Lahustuv *E. coli* peptidoglükaan (kat-nr t1rl-ksspgn, Invivogen, San Diego, CA, USA) lahjendati 0 µg/ml 1× HBS-P analüüsipuhvrts (kat-nr BR-1006-71, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) ning seejärel sisestati üle TREM-1 pinna. Andmetest lahutatakse võrdlusarvud, võrreldes aktiveeritud ja blokeeritud (etanoolamiiniga) 10 kontrollpinnaga.

[0123] Joonisel fig 4D kasutati sama kiipi kui joonisel fig 4C (274.8 RU PGLYRP1 dimeeri, (SEQ ID NO: 1). TREM-1 dimeer (SEQ ID NO: 8) lahjendati mahuni 150 nM 1× HBS-P analüüsipuhvrts (BR-1006-71, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) ja sisestati nii 15 enne kui pärast peptiiglükaani korduvat sisestamist (kujutatud joonisel B). Andmetest lahutatakse võrdlusarvud, võrreldes aktiveeritud ja blokeeritud (etanoolamiiniga) kontrollpinnaga, maha arvatakse ka puhvri tühiproovi signaal. TREM-1 näitab selgelt seondumist immobiliseeritud PGLYRP1-ga. Lahustuv TREM-1 dimeer seondub samamoodi nii ainult immobiliseeritud PGLYRP1-ga kui ka PGLYRP1-ga, mis on PGN- 20 iga laetud. Üleüldine pind-immobiliseeritud TREM-1 retseptori sidumine PGLYRP1 ja PGN-iga hõlmab keskmist afiinsust PGLYRP1/TREM-1 kompleksi mõningast afiinsust, mida võimendab tugevalt ristseotud PGLYRP1 aviidsusefekt.

25 Näide 9. TREM-1-vastuse aktivatsioon rekombinantse PGLYRP1-ga

[0124] Katsetamiseks, kas PGLYRP1 on võimeline aktiveerima TREM-1 vastuse, külvati BWZ/hTREM-1 reporterrakuliin mustale 96-süvendilisele plaadile ja stimuleeriti rekombinantse inimese PGLYRP1-ga (kat-nr 2590-PG-050, R&D Systems: Minneapolis, MN) 10 µg/ml PGN-iga või ilma. TREM-1 aktivatsiooni analüüsiti pärast 24 tundi 30 kultiveerimist reaktiiviga BetaGlo (kat-nr E4720, PromegaMadison, WI, USA) ja luminesentsi mõõdeti Perkin Elmeri loenduriga TopCount Luminescence. Nagu nähtub jooniselt fig 5a, indutseeris TREM-1 reporterrakuliini stimuleerimine PGLYRP1-ga annusest sõltuva TREM-1 aktivatsiooni PGN-i juuresolekul. Katsetati mitut erinevat

PGN-i, kaasa arvatud PGN-EC (*E. coli*), PGN-SA (*S. aureus*) and PGN-BS (*B. subtilis*) (Invivogen, San Diego, CA, USA), mis kõik olid võimelised soodustama PGLYRP1-indutseeritud TREM-1-vastust.

- 5 [0125] Rekombinantse PGLYRP1 indukseeritud vastust võib inhibeerida rekombinantse TREM-1-Fc liitvalgu (SEQ ID NO: 2) lisamisega (joonis fig 5b) või polükloonse PGLYRP1-vastase antikeha (kat-nr AF-2590, R&D Systems:Minneapolis, MN, USA) lisamise teel, mis kinnitab, et PGLYRP1 on TREM-1 ligand ning lahustuv TREM-1 ja PGLYRP1-vastane antikeha on potentsiaalselt kasulikud TREM-1 antagonistidena.

10

Näide 10. TNF-alfa vabanemine PGLYRP1-ga stimuleeritud M1-makrofaagidest

[0126] Monotsüüdid eraldati M1-makrofaagidesse ning stimuleeriti PGLYRP1 kompleksiga, mille tulemuseks oli TNF-alfa vabanemine kahes erinevas doonoris.

15

- [0127] Valdlinna asjatundjad teavad mitmetelt doonoritelt kogutud esmaste rakkude külmutuspanga kogu loomise eeliseid, mis võimaldavad katseid mugavalt taasluua. *In vitro* saadud makrofaagid saadi perifeerse vere monotsüütidest järgneval viisil. Negatiivselt rikastatud monotsüüdid eraldati perifeerse vere „leukopakist“, mis on saadud uuringute verekomponentidest (Brighton, MA, USA), kasutades Rosette Sep komplekti (kat-nr 15068 Stem Cell Technologies, Vancouver BC, Kanada) tootja juhiste järgi. Eraldatud monotsüüdid suspendeeriti 10% DMSO/FBS alikvootides 50×10^6 rakku/ml ja jahutati järk-järgult temperatuurini -80°C . Makrofaagirakkude tootmiseks sulatati üks või mitu külmutatud monotsüüdiviaali kiiresti 37°C -kraadises vees, lahjendati 10 ml kasvukeskkonnaga [RPMI 1640 (kat-nr 72400-047, Life Technologies, Carlsbad CA, USA)) 10% FBS-iga (kat-nr 03-600-511, ThermoFisher, Waltham MA, USA) ja tsentrifuugiti 5 minutit kiirendusega $250 \times g$. Rakud suspendeeriti 2×10^6 rakk/ml kasvusöötmes, mida täiendati 50 ng/ml inimese MCSF-iga (kat-nr PHC9501, Life Technologies, Carlsbad CA, USA), paigutati koekultuuri töödeldud Petri koekultuuriplaatidele ning niisutatud inkubaatorisse, mis oli seatud hüpoksilisele keskkonnale (5% CO_2 , 2% O_2). Kolmandal päeval kultuuris toideti rakke lisandusega, mis sisaldas samaväärset kogust kasvusöödet, mida oli täiendatud 50 ng/ml inimese MCSF-iga. Pärast 6 päeva kultuuris olid monotsüüdid diferentseerunud M0-makrofaagideks. M0-

5 rakke diferentseeriti veelgi söötme vahetamisegakasvusöötme vastu, mida oli täiendatud 50 ng/ml inimese IFN γ -ga (kat-nr, PHC4031, Life Technologies, Carlsbad CA, USA) M1 makrofaagide jaoks, või 40 ng/ml inimese IL-4-ga (kat-nr PHC0045, Life Technologies, Carlsbad CA, USA) M2-makrofaagide jaoks, ning viies makrofaagid tagasi inkubaatorisse
 10 veel 22 tunniks. Seitsmendal päeval diferentseeriti makrofaagid sobivalt bioanalüüsiks kasutamisele. Lühidalt öeldes koguti makrofaagid Petri plaatidelt nende loputamiseks 1 \times PBS-iga, ning 5 mM EDTA-ga PBS-is. Plaadid viidi 30 minutiks tagasi temperatuurile 37 $^{\circ}$ C ning rakud „survepesti“ plaadilt 10 ml süstla ja 22 G nõela abil. Seejärel lahjendati rakud kasvusöötmega, tsentrifuugiti kiirendusega 250 \times g 5 minutit, pärast mida
 10 suspendeeriti rakupellet lõplikusse kontsentratsiooni 1 \times 10⁶/ml.

[0128] Eelkirjeldatud meetodil valmistatud makrofaagirakke kasutati bioanalüüsides, kus rakkude TREM-1 ligandiga stimuleerimisel tulemusel saadud tsütokiine, nagu TNF-alfa mõõdeti ELISA töödeldud söötmes. Sellist bioanalüüsi kasutati lisaks ka TREM-1
 15 spetsiifiliste antikehade stimuleeritud TREM-1 ligandi blokaadi mõõtmiseks. TREM-i ligand või negatiivsed kontrollid valmistati ette kasvusöötme 4 \times kontsentratsioonis ning 50 mikrotliitrit/süvend lisati 96-süvendilistele mikrotiiteralustele. TREM-1 ligandi lõplikud kontsentratsioonid koosnesid 7,5 ng/ml rekombinantsest inimese PGLYRP1-st (saadud näites 5 kirjeldatud protseduuriga) ja 3 μ g/ml PGN-BS-ist (kat-nr, tlr-pgnbs, Invivogen,
 20 San Diego CA, USA). Rakke kasvatati eespool kirjeldatud niisketes hüpoksilistes tingimustes 22 tundi, pärast mida koguti töödeldud sööde kokku ning mõõdeti TNF-alfa taset ELISA abil tootja juhiste järgi (kat-nr DY210, R&D Systems, Minneapolis MN, USA).

	Doonor 1		Doonor 2	
	TNF- α , pg/ml		TNF- α , pg/ml	
<u>M1-makrofaag koos:</u>	<u>Keskmine</u>	<u>SD</u>	<u>Keskmine</u>	<u>SD</u>
Ilma lisata	0	0	22	1
0,4 μ g/ml PGN-BS	357	153	764	139
2,0 μ g/ml PGN-BS	3086	151	5792	226

	Doonor 1		Doonor 2	
	TNF- α , pg/ml		TNF- α , pg/ml	
<u>M1-makrofaag koos:</u>	<u>Keskmine</u>	<u>SD</u>	<u>Keskmine</u>	<u>SD</u>
5 μ g/ml PGLYRP1 + 0,4 μ g/ml PGN-BS	7502	384	7819	945
5 μ g/ml PGLYRP1 + 2 μ g/ml PGN-BS	31440	1030	40418	1633

See näide näitab, et TREM-1 ligand PGLYRP1 on võimeline lisaks suurendama TNFa vabastamist kahe erineva doonori makrofaagidest.

Näide 11. Tsütokiinide vabanemine sünoviaalkoe rakkudest RA-ga patsientides

5 PGLYRP1-ga stimuleerimisel

[0129] Sünoviaalkoe proovid saadi RA-ga patsientidest täieliku põlveliigese proteesi paigaldamise ajal. Üks sünoviaalkoeraku suspensioon eraldati lõhustamise teel 4 mg/ml kollageenaasiga (kat-nr 11088793001, Roche, Mannheim, Saksamaa) ja 0,1 mg/ml DNAasiga (kat-nr 11284932001, Roche, Mannheim, Saksamaa) 1 tunni vältel temperatuuril 37 °C. Sünoviaalkoerakke 1×10^5 /süvend kultiveerimiskeskonnas RPMI (kat-nrR0883, Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) + 10% FCS (kat-nr S0115, BioChrom AG, Grand Island, NY 14072, USA) stimuleeriti 4 μ g/ml PGLYRP1 ja 1 μ g/ml PGN-ECNDi-ga (kat-nr t1rl-kipgn, Invivogen, San Diego, CA 92121, USA). Pärast 24-tunnist inkubeerimist koguti raku supernatandid ning tsütokiinide taset mõõdeti kas ELISA (TNFa (kat-nr DY210, R&D Systems, Minneapolis, MN55413 USA), IL-1b (kat-nr 88-7010-88, eBioscience, San Diego CA USA), GM-CSF (kat-nr 88-7339-88, eBioscience, San Diego CA USA) või Flowcytomix abil (TNFa, IL-1b, MIP-1b, MCP-1, IL-6, ja IL-8 (kat-nrBMS, eBioscience, San Diego CA USA). Tsütokiinid sekreteeriti sünoviaalkoerakudest pärast stimuleerimist TREM-1 ligandiga.

Tsütokiin (pg/ml)	PGN	PGN + PGLYRP1
TNFalfa	623,69	1444,59
IL-1beeta	2419,42	3772,74

Tsütokiin (pg/ml)	PGN	PGN + PGLYRP1
GM-CSF	181,91	615,91
MIP-1beeta	2457,955	4394,725
MCP-1	273,055	471,26
IL-6	2056,94	4189,355
IL-8	2574,56	5509,195

See näide näitab, et reumatoidartriidiga patsientide sünoviaalkoerakud reageerivad TREM-1 ligandiga PGLYRP1 stimuleerimisele paljude tsütokiinide eritamiseiga.

Näide 12. TREM-1 aktiivsust inhibeerivate PGLYRP1-vastaste mAb-de tuvastamine

5

[0130] TREM-1 vastuseid blokeerivate monokloonsete PGLYRP1-vastaste mAb-de tuvastamiseks immuniseeriti wtbalb/c-hiiri rekombinantse inimese PGLYRP1-ga. Esmane sõelumine tehti otsese ELISA-ga PGLYRP1 valgul ning kõiki PGLYRP1-spetsiifilisi hübridoomi supernatante testiti seejärel BWZ/hTREM-1 reporterraku analüüsis, et

10 tuvastada monokloonsed PGLYRP1-vastased antikehad, mis on võimelised PGN-stimuleeritud neutrofiilidega indutseeritud TREM-1-aktivatsiooni inhibeerima, nagu kirjeldatud näites 1. Analüüs tehti järgmisel viisil: 40 000 hTREM-1/BWZ.36 rakku/süvend kanti läbipaistva põhjaga mustale 96-süvendilisele plaadile 75 ng/ml PGLYRP1 juuresolekul (SEQ ID NO: 1) 2,5 µg/ml PGN-ECndi-ga (kat-nr tlr-

15 kipgn,Invivogen San Diego, CA, USA), et anda sub-maksimaalne positiivne signaal või sub-maksimaalsel tasemel (1 µg/ml) plastik-adsorbeeritud TREM-1-vastase monokloonse antikeha (kat-nr MAB1278 R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) juuresolekul anda positiivne signaal. Testantikehad tiitriti analüüsi alates mahust 10 µg/ml, 5 järjestikuse 2-kordse lahjendamisega. Analüüsi inkubeeriti üle öö temperatuuril 37 °C ning ilmutati Beta

20 Glo-ga (kat-nr E4740, Promega Madison, WI, USA) Beta Glo juhiste järgi ning luminescents salvestati. Andmed kanti graafikule Beta Glo-st sõltuvate luminescentsühikute võrdlusena antikehakontsentratsiooniga. Mitte-neutraliseerivat negatiivse kontrollina kasutatud mlgG1 (kat-nr MAB002, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) ja neutraliseerivat positiivse kontrollina kasutatud polükloonset kitse

25 hPGLYRP1-vastast antikeha (kat-nr AF2590, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)

analüüsiti igal analüüsiplaadil. Nagu näidatud joonisel fig 6a, avastati, et F10, F14, F29, F36, F38, F77, F95 ja F105 on võimelised blokeerima TREM-1 vastust PGLYRP1-le. Joonisel fig 6B on näidatud teised PGLYRP1-antikeha hübriidoomi supernatandid, mis on võimelised blokeerima TREM-1-sõltuvat signaali. M-hPGRPS-2F5 (SEQ ID NO: 31-32 ja -2F7 (SEQ ID NO: 35-36) on blokeerimisel väga efektiivsed. Kaubanduslikult saadaval olevate monokloonsete PGLYRP1-vastase antikehade testimine samas analüüsis koos PGLYRP1-vastase kitse polükloonse positiivse kontrolliga (kat-nr AF2590, R&D Systems Minneapolis, MN, USA) näitas aga, et ükski neist antikehadest polnud võimeline TREM-1 aktivatsiooni blokeerima (joonis fig 6C). Testitud PGLYRP1-antikehade hulka kuuluvad: 188C424 (Thermo Scientific (6D)), mAb-d 4H230 ja 9A319 (US Biological (joonis fig 6D,6E)); ei blokeerinud TREM-1 bioanalüüsi stimuleerimist PGLYRP1-ga. Täheledata, et kloonitud 6D653 (Santa Cruz Biotechnology (joonis fig 6F ja 6G)) blokeeris analüüsi mitte-spetsiifiliselt, põhinedes analüüsil, et mAb blokeeris nii PGLYRP1(6F) kui ka TREM-1-vastast stimuleerimist (6G), samas kui positiivse kontrollina kasutatud PGLYRP1-vastane polükloonne Ab blokeeris ainult PGLYRP1-vahendatud aktivatsiooni. See mittespetsiifiline blokeerimine võib tuleneda bioanalüüsi asiidtoksilisusest.

[0131] Kokkuvõttes tuvastati PGLYRP1-antikehad, mis mitte ainult ei seo PGLYRP1, vaid neutraliseerivad ka selle TREM-1 signaalid. Nende molekulide leidmiseks kasutatud meetodil on tavapärastelt PGLYRP1-antikehade tuvastamiseks kasutatavate meetodite suhtes unikaalne eelis, millest annab tunnistust saadaval olevate kaubanduslike antikehade võimetus neutraliseerida PGLYRP1.

Näide 13. PGLYRP1-antikehad blokeerivad TREM-1-spetsiifilist signaali

[0132] PGLYRP1 hübriidoomi kloonid järjestati ning ekspresseeriti rekombinantselt higG4-antikehana. Kaht neist, mAb0182 (1F36-st) (SEQ ID NO: 15 ja 16) ja mAb 0184 (1F105-st) (SEQ ID NO: 23 ja 24) analüüsiti uuesti BWZ/hTREM-1 reporterrakuanalüüsis näite 13 põhjal. Need PGLYRP1-vastased antikehad blokeerivad BWZ/hTREM-1 reporterrakuanalüüsis TREM-1 vastust annusest sõltuvalt.

BWZ.36/hTREM-1 reaktsioon, Beta Glo RLU						
Antikeha	Isotüüp		182		184	
<u>µg/ml</u>	<u>Keskmine</u>	<u>SD</u>	<u>Keskmine</u>	<u>SD</u>	<u>Keskmine</u>	<u>SD</u>
0	74636	10004	74636	10004	74636	10004
0,16	70289	13018	81858	3336	60738	5449
0,31	68555	5585	73382	650	59830	2837
0,63	68105	11547	73831	7818	51198	397
1,25	71797	8545	63280	1663	46447	708
2,5	69207	5004	51675	1270	42062	1953
5	76951	901	33641	842	36194	1461
10	83930	8962	20655	1080	25239	407
20	74555	511	11852	464	21333	115
40	72296	8228	7696	306	15693	1861

[0133] See näide näitab, et erinevalt kaubanduslikult saadaval olevatest PGLYRP1-vastastest antikehadest, mida on näidatud joonistel fig 6C–G, on siin avaldatud antikehad võimelised BWZ/hTREM-1 reporterrakuanalüüsis blokeerima TREM-1 spetsiifilist signaali.

Näide 14. TNF-alfa vabanemine PGLYRP1-stimuleeritud M2-makrofaagidest

[0134] Monotsüüdid diferentseeriti M2-makrogaagideks ning stimuleeriti PGLYRP1 kompleksiga. PGLYRP1 vastu suunatud antikehad (10 µg/ml) mAb -0182 ja -0184 on võimelised vähendama TNF-alfa vabastamist M2-makrofaagidest. M2-makrofaagid diferentseeriti, nagu kirjeldatud näites 10. Testitavad antikehad valmistati ette 4× kontsentratsioonides kasvusöötmes, neile lisati 50 mikrolitrit süvendi kohta. Viimane samm bioanalüüsi alustamisel oli 100 mikrolitri eelkirjeldatud moel ette valmistatud M2-makrofaagirakkude lisamine süvendi kohta. Monokloonseid antikehi PGLYRP1 (mAb 0182 ja mAb 0184) analüüsiti, et tuvastada M2-makrofaagidel neutraliseerivat aktiivsust.

Duplikaate (kui ei ole märgitud teisiti) katsesüvenditest testiti järgnevatel tingimustel: puudus lisastimulatsioon; ainult 7,5 ng/ml PGLYRP1; ainult 3 µg/ml PGN-BS-i (kat-nr tlr1-pgnbs, Invivogen San Diego, CA, USA) (6× duplikaat); PGLYRP1-t ja PGN-BS-i (6× duplikaat), PGLYRP1 ja PGN-BS-i tiitriti PGLYRP1 antikehade või hlgG4 isotüübi kontroll-antikehaga konsentratsioonidel vahemikus 40 µg/ml kuni 0,31 µg/ml kahekordsetes lahjendustes.

	Doonor 1 TNF- α , pg/ml		Doonor 2 TNF- α , pg/ml	
	<u>Keskmine</u>	<u>SD</u>	<u>Keskmine</u>	<u>SD</u>
M2-makrofaagid koos:				
Ilma lisata	108	42	68	16
PGLYRP1	167	98	89	33
PGN	424	105	635	156
PGLYRP1+PGN	1660	198	2168	210
PGLYRP1 +PGN+isotüüp	1726	182	2483	251
PGLYRP1+PGN+mAb 0182	1322	173	2014	107
PGLYRP1+PGN+mAb 0184	1207	168	1948	173

[0135] See näide näitab, et TREM-1 ligand PGLYRP1 on võimeline veelgi suurendama TNFa vabanemist M2-makrofaagidest kahelt erinevalt doonorilt ning siin avaldatud antikehad on võimelised sellist TNFa vabanemist vähendama. Seega on need PGLYRP1-antikehad potentsiaalselt kasulikud TREM-1 antagonistidena.

15 Näide 15. TREM-1 ja PGLYRP1-ga seotud molekulide vaheliste interaktsioonide uuring kinnitab spetsiifilisust

[0136] Olles kinnitanud, et TREM-1 on võimeline PGLYRP1-ga seonduma ning TREM-1 aktiveerima PGN-i juuresolekul, tahtsime me kindlaks teha, kas TREM-1 on võimeline seonduma teiste PGLYRP perekonda kuuluvate molekulidega. PGLYRP1 ankurdati rakumembraanis kunstlikult N-terminaalsesse otsa rakkudevahelise (IC) ja transmembraanse domeeni (TM) lisamiase teel, mis saadi II tüüpi retseptorist MDL-1.

Viimased konstruktid tähistati kui II tüüpi PGLYRP1 (joonis fig 9a). II tüübis 1.0 (SEQ ID NO:

37) säilitatakse natiivse MDL-1 retseptori TM laetud aminohape ning selle valgu tõhus ekspressioon sõltub DAP12 koekspressioonist. II tüübi 2.0 PGLYRP1 konstrukti (SEQ ID NO: 38) on laetud TM-jääk asendatud neutraalse aminohappega (lüsiini asemel leutsiin), mis võimaldab valgul ekspresseruda iseseisvalt nt DAP12-st, ning lisatud on epitoopmärgis DYKDDDDK (SEQ ID NO: 39. Täispikad hPGLYRP2 (SEQ ID NO: 40), hPGLYRP3 (SEQ ID NO: 41) ja hPGLYRP4 (SEQ ID nr: 42]) cDNA-d sünteesiti membraanankurdatud valkudena N-terminaalsesse otsa II tüüpi 2.0 MDL1 N-terminaalse otsa liitmist, nagu tehti eelkirjeldatult ka PGLYRP1 puhul. cDNA-d subklooniti modifitseeritud ekspressioonivektorisse pTT5 (Zhang J *et al. Protein Expression and Purification*, 65. kd, 1. väljaanne, mai 2009, lk 77–78), ja transfekteriti näites 8 kirjeldatud protsessiga HEK293-6E-rakkudesse koos tühja vektori negatiivkontrolliga (tühikatse). Rakke analüüsiti voolutsütomeetriaga, et tuvastada nii alljärgnevate sondide pindmist kui ka rakkudevahelist seondumist: kitse inimesevastane PGLYRP1 (PGRPS) (kat-nr AF2590, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA); Mab inimesevastane PGLYRP2 (PGRP-L) (kat-nrMAB0755, Abnova, Walnut, CA, USA); Mab inimesevastane PGLYRP3 (PGRP-1a) (kat-nrMAB0068, Abnova, Walnut, CA, USA); Mab inimesevastane PGLYRP3 (PGRP-1a) (kat-nr ab13901, Abcam, Cambridge MA, USA); küüliku inimesevastane PGLYRP3 (PGRP-1a) (kat-nr 18082-1-AP, Protein Tech, Chicago IL, USA); kitse inimesevastane PGLYRP4-biotiin (PGRP-1b) (kat-nr BAF3018, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA); kitse hiirevastane PGLYRP1 (PGRPS) (kat-nr AF2696, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA); huTREM-1.Fc dimeer (C0099); huTREML1.Fc dimeer (C0246); huTREML2.Fc dimeer (C0247); huTREM2.Fc dimeer (C0248); Seondumisprotokoll tehti kas tsütofiks/perm-puhvriga (kat-nr 51.2090KZ, BD Biosciences, San Jose CA, USA) rakusiseseks värvimiseks või 2% FBS-i/PBS-iga pindmiseks värvimiseks: rakupelletid taassuspendeeriti 96-süvendilisel ümarapõhjalisel plaadil (alustuseks: 160 000 rakku/süvend) 200 µl tsütofiks/perma-puhvriga 15 minutit temperatuuril 22 °C, loputati kaks korda 200 µl 1× PermWash-puhvriga (lahjendatud 10× DiH2O-s), märgistati 50 µl sondiga, mida lahjendati 5 g/ml 1× PermWash-puhvriga, inkubeeriti 1 tund temperatuuril 4 °C, seejärel rakud loputati 200 µl 1× PermWash-puhvriga, teine puhver lisati 50 µl 1× PermWash-puhvrile, rakke inkubeeriti temperatuuril

	Platseebo	Tüüp II PGLYRP1	Tüüp II PGLYRP2	Tüüp II PGLYRP3	Tüüp II PGLYRP4	Tüüp II PGLYRP3+4	Tüüp II muPGLYRP1
huPGLYRP3 (Proteintech, 18082-1-AP)							puuduvad
anti huPGLYRP4 (R&D, BAF3018)	-	++++	-	-	++++	++++	Andmed puuduvad
anti muPGLYRP1 (R&D, AF2696)	-	++++	Andmed puuduvad	Andmed puuduvad	Andmed puuduvad	Andmed puuduvad	++++
huTrem1.Fc/C0 099	-	++++	-	-	-	-	-
huTremL1.Fc/C 0246	-	-	-	-	-	-	-
huTremL2.Fc/C 0247	-	-	-	-	-	-	Andmed puuduvad
huTrem2.Fc/C0 248	-	-	-	-	-	-	Andmed puuduvad

[0138] Inimese membraani ankurdatud PGLYRP1, PGLYRP2, PGLYRP3 ja PGLYRP4 ekspresseeriti ajutiselt HEK293-s ja sondeeriti nii leiutisekohaste kui ka kaubanduslike retseptorite ja antikehadega, et tuvastada perekonda kuuluvate molekulide uusi interaktsioone. Seandumisskoore tähistati kas „n/d“, „-“, „+“ või „++++“. Skoorid põhinevad sondi märgistuse keskmise fluorestsentsintensiivsuse (MFI, ingl *mean florescent intensity*) ning negatiivkontrollmärgistuse suhtarvul; „-“ tähistab vahetorda < 1, „++++“ tähistab skoori, mis on > 30, „++“ tähistab ligikaudu 10–15, „+“ tähistab 2–5

statistiliselt olulise erinevusega ($p < 0,05$). Valdonna asjatundjad võivad skoori nimetada vastavalt kas negatiivseks, eredaks või tuhmiks.

- 5 [0139] TREM-1 seondub ainult PGLYRP1-ga ja mitte ühegi teise PGLYRP perekonna liikmega, ning vastupidi: PGLYRP1 interakteerub ainult TREM-1-ga ja mitte ühegi teise TREM-perekonna liikmega.

Näide 16. TREM-1 ligandi esineb RA sünoviaalvedeliku proovides

- 10 [0140] Reumatoidartriiti iseloomustab sõrmeliigeste (MCP) põletik, milles mängivad suurt rolli granulotsüüdid. PGLYRP1 analüüsiti ELISA-ga ja katsetati BWZ/hTREM-1 reporterrakuanalüüsis sünoviaalvedelikust, mis saadi 9 RA-ga patsiendi sõrmeliigestest. Kaubanduslikult saadud sünoviaalvedelik (Asterand, Detroit MI, USA) sulatati, keeristati, lahjendati järk-järgult ELISA puhvriga ja analüüsiti PGLYRP1 analüüsis tootja juhiste
15 järgi (Promega, Madison WI, USA). Neljal patsiendil üheksast olid kõrgendatud PGLYRP1 tasemed.

RA SF doonor	PGLYRPP1, ng/ml	
	Keskmine	SD
1	14	5
2	8	1
3	213	44
4	229	58
5	135	49
6	47	4
7	39	13
8	116	33
9	32	1

[0141] Ra sünoviaalvedekuproove analüüsi seejärel BWZ reporteranalüüsis näite 2 kohaselt, et tuvastada TREM-i ligandi aktiivsust. Lühidalt öeldes, sünoviaalvedelik sulatati, keeristati ja lahjendati järk-järgult ja analüüsi duplikaadis +/- 10 µg/ml PGNECndi (Invivogen, SanDiego, CA, USA) polükloonse PGLYRP1-antikeha lisamisega
5 (kat-nr AF2590, Promega, Madison WI, USA) või polükloonse negatiivkontrolliga. Plastikule kinnitatud monokloonsed TREM-1- ja isotüübi antikehad (R&D Systems, Minneapolis MN, USA) olid vastavalt positiivseks ja negatiivseks kontrolliks. Joonis fig 8 illustreerib näidet sellest, kuidas reumatoidartriidiga patsiendi sünoviaalvedelik on võimeline vallandama BWZ/hTREM-1 reporterrakuanalüüsi sõltuvalt PGLYRP1-st.

10

Näide 17. Imetajate ekspressioonivektorite koostamine, mis on kasulikud PGLYRP1:TREM-1 interaktsiooni tuvastamisel ja iseloomustamisel

A.) pJSV002 hTREM-1-G4Sx3-hTREM-1/Fc6mut konstruktsioon (SEQ ID NO: 9.

15

[0142] Inimese IgG1 puudulikku versiooni siduv Fc retseptor loodi, eemaldades esimesed 215 aminohapet inimese IgG1-st, mis sisaldab varieeruvat ja konstantset (CH1) domeeni, ning tehes liigendis, 2. konstantses ja 3. konstantses domeenis järgnevad aminohappeasendused: (E216G, C220S, L234A, L235E, G237A, A330S, P331S). Sellele
20 konstruktile pandi nimeks Fc6mut, kuna Fc retseptoritega seondumise moduleerimiseks tehti 6 mutatsiooni, samas kui 7. mutatsioon (E216G) inkorporeeriti aPal restriksiooni kloonimissaidi loomiseks. Need mutatsioonid sisestati pJSV002-sse (modifitseeritud pTT5, Zhang J *et al. Protein Expression and Purification*, 65. kd, nr 1, mai 2009, lk 77–78), et võimaldada Fc6mut 5' retseptorite rakuväliste domeenide kloonimist EcoRI/Apal fragmentidena. cDNA sünteesiti 5' EcoRI restriksioonisaidiga, Kozaki järjestusega GCCACC, CD33 liiderjärjestusega, millele järgnes inimese TREM-1 (ah 17–200) rakuväline domeen KpnI restriksioonisaidi vaheosa ja kolmekordse glütsiin-glütsiin-glütsiin-seriin vaheosaga (G4Sx3), millele järgnesid koopia inimese TREM-1 (ah 17–200) rakuvälisest domeenist ja ApaI sait, et võimaldada kloonimist Fc6mut-ist ülesvoolu. Seda
25 sünteesitud DNA-d lõigati EcoRI ja ApaI-iga ning ligeeriti pJSV002 Fc6mut-i, mis oli samuti ette valmistatud EcoRI/Apal-ga lõhustamise teel. See ligatsioon elektroporeeriti DH10B *E. coli*'sse ja plaaditi ampitsilliiniga agarplaatidele. Individuaalsed kloonid kasvatati üle öö 2 ml LB-s + ampitsilliinkultuurides ning valmistati minipreparaatidena
30

ette, millele järgnes restriksiooni sõelumine EcoRI/ApaI-ga, et leida kloonid sobiva 1219 aluspaarsisestusega. Õiged kloonid järjestati ning üks kloonidest (nr 519) valiti välja lisa-DNA ette valmistamiseks.

5 ***B.) hTREM-1-COMP-SBP38x2-6His-i konstruktsioon (SEQ ID NO: 10)***

[0143] Pentameerse TREM ECD molekuli saamiseks loodi pJSV002 ekspressioonivektoris C-terminaalse otsa epitoobi märgis. Kõhre oligomeerset valku (COMP) kodeeriv sünteetiline cDNA liideti kahe koopiaga streptavidiini siduva valgu domeenist (SBP), millele järgnes C-terminaalse otsa 6xHis-domeen, mis on pJSV002 sisestatud nõnda, et retseptorite rakuvälised domeenid tuleks kloonida 5'-suunas sellest fragmendist, EcoRI/KpnI fragmendina. Seejärel sünteesiti ahTREMcdDNA EcoRI restriksioonisaidiga, millele järgnesid GCCACC Kozaki järjestus ja inimese TREM-1 rakuväline domeen C-terminaalses otsas oleva KpnI saidiga. See EcoRI/KpnI fragment ligeeriti eespool kirjeldatud vektoriga pJSV002 COMP-SBP38x2-6His. See ligatsioon elektroporeeriti DH10B *E. coli*'sse (Life Technologies, Carlsbad CA, USA) ja plaaditi ampitsilliiniga agarplaatidele. Individuaalseid kloone kasvatati üle öö 2 ml LB-s + ampitsilliinkultuurides ning valmistati ette minipreparaatidena, millele järgnes restriksiooni sõelumine EcoRI/ApaI-ga, et leida kloonid sobiva 616 aluspaarsisestusega. Õiged kloonid järjestati ning üks kloonidest (nr 525) valiti välja lisa-DNA ette valmistamiseks. Täispikk cDNA on tähistatud kui SEQ ID NO: 10.

C.) pJSV002 hCD83-G4Sx3-hCD83/Fc6mut-i konstruktsioon (SEQ ID NO: 11)

25 [0144] hCD83 tetrameeril on varasemalt FACS-analüüsiga leitud olevat väike seonduvus võrreldes paljude erinevate rakuliinidega ning see on seega suurepärane negatiivne kontroll näites 3 kirjeldatud IPMS-katses. Selle molekuli loomiseks sünteesiti cDNA-d 5' EcoRI restriksioonisaidiga, GCCACC Kozak-i järjestusega, CD33 liiderjärjestusega, millele järgneb inimese CD83 rakuväline domeen vaheldumisi KpnI restriksioonisaidiga ja kolmekordse glütsiin-glütsiin-glütsiin-seriin vaheosaga (G4Sx3), millele järgneb koopia inimese CD83 rakuvälisest domeenist. Seejärel see cDNA klooniti ülesvoolu hFc6mut-ist eelnevalt kirjeldatud ekspressioonivektoris. Saadud küps valk on tähistatud kui SEQ ID

NO: 6 ja CD83 rakuvälise domeeni cDNA järjestuse tandem EcoR1 ja Apa1 vahel on tähistatud kui SEQ ID NO: 11.

D.) pJSV002 NCOMP-hDCIR-i konstruktsioon (SEQ ID NO: 12)

5

[0145] Näites 5 kasutatud hTREM-1-COMP pentameeri negatiivseks kontrolliks kasutati hDCIR-COMP-i. pJSV002-põhine ekspressiooniplasmiid loodi järgnevate elementidega: 6xHIS-märgis ning kaks koopiat streptavidiini siduva valgu domeenist (SBP) liideti kõhre oligomeerse valgu (COMP) 3'-otsaga selliselt, et 2. tüüpi retseptorite rakuväliseid domeene oleks võimalik kloonida 3' sellest fragmendist BgIII/BamHI-fragmentidena ja ekspresseerida pentameersete lahustuvate retseptoritena. PCR-fragmenti amplifitseeriti sünteetilisest cDNA matriitsilt, et luua DNA fragment, millel oleksid BgIII ja BamHI otsad vastavalt 5'- ja 3'-otsades. Seda fragmenti lõigati BgIII ja BamHI restriksiooniensüümidega, millele järgnes vöödi puhastamine. Tulemuseks saadud fragment ligeeriti pJSV002 NCOMP-i, mida oli eelnevalt BgIII ja BamHI-ga lõigatud. See ligatsioon elektroporeeriti DH10B *E. coli*'sse ja paigutati ampitsilliiniga selektsiooniagarile. Kloonid valiti välja, valmistati ette ja sõeluti EcoRI ja BamHI abil, ning õige 1137 kB sisestusega kloonid järjestati. Täielikku avatud lugemisraami, k.a NCOMP-SBP ja DCIR järjestust kodeeriv cDNA on tähistatud kui SEQ ID NO: 12, ning kodeerib eelnevalt mainitud küpset peptiidjärjestust SEQ ID NO: 4.

10

15

20

E.) pNNC649-hTREM1-hFc6mut-i dimeeri konstruktsioon

[0146] TREM-1-Fc dimeeri kasutati näites 14 PGLYRP1-ga seondumise kinnitamiseks ning teiste PGLYRP perekonna liikmetega seondumise testimiseks. ApTT5-põhist plasmidi (Zhang J *et al.*, *Protein Expression and Purification*, 65. kd, nr 1, mai 2009, lk. 77–78) pNNC649 kasutati selleks, et võimaldada retseptorite rakuvälise domeenide kloonimist raamistikus ning 5'-suunas Fc6mut-st. hTREM1-Fc6mut-i ekspresseerimiseks sünteesiti cDNA 5' EcoRI restriksioonisaidiga, GCCACC Kozaki järjestusega, hCD33 liiderjärjestusega, millele järgnesid inimese TREM-1 (ah 17–200) rakuvälise domeeni ja Kpn1 sait. See cDNA klooniti PNNC549-sse restriksiooniensüümide ning DNA ligeerimistehnikate abil, mis on valdkonna asjatundjatele tuttavad. Täielikku avatud

25

30

lugemisraami, k.a CD33 liidri, hTREM1 ECD ja Fc6mut järjestust kodeeriv cDNA on tähistatud SEQ ID NO: 43 ning kodeerib küpset peptiidjärjestust SEQ ID NO: 44.

F.) pNNC649-hTREML1-Fc6mut-i dimeeri konstruktsioon

5

[0147] Sünteetiline cDNA loodi 5' EcoRI restriksioonisaadiga, Kozaki järjestusega GCCACC ja hCD33 liiderjärjestusega, millele järgnesid inimese TREML-1 (ah 16–162) rakuväline domeen ja Kpn1 sait. See cDNA klooniti eelnevalt kirjeldatud vektorisse PNNC549 restriksiooniensüümide ning DNA ligeerimistehnikate abil, mis on valdkonna asjatundjatele tuttavad. Täielikku avatud lugemisraami, k.a CD33 liidri, hTREML1 ECD ja Fc6mut-i järjestust kodeeriv cDNA on tähistatud SEQ ID NO: 45 ning kodeerib küpset peptiidjärjestust SEQ ID NO: 46.

G.) pNNC649-hTREML2-Fc6mut-i dimeeri konstruktsioon

15

[0148] Sünteetiline cDNA loodi 5' EcoRI restriksioonisaadiga, Kozaki järjestusega GCCACC ja hCD33 liiderjärjestusega, millele järgnesid inimese TREML-2 (ah 19–268) rakuväline domeen ja Kpn1 sait. See cDNA klooniti eelnevalt kirjeldatud vektorisse PNNC549 restriksiooniensüümide ning DNA ligeerimistehnikate abil, mis on valdkonna asjatundjatele tuttavad. Täielikku avatud lugemisraami, k.a CD33 liidri, hTREML2 ECD ja Fc6mut-i järjestust kodeeriv cDNA on tähistatud SEQ ID NO: 47 ning kodeerib küpset peptiidjärjestust SEQ ID NO: 48.

H.) pNNC649-hTREM2-Fc6mut-i dimeeri konstruktsioon

25

[0149] Sünteetiline cDNA loodi 5' EcoRI restriksioonisaadiga, Kozaki järjestusega GCCACC ja hCD33 liiderjärjestusega, millele järgnesid inimese TREM-2 (ah 19–174) rakuväline domeen ja Kpn1 sait. See cDNA klooniti eelnevalt kirjeldatud vektorisse PNNC549 restriksiooniensüümide ning DNA ligeerimistehnikate abil, mis on valdkonna asjatundjatele tuttavad. Täielikku avatud lugemisraami, k.a CD33 liidri, hTREM2 ECD ja Fc6mut-i järjestust kodeeriv cDNA on tähistatud SEQ ID NO: 49 ning kodeerib küpset peptiidjärjestust SEQ ID NO: 50.

Näide 18. Multimeeritud PGLYRP1 aktiveerib TREM-1

[0150] TREM-1 vastasstruktuur või ligand tuvastati seondumisanalüüsi ja IP/MS-proteoomika abil. Ligandi määratlus PGLYRP1 (PGRP-S) kinnitati spetsiifilise blokeerimise teel.

[0151] Kuigi lahustuva PGLYRP1 sidumise võib lugeda TREM-1 arvele, siis huvitaval kombel nõuab TREM-1 aktivatsioon PGLYRP1-ga tugiaine olemasolu, näiteks neutrofiili rakuvälised lukud (NET) või PGN.

10

[0152] Rakuga seonduv PGLYRP1 valk loodi ja avaldati, et testida selliste alternatiivsete ja multimeersete PGLYRP1 vormide võimet siduda ja/või aktiveerida TREM-1. Testiti kaht erineva kontseptsiooniga PGLYRP1 konstrukti. Ühes lisati PGLYRP1 C-terminaalsesse otsa GPI-ankurdav järjestusmotiiv. Teisel juhul ankurdati PGLYRP1 rakumembraanis kunstlikult, lisades N-terminaalsesse otsa rakkudevahelise (IC) ja transmembraanse domeeni (TM), mis saadi II tüüpi retseptorist MDL-1. Viimased konstruktid tähistati kui II tüüpi PGLYRP1 (joonis fig 9a). II tüübis 1.0 (SEQ ID NO: 37) säilitatakse natiivse MDL-1 retseptori TM-laetud aminohape ning selle valguga tõhus ekspresseerimine sõltub DAP12 koekspressioonist. II tüübi 2.0 PGLYRP1 konstrukti (SEQ ID NO: 38) on laetud TM-jääk asendatud neutraalse aminohappega (lüsiini asemel leutsiin), mis võimaldab valgul ekspresseeruda iseseisvalt nt DAP12-s. Neid konstrukte kodeerivaid cDNA-sid ekspresseeriti ajutiselt HEK293-6E-rakkudes, rakud koguti kokku 2. päeval pärast transfektoerimist ning seejärel analüüsiti nende võimet stimuleerida reporterrakuliini BWZ/hTREM1. PGLYRP1 II tüüpi transfektandid inkubeeriti koos BWZ/hTREM1 reporterrakkudega ilma PGN-ita. TREM1 aktivatsiooni kontrolliti pärast 18 tundi BetaGlo reaktsiooni abil (kat-nr E4720, Promega, Madison WI, USA). II tüüpi PGLYRP1 ekspresseerivad transfektandid indutseerisid TREM-1 aktivatsiooni ilma PGN-ita kuni 24 korda kõrgemal tasemel kui tühja ekspressioonivektoriga transfektoeritud kontrollrakud. C-terminaalse otsa kaudu immobiliseeritud GPI-ankurdatud PGLYRP1 seevastu ei vahendanud TREM-1 aktivatsiooni. Membraaniga seotud ja immobiliseeritud PGLYRP1 valguga avaldumine raku pinnal tehti kindlaks voolutsütomeetria abil polükloonsel PGLYRP1-vastase antikehaga (AF2590). Mõlemad valgud, nii II tüüpi PGLYRP1 kui ka GPI-PGLYRP1, ekspresseerusid tõepoolest raku pinnal.

30

<i>Konstrukt</i>	<i>Voldi aktiivsus</i>
C-GPI PGLYRP1	2,0 ± 0,4 (n = 3)
II tüüpi 1.0 PGLYRP1	24 ± 3,3 (n = 3)

[0153] Eelnev tabel näitab, et C-terminaalse otsa GPI ankru abil rakumembraani pinnaga seonduv PGLYRP1 ei ole TREM-1 aktiivsuse indutseerimisel nii võimekas kui N-terminaalse otsa kaudu rakumembraani pinnaga seotud PGLYRP1. See näitab ilmekalt C-terminaalse otsa PGLYRP1 vaba osa olemasolu tähtsust TREM-1 stimuleerimiseks.

[0154] Näidati, et II tüüpi PGLYRP1 aktivatsiooni inhibeeriti spetsiifiliselt PGLYRP1-vastase antikeha abil. Polükloonse PGLYRRP1-antikeha (kat-nr AF2590, R&D Systems, Minneapolis MN, USA) kõrgele kontsentratsioonil (1 µg/100 µl analüüsi mahust) lisamine võimaldas seega PGLYRP1-indutseeritud aktiivsuse täielikult inhibeerida.

<i>Tingimused</i>	<i>Toime</i>
II tüüpi 1.0 PGLYRP1	100%
II tüüpi 1.0 PGLYRP1 + IsoAb	98%
II tüüpi 1.0 PGLYRP1 + AF2590	9,7%

[0155] PGLYRP1 C-terminaalse otsa järjestused paistavad olevat TREM-1 retseptori aktiveerimisel kriitilise tähtsusega. Mitmetel konstruktidel, millel on ühise omadusena PGLYRP1 C-terminaalse otsa lõpu modifikatsioon, puudub võime vahendada TREM1/BWZ reporteri aktiivsuse aktivatsiooni, samal ajal kui vastavatel konstruktidel, millel on modifikatsioon N-terminaalses otsas, esineb aktiivsus.

<i>Konstrukt</i>	<i>Toime</i>
PGLYRP1 töötlemata	+++
PGLYRP1 N-lipp	+++

<i>Konstrukt</i>	<i>Toime</i>
PGLYRP1 C-lipp	–
PGLYRP1 N-Fc	+++
PGLYRP1 C-Fc	(+)
II tüüpi 1.0 PGLYRP1	+++
PGLYRP1 C-GPI	(+)

[0156] See näitab C-terminaalse otsa PGLYRP1 vaba osa olemasolu tähtsust TREM-1 stimuleerimiseks.

5 *Tõlgendamine ja bioloogilised võimalused*

[0157] Võime aktiveerida TREM-1 retseptor kasutades kas loomumast PGLYRP1-ligandit PGN-iga või uusi PGLYRP1 variante, mis PGN-i ei vaja, näitab selgelt, et PGN ei ole TREM-1 aktivatsiooni jaoks absoluutselt vajalik kaastegur. Paljude PGN-ist sõltumatut
 10 TREM-1 aktivatsiooni võimaldavate erinevate molekulaarsete PGLYRP1 vormide ühine omadus tundub olevat suur tihendus, mis viib hüpoteesini, et PGN-i peamine roll natiivse ligandi kofaktorina on olla tugi multimeerimisel. *In vivo* saaks sellise toe neutrofiilide rakuvälistelt lukkudelt (NET) (*Blood* 2005, 106: 2551–2558) või teistelt loomuliku tekkega maatriksstruktuuridelt, nagu hüaluroonhape, proteoglükaanstruktuurid, nagu
 15 versikaan, agrekaan, dekoriin või fibrin, mis kõik võivad PGLYRP1 multimeerida või muul moel esitada.

[0158] Need avastused viitavad sellele, et PGLYRP1 C-terminaalse otsa modifitseerimine vähendab TREM-1 aktivatsiooni, mis omakorda näitab, et PGLYRP1 C-terminaalse otsa
 20 blokeerimine näiteks PGLYRP1 C-terminaalse otsa vastu suunatud antikehaga vähendaks selle interaktsiooni TREM-1-ga ning seega ka TREM-1 stimuleerimist.

Näide 19. II tüüpi PGLYRP1 on võimeline indutseerima TNF-alfa vabanemist reumatoidartriidiga patsientide sünoviaalkoerakkudes

[0159] Sünoviaalkoe proovid saadi RA-ga patsientidest täieliku põlveliigese proteesi paigaldamise ajal. Üksainus sünoviaalkoerakkude suspensioon eraldati 4 mg/ml kollageenaasiga (kat-nr 11088793001, Roche, Mannheim, Saksamaa) ja 0,1 mg/ml DNAasiga (kat-nr 11284932001, Roche, Mannheim, Saksamaa) lõhustamise teel 1 tund temperatuuril 37 °C. Sünoviaalkoerakud (1×10^5 /süvend kultuursöötmes RPMI (kat-nr 22400105, Life Technologies, Carlsbad CA, USA) + 10% FCS (kat-nr S0115, BioChrom AG, Berliin, Saksamaa) kaaskultiveeriti erinevate koguste HEK-rakkudega, mis olid ajutiselt transfekteeritud II tüüpi PGLYRP1-ga hüpoksilistel tingimustel. Pärast 24-tunnist inkubeerimist koguti raku supernatandid ning tsütokiine mõõdeti TNF α ELISA-ga (kat-nr 10 DY210, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

	TNF- α (pg/ml) vabanemine					
II tüüpi PGLYRP1 (HEK-transfekteeritud)/kontroll-HEK	1×10^5	3×10^4	1×10^4	3×10^3	1×10^3	0
IgG4 + tüüp II	121,17	114,08	95,02	54,56	57,87	33,47
IgG4 + kontroll	55,65	63,73	57,99	33,78	36,40	36,32

[0160] See näide näitab, et TREM-1 ligand võib annusest sõltuvalt indutseerida TNF- α reumatoidartriidiga patsientide sünoviaalkoerakkudes.

15

Näide 20. PGLYRP1-antikehad blokeerivad TREM-1-vahendatud signaali neutrofiilides ja vähendavad IL-8 vabanemist

[0161] Olles näidanud, et neutrofiilid võivad PGLYRP1 vabastada ning neutrofiilid avaldavad ka TREM-1 retseptorit, katsetasime me neutrofiil-derivaat PGLYRP1 võimet stimuleerida neutrofiile ka autorkriinilaadselt. Eraldatud neutrofiile stimuleeriti PGN-SA-ga (kat-nr tlr1-pgnsa, Invivogen, San Diego CA, USA) ja mõõdeti IL-8 vabanemist kultuursöötmesse. PGLYRP1-antikeha mAb 0184 oli võimeline vähendama PGN-SA-indutseeritud IL-8 vabanemist. Neutrofiilid saadi tervete inimdoonorite täisverest, nagu kirjeldatud näites 3 ning resuspendeeriti RPMI / 10% FBS-is. Rakud kanti plaadile $1,5 \times 10^6$ raku ml kohta ning triplikaattestsüvendeid testiti järgnevatel tingimustel: puudus lisastimulatsioon; ainult 10 μ g/ml PGN-SA -d või 10 μ g/ml PGN-SA-d PGLYRP1

25

antikeha juuresolekul või 4 µg/ml hlgG4 isotüübi kontrollantikeha. Proovid inkubeeriti 24 tundi temperatuuril 37 °C 5% CO₂ inkubaatoris. Seejärel koguti supernatandid kokku ning analüüsiti IL-8 tuvastamiseks komplektiga Bioplex Pro Human Cytokine IL-8 (kat-nr 171-B5008M, BioRad, Hercules CA, USA).

5

Neutrofiilid, stimuleeritud	IL-8-ga, pg/ml	
	Keskmine	SD
Ilma lisata	52	3
PGN-SA	1158	341
PGN-SA + isotüübi kontroll	1195	144
PGN-SA + mAb 0184	449	50

[0162] See näide täitab, et bakteriaalselt saadud PGN-SA-ga stimuleerimisest induktseeritud IL-8 vabanemist neutrofiilidest on võimalik PGLYRP1-vastase antikehaga vähendada. TREM-1 ligand PGLYRP1 on seega neutrofiilide autokriinstimulant ning siin avaldatavad antikehad on potentsiaalselt kasulikud neutrofiilvastuse allareguleerimiseks.

10

Patendinõudlus

1. Monokloonne antikeha või selle antigeeni siduv fragment, mis on võimeline spetsiifiliselt siduma PGLYRP1 ja vähendama PGLYRP1-vahendatud TREM-1 aktiivsust.
- 5
2. Monokloonne antikeha või selle antigeeni siduv fragment vastavalt nõudluspunktile 1, mis on võimeline spetsiifiliselt siduma järjestust SEQ ID NO: 37 (II tüüpi 1.0 PGLYRP1) ja/või SEQ ID NO: 38 (II tüüpi 2.0 PGLYRP1).
- 10
3. Monokloonne antikeha või selle antigeeni siduv fragment vastavalt mis tahes nõudluspunktile 1 või 2, mis on võimeline PGLYRP1-ga seondumisel konkureerima
- (i) antikehaga, millel on raske ahel järjestusega SEQ ID NO: 19 ja kerge ahel järjestusega SEQ ID NO: 20.
 - (ii) antikehaga, millel on raske ahel järjestusega SEQ ID NO: 15 ja kerge ahel

15

 - järjestusega SEQ ID NO: 16.
 - (iii) antikehaga, millel on raske ahel järjestusega SEQ ID NO: 27 ja kerge ahel järjestusega SEQ ID NO: 28.
 - (iv) antikehaga, millel on raske ahel järjestusega SEQ ID NO: 23 ja kerge ahel järjestusega SEQ ID NO: 24.

20

 - (v) antikehaga, millel on raske ahel järjestusega SEQ ID NO: 31 ja kerge ahel järjestusega SEQ ID NO: 32 ja/või
 - (vi) antikehaga, millel on raske ahel järjestusega SEQ ID NO: 35 ja kerge ahel järjestusega SEQ ID NO: 36.
- 25
4. Monokloonne antikeha või selle antigeeni siduv fragment vastavalt mis tahes nõudluspunktile 1–3, mis sisaldab
- (i) CDRH1 järjestust, mis vastab aminohappejääkidele 31 kuni 35 (SYWMN) järjestuses SEQ ID NO: 15, kusjuures üks nimetatud aminohappejääkidest võib valikuliselt olla erinev aminohappejääk;

30

 - (ii) CDRH2 järjestust, mis vastab aminohappejääkidele 50 kuni 66 (MIHPSDSETRLNQQKFKD) järjestuses SEQ ID NO: 15, kusjuures üks, kaks või kolm nimetatud aminohappejääkidest võivad valikuliselt olla erinevad aminohappejäägid;

- (iii) CDRH3 järjestust, mis vastab aminohappejääkidele 98 kuni 108 (DYSDYDGFAY) järjestuses SEQ ID NO: 15, kusjuures üks, kaks või kolm nimetatud aminohappejääkidest võivad valikuliselt olla erinevad aminohapped;
- 5 (iv) CDRL1 järjestust, mis vastab aminohappejääkidele 24 kuni 34 (RASQISDYLH) järjestuses SEQ ID NO: 16, kusjuures üks, kaks või kolm nimetatud aminohappejääkidest võivad valikuliselt olla erinevad aminohapped;
- (v) CDRL2 järjestust, mis vastab aminohappejääkidele 51 kuni 56 (ASQIS) järjestuses SEQ ID NO: 16, kusjuures üks või kaks nimetatud aminohappejääkidest võivad valikuliselt olla erinevad aminohapped; ja
- 10 (vi) CDRL3 järjestust, mis vastab aminohappejääkidele 89 kuni 97 (QNGHSFPLT) järjestuses SEQ ID NO: 16, kusjuures üks või kaks nimetatud aminohappejääkidest võivad valikuliselt olla erinevad aminohapped.

5. Monokloonne antikeha või selle antigeeni siduv fragment vastavalt mis tahes
15 nõudluspunktile 1–3, mis sisaldab

- (i) CDRH1 järjestust, mis vastab aminohappejääkidele 31 kuni 35 (DYNMY) järjestuses SEQ ID NO: 19, kusjuures üks nimetatud aminohappejääkidest võib valikuliselt olla erinev aminohappejääk;
- 20 (ii) CDRH2 järjestust, mis vastab aminohappejääkidele 50 kuni 66 (YIDPYNGDTSYNQKFKG) järjestuses SEQ ID NO: 19, kusjuures üks, kaks või kolm nimetatud aminohappejääkidest võivad valikuliselt olla erinevad aminohappejäägid;
- (iii) CDRH3 järjestust, mis vastab aminohappejääkidele 99 kuni 109 (GDYGNPFYLDY) järjestuses SEQ ID NO: 19, kusjuures üks, kaks või kolm
25 nimetatud aminohappejääkidest võivad valikuliselt olla erinevad aminohapped;
- (iv) CDRL1 järjestust, mis vastab aminohappejääkidele 24 kuni 33 (SVSSSVNYMY) järjestuses SEQ ID NO: 20, kusjuures üks, kaks või kolm nimetatud aminohappejääkidest võivad valikuliselt olla erinevad aminohapped;
- 30 (v) CDRL2 järjestust, mis vastab aminohappejääkidele 49 kuni 55 (DTSKLPS) järjestuses SEQ ID NO: 20, kusjuures üks või kaks nimetatud aminohappejääkidest võivad valikuliselt olla erinevad aminohapped; ja

(vi) CDRL3 järjestust, mis vastab aminohappejääkidele 88 kuni 96 (QQWTSNPPT) järjestuses SEQ ID NO: 20, kusjuures üks või kaks nimetatud aminohappejääkidest võivad valikuliselt olla erinevad aminohapped.

5 **6.** Monokloonne antikeha või selle antigeeni siduv fragment vastavalt mis tahes nõudluspunktile 1–3, mis sisaldab

(i) CDRH1 järjestust, mis vastab aminohappejääkidele 31 kuni 35 (DTYIH) järjestuses SEQ ID NO: 23, kusjuures üks nimetatud aminohappejääkidest võib valikuliselt olla erinev aminohappejääk;

10 (ii) CDRH2 järjestust, mis vastab aminohappejääkidele 50 kuni 66 (RIDPANDDTKYDPNFQG) järjestuses SEQ ID NO: 23, kusjuures üks, kaks või kolm nimetatud aminohappejääkidest võivad valikuliselt olla erinevad aminohappejäägid;

15 (iii) CDRH3 järjestust, mis vastab aminohappejääkidele 99 kuni 108 (SDNSDSWFAY) järjestuses SEQ ID NO: 23, kusjuures üks, kaks või kolm nimetatud aminohappejääkidest võivad valikuliselt olla erinevad aminohapped;

iv) CDRL1 järjestust, mis vastab aminohappejääkidele 24 kuni 33 (SVSSSVNFMN) järjestuses SEQ ID NO: 24, kusjuures üks, kaks või kolm nimetatud aminohappejääkidest võivad valikuliselt olla erinevad aminohapped;

20 v) CDRL2 järjestust, mis vastab aminohappejääkidele 49 kuni 55 (DTSKLAP) järjestuses SEQ ID NO: 24, kusjuures üks või kaks nimetatud aminohappejääkidest võivad valikuliselt olla erinevad aminohapped; ja

25 vi) CDRL3 järjestust, mis vastab aminohappejääkidele 88 kuni 96 (HQWSSYSLT) järjestuses SEQ ID NO: 24, kusjuures üks või kaks nimetatud aminohappejääkidest võivad valikuliselt olla erinevad aminohapped.

7. Monokloonne antikeha või selle antigeeni siduv fragment vastavalt mis tahes nõudluspunktile 1–3, mis sisaldab

30 (i) CDRH1 järjestust, mis vastab aminohappejääkidele 31 kuni 35 (DYNMH) järjestuses SEQ ID NO: 27, kusjuures üks nimetatud aminohappejääkidest võib valikuliselt olla erinev aminohappejääk;

(ii) CDRH2 järjestust, mis vastab aminohappejääkidele 50 kuni 66 (YVDPYDGGTSSNQKFKG) järjestuses SEQ ID NO: 27, kusjuures üks, kaks või

kolm nimetatud aminohappejääkidest võivad valikuliselt olla erinevad aminohappejäägid;

5 (iii) CDRH3 järjestust, mis vastab aminohappejääkidele 99 kuni 106 (EVPYYFDY) järjestuses SEQ ID NO: 27, kusjuures üks, kaks või kolm nimetatud aminohappejääkidest võivad valikuliselt olla erinevad aminohapped;

iv) CDRL1 järjestust, mis vastab aminohappejääkidele 24 kuni 33 (VASSSVTYMY) järjestuses SEQ ID NO: 28, kusjuures üks, kaks või kolm nimetatud aminohappejääkidest võivad valikuliselt olla erinevad aminohapped;

10 v) CDRL2 järjestust, mis vastab aminohappejääkidele 49 kuni 54 (THPLAS) järjestuses SEQ ID NO: 28, kusjuures üks või kaks nimetatud aminohappejääkidest võivad valikuliselt olla erinevad aminohapped; ja

vi) CDRL3 järjestust, mis vastab aminohappejääkidele 87 kuni 95 (PHWNTNPPT) järjestuses SEQ ID NO: 28, kusjuures üks või kaks nimetatud aminohappejääkidest võivad valikuliselt olla erinevad aminohapped.

15

8. Monokloonne antikeha või selle antigeeni siduv fragment vastavalt mis tahes nõudluspunktile 1–3, mis sisaldab

20 (i) CDRH1 järjestust, mis vastab aminohappejääkidele 31 kuni 35 (DYMY) järjestuses SEQ ID NO: 31, kusjuures üks nendest aminohappejääkidest võib valikuliselt olla erinev aminohappejääk;

(ii) CDRH2 järjestust, mis vastab aminohappejääkidele 50 kuni 66 (AISDDSTYTYYPDSVKG) järjestuses SEQ ID NO: 31, kusjuures üks, kaks või kolm nimetatud aminohappejääkidest võivad valikuliselt olla erinevad aminohappejäägid;

25 (iii) CDRH3 järjestust, mis vastab aminohappejääkidele 99 kuni 109 (GGYGNYAMDY) järjestuses SEQ ID NO: 31, kusjuures üks, kaks või kolm nimetatud aminohappejääkidest võivad valikuliselt olla erinevad aminohapped;

30 iv) CDRL1 järjestust, mis vastab aminohappejääkidele 24 kuni 35 (TASSSVSSSYLH) järjestuses SEQ ID NO: 32, kusjuures üks, kaks või kolm nimetatud aminohappejääkidest võivad valikuliselt olla erinevad aminohapped;

v) CDRL2 järjestust, mis vastab aminohappejääkidele 51–57 (STSNLAS) järjestuses SEQ ID NO: 32, kusjuures üks või kaks nimetatud aminohappejääkidest võivad valikuliselt olla erinevad aminohapped; ja

vi) CDRL3 järjestust, mis vastab aminohappejääkidele 90–98 (HQYHRSPFT) järjestuses SEQ ID NO: 32, kusjuures üks või kaks nimetatud aminohappejääkidest võivad valikuliselt olla erinevad aminohapped.

- 5 **9.** Monokloonne antikeha või selle antigeeni siduv fragment vastavalt mis tahes nõudluspunktile 1–3, mis sisaldab
- (i) CDRH1 järjestust, mis vastab aminohappejääkidele 31 kuni 35 (NYVMH) järjestuses SEQ ID NO: 35, kusjuures üks nendest aminohappejääkidest võib valikuliselt olla erinev aminohappejääk;
 - 10 (ii) CDRH2 järjestust, mis vastab aminohappejääkidele 50 kuni 66 (WINPFNDGTNYNENFKN) järjestuses SEQ ID NO: 35, kusjuures üks, kaks või kolm nimetatud aminohappejääkidest võivad valikuliselt olla erinevad aminohappejäägid;
 - (iii) CDRH3 järjestust, mis vastab aminohappejääkidele 99 kuni 109
15 (SGFITTLIEDY) järjestuses SEQ ID NO: 35, kusjuures üks, kaks või kolm nimetatud aminohappejääkidest võivad valikuliselt olla erinevad aminohapped;
 - iv) CDRL1 järjestust, mis vastab aminohappejääkidele 24 kuni 34 (KASESVGSFVS) järjestuses SEQ ID NO: 36, kusjuures üks, kaks või kolm nimetatud aminohappejääkidest võivad valikuliselt olla erinevad aminohapped;
 - 20 v) CDRL2 järjestust, mis vastab aminohappejääkidele 50 kuni 56 (GASNRYT) järjestuses SEQ ID NO: 36, kusjuures üks või kaks nimetatud aminohappejääkidest võivad valikuliselt olla erinevad aminohapped; ja
 - vi) CDRL3 järjestust, mis vastab aminohappejääkidele 89 kuni 96 (GQYYTHPT) järjestuses SEQ ID NO: 36, kusjuures üks või kaks nimetatud aminohappejääkidest
25 võivad valikuliselt olla erinevad aminohapped.

10. Farmatseutiline kompositsioon, mis sisaldab mistahes nõudluspunkti 1–9 kohast antikeha või selle fragmenti ning farmatseutiliselt vastuvõetavat kandjat.

- 30 **11.** Monokloonne antikeha või selle antigeeni siduv fragment vastavalt mis tahes nõudluspunktile 1–9 või farmatseutiline kompositsioon vastavalt nõudluspunktile 10 kasutamiseks ravimina.

12. Isoleeritud antikeha või selle antigeeni siduv fragment vastavalt mis tahes nõudluspunktile 1–9 või farmatseutiline kompositsioon vastavalt nõudluspunktile 10 kasutamiseks akuutse või kroonilise põletiku tulemusel tekkinud põletikulise haiguse või autoimmuunhaiguse ravimiseks ravi vajavas patsiendis.

5

13. Antikeha või selle antigeeni siduv fragment kasutamiseks või farmatseutiline kompositsioon kasutamiseks vastavalt nõudluspunktile 12, kusjuures põletikuline haigus või autoimmuunhaigus valitakse rühmast, kuhu kuuluvad põletikuline soolehaigus, Crohni tõbi, haavandiline koliit, sooleärritussündroom, reumatoidartriit, psoriaas, psoriaatiline artriit, süsteemne erütematoosne luupus, nefriitluupus, I tüüpi diabeet, Gravesi tõbi, polüsklerosis, autoimmuunne müokardiit, Kawasaki tõbi, koronaararteri haigus, krooniline obstruktiivne kopsuhaigus, inerstitsiaalne kopsuhaigus, autoimmuunne türeoidiit, sklerodermia, süsteemne sklerosis, osteoartriit, atoopiline dermatiit, vitiliigo, hülgamisreaktsioon, Sjögreni tõbi, autoimmuunne nefriit, Goodpasture'i sündroom, krooniline põletikuline demüeliniseeriv polüneuropaatia, allergiad ja astma.

10

15

14. Meetod mis tahes nõudluspunkti 1–9 kohase antikeha või selle antigeeni siduva fragmendi loomiseks, mis sisaldab antikeha või selle antigeeni siduva fragmendi rekombinantset ekspresseerimist prokariöotses või eukariöotses rakus.

FIG 1

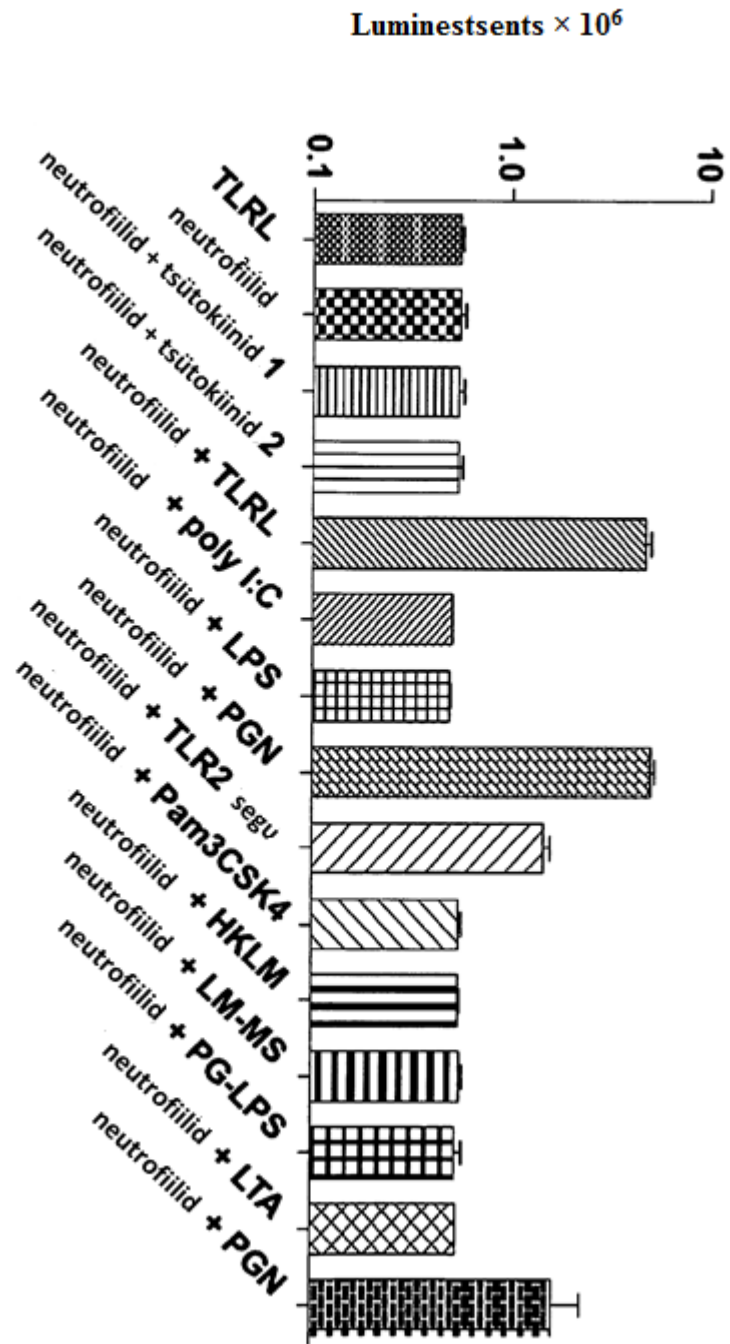
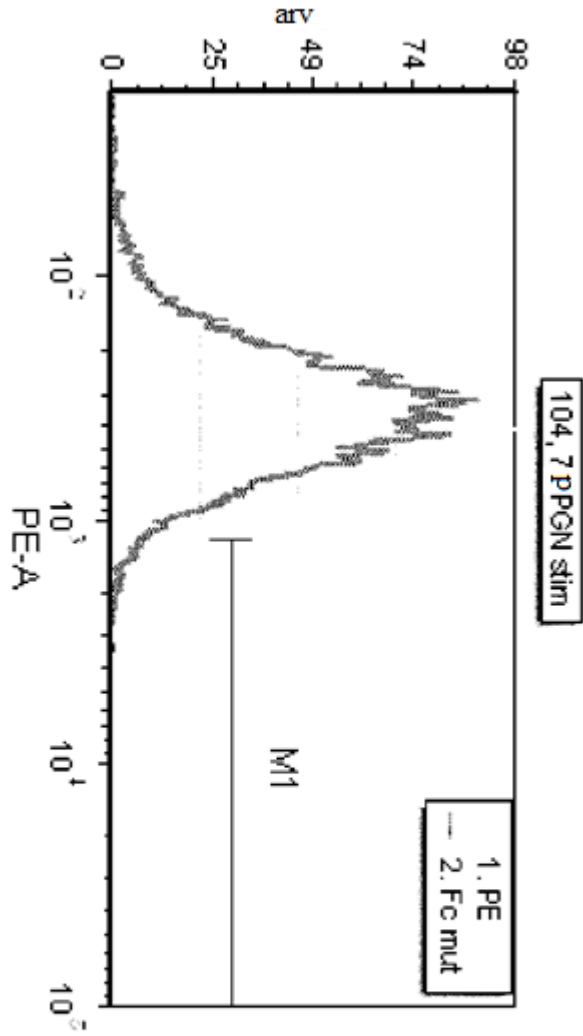
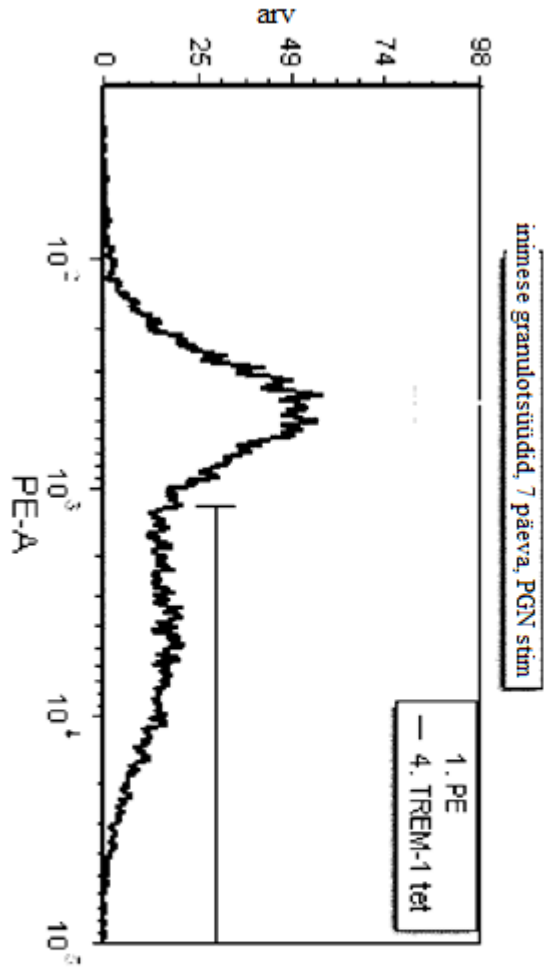


FIG 2A



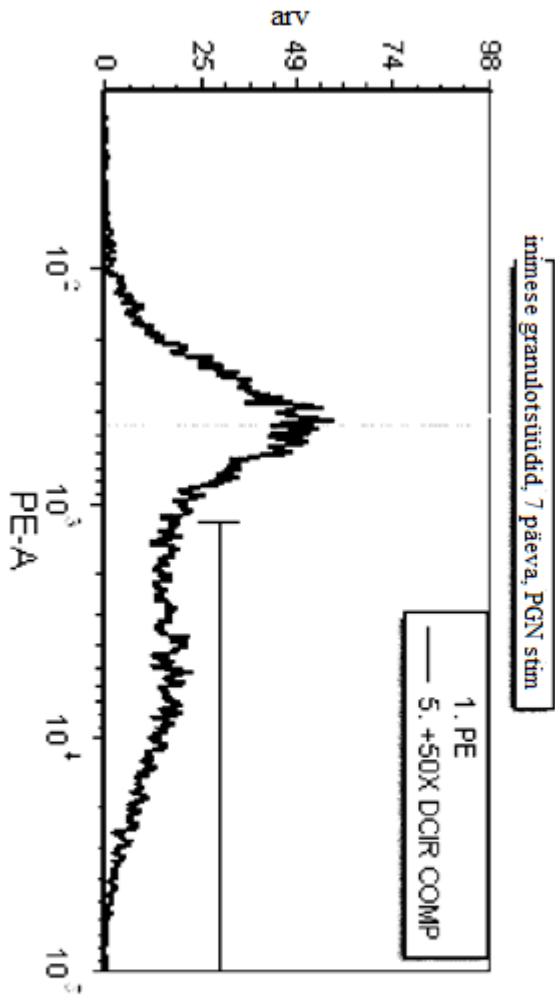
Histogram #	printletud rakkude %
1	2
2	2

FIG 2B



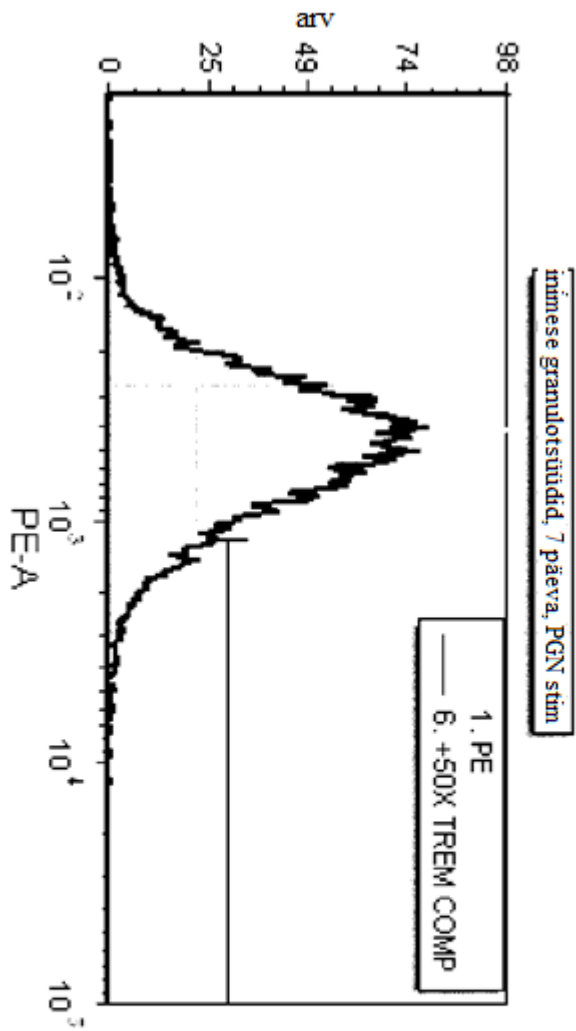
Histogramm #	printletud rakkude %
1	2
2	39

FIG 2C



Histogramm #	piiritletud rakkude %
1	2
2	41

FIG 2D



Histogramm #	piiritletud rakkude %
1	2
2	10

FIG 3

Tuvastatud valgud	Geeni sümbolid	Registreerimis-number
Müeloidrakkudel 1 avaldatud vallandusretseptori isovorm 1	Trem 1	IP100427321
Peptidoglükkaani tuvastusvalk 1	PGLYRP1	IP100021085
Tirosiinvalgu fosfataasi tüüp 6 mitteretseptori isovorm 3	PTPN6	IP100183046

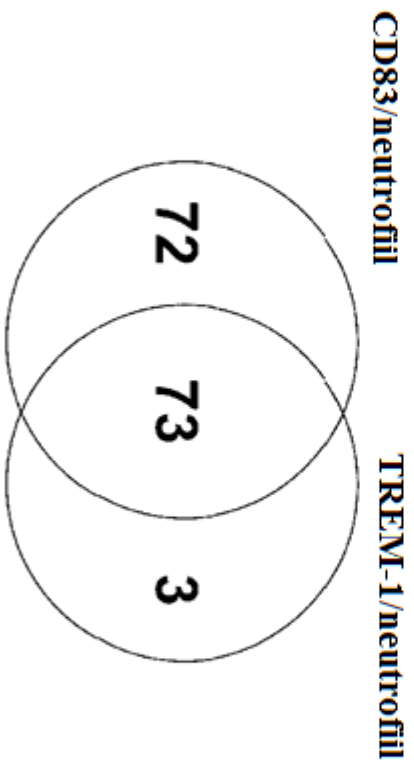


FIG 4A

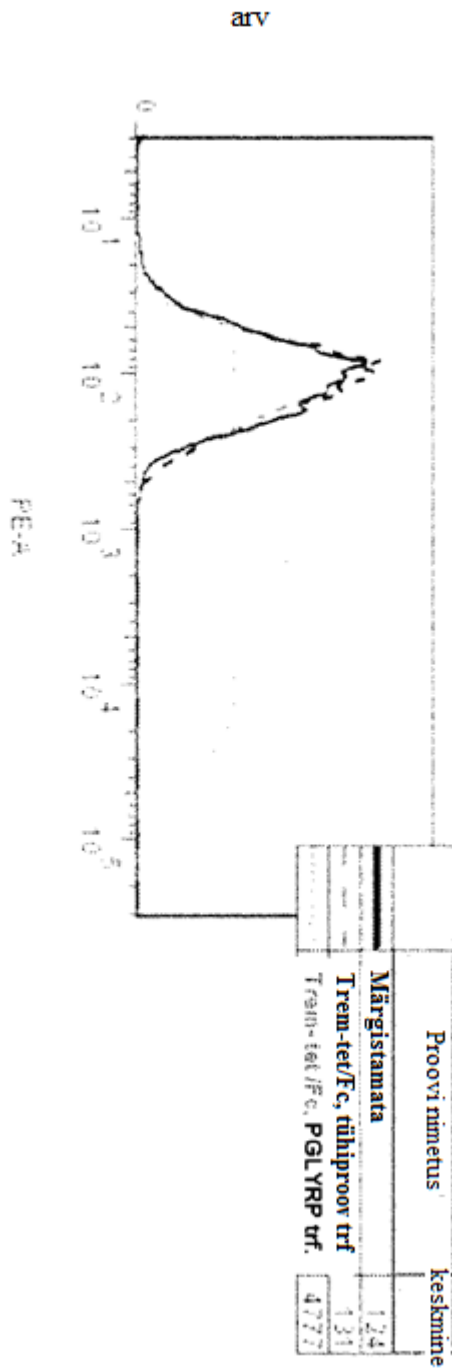
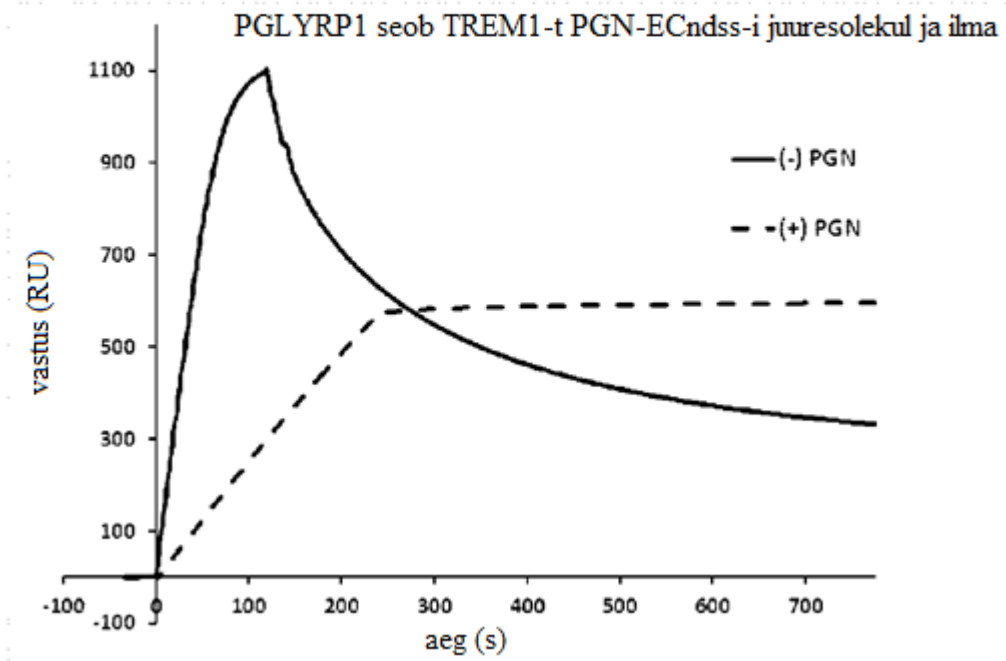
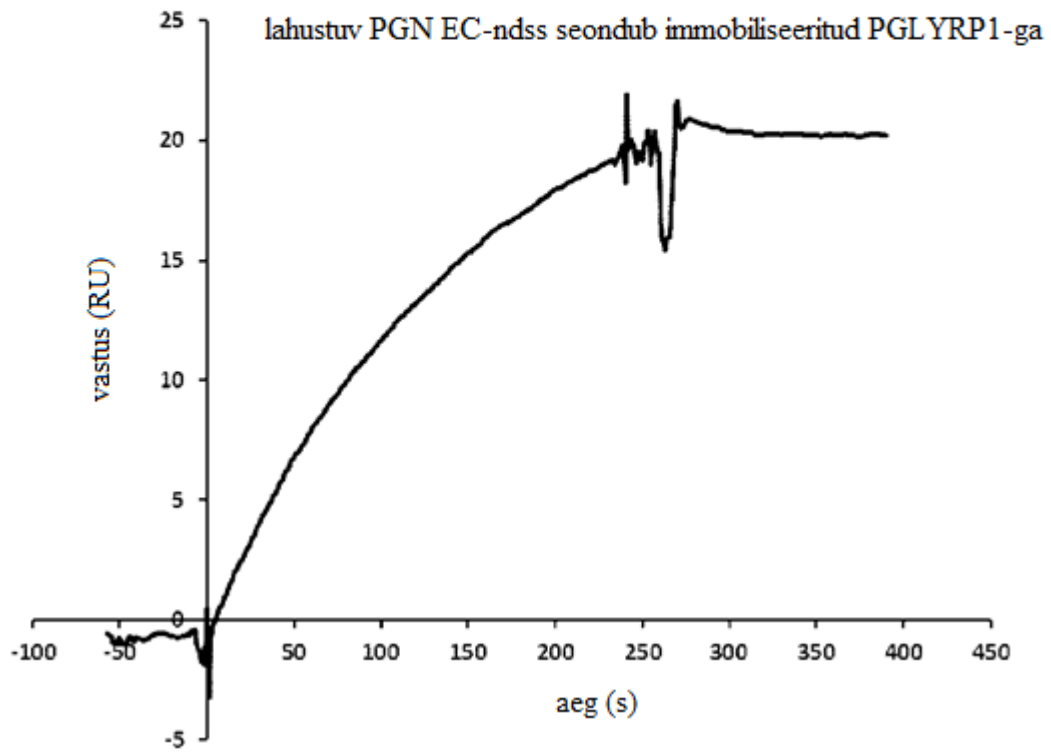


FIG 4B



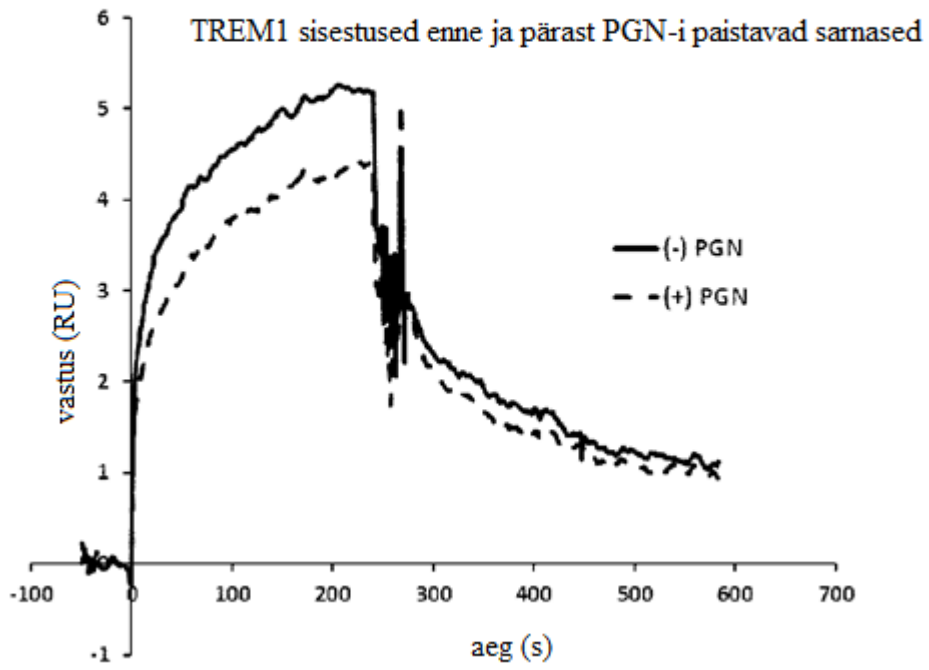
9/21

FIG 4C



10/21

FIG 4D



11/21

FIG 5A

hTREM-1/BWZ.36 reporteranalüzi
hPGLYRP1 titrimine + PGN ECndi

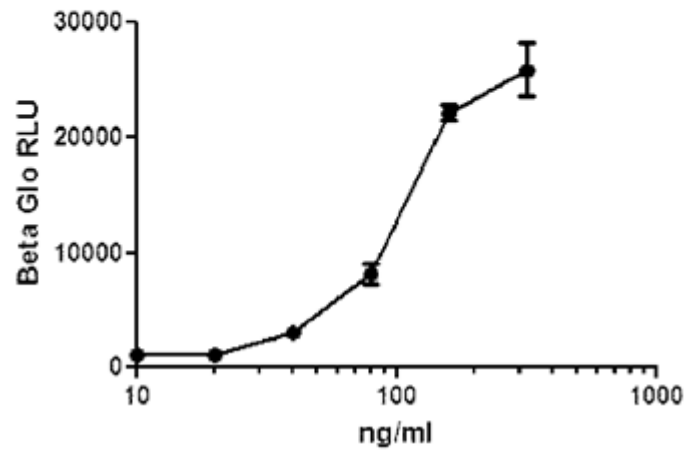


FIG 5B

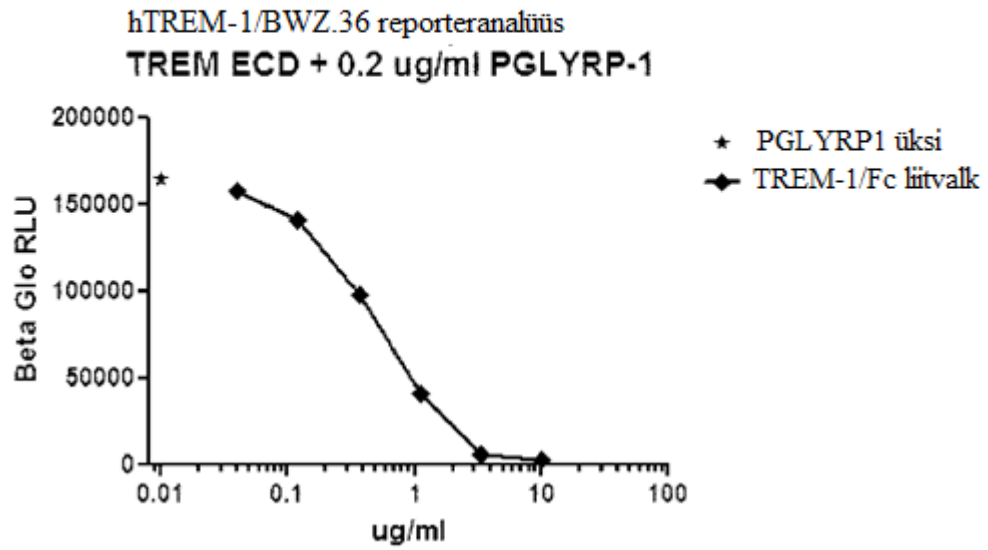
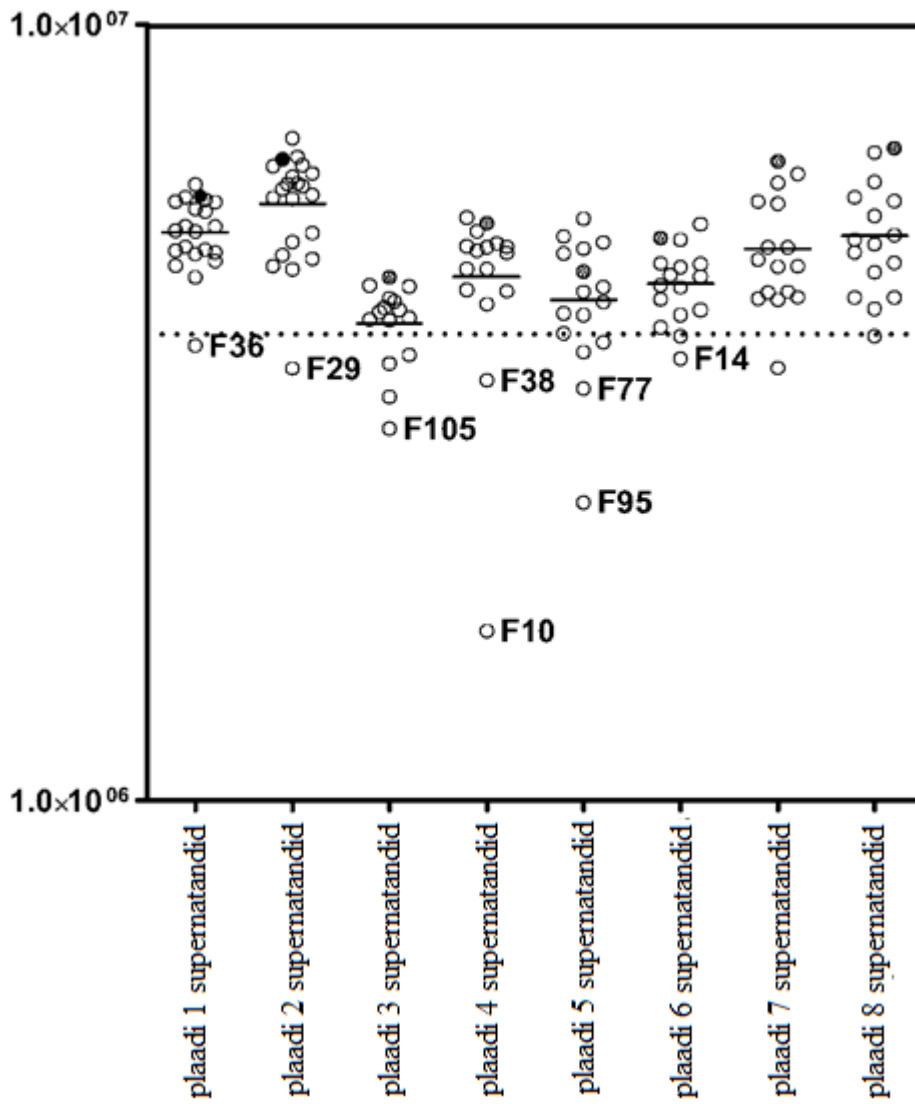


FIG 6A



14/21

FIG 6B

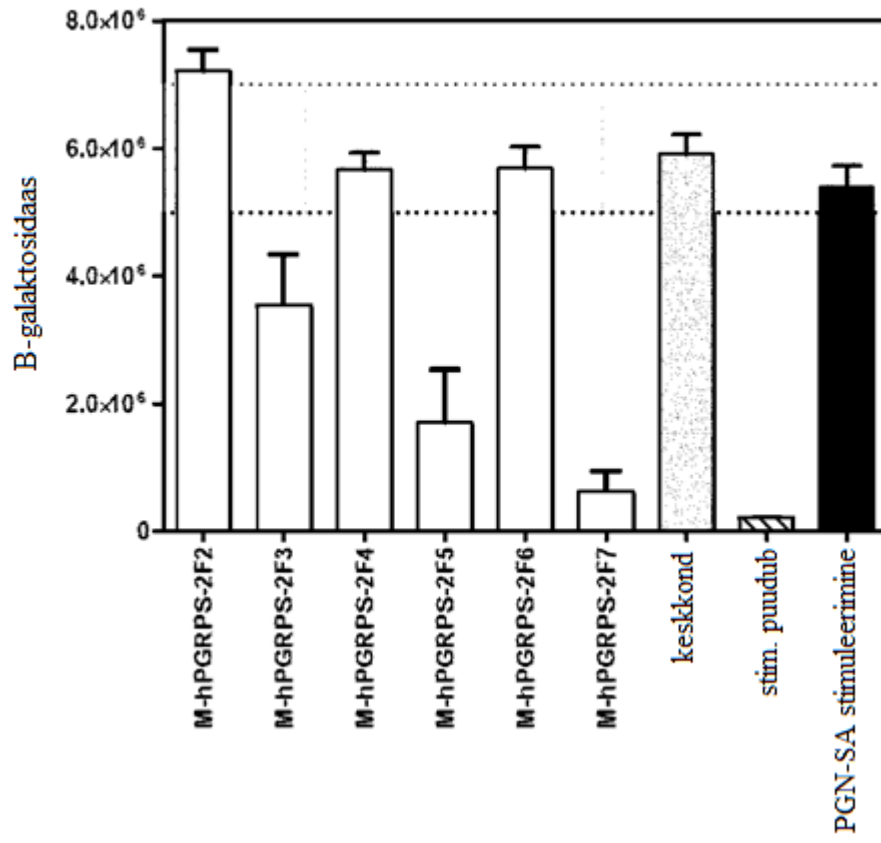


FIG 6C

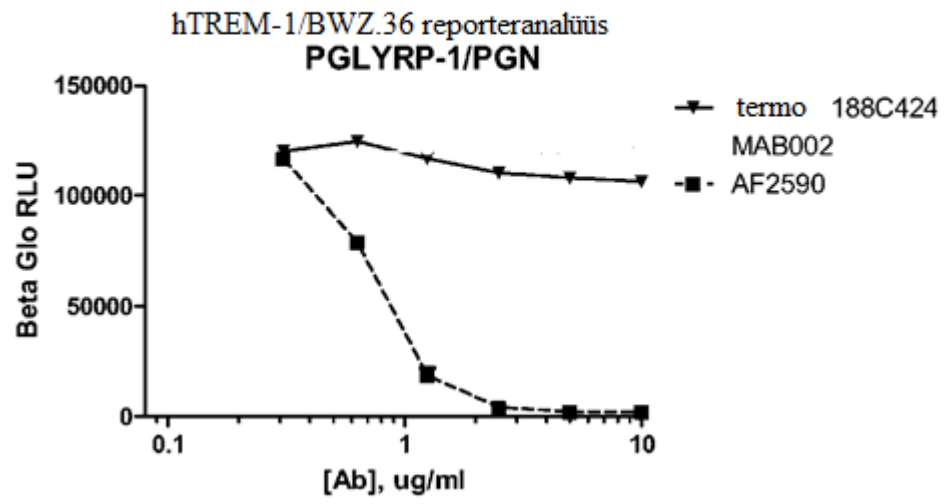


FIG 6D

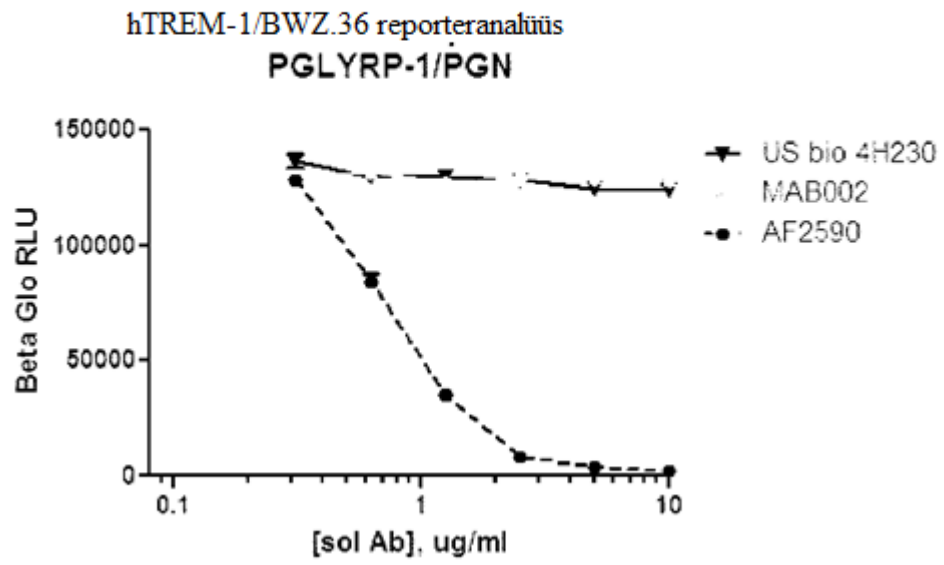


FIG 6E

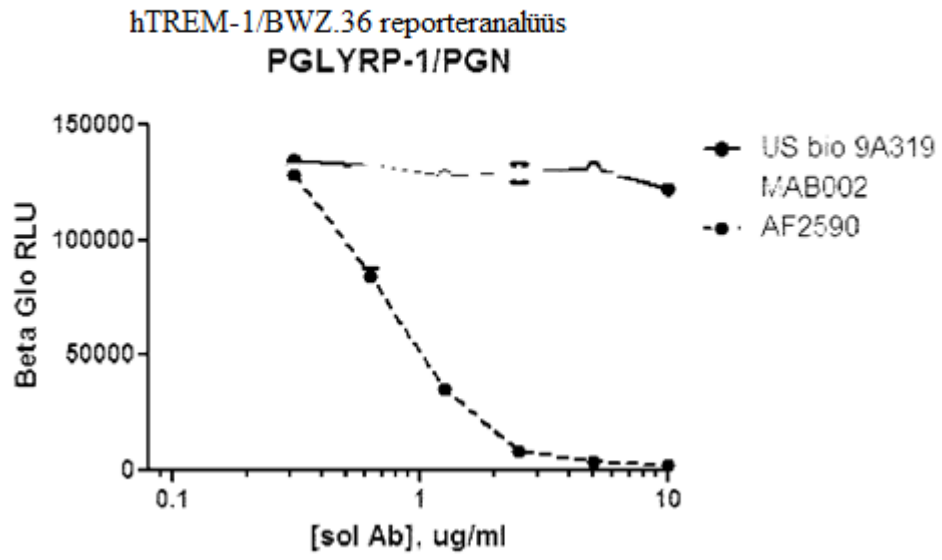
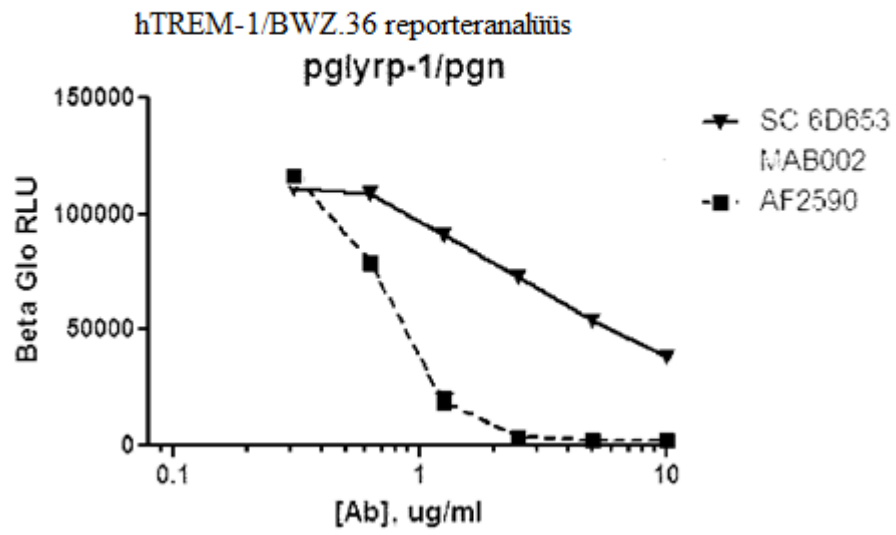


FIG 6F

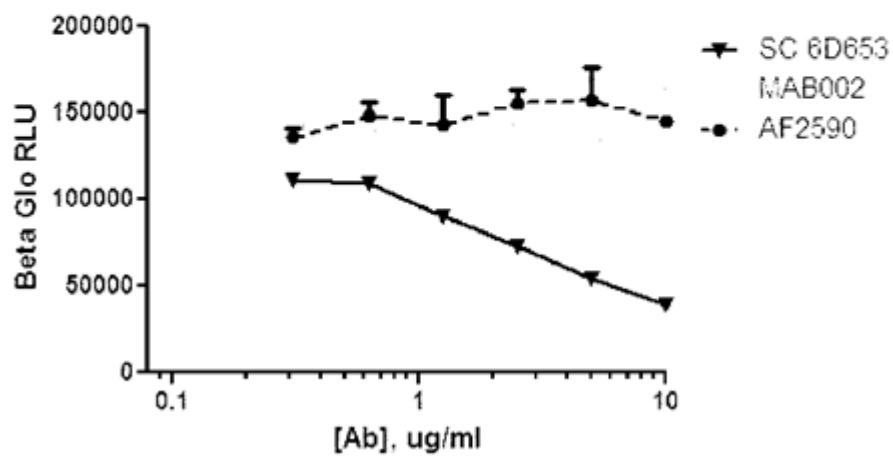


5

10

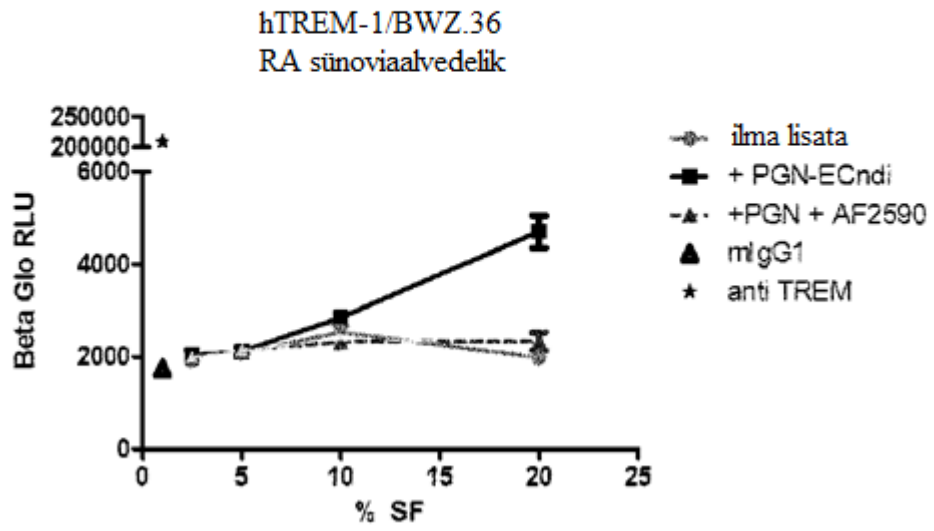
FIG 6G

hTREM-1/BWZ.36 reporteranalüüs
1 µg/pl plaadile kantud TREM-1-vastane mAb



20/21

FIG 7



5

10

15

FIG 8



JÄRJESTUSE LOETELU**[0163]**

- <110> Novo Nordisk A/S
 5 <120> Peptiidglükaani tuvastusvalku 1 siduvad antikehad
 <130> 8498
 <160> 53
 <170> PatentIn versioon 3.5
 <210> 1
 10 <211> 175
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
- ```

Gln Glu Thr Glu Asp Pro Ala Cys Cys Ser Pro Ile Val Pro Arg Asn
1 5 10 15

Glu Trp Lys Ala Leu Ala Ser Glu Cys Ala Gln His Leu Ser Leu Pro
 20 25 30

Leu Arg Tyr Val Val Val Ser His Thr Ala Gly Ser Ser Cys Asn Thr
 35 40 45

Pro Ala Ser Cys Gln Gln Gln Ala Arg Asn Val Gln His Tyr His Met
 50 55 60

Lys Thr Leu Gly Trp Cys Asp Val Gly Tyr Asn Phe Leu Ile Gly Glu
65 70 75 80

Asp Gly Leu Val Tyr Glu Gly Arg Gly Trp Asn Phe Thr Gly Ala His
 85 90 95

Ser Gly His Leu Trp Asn Pro Met Ser Ile Gly Ile Ser Phe Met Gly
 100 105 110

Asn Tyr Met Asp Arg Val Pro Thr Pro Gln Ala Ile Arg Ala Ala Gln
 115 120 125

Gly Leu Leu Ala Cys Gly Val Ala Gln Gly Ala Leu Arg Ser Asn Tyr
 130 135 140

Val Leu Lys Gly His Arg Asp Val Gln Arg Thr Leu Ser Pro Gly Asn
145 150 155 160

Gln Leu Tyr His Leu Ile Gln Asn Trp Pro His Tyr Arg Ser Pro

```



Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Leu Arg Ala Ala Thr Lys  
 195 200 205

Leu Thr Glu Glu Lys Tyr Glu Leu Lys Glu Gly Gln Thr Leu Asp Val  
 210 215 220

Lys Cys Asp Tyr Thr Leu Glu Lys Phe Ala Ser Ser Gln Lys Ala Trp  
 225 230 235 240

Gln Ile Ile Arg Asp Gly Glu Met Pro Lys Thr Leu Ala Cys Thr Glu  
 245 250 255

Arg Pro Ser Lys Asn Ser His Pro Val Gln Val Gly Arg Ile Ile Leu  
 260 265 270

Glu Asp Tyr His Asp His Gly Leu Leu Arg Val Arg Met Val Asn Leu  
 275 280 285

Gln Val Glu Asp Ser Gly Leu Tyr Gln Cys Val Ile Tyr Gln Pro Pro  
 290 295 300

Lys Glu Pro His Met Leu Phe Asp Arg Ile Arg Leu Val Val Thr Lys  
 305 310 315 320

Gly Phe Ser Gly Thr Pro Gly Ser Asn Glu Asn Ser Thr Gln Asn Val  
 325 330 335

Tyr Lys Ile Pro Pro Thr Thr Thr Lys Ala Leu Cys Pro Leu Tyr Thr  
 340 345 350

Ser Pro Arg Thr Val Thr Gln Ala Pro Pro Lys Ser Thr Ala Asp Val  
 355 360 365

Ser Thr Pro Asp Ser Glu Ile Asn Leu Thr Asn Val Thr Asp Ile Ile  
 370 375 380

Arg Gly Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
 385 390 395 400

Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
 405 410 415

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
 420 425 430

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr  
435 440 445

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
450 455 460

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
465 470 475 480

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
485 490 495

Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
500 505 510

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met  
515 520 525

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
530 535 540

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
545 550 555 560

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
565 570 575

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
580 585 590

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
595 600 605

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
610 615

<210> 3

<211> 228

<212> PRT

5

<213> Tehislik

<220>

<223> Fc5mut

<400> 3

Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu





His His His His His His Glu Asp Leu Tyr Phe Gln Ser Met Asp Glu  
 1 5 10 15

Lys Thr Thr Gly Trp Arg Gly Gly His Val Val Glu Gly Leu Ala Gly  
 20 25 30

Glu Leu Glu Gln Leu Arg Ala Arg Leu Glu His His Pro Gln Gly Gln  
 35 40 45

Arg Glu Pro Gly Ser Gly Met Asp Glu Lys Thr Thr Gly Trp Arg Gly  
 50 55 60

Gly His Val Val Glu Gly Leu Ala Gly Glu Leu Glu Gln Leu Arg Ala  
 65 70 75 80

Arg Leu Glu His His Pro Gln Gly Gln Arg Glu Pro Gly Gly Gly Ser  
 85 90 95

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Asp Leu Ala Pro Gln Met Leu  
 100 105 110

Arg Glu Leu Gln Glu Thr Asn Ala Ala Leu Gln Asp Val Arg Glu Leu  
 115 120 125

Leu Arg Gln Gln Val Lys Glu Ile Thr Phe Leu Lys Asn Thr Val Met  
 130 135 140

Glu Cys Asp Ala Cys Gly Met Gln Pro Ala Arg Thr Pro Gly Leu Ser  
 145 150 155 160

Val Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Leu Glu Val  
 165 170 175

Leu Phe Gln Gly Pro Arg Ser Ile Ala Phe Val Ile Phe Phe Gln Lys  
 180 185 190

Tyr Ser Gln Leu Leu Glu Lys Lys Thr Thr Lys Glu Leu Val His Thr  
 195 200 205

Thr Leu Glu Cys Val Lys Lys Asn Met Pro Val Glu Glu Thr Ala Trp  
 210 215 220

Ser Cys Cys Pro Lys Asn Trp Lys Ser Phe Ser Ser Asn Cys Tyr Phe  
 225 230 235 240

Ile Ser Thr Glu Ser Ala Ser Trp Gln Asp Ser Glu Lys Asp Cys Ala  
 245 250 255

Arg Met Glu Ala His Leu Leu Val Ile Asn Thr Gln Glu Glu Gln Asp  
 260 265 270

Phe Ile Phe Gln Asn Leu Gln Glu Glu Ser Ala Tyr Phe Val Gly Leu  
 275 280 285

Ser Asp Pro Glu Gly Gln Arg His Trp Gln Trp Val Asp Gln Thr Pro  
 290 295 300

Tyr Asn Glu Ser Ser Thr Phe Trp His Pro Arg Glu Pro Ser Asp Pro  
 305 310 315 320

Asn Glu Arg Cys Val Val Leu Asn Phe Arg Lys Ser Pro Lys Arg Trp  
 325 330 335

Gly Trp Asn Asp Val Asn Cys Leu Gly Pro Gln Arg Ser Val Cys Glu  
 340 345 350

Met Met Lys Ile His Leu  
 355

<210> 5

<211> 367

<212> PRT

5

<213> Tehislik

<220>

<223> hTREM-1 ECD COMP pentameeri jaoks

<400> 5

Glu Leu Arg Ala Ala Thr Lys Leu Thr Glu Glu Lys Tyr Glu Leu Lys  
 1 5 10 15

Glu Gly Gln Thr Leu Asp Val Lys Cys Asp Tyr Thr Leu Glu Lys Phe  
 20 25 30

Ala Ser Ser Gln Lys Ala Trp Gln Ile Ile Arg Asp Gly Glu Met Pro

10





Gln Arg Lys Glu Glu Thr Phe Lys Lys Tyr Arg Ala Glu Gly Thr Gly  
 115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Thr Pro  
 130 135 140

Glu Val Lys Val Ala Cys Ser Glu Asp Val Asp Leu Pro Cys Thr Ala  
 145 150 155 160

Pro Trp Asp Pro Gln Val Pro Tyr Thr Val Ser Trp Val Lys Leu Leu  
 165 170 175

Glu Gly Gly Glu Glu Arg Met Glu Thr Pro Gln Glu Asp His Leu Arg  
 180 185 190

Gly Gln His Tyr His Gln Lys Gly Gln Asn Gly Ser Phe Asp Ala Pro  
 195 200 205

Asn Glu Arg Pro Tyr Ser Leu Lys Ile Arg Asn Thr Thr Ser Cys Asn  
 210 215 220

Ser Gly Thr Tyr Arg Cys Thr Leu Gln Asp Pro Asp Gly Gln Arg Asn  
 225 230 235 240

Leu Ser Gly Lys Val Ile Leu Arg Val Thr Gly Cys Pro Ala Gln Arg  
 245 250 255

Lys Glu Glu Thr Phe Lys Lys Tyr Arg Ala Glu Gly Ala Leu Ala Gly  
 260 265 270

Thr Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
 275 280 285

Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
 290 295 300

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
 305 310 315 320

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr  
 325 330 335

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
 340 345 350

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
 355 360 365

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
 370 375 380

Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
 385 390 395 400

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met  
 405 410 415

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
 420 425 430

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
 435 440 445

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
 450 455 460

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
 465 470 475 480

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
 485 490 495

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 500 505

<210> 7

<211> 684

<212> DNA

5

<213> Tehislik

<220>

<223> hPGYRP1-GPI

<400> 7

gaattgccca ccattgtcccg ccgctctatg ctgcttgccct cggctctccc cagcctcctt  
 60

cgactcggag cggctcagga gacagaagac ccggcctgct ccagcccat agtgccccg  
 120

aacgagtgga aggcctgga atcagagtgc gcccagcacc tgagcctgca cttacgctat  
 180

gtggtggtat cgcacacgga gggcagcagc tgcaacaccc ccgctctgtg ccagcagcag

10

240

gcccggaatg tgcagcacta ccacatgaag acactgggct cgtgogacgt gggctacaac  
300

ttcttgattg gagaagacgg gctcgtatac gagggccgtg cctggaactt cacgggtgcc  
360

cactcaggtc acttatggaa ccccatgtcc attggcatca ctttcatggg caactacatg  
420

gatcgggtgc ccacacccca ggcacatccg gcagcccagg ctctactggc ctgagggtgtg  
480

gctcagggag ccttgaggtc caactatgct ctcaaaggac accgggatgt gcagcgtaca  
540

ctctctccag gcaaccagct ctaccacctc atccagaatt ggcacacata ccgctcccc  
600

tctcatoga caactacgac cacaactaag acctacttc tctgtctact tetgtctcta  
660

cttctgctcc tactttgact cgag  
684

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 180

&lt;212&gt; PRT

5

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 8

Ala Thr Lys Leu Thr Glu Glu Lys Tyr Glu Leu Lys Glu Gly Gln Thr  
1 5 10 15

Leu Asp Val Lys Cys Asp Tyr Thr Leu Glu Lys Phe Ala Ser Ser Gln  
20 25 30

Lys Ala Trp Gln Ile Ile Arg Asp Gly Glu Met Pro Lys Thr Leu Ala  
35 40 45

Cys Thr Glu Arg Pro Ser Lys Asn Ser His Pro Val Gln Val Gly Arg  
50 55 60

Ile Ile Leu Glu Asp Tyr His Asp His Gly Leu Leu Arg Val Arg Met  
65 70 75 80

Val Asn Leu Gln Val Glu Asp Ser Gly Leu Tyr Gln Cys Val Ile Tyr  
85 90 95

Gln Pro Pro Lys Glu Pro His Met Leu Phe Asp Arg Ile Arg Leu Val  
100 105 110



Val Thr Lys Gly Phe Ser Gly Thr Pro Gly Ser Asn Glu Asn Ser Thr  
 115 120 125

Gln Asn Val Tyr Lys Ile Pro Pro Thr Thr Thr Lys Ala Leu Cys Pro  
 130 135 140

Leu Tyr Thr Ser Pro Arg Thr Val Thr Gln Ala Pro Pro Lys Ser Thr  
 145 150 155 160

Ala Asp Val Ser Thr Pro Asp Ser Glu Ile Asn Leu Thr Asn Val Thr  
 165 170 175

Asp Ile Ile Arg  
 180

<210> 9

<211> 1221

<212> DNA

5

<213> Tehislik

<220>

<223> hTREM ECD x2

<400> 9

gaattcgcaa ctatgcctct gctgctgctg ctgcctctgc tgtggctgg cgcactgct  
 60

gaactgaggg ccgetaccaa actgaccgaa gaaaagtacg agctgaaaga agggcagacc  
 120

ctggacgtga agtgcgatta tacactggaa aagtctgcaa cctcccagaa agcctggcag  
 180

atcattagag acggagagat gcccaagaact ctggcttgta ccgaacgccc ttcaaaaaac  
 240

agccaccag tgcaggtgg ccgaatcatt ctggaggact accacgatca tgggctgctg  
 300

cgggtgagaa tggtaaatct gcaggtggag gactccggcc tgtaccagtg cgtcatctat  
 360

cagcccccta aggaaccaca tatgctgttc gataggattc ccttgggtgt cactaaaggc  
 420

ttttctggga cccccggaag taacgagaac agcaccagaa acgtgtacaa gatcccacc  
 480

accacaacta aggcctgtg cccctgtat acatctctc gaaccgtgac acaggccccct  
 540

ccaaagagta ccgctgaact gagcaccccc gattccgaga ttaacctgac aaatgtgact  
 600

10

gacatcatta ggggtaccgg aggaggagga tccggaggag gaggeagcgg aggcggggga  
 660  
 tccgaactgc gcgcgcctac caagctgaca gaggaaaaat atgagctgea agaaggccag  
 720  
 actctggacg tgaatgcga ttataccctc gagaagtttg cttctagtca gaaagcatgg  
 780  
 cagatcattc gcgatgggga gatgcctaag aactggcct gtactgaacg gcctccaaa  
 840  
 aactctacc ctgtgcaggc cgaagaatc attctggaag actatcacga tcatggcctg  
 900  
 ctgcgagcgc ggatggtgaa tctgcaggcc gaggacagtg gactgtatca atgcgtcatc  
 960  
 tatcaacccc ctaaggaacc tcatatgctc ttgatagaa ttaggctggc gtcacaaaa  
 1020  
 ggctttagcg ggactccagg atctaacgag aatagtactc agaactgtga caaaattcct  
 1080  
 cctactacca ccaaggcct gtgccactc tatacaagcc cacgaactgt gaccagga  
 1140  
 cctccaaaga gcaactgcaga tgtgagcact ccagatagcg aatcaacct gaccaatgtg  
 1200  
 acagatatta ttagggggcc c  
 1221

<210> 10

<211> 1170

<212> DNA

5

<213> Tehislik

<220>

<223> hTREM COMP

<400> 10

gaattcgcaa ctatgcctct gctgctgctc ctgcctctgc tgtggctgg cgcactgct  
 60  
 gaactgaggg ccgctaccaa actgaccgaa gaaaagtacg agctgaaaga agggcagacc  
 120  
 ctggacgtga agtgcgatta tacactggaa aagtctgcaa cctcccaga agcctggcag  
 180  
 atcattagag acggagagat gcccaagact ctggcttgta ccgaacgccc ttcaaaaaac  
 240  
 agccacccag tgcaggtcgg ccgaatcatt ctggaggact accacgata tggctgctg  
 300  
 cgggtgagaa tggcfaatct gcaggtggac gactccggcc tgtaccagtg cgtcatctat

10

360

cagcccccta aggaaccaca tatgctgttc gataggattc ccttgggtgt cactaaaggc  
420

ttttctggga cccccggaag taacgagaac agcaccaga acgtgtacaa gatcccccc  
480

accacaacta aggcctgtg cccctgtat acatctctc gaaccgtgac acaggccctt  
540

ccaaagagta ccgctgacgt gagcacacc c gattccgaga ttaacctgac aaatgtgact  
600

gacatcatta ggggtacctt ggaggtgctg ttccagggac caggaggagg aagcggagga  
660

ggcagcggcg ggggatctgg ggacctggcc cctcagatgc tgaggagct gcaggaaacc  
720

aacgcgcctc tgcaggatgt gcgggagctg ctgagacagc aggtgaagga aatcacattt  
780

ctgaaaaata ctgtgatgga gtgcgacgt tgtggaatgc agccagctag gacacctgga  
840

ctgagcgtgg gaggaggaag tggaggagga tcaggaggag caagcatgga tgagaagacc  
900

acaggatgga gaggaggaca cgtggtggaa ggactggctg gagagctgga acagctgagg  
960

gctagactgg agcaccatcc acagggacag agggagccag cgtccggaat ggacgaaaa  
1020

actaccggat ggaggggagg acacgtgctg gagggcctgg ccggcgaact ggagcagctg  
1080

agagctgcgc tggaaacacca tctcagggc cagagagagc cagaggacct gtaactccag  
1140

tctcaccatc accatcacca ttaaggatcc  
1170

&lt;210&gt; 11

&lt; 211&gt; 867

&lt; 212&gt; DNA

5

&lt; 213&gt; Tehislik

&lt;220&gt;

&lt; 223&gt; hCD83 tetrameeri jaoks

&lt;400&gt; 11

gaattcgcca ccatgcctct gctgctgctg ctgcactgac tgtggctgg cgctctgct  
60

accccagagg tgaaggtggc ttgctccgaa gacgtggatc tgcttgtac agccccctgg  
120

10

gaccctcagg tgcatacac cgtgagctgc gtgaaactgc tggaggcggg ggaggaacgg  
 180  
 atggagacac cacaggaaga ccacctgaga gggcagcact atcatcagaa ggggcagaac  
 240  
 ggatctttcg atgctcccaa tgaacggcct tacagtctga aatcagaaa caccacaagc  
 300  
 tgcaattccg gcacatatag gtgtactctg caggaccctg atggacagcg caacctgagc  
 360  
 ggcaaagtga tcttgccggg gacaggctgc ccagctcaga gaaaggagga aacttttaag  
 420  
 aagtaccggg ccgagggtac cggaggcggg ggatccggag caggaggaag cggaggagga  
 480  
 ggatccactc ctgaagtga ggtggcttgc agtgaagacg tggatctgcc ctgtaccgcc  
 540  
 ccctgggata ctcagggtgc atacacagtc tcttgggtga agctgtgga gggaggcag  
 600  
 gaacggatgg agaccctca ggaagaccat ctgagaggcc agcattaca tcagaagggc  
 660  
 cagaacgggt cattcgatgc cccaaatgaa aggcctaca cctgaaaat ccgcaact  
 720  
 acctcttgca atagtggaa cctatagggt acactgcagg accccgatgg gcagcgcaat  
 780  
 ctgtccggca aagtgatect gagggtgact ggctgtcctg ctcagcgcaa agaggaaacc  
 840  
 tttaagaaat atagggccga ggggccc  
 867

<210> 12

<211> 1143

<212> DNA

5

<213> Tehislik

<220>

<223> hDCIR COMP

<400> 12

gaattcgcca ccattgccact gctgctgctg ctgccactgc tgtggctgg agctctgct  
 60  
 caccatcacc atcaccatga ggaacctgtac ttccagttca tggatgaaa gaccacagga  
 120  
 tggaggggag gacacgtggt ggagggactg gctggagagc tggaacagct gagggctaga  
 180  
 ctggaacacc atcctcaggg ccagagggag ccagggctctg gaatggacga aaaaactacc  
 240

10

ggctggagag ggggccaatgt cgtcgaagge ctggccggcg aactggagca gctgagagct  
300

aggetggagc accatccaca gggacagagg gaacctggag gaggcagcgg aggaggctcc  
360

ggaggaggct ctggcgacct ggccccacag atgotgagag agctgcagga aaccaacgcc  
420

gctctgcagg atgtgcggga gctgctgaga cagcaggtga aggaaatcac attcctgaaa  
480

aatactgtga tggagtgcga tgcctgtgga atgcagccag ctaggacacc tggactgagc  
540

gtgggaggag gcagtgagg aggotcagga ggaggcagcc tggagggtct gtttcagggc  
600

cccagatcta ttgcttttgt cattttcttt caaaaatatt ctgagcttct tgaaaaaaag  
660

actacaaaag agctggttca tacaacattg gagtgtgtga aaaaaatat gccctggaa  
720

gagacagcct ggagctgttg cccaaagaat tggaaatcat ttagttccaa ctgctacttt  
780

atttctactg aatcagcacc ttggcaagac agtgagaagg actgtgctag aatggaggct  
840

cacctgcctg tgataaacac tcaagaagag caggatttca tottccagaa totgcaagaa  
900

gaatctgctt attttgtgg gctctcagat ccagaaggtc agcgacattg gcaatgggtt  
960

gatcagacac catacaatga aagttccaca ttctggcacc cactgagcc cagtgatccc  
1020

aatgagcgcct gcgttgtgct aaatttctgt aaatcaccda aaagatgggg ctggaatgat  
1080

gttaattgtc ttggctctca aaggtcagtt tgtgagatga tgaagatcca cttatgagga  
1140

tcc  
1143

<210> 13

<211> 426

<212> DNA

5

<213> Mus musculus

<400> 13

aagcttgccg ccaccatgcc tctgctgctg ctgctgctc tgcctgtggc cggggctctg  
60

gctcaggccc agctgcagca gctggggccc gaactggctc caccaggggc atctgtgaaa

120

ctgagttgca aggcctctgg atacagtttc acctcatatt ggatgaactg ggtcaaacag  
180

cgaccaggac agggactgga gtggatcggc atgattcacc ctagecactc cgaaacaaga  
240

ctgaatcaga agtttaaaga caaggctacc ctgacagtgg ataagagctc ctctacagca  
300

tacatgcagc tgagttcacc cactagcgag gactcgcgct totactattg tgctagggat  
360

tactctgact atgatgggtt cgcctattgg ggacagggca ctctggtgac cgtcagcgct  
420

gctagc  
426

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 390

&lt;212&gt; DNA

5

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 14

aagcttgccg ccaccatgcc totgctgctg ctgctgcctc tgctgtgggc tgggctctg  
60

gctgatactg tgatgactca gtcaccgctt acctgtctcg tgacaccagg ggaaccgggtg  
120

agcctgtcct gcagagcctc tcagagtatc tcagattacc tgcactggta tcagcagaag  
180

tctcatgaga gtcccaggct gctgatcaag tacgccagcc agtccatctc tggcattcct  
240

tcccggttca gtggctcagg gagcggatcc gactttactc tgtctatcaa cagcgtcgag  
300

ccagaagatg tgggagtcta ctattgtcag aatggccaca gcttcccctt gacctttggc  
360

accgggacaa agctggaact gaaacgtacc  
390

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 446

10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 15

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Met Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Arg Leu Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Ser Asp Tyr Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
 115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu  
 130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp  
 145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
 165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
 180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro  
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro  
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe  
 225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
 245 250 255

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

<210> 16

<211> 214

<212> PRT

5

<213> Mus musculus

<400> 16

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Tyr





gcccgaatcc agctgcagca gtcaggacct gaactgggtga aacccggggc ctcagtgaaa  
120

gtcagctgca tggettccagt gtacagcttc accgaactaca acatgtattg ggtaaacacag  
180

tcccggggga agtctctgga gtggatcgga tacattgacc cttataacgg cgatacatcc  
240

tataatcaga agttcaaagg caaggcaact ctgaccgtgg acaagagctc caacacagcc  
300

tttatgcacc tgaattccct gactctgaa gatagtgtct tctactattg tctcagagga  
360

gactacggca atccccttta cctggattat tggggccagg cgaccacact gaccgtgtct  
420

agtgctagc  
429

<210> 18

<211> 387

<212> DNA

5

<213> Mus musculus

<400> 18

aagcttgccg ccaccatgcc cctgctgctc ctgctgctc tctgtggggc cggcgcactg  
60

gtcagattg tcttgattca gtctcccgcc atcgtgtccg cttcccctgg ggagaaggtg  
120

accatgacat gcagcgtgag ctcctctgtc aactacatgt attggtacca gcagaagagc  
180

ggaacatccc ccaaacggtg gatctatgac acttctaaac tgccaagtgg agtcccagca  
240

agattcagcg gatccggatc tggaaactagt tactcactga ccattagttc aatggaggcc  
300

gaagatgccg ctacatacta ttgtcagcag tggacatcta acccccctac ttttggcagc  
360

gggaccaatc tggaaatcaa gcgtacg  
387

<210> 19

<211> 447

10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 19

Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Met Ala Ser Val Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30

Asn Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser Arg Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Phe  
 65 70 75 80

Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ile Arg Gly Asp Tyr Gly Asn Pro Phe Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala  
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys  
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro  
 210 215 220

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val  
 225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
 245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu  
260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile  
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
435 440 445

<210> 20

<211> 213

<212> PRT

5

<213> Mus musculus

<400> 20

Gln Ile Val Leu Ile Gln Ser Pro Ala Ile Val Ser Ala Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met  
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr  
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Pro Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu  
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr  
85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro  
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr  
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys  
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu  
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser  
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala  
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe  
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 21

<211> 426

<212> DNA

5

<213> Mus musculus

<400> 21

aagcttgccg ccaccatgcc cctgctgctg ctgctgctc tgctgtgggc cggagcctg  
60

gccgaagtcc agctgcagca gtctggcget gagtttgtga agccaggggc aagcgtgaag  
 120  
 ctgtctctgca ccgctctctgg attcaacatc aaagacacat acattcactg ggccaatcag  
 180  
 cggcccagac agggactgga atggatcggc agaattgacc ccgccaacga cgatactaag  
 240  
 tacgatccta attttcaggg caaagctacc atcaatccg acactagctc caacaccgca  
 300  
 tatgtgcagc tgtctagtct gacaagcgag gatactgccg tctactattg tcttcaagc  
 360  
 gacaattccg attcttgggt ccctattggc gccacgggga cactggtgag tctctcagct  
 420  
 gctagc  
 426

&lt;210&gt; 22

&lt; 211&gt; 387

&lt; 212&gt; DNA

5

&lt; 213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 22

aagcttgccg ccaccatgcc cctgctgctg ctgctgctc tctgtgggga tggagcctg  
 60  
 gccagattg tctgactca gtccccctg attatgtccg cttcaccagg ggagaaggtg  
 120  
 accatcacat gcagtgtgag ctctctctg cacttcatga attggtacca gcagaagctg  
 180  
 ggaagttcac ccaaactgtg gatctacgac accagcaaac tggcaccagg agtccctgca  
 240  
 cggttttcag gaagcggatc cggaaactct tacagtctga ccatcagctc catggagaca  
 300  
 gaagatgccc ctctctactt ctgtcaccag tggctagtt attctctgac atttggcct  
 360  
 gggactaagc tggaaactgaa acgtacg  
 387

&lt;210&gt; 23

&lt; 211&gt; 446

10

&lt; 212&gt; PRT

&lt; 213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 23

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Phe Val Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

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

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val  
260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro  
340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val  
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
435 440 445

<210> 24

<211> 213

<212> PRT

5

<213> Mus musculus

<400> 24

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly  
1 5 10 15



Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser Val Asn Phe Met  
 20 25 30

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Leu Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr  
 35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Thr Glu  
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Ser Tyr Phe Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Ser Leu Thr  
 85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro  
 100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr  
 115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys  
 130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu  
 145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser  
 165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala  
 180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe  
 195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 25

<211> 420

<212> DNA

5

<213> Mus musculus

<400> 25

aagcttgccg ccaccatgcc ttgtgtgtc ctgtgtctc tgtgtgggc cggggctctg

60

gccgagattc agctgcagca gtctggacct gacctggtga aaccocggcac ctctgtgaaa  
120

gtcagttgca aggcttctgg gtacagtttc acagactata acatgcactg ggtgaaacag  
180

tctcatggga agagcctgga gtggatcgga taogtccacc cttatgatgg cgggactagc  
240

tccaatcaga agttcaaagg caaggcaact ctgacocgtgg ataaatctag ttcaaacagcc  
300

tttatgcacc tgaagtcact gactagocag gactccgccg tgtactattg tgctcgggaa  
360

gtcccactact attttgatta ctggggacag ggcaccacac tgacagtgg ctccgctagc  
420

&lt;210&gt; 26

&lt; 211&gt; 384

&lt; 212&gt; DNA

5

&lt; 213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 26

aagcttgccg ccaccatgcc cctgctgctg ctgctgcccc tgctgtgggc cggagctctg  
60

gctcagactg tgctgactca gtcccctagt attatgtccg cctcccctgg cgagaaggtg  
120

accatgacat gcgtccgcag ctccctctgag acatacatgt attggtacca gcagaaaagc  
180

ggaacctccc cacaggacgg cttcatgaca cccccactgg caagcggagt cccagcacgg  
240

tttatcggag gaggatctgg cacaagttat tcaactgacta ttagtaacat ggaggccgaa  
300

gatgcoceta cttactattg tcccattgg aacaotaatc cccctacott cggtctctgg  
360

accaagctgg aatcaatcg tacg  
384

&lt;210&gt; 27

&lt; 211&gt; 444

10

&lt; 212&gt; PRT

&lt; 213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 27

Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro Gly Thr  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30

Asn Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Tyr Val Asp Pro Tyr Asp Gly Gly Thr Ser Ser Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Phe  
 65 70 75 80

Met His Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Glu Val Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
 100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu  
 115 120 125

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys  
 130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser  
 145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser  
 165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser  
 180 185 190

Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn  
 195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro  
 210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe  
 225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val  
 245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe  
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr  
290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val  
305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala  
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln  
340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly  
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro  
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser  
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu  
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
435 440

<210> 28

<211> 212

<212> PRT

5

<213> Mus musculus

<400> 28

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Val Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Met



tcctgtgcag cctctggatt ctctttcagt gactattaca tgtattgggt tgcgcagaet  
120

ccggaaaaga ggctggagtg ggctgcagcc attagtgatg atagtactta cacctactat  
180

ccagacagtg tgaagggggg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caacctgtac  
240

ctgcaaatga gcagctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagagggggg  
300

tatggtaacc totatgotat ggaactctgg ggtaaggaa cctcagtcac cgtctctca  
360

<210> 30

<211> 327

<212> DNA

5

<213> Mus musculus

<400> 30

caaattgttc tcaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctctagggga acgggtcacc  
60

atgaacctga ctgccagctc aagtgttaagt tccagttact tgcactggta ccagcagaag  
120

ccaggatcct cccccaaact ctggatttat agcacatcca acctggettc tggagtcca  
180

gtctgcttca gtggcagtggt gtctgggacc tcttactctc tcacaatcag cagcatggag  
240

gctgaagatg ctgccactta ttactgccac cagtatcacc gttccccatt caagttcggc  
300

tcgggggaca agttggaaat aaaacgg  
327

<210> 31

<211> 120

10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 31

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Asp Tyr  
20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Asp Asp Ser Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Asn Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Tyr Gly Asn Leu Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 32

<211> 109

<212> PRT

5

<213> Mus musculus

<400> 32

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Leu Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser  
20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp  
35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu  
65 70 75 80

Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr His Arg Ser Pro  
85 90 95

Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100 105

<210> 33

<211> 360

10

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 33

gagggtccagc tgcagcagtc tggacctgac gtggtaaagc ctgggacttc agtgaagatg  
60

tcttgcaagg cttctggata cacattcaet aactatgtta tgcactgggt gaggcagaag  
120

cctgggcagg gccttgaatg ggttggatgc attaatecct tcaatgatgg tacaaattat  
180

aatgagaact tcaaaaacaa ggccacactg acttcagaca aatcctccag cacagcctac  
240

atggagctca gcagcctgac ctctgaggac tetgcggtct attactgtgc aagatccggt  
300

tttattacta cacttataga agactactgg ggccaaggca ccactctcac agtctcctca  
360

<210> 34

<211> 321

<212> DNA

5

<213> Mus musculus

<400> 34

aacattgtga tgaccaaatc tcccaaatac atgtccatgt cagtaggaga gagggtcacc  
60

ttgacctgca aggccagtga gagggtggga agttttgtat cctggatca acagaaagca  
120

gaccagtctc ctaacctact gatatacggc gcatacaacc ggtacactgg ggtccccgat  
180

cgcttcacag gcagtgatc tgcaagagat ttcactctga ccacagtag tgtgcaggt  
240

aaagacctg cagaatatta ctgtggacag tattacacc atcccagtt cgggtctggg  
300

accaagctgg agctgaaacg g  
321

<210> 35

<211> 120

10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 35

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Val Val Lys Pro Gly Thr  
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
20 25 30



Val Met His Trp Val Arg Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Phe Asn Asp Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Asn Phe  
 50 55 60

Lys Asn Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Ser Gly Phe Ile Thr Thr Leu Ile Glu Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 36

<211> 107

<212> PRT

5

<213> Mus musculus

<400> 36

Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Tyr Met Ser Met Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Glu Ser Val Gly Ser Phe  
 20 25 30

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Asp Gln Ser Pro Asn Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Ala Arg Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala  
 65 70 75 80

Lys Asp Leu Ala Glu Tyr Tyr Cys Gly Gln Tyr Tyr Thr His Pro Thr  
 85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg  
 100 105

<210> 37

<211> 200

10

<212> PRT

<213> Tehislik järjestus

<220>

<223> Tüüp II 1.0 PGLYRP1

&lt;400&gt; 37

Met Asn Trp His Met Ile Ile Ser Gly Leu Ile Val Val Val Leu Lys  
 1 5 10 15

Val Val Gly Met Thr Leu Phe Leu Leu Gln Glu Thr Glu Asp Pro Ala  
 20 25 30

Cys Cys Ser Pro Ile Val Pro Arg Asn Glu Trp Lys Ala Leu Ala Ser  
 35 40 45

Glu Cys Ala Gln His Leu Ser Leu Pro Leu Arg Tyr Val Val Val Ser  
 50 55 60

His Thr Ala Gly Ser Ser Cys Asn Thr Pro Ala Ser Cys Gln Gln Gln  
 65 70 75 80

Ala Arg Asn Val Gln His Tyr His Met Lys Thr Leu Gly Trp Cys Asp  
 85 90 95

Val Gly Tyr Asn Phe Leu Ile Gly Glu Asp Gly Leu Val Tyr Glu Gly  
 100 105 110

Arg Gly Trp Asn Phe Thr Gly Ala His Ser Gly His Leu Trp Asn Pro  
 115 120 125

Met Ser Ile Gly Ile Ser Phe Met Gly Asn Tyr Met Asp Arg Val Pro  
 130 135 140

Thr Pro Gln Ala Ile Arg Ala Ala Gln Gly Leu Leu Ala Cys Gly Val  
 145 150 155 160

Ala Gln Gly Ala Leu Arg Ser Asn Tyr Val Leu Lys Gly His Arg Asp  
 165 170 175

Val Gln Arg Thr Leu Ser Pro Gly Asn Gln Leu Tyr His Leu Ile Gln  
 180 185 190

Asn Trp Pro His Tyr Arg Ser Pro  
 195 200

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 210

5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Tehislik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Tüüp II 2.0 PGLYRP1

&lt;400&gt; 38

Met Asn Trp His Met Ile Ile Ser Gly Leu Ile Val Val Val Leu Leu  
 1 5 10 15

Val Val Gly Met Thr Leu Phe Leu Leu Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp  
 20 25 30

Lys Gly Ser Gln Glu Thr Glu Asp Pro Ala Cys Cys Ser Pro Ile Val  
 35 40 45

Pro Arg Asn Glu Trp Lys Ala Leu Ala Ser Glu Cys Ala Gln His Leu  
 50 55 60

Ser Leu Pro Leu Arg Tyr Val Val Val Ser His Thr Ala Gly Ser Ser  
 65 70 75 80

Cys Asn Thr Pro Ala Ser Cys Gln Gln Gln Ala Arg Asn Val Gln His  
 85 90 95

Tyr His Met Lys Thr Leu Gly Trp Cys Asp Val Gly Tyr Asn Phe Leu  
 100 105 110

Ile Gly Glu Asp Gly Leu Val Tyr Glu Gly Arg Gly Trp Asn Phe Thr  
 115 120 125

Gly Ala His Ser Gly His Leu Trp Asn Pro Met Ser Ile Gly Ile Ser  
 130 135 140

Phe Met Gly Asn Tyr Met Asp Arg Val Pro Thr Pro Gln Ala Ile Arg  
 145 150 155 160

Ala Ala Gln Gly Leu Leu Ala Cys Gly Val Ala Gln Gly Ala Leu Arg  
 165 170 175

Ser Asn Tyr Val Leu Lys Gly His Arg Asp Val Gln Arg Thr Leu Ser  
 180 185 190

Pro Gly Asn Gln Leu Tyr His Leu Ile Gln Asn Trp Pro His Tyr Arg

195

200

205

Ser Pro  
 210

&lt;210&gt; 39

5

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Tehislik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Epitoomärgistusega

10

&lt;400&gt; 39

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys  
1 5

<210> 40

<211> 589

<212> PRT

5

<213> Homo sapiens

<400> 40

Met Asn Trp His Met Ile Ile Ser Gly Leu Ile Val Val Val Leu Leu  
1 5 10 15

Val Val Gly Met Thr Leu Phe Leu Leu Asp Tyr Lys Asp Asp Asp  
20 25 30

Asp Lys Ser Leu Pro Leu Leu Met Asp Ser Val Ile Gln Ala Leu Ala  
35 40 45

Glu Leu Glu Gln Lys Val Pro Ala Ala Lys Thr Arg His Thr Ala Ser  
50 55 60

Ala Trp Leu Met Ser Ala Pro Asn Ser Gly Pro His Asn Arg Leu Tyr  
65 70 75 80

His Phe Leu Leu Gly Ala Trp Ser Leu Asn Ala Thr Glu Leu Asp Pro  
85 90 95

Cys Pro Leu Ser Pro Glu Leu Leu Gly Leu Thr Lys Glu Val Ala Arg  
100 105 110

His Asp Val Arg Glu Gly Lys Glu Tyr Gly Val Val Leu Ala Pro Asp  
115 120 125

Gly Ser Thr Val Ala Val Glu Pro Leu Leu Ala Gly Leu Glu Ala Gly  
 130 135 140

Leu Gln Gly Arg Arg Val Ile Asn Leu Pro Leu Asp Ser Met Ala Ala  
 145 150 155 160

Pro Trp Glu Thr Gly Asp Thr Phe Pro Asp Val Val Ala Ile Ala Pro  
 165 170 175

Asp Val Arg Ala Thr Ser Ser Pro Gly Leu Arg Asp Gly Ser Pro Asp  
 180 185 190

Val Thr Thr Ala Asp Ile Gly Ala Asn Thr Pro Asp Ala Thr Lys Gly  
 195 200 205

Cys Pro Asp Val Gln Ala Ser Leu Pro Asp Ala Lys Ala Lys Ser Pro  
 210 215 220

Pro Thr Met Val Asp Ser Leu Leu Ala Val Thr Leu Ala Gly Asn Leu  
 225 230 235 240

Gly Leu Thr Phe Leu Arg Gly Ser Gln Thr Gln Ser His Pro Asp Leu  
 245 250 255

Gly Thr Glu Gly Cys Trp Asp Gln Leu Ser Ala Pro Arg Thr Phe Thr  
 260 265 270

Leu Leu Asp Pro Lys Ala Ser Leu Leu Thr Met Ala Phe Leu Asn Gly  
 275 280 285

Ala Leu Asp Gly Val Ile Leu Gly Asp Tyr Leu Ser Arg Thr Pro Glu  
 290 295 300

Pro Arg Pro Ser Leu Ser His Leu Leu Ser Gln Tyr Tyr Gly Ala Gly  
 305 310 315 320

Val Ala Arg Asp Pro Gly Phe Arg Ser Asn Phe Arg Arg Gln Asn Gly  
 325 330 335

Ala Ala Leu Thr Ser Ala Ser Ile Leu Ala Gln Gln Val Trp Gly Thr  
 340 345 350

Leu Val Leu Leu Gln Arg Leu Glu Pro Val His Leu Gln Leu Gln Cys  
 355 360 365

Met Ser Gln Glu Gln Leu Ala Gln Val Ala Ala Asn Ala Thr Lys Glu  
 370 375 380

Phe Thr Glu Ala Phe Leu Gly Cys Pro Ala Ile His Pro Arg Cys Arg  
 385 390 395 400

Trp Gly Ala Ala Pro Tyr Arg Gly Arg Pro Lys Leu Leu Gln Leu Pro  
 405 410 415

Leu Gly Phe Leu Tyr Val His His Thr Tyr Val Pro Ala Pro Pro Cys  
 420 425 430

Thr Asp Phe Thr Arg Cys Ala Ala Asn Met Arg Ser Met Gln Arg Tyr  
 435 440 445

His Gln Asp Thr Gln Gly Trp Gly Asp Ile Gly Tyr Ser Phe Val Val  
 450 455 460

Gly Ser Asp Gly Tyr Val Tyr Glu Gly Arg Gly Trp His Trp Val Gly  
 465 470 475 480

Ala His Thr Leu Gly His Asn Ser Arg Gly Phe Gly Val Ala Ile Val  
 485 490 495

Gly Asn Tyr Thr Ala Ala Leu Pro Thr Glu Ala Ala Leu Arg Thr Val  
 500 505 510

Arg Asp Thr Leu Pro Ser Cys Ala Val Arg Ala Gly Leu Leu Arg Pro  
 515 520 525

Asp Tyr Ala Leu Leu Gly His Arg Gln Leu Val Arg Thr Asp Cys Pro  
 530 535 540

Gly Asp Ala Leu Phe Asp Leu Leu Arg Thr Trp Pro His Phe Thr Ala  
 545 550 555 560

Thr Val Lys Pro Arg Pro Ala Arg Ser Val Ser Lys Arg Ser Arg Arg  
 565 570 575

Glu Pro Pro Pro Arg Thr Leu Pro Ala Thr Asp Leu Gln  
 580 585

<210> 41

<211> 355

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 41

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





Glu Ala Val Gly Cys Ser Ile Gln Leu Thr Thr Pro Val Asn Val Leu  
 85 90 95

Val Ile His His Val Pro Gly Leu Glu Cys His Asp Gln Thr Val Cys  
 100 110

Ser Gln Arg Leu Arg Glu Leu Gln Ala His His Val His Asn Asn Ser  
 115 120 125

Gly Cys Asp Val Ala Tyr Asn Phe Leu Val Gly Asp Asp Gly Arg Val  
 130 135 140

Tyr Glu Gly Val Gly Trp Asn Ile Gln Gly Val His Thr Gln Gly Tyr  
 145 150 155 160

Asn Asn Ile Ser Leu Gly Phe Ala Phe Phe Gly Thr Lys Lys Gly His  
 165 170 175

Ser Pro Ser Pro Ala Ala Leu Ser Ala Met Glu Asn Leu Ile Thr Tyr  
 180 185 190

Ala Val Gln Lys Gly His Leu Ser Ser Ser Tyr Val Gln Pro Leu Leu  
 195 200 205

Gly Lys Gly Glu Asn Cys Leu Ala Pro Arg Gln Lys Thr Ser Leu Lys  
 210 215 220

Lys Ala Cys Pro Gly Val Val Pro Arg Ser Val Trp Gly Ala Arg Glu  
 225 230 235 240

Thr His Cys Pro Arg Met Thr Leu Pro Ala Lys Tyr Gly Ile Ile Ile  
 245 250 255

His Thr Ala Gly Arg Thr Cys Asn Ile Ser Asp Glu Cys Arg Leu Leu  
 260 265 270

Val Arg Asp Ile Gln Ser Phe Tyr Ile Asp Arg Leu Lys Ser Cys Asp  
 275 280 285

Ile Gly Tyr Asn Phe Leu Val Gly Gln Asp Gly Ala Ile Tyr Glu Gly  
 290 295 300

Val Gly Trp Asn Val Gln Gly Ser Ser Thr Pro Gly Tyr Asp Asp Ile  
 305 310 315 320

Ala Leu Gly Ile Thr Phe Met Gly Thr Phe Thr Gly Ile Pro Pro Asn  
 325 330 335

Ala Ala Ala Leu Glu Ala Ala Gln Asp Leu Ile Gln Cys Ala Met Val  
 340 345 350

Lys Gly Tyr Leu Thr Pro Asn Tyr Leu Leu Val Gly His Ser Asp Val  
 355 360 365

Ala Arg Thr Leu Ser Pro Gly Gln Ala Leu Tyr Asn Ile Ile Ser Thr  
 370 375 380

Trp Pro His Phe Lys His  
 385 390

<210> 43

<211> 1317

<212> DNA

5 <213> Tehislik järjestus

<220>

<223> huCD33-huTrem1 ECD(aa17-200)-Fc6mut

<400> 43

gaattcgcaa ctatgcctct gctgctgctg ctgcctctgc tgtgggctgg cgcactggct  
 60

gaactgaggg ccgctaccaa actgaccgaa gaaaagtacg agctgaaaga agggcagacc  
 120

ctggacgtga agtgcgatta tacactggaa aagtctgcaa cctcccagaa agcctggcag  
 180

atcattagag acggagagat gcccaagaact ctggcttgta ccgaacgccc ttcaaaaaac  
 240

agccaccag tgcaggtgg ccgaatcatt ctggaggact accacgatca tgggctgctg  
 300

cgggtgagaa tggccaatct gcaggtggag gactccggcc tgtaccagtg cgtcatctat  
 360

cagcccccta aggaaccaca tatgctgttc gataggattc ccttgggtgt cactaaaggc  
 420

ttttctggga cccccggaag taacgagaac agcaccagaa acgtgtacaa gatcccacc  
 480

accacaacta aggcctgtg cccctgtat acatctctc gaaccgtgac acaggccct  
 540

ccaaagagta ccgctgacgt gagcaccccc gattccgaga ttaacctgac aaatgtgact  
 600

gacatcatta ggggtaccga gcccaaetct tctgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc  
 660  
 ccagcacctg aagccgaggg ggcaccgtca gtcttctctt tccccccaaa acccaaggac  
 720  
 acctcatga tctcccgac cctgaggtc acatgctgtg tgggtgacgt gagccacgaa  
 780  
 gaccctgagg tcaagttcaa ctggtaactg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca  
 840  
 aagccgctgg aggagcagta caacagcagc taccgtgtgg tcagcgtctt caccgtctctg  
 900  
 caccaggact ggctgaatgg caaggagtag aagtgcagg tctccaacaa agccctccca  
 960  
 tcttccatcg agaaaacat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac  
 1020  
 acctgcccc catcccggga ggagatgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgctgtgtc  
 1080  
 aaagctctt atcccagcga catgcccgtg gactggggaga gcaatgggca gccggagaac  
 1140  
 aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tcagacggct ccttctctct ctatagcaag  
 1200  
 ctaccctggg acaagagcag gtggcagcag gggaaactct tctcatgctc cgtgatgcac  
 1260  
 gaggtctctc acaaccacta cagcagaag agcctctccc tgtccccggg taaatga  
 1317

<210> 44

<211> 434

<212> PRT

5

<213> Tehislik järjestus

<220>

<223> huCD33-huTrem1 ECD(aa17-200)-Fc6mut

<400> 44

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

10

Ala Ser Ser Gln Lys Ala Trp Gln Ile Ile Arg Asp Gly Glu Met Pro  
 50 55 60

Lys Thr Leu Ala Cys Thr Glu Arg Pro Ser Lys Asn Ser His Pro Val  
 65 70 75 80

Gln Val Gly Arg Ile Ile Leu Glu Asp Tyr His Asp His Gly Leu Leu  
 85 90 95

Arg Val Arg Met Val Asn Leu Gln Val Glu Asp Ser Gly Leu Tyr Gln  
 100 105 110

Cys Val Ile Tyr Gln Pro Pro Lys Glu Pro His Met Leu Phe Asp Arg  
 115 120 125

Ile Arg Leu Val Val Thr Lys Gly Phe Ser Gly Thr Pro Gly Ser Asn  
 130 135 140

Glu Asn Ser Thr Gln Asn Val Tyr Lys Ile Pro Pro Thr Thr Thr Lys  
 145 150 155 160

Ala Leu Cys Pro Leu Tyr Thr Ser Pro Arg Thr Val Thr Gln Ala Pro  
 165 170 175

Pro Lys Ser Thr Ala Asp Val Ser Thr Pro Asp Ser Glu Ile Asn Leu  
 180 185 190

Thr Asn Val Thr Asp Ile Ile Arg Gly Thr Glu Pro Lys Ser Ser Asp  
 195 200 205

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala  
 210 215 220

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
 225 230 235 240

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
 245 250 255

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
 260 265 270

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
 275 280 285

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
290 295 300

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu  
305 310 315 320

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
325 330 335

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
340 345 350

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
355 360 365

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
370 375 380

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
385 390 395 400

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
405 410 415

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
420 425 430

Gly Lys

<210> 45

<211> 1206

<212> DNA

5 <213> Tehislik järjestus

<220>

<223> huCD33-huTremL1 ECD(aa16-162)-Fc6mut

<400> 45

gaattgcgca ccattgcctct gctgctgctg ctgcctctgc tgtgggctgg cgcactggct  
60

cagggcctag ttggcagcct cctgaggctg ctgcaggcac ccgtgggaag ctccattctg  
120

gtgcagtgc actacaggct ccaggatgic aaagctcaga aggtgtggtg ccggttcttg  
180

ccggagggt gccagccct ggtgtctca gctgtggatc ccagagctcc agcgggcagg  
240

cgtaoqtttc tcacagacct gggtaggggc ctgctgcagg tggaaatggt taacctgcag  
300

gaagaggatg ctggcgagta tggctgcatg gtggatgggg ccagggggcc ccagattttg  
360

cacagagtct ctctgaacat actgccccca gaggaagaag aagagacca taagattggc  
420

agtctggctg agaacgcatt ctacagacct gcaggcagtg ccaacctttt ggaaccacgc  
480

caggatgaga agagcatccc cggtagccag cccaaatctt ctgacaaaac tcacacatgc  
540

ccaccgtgcc cagcacctga agccgagggg gcaccgtcag tcttctctt cccccaaaa  
600

cccaggaca cctcatgat ctcccggacc cctgaggtca catgctggtt ggtggacgtg  
660

agccacgaag acctgaggtt caagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat  
720

gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtac aacagcacgt acctgtggtt cagcgtctct  
780

acctctctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa  
840

gcctcccat cctccatga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca  
900

caggtgtaca cctgcccc atcccgggag gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc  
960

tgctgtgta aagcttcta tcccagcag atcgcctgg agtgggagag caatgggcag  
1020

ccggagaaca actacaagac cagcctccc gtgctggact ccgacggctc cttctctctc  
1080

tatagcaagc tcacctgga caagagcagc tggcagcagg cgaacctctt ctcatgctcc  
1140

gtgatgcatg aggtctgca caaccactac acgcagaaga cctctcctt gtcccgggt  
1200

aatga  
1206

<210> 46

<211> 397

<212> PRT

5

<213> Tehislik järjestus

<220>

<223> huCD33-huTremL1 ECD(aa16-162)-Fc6mut

<400> 46

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





aggaagaaga agtgtgagcc tggctttgcc cgagtctggg tgaaagggcc ccgctacttg  
 240  
 ctgcaggacg atgcccaggc caaggtgggc aacatcacca tggtagccct caagctccag  
 300  
 gactcaggcc gatactggtg catgcgcaac acctctggga tctgtaccc ctgatgggc  
 360  
 ttccagctgg atgtgtctcc agctcccaaa actgagagga acattccttt cacacatctg  
 420  
 gacaacatcc tcaagagtgg aactgtcaca actggccaag ccctaacctc aggcctgat  
 480  
 gccctttta ccaactgggtg gatgggtgtc accccaggac tcatcacctt gcttaggctc  
 540  
 ttagctcca ccagacctgc ctccaagaca ggotacagct tcaactgtac cagcaccacc  
 600  
 agccagggac ccaggaggac catggggctc cagacagtga ccgctctcc cagcaatgcc  
 660  
 agggactcct ctgctggccc agaatccatc tccactaagt ctggggacct cagcaccaga  
 720  
 tcgcccacca cagggtcttg cctcaccagc agatctctcc tcaacagact accctccatg  
 780  
 cctccatca ggcaccagga tgtttactcc ggtaccgagc ccaaattctc tgacaaaact  
 840  
 cacacatgcc caccgtgcc agcaccgtga gcgaggggg caccgtcagt ctctctctc  
 900  
 cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggacc ctagggtcac atgctgtgtg  
 960  
 gtggacgtga gccacgaaga cctgagggc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag  
 1020  
 gtgcataatg ccaagacaaa gccgggggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc  
 1080  
 agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc  
 1140  
 tccaacaaag cctcccatc ctccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc  
 1200  
 cgagaaccac aggtgtacac cctgcccaca tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtc  
 1260  
 agcctgacct gcttggtaa aggttttat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc  
 1320  
 aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc accctcccg tcttggactc cgacggctcc  
 1380  
 ttctctctct atagcaagct caccgtggac aagagcaggt cgcagcaggg gaactctctc  
 1440  
 tcatgtctcg tgatgatga ggtctgcac aaccactaca ccgagaagag cctctccctg  
 1500  
 tccccgggta aatga  
 1515

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 500

&lt; 212&gt; PRT

&lt; 213&gt; Tehislik järjestus

&lt;220&gt;

&lt; 223&gt; huCD33-huTremL2 ECD(aa19-268)-Fc6mut

5

&lt;400&gt; 48

Met Pro Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp Ala Gly Ala Leu Ala  
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Ala Asp Ser Val Tyr Thr Lys Val Arg Leu Leu Glu Gly  
 20 25 30

Glu Thr Leu Ser Val Gln Cys Ser Tyr Lys Gly Tyr Lys Asn Arg Val  
 35 40 45

Glu Gly Lys Val Trp Cys Lys Ile Arg Lys Lys Lys Cys Glu Pro Gly  
 50 55 60

Phe Ala Arg Val Trp Val Lys Gly Pro Arg Tyr Leu Leu Gln Asp Asp  
 65 70 75 80

Ala Gln Ala Lys Val Val Asn Ile Thr Met Val Ala Leu Lys Leu Gln  
 85 90 95

Asp Ser Gly Arg Tyr Trp Cys Met Arg Asn Thr Ser Gly Ile Leu Tyr  
 100 105 110

Pro Leu Met Gly Phe Gln Leu Asp Val Ser Pro Ala Pro Gln Thr Glu  
 115 120 125

Arg Asn Ile Pro Phe Thr His Leu Asp Asn Ile Leu Lys Ser Gly Thr  
 130 135 140

Val Thr Thr Gly Gln Ala Pro Thr Ser Gly Pro Asp Ala Pro Phe Thr  
 145 150 155 160

Thr Gly Val Met Val Phe Thr Pro Gly Leu Ile Thr Leu Pro Arg Leu  
 165 170 175

Leu Ala Ser Thr Arg Pro Ala Ser Lys Thr Gly Tyr Ser Phe Thr Ala  
 180 185 190

Thr Ser Thr Thr Ser Gln Gly Pro Arg Arg Thr Met Gly Ser Gln Thr  
 195 200 205

Val Thr Ala Ser Pro Ser Asn Ala Arg Asp Ser Ser Ala Gly Pro Glu  
 210 215 220

Ser Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Leu Ser Thr Arg Ser Pro Thr Thr  
 225 230 235 240

Gly Leu Cys Leu Thr Ser Arg Ser Leu Leu Asn Arg Leu Pro Ser Met  
 245 250 255

Pro Ser Ile Arg His Gln Asp Val Tyr Ser Gly Thr Glu Pro Lys Ser  
 260 265 270

Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu  
 275 280 285

Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
 290 295 300

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
 305 310 315 320

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu  
 325 330 335

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr  
 340 345 350

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
 355 360 365

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser  
 370 375 380

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
 385 390 395 400

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val  
405 410 415

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
420 425 430

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
435 440 445

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr  
450 455 460

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
465 470 475 480

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
485 490 495

Ser Pro Gly Lys  
500

<210> 49

<211> 1233

<212> DNA

5

<213> Tehislik järjestus

<220>

<223> huCD33-huTrem2 ECD(aa19-174)-Fc6mut

<400> 49

gaattcgcca ccattgcctct gctgctgctg ctgcctctgc tgtgggctgg cgcactggct  
60

cacaacacca cagtgttcca gggcgtggcg ggcagtcctc tgcaggtgct ttgccctat  
120

gactccatga agcactgggg gaggcgcaag gcctgggtgc gccagctggg agagaagggc  
180

ccatgccagc gtgtggteag caccacacac ttgtggctgc tgccttctct gaggaggtgg  
240

aatgggagca cagccatcac agacgatacc ctgggtggca ctctcaccat tacgctgcgg  
300

aatctacaac cccatgatgc gggctctctac cagtgcacaga gccctccatgg cagtgaggct  
360

gacaccccca ggaaggtcct ggtggaggcg ctggcagacc cccctggatca ccgggatgct  
420

ggagatctct ggttccccgg ggagttctgac agcttcgagg atgcccatgt ggagcacagc

10

480

atctccagga gcctcttgggaggagaaatc cccttcccac ccacttccgg tacggagccc  
540

aaatcttctg acaaaactca cacatgccc cctgcccag cacctgaagc cgagggggca  
600

ccgtcagctt tctcttccc cccaaaacc aaggacacc tcctgatctc cggaccctt  
660

gaggtcacat gcgtgggtg ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtaa gttcaactgg  
720

tacgtggagc gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgggggagga gcagtacaac  
780

agcacgtacc gtgtggtcag cgtctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag  
840

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccactct ccactgagaa aaccatctcc  
900

aaagccaaag ggcagcccgc agaaccacag gtgtacacc tgcccaccatc ccgggaggag  
960

atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc  
1020

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccc gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg  
1080

ctggactccg accgctcctt ctctctctat agcaagctca ccgtggacaa gacaggtgg  
1140

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacagc  
1200

cagaagagcc tctcctgtc cccgggtaaa tga  
1233

&lt;210&gt; 50

&lt;211&gt; 406

&lt;212&gt; PRT

5

&lt;213&gt; Tehislik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; huCD33-huTrem2 ECD(aa19-174)-Fc6mut

&lt;400&gt; 50

Met Pro Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp Ala Gly Ala Leu Ala  
1 5 10 15

His Asn Thr Thr Val Phe Gln Gly Val Ala Gly Gln Ser Leu Gln Val  
20 25 30

10

Ser Cys Pro Tyr Asp Ser Met Lys His Trp Gly Arg Arg Lys Ala Trp  
 35 40 45

Cys Arg Gln Leu Gly Glu Lys Gly Pro Cys Gln Arg Val Val Ser Thr  
 50 55 60

His Asn Leu Trp Leu Leu Ser Phe Leu Arg Arg Trp Asn Gly Ser Thr  
 65 70 75 80

Ala Ile Thr Asp Asp Thr Leu Gly Gly Thr Leu Thr Ile Thr Leu Arg  
 85 90 95

Asn Leu Gln Pro His Asp Ala Gly Leu Tyr Gln Cys Gln Ser Leu His  
 100 105 110

Gly Ser Glu Ala Asp Thr Leu Arg Lys Val Leu Val Glu Val Leu Ala  
 115 120 125

Asp Pro Leu Asp His Arg Asp Ala Gly Asp Leu Trp Phe Pro Gly Glu  
 130 135 140

Ser Glu Ser Phe Glu Asp Ala His Val Glu His Ser Ile Ser Arg Ser  
 145 150 155 160

Leu Leu Glu Gly Glu Ile Pro Phe Pro Pro Thr Ser Gly Thr Glu Pro  
 165 170 175

Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu  
 180 185 190

Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 195 200 205

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 210 215 220

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 225 230 235 240

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn  
 245 250 255

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
 260 265 270

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro  
 275 280 285

Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 290 295 300

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn  
 305 310 315 320

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 325 330 335

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 340 345 350

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
 355 360 365

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 370 375 380

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 385 390 395 400

Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 405

<210> 51

<211> 29

<212> DNA

5 <213> Tehislik järjestus

<220>

<223> Praimer

<400> 51

tagtagggat ccgctggtgc acaggaagg  
 29

10 <210> 52

<211> 32

<212> DNA

<213> Tehislik järjestus

<220>

15 <223> Praimer

<400> 52

tagtagggcg ccgcttcgtg ggcttagggt ac  
 32

<210> 53

