

### Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к антителам, специфично связывающимся с белком активации фибробласта (FAP $\alpha$ ). Изобретение также относится к применению этих антител для диагностических и терапевтических целей и к способам получения антител.

### Предпосылки создания изобретения

Инвазивный рост злокачественных опухолей эпителиальной ткани связан с многочисленным характерными изменениями в поддерживающей строме на клеточном и молекулярном уровне. Наиболее постоянным признаком на молекулярном уровне реактивной стромы при многих типах злокачественных опухолей эпителиальной ткани является индукция белка активации фибробласта альфа (далее обозначен как FAP), молекулы клеточной поверхности реактивных фибробластов стромы, которые первоначально были идентифицированы с помощью моноклонального антитела F19 (Garin-Chesa P., Old L.J. и Rettig W.J. "Cell surface glycoprotein of reactive stromal fibroblasts as a potential antibody target in human epithelial cancers", Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 7235 (1990)). Поскольку антиген FAP избирательно экспрессируется в строме ряда эпителиальных карцином, независимо от их локализации и гистологического типа, разрабатывалась связанная с использованием в качестве мишени FAP концепция для визуализации, диагностики и лечения злокачественных опухолей эпителиальной ткани и некоторых других состояний. Для этой цели было создано моноклональное антитело, которое специфично связывается с FAP, обозначенное как F19 и описанное в патенте US 5059523 и WO 93/05804, которые полностью включены в настоящее описание в виде ссылки.

Одной из серьезных проблем, возникающих когда антитела, полученные не из человека, а из других источников, применяют *in vivo* на людях. Гуманизация антител, как правило, может быть осуществлена с помощью одного из двух путей: (1) с помощью конструирования химерных антител человека, когда вариабельные области антитела связывают с константными областями антитела человека (Boulianne G.L., Hozumi N. и Shulman M.J. "Production of functional chimeric mouse/human antibody", Nature 312: 643 (1984)) или (2) путем трансплантации гипервариабельных участков (CDR) из вариабельных областей в вариабельные области антител человека и затем соединения этих "преобразованных" вариабельных областей антител человека с константными областями антител человека (Riechmann L., Clark M., Waldmann H. и Winter G. "Reshaping human antibody for therapy", Nature 332: 323 (1988)). Химерные антитела, хотя они обладают значительно более высокой активностью, чем антитела мыши, все еще могут вызвать у людей реакцию на антитело мыши (LoBuglio A.F., Wheeler R.H., Trang J., Haynes A., Rogers K., Harvey E.B., Sun L., Ghrayeb J. и Khazaeli M.B. "Mouse/human chimeric monoclonal antibody in man: Kinetics and immune response. Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 4220 (1989)). Антитела человека с трансплантированными CDR или "преобразованные" антитела человека содержат лишь небольшую часть или не содержат вообще последовательностей протеина, которые могут быть идентифицированы как антитела, происходящие из мыши. Хотя антитело, гуманизированное с помощью трансплантации CDR, все еще может вызвать определенные иммунные ответы, такие как антиаллотипическая реакция или антиидиотипическая реакция, которые также могут быть обнаружены даже и при применении природных антител человека, антитело с трансплантированными CDR должно быть в значительной степени менее иммуногенным, чем антитело мыши, что дает возможность осуществлять более пролонгированное лечение пациента.

Другим серьезным ограничением коммерческого применения антител для диагностики, визуализации и терапии является необходимость их получения в больших количествах. Во многих случаях рекомбинантная экспрессия природного, химерного антитела и/или антитела с трансплантированными CDR в системах для культивирования клеток является весьма низкой. Факторы, обуславливающие низкую продуктивность, могут зависеть от выбора лидерных последовательностей и выбора клеток-хозяев для производства, а также от несоответствующей складчатости цепи антитела и пониженной секреции. Несоответствующая складчатость может привести к плохой сборке тяжелых и легких цепей или транспорту некомпетентной конформации, что предотвращает секрецию одной или обеих цепей. В целом, считается, что L-цепь обуславливает способность к секреции собранного белка. В некоторых случаях несколько или даже одна замена может привести к повышенной продуктивности антител.

Из-за клинической важности специфической иммунологической направленности *in vitro* и *in vivo* связанных с конкретными болезнями антигенов для диагностики и терапии людей, имеется растущая потребность в антителах, которые объединяют такие особенности, как специфичность в отношении антигенов, низкая иммуногенность и высокая продуктивность.

Таким образом, основной задачей настоящего изобретения являются антитела, которые объединяют такие свойства как специфичность связывания с FAP, низкая иммуногенность для людей и высокая продуктивность в рекомбинантных системах.

### Описание изобретения

Техническая проблема решается с помощью вариантов осуществления, представленных в формуле изобретения.

Настоящее изобретение относится к антителам, имеющим гипервариабельные участки моноклонального антитела F19 (АТСС регистрационный номер HB 8269), причем эти антитела специфически связываются с белками активации фибробласта и отличаются тем, что они имеют модификации каркас-

ного участка, которые приводят к повышенной продуктивности в клетках-хозяевах по сравнению с химерным антителом, содержащим переменные области F19 и чужеродные константные области.

В контексте настоящего описания понятие "антитела" обозначает белок, обладающий специфичностью моноклонального антитела в отношении связывания антигена.

Понятие "гипервариабельные участки моноклонального антитела" обозначает такие аминокислотные последовательности, которые участвуют в специфичном связывании антигена согласно Кэбату (Kabat E.A. and Wu T.T., Perry H.M., Gottschalk K.S. and Foeller C. "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (5-е изд.) NIH Publication №91-3242. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1991)), а также Chothia и Lesk (Chothia и Lesk J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)).

В контексте настоящего описания понятие "модификации каркасного участка" обозначает изменение, делецию или добавление одной или нескольких аминокислот в переменные области, окружающие отдельные гипервариабельные участки. Модификации каркасного участка могут оказывать влияние на иммуногенность, продуктивность или специфичность связывания антитела.

Понятие "белок активации фибробласта (FAP)", также обозначаемый как белок активации фибробласта альфа (FAP  $\alpha$ ), представляет собой связанный с мембраной гликопротеин, принадлежащий к семейству серинпротеаз (WO 97/34927). Не известна ни выделяемая, ни секретируемая форма FAP. FAP может быть охарактеризован путем его связывания с моноклональным антителом F19 (F19 может быть получен из линии клеток гибридомы с регистрационным номером HB 8269, депонированной в ATCC).

Понятие "специфическое связывание белка активации фибробласта" антителом в контексте настоящего описания относится к его способности специфически распознавать и связывать экспрессирующие FAP человеческие клетки. Специфичность связывания белков по изобретению может быть определена стандартными методами по оценке специфичности связывания, такими как описанные в качестве иллюстрации в примерах 6, 8 и примере 12.

Понятие "химерное антитело" обозначает антитело, имеющее переменные области легкой и тяжелой цепи, такие как приведенные на фиг. 17 и 18, и чужеродные константные области. "Чужеродные константные области" в контексте настоящего описания обозначают константные области, которые отличны от константных областей F19. При сравнении антитела по изобретению с химерным антителом должно быть очевидно, что такое химерное антитело должно содержать такие же константные области, что и антитело. Исключительно для цели демонстрации и сравнения в качестве примера использовали константную область тяжелой и легкой цепей антитела человека, как представлено на фиг. 19-22.

Для создания антител по настоящему изобретению нуклеотидные последовательности генов тяжелой и легкой цепей антитела мыши были выделены с использованием РНК, экстрагированной из клеток линии гибридомы F19 (регистрационный номер ATCC HB 8269).

Согласно одному из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к антителам, имеющим гипервариабельные участки моноклонального антитела F19 (регистрационный номер ATCC HB 8269), причем эти новые антитела специфически связываются с белком активации фибробласта (FAP), которые отличаются тем, что они имеют модификации каркасного участка, приводящие к повышенной продуктивности в клетках-хозяевах по сравнению с химерным антителом, включающим переменные области F19 и чужеродные константные области, причем это антитело получают из антитела мыши, обозначенного F19 (регистрационный номер ATCC HB 8269).

Для получения гуманизированных FAP-специфических антител конструировали химерное антитело, имеющее переменные области легкой и тяжелой цепей F19 и, соответственно, константные области легкой и тяжелой цепей антитела человека. Конструирование и производство химерных антител мыш/человек являются хорошо известными (Boulianne и др. (1984), см. выше) и с целью иллюстрации продемонстрированы в примерах 1 и 2.

Переменные области антитела по настоящему изобретению, как правило, связаны по меньшей мере с частью константной области иммуноглобулина (Fc), обычно иммуноглобулина человека. Последовательности ДНК константной области антитела человека могут быть выделены с помощью хорошо известных методик из разнообразных клеток человека, но предпочтительно из иммортализованных В-клеток (см. Kabat и др., выше и WO 87/02671). Следовательно, антитела по изобретению могут содержать всю константную область или только ее часть, лишь бы они специфически связывались с антигеном FAP. Выбор типа и протяженности константной области зависит от того, требуется ли сохранить эффекторные функции типа фиксации комплемента или зависящая от антитела цитотоксичность, а также от требуемых фармакологических свойств антитела. Антитела по изобретению могут представлять собой тетрамер, состоящий из двух пар легкая цепь/тяжелая цепь, но также может представлять собой димер, т.е. состоять из пары легкая цепь/тяжелая цепь, например Fab- или Fv-фрагмент.

Таким образом, еще одним объектом настоящего изобретения являются антитела, отличающиеся тем, что они имеют переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, каждая из которых соединена с константной областью антитела человека. В частности переменная область легкой цепи соединена с каппа-константной областью антитела человека (константная область каппа-цепи) и переменная область тяжелой цепи соединена с гамма-1-константной областью антитела человека (кон-

стантная область гамма-1-цепи). Специалистам также известны другие константные области антитела человека, пригодные для гуманизации легкой и тяжелой цепей.

Таким образом, согласно одному из вариантов осуществления антитела по изобретению содержат каппа-константную область антитела человека.

Согласно еще одному варианту осуществления антитела по изобретению содержат гамма-1-константную область антитела человека.

Конкретное "химерное антитело F19" (сF19) состоит из переменных и константных областей тяжелой и легкой цепей, приведенных на фиг. 17-22. сF19 проявляет специфичность связывания и высокую авидность к антигену FAP. Как продемонстрировано в примере 2, продукция сF19 COS-клетками (клетками, полученными из почки африканской зеленой мартышки) является невысокой, составляющей от примерно 10 до 60 нг/мл, что по меньшей мере в 10 раз ниже, чем для большинства антител.

С целью попытки повысить продуктивность сF19 лидерная последовательность  $V_L$ -области F19 была изменена путем замены пролина на лейцин в положении -9. Эта одна замена аминокислоты в лидерной последовательности привела к увеличению по меньшей мере в 2 раза количества химерного антитела, продуцируемого в COS-клетках. Для обеспечения экспрессии этого конкретного химерного антитела в COS-клетках использовали следующую мутантную лидерную последовательность легкой цепи:

MDSQAQVLMLLLLWVSGTCG и следующую лидерную последовательность тяжелой цепи: MGWSWVFLFLSGTAGVLS.

Согласно изобретению понятие "повышенная продуктивность" в клетках-хозяевах относится к значительному повышению продуктивности и/или выхода очищенного антитела по сравнению с продуктивностью и/или выходом очищенного химерного антитела, не имеющего указанных выше модификаций каркасного участка. Двумя конкретными, не ограничивающими объем изобретения примерами, демонстрирующими повышение продуктивности, являются повышение продуктивности в системе экспрессии COS-клеток (примеры 2 и 5) и в системе экспрессии CHO-клеток (примеры 10 и 11).

В то время как мутация лидерной последовательности приводит только к двукратному повышению продуктивности химерного антитела F19, значительное повышение согласно настоящему изобретению обозначает повышение продуктивности и/или выхода очищенного антитела по меньшей мере в 10 раз.

Согласно предпочтительному варианту осуществления изобретение относится к антителам, отличающимся тем, что их продуктивность в неочищенных образцах сред, которые определены с помощью ELISA и/или по выходу очищенных антител, превышает продуктивность и/или выход очищенных химерных антител, не имеющих модификации каркасного участка, по меньшей мере в 10 раз.

Согласно более предпочтительному варианту осуществления изобретение относится к антителам, отличающимся тем, что их продуктивность в неочищенных образцах сред, которые определены с помощью ELISA и/или по выходу очищенных антител, превышает продуктивность и/или выход очищенных химерных антител, не имеющих модификации каркасного участка, по меньшей мере в 20 раз.

Согласно наиболее предпочтительному варианту осуществления изобретение относится к антителам, отличающимся тем, что их продуктивность в неочищенных образцах сред, которые определены с помощью ELISA и/или по выходу очищенных антител, превышает продуктивность и/или выход очищенных химерных антител, не имеющих модификации каркасного участка, по меньшей мере в 100 раз.

Повышенная продуктивность рекомбинантных протеинов по изобретению может быть продемонстрирована на эукариотических клетках в целом, например, на эукариотических клетках COS и CHO (клетки яичника китайского хомячка) (см. примеры 5 и 11).

Согласно еще одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к рекомбинантным антителам повышенной продуктивности в эукариотических клетках.

Согласно предпочтительному варианту осуществления настоящее изобретение относится к антителам, отличающимся тем, что эукариотическая клетка представляет собой клетку яичника китайского хомячка (CHO-клетку).

При создании изобретения неожиданно было установлено, что определенные модификации каркасного участка переменных областей легкой цепи определяют повышенную продуктивность антитела по изобретению. Были получены три версии преобразованных переменных областей легкой цепи, обозначенные как версии A, B и C, приведены на фиг. 1-6.

Для версий A, B и C переменных областей легкой цепи обнаружена в значительной степени повышенная продуктивность в CHO-клетках (см. пример 11). Хотя версии A и C переменных областей легкой цепи отличаются от версии B переменной области только двумя общими аминокислотными остатками, для них характерно еще более значительное повышение продуктивности. Существует по меньшей мере еще 10-кратное различие по уровням секреции антитела между версией B преобразованной легкой цепи антитела человека F19 и версиями A или C. Аминокислотные последовательности версий A и B преобразованной легкой цепи антитела человека F19 отличаются только двумя остатками в положениях 36 (замена Туг на Phe) и 87 (замена Туг на Asp) (номенклатура дана согласно Кэбату). Это отрицательное воздействие на секреторную способность антител, содержащих версию B переменной области легкой цепи, может оказаться косвенным, если замены Туг на Asp и Туг на Phe, при их рассмотрении индивидуально или в сочетании, главным образом, вызывают неправильную складчатость антитела. Но это

предположение является маловероятным, поскольку опыты по связыванию антигена показали, что иммуноглобулины, содержащие версию В легкой цепи F19, обладают такими же авидностями, что и версии А и С легкой цепи F19, что позволяет предположить, что они не могут иметь значительное нарушение складчатости.

Остаток 87 в версии В преобразованной легкой цепи антитела человека F19, вероятно, ответственен за уменьшение секреции по сравнению с версиями А и С.

Согласно более предпочтительному варианту осуществления изобретение относится к антителам, в которых аминокислота в положении 87 по Кэбату в легкой цепи является любой аминокислотой, за исключением аспарагина.

Согласно более предпочтительному варианту осуществления изобретение относится к антителам, в которых аминокислоту в положении 87 по Кэбату в легкой цепи выбирают из ароматических или алифатических аминокислот.

Согласно еще более предпочтительному варианту осуществления изобретение относится к антителам, в которых аминокислота в положении 87 по Кэбату в легкой цепи представляет собой тирозин или фенилаланин.

Согласно еще одному варианту осуществления изобретение также относится к антителам по изобретению, в которых аминокислоту в положении 36 по Кэбату в легкой цепи выбирают из ароматических аминокислот.

Согласно предпочтительному варианту осуществления изобретение относится к специфическим антителам, которые могут быть получены из описанных по отдельности преобразованных переменных областей легкой и тяжелой цепей.

Для практического воплощения изобретения особенно предпочтительны версии А и С переменной области легкой цепи вследствие их очень высокой продуктивности в сочетании с полным сохранением специфичности FAP-связывания и низкой иммуногенностью. Эти положения особенно важны при сравнении с химерным антителом, имеющим переменные области F19 и такие же константные области, а также при сравнении с версией В легкой цепи.

Таким образом, согласно одному из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к антителам, которые содержат переменную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO:2.

Согласно еще одному из вариантов осуществления настоящее изобретение также относится к антителам, отличающимся тем, что переменная область легкой цепи кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:1.

Согласно одному из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к антителам, которые содержат переменную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO:6.

Согласно еще одному из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к антителам, отличающимся тем, что переменная область легкой цепи кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:5.

В настоящем изобретении также описано несколько различных переменных областей тяжелой цепи, которые обеспечивают повышение продуктивности, с А и С переменными областями легкой цепи.

Согласно одному из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к антителам, которые содержат переменную область тяжелой цепи, соответствующей любой из последовательностей, представленных в SEQ ID NO:8, 10, 12, 14.

Согласно еще одному из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к антителам, отличающимся тем, что переменная область тяжелой цепи кодируется нуклеотидной последовательностью, соответствующей любой из последовательностей, представленных в SEQ ID NO:7, 9, 11, 13.

Согласно особенно предпочтительному варианту осуществления изобретение относится к антителам, которые содержат переменную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO:2, и переменную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO:12. Наиболее предпочтительно это антитело дополнительно содержит константную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO:20, и константную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO:22.

Таким образом, еще одним объектом настоящего изобретения является антитело, содержащее аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:2. Более предпочтительно это антитело дополнительно содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:12. Более предпочтительно это антитело кроме того содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:20, и аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:22. Еще одним объектом настоящего изобретения является описанное в настоящем разделе антитело, которое конъюгировано с радиоактивным изотопом, предпочтительно с  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$  или  $^{90}\text{Y}$ . Еще одним объектом настоящего изобретения является молекула ДНК, которая кодирует антитело, описанное в этом разделе. Еще одним объектом изобретения является клетка-хозяин, несущая такую молекулу ДНК. Кроме того, объектом изобретения является способ получения антитела, как он описан в этом разделе, предусматривающий стадии культивирования такой клетки-хозяина в условиях, обеспечивающих экспрессию антитела клеткой-хозяином, и его выделение. Еще одним объектом изобретения является фармацевтическая композиция, включающая антитело по настоящему изобретению и фармацевтически приемле-

мый носитель. Согласно еще одному варианту осуществления изобретение относится к антителу, которое отличается тем, что переменная область легкой цепи кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:1, а переменная область тяжелой цепи кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:11.

Согласно особенно предпочтительному варианту осуществления изобретение относится к антителам, которые содержат переменную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO:2, и переменную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO:8.

Согласно еще одному из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к антителам, отличающимся тем, что переменная область легкой цепи кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:1, а переменная область тяжелой цепи кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:7.

Гуманизация переменной области антитела мыши может быть осуществлена с помощью методов, хорошо известных в данной области. В EP 0239400 описана трансплантация CDR переменной области антитела мыши в каркасный участок переменной области антитела человека. В WO 90/07861 описаны способы преобразования трансплантированного CDR переменной области путем интродукции дополнительных модификаций каркасного участка. В WO 92/11018 описаны способы получения гуманизованного Ig путем объединения CDR доноров с каркасным участком акцептора, который обладает высоким уровнем гомологии с каркасным участком донора. В WO 92/05274 описано получение каркасного участка мутантных антител с использованием в качестве исходного антитела мыши. Дополнительными известными из существующего уровня техники документами, в которых описана гуманизация моноклональных антител мыши, являются EP 0368684; EP 0438310; WO 92/07075 или WO 92/22653. Таким образом, специалист в данной области может получить антитело по настоящему изобретению, используя в качестве исходного известное из литературы моноклональное антитело F19 мыши и применяя методы, известные в данной области, например, описанные в WO 92/05247. Молекулы ДНК, кодирующие антитела по настоящему изобретению, естественно также могут быть получены с использованием известных для данной области методов синтеза, например, с помощью химического синтеза соответствующих олигонуклеотидов и последующего лигирования и амплификации (см., например, Frank и др., *Methods Enzymol.* 154: 221-249 (1987)).

Еще одним объектом настоящего изобретения являются молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитело по изобретению, как они описаны выше. Предпочтительно молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 или 15.

Еще одним объектом изобретения является включающий рекомбинантную ДНК вектор, содержащий нуклеотидную последовательность любой из перечисленных выше нуклеиновых кислот, прежде всего, если эта нуклеотидная последовательность функционально связана с контролирующей экспрессию последовательностью, как это принято для экспрессионных векторов. Предпочтительным является включающий рекомбинантную ДНК вектор, причем этот вектор представляет собой экспрессионный вектор.

Еще одним объектом настоящего изобретения является клетка-хозяин, несущая описанный выше вектор, предпочтительно экспрессионный вектор. Такой клеткой-хозяином может быть прокариотическая или эукариотическая клетка. Предпочтительно такая клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку, дрожжевую клетку или клетку млекопитающего. Более предпочтительно эта клетка-хозяин представляет собой CHO-клетку (клетку яичника китайского хомячка) или COS-клетку.

Таким образом, еще одним объектом настоящего изобретения является способ получения антитела по изобретению.

Такой способ включает стадии:

- (а) культивирования клетки-хозяина, как она описана выше, в условиях обеспечивающих экспрессию антитела клеткой-хозяином, и
- (б) выделения антитела.

Предпочтительными являются клетки-хозяева, представляющие собой клетки млекопитающего, предпочтительно CHO- или COS-клетки. Клетки-хозяева для получения протеинов антитела по изобретению могут быть трансфектированы одним вектором, несущим единицы экспрессии как легкой, так и тяжелой цепи (см., например, WO 94/11523). Согласно одному из предпочтительных вариантов осуществления способа получения антитела по изобретению применяют клетки-хозяева, отличающиеся тем, что эти клетки-хозяева котрансфецируют двумя плазмидами, несущими единицы экспрессии легкой и тяжелой цепи, соответственно (см., например, EP 0481790).

Антитела по изобретению представляют собой высокоспецифичный инструмент для направленного переноса терапевтических агентов к антигену FAP. Таким образом, согласно еще одному варианту осуществления изобретение относится к антителам, отличающимся тем, что антитело конъюгировано с терапевтическим агентом. Из множества терапевтических агентов, известных в данной области, предпочтительными являются такие агенты, как радиоизотопы, токсины, токсины, воспалительные агенты, ферменты, атисмысловые молекулы, пептиды, цитокины и химиотерапевтические агенты. Из радиоизо-

топов в качестве терапевтического агента могут применяться радиоизотопы с гамма-, бета- и альфа-излучением. Предпочтительными в качестве радиоизотопов являются радиоизотопы с  $\beta$ -излучением. Наиболее предпочтительными из радиоизотопов с  $\beta$ -излучением, позволяющими осуществлять локализованное облучение и разрушение злокачественных опухолевых клеток, являются  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{131}\text{I}$  и  $^{90}\text{Y}$ . Таким образом, радиоизотопы, выбранные из группы, включающей  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{131}\text{I}$  и  $^{90}\text{Y}$ , являются особенно предпочтительными в качестве терапевтических агентов, конъюгированных с антителами по изобретению. Например, для введения радиоактивной метки в антитело по изобретению может применяться метод, описанный в WO 93/05804.

Еще одним объектом настоящего изобретения являются антитела, отличающиеся тем, что они являются мечеными. Такое антитело, несущее специфичную для FAP метку, позволяет локализовать и/или выявлять антиген FAP *in vitro* и *in vivo*. Под меткой понимают маркер, который может быть выявлен прямо или косвенно. Под косвенным маркером понимают маркер, который не может быть выявлен сам по себе, а нуждается в дополнительном непосредственно выявляемом маркере, специфичном для косвенного маркера. Предпочтительными метками для практического воплощения изобретения являются выявляемые маркеры. Из широкого разнообразия выявляемых маркеров наиболее предпочтительными являются выявляемые маркеры, выбранные из группы, включающей ферменты, красители, радиоизотопы, диоксигенин и биотин.

Еще одним объектом настоящего изобретения являются антитела, отличающиеся тем, что они конъюгированы с визуализирующим агентом. Из существующего уровня техники известно широкое разнообразие визуализирующих агентов, прежде всего радиоизотопов. Для практического воплощения изобретения особенно предпочтительными являются радиоизотопы с гамма-излучением. Наиболее предпочтительным является йод.

Еще одним объектом настоящего изобретения являются фармацевтические композиции, содержащие антитело по настоящему изобретению, как они описаны выше, и фармацевтически приемлемый носитель. Такие фармацевтические композиции могут применяться для лечения опухолей, где опухоли связаны с активированными фибробластами стромы. Существует два возможных действенных принципа противоопухолевой иммунотерапии стромы, которые могут действовать синергетически: (а) немодифицированное (неконъюгированное, "обнаженное") антитело по изобретению может вызывать иммунное нарушение или воспалительные реакции в строме опухоли, в то время как (б) антитело, конъюгированное с терапевтическим агентом, таким как, например, радиоизотоп или другое токсичное соединение, может осуществлять локализованное облучение и разрушение злокачественных опухолевых клеток. Таким образом, еще одним объектом настоящего изобретения является применение антитела, как оно описано выше, для приготовления фармацевтической композиции, прежде всего для лечения опухолей.

Еще одним вариантом осуществления изобретения являются фармацевтические композиции, содержащие антитело, конъюгированное с терапевтическим агентом, как описано выше, и фармацевтически приемлемый носитель, пригодные для лечения опухолей, где опухоли связаны с активированными фибробластами стромы. Другим вариантом осуществления являются фармацевтические композиции, содержащие антитело по изобретению, конъюгированное с визуализирующим агентом, как описано выше, и фармацевтически приемлемый носитель, пригодные для визуализации наличия активированных фибробластов стромы в заживающей ране, воспаленном участке кожи или опухоли у больного человека. Наиболее предпочтительный вариант осуществления относится к указанным выше фармацевтическим композициям, где опухоли представляют собой опухоли, выбранные из группы злокачественных опухолей, включающей колоректальные опухоли, немелкоклеточный рак легкого, опухоли молочной железы, рак головы и шеи, опухоли яичника, опухоли легкого, инвазивные опухоли мочевого пузыря, опухоли поджелудочной железы и метастазирующие опухоли головного мозга.

При лечении животного или человека это может быть осуществлено путем введения фармацевтических композиций, как они описаны выше, внутривенным или другим путем, например, системно, локально или местно к представляющей интерес ткани или органу в зависимости от типа и происхождения болезни или цели лечения, например, опухоли. Например, системный механизм действия является желательным, когда различные органы или системы органов подлежат лечению, например, при системных аутоиммунных болезнях или аллергиях, или при трансплантациях чужеродных органов или тканей, или при опухолях, которые являются диффузными или их трудно локализовать. Местный механизм действия предусматривается, когда ожидаются только местные проявления неопластического или иммунологического действия, как, например, при локальных опухолях.

Антитела по настоящему изобретению могут применяться различными путями, известными в данной области, прежде всего внутривенной инъекцией или прямой инъекцией в ткани-мишени. Для системного применения предпочтительными являются внутривенный, внутрисосудистый, внутримышечный, внутриаартериальный, внутрибрюшинный, оральный или интратрахеальный пути введения. Предпочтительное местное нанесение представляет собой подкожный, внутрикожный, внутрикардиальный, внутридольковый, интрамедуллярный, внутрилегочный путь введения или непосредственную обработку или обработку вблизи подлежащей лечению ткани (соединительной, костной, мышечной, нервной, эпители-

нальной ткани). В зависимости от требуемой продолжительности и эффективности лечения фармацевтические композиции антитела могут быть введены один раз или несколько раз, например, периодически, например, ежедневно в течение нескольких дней, недель или месяцев, и с использованием различных доз.

Для получения приемлемых композиций антитела для описанных выше способов применения специалист может использовать известные инъекционные, физиологически приемлемые стерильные растворы. Для приготовления готового к употреблению раствора для парентеральной инъекции или инфузии легко доступны водные изотонические растворы, такие как, например, физиологические растворы или растворы соответствующего протеина плазмы. Фармацевтические композиции могут присутствовать в виде лиофилизатов или безводных препаратов, которые могут быть восстановлены с помощью известных инъекционных растворов непосредственно перед применением в стерильных условиях, например, в качестве набора составляющих. Конечную форму композиций антитела по настоящему изобретению готовят для инъекции, инфузии или перфузии путем смешения очищенных антител по изобретению со стерильным физиологическим раствором, в который могут быть добавлены известные носители и/или добавки (например, сывороточный альбумин, декстроза, бисульфит натрия, ЭДТК).

Количество введенного антитела зависит от природы болезни. В случае страдающих раком пациентов внесенная доза "обнаженного" антитела может находиться в диапазоне от 0,1 до 100 мг/м<sup>2</sup>, предпочтительно от 5 до 50 мг/м<sup>2</sup> на обработку. Для радиоактивно меченных, например, с помощью иода антител должна быть определена максимальная переносимая доза (MTD), которая не должна превышать терапевтически рекомендованные дозы. Затем может быть проведено лечение радиоактивно меченным антителом страдающих раком пациентов путем повторной (ежемесячной или еженедельной) внутривенной инфузии дозы, которая ниже MTD (см., например, Welt и др., J. Clin. Oncol. 12: 1193-1203 (1994)).

Таким образом, одним из объектов настоящего изобретения является применение антитела по изобретению для лечения рака. Согласно предпочтительному варианту осуществления настоящее изобретение относится к применению антител по изобретению, конъюгированных с терапевтическим агентом, как описано выше, для лечения рака. Согласно другому предпочтительному варианту осуществления настоящее изобретение относится к применению антител по изобретению, конъюгированных с визуализирующим агентом для визуализации активированных фибробластов стромы. Согласно еще одному предпочтительному варианту осуществления настоящее изобретение относится к применению меченных антител по изобретению для обнаружения присутствия активированных фибробластов стромы в образце.

Одним из объектов изобретения является способ лечения опухолей, где опухоль связана с активированными фибробластами стромы, обладающими способностью специфично формировать комплекс с антителами по изобретению, присутствующими в виде "обнаженных"/немодифицированных антител, модифицированных антител, таких как слитые белки, или антител, конъюгированных с терапевтическим агентом, предусматривающий контактирование опухоли с терапевтически эффективным количеством указанных антител. Согласно предпочтительному варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения опухолей, как указано выше, где опухоль представляет собой опухоль, включающую раковые клетки, выбранную из группы злокачественных опухолей, включающей колоректальные опухоли, немелкоклеточный рак легкого, опухоли молочной железы, рак головы и шеи, опухоли яичника, опухоли легкого, инвазивные опухоли мочевого пузыря, опухоли поджелудочной железы и метастазирующие опухоли головного мозга. Описанный выше способ лечения опухолей может осуществляться *in vitro* или *in vivo*.

Еще одним объектом изобретения является способ выявления присутствия активированных фибробластов стромы в области заживления раны, воспаления или в опухоли, отличающийся тем, что

(а) образец, который может содержать активированные фибробласты стромы, приводят в контакт с антителом по изобретению в условиях, обеспечивающих формирование комплекса между антителом и антигеном,

(б) производят обнаружение присутствия комплекса, тем самым обнаруживая присутствие активированных фибробластов стромы в области заживления раны, воспаления или в злокачественной опухоли.

Согласно предпочтительному варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу выявления присутствия активированных фибробластов стромы в опухоли, где опухоль представляет собой опухоль, включающую раковые клетки, выбранную из группы злокачественных опухолей, включающей колоректальные опухоли, немелкоклеточный рак легкого, опухоли молочной железы, рак головы и шеи, опухоли яичника, опухоли легкого, опухоли мочевого пузыря, опухоли поджелудочной железы и метастазирующие опухоли головного мозга. Наиболее предпочтительными антителами по изобретению являются антитела, отличающиеся тем, что их метят как указано выше.

Еще одним объектом настоящего изобретения является способ визуализации наличия активированных фибробластов стромы в области заживлении раны, воспаленной ткани (также рассматриваются ревматоидный артрит и цирроз) или в опухоли больного человека, отличающийся тем, что

(а) больному человеку вводят антитело по изобретению, конъюгированное с визуализирующим агентом, в условиях, обеспечивающих образование комплекса антитело-антиген,

(б) выявляют полученный таким образом комплекс,

(в) тем самым обнаруживают присутствие активированных фибробластов стромы у больного человека.

Согласно предпочтительному варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу визуализации, как описано выше, присутствия активированных фибробластов стромы в опухоли, где опухоль представляет собой опухоль, включающую раковые клетки, выбранную из группы злокачественных опухолей, включающей колоректальные опухоли, немелкоклеточный рак легкого, опухоли молочной железы, рак головы и шеи, опухоли яичника, опухоли легкого, опухоли мочевого пузыря, опухоли поджелудочной железы и метастазирующие опухоли головного мозга.

Еще одним объектом настоящего изобретения является способ обнаружения присутствия стромы опухоли, отличающийся тем, что

(а) приемлемый образец, приводят в контакт с антителом по изобретению в условиях, обеспечивающих формирование комплекса между антителом и антигеном,

(б) обнаруживают присутствие любого сформированного таким образом комплекса,

(в) соотносят присутствие этого комплекса с присутствием стромы опухоли.

Антитела по изобретению для воплощения изобретения на практике предпочтительно метят с помощью выявляемого маркера.

И еще одним объектом настоящего изобретения является способ визуализации стромы опухоли у пациента, отличающийся тем, что

(а) больному человеку вводят антитело по изобретению, конъюгированное с визуализирующим агентом, в условиях, обеспечивающих образование комплекса антитело-антиген,

(б) выявляют любой полученный таким образом комплекс, тем самым обнаруживая присутствие стромы опухоли у больного человека.

### Описание чертежей

Фиг. 1. Последовательность ДНК версии А преобразованной человеческой варибельной области легкой цепи F19 (hF19L<sub>A</sub>), SEQ ID NO:1.

Фиг. 2. Аминокислотная последовательность версии А преобразованной человеческой варибельной области легкой цепи F19 (hF19L<sub>A</sub>), SEQ ID NO:2.

Фиг. 3. Последовательность ДНК версии В преобразованной человеческой варибельной области легкой цепи F19 (hF19L<sub>B</sub>), SEQ ID NO:3. Отличные от версии А нуклеотиды подчеркнуты и выделены жирным шрифтом.

Фиг. 4. Аминокислотная последовательность версии В преобразованной человеческой варибельной области легкой цепи F19 (hF19L<sub>B</sub>), SEQ ID NO:4. Отличные от версии А аминокислоты подчеркнуты и выделены жирным шрифтом.

Фиг. 5. Последовательность ДНК версии С преобразованной человеческой варибельной области легкой цепи F19 (hF19L<sub>C</sub>), SEQ ID NO:5. Отличные от версии А нуклеотиды подчеркнуты и выделены жирным шрифтом.

Фиг. 6. Аминокислотная последовательность версии Б преобразованной человеческой легкой цепи F19 (hF19L<sub>C</sub>), SEQ ID NO:6. Отличные от версии А аминокислоты подчеркнуты и выделены жирным шрифтом.

Фиг. 7. Последовательность ДНК версии А преобразованной человеческой варибельной области тяжелой цепи F19 (hF19H<sub>A</sub>), SEQ ID NO:7.

Фиг. 8. Аминокислотная последовательность версии А преобразованной человеческой варибельной области тяжелой цепи F19 (hF19H<sub>A</sub>), SEQ ID NO:8.

Фиг. 9. Последовательность ДНК версии В преобразованной человеческой варибельной области тяжелой цепи F19 (hF19H<sub>B</sub>), SEQ ID NO:9. Отличные от версии А нуклеотиды подчеркнуты и выделены жирным шрифтом.

Фиг. 10. Аминокислотная последовательность версии Б преобразованной человеческой варибельной области тяжелой цепи F19 (hF19H<sub>B</sub>), SEQ ID NO:10. Отличные от версии А аминокислоты подчеркнуты и выделены жирным шрифтом.

Фиг. 11. Последовательность ДНК версии С преобразованной человеческой варибельной области тяжелой цепи F19 (hF19H<sub>C</sub>), SEQ ID NO:11. Отличные от версии А нуклеотиды подчеркнуты и выделены жирным шрифтом.

Фиг. 12. Аминокислотная последовательность версии В преобразованной человеческой варибельной области тяжелой цепи F19 (hF19H<sub>C</sub>), SEQ ID NO:12. Отличные от версии А аминокислоты подчеркнуты и выделены жирным шрифтом.

Фиг. 13. Последовательность ДНК версии D преобразованной человеческой варибельной области тяжелой цепи F19 (hF19H<sub>D</sub>), SEQ ID NO:13. Отличные от версии А нуклеотиды подчеркнуты и выделены жирным шрифтом.

Фиг. 14. Аминокислотная последовательность версии D преобразованной человеческой варибельной области тяжелой цепи F19 (hF19H<sub>D</sub>), SEQ ID NO:14. Отличные от версии А аминокислоты подчеркнуты и выделены жирным шрифтом.



Фиг. 15. Последовательность ДНК версии E преобразованной человеческой варибельной области тяжелой цепи F19 (hF19H<sub>E</sub>), SEQ ID NO:15. Отличные от версии A нуклеотиды подчеркнуты и выделены жирным шрифтом.

Фиг. 16. Аминокислотная последовательность преобразованной версии E человеческой варибельной области тяжелой цепи F19 (hF19H<sub>E</sub>), SEQ ID NO:16. Отличные от версии A аминокислоты подчеркнуты и выделены жирным шрифтом.

Фиг. 17. Аминокислотная последовательность химерной варибельной области легкой цепи F19 (chF19LC), SEQ ID NO:16.

Фиг. 18. Аминокислотная последовательность химерной варибельной области тяжелой цепи F19 (chF19HC), SEQ ID NO:18.

Фиг. 19. Последовательность ДНК человеческой каппа-константной области легкой цепи, SEQ ID NO:19.

Фиг. 20. Аминокислотная последовательность человеческой каппа-константной области легкой цепи, SEQ ID NO:20.

Фиг. 21. Последовательность ДНК человеческой константной области тяжелой цепи, SEQ ID NO:21.

Фиг. 22. Аминокислотная последовательность человеческой константной области тяжелой цепи, SEQ ID NO:22.

Фиг. 23. Экспрессионные векторы клеток млекопитающих, которые применялись для получения химерных и преобразованных человеческих антител с человеческими легкими капа-цепями и человеческими тяжелыми гамма-1-цепями.

А. Экспрессионный вектор легкой цепи: pKN100

Б. Экспрессионный вектор тяжелой цепи: pG1D105.

Фиг. 24. Последовательность ДНК и аминокислотная последовательность мышинной варибельной области легкой цепи F19, модифицированные для применения при конструировании химерной легкой цепи F19. Сайты рестрикции выделены жирными буквами. Подчеркнуты последовательность Козака, CDR с 1 по 3 и сайт сплайсинга донора.

Фиг. 25. Последовательность ДНК и аминокислотная последовательность мышинной варибельной области тяжелой цепи F19, модифицированные для применения при конструировании химерной тяжелой цепи F19. Сайты рестрикции выделены жирными буквами. Подчеркнуты последовательность Козака, CDR с 1 по 3 и сайт сплайсинга донора.

Фиг. 26. Последовательность ДНК химерного антитела F19, клонированная в экспрессионном векторе млекопитающих pKN100. Сайты рестрикции выделены жирными буквами и подчеркнуты. Подчеркнуты CDR с 1 по 3 и сайт сплайсинга донора. Эта последовательность представляет собой последовательность ДНК легкой цепи мышинного F19, клонированную внутри эукариотического экспрессионного вектора pKN100. Этот вектор имеет версию кДНК гена человеческой каппа-константной области (аллотип Km(3)), заканчивающуюся сильной искусственной терминирующей последовательностью. Кроме того, ген для отбора по признаку устойчивости к неомицину (Neo) также заканчивается этой искусственной последовательностью и также находится в такой же ориентации, что и кассета экспрессии легкой каппа-цепи.

Основными компонентами эукариотического экспрессионного вектора pKN100 являются:

1-6 = сайт EcoRI

7-1571 = промотор/энхансер HCMVi (человеческий цитомегаловирус)

583-587 = TATAA-бокс

610 = сайт инициации транскрипции

728-736 = сайт сплайсинга донора

731 = начало интрона

1557 = конец интрона

1544-1558 = сайт сплайсинга акцептора

1590-1598 = последовательность Козака

1599-1658 = пептидная лидерная последовательность

1659-1997 = легкая цепь мышинного F19

1996-2004 = сайт сплайсинга донора

2011-2657 = копия кДНК гена человеческой каппа-константной области (аллотип Km(3))

2664-2880 = искусственная терминирующая последовательность spaC2

2887-7845 = ДНК-фрагмент вектора pSV2neo, включающий ген, обуславливающий устойчивость к ампициллину (Amp) (в противоположной ориентации), сайты инициации репликации CoIEI и SV40 и ген, обуславливающий устойчивость к неомицину Neo (в такой же ориентации, что и кассета HCMVi-KCT)

7852-8068 = искусственная терминирующая последовательность spaC2.

Эта последовательность заканчивается непосредственно против хода транскрипции за сайтом EcoRI (положение 1-6) в точке начала последовательности. В качестве вектора эта последовательность ДНК должна быть кольцевой.

Фиг. 27. Последовательность ДНК химерного антитела F19, клонированная в экспрессионном векторе млекопитающих pG1D105. Сайты рестрикции выделены жирными буквами и подчеркнуты. Подчеркнуты CDR 1-3 и сайт сплайсинга донора. Эта последовательность представляет собой последовательность ДНК тяжелой цепи мышинового F19, клонированную в эукариотическом экспрессионном векторе pG1D105. Этот вектор имеет версию кДНК гена человеческой гамма-1-константной области (аллотип Gln (non-a, z,-x), также известный как аллотип Gm(17)).

Основными компонентами конструкции pKN100 являются:

1-2501 = базирующаяся на pBR322 последовательность, включающая ген, обуславливающий устойчивость к ампициллину и сайт инициации репликации ColEI плюс сайт инициации репликации SV40 и деформированный ранний промотор

SV40 2502-3226 = ген dhfr

3233-4073 = поли A-последовательность SV40 и т.д.

4074-4079 = лигированные сайты BamHI и BglIII (BstYI)

4080-4302 = сайт SPA плюс сигнал терминации C2

4303-5867 = промотор HCMVi

5879-5885 = уникальный сайт рестрикции HindIII для клонирования генов переменных областей иммуноглобулина

5886-5894 = последовательность Козака

5895-5951 = сигнальный пептид 5952-6323 = тяжелая цепь мышинового F19

6323-6330 = сайт сплайсинга донора

6331-6336 = уникальный сайт рестрикции BamHI для клонирования генов переменных областей иммуноглобулина

6337-7388 = копия кДНК гена человеческой гамма-1-константной области, предшествующей интрону длиной 62 пары оснований

7389-7709 = терминирующая последовательность Arnie.

Примененная в этой последовательности человеческая гамма-1-константная область имеет аллотип Gln (non-a, z,-x), также известный как аллотип Gm(17), для которого характерно наличие остатка глутаминовой кислоты (E) в положении 356 (согласно Eу-нумерации), остатка метионина (M) в положении 358 (согласно Eу-нумерации) и остатка лизина (K) в положении 214 (согласно Eу-нумерации). Эти остатки подчеркнуты в приведенной выше последовательности.

Фиг. 28. Основанный на ПЦР способ конструирования преобразованной человеческой легкой цепи F19. На этом чертеже дано схематическое изображение стратегии конструирования. Пунктирными линиями показана комплементарная последовательность, состоящая по меньшей мере из 21 пары оснований, между праймерами.

Фиг. 29. Нуклеотидная и выведенная аминокислотная последовательности версий А, В и С преобразованных человеческих переменных областей легкой цепи F19. Проведен анализ нуклеотидной и выведенной аминокислотной последовательностей и сравнение с последовательностями версии А, штрихами обозначены нуклеотиды, идентичные с этой последовательностью, точками обозначены аминокислоты, идентичные с этой последовательностью. Нумерация аминокислот соответствует нумерации, описанной у Kabat и др. (1991). Прямоугольником обозначены местоположения CDR.

Фиг. 30. Последовательность ДНК F19L<sub>A</sub> (версия А преобразованной человеческой легкой цепи), клонированная в экспрессионном векторе млекопитающих pKN100. Сайты рестрикции выделены жирными буквами и подчеркнуты. Подчеркнуты CDR 1-3 и сайт сплайсинга донора. Эта последовательность представляет собой версию А преобразованной легкой цепи F19, клонированную внутри эукариотического экспрессионного вектора pKN100. Этот вектор содержит версию кДНК гена человеческой каппа-константной области (аллотип Km(3)), заканчивающуюся сильной искусственной терминирующей последовательностью. Кроме того, ген для отбора по признаку устойчивости к неомицину Neo также заканчивается этой искусственной последовательностью и также находится в такой же ориентации, что и кассета экспрессии легкой каппа-цепи.

Основными компонентами вектора являются:

7-1571 = промотор/энхансер HCMVi

583-587 = ТАТАА-бокс

610 = сайт инициации транскрипции

728-736 = сайт сплайсинга донора

731 = начало интрона

1557 = конец интрона

1544-1558 = сайт сплайсинга акцептора

1590-1598 = последовательность Козака

1599-1658 = пептидная лидерная последовательность

1659-1997 = версия А преобразованной легкой цепи F19

1996-2004 = сайт сплайсинга донора

2011-2657 = копия кДНК гена человеческой каппа-константной области (аллотип Km(3))

2664-2880 = искусственная терминирующая последовательность sраC2

2887-7845 = ДНК-фрагмент вектора pSV2neo, включающий ген, обуславливающий устойчивость к ампициллину (Amp) (в противоположной ориентации), сайты инициации репликации ColEI и SV40 и ген, обуславливающий устойчивость к неомицину Neo (в такой же ориентации, что и кассета HCMVi-KCT)

7852-8068 = искусственная терминирующая последовательность sраC2.

Эта последовательность заканчивается непосредственно против хода транскрипции за сайтом EcoRI (положение 1-6) в точке начала приведенной ниже последовательности. В качестве вектора эта последовательность ДНК должна быть кольцевой.

Фиг. 31. Основанный на ПЦР способ конструирования преобразованной человеческой тяжелой цепи F19. На этом чертеже дано схематическое изображение стратегии конструирования. Пунктирными линиями показана комплементарная последовательность, состоящая по меньшей мере из 21 пары оснований между праймерами.

Фиг. 32. Нуклеотидная и выведенная аминокислотная последовательности версий А-Е преобразованных человеческих переменных областей тяжелой цепи F19. Проведен анализ нуклеотидной и выведенной аминокислотной последовательностей и сравнение с последовательностями версии А, штрихами обозначены нуклеотиды, идентичные с этой последовательностью, точками обозначены аминокислоты, идентичные с этой последовательностью. Нумерация аминокислот соответствует нумерации, описанной у Kabat и др. (1991). Прямоугольником обозначены местоположения CDR.

Фиг. 33. Последовательность ДНК F19H<sub>A</sub> (версия А преобразованной человеческой тяжелой цепи), клонированная в экспрессионном векторе млекопитающих pG1D105. Сайты рестрикции выделены жирными буквами и подчеркнуты. Подчеркнуты CDR 1-3 и сайт сплайсинга донора. Эта последовательность представляет собой последовательность ДНК эукариотического экспрессионного вектора pG1D105, содержащую версию А преобразованной переменной области тяжелой цепи F19. Этот вектор содержит версию кДНК гена человеческой гамма-1-константной области (аллотип Gln (non-a, z, -x), также известный как аллотип Gm(17)).

Основными компонентами конструкции являются:

1-2501 = базирующаяся на pBR322 последовательность, включающая ген, обуславливающий устойчивость к ампициллину и сайт инициации репликации ColEI плюс сайт инициации репликации SV40 и деформированный ранний промотор SV40

2502-3226 = ген dhfr

3233-4073 = SV40-поли А-последовательность и т.д.

4074-4079 = лигированные сайты BamHI и BglII (BstYI)

4080-4302 = сайт SPA плюс сигнал терминации C2

4303-5867 = промотор HCMVi

5879-5885 = уникальный сайт рестрикции HindIII для клонирования генов переменных областей иммуноглобулина

5886-5894 = последовательность Козака

5895-5894 = сигнальный пептид

5952-6323 = тяжелая цепь мышиного F19

6323-6330 = сайт сплайсинга донора

6331-6336 = уникальный сайт рестрикции BamHI для клонирования генов переменных областей иммуноглобулина

6337-7388 = копия кДНК гена человеческой гамма-1-константной области, предшествующей интрону длиной 62 пары оснований

7389-7709 = терминирующая последовательность Arnie.

Примененная в этой последовательности человеческая гамма-1-константная область имеет аллотип Gln (non-a, z, -x), также известный как аллотип Gm(17), для которого характерно наличие остатка глутаминовой кислоты (Е) в положении 356 (согласно Eu-нумерации), остатка метионина (М) в положении 358 (согласно Eu-нумерации) и остатка лизина (К) в положении 214 (согласно Eu-нумерации). Эти остатки подчеркнуты в приведенной выше последовательности.

Фиг. 34. Случаи сплайсинга РНК тяжелой (панель А) и легкой (панель Б) цепи, имеющие место при экспрессии антитела F19 в клетках млекопитающих -схематическое изображение.

А. Сплайсинг РНК тяжелой цепи.

Б. Сплайсинг РНК легкой каппа-цепи.

Фиг. 35. Зависимость связывания супернатанта L<sub>A</sub>H<sub>A</sub> с CD8-FAP от концентрации.

Фиг. 36. Связывание биотинилированного L<sub>A</sub>H<sub>A</sub> с человеческим FAP.

Фиг. 37. CD8-FAP несет эпитоп F19, что обнаружено с помощью cF19.

### Примеры

Пример 1. Конструирование мышиных-человеческих химерных генов.

Создавали химерное антитело F19 (сF19), включающее мышиные  $V_L$ - и  $V_H$ -области, связанные с человеческими константными областями каппа-цепи и гамма-1-цепи соответственно. Для модификации 5'- и 3'-последовательностей, фланкирующих последовательности кДНК, которые кодируют мышиные  $V_L$ - и  $V_H$ -области, использовали ПЦР-праймеры (табл. 1). Конструировали ГТЦР-праймеры, специфичные для V-области легкой цепи F19. Затем эти адаптированные мышиные вариабельные области F19 субклонировали в экспрессионных векторах, функционирующих в клетках млекопитающих, которые уже содержат человеческую каппа-(вектор рKN100) или гамма-1-(вектор рG1D105)-константные области (фиг. 23). В этих векторах используются промотор/энхансер человеческого цитомегаловируса (HCMV) для эффективной транскрипции легкой и тяжелой цепей. Векторы также содержат сайт инициации репликации SV40 для осуществления эффективной репликации ДНК и последующей экспрессии протеина в COS-клетках. Создавали экспрессионные векторы, несущие вариабельные области, встроенные в виде HindIII-BamHI-фрагментов ДНК. Для интродукции этих сайтов рестрикции на 5'-(HindIII) и 3'-(BamHI)-концы кДНК, кодирующих V-области, создавали ПЦР-праймеры. Кроме того, создавали ПЦР-праймеры для интродукции последовательности Козака (GCCGCCACC) на 5'-концы кДНК легкой и тяжелой цепи, что позволяло эффективно осуществлять трансляцию (Kozak M.: "At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells", J. Mol. Biol. 196:947 (1987)) и интродуцировать сайты сплайсинга донора на 3'-концы кДНК легкой и тяжелой цепи для объединения (сплайсинга) вариабельных областей с константными областями. ПЦР-праймеры, которые использовали для конструирования легкой и тяжелой цепи химерного F19, приведены в таблице 1. Последовательности ДНК и аминокислотные последовательности мышиных  $V_L$ - и  $V_H$ -областей, адаптированных для применения в конструкции легкой и тяжелой цепи химерного F19, приведены на фиг. 24 и 25. Последовательности ДНК легкой и тяжелой цепей мышиного F19, клонированные в эукариотических экспрессионных векторах рKN100 и рG1D105 соответственно, приведены на фиг. 26 и 27.

Таблица 1. ПЦР-праймеры для конструирования химерного антитела F19.

А. Вариабельная область легкой цепи

1. Праймер для конструирования 5'-конца (37-мерный)  
5'-CAGA AAGCTT GCCGCCACC ATG GAT TCA CAG GCC CAG-3'

HindIII                      M D S Q A Q

последовательность Козака

2. Праймер для конструирования 3'-конца (35-мерный)  
5'-CCGA GGATCC ACTCACG TTT CAG CTC CAG CTT GGT-3'

BamHI сайт сплайсинга донора

Б. Вариабельная область тяжелой цепи

1. Праймер для конструирования 5'-конца (37-мерный)  
5'-CAGA AAGCTT GCCGCCACC ATG GGA TGG AGC TGG CTC-3'

HindIII                      M G W S W V

последовательность Козака

2. Праймер для конструирования 3'-конца (35-мерный)  
5'-CCGA GGATCC ATCCACC TGA GGA GAC GGT GAC TGA-3'

BamHI сайт сплайсинга донора

Пример 2. Экспрессия и активность связывания химерного антитела F19.

Двумя плазмидными ДНК, кодирующими легкую и тяжелую цепи химерного F19 (см. пример 1), котрансфектировали COS-клетки, оценивая временную экспрессию химерного антитела F19, как описано ниже. После инкубации в течение 72 ч среду собирали, центрифугировали для удаления клеточного дебриса и анализировали с помощью ELISA в отношении производства человеческого IgG1-подобного антитела. Супернатант COS-клеток, содержащий химерное антитело F19, анализировали на способность связываться с клетками линии HT 1080 (см. пример 13), экспрессирующих на поверхности антиген FAP.

Трансфекция COS-клеток с помощью электропорации

Функционирующие в клетках млекопитающих экспрессионные векторы рG1D105 и рKN100, содержащие химерные или преобразованные человеческие версии тяжелой и легкой цепи соответственно, тестировали в COS-клетках, оценивая временную экспрессию антител F19. COS7-клетки пересевали общепринятым методом в среду DMEM (каталожный номер фирмы Gibco BRL 41966), содержащую пенициллин (50 ед./мл), стрептомицин (50 мкг/мл), L-глутамин и 10%-ную инактивированную нагреванием не содержащую гаммаглобулин fetalную телячью сыворотку (ФТС каталожный номер фирмы Harlan Sera-Lab D0001). ДНК интродуцировали в COS-клетки электропорацией с использованием устройства типа Gene Pulsar (фирма BioRad). ДНК (10 мкг из каждого вектора) добавляли к аликвотам по 0,8 мл, включающим  $1 \times 10^6$  клеток/мл, в забуферном фосфатом физиологическом растворе (ЗФР, без  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ ). Импульс создавали при напряжении 1900 В, емкости конденсатора 25 мкФ. После восстановления в течение 10 мин при температуре окружающей среды полученные в результате электропорации клетки

добавляли к 8 мл среды DMEM, дополненной 5% ФТС. После инкубации при 37°C в течение 72 ч среду собирали, центрифугировали для удаления клеточного дебриса и хранили в стерильных условиях при 4°C в течение непродолжительных периодов времени или при -20°C в течение более продолжительных периодов.

Метод ELISA для оценки концентраций слитого антитела IgG1/каппа в супернатантах COS-клеток

Образцы антител, полученных в трансфектированных COS-клетках, анализировали с помощью ELISA для определения количеств продуцированного химерного или преобразованного человеческого антитела. Для определения антитела планшеты сенсibilizировали козьим антителом к человеческому IgG (специфическим для Fcγ-фрагмента) (фирма Jackson Immuno Research Laboratories Inc., №109-005-098). Приготавливали серийные разведения образцов COS-клеток и добавляли в каждую лунку. После инкубации в течение 1 ч при 37°C и промывки добавляли конъюгированное с пероксидазой из хрена козье антитело к человеческой легкой каппа-цепи (фирма Sigma, A-7164). После инкубации в течение 30 мин при 37°C и промывки при комнатной температуре добавляли в течение 30 мин субстрат К-голубой (смесь 3,3',5,5'-тетраметилбензидина и перекиси водорода, фирма Bionostics Limited, №KB175). Реакцию прекращали, используя раствор Red Stop (Bionostics Limited, №RS20), и определяли оптическую плотность с помощью микропланшет-ридера при 650 нм. В качестве стандарта использовали очищенное человеческое IgG1/каппа-антитело (фирма Sigma, 1-3889) известной концентрации.

Экспрессия химерного антитела F19 в COS-клетках была невысокой (таблица 2), находясь в диапазоне от 10 до 60 нг/мл, что по меньшей мере в 10 раз ниже, чем экспрессия большинства антител.

С целью повышения уровней экспрессии химерного антитела F19 лидерную последовательность V<sub>L</sub>-области F19 изменяли путем замены лейцина на пролин в положении -9. Эта одна аминокислотная замена в лидерной последовательности привела к по меньшей мере двукратному увеличению количества химерного антитела, продуцируемого в COS-клетках.

Результаты оценки клеточного связывания показали, что химерное антитело F19 связывается с FAP-мишенью специфически и с ожидаемой авидностью.

Таблица 2. Концентрации химерного антитела F19 в супернатантах COS-клеток (приведены результаты трех независимых трансфекций)

Компоненты трансфектирующего антитела		Человеческий γ1/К (в мкг/мл)
Тяжелая цепь	Легкая каппа-цепь	
cF19	cF19 (лидерная последовательность F19)	0,060
cF19	cF19 (мутантная лидерная последовательность)	0,212
cF19	cF19 (лидерная последовательность F19)	0,056
cF19	cF19 (мутантная лидерная последовательность)	0,108
cF19	cF19 (лидерная последовательность F19)	0,011
cF19	cF19 (мутантная лидерная последовательность)	0,087

Пример 3. Конструирование версий A-C(L<sub>A</sub>-L<sub>C</sub>)преобразованной человеческой легкой цепи F19.

Конструирование первой версии преобразованной человеческой V<sub>L</sub>-области (L<sub>A</sub>) проводили с использованием перекрывающихся ПЦР-фрагментов согласно методу, описанному у Daugherty B.L., DeMartino J.A., Law M.F., Kawka D.W., Singer I.I. и Mark G.E., "Polymerase chain reaction (PCR) facilitates the cloning, CDR-grafting, and rapid expression of murine monoclonal antibody directed against the CD18 component of leukocyte integrins. Nucl. Acid. Res. 19: 2471 (1991). Синтезировали 10 олигонуклеотидов, которые состояли из пяти пар праймеров, APCR1-vall, vla2-vla3, vla40-vla5, vla6-vla7 и vla8-APCR4 (табл. 3 и фиг. 28). Между соседними парами праймеров находилась перекрывающаяся последовательность, состоящая по меньшей мере из 21 пары оснований (фиг. 28). APCR1 и APCR4 гибридизовались с фланкирующими последовательностями вектора pUC19. Создавали мутагенные праймеры таким образом, чтобы их 5'-конец был расположен непосредственно за кодоном в нестрогом положении. Эту стратегию использовали для нейтрализации случайного добавления одного нуклеотида на 3'-конец цепи, комплементарной мутагенному праймеру, с помощью ДНК-полимеразы в процессе ПЦР (Sharrocks A.D. и Shaw P.E., "Improved primer design for PCR-based, site-directed mutagenesis", Nucl. Acid. Res. 20: 1147 (1992)). Соответствующую пару праймеров (по 0,2 мкМ каждого) объединяли с 10 нг версии "B" преобразованной человеческой L25V<sub>L</sub>-области кДНК и 1 ед. ДНК-полимеразы AmpliTaq (фирма Perkin Elmer Cetus) в 50 мкл ПЦР-буфера, содержащего 10мМ Трис-НСl (рН 8,3), 50мМ КСl, 200мкМ дНТФ и 1,5мМ MgCl<sub>2</sub>. Эту смесь покрывали минеральным маслом и осуществляли ПЦР, включающую 25 циклов, каждый из которых включал стадию денатурации при 94°C в течение 1 мин, стадию ренатурации праймера при 55°C в течение 1 мин и стадию удлинения при 72°C в течение 2 мин. После этого проводили 1 цикл, включающий

дополнительную стадию удлинения при 72°C в течение 10 мин, после чего смесь охлаждали до 4°C. Промежуток времени между стадиями ренатурации праймера и удлинения составлял 2,5 мин. ПЦР-продукты из 5 реакций (А, Б, В, Г и Д) затем очищали гель-электрофорезом с последующей элюцией ДНК с использованием набора Wizard CR preps (фирма Promega). ПЦР-продукты А, Б, В, Г и Д объединяли в соответствии с их комплементарностью друг с другом. Во второй серии ПЦР ПЦР-продукты Б и В и Г и Д (по 50 нг каждого) добавляли к 50 мкл смеси для ПЦР (как описано выше), каждая из которых содержала по 1 ед. ДНК-полимеразы AmpliTaq (фирма Perkin Elmer Cetus). Реакции повторяли в течение 20 циклов, как описано выше, за исключением того, что температуру ренатурации поднимали до 60° С. В третьей серии ПЦР ПЦР-продукты Е и Ж подвергали ПЦР-амплификации с использованием по 1 мкл смеси каждой из проведенных ранее ПЦР и соответствующей пары ПЦР-праймеров (vla2-vla5 или vla6-APCR4). Смеси для ПЦР содержали 1 ед. ДНК-полимеразы AmpliTaq в 50 мкл смеси для ПЦР (как описано выше) и их амплифицировали с использованием одной стадии из 25 циклов. В четвертой серии ПЦР ПЦР-продукт 3 подвергали ПЦР-амплификации с использованием по 1 мкл смеси каждой из предыдущих смесей для ПЦР и val2-APCR4 в качестве пары ПЦР-праймеров. И наконец, ПЦР-продукты А и 3 объединяли в соответствии с их собственной комплементарностью с помощью состоящей из двух стадий ПЦР, аналогичной описанной выше, с использованием а качестве терминирующих праймеров RSP и UP. Полностью сконструированный фрагмент, соответствующий полной преобразованной человеческой V<sub>L</sub>-области F19, включающей лидерную последовательность, расщепляли с помощью HindIII и BamHI и клонировали в векторе pUC19 для секвенирования. Клон, имеющий правильную последовательность ДНК, обозначили как reshF19La (фиг. 29), и его субклонировали в эукариотическом экспрессионном векторе pKN100. Последовательность ДНК reshF19La, клонированная в pKN100, показана на фиг. 30.

Вторую версию преобразованной человеческой V<sub>L</sub>-области (L<sub>B</sub>) F19 конструировали, используя такую же схему, которая описана для LA, но в которой праймеры vla4 и vla7 были заменены на vlb4 и vlb7 соответственно (табл. 3). Последовательность ДНК L<sub>B</sub> приведена на фиг. 29.

Третью версию преобразованной человеческой V<sub>L</sub>-области (L<sub>C</sub>) F19 конструировали, используя набор для сайтнаправленного мутагенеза QuikChange™ фирмы Stratagene. Метод QuikChange-сайтнаправленного мутагенеза осуществляли согласно инструкциям производителя, используя reshF19La в векторе pKN100 в качестве двухцепочечной ДНК-матрицы. Необходимые для этого протокола мутагенные олигонуклеотидные праймеры F19L<sub>C</sub>-смысловой и F19L<sub>C</sub>-антисмысловой (табл. 3) создавали согласно инструкциям производителя. Вкратце метод состоит в следующем: оба мутагенных праймера содержали требуемую точковую мутацию (кодон ТТТ в положении 49 (Phe) в последовательности Кэбата заменяли на кодон ТАТ, кодирующий Тир) и их ренатурировали до одной и той же последовательности в противоположных цепях L<sub>A</sub> в векторе pKN100. Точковую мутацию подтверждали с помощью секвенирования ДНК полной V<sub>L</sub>-области. Последовательность ДНК L<sub>C</sub> приведена на фиг. 29. Для устранения возможности возникновения случайной мутации в pKN100 в процессе ПЦР, V<sub>L</sub>-область вырезали из вектора pKN100 в виде HindIII/BamHI-фрагмента и повторно субклонировали в немодифицированном векторе pKN100, расщепленном с помощью указанных выше двух рестриктаз.

Таблица 3. ПЦР-праймеры для конструирования преобразованных человеческих переменных областей легкой цепи F19 1. Праймеры для синтеза версии "А"

F19vla1 (36 mer):

5' GTCATCACAATGTCTCCGGAGGAACCTGGAACCCAG 3'

F19vla2 (29 mer):

5' CTCCGGAGACATTGTGATGACCCAATCTC 3'

F19vla3 (45 mer):

5' GAATATAAAAGGCTCTGACTGGACTTGCAGTTGATGGTGGCCCTC 3'

F19vla4 (72 mer):

5' CAGTCAGAGCCTTTTATATTCTAGAAATCAAAAGAACTACTTGGCCT  
GGTATCAGCAGAAACCAGGACAGCC 3'

F19vla5 (44 mer):

5' ACCCCAGATTCCCTAGTGCTAGCCCAAAAGATGAGGAGTTTGGG 3'

F19vla6 (67 mer):

5' TAGCACTAGGGAATCTGGGGTACCTGATAGGTTCACTGGCAGTGGGTTTG  
GGACAGACTTCACCCCTC 3'

F19v1a7 (53 mer):

5' GTCCCTTGTCCGAACGTGAGCGGATAGCTAAAATATTGCTGACAGTAA  
TAAAC 3'

F19v1a8 (33 mer):

5' GCTCACGTTCCGACAAGGGACCAAGGTGGAAAT 3'

## 2. Праймеры для синтеза версии "В"

F19v1b4 (72 mer):

5' CAGTCAGAGCCTTTTATATTCTAGAAATCAAAAGAACTACTTGGCCTGG  
TTCCAGCAGAAACCAGGACAGCC 3'

F19v1b7 (57 mer):

5' GTCCCTTGTCCGAACGTGAGCGGATAGCTAAAATATTGCTGACAGTCATA  
AACTGCC 3'

## 3. Праймеры для синтеза версии "С"

F19Lc-смысловой (34 mer):

5' CCCAAACTCCTCATCTATTGGGCTAGCACTAGGG 3'

F19Lc-антисмысловой (34 mer):

5' CCCTAGTGCTAGCCCAATAGATGAGGAGTTTGGG 3'

## 4. Праймеры для гибридизации с фланкирующими последовательностями вектора pUC19

APCR1 (17 мер, смысловой праймер): 5'-TACGCAAACCGCCTCTC-3'

APCR1 (18 мер, антисмысловой праймер): 5'-GAGTGCACCATATGCGGT-3'

RSP (-24) (16 мер, смысловой праймер): 5'-AACAGCTATGACCATG-3'

UP (-40) (17 мер, антисмысловой праймер): 5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3'

Пример 4. Конструирование версий А-Е ( $H_A$ - $H_E$ ) преобразованной человеческой тяжелой цепи F19.

Версию "А" преобразованной человеческой  $V_H$ -области ( $H_A$ ) F19 конструировали с использованием таких же методов ПЦР, которые описаны для конструирования версии "А" преобразованной человеческой  $V_L$ -области F19 ( $L_A$ ) (фиг. 31). ДНК-матрица представляла собой версию "А" преобразованной человеческой  $V_H$  226 (Leger O. J. P., Yednock T. A., Tanner L., Horner H. C., Hines D. K., Keen S., Saldanha J., Jones T., Fritz L. C. и Bendig M. M., "Humanization of mouse antibody against human alpha-4 integrin: a potential therapeutic for the treatment of multiple sclerosis", Hum. Antibod. 8: 3 (1997)). Шесть ПЦР-праймеров создавали и синтезировали для конструирования версии "А" преобразованной человеческой  $V_H$ -области F19 (табл. 4). ПЦР-продукты А, В, С и D получали, используя в качестве пар ПЦР-праймеров APCR1-Vha1, Vha2-Vha3, Vha4-Vha5 и Vha6-APCR4 соответственно. Условия для ПЦР в основном соответствовали описанным для конструирования преобразованной человеческой  $V_L$ -области F19. Клон, имеющий правильную последовательность ДНК, обозначили как reshF19Ha (фиг. 32) и затем его субклонировали в эукариотическом векторе pG1D105. Последовательность reshF19Ha, клонированная в pG1D105, приведена на фиг. 33.

Третью версию преобразованной человеческой  $V_H$ -области F19 ( $H_C$ ) конструировали с использованием такой же схемы, которая описана для  $H_A$ , но праймер Vha4 заменяли на Vhc4 (табл. 4). Последовательность ДНК  $H_C$  приведена на фиг. 32. Вторую ( $H_B$ ) и четвертую ( $H_D$ ) версию преобразованной человеческой  $V_H$ -области F19 конструировали на основе ПЦР-мутагенеза, описанного Kamman с соавторами (Kamman M., Laufs J., Schell J. и Gronenborn B., "Rapid insertional mutagenesis of DNA by polymerase chain reaction (PCR)" Nucl. Acids Res. 17: 54040 (1980)). Для  $H_B$  и  $H_D$  использовали мутагенный праймер F19VHb6 (замена Tyr-91 на Phe-91, табл. 4) в паре с APCR4 в ПЦР с использованием в качестве ДНК-матрицы  $H_A$  и  $H_C$  соответственно. ПЦР-продукты VHb и VHd расщепляли с помощью рестриктаз PstI и BamHI и субклонировали в reshF19Ha и reshF19Hc, соответственно, предварительно расщепленных с помощью этих же двух рестриктаз. Последовательности ДНК  $H_B$  и  $H_D$  приведены на фиг. 32.

Версию "Е" преобразованной человеческой  $V_H$ -области F19 ( $H_E$ ) конструировали на основе методов ПЦР-мутагенеза, описанных у Kamman с соавторами (1989) выше.

Для reshF19He использовали мутагенный праймер F19Msc1He (табл. 5) в паре с праймером F19VHIndIII (табл. 5) в ПЦР с использованием  $H_C$ , клонированной в функционирующем в клетках млекопитающих экспрессионном векторе pG1D105, в качестве ДНК-матрицы. Соответствующую пару праймеров (по 0,2мкМ каждого) объединяли с 10 нг кДНК версии "А" преобразованной человеческой  $V_H$ -области 226 в 100 мкл ПЦР-буфера, содержащего 10мМ KCl, 10мМ  $(NH_4)_2SO_4$ , 20мМ трис-HCl (pH

8,8), 2мМ MgSO<sub>4</sub>, 0,1% тритона X-100 и 200мкМ дНТФ. Реакционные смеси покрывали минеральным маслом и выдерживали при 94°C в течение 5 мин. Затем добавляли 1 ед. ДНК-полимеразы Deep Vent (фирма New England Biolabs) ("Hot Start" PCR; Chou Q., Russell M., Birch D., Raymond J. и Bloch W., "Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications" Nucl. Acids Res. 20: 1717 (1992)) и проводили ПЦР в течение 25 циклов в термоячейке типа TRIO-Thermoblock Thermal Cycler (фирма Biometra, Геттинген, Германия). Каждый цикл включал стадию денатурации при 94°C в течение 1 мин, стадию ренатурации праймера при 70°C в течение 1 мин и стадию удлинения при 72°C в течение 2 мин. После этого проводили 1 цикл, включающий дополнительную стадию удлинения при 72°C в течение 10 мин, после чего смесь охлаждали до 4°C. ПЦР-продукты затем экстрагировали и очищали из стандартного агарозного геля с 1,4% TAE, с использованием набора для гель-экстракции типа QIAquick™ согласно протоколу производителя (фирма QIAGEN Ltd., Великобритания). Затем ПЦР-продукт V<sub>H</sub> расщепляли с помощью рестриктаз MscI и HindIII и встраивали в reshF19Hc, клонированный в pG1D105, предварительно расщепленном с помощью этих же двух рестриктаз. Сайт рестрикции, распознаваемый MscI, представляет собой уникальный сайт для всех версий преобразованной человеческой V<sub>H</sub>-области, и он не присутствует в экспрессионном векторе pG1D105. Сайт рестрикции, распознаваемый HindIII, представляет собой уникальный сайт pG1D105 для клонирования генов V<sub>H</sub>-области иммуноглобулина. Компетентные в отношении электропорации клетки E.coli линии XL-1 BLue трансформировали 1 мкл лигированной ДНК и высевали на агарозные пластины, содержащие ампициллин. Затем колонии подвергали скринингу в отношении присутствия и правильного размера вставок путем прямой ПЦР этих колоний (Gussow D. и Clackson T., "Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction", Nucl. Acid Res. 17:4000 (1989)) с помощью праймеров HCMi и HucyI, гибридизующихся с фланкирующими последовательностями вектора pG1D105 (табл. 5). ДНК из позитивных колоний получали с помощью набора Plasmid Midi, следуя протоколу производителя (фирма QIAGEN Ltd., Великобритания). Секвенирование ДНК проводили с помощью дидезокси-метода на основе разрыва цепи (Sanger F., Nicklen S. и Coulson A., "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74: 5463 (1977)) непосредственно из кольцевой векторной ДНК с использованием общепринятой тепловой денатурации (Andersen A., Pettersson A. и Kielsen T., "A fast and simple techniques for sequencing plasmid DNA with sequenase using heat denaturation", Biotechniques 13: 678 (1992)) и секвеназы 2.0 (фирма USB, Кливленд, штат Огайо). Последовательность ДНК reshF19Hc приведена на фиг. 32.

Таблица 4. ПЦР-праймеры для конструирования версий A-D, преобразованных человеческих вариабельных областей тяжелой цепи.

1. Праймеры для синтеза версии "А"

F19vha1 (47mer):

5' GTGTATTTCAGTGAAGGTGTATCTACTAGTTTTACAGCTGACTTTCAC 3'

F19vha2 (53 mer):

5' TAGTAGATACACCTTCACTGAATACACCATACACTGGGTAGACAGG  
CCCCTG 3'

F19vha3 (71 mer):

5' CCCTTGAACCTCTGGTTGTAGTTAGGAATACCATTGTTAGGATTAATACC  
TCCTATCCACTCCAGCCTTTG 3'

F19vha4 (71 mer):

5' TAACTACAACCAGAAAGTTCAAGGGCCGGCCACCTTGACCGTAGGCAA  
GTCTGCCAGCACCGCCTACATGG 3'

F19vha5 (63 mer):

5' GCATGGCCCTCGTCGTAACCATAGGCGATTCTTCTTCTGGCGCAGTAGT  
AGACTGCAGTGTC 3'

F19vha6 (48 mer):

5' CTATGGTTACGACGAGGGCCATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAAC 3'

2. Праймеры для синтеза версии "С"

F19vha4 (71 mer):

5' TAACTACAACCAGAAAGTTCAAGGGCCGGGTCAACATCACCGTAGACA  
CCTCTGCCAGCACCGCCTACATGG 3'

3. Праймеры для синтеза версий "В" и "D"

F19vhbd6 (27 mer):

5' GGACACTGCAGTCTACTTCTGCGCCAG 3'



4. Праймеры, гибридизующиеся в фланкирующими последовательностями вектора pUC19  
APCR1 (17 мер, смысловой праймер) 5'-TACGCAAACCGCCTCTC-3'

APCR4 (18 мер, антисмысловой праймер) 5'-GAGTGCACCATATGCGGT-3'

Таблица 5. ПЦР-праймеры для конструирования версии E преобразованных человеческих вариабельных областей тяжелой цепи.

1. Праймеры для синтеза версии "E" F19MscIHe (65 мер, антисмысловой):

5' CСТТТGGCCAGGGGCCTGTCTAACCCAGTGTATGGTGTATTTCAGTGAAGGTG

MscI

TATCCASTAGTTTCCASTAGTTT 3'

2. Праймеры, гибридизующиеся с фланкирующими последовательностями функционирующего в клетках млекопитающих вектора pG1D105

HCMi (28 мер, смысловой) 5'-GTCACCGTCCTTGACACGCGTCTCGGGA-3'

Нисуγ (17 мер, антисмысловой) 5'-TTGGAGGAGGGTGCCAG-3'

Пример 5. Концентрации преобразованного человеческого антитела F19 в супернатантах COS-клеток.

COS-клетки трансфектировали одной парой из серий конструкций преобразованного человеческого антитела F19 и определяли концентрацию человеческого антитела с помощью IgG1/каппа-ELISA, как описано в примере 2.

Таблица 6. Концентрации преобразованного человеческого антитела F19 в супернатантах COS-клеток.

Компоненты трансфектирующего антитела		Человеческий γ1/К
Тяжелая цепь	Легкая каппа-цепь	Концентрация (мкг/мл)
H <sub>A</sub>	L <sub>A</sub>	2,50
H <sub>A</sub>	L <sub>B</sub>	0,18
H <sub>B</sub>	L <sub>A</sub>	1,25
H <sub>B</sub>	L <sub>B</sub>	0,10
H <sub>D</sub>	L <sub>A</sub>	1,15
H <sub>D</sub>	L <sub>B</sub>	0,18
H <sub>A</sub>	L <sub>A</sub>	1,50
H <sub>A</sub>	L <sub>C</sub>	1,56
H <sub>C</sub>	L <sub>A</sub>	1,47
H <sub>C</sub>	L <sub>C</sub>	1,97
cF19	L <sub>A</sub>	1,54
cF19	L <sub>B</sub>	0,07
cF19	L <sub>C</sub>	2,14

Таблица 7. Концентрации преобразованного человеческого антитела F19 в супернатантах COS-клеток

Компоненты трансфектирующего антитела		Человеческий γ1/К
Тяжелая цепь	Легкая каппа-цепь	Концентрация (мкг/мл)
H <sub>A</sub>	L <sub>A</sub>	2,00
H <sub>A</sub>	L <sub>C</sub>	2,50
H <sub>C</sub>	L <sub>A</sub>	2,90
H <sub>C</sub>	L <sub>C</sub>	3,00
H <sub>E</sub>	L <sub>A</sub>	2,80
H <sub>E</sub>	L <sub>C</sub>	3,50

Случаи сплайсинга РНК, необходимые для экспрессии генов иммуноглобулина в клетках млекопитающих.

Оба экспрессионных вектора, функционирующих в клетках млекопитающих, т.е. pKN100 и pG1D105, содержат интрон между вариабельной и константной областями, который удаляется в процессе экспрессии гена, приводя к образованию матричной РНК. Случай сплайсинга, включающий рекомбинацию ДНК между сайтами сплайсинга донора тяжелой или легкой цепи и сайтом сплайсинга акцептора иммуноглобулина представлены на фиг. 34.

Пример 6. Анализ методом проточной цитометрии связывания cF19 и L<sub>A</sub>H<sub>C</sub> с экспрессирующими FAP человеческими клетками.

Оценивали способность L<sub>A</sub>H<sub>C</sub> связываться как с рекомбинантным, так и с эндогенно экспрессируемым на клеточной поверхности FAP.

Пример определения связывания L<sub>A</sub>H<sub>C</sub> с клеточным FAP.

В качестве клеток-мишеней применяли как встречающиеся в естественных условиях, экспрессирующие FAP клетки опухоли человека линии MF-SH (Shirasuma K. и др., Cancer, 55: 2521-2532 (1985)), так и трансфектированные FAP человеческие линии опухолевых клеток. Эффективность  $L_AH_C$  оценивали с помощью цитофлуорометрических анализов, позволяющих оценить прямое связывание с клетками-мишенями, а также по ингибирующему действию на связывание с FAP либо мышинового F19, либо химерного антитела cF19.

Использовали такие антитела и линии клеток, как F19 (мышинное моноклональное антитело к человеческому FAP, подкласс IgG1), mIgG (мышинный иммуноглобулин, класс IgG), cF19 (химерное моноклональное антитело к человеческому FAP, подкласс IgG1),  $L_AH_C$  (преобразованное моноклональное антитело к человеческому FAP, подкласс IgG1), hIgG1 (человеческий иммуноглобулин, подкласс IgG1), MF-SH (линия клеток человеческой злокачественной фиброзной гистiocитомы), HT-1080 (линия клеток человеческой фибросаркомы), клон 33 HT-1080FAP (линия клеток HT-1080, трансфектированная кДНК, кодирующей человеческий FAP). Антитела биотинилировали, как описано в примерах 8 и 12.

Непосредственное связывание  $L_AH_C$  с FAP на поверхности человеческих линий опухолевых клеток

При исследовании  $5 \times 10^5$  клеток линии опухолевых клеток инкубировали с определенными концентрациями тестируемого или контрольного антитела в общем объеме 0,2 мл забуференного фосфатом физиологического раствора (ЗФР), дополненного 1% бычьим сывороточным альбумином (БСА), в течение 30 мин на льду. Затем клетки промывали дважды 2 мл ЗФР, ресуспендировали в 0,2 мл ЗФР, дополненного 1% БСА, добавляли в качестве вторичного реагента разбавленное в соотношении 1:20 мышинное антитело к человеческому IgG, меченное ФИТЦ (фирма Dianiva) и инкубировали в течение еще 30 мин на льду.

В другом варианте исследования  $5 \times 10^5$  клеток линии опухолевых клеток инкубировали с определенными концентрациями меченного биотином cF19 в общем объеме 0,2 мл ЗФР, дополненного 1% БСА, в течение 30 мин на льду. Затем клетки промывали дважды 2 мл ЗФР, ресуспендировали в 0,2 мл ЗФР, дополненного 1% БСА, и инкубировали в течение еще 30 мин на льду с разбавленным в соотношении 1:40 стрептавидином-ФИТЦ (фирма Dianiva) в качестве вторичного реагента.

Клетки вновь промывали дважды 2 мл ЗФР, ресуспендировали в общем объеме 0,5 мл ЗФР, дополненного 1% параформальдегда (ПФА) и выдерживали на льду. Флуоресценцию одной клетки определяли цитофлуорометрически, анализируя клеточную флуоресценцию зеленого цвета при 488 нм в анализаторе клеток с активированной флуоресценцией типа EPICS XL (фирма Coulter).

Конкуренция  $L_AH_C$  с биотинилированным cF19 за связывание с FAP на клеточной поверхности экспрессирующих FAP человеческих линий клеток

При исследовании  $5 \times 10^5$  клеток линии опухолевых клеток инкубировали с определенными концентрациями немеченого тестируемого или контрольного антитела вместе с 1 мкг/мл меченного биотином антитела cF19. Затем клетки промывали дважды 2 мл ЗФР, ресуспендировали в 0,2 мл ЗФР, дополненного 1% БСА, и инкубировали в течение еще 30 мин на льду с разбавленным в соотношении 1:40 стрептавидином-ФИТЦ (фирма Dianiva) в качестве вторичного реагента и инкубировали в течение еще 30 мин на льду.

Затем клетки промывали дважды 2 мл ЗФР, ресуспендировали в общем объеме 0,5 мл ЗФР, дополненного 1% ПФА и выдерживали на льду. Флуоресценцию одной клетки определяли цитофлуорометрически, анализируя клеточную флуоресценцию зеленого цвета при 488 нм в анализаторе клеток с активированной флуоресценцией типа EPICS XL (фирма Coulter).

Как cF19, так и  $L_AH_C$  специфично связывалось в зависимости от концентрации с клоном 33 трансфектированных FAP человеческих опухолевых клеток линии HT-1080FAP (табл. 8). Не обнаружено никакого связывания с FAP-негативными клетками линии HT-1080 (табл. 9). Как cF19, так и  $L_AH_C$  специфично связывалось в зависимости от концентрации с человеческими клетками линии MF-SH, эндогенно экспрессирующих FAP (табл. 10).

Биотинилированное cF19 связывалось с клоном 33 человеческой линии HT-1080FAP (табл. 11) в зависимости от концентрации. Не обнаружено никакого связывания с FAP-негативными клетками линии HT-1080 (табл. 12).

Связывание биотинилированного cF19 с клоном 33 клеток линии HT-1080FAP ингибировалось как немеченым cF19, так и немеченым  $L_AH_C$  (табл. 13).

Установлено, что химерное моноклональное антитело к человеческому FAP cF19, а также преобразованное человеческое антитело к человеческому FAP  $L_AH_C$  (пример 10) связываются непосредственно с FAP, который экспрессируется на поверхности человеческих линий клеток, либо в результате эндогенной экспрессии этого протеина, либо в результате трансфекции клеток кодирующей его кДНК. Установлено, что это связывание зависит от концентрации.

Связывание биотинилированного cF19 может ингибироваться как немеченым cF19, так и немеченым  $L_AH_C$ .

Цитофлуорометрический анализ непосредственного связывания, а также ингибирования специфически связывающихся реагентов позволил установить специфичность химерного cF19 и преобразованных человеческих антител  $L_AH_C$  в отношении экспрессируемого на клеточной поверхности FAP.

Таблица 8. Связывание антител к FAP с клетками клона 33 HT-1080FAP

Концентрация антитела (нг/мл)	Среднее значение интенсивности флуоресценции		
	hIgG1	cF19	L <sub>A</sub> H <sub>C</sub>
500,0	0,12	6,65	2,76
100,0	0,12	1,63	0,66
20,0	0,12	0,43	0,22
4,0	0,12	0,17	0,15
0,8	0,12	0,14	0,13

Таблица 9. Связывание антител к FAP с нетрансфектированными клетками HT-1080

Концентрация антитела (нг/мл)	Среднее значение интенсивности флуоресценции		
	hIgG1	cF19	L <sub>A</sub> H <sub>C</sub>
500,0	0,11	0,11	0,12
100,0	0,11	0,11	0,11
20,0	0,11	0,11	0,12
4,0	0,11	0,11	0,12
0,8	0,11	0,11	0,11

Таблица 10. Связывание антител к FAP с клетками MF-SH

Концентрация антитела (нг/мл)	Среднее значение интенсивности флуоресценции		
	hIgG1	cF19	L <sub>A</sub> H <sub>C</sub>
4000	0,6	3,6	2,8
2000	н/о	3,3	2,5
1000	н/о	2,4	1,9

Концентрация антитела (нг/мл)	Среднее значение интенсивности флуоресценции		
	hIgG1	cF19	L <sub>A</sub> H <sub>C</sub>
500	н/о	1,8	1,3

н/о обозначает "не определяли"

Таблица 11. Связывание биотинилированного антитела cFAP с клетками клона 33 HT-1080FAP

Концентрация антитела (нг/мл)	Среднее значение интенсивности флуоресценции	
	биотинилированный hIgG1	биотинилированное cF19
5000,0	0,2	36,5
1000,0	0,2	18,1
200,0	0,2	4,5
40,0	0,2	1,3
8,0	0,2	0,5
1,6	0,3	0,3

Таблица 12. Связывание биотинилированного антитела cFAP с нетрансфектированными клетками HT-1080

Концентрация антитела (нг/мл)	Среднее значение интенсивности флуоресценции	
	биотинилированный hIgG1	биотинилированное cF19
5000,0	0,1	0,1
1000,0	0,1	0,1
200,0	0,1	0,1
40,0	0,1	0,1
8,0	0,1	0,1
1,6	0,1	0,1

Таблица 13. Конкуренция антител к FAP с биотинилированным cF19 за связывание с клетками клона 33 HT-1080FAP

Конкурентное антитело	Концентрация конкурентного антитела (мкг/мл)	Среднее значение интенсивности флуоресценции
нет	0,00	11,2
hIgG1	1,00	9,0
hIgG1	3,16	11,3
hIgG1	10,00	9,8
hIgG1	31,66	10,3
cF19	1,00	7,5
cF19	3,16	4,8
cF19	10,00	1,3
cF19	31,66	1,2
L <sub>A</sub> H <sub>C</sub>	1,00	8,0
L <sub>A</sub> H <sub>C</sub>	3,16	5,5
L <sub>A</sub> H <sub>C</sub>	10,00	2,9
L <sub>A</sub> H <sub>C</sub>	31,66	1,7

Биотинилированное cF19 использовали в концентрации 1 мкг/мл во всех опытах, приведенных в табл. 13.

Пример 7. Иммуноэффекторные функции моноклонального антитела L<sub>A</sub>H<sub>C</sub> в опытах *in vitro*.

Этот эксперимент проводили с целью выявления потенциальной активности моноклонального антитела (МАТ) L<sub>A</sub>H<sub>C</sub> со специфичностью в отношении антигена активации фибробласта (FAP) в отношении лизиса экспрессирующих FAP мишеней в присутствии человеческого комплемента или человеческих мононуклеарных лейкоцитов соответственно.

В частности, изучали способность L<sub>A</sub>H<sub>C</sub> опосредовать цитотоксические действия в отношении клеток клона 33 HT-1080FAP, которые экспрессируют человеческий FAP на своей поверхности. Цитотоксичность определяли *in vitro* с помощью следующего метода: меченные с помощью <sup>51</sup>Сг клетки-мишени инкубировали в присутствии L<sub>A</sub>H<sub>C</sub> с человеческой сывороткой в качестве источника комплемента или с человеческими MNC (мононуклеары периферической крови) в качестве клеток-эффекторов. Для количественной оценки лизиса клеток-мишеней использовали выделение <sup>51</sup>Сг.

Использовали следующие антитела и линии клеток: L<sub>A</sub>H<sub>C</sub> (преобразованное человеческое антитело к человеческому FAP, подкласс IgG1), hIgG1 (человеческий изотип IgG1, контроль), 3S193 (мышинное моноклональное антитело к IgG3 Lewis<sup>y</sup> (один из антигенов Льюиса), mIgG (мышинный IgG, контроль), HT-1080 (человеческая фибросаркома), клон 33 HT-1080FAP (линия клеток HT-1080, трансфектированная кДНК, кодирующей человеческий FAP), MCF-7 (клетки линии человеческой аденокарциномы молочной железы).

Опосредованный комплементом лизис клеток-мишеней с помощью L<sub>A</sub>H<sub>C</sub>

Опухолевые клетки метили с помощью радиоактивного изотопа путем инкубации в среде RPMI1640 с 100 мкКи <sup>51</sup>Сг (фирма NEN) при 37°C в течение 1 ч. Затем клетки промывали дважды средой без <sup>51</sup>Сг и ресуспендировали в концентрации 2x10 клеток/мл.

Человеческая сыворотка, являющаяся источником комплемента, представляла собой свежеприготовленную сыворотку из крови различных добровольцев. Кровь брали путем пункции из вены руки, выдерживали при комнатной температуре в течение 1 ч, давая произойти свертыванию крови, и хранили при 4°C в течение ночи. Сыворотку отделяли центрифугированием и отбирали из осадка.

Исследуемое антитело разбавляли из маточного раствора до соответствующей концентрации средой для культуры клеток RPMI1640.

1x10 радиоактивно меченных опухолевых клеток из исследуемой линии клеток инкубировали в течение 2 ч при 37°C в термостате (95% воздуха и 5% CO<sub>2</sub>) в присутствии различных концентраций тестируемого или контрольного антитела и 25 об.% человеческой сыворотки в качестве источника человеческого комплемента. Инкубацию осуществляли в U-образных 96-луночных планшетах в общем объеме 200 мкл среды RPMI1640 в трех повторностях. После периода инкубации планшеты центрифугировали, удаляли 100 мкл супернатанта и подсчитывали радиоактивность с помощью счетчика гамма-лучей. Общее количество включенной радиоактивности определяли для 10 клеток-мишеней. Спонтанное выделение определяли как радиоактивность, выделившуюся из клеток в отсутствие как антитела, так и комплемента в процессе указанного периода инкубации.

Удельный лизис рассчитывали из следующего уравнения:

$$\text{удельный лизис (\%)} = \frac{[\text{активность в образце}] - [\text{спонтанная активность}]}{[\text{максимальная активность}] - [\text{спонтанная активность}]} \times 100$$

Зависящая от антитела клеточная цитотоксичность (АЗКЦ)  $L_A H_C$ .

Опухолевые клетки метили с помощью радиоактивного изотопа путем инкубации в среде RPMI1640 с 100 мкКи  $^{51}\text{Cr}$  при 37°C в течение 1 ч. Затем клетки промывали дважды средой без  $^{51}\text{Cr}$  и ресуспендировали в концентрации  $2 \times 10^5$  клеток/мл.

MNC (мононуклеары периферической крови) получали из периферической крови путем пункции из вены руки здоровых добровольцев. Для предотвращения свертывания крови добавляли 20%-ный цитратный буфер. MNC из 4 мл этого препарата крови очищали центрифугированием (30 мин при 400 x g и комнатной температуре) на 3 мл среды для фракционирования лимфоцитов (фирма Boehringer Mannheim, Германия). MNC (мононуклеары периферической крови) получали из градиента, трижды промывали и разбавляли средой RPMI1640 до соответствующей концентрации. Лимфокинактированные киллеры (LAK-клетки) получали из MNC (мононуклеары периферической крови) инкубацией в течение 5 дней при 37° C в термостате (95% воздуха, 5%  $\text{CO}_2$ ) с начальной плотностью клеток  $1,3 \times 10^6$  клеток/мл в присутствии 100 ед. рекомбинантного человеческого интерлейкина-2 (IL-2). Исследуемое антитело разбавляли из маточного раствора до соответствующей концентрации средой для культуры клеток RPMI1640.

$1 \times 10^5$  радиоактивно меченных опухолевых клеток из исследуемой линии клеток инкубировали в течение 5 ч при 37°C в атмосфере 5%  $\text{CO}_2$  в присутствии различных концентраций тестируемого или контрольного антитела и MNC. MNC добавляли в количестве, достаточном для достижения требуемого соотношения эффектор : клетка-мишень. Инкубацию осуществляли в U-образных 96-луночных планшетах в общем объеме 200 мкл среды RPMI1640 с дублированием.

После периода инкубации планшеты центрифугировали, отбирали 100 мкл супернатанта и подсчитывали радиоактивность с помощью счетчика гамма-лучей. Общее количество включенной радиоактивности определяли для  $10^4$  клеток-мишеней. Спонтанное выделение определяли как радиоактивность, выделившуюся из клеток-мишеней в отсутствие как антитела, так и клеток -эффекторов в процессе указанного периода инкубации.

Удельный лизис рассчитывали из следующего уравнения:

$$\text{удельный лизис (\%)} = \frac{[\text{активность в образце}] - [\text{спонтанная активность}]}{[\text{максимальная активность}] - [\text{спонтанная активность}]} \times 100$$

Опосредованный антителом вызванный комплементом лизис опухолевых клеток

Никакого специфичного в отношении  $L_A H_C$  опосредуемого комплементом лизиса (превышающего лизис, обнаруженный при использовании изотипа в качестве контроля) не обнаружено в клетках клона 33 NT-1080FAP, обработанных концентрациями  $L_A H_C$  до 50 мкг/мл (табл. 14, табл. 15a).

Литическая активность человеческой сыворотки, которую использовали в качестве источника комплемента, обнаружена по лизису клеток линии человеческой аденокарциномы молочной железы MCF-7 в присутствии 12,5 мкг/мл мышинового моноклонального анти-Lewis<sup>y</sup> антитела 3S193 с известной способностью к активации комплемента (табл. 156).

Опосредованный антителом клеточный лизис опухолевых клеток

В присутствии  $L_A H_C$  в концентрации до 10 мкг/мл никакой АЗКЦ (зависящей от антитела клеточной цитотоксичности), опосредуемой человеческими MNC (табл. 16) или человеческими LAK-клетками (лимфокинактированные киллеры, табл. 17))  $L_A H_C$  в отношении клеток клона 33 NT-1080FAP, которая бы превышала обнаруженную при использовании изотипа в качестве контроля, не обнаружено при соотношении эффектор:мишень 50:1.

В аналогичных анализах in vitro с использованием либо человеческого комплемента, либо человеческих MNC в качестве эффекторных механизмов, человеческое моноклональное антитело к FAP  $L_A H_C$  не проявило никаких выраженных цитотоксических воздействий, превышающих таковые взятых в качестве контролей изотипов в отношении экспрессирующего FAP клона 33 линии опухолевых клеток NT-1080FAP.

Таблица 14. Удельный вызванный комплементом лизис (в %) клона 33 линии опухолевых клеток-мишеней NT-1080FAP, опосредованный  $L_A H_C$

Источник человеческой сыворотки:	Клон 33 NT-1080	
	hIgG1, контрольный изотип	$L_A H_C$
А 50 мкг/мл	5	4
А 10 мкг/мл	5	3
Б 50 мкг/мл	7	5
Б 10 мкг/мл	6	5
0 мкг/мл	0	0

Инкубация: 2 ч при 37° С, 25% сыворотка, взятая у добровольцев А или Б соответственно, в качестве источника комплемента.

Таблица 15а. Удельный вызванный комплементом лизис (в %) клон 33 линии опухолевых клеток-мишеней HT-1080FAP, опосредованный человеческим моноклональным антителом к FAP L<sub>A</sub>H<sub>C</sub>

Источник человеческой сыворотки:	Клон 33 HT-1080	
Концентрация антитела	hIgG1	L <sub>A</sub> H <sub>C</sub>
А 10,00 мкг/мл	2	1
А 2,50 мкг/мл	2	2
А 0,60 мкг/мл	1	1
А 0,15 мкг/мл	1	2
А 0,00 мкг/мл	2	2
Б 10,00 мкг/мл	2	2

Источник человеческой сыворотки:	Клон 33 HT-1080	
Концентрация антитела	hIgG1	L <sub>A</sub> H <sub>C</sub>
Б 2,50 мкг/мл	2	2
Б 0,60 мкг/мл	2	2
Б 0,15 мкг/мл	2	2
Б 0,00 мкг/мл	2	2
В 10,00 мкг/мл	2	2
В 2,50 мкг/мл	1	1
В 0,60 мкг/мл	1	1
В 0,15 мкг/мл	2	1
В 0 мкг/мл	3	3

Инкубация: 2 ч при 37°С, 25% сыворотка, взятая у добровольцев А, Б или В, соответственно, в качестве источника комплемента

Таблица 15б. Удельный вызванный комплементом лизис (в %) линии опухолевых клеток-мишеней MCF-7. опосредованный мышинным моноклональным антителом к Lewis<sup>y</sup> 3S193

Источник человеческой сыворотки:	MCF-7	
Концентрация антитела	mIgG	3S193
А 10,00 мкг/мл	0	21
А 2,50 мкг/мл	1	21
А 0,60 мкг/мл	0	21
А 0,15 мкг/мл	1	18
А 0,00 мкг/мл	0	0
Б 10,00 мкг/мл	1	13
Б 2,50 мкг/мл	0	17
Б 0,60 мкг/мл	1	18
Б 0,15 мкг/мл	1	15
Б 0,00 мкг/мл	0	0

Источник человеческой сыворотки:	MCF-7	
Концентрация антитела	mIgG	3S193
В 10,00 мкг/мл	1	22
В 2,50 мкг/мл	0	23
В 0,60 мкг/мл	1	26
В 0,15 мкг/мл	1	20
В 0 мкг/мл	1	1

Инкубация. 2 ч при 37° С, 25% сыворотка, взятая у добровольцев А, Б или В, соответственно, в качестве источника комплемента

Таблица 16. АЗКЦ (зависящая от антитела клеточная цитотоксичность) (удельный лизис в %) в отношении клон 33 линии опухолевых клеток-мишеней HT-1080FAP человеческих MNC (мононуклеары периферической крови), опосредованная L<sub>A</sub>H<sub>C</sub> Клон 33 HT-1080FAP

Концентрация антитела (в мкг/мл)	Клон 33 HT-1080FAP	
	hIgG1	L <sub>A</sub> H <sub>C</sub>
10,000	2	2
2,500	2	2
0,625	2	2
0,156	3	3
0,000	3	3

Инкубация: 5 ч при 37°С, 10<sup>4</sup> клеток-мишеней и соотношение эффекто-ры:клетки-мишени 50:1.

Таблица 17. АЗКЦ (зависящая от антитела клеточная цитотоксичность) (удельный лизис в %) в отношении клон 33 линии опухолевых клеток-мишеней HT-1080FAP LAK-клетками (лимфокинактивированные киллеры), опосредованная L<sub>A</sub>H<sub>C</sub>

Концентрация антитела (в мкг/мл)	Клон 33 HT-1080FAP	
	hIgG1	L <sub>A</sub> H <sub>C</sub>
10,000	12	14
2,500	14	17
0,625	14	21
0,156	15	21
0,000	14	14

Инкубация. 5 ч при 37°С, 10 клеток-мишеней и соотношение эффекторы:клетки-мишени 50:1.

Пример 8. Иммуногистохимический анализ связывания моноклонального антитела L<sub>A</sub>H<sub>C</sub> с нормальной и неопластической тканями человека.

Этот эксперимент осуществляли для того, чтобы определить характеристики связывания гуманизированного МАТ L<sub>A</sub>H<sub>C</sub> с нормальной и неопластической тканями человека.

Использовали следующие антитела: L<sub>A</sub>H<sub>C</sub>, сF19 и в качестве отрицательного контроля hIgG1, их непосредственно биотинилировали согласно методам, известным в данной области, и использовали в концентрациях от 2,5 до 0,25 мкг/мл в 2% БСА/3ФР (бычий сывороточный альбумин в забуференном фосфатом физиологическом растворе). Мышиное МАТ F19 использовали в качестве супернатанта культуры ткани гибридомы F19 в разбавлениях от 1:5 до 1:10 в 2% БСА/3ФР.

Для иммунохимических анализов использовали следующие реагенты: комплекс стрептавидин-пероксидаза (фирма Vector Labs, Burlingame, CA), комплекс авидин-биотин-пероксидаза (фирма Vector Labs), биотинилированное лошадиное антимышинное антитело (фирма Vector Labs), ДАБ (диаминобензидин, фирма Sigma Chemical Co., Сент-Луис, МО, США), гематоксилин Гарриса.

Оценивали свежемороженные образцы ткани, такие как нормальная ткань ободочной кишки, молочной железы, легкого, желудка, панкреатической железы, кожи, гортани, мочевого пузыря, гладкой и скелетной мускулатуры. Изученные ткани опухолей включали карциномы молочной железы, ободочной кишки, пищевода, матки, яичника, панкреатической железы, желудка и головы и шеи.

Применяли непрямой иммунопероксидазный метод, известный в данной области (Garin-Chesa P., Old L.J., Rettig W.J., "Cell surface glycoprotein of reactive stromal fibroblasts as potential antibody target in

human epithelial cancers", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 7235-7239 (1990)), с использованием свежемороженых срезов толщиной 5 мкм. ДАБ использовали в качестве субстрата для конечного продукта реакции. Срезы подвергали контрастному окрашиванию гематоксилином Гарриса и оценивали в отношении экспрессии антигена.

#### Экспрессия $L_AH_C$ в нормальных человеческих тканях

Изученные нормальные ткани были отрицательными в отношении экспрессии  $L_AH_C$  за исключением нормальной ткани панкреатической железы, в которой была выявлена подгруппа позитивных эндокринных клеток в островках Лангергансена (А-клетки), включающая  $L_AH_C$ , cF19 и F19 (табл. 18). Никакой иммунореактивности не обнаружено при использовании в качестве отрицательного контроля hIgG1 (человеческий иммуноглобулин подкласса IgG1).

#### Экспрессия $L_AH_C$ в опухолях

При изучении образцов ткани опухолей обнаружена практически одинаковая схема экспрессии  $L_AH_C$ , cF19 и F19 в фибробластах стромы опухоли. Сильная и однородная экспрессия обнаружена в большинстве изученных случаев, прежде всего, в изученных образцах злокачественных опухолей, полученных из молочной железы, ободочной кишки, легкого, панкреатической железы и из плоскоклеточных карцином (SQCC) головы и шеи (табл. 19). Никакой иммунореактивности не обнаружено при использовании в качестве отрицательного контроля hIgG1.

$L_AH_C$ , cF19 и F19 проявили иммунореактивность в отношении фибробластов стромы опухоли в изученных образцах рака эпителия. Не обнаружено иммунореактивности ни  $L_AH_C$ , ни cF19 в отношении фиброцитов клеток мезенхимы нормального органа или клеток паренхимы нормального органа взрослого человека. Иммунореактивность в отношении FAP выявлена только в подгруппе эндокринных клеток в островках панкреатической железы, вероятно в продуцирующих глюкагон А-клетках, и в 4-х из 9-ти изученных образцов матки, представляющих собой подгруппы фибробластов стромы в этих тканях.

Иммуногистохимический анализ  $L_AH_C$  в нормальных человеческих тканях и экспрессирующих FAP человеческих карциномах показал одинаковую схему связывания для  $L_AH_C$ , cF19 и мышиного МАт F19.

Таблица 18. Иммунореактивность МАт  $L_AH_C$ , cF19 и F19 в отношении нормальных тканей человека

Тип ткани	№	ВВН 1	cF19	F19
грудная клетка -эпителиальные клетки протоков/желез -миоэпителиальные клетки -соединительная ткань -кровеносные сосуды	4	- - - -	- - - -	- - - -
ободочная кишка -либеркюновы крипты -соединительная ткань -гладкие мышцы -кровеносные сосуды -мышечно-кишечное сплетение	6	- - - - -	- - - - -	- - - - -
легкое бронхи: -эпителий бронхов -гиалиновый хрящ -соединительная ткань -слизистые железы альвеолы: -пневмоциты (тип I/II) -альвеолярные фагоциты -альвеолярные капилляры	4	- - - - - - - - -	- - - - - - - - -	- - - - - - - - -



Тип ткани	№	ВВН 1	cF19	F19
желудок -наружный эпителий -желудочные железы: -главные клетки -париетальные (обкладочные) клетки -слизистые клетки -нейроэндокринные клетки -соединительная ткань -кровеносные сосуды -гладкие мышцы	3	- - - - - - - - -	- - - - - - - -	- - - - - - -
пищевод -наружный эпителий -соединительная ткань	1	- -	- -	- -
тонкий кишечник -эпителий ворсинок/криптов -соединительная ткань -гладкие мышцы -кровеносные сосуды -лимфоидная ткань	1	- - - - - -	- - - - - -	- - - - - -
мочевой пузырь -уротелий -соединительная ткань -гладкие мышцы -кровеносные сосуды	2	- - - -	- - - -	- - - -
поджелудочная железа -эпителий протоков -ацинарный эпителий -островки Лангерганса: -В-клетки -А-клетки -D-клетки -соединительная ткань -кровеносные сосуды -нервы	3	- - - - + * - - - - -	- - - - + * - - - - -	- - - - + * - - - - -
гортань -чешуйчатый эпителий -слизистые железы -соединительная ткань -гиалиновый хрящ -кровеносные сосуды -скелетные мышцы	1	- - - - - -	- - - - - -	- - - - - -

Тип ткани	№	BIBN 1	cF19	F19
лимфатические узлы -лимфоидные клетки -лимфатические синусы -соединительная ткань -кровеносные сосуды	1	- - - -	- - - -	- - - -
селезенка -красная и белая пульпа -синусы -соединительная ткань	1	- - - -	- - - -	- - - -
печень -гепатоциты -желчные протоки -воротная триада	1	- - - -	- - - -	- - - -
щитовидная железа -фолликулярный эпителий -парафолликулярные клетки -соединительная ткань	2	- - - -	- - - -	- - - -
предстательная железа -железистый эпителий -строма	1	- - -	- - -	- - -
яичко -семенные канальцы -строма	1	- - -	- - -	- - -
яичник -фолликулы -строма	3	- - -	- - -	- - -
шейка матки -эпителий -строма	1	- - -	- - -	- - -
матка -эндометрий: -железы -строма -кровеносные сосуды -миометрий	9	- + # - - -	- + # - - -	- + # - - -
кора головного мозга -нейроны -нейроглиальные клетки -кровеносные сосуды	1	- - - -	- - - -	- - - -
Тип ткани	№	BIBN 1	cF19	F19
мозжечок -молекулярный слой -зернистый клеточный слой -клетки Пуркинье -кровеносные сосуды	1	- - - - -	- - - - -	- - - - -
кожа -сквамозный эпителий -меланоциты	3	- - -	- - -	- - -

Замороженные срезы с фиксацией ацетоном тестировали иммуноперокси-дазным методом с использованием комплекса авидин-биотин. № Обозначает количество образцов ткани, полученных из различных пациентов.

\* Идентификация А-клеток, основанная на морфологии и локализации внутри островков.

# Положительная иммунореактивность в строме 4-х из 9-ти изученных образцов. Положительные образцы представляют собой образцы ранней (2) и промежуточной (2) фазы пролиферации эндометрия.

Пример 9. Видоспецифичность связывания L<sub>A</sub>H<sub>C</sub> в срезах тканей Этот эксперимент проводили для оценки с помощью иммуногистохимических методов реактивности L<sub>A</sub>H<sub>C</sub> с тканями, полученными из мыши, крысы, кролика и cynomolgus обезьян.

В этих опытах в качестве негативных контролей также использовали cF19 и человеческий IgG1 (hIgG1). Для иммуногистохимических анализов использовали следующие реагенты: комплекс стрептавидин-пероксидаза (фирма Vector Labs, Burlingame, CA), ДАБ (фирма Sigma Chemical Co., Сент-Луис, МО, США), гематоксилин Гарриса.

Для опытов использовали свежемороженные образцы следующих тканей, полученных из мыши, крысы, кролика и cynomolgus обезьян: головной мозг, печень, легкое, почка, желудок, панкреатическая железа, тонкий кишечник, тимус, кожа, мышца, сердце, селезенка, яичник, матка и семенники. В качестве положительного контроля в каждый опыт включали срезы нормальных человеческих панкреатических желез и образец карциномы молочной железы.

#### Иммуногистохимия

Использовали непрямой иммунопероксидазный метод, известный в данной области (Garin-Chesa P., Old L.J. и Rettig W.J. "Cell surface glycoprotein of reactive stromal fibroblasts as a potential antibody target in human epithelial cancers", Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 7235 (1990)), для анализа 5 свежемороженых срезов толщиной 5 мкм. Антитела L<sub>A</sub>H<sub>C</sub>, cF19 и hIgG1 (по 1 мкг/мл) биотинилировали согласно методу, известному в данной области, и выявляли с помощью комплекса стрептавидин-пероксидаза. ДАБ использовали в качестве субстрата для конечного продукта реакции. Срезы подвергали контрастному окрашиванию гематоксилином Гарриса и оценивали в отношении экспрессии антигена.

В экспериментах установлено, что изученные нормальные ткани не реагировали ни с L<sub>A</sub>H<sub>C</sub>, ни с cF19 (табл. 1).

В примененных в качестве положительного контроля человеческих панкреатических железах обнаружено, что L<sub>A</sub>H<sub>C</sub> и cF19 связываются с подгруппой эндокринных клеток в островках Лангерганса, как ранее установлено для F19. Кроме того, связывание L<sub>A</sub>H<sub>C</sub> и cF19 обнаружено в фибробластах стромы опухоли в образце карциномы молочной железы.

В этих экспериментах иммуногистохимические анализы нормальных тканей, полученных из мыши, крысы, кролика и cynomolgus обезьян, не позволили выявить какое-либо связывание ни L<sub>A</sub>H<sub>C</sub>, ни cF19.

Таблица 20. Связывание L<sub>A</sub>H<sub>C</sub> со срезами тканей животных по данным иммуногистохимии

Орган/Тип ткани	Мышь	Крыса	Кролик	Cynomolgus
головной мозг-кора	-	-	-	-
головного мозга -мозжечок	-	-	-	-
печень-гепатоциты	-	-	-	-
-воротная триада	-	-	-	-
легкое-бронхи	-	-	-	-
-альвеолы	-	-	-	-
почки- клубочки	-	-	-	-
-эпителий трубочек	-	-	-	-

Орган/Тип ткани	Мышь	Крыса	Кролик	Cynomolgus
желудок-железистый эпителий	-	-	-	-
-гладкие мышцы	-	-	-	-
поджелудочная железа- экзокринные ацинии	-	-	-	-
-экзокринные островки	-	-	-	-
кишечник-железистый эпителий	-	-	-	-
-гладкие мышцы	-	-	-	-
тимус-лимфоциты	-	-	-	-
кожа- кератиноциты	-	-	-	-
-потовые железы	-	-	-	-
-волосные фолликулы	-	-	-	-
скелетные мышцы	-	-	-	-
сердце	-	-	-	-
селезенка-лимфоциты	-	-	-	-
яичник-фолликулярный эпителий	-	-	-	-
-строма	-	-	-	-
матка-миометрий	-	-	-	-
-шейка матки	-	-	-	-
семенник-эпителий трубочек	н.и.	н.и.	н.и.	-
соединительная ткань	-	-	-	-

н.и.- не испытывали

Пример 10. Создание линий клеток, продуцирующих химерные и преобразованные моноклональные антитела к FAP.

Целью этого эксперимента была демонстрация получения стабильных линий клеток по изобретению, экспрессирующих  $L_AH_C$ ,  $L_AH_A$ ,  $L_BH_B$ ,  $L_BH_D$  и cF19 в CHO-клетках линии DG44. Получали стабильные линии клеток, трансфектированные гуманизированным или химерными антителами F19, и их идентичность подтверждали с помощью ПЦР-амплификации переменных областей тяжелой и легкой цепи с использованием в качестве матрицы геномной ДНК, полученной из каждого трансфектанта.

CHO-клетки линии DG44 поддерживали в бессывороточных условиях в среде SFM-II. Липофектин и бессывороточную среду SFM-II получали от фирмы Gibco/BRL. Генетицин и все рестриктазы получали от фирмы Boehringer Mannheim. Полимеразу Pfu получали от фирмы Stratagene.

ДНК для трансфекции выделяли из клеток E.coli, используя QiaFilter Maxi Cartridges (фирма Qiagen) согласно инструкциям поставщика. Все препараты ДНК оценивали с помощью расщепления рестриктазами. Последовательности переменных областей  $L_AH_C$  в соответствующих векторах подтверждали с использованием секвенатора типа ABI PRISM 310 (фирма Perkin-Elmer).

Дополнительная информация, касающаяся примененных векторов и последовательностей ДНК, может быть получена из приведенных ранее примеров.

#### Трансфекция CHO-клеток линии DG44

Клетки на логарифмической фазе роста высаживали в 6-луночные планшеты, содержащие 1 мл свежей среды SFM-II. CHO-клетки линии DG44 котрансфектировали плазмидами, кодирующими тяжелую и легкую цепи гуманизированной или химерной версий F19 с помощью трансфекции липосомами. Липосомы получали, используя 6 мкл реагента липофектина и 0,5 мкг каждого вектора (один для требуемой тяжелой цепи и один для легкой цепи), как описано для трансфекции с использованием LipofectAMINE, за исключением того, что для разбавления всех реагентов использовали среду SFM-II. Через 24 ч клетки разбавляли в соотношении 1:10, средой SFM-II, содержащей 300 мкг/мл генетицина.

После прохождения начальной фазы уничтожения клеток (10-14 дней) концентрацию генетицина уменьшали до 200 мкг/мл и добавляли метотрексат до получения конечной концентрации 5нМ. Через 10-14 дней концентрации метотрексата повышали до получения конечной концентрации 20нМ.

#### ПЦР-амплификация ДНК трансфектантов

$10^7$  CHO-клеток линии DG44 центрифугировали в микроцентрифуге Эппендорфа в течение непродолжительного периода времени при полной скорости, промывали однократно 3ФР и вновь один раз пеллетировали.

Геномную ДНК получали осаждением этанолом после лизиса ДСН и обработки дебриса протеиназой К.

Для амплификации переменной области либо тяжелой, либо легкой цепи с использованием в качестве матрицы геномной ДНК, применяли смесь, содержащую один из приведенных ниже праймеров, дНТФ, буфер и полимеразу Pfu. Полученные в результате ПЦР продукты расщепляли обработкой соответствующей рестриктазой и для подтверждения их идентичности анализировали с помощью электрофореза на агарозном геле.

Набор праймеров для легкой цепи:

5'-GAG ACA TTG TGA CCC AAT CTC-3' PKN 1690

5'-GAC AGT CAT AAA CTG CCA CAT CTT-3' PKN.1930.R

Набор праймеров для тяжелой цепи:

5'-TTG ACA CGT GTC TCG GGA AGC TT-3' PG 5863

5'-GGC GCA GAG GAT CCA CTC ACC T-3' PG 6332.R

Нерасщепленный ПЦР-продукт тяжелой цепи имел предсказанный размер 469 пар оснований, а ПЦР-продукт легкой цепи имел предсказанный размер 286 пар оснований. Проверку идентичности осуществляли обработкой рестриктазами BstEII (тяжелая цепь) или NlaIV (легкая цепь).

Линии CHO-клеток трансфектировали  $L_AH_C$ ,  $L_AH_A$ ,  $L_BH_B$ ,  $L_BH_D$ , а также cF19. Получали устойчивые к генетицину линии и эти клетки подвергали дальнейшей селекции по признаку устойчивости к метотрексату. После ПЦР-амплификации с последующим расщеплением рестриктазами ДНК легкой и тяжелой цепи получали ожидаемые полосы и подтверждали идентичность трансфектантов  $L_AH_C$ ,  $L_AH_A$ ,  $L_BH_B$  и  $L_BH_D$ .

Описанные клетки все время поддерживали в бессывороточных условиях и не обрабатывали продуктами животного происхождения, такими как трипсин.

Получали трансфектированные линии клеток-продуцентов, которые экспрессировали моноклональные антитела  $L_AH_C$ ,  $L_AH_A$ ,  $L_BH_B$ ,  $L_BH_D$  и cF19. Их идентичность подтверждали, используя ПЦР-амплификацию и расщепление рестриктазами полученных ПЦР-продуктов переменных областей как тяжелой, так и легкой цепи.

Пример 11. Экспрессия протеинов антитела в клетках яичника китайского хомячка линии DG44 и их очистка.

Целью данного эксперимента была экспрессия и очистка МАт  $L_AH_C$ ,  $L_AH_A$ ,  $L_BH_B$  и  $L_BH_D$  для получения их характеристик. Другие задачи включали применение количественного анализа ELISA для оценки концентраций антитела как образцах неочищенных сред, так и в очищенных образцах Ig, и определение с помощью этого анализа относительных уровней экспрессии различных гуманизированных конструкций F19.

Выращенные в бессывороточной среде CHO-клетки линии DG44 и метотрексат, имеющий чистоту, соответствующую фармакопее США (USP-чистоту) получали от фирмы Biotechnical Production Unit of the Dr. Karl Thomae GmbH, Biberach, Германия; оба продукта также имеются в продаже. Клетки все время поддерживали в бессывороточных условиях. Бессывороточную среду SFM-II получали от фирмы Gibco/BRL. Протеин-А агарозу получали от фирмы Pierce Chemical (Индианаполис, IN, США). Стандартные образцы человеческого IgG1 (каталожный номер I 3889), таблетки пара-нитрофенилфосфата (N 2640), бычий сывороточный альбумин (БСА) (A 7906) и специфическое конъюгированное с щелочной фосфатазой козье антитело к человеческой гамма-цепи получали от фирмы Jackson ImmunoResearch Laboratories (через фирму Stratech Scientific). TBS (забуференный трис физиологический раствор) содержал 150мМ NaCl, 50мМ трис, pH 7,5.

#### Условия культивирования клеток для экспрессии антител

Клетки культивировали и поддерживали в матрасах типа T-175 в бессывороточной среде SFM-II без перемешивания. Среда содержала 200 мкг/мл генетицина и 20нМ метотрексат и не содержала антибиотиков. Клетки пересевали разбавлением, они не склеивались и вырастали с образованием небольших кластеров. Когда клетки достигали стационарной фазы роста, среду собирали и центрифугировали для удаления клеток и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$  до употребления.

#### Очистка $L_AH_C$

Все стадии очистки проводили при  $4^{\circ}\text{C}$ . Колонку типа C10/10 (фирма Pharmacia Fine Chemicals) упаковывали протеин-А агарозой (объем гранул 3 мл). Колонку промывали TBS и однократно предварительно элюировали 0,1М Na-цитратным буфером, pH 3,0 для гарантии того, что никакого свободно связанного материала не осталось на колонке. Затем колонку немедленно повторно уравнивали TBS и хранили при  $4^{\circ}\text{C}$ . Искользованные супернатанты культуры подвергали оттаиванию и центрифугировали при 10000xg в течение 30 мин до проведения хроматографии на протеине-А для удаления дебриса и разбавляли равным объемом TBS. Этот продукт загружали в колонку с протеином-А со скоростью 0,5 мл/мин, используя перистальтический насос типа P-1 (фирма Pharmacia), и промывали TBS до тех пор пока абсорбция при 280 нм не становилась не выявляемой. Элюцию антитела начинали при 280 нм и собирали 1 мл фракции элюированного продукта в пробирки, содержащие достаточное для нейтрализации цитратного буфера количество трис-буфера, pH 9. Содержащие протеин фракции объединяли и концентрировали, используя устройство для фильтрации типа Amicon с фильтром YM-30 и диализ в противотоке ЗФР. Колонку немедленно регенерировали с помощью TBS. Анализы связывания протеина с красителем проводили с помощью набора для определения протеинов фирмы BioRad (Hercules, Калифорния) согласно инструкциям производителя, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

#### Анализ с помощью ELISA человеческого IgG (гамма-иммуноглобулин)

Планшеты для ELISA покрывали (сенсibilизировали) в течение ночи 100 мкл специфического конъюгированного с щелочной фосфатазой козьего антитела к человеческой гамма-цепи в концентрации 0,4 мг/мл в буфере для сенсibilизации поверхностей при  $4^{\circ}\text{C}$ . Сенсibilизирующее антитело удаляли и планшеты блокировали 2%-ным БСА в ЗФР в течение 2 ч. Все последующие стадии проводили при  $37^{\circ}\text{C}$ . Блокирующий буфер заменяли образцами антител или используемым в качестве стандарта человеческим IgG1, разбавленным в буфере для разведения, получали серийные разведения в объеме 200 мл и инкубировали в течение 1 ч. Отрицательные контроли включали буфер для разведения и/или культуральную среду нетрансфектированных клеток. Лунки промывали и добавляли 100 мкл специфического конъюгированного с щелочной фосфатазой козьего антитела к человеческой каппа-цепи, разбавленного в соотношении 1:5000, и инкубировали в течение 1 ч. Лунки промывали и добавляли 100 мкл буфера для проведения реакции и инкубировали 30 мин. Реакцию прекращали, добавляя 1М NaOH и определяли абсорбцию при 405 нм с помощью планшет-ридера для ELISA. Результаты анализировали с помощью итеративной аппроксимации четырехпараметрической кривой.

Анализ аминокислот проводили согласно методам, известным в данной области.

Получали моноклональное антитело  $L_AH_C$  и очищали до гомогенного состояния с помощью аффинной хроматографии на протеине-А. Анализ ELISA с использованием в качестве стандарта человеческого IgG1 позволил установить, что выход  $L_AH_C$  превышает 70%. По данным, полученным с помощью геле-электрофореза в ДСН-полиакриламидном геле, чистота продукта составляла более 90%. Репрезентативные данные об экспрессии и типичные выходы после очистки приведены в табл. 21.

Таблица 21. Данные об экспрессии и уровнях выхода протеинов антител к FAP в CHO-клетках

Антитело	Уровень экспрессии в неочищенных образцах среды (ELISA)	Выходы очищенного антитела	Повышение выхода (очищенного антитела)
L <sub>A</sub> H <sub>C</sub>	7-10 мг/л	~5-7 мг/л	500-700
L <sub>A</sub> H <sub>A</sub>	5-7 мг/л	~3-4 мг/л	300-400
L <sub>B</sub> H <sub>B</sub>	0,5-1 мг/л	~0,2-0,5 мг/л	20-50
L <sub>B</sub> H <sub>D</sub>	0,8-1,5 мг/л	~0,3-0,8 мг/л	30-60
химерное F19	~0,02 мг/л	< 0,01 мг/л	1

В этом эксперименте получены репрезентативные данные об экспрессии каждого антитела к FAP. Данные о выходе после аффинной хроматографии на протеин-А агарозе получены на основе оценок связывания протеина с красителем очищенного Ig с использованием БСА в качестве стандарта.

Пример 12. Связывание моноклонального антитела L<sub>A</sub>H<sub>C</sub> с выделенным рекомбинантным человеческим FAP.

Целью этого исследования была характеристика связывания L<sub>A</sub>H<sub>C</sub> с выделенным рекомбинантным человеческим FAP.

#### Оценка с помощью ELISA CD8-FAP

Планшеты для ELISA покрывали (сенсibilizировали) в течение ночи 100 мкл мышиного антикрысиного антитела (фирма Sigma Chemical, R0761), разбавленного в соотношении 1:2000 в буфере для сенсibilизации поверхностей при 4°C. Сенсibilизирующее антитело удаляли и планшеты блокировали 2%-ным БСА в ЗФР в течение 1 ч. Все последующие стадии проводили при комнатной температуре. Блокирующий буфер заменяли образцами 100 мл крысиного антитела к CD8 (фирма Pharmingen) в концентрации 1 мг/мл и инкубировали в течение 1 ч. Планшеты промывали и добавляли 100 мкл супернатанта культуры CD8-FAP (см. пример 14) (1:2 в ЗФР) и позволяли связываться в течение 1 ч. Планшеты промывали и добавляли образцы антитела (двукратные серийные разведения) в объеме 100 мкл и инкубировали в течение 1 ч. Отрицательные контроли включали человеческий IgG и/или культуральную среду нетрансфицированных клеток. Лунки промывали и добавляли 100 мкл мышиного антитела к человеческому IgG1, конъюгированного с пероксидазой из хрена (HRP) (фирма Zymed, 05-3320), разбавленного в соотношении 1:500 буфером для разведения, и инкубировали в течение 1 ч. Лунки промывали и добавляли 100 мкл субстрата для HRP (азинобис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоная) кислота, фирма Sigma Chemical, A9941) и инкубировали 60 мин. Реакцию прекращали, добавляя 1M NaOH и определяли абсорбцию при 405/490 нм с помощью планшет-ридера для ELISA. Результаты анализировали с помощью итеративной аппроксимации четырехпараметрической кривой.

В альтернативном варианте планшеты непосредственно сенсibilizировали cF19. Согласно описанному выше способу давали связаться с этими планшетами FAP (рекомбинантный человеческий FAP, см. пример 13) и затем добавляли биотинилированное L<sub>A</sub>H<sub>C</sub> (~1 мкг/мл). Связывание антитела определяли с помощью конъюгата HRP-стрептавидин, как описано выше.

#### Солюбилизация связанного с мембраной человеческого FAP

Экспрессирующие FAP клетки линии 293FAP 1/2 или контрольные клетки линии 293 промывали ЗФР и лизировали с помощью 1%-ного тритона X-114 в забуференном трис физиологическом растворе. Ядра и дебрис удаляли центрифугированием при 10000xg. Супернатант разделили на фазы (Estreicher A., Wohlend A., Belin D., Scheuning W.D., Vasalli J.D., "Characterization of cellular binding site for the urokinase-type plasminogen activator", J. Biol. Chem., 264: 1180-1189 (1989)) с целью обогащения мембранных протеинов. Собирали полученную с помощью детергента фазу и разбавляли буфером, содержащим 1%-ный эмпиген BB (фирма Calbiochem) для предотвращения повторной агрегации тритона X-114. Этот продукт подвергали хроматографии на конканавалин-А агарозе (Retting W.J., Garin-Chesa P., Healey J.H., Su S.L., Ozer H.L., Schwab M., Albino A. P., Old L.J., "Regulation and heteromeric structure of fibroblast activation protein in normal and transformed cells of mesenchymal and neuroectodermal origin", Cancer Res. 53: 3327-3335 (1993)).

#### Биотинилированное L<sub>A</sub>H<sub>C</sub>

L<sub>A</sub>H<sub>C</sub> (1-2 мг) подвергали диализу в противотоке 50мМ бикарбонатного буфера и биотинилировали с помощью 10-кратного молярного избытка сульфосукцинимидил-6-биотинамидогексаноата (NHS-LC-биотин) (фирма Pierce Chemical, Rockford, Иллинойс, США) в течение 2 ч при комнатной температуре. Непрореагировавший продукт удаляли путем повторного микродиализа в микроконцентраторе.

#### Кратковременные трансфекции

Клетки линии COS-7 (Американская коллекция типовых культур тканей, регистрационный номер CRL-1651) котрансфицировали электропорацией векторами, кодирующими тяжелую и легкую цепь L<sub>A</sub>H<sub>C</sub>.

Моноклональное антитело к CD 8 иммобилизовывали на титрационных микропланшетах. CD8-FAP из среды культуры клеток насекомых, зараженных бакуловирусами, CD8-FAP, давали связаться с этими

планшетами. Использованную среду культур клеток COS-7, кратковременно трансфектированных двумя различными векторами, кодирующими L<sub>A</sub>H<sub>C</sub>, серийно разбавляли и добавляли в лунки, содержащие иммобилизованный CD8-FAP. L<sub>A</sub>H<sub>C</sub> связывалось с выделенным иммобилизованным протеином CD8-FAP (фиг. 35). В супернатантах мнимо трансфектированных культур клеток COS-7 не выявлено связывания.

Рекомбинантный связанный с мембраной FAP, полученный с помощью детергента из экстрактов клеток линии 293FAP 1/2 или из контрольных экстрактов, серийно разводили и иммобилизовывали с помощью химерного моноклонального антитела F19, связанного с титрационными микропланшетами. Биотинилированное L<sub>A</sub>H<sub>C</sub> связывалось рекомбинантным человеческим FAP, иммобилизованным с помощью cF19 (фиг. 36) в зависимости от концентрации.

Антитело L<sub>A</sub>H<sub>C</sub> распознавало выделенный иммобилизованный рекомбинантный человеческий FAP, несущий эпитоп мышиного F19. Антитело L<sub>A</sub>H<sub>C</sub> связывалось как с CD8-FAP, продуцируемыми клетками насекомых, так и с протеином FAP, продуцируемым клетками линии 293FAP 1/2.

Супернатанты культур из COS-7-клеток, трансфектированных либо кодирующими L<sub>A</sub>H<sub>C</sub> векторами тяжелой и легкой цепи, либо векторами без ДНК (контроль), собирали через 3 дня после трансфекции. CD8-FAP иммобилизовывали с помощью антитела к CD8, как описано выше. Серийным разведениям супернатантов COS-7-клеток давали связываться с иммобилизованным CD8-FAP и затем выявляли с помощью антитела к человеческому IgG1, конъюгированному с HRP. Готовили серийные разведения полученных с помощью детергента экстрактов экспрессирующей FAP клетки линии 293FAP 1/2 или контрольных клеток линии 293 и добавляли в сенсibilизированные cF19 титрационные микропланшеты. Добавляли биотинилированное L<sub>A</sub>H<sub>C</sub> и связывание биотинилированного L<sub>A</sub>H<sub>C</sub> определяли с помощью конъюгата HRP-стрептавидин.

Пример 13. Характеристика клеток фибросаркомы линии HT-1080 и человеческих эмбриональных клеток почки, трансфектированных кДНК человеческого FAP.

Протеин активации фибробласта (FAP) представляет собой связанный с мембраной протеин, несущий эпитоп F19, который экспрессируется на поверхности фибробластов стромы опухоли. С целью получения характеристик моноклональных антител к FAP получали линии клеток, экспрессирующие рекомбинантный протеин FAP, и соответствующих контрольных клеток, лишенных FAP.

Использовали клетки линии HT-1080 (регистрационный номер CCL 121) и человеческие эмбриональные клетки почки линии 293 (регистрационный номер CRL 1573), полученные из Американской коллекции типовых культур тканей (Мэриленд, США). Трансфектам получали от фирмы Promega (Мэдисон, WI). Генетицин и все рестриктазы получали от фирмы Boehringer Mannheim. ДНК для трансфекций выделяли из клеток E.coli, используя QiaFilter Maxi Cartridges (фирма Qiagen) согласно инструкциям поставщика. Все препараты ДНК оценивали с помощью расщепления рестриктазами. Последовательности векторов подтверждали с использованием секвенатора типа ABI PRISM 310 (фирма Perkin-Elmer).

Дополнительную информацию, касающуюся векторов и примененных последовательностей ДНК, можно обнаружить у Scanlan M.J., Raj B.K., Calvo B., Garin-Chesa P., Sanz-Moncasi M.P., Healey J.H., Old L.J., Retting W.J. "Molecular cloning of fibroblast activation protein alpha, a member of serine protease family selectively expressed in stromal fibroblasts of epithelial cancers", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 10832-10836 (1992)). Последовательность кДНК FAP депонирована в Genbank (регистрационный номер HS09287).

#### Культура клеток и иммуноанализы

Клетки HT-1080 трансфектировали 1 мг ДНК, используя трансфектам согласно инструкциям производителя. Человеческие эмбриональные клетки почки линии 293 трансфектировали 10 мг ДНК с помощью фосфата кальция (Brann M.R., Byckley N.J., Jones SVP, Bonner T.I., "Expression of cloned muscarinic receptor in A9 L cells", Mol. Pharmacol., 32: 450-455 (1987)). Через 24 ч клетки разбавляли из расчета 1:10 свежей средой, содержащей 200 мг/мл генетицина. Колонии собирали и оценивали с помощью иммунофлуоресценции в отношении экспрессии FAP, как описано у Rettig W.J., Garin-Chesa P., Beresford H.R., Oettgen H.F., Melamed M.R., Old L.J. "Cell surface glycoprotein of human sarcomas: different expression in normal and malignant tissues and cultured cell", Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 3110-3114 (1988)).

Иммунопреципитацию с cF19 проводили с метаболически мечеными клетками, как описано у Rettig W.J., Garin-Chesa P., Healey J.H., Su S.L., Ozer H.L., Schwab M., Albino A.P., Old L.J., "Regulation and heteromeric structure of fibroblast activation protein in normal and transformed cells of mesenchymal and neuroectodermal origin", Cancer Res. 53: 3327-3335 (1993)).

Клетки линий HT-1080 и 293 тестировали в отношении экспрессии антигена FAP с помощью иммунофлуоресцентных анализов с использованием антител к FAP и было установлено, что они являются антигеннегативными клетками. Трансфекция этих клеток вектором FAP. 38 привела к получению устойчивых к генетицину клонов. Выделенные клоны собирали и анализировали в отношении экспрессии FAP с помощью иммунофлуоресценции. Выявлено два клон клеток, обозначенные как клон 33 HT-1080FAP и 293FAP 1/2, которые экспрессируют связанный с клеточной поверхностью протеин FAP, что установлено с помощью антитела cF19. Окрашивание не обладающих проницаемостью клеток клон 33 HT-1080FAP и 293FAP 1/2 антителом cF19 подтвердило локализацию на клеточной поверхности протеина FAP.

Иммунопреципитация радиоактивно меченного протеина FAP с помощью cF19 из экстрактов меченных с помощью  $^{35}\text{S}$ -метионина клеток клона 33 HT-1080FAP и 293FAP I/2 привела к появлению полосы 93 кДа, выявленной после автордиографии. Эта полоса не выявлялась в иммунопреципитатах в экстрактах родительских клеток линии HT-1080 или 293.

Две стабильно трансфектированные линии клеток, клон 33 HT-1080FAP и 293FAP I/2, экспрессируют FAP на поверхности клеток, что установлено с помощью иммунологических анализов с Мат к FAP. Ни родительские клетки HT-1080, ни родительские клетки 293 не экспрессируют обнаруживаемые уровни FAP.

Пример 14. Получение и характеристики слитого протеина CD8-FAP.

Растворимую форму человеческого FAP (протеин активации фибробласта) в форме слитого протеина CD8-FAP получали в клетках насекомых с целью характеристики  $\text{L}_\text{A}\text{H}_\text{C}$ -содержащего антигенсвязывающего участка Мат к FAP. Для осуществления секреции протеина и для создания дополнительной эпитопной метки был выбран мышинный CD8.

кДНК, кодирующую внеклеточный домен CD8, состоящий из первых 189 аминокислот мышинного CD8 $\alpha$  (Genbank M12825), связывали с кДНК внеклеточного домена FAP (аминокислоты 27-760), в основном согласно методу, описанному Lane с соавторами (Lane P., Bocker T., Hubele S., Padovan E., Lazavacchia A., McConnell, "Soluble CD40 ligand can replace the normal T cell-derived CD40 ligand signal to B cells in T cell-dependent activation", J. Exp. Med. 177: 1209-1213 (1993)), используя стандартные протоколы ПЦР.

Аутентичность всех клонов подтверждали с помощью секвенирования ДНК. Полученную ДНК встраивали в вектор pV11393 (фирма Invitrogen) и трансфекцию клеток линии Sf9 (фирма Invitrogen) этим вектором и амплификацию полученного рекомбинантного бакуловируса осуществляли согласно известным методам (Baculovirus Expression Vectors. A Laboratory Manual. O'Reilly D.R., Miller L.K., Luckow V.A. (ред.), Qxford University Press: New York, 1994). Используемую среду клеток линии High Five<sup>TM</sup> (фирма Invitrogen), зараженную рекомбинантным бакуловирусом CD8-FAP в течение 4 дней, собирали и очищали ультрацентрифугированием.

ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ) CD8-FAP описан выше (пример 12).

Зараженные вирусом CD8-FAP культуры клеток насекомых, секретирующие в среду слитый протеин, который несет эпитоп F19, распознавали с помощью антитела к FAP (фиг. 1). Ни сама среда для культуры клеток, ни среда клеток насекомых, зараженных слитым протеином CD8-CD40L, ни связывались антителом к FAP.

Растворимый протеин CD8-FAP, который несет эпитоп F19, секретировался в среду, содержащую зараженные культуры клеток насекомых. Супернатанты культур клеток, зараженных контрольной конструкцией, не содержали антиген, несущий эпитоп F19.

Растворимую форму FAP, т.е. CD8-FAP, получали в клетках насекомых, и было установлено, что CD8-FAP несет эпитоп распознаваемый cF19.

Супернатанты клеток насекомых, зараженных рекомбинантным бакуловирусом, кодирующим либо слитый протеин CD8-FAP, либо CD8-CD40L, собирали через 4 дня после заражения. Среду для культуры клеток без клеток использовали в качестве дополнительного контроля (среда). Серийные разведения этих продуктов добавляли в сенсibilизированные с помощью антитела к CD8 микротитрационные планшеты и давали произойти связыванию. Затем добавляли cF19 (1 мг/мл) и давали произойти связыванию. Связывание cF19 определяли с помощью антитела к человеческому IgG1, конъюгированному с пероксидазой из хрена.



## Перечень последовательностей

&lt;110&gt; Boehringer Ingelheim International GmbH

<120> Специфическое в отношении FAP $\alpha$ -(протеин альфа активации фибробласта) антитело с повышенной продуктивностью

&lt;130&gt; 12-196-РСТ

&lt;140&gt; РСТ/EP99/02711

&lt;141&gt; 1999-04-22

&lt;150&gt; EP 98107925.4

&lt;151&gt; 1998-04-30

&lt;160&gt; 101

&lt;170&gt; PatentIn ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 339

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

```

gacattgtga tgacccaatc tccagactct ttggctgtgt ctctagggga gagggccacc 60
atcaactgca agtccagtca gaggccttta tattctagaa atcaaaagaa ctacttggcc 120
tggtatcagc agaaaccagg acagccaccc aaactcctca tcttttgggc tagcactagg 180
gaatctgggg tacctgatag gttcagtggc agtggggttg ggacagactt caccctcacc 240
attagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttttagctat 300
ccgctcacgt tcggacaagg gaccaaggtg gaaataaaa 339

```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 113

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

```

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

```

Lys

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 339

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Homo sapiens

<400> 3  
gacattgtga tgaccaatc tccagactct ttggctgtgt ctctagggga gagggccacc 60  
atcaactgca agtccagtca gagcctttta tattctagaa atcaaaagaa ctacttggcc 120  
tggttccagc agaaaccagg acagccaccc aaactcctca tcttttgggc tagcactagg 180  
gaatctgggg tacctgatag gttcagtggc agtggggttg ggacagactt caccctcacc 240  
attagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttatgact gtcaacaata ttttagctat 300  
ccgctcacgt tcggacaagg gaccaaggtg gaaataaaa 339

<210> 4  
<211> 113  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 4  
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
1 5 10 15  
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser  
20 25 30  
Arg Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
35 40 45  
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Phe Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
50 55 60  
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Phe Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
65 70 75 80  
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Asp Cys Gln Gln  
85 90 95  
Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile  
100 105 110

Lys

<210> 5  
<211> 339  
<212> ДНК  
<213> Homo sapiens

<400> 5  
gacattgtga tgaccaatc tccagactct ttggctgtgt ctctagggga gagggccacc 60  
atcaactgca agtccagtca gagcctttta tattctagaa atcaaaagaa ctacttggcc 120  
tggtatcagc agaaaccagg acagccaccc aaactcctca tctattgggc tagcactagg 180  
gaatctgggg tacctgatag gttcagtggc agtggggttg ggacagactt caccctcacc 240  
attagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttttagctat 300  
ccgctcacgt tcggacaagg gaccaaggtg gaaataaaa 339

<210> 6  
<211> 113  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 6  
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
1 5 10 15  
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser  
20 25 30  
Arg Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Phe Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 65 70 75 80

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

Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile  
 100 105 110

Lys

<210> 7  
 <211> 372  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<400> 7  
 caggtgcaac tagtgcagtc cggcgccgaa gtgaagaaac ccggtgcttc cgtgaaagtc 60  
 agctgtaaaa ctagtagata caccttcact gaatacacca tacactgggt tagacaggcc 120  
 cctggccaaa ggctggagtg gataggaggt attaataccta acaatgggtat tcctaactac 180  
 aaccagaagt tcaagggccg ggccaccttg accgtaggca agtctgccag caccgcctac 240  
 atggaactgt ccagcctgcg ctccgaggac actgcagtct actactgcgc cagaagaaga 300  
 atgcctatg gttacgacga gggccatgct atggactact ggggtcaagg aacccttgct 360  
 accgtctcct ca 372

<210> 8  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 8  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Arg Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr  
 20 25 30

Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Ile Pro Asn Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60

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

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

Ala Arg Arg Arg Ile Ala Tyr Gly Tyr Asp Glu Gly His Ala Met Asp  
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 9  
 <211> 372  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<400> 9  
 caggtgcaac tagtgcagtc cggcgccgaa gtgaagaaac ccggtgcttc cgtgaaagtc 60  
 agctgtaaaa ctagtagata caccttcact gaatacacca tacactgggt tagacaggcc 120  
 cctggccaaa ggctggagtg gataggaggt attaataccta acaatgggtat tcctaactac 180  
 aaccagaagt tcaagggccg ggccaccttg accgtaggca agtctgccag caccgcctac 240  
 atggaactgt ccagcctgcg ctccgaggac actgcagtct acttctgcgc cagaagaaga 300  
 atgcctatg gttacgacga gggccatgct atggactact ggggtcaagg aacccttgct 360  
 accgtctcct ca 372

<210> 10  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

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

<210> 11  
 <211> 372  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<400> 11  
 caggtgcaac tagtgcagtc cggcgccgaa gtgaagaaac ccggtgcttc cgtgaaagtc 60  
 agctgtaaaa ctagtagata caccttcact gaatacacca tacactgggt tagacaggcc 120  
 cctggccaaa ggctggagtg gataggaggt attaataccta acaatgggtat tcctaactac 180  
 aaccagaagt tcaagggccg ggccaccttg accgtaggca cctctgccag caccgcctac 240  
 atggaactgt ccagcctgcg ctccgaggac actgcagtct actactgcgc cagaagaaga 300  
 atgcctatg gttacgacga gggccatgct atggactact ggggtcaagg aacccttgct 360  
 accgtctcct ca 372

<210> 12  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 12  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Arg Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr  
 20 25 30

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

<210> 13  
 <211> 372  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<400> 13  
 caggtgcaac tagtgcaagtc cggcgccgaa gtgaagaaac ccggtgcttc cgtgaaagtc 60  
 agctgtaaaa ctagtagata caccttcact gaatacacca tacactgggt tagacaggcc 120  
 cctggccaaa ggctggagtg gataggaggt attaatccta acaatgggtat tcctaactac 180  
 aaccagaagt tcaagggccg ggtcaccatc accgtagaca cctctgccag caccgcctac 240  
 atggaactgt ccagcctgcg ctccgaggac actgcagtct acttctgcgc cagaagaaga 300  
 atgcctatg gttacgacga gggccatgct atggactact ggggtcaagg aacccttgtc 360  
 accgtctcct ca 372

<210> 14  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

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

<210> 15  
 <211> 372

<212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<400> 15  
 caggtgcaac tagtgagtc cggcgccgaa gtgaagaaac ccggtgcttc cgtgaaagtc 60  
 agctgtaaaa ctagtggata caccttcact gaatacacca tacactgggt tagacaggcc 120  
 cctggccaaa ggctggagtg gataggaggt attaatccta acaatgggtat tcctaactac 180  
 aaccagaagt tcaagggccg ggtcaccatc accgtagaca cctctgccag caccgcctac 240  
 atggaactgt ccagcctgcg ctccgaggac actgcagtct actactgcgc cagaagaaga 300  
 atcgcttatg gttacgacga gggccatgct atggactact ggggtcaagg aacccttgtc 360  
 accgtctcct ca 372

<210> 16  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 16  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr  
 20 25 30  
 Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Ile Pro Asn Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Arg Arg Ile Ala Tyr Gly Tyr Asp Glu Gly His Ala Met Asp  
 100 105 110  
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 17  
 <211> 220  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: химерная вариабельная  
 область легкой цепи

<400> 17  
 Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser  
 20 25 30  
 Arg Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 35 40 45  
 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Phe Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 50 55 60

```

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Phe Gly Thr Asp Phe Asn Leu Thr
 65          70          75          80
Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Asp Cys Gln Gln
          85          90          95
Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
          100          105          110
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
          115          120          125
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
          130          135          140
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
          145          150          155          160
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
          165          170          175
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
          180          185          190
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
          195          200          205
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          210          215          220

```

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 453

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Описание искусственной последовательности: химерная вариабельная область тяжелой цепи

&lt;400&gt; 18

```

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

```

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val  
 145 150 155 160  
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe  
 165 170 175  
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val  
 180 185 190  
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val  
 195 200 205  
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys  
 210 215 220  
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu  
 225 230 235 240  
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 245 250 255  
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 260 265 270  
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 275 280 285  
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser  
 290 295 300  
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
 305 310 315 320  
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
 325 330 335  
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 340 345 350  
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln  
 355 360 365  
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 370 375 380  
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 385 390 395 400  
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
 405 410 415  
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 420 425 430  
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 435 440 445  
 Leu Ser Pro Gly Lys  
 450

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 321

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Homo sapiens



<400> 19  
 cgtactgtgg ctgcaccatc tgtcttcac ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60  
 ggaactgcct ctgttggtgt cctgctgaat aacttctatc ccagagagggc caaagtacag 120  
 tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180  
 agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240  
 aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag 300  
 agcttcaaca ggggagagtg t 321

<210> 20  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

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

<210> 21  
 <211> 990  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<400> 21  
 gcctccacca agggcccac ttgtcttccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60  
 ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgtcg 120  
 tggaactcag gcgccctgac cagcggcggt cacaccttcc cggtgtgtct acagtctctca 180  
 ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240  
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300  
 aaatcttgtg acaaaaactca cacatgccc ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 360  
 ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct 420  
 gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc caggaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480  
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgaggaga gcagtacaac 540  
 agcacgtacc ggggtggtcag cgtcctcacc gtccctgacc aggactgggt gaatggcaag 600  
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660  
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggaggag 720  
 atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780  
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840  
 ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900  
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 960  
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 990

<210> 22  
 <211> 330  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

&lt;400&gt; 22

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

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 427

<212> ДНК  
<213> Homo sapiens

<400> 23  
aagcttgccg ccaccatgga ttcacaggcc caggttctta tgttactgcc gctatgggta 60  
tctggtacct gtggggacat tgtgatgtca cagtctccat cctccctagc tgtgtcagtt 120  
ggagagaagg ttactatgag ctgcaagtcc agtcagagcc ttttatatag tcgtaatcaa 180  
aagaactact tggcctgggt ccagcagaag ccagggcagt ctcctaaact gctgattttc 240  
tgggcatcca ctagggaatc tgggggtccct gatcgcttca caggcagtgg atttgggacg 300  
gatttcaatc tcaccatcag cagtgtgcag gctgaggacc tggcagtta tgactgtcag 360  
caatatttta gctatccgct cacgttcggt gctgggacca agctggagct gaaacgtgag 420  
tggatcc 427

<210> 24  
<211> 133  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

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

<210> 25  
<211> 457  
<212> ДНК  
<213> Homo sapiens

<400> 25  
aagcttgccg ccaccatggg atggagctgg gtctttctct ttctcctgtc aggaactgca 60  
ggtgtcctct ctgaggtcca gctgcaacag tctggacctg agctggtgaa gcttggggct 120  
tcagtaaaga tgtcctgcaa gacttctaga tacacattca ctgaatacac catacactgg 180  
gtgagacaga gccatggaaa gagccttgag tggattggag gtattaatcc taacaatggt 240  
attcctaact acaaccagaa gttcaagggc agggccacat tgactgtagg caagtcctcc 300  
agcaccgcct acatggagct ccgcagcctg acatctgagg attctgcggt ctatttctgt 360  
gcaagaagaa gaatcgcccta tggttacgac gagggccatg ctatggacta ctgggggtcaa 420  
ggaacctcag tcaccgtctc ctcagggtgag tggatcc 457

<210> 26  
<211> 143  
<212> PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 26

Met Gly Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly  
 1 5 10 15

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys  
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Arg Tyr Thr Phe  
 35 40 45

Thr Glu Tyr Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys Ser Leu  
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Ile Pro Asn Tyr Asn  
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Gly Lys Ser Ser Ser  
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val  
 100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Arg Ile Ala Tyr Gly Tyr Asp Glu Gly His  
 115 120 125

Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 130 135 140

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 8068

&lt;212&gt; DHK

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 27

gaattccagc acactggcgg ccgttactag ttattaatag taatcaatta cggggtcatt 60  
 agttcatagc ccatatatgg agttccgcgt tacataactt acggtaaatg gcccgccctgg 120  
 ctgaccgccc aacgaccccc gccattgac gtcaataatg acgtatgttc ccatagtaaac 180  
 gccaataggg actttccatt gacgtcaatg ggtggagtat ttacggtaaa ctgcccactt 240  
 ggcagtacat caagtgtatc atatgccaaag tacgccccct attgacgtca atgacggtaa 300  
 atggcccgcc tggcattatg cccagtacat gaccttatgg gactttccta cttggcagta 360  
 catctacgta ttagtcatcg ctattaccat ggtgatgcgg ttttggcagt acatcaatgg 420  
 gcgtggatag cggtttgact cacggggatt tccaagtctc caccgccattg acgtcaatgg 480  
 gagtttgttt tggcaccaaaa atcaacggga ctttccaaaa tgctgtaaca actccgcccc 540  
 attgacgcaa atgggcggga ggctgtacg gtgggaggtc tatataagca gagctcgttt 600  
 agtgaaccgt cagatcgctt ggagacgcca tccacgctgt tttgacctcc atagaagaca 660  
 ccgggaccga tccagcctcc gcggccggga acggtgcatt ggaacgcgga tccccgtgc 720  
 caagagtgc gtaagtaccg cctatagagt ctataggccc acccccttgg cttcttatgc 780  
 atgctatact gtttttggct tgggggtctat acacccccgc ttcctcatgt tatagggtgat 840  
 ggtatagctt agcctatagg tgtgggttat tgaccattat tgaccactcc cctattgggtg 900  
 acgatacttt ccattactaa tccataacat ggctctttgc cacaactctc tttattggct 960  
 atatgccaat acactgtcct tcagagactg acacggactc tgtattttta caggatgggg 1020  
 tctcatttat tatttataaa ttcacatata caacaccacc gtccccagtg cccgcagttt 1080  
 ttattaaaca taacgtggga tctccacgcg aatctcgggt acgtgttccg gacatgggct 1140  
 cttctccggt agcggcgagg cttctacatc cgagccctgc tcccatgcct ccagcgactc 1200  
 atggctcgctc ggcagctcct tgctcctaac agtggaggcc agacttaggc acagcacgat 1260  
 gccaccacc accagtgtgc cgcacaaggc cgtggcggtg gggatgtgt ctgaaaatga 1320  
 gctcggggag cgggcttgca ccgctgacgc atttggaaga cttaaggcag cggcagaaga 1380  
 agatgcaggc agctgagttg ttgtgttctg ataagagtca gaggtaactc ccgttgcggt 1440  
 gctgttaacg gtggagggca gtgtagtctg agcagtactc gttgctgccg cgcgcgccac 1500  
 cagacataat agctgacaga ctaacagact gttcctttcc atgggtcttt tctgcagtca 1560  
 ccgtccttga cacgcgtctc gggaagcttg ccgccaccat ggattcacag gccaggttc 1620  
 ttatgttact gccgctatgg gtatctggta cctgtgggga cattgtgatg tcacagtctc 1680  
 catcctccct agctgtgtca gttggagaga aggttactat gagctgcaag tccagtcaga 1740  
 gcctttttata ttctagaaat caaaagaact acttggcctg gttccagcag aagccagggc 1800

agtctcctaa	actgctgatt	ttctgggcat	ccactagggg	atctggggtc	cctgatcgct	1860
tcacaggcag	tggatttggg	acggatttca	atctcaccat	cagcagtggt	caggctgagg	1920
acctggcagt	ttatgactgt	cagcaatatt	ttagctatcc	gctcacgttc	ggtgctggga	1980
ccaagctgga	gctgaaacgt	gagtggatcc	atctgggata	agcatgctgt	tttctgtctg	2040
tccctaacat	gccctgtgat	tatgcgcaaa	caacacaccc	aagggcagaa	ctttgttact	2100
taaacaccat	cctgtttgct	tctttcctca	ggaactgtgg	ctgcaccatc	tgtcttcac	2160
ttcccggcat	ctgatgagca	gttgaaatct	ggaactgcct	ctgttggtgt	cctgctgaat	2220
aacttctatc	ccagagaggc	caaagtacag	tgggaaggtg	ataacgccct	ccaatcgggt	2280
aactcccagg	agagtgtcac	agagcaggac	agcaaggaca	gcacctacag	cctcagcagc	2340
accttgacgc	tgagcaaagc	agactacgag	aaacacaaaag	tctacgcctg	cgaagtcacc	2400
catcagggcc	tgagctcgcc	cgtcacaaaag	agcttcaaca	ggggagagt	ttagagggag	2460
aagtgcccc	acctgctcct	cagttccagc	ctgaccccc	cccatccttt	ggcctctgac	2520
cctttttcca	caggggacct	acccctattg	cggtcctcca	gctcatcttt	cacctcaccc	2580
ccctcctcct	ccttggtctt	aattatgcta	atgttgagg	agaatgaata	aataaagtga	2640
atctttgcac	ctgtggtgga	tctaataaaa	gatatttatt	ttcattagat	atgtgtgttg	2700
gttttttgtg	tgagtgccct	ctatctggag	gccaggtagg	gctggccttg	ggggaggggg	2760
aggccagaat	gactccaaga	gctacaggaa	ggcaggtcag	agacccccct	ggacaaacag	2820
tggctggagt	ctgcaccata	acacacagag	aacaggggag	tgagctggaa	atttctgagc	2880
gaattcctga	agacgaaagg	gcctcgtgat	acgcctattt	ttataggtta	atgtcatgat	2940
aataatggtt	tcttagacgt	caggtggcac	ttttcgggga	aatgtgcgcg	gaacccctat	3000
ttgtttatct	ttctaataac	attcaaatat	gtatccgctc	atgagacaat	aacctgtata	3060
aatgcttcaa	taatattgaa	aaaggaagag	tatgagtatt	caacatttcc	gtgtcgccct	3120
tattcccttt	tttgcgcat	tttgccctcc	tgtttttgct	caccagaaaa	cgctggtgaa	3180
agtaaaagat	gttgaagatc	agttgggtgc	acgagtgggt	tacatcgaac	tggatctcaa	3240
cagcggtaag	atccttgaga	gttttcgccc	cgaagaacgt	tttccaatga	tgagcacttt	3300
taaagtctct	ctatgtggcg	cggtattatc	ccgtgttgac	gccgggcaag	agcaactcgg	3360
tcgccgcata	cactattctc	agaatgactt	ggttgagtac	tcaccagtca	cagaaaagca	3420
tcttacggat	ggcatgacag	taagagaatt	atgcagtgtc	gccataacca	tgagtataaa	3480
cactgcggcc	aacttacttc	tgacaacgat	cggaggaccg	aaggagctaa	ccgctttttt	3540
gcacaacatg	ggggatcatg	taactcgcct	tgatcgttgg	gaaccggagc	tgaatgaagc	3600
cataccaaac	cagcagcgtg	acaccacgat	gcctgcagca	atggcaacaa	cgttgcgcaa	3660
actattaact	ggcgaactac	ttactctagc	ttcccggcaa	caattaatag	actggatgga	3720
ggcggataaa	gttgaggagc	cacttctgct	ctcgccctct	ccggctggct	ggtttattgc	3780
tgataaatct	ggagccgggt	agcgtgggtc	tcgcggtatc	attgcagcac	tgggggccaga	3840
tggtaaagcc	tcccgatctg	tagttatcta	cacgacgggg	agtcaggcaa	ctatggatga	3900
acgaaaataga	cagatcgctg	agataggtgc	ctcactgatt	aagcatttgt	aactgtcaga	3960
ccaagtttac	tcataatata	tttagattga	tttaaaactt	catttttaat	ttaaaaggat	4020
ctaggtgaag	atcctttttg	ataatctcat	gaccaaatac	ccttaacgtg	agttttctgt	4080
ccactgagcg	tcagaccccc	tagaaaagat	caaaggatct	tcttgagatc	ctttttttct	4140
gcgcgtaatc	tgctgcttgc	aaacaaaaaa	accaccgcta	ccagcgggtg	tttgtttgcc	4200
ggatcaagag	ctaccaactc	tttttcgaaa	ggtaactggc	ttcagcagag	cgcatatacc	4260
aaataactgtc	cttctagtgt	agccgtagtt	agccaccac	ttcaagaact	ctgtagcacc	4320
gcctacatac	ctcgtctctg	taatcctggt	accagtggct	gctgccagt	gcgataagtc	4380
gtgtcttacc	gggttgga	caagacgata	gttaccggat	aaggcgcagc	ggtcgggctg	4440
aacggggggt	tcgtgcacac	agcccagctt	ggagcgaacg	acctacaccg	aactgagata	4500
cctacagcgt	gagctatgag	aaagcgccac	gcttcccga	gggagaaagg	cggacaggta	4560
tcggtaagc	ggcagggtcg	gaacaggaga	gcgcacgagg	gagcttccag	ggggaaacgc	4620
ctggtatctt	tatagtcctg	tcgggtttcg	ccacctctga	cttgagcgtc	gattttttgt	4680
atgctcgtca	ggggggcgga	gcctatggaa	aaacgccagc	aacgcggcct	ttttacggtt	4740
cctggccttt	tgctggcctt	ttgctcacat	gttctttcct	gcgttatccc	ctgattctgt	4800
ggataaccgt	attaccgcct	ttgagtgage	tgataccgct	cgccgcagcc	gaacgaccga	4860
gcgcagcgag	tcagtgage	aggaagcgga	agagcgcctg	atgcggtatt	ttctccttac	4920
gcctctgtgc	ggtatttcac	accgcatatg	gtgcactctc	agtacaatct	gctctgtatg	4980
cgcatagtta	agccagtata	cactccgcta	tcgctacgtg	actgggtcat	ggctgcgccc	5040
cgacacccgc	caacacccgc	tgacgcgccc	tgacgggctt	gtctgctccc	ggcatccgct	5100
tacagacaag	ctgtgaccgt	ctccgggagc	tgcatgtgtc	agaggttttc	accgtcatca	5160
ccgaaacgcg	cgaggcagct	gtggaatgtg	tgtcagttag	ggtgtggaaa	gtccccagcc	5220
tccccagcag	gcagaagtat	gcaaagcatg	catctcaatt	agtcagcaac	caggtctccc	5280
agcaggcaga	agtatgcaaa	gcatgcatct	caattagtc	gcaaccatag	tcccgccct	5340
aactccgccc	atcccgcccc	taactccgcc	cagttccgcc	catttctcgc	cccatggctg	5400
actaatTTTT	tttattttatg	cagaggccga	ggccgcctcg	gcctctgagc	tattccagaa	5460
gtagttagga	ggcttttttg	gaggcctagg	cttttgcaaa	aagctagctt	cacgctgccg	5520
caagcactca	gggcgcaagg	gctgctaaag	gaagcggaac	acgtagaaag	ccagtcgcga	5580
gaaacgggtg	tgaccccgga	tgaatgtcag	ctactgggct	atctggacaa	gggaaaacgc	5640
aagcgcgaa	agaaaagcag	tagcttgca	tgggctttaca	tgccgatagc	tgactgggg	5700
ggttttatgg	acagcaagcg	aaccggaatt	gccagctggg	gcgcctctg	gtaaggttgg	5760
gaagccctgc	aaagtaact	ggatggcttt	cttgccgcca	aggatctgat	ggcgcagggg	5820

```

atcaagatct gatcaagaga caggatgagg atcgtttcgc atgattgaac aagatggatt 5880
gcacgcaggt tctccggccg cttgggtgga gaggctattc ggctatgact gggcacaaca 5940
gacaatcggc tgctctgatg ccgccgtgtt ccggctgtca gcgcaggggc gcccggttct 6000
ttttgtcaag accgacctgt ccggtgccct gaatgaactg caggacgagg cagcgcggtc 6060
atcgtggctg gccacgacgg gcgttccttg cgcagctgtg ctcgacgttg tcactgaagc 6120
gggaagggac tggctgctat tgggcgaagt gccggggcag gatctcctgt catctcacct 6180
tgctcctgcc gagaaagtat ccatcatggc tgatgcaatg cggcggtgcg atacgcttga 6240
tccggctacc tgcccattcg accaccaagc gaaacatcgc atcgagcgag cacgtactcg 6300
gatggaagcc ggtcctgtcg atcaggatga tctggacgaa gagcatcagg ggctcgcgcc 6360
agccgaactg ttcgccaggc tcaaggcgcg catgcccgac ggcgaggatc tcgtcgtgac 6420
ccatggcgat gcctgcttgc cgaatatcat ggtggaaaat ggccgctttt ctggattcat 6480
cgactgtggc cggctgggtg tggcgagacc ctatcaggac atagcgttgg ctaccctga 6540
tattgctgaa gagcttggcg gcgaatgggc tgaccgcttc ctcgtgcttt acggtatcgc 6600
cgctcccgat tcgcagcgca tcgccttcta tcgccttctt gacgagttct tctgagcggg 6660
actctggggt tcgaaatgac cgaccaagcg acgcccacc tgccatcacg agatttcgat 6720
tccaccgccg ccttctatga aaggttgggc ttccggaatcg ttttccggga cgccggtcgg 6780
atgatcctcc agcgcgggga tctcatgctg gattcttctc cccaccccgg gctcgatccc 6840
ctcgcgagtt ggttcagctg ctgcctgagg ctggacgacc tcgcgaggtt ctaccggcag 6900
tgcaaatccg tcggcatcca ggaaaccagc agcggctatc cgcgcacca tgccccgaa 6960
ctgcaggagt ggggaggcac gatggccgct ttggtcccgg atctttgtga aggaacctta 7020
cttctgtggt gtgacataat tggacaaact acctacagag atttaaagct ctaaggtaaa 7080
tataaaatgt ttaagtgtat aatgtgttaa actactgatt ctaattgttt gtgtatttta 7140
gattccaacc tatggaactg atgaatggga gcagtgggtg aatgccttta atgaggaaaa 7200
cctgttttgc tcagaagaaa tgccatctag tgatgatgag gctactgctg actctcaaca 7260
ttctactcct ccaaaaaaga agagaaaggt agaagacccc aaggactttc cttcagaatt 7320
gctaagtttt ttgagtcag ctgtgttttag taatagaact cttgcttgct ttgctattta 7380
caccacaaag gaaaaagctg cactgctata caagaaaatt atggaaaaat attctgtaac 7440
ctttataagt aggcataaca gttataatca taacatactg ttttttctta ctccacacag 7500
gcatagagtg tctgctatta ataactatgc tcaaaaattg tgtaccttta gctttttaat 7560
ttgtaaaggg gttaataagg aatattttgat gtatagtgcc ttgactagag atcataatca 7620
gccataccac atttgtagag gttttacttg ctttaaaaaa cctcccacac ctccccctga 7680
acctgaaaca taaaatgaat gcaattgttg ttgttaactt gtttattgca gcttataatg 7740
gttaciaaata aagcaatagc atcaciaaatt tcaciaaata agcatttttt tcaactgcatt 7800
ctagtgtggg tttgtccaaa ctcatcaatg tatcttatca tgtctggatc taataaaaaga 7860
tatttatttt cattagatat gtgtgttggg tttttgtgtg cagtgcctct atctggaggc 7920
caggtagggc tggccttggg ggagggggag gccagaatga ctccaagagc tacaggaagg 7980
caggtcagag accccactgg acaaacagtg gctggactct gcaccataac acacaatcaa 8040
caggggagtg agctggaaat ttgctagc                                     8068

```

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 239

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 28

Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Met Leu Leu Pro Leu Trp Val Ser Gly  
1 5 10 15

Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val  
20 25 30

Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu  
35 40 45

Leu Tyr Ser Arg Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys  
50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Phe Trp Ala Ser Thr Arg Glu  
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Phe Gly Thr Asp Phe  
85 90 95

Asn Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Asp  
100 105 110

Cys Gln Gln Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys  
 115 120 125  
 Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro  
 130 135 140  
 Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu  
 145 150 155 160  
 Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp  
 165 170 175  
 Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp  
 180 185 190  
 Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys  
 195 200 205  
 Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln  
 210 215 220  
 Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230 235

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 7731

&lt;212&gt; DHK

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 29

ttgaagacga aagggcctcg tgatacgccct atttttatag gttaaatgtca tgataataat 60  
 ggtttcttag acgtcaggtg gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaaccc ctatttggtt 120  
 atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct 180  
 tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc 240  
 cttttttgcg gcattttgcc ttccgtgttt tgctcaccga gaaacgctgg tgaaagtaaa 300  
 agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt ggggttacatc gaactggatc tcaacagcgg 360  
 taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaaagt 420  
 tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgtgt tgacgcgggg caagagcaac tcggtcgccc 480  
 catacactat tctcagaatg acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac 540  
 ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataactgc 600  
 ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgacaaa 660  
 catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc 720  
 aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgc agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt 780  
 aactggcgaa ctacttactc tagcttccc gcaacaatta atagactgga tggaggcggg 840  
 taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ccttccggct ggctggttta ttgctgataa 900  
 atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcgcgg tatcattgca gcaactgggc cagatggtaa 960  
 gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa 1020  
 tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt 1080  
 ttactcatat atactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt 1140  
 gaagatcctt tttgataaat tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg 1200  
 agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt 1260  
 aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttggt tgccggatca 1320  
 agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaaatac 1380  
 tgtcctttta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac 1440  
 atacctcgct ctgctaattc tgttaccagt ggcgtgctgc agtgggcgata agtcgtgtct 1500  
 taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaaggcg cagcggctcg gctgaacggg 1560  
 gggttcgtgc acacagccca gcttgagcgc aacgacctac accgaactga gatacctaca 1620  
 gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt 1680  
 aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggt 1740  
 tctttatagt cctgtcgggt ttccgccact ctgacttgag cgtcgatttt tggatgctc 1800  
 gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc 1860  
 cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tctgcggtta tccccgtatt ctgtggataa 1920  
 ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgcgc agccgaacga ccgagcgcag 1980  
 cgagtcagtg agcaggaag cggaagagcg cctgatgcgg tattttctcc ttacgcatct 2040  
 gtgcggtatt tcacaccgca tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atgccgcata 2100  
 gttaagccag tatacactcc gctatcgcta cgtgactggg tcatggctgc gccccgacac 2160

ccgccaaacac	ccgctgacgc	gccctgacgg	gcttgtctgc	tcccggcatc	cgcttacaga	2220
caagctgtga	ccgtctccgg	gagctgcatg	tgtcagaggt	tttcaccgtc	atcaccgaaa	2280
cgcgcgaggc	agcatgcatc	tcaattagtc	agcaaccata	gtcccgcgcc	taactccgcc	2340
catcccgccc	ctaactccgc	ccagttccgc	ccattctccg	ccccatggct	gactaatttt	2400
ttttatttat	gcagaggccg	aggccgcctc	ggcctctgag	ctattccaga	agtagtgagg	2460
aggctttttt	ggaggcctag	gcttttgcaa	aaagctagct	tacagctcag	ggctgcgatt	2520
tcgcgccaaa	cttgacggca	atcctagcgt	gaaggctggt	aggattttat	ccccgctgcc	2580
atcatggttc	gaccattgaa	ctgcatcgtc	gccgtgtccc	aaaatatggg	gattggcaag	2640
aacggagacc	taccctggcc	tccgctcagg	aacgagttca	agtacttcca	aagaatgacc	2700
acaacctctt	cagtggaaag	taaacagaat	ctggtgatta	tgggtaggaa	aacctggttc	2760
tccattcctg	agaagaatcg	acctttaaat	gacagaatta	atatagttct	cagtagagaa	2820
ctcaaagaac	caccacgagg	agctcatttt	cttgccaaaa	gtttggatga	tgccttaaga	2880
cttattgaac	aaccggaatt	ggcaagtaaa	gtagacatgg	tttggatagt	cggaggcagt	2940
tctgtttacc	aggaagccat	gaatcaacca	ggccacctca	gactctttgt	gacaaggatc	3000
atgcaggaat	ttgaaagtga	cacgtttttc	ccagaaattg	atltggggaa	atataaaact	3060
ctcccagaat	accagggcgt	cctctctgag	gtccaggagg	aaaaaggcat	caagtataag	3120
tttgaaagtct	acgagaagaa	agactaacag	gaagatgctt	tcaagttctc	tgctcccctc	3180
ctaaagctat	gcattttttat	aagaccatgg	gacttttgct	ggcttttagat	ctttgtgaag	3240
gaaccttact	tctgtggtgt	gacataattg	gacaaactac	ctacagagat	ttaaagctct	3300
aaggtaaata	taaaattttt	aagtgtataa	tgtgttaaac	tactgattct	aattgtttgt	3360
gtattttaga	ttccaacctt	tggaaactgat	gaatgggagc	agtgggtgaa	tgcctttaat	3420
gaggaaaacc	tgttttgcct	agaagaaatg	ccatctagt	atgatgaggc	tactgtgcac	3480
tctcaacatt	ctactcctcc	aaaaaagaag	agaaaggtag	aagaccccaa	ggacttttct	3540
tcagaattgc	taagtttttt	gagtcatgct	gtgttttagta	atagaactct	tgcttgcttt	3600
gctattttaca	ccacaaagga	aaaagctgca	ctgtatatac	agaaaattat	ggaaaaatat	3660
tctgtaacct	ttataagtag	gcataacagt	tataatcata	acatactgtt	ttttcttact	3720
ccacacaggg	atagagtgtc	tgctattaat	aactatgtct	aaaaattgtg	taccttttag	3780
tttttaattt	gtaaaggggt	taataaggaa	tatttgatgt	atagtgcctt	gactagagat	3840
cataatcagc	cataccacat	ttgtagaggt	tttacttgct	ttaaaaaacc	toaccacact	3900
ccccctgaac	ctgaaacata	aaatgaatgc	aattgtttgt	gttaacttgt	ttattgcagc	3960
ttataatggt	tacaaataaa	gcaatagcat	cacaaatttc	acaaataaag	catttttttc	4020
actgcattct	agttgtggtt	tgtccaaaact	catcaatgta	tcttatcatg	tctggatcta	4080
ataaaaagata	tttatttttca	ttagatatgt	gtgttggttt	tttgtgtgca	gtgctctcta	4140
ctggaggcca	ggtagggtcg	gccttggggg	agggggaggc	cagaatgact	ccaagagcta	4200
caggaaaggca	ggtcagagac	cccactggac	aaacagtggc	tggactctgc	accataacac	4260
acaatcaaca	ggggagttag	ctggaaattt	gctagcgaat	tccagcacac	tggcggccgt	4320
tactagttat	taatagtaat	caattacggg	gtcattagtt	catagcccat	atatggagtt	4380
ccgcgttaca	taacttacgg	taaattggccc	gcctggtgta	ccgcccacac	acccccgcgc	4440
attgacgtca	ataatgacgt	atgttcccat	agtaacgcc	atagggactt	tccattgacg	4500
tcaatgggtg	ggtattttac	ggtaaaactgc	ccacttggca	gtacatcaag	tgatcatata	4560
gccaaagtacg	ccccctattg	acgtcaatga	cggtaaatgg	ccgcctggc	attatgccca	4620
gtacatgacc	ttatgggact	ttcctacttg	gcagtacatc	tacgtattag	tcatcgctat	4680
taccatgggtg	atgcggtttt	ggcagtagat	caatgggctg	ggatagcggt	ttgactcacg	4740
gggattttcca	agtctccacc	ccattgacgt	caatgggagt	ttgttttggc	acaaaaatca	4800
acgggacgtt	ccaaaatgtc	gtaacaactc	cgccccattg	acgcaaatgg	gcggtaggcg	4860
tgtacggtgg	gaggtctata	taagcagagc	tcggttagtg	aaccgtcaga	tcgcctggag	4920
acgccatcca	cgtgtttttg	acctccatag	aagacacccg	gaccgatcca	gcctccgcgg	4980
ccgggaacgg	tgcatgggaa	cgcggtattc	ccgtgccaa	agtgaagtaa	gtaccgccta	5040
tagagtctat	aggccccacc	ccttggtctc	ttatgcatgc	tatactgttt	ttggcttggg	5100
gtctatacac	ccccgcttcc	tcatgttata	ggtgatggt	tagcttagcc	tataggtgtg	5160
ggttattgac	cattattgac	cactccccta	ttggtgacga	tactttccat	tactaatcca	5220
taacatgggt	ctttgccaca	actctcttta	ttggctatat	gccaatcac	tgtccttcag	5280
agactgacac	ggactctgta	tttttacagg	atggggtctc	atttattatt	tacaaattca	5340
catatacaac	accaccgtcc	ccagtgcctg	cagtttttat	taaacataac	gtgggatctc	5400
cacgcgaatc	tgggttacgt	gttccggaca	tgggtctctc	tccggtagcg	gcggtgcttc	5460
tacatccgag	ccctgctccc	atgcctccag	cgactcatgg	tcgctcgcca	gctccttgct	5520
cctaacagtg	gaggccagac	ttaggcacag	cacgatgccc	accaccacca	gtgtgccgca	5580
caaggccgtg	gcggtagggt	atgtgtctga	aaatgagctc	ggggagcggg	cttgcaaccgc	5640
tgacgcattt	ggaagactta	aggcagcggc	agaagaagat	gcaggcagct	gagttgttgt	5700
gttctgataa	gagtcagagg	taactcccg	tgcggtgctg	ttaacggtgg	agggcagtg	5760
agtctgagca	gtactcgttg	ctgccgcgcg	cgccaccaga	cataatagct	gacagactaa	5820
cagactgttc	ctttccattg	gtcttttctg	cagtcaccgt	ccttgacacg	cgtctcgga	5880
agcttgcgcg	caccattggg	tggagctggg	ctttctctct	tctcctgtca	gggaactgcag	5940
gtgtcctctc	tgaggctccag	ctgcaacagt	ctggacctga	gctggtgaag	cctggggctt	6000
cagtaaagat	gtcctgcaag	acttctagat	acacattcac	tgaatacacc	atacactggg	6060
tgagacagag	ccatggaaag	agccttgagt	ggattggagg	tattaatcct	aacaatggta	6120
ttcctaacta	caaccagaag	ttcaagggca	gggccacatt	gactgtaggg	aagtccctca	6180



```

gcaccgccta catggagctc cgcagcctga catctgagga ttctgcggtc tattttctgtg 6240
caagaagaag aatcgcttat ggttacgacg agggccatgc tatggactac tggggtoaag 6300
gaacctcagt caccgtctcc tcaggtgagt ggatcctctg cgccctgggc cagctctgtc 6360
ccacaccgcg gtcacatggc accacctctc ttgcagcctc caccaagggc ccacggtct 6420
tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctgggggcac agcgccctg ggctgcctgg 6480
tcaaggacta cttccccgaa cgggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg 6540
gcgtgcacac cttccccggt gtctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg 6600
tgaccgtgcc ctccagcagc ttggggaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc 6660
ccagcaacac caaggtggac aagaaagttg agcccaaatac ttgtgacaaa actcacacat 6720
gcccaccgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttctc tccccccaa 6780
aaccacaagg caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg 6840
tgagccacga agacctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcggtg gaggtgcata 6900
atgccaagac aaagccgchg gaggagcagt acaacagcac gtaccgggtg gtcagcgtcc 6960
tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca 7020
aagccctccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac 7080
cacaggtgta caacctgcc ccattccggg aggatagac caagaaccag gtcagcctga 7140
cctgcctggt caaaggcttc tatccagcg acatgcctg ggagtgggag agcaatggg 7200
agccggagaa caactacaag accacgcctc cgtgctgga ctccgacggc tcttcttcc 7260
tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct 7320
ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg 7380
gtaaattgagt ggcagggcgg gcaagccccg cccccgggc tctgcggtc gcacgaggat 7440
gcttggcagc taccctctgt acatacttcc cgggcgcca gcatggaaat aaagcagg 7500
atctaataaa agatatttat ttctattaga tatgtgtgtt ggtttttgt gtgcagtgc 7560
tctatctgga ggccaggtag ggctggcctt gggggagggg gagggcagaa tgactccaag 7620
agctacagga aggcaggta gagacccac tggacaaaca gtggctggac tctgcaccat 7680
aacacacaat caacagggga gtgagctgga aatttgctag cgaattaatt c 7731

```

<210> 30

<211> 472

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Met Gly Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly  
1 5 10 15

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys  
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Arg Tyr Thr Phe  
35 40 45

Thr Glu Tyr Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys Ser Leu  
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Ile Pro Asn Tyr Asn  
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Gly Lys Ser Ser Ser  
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val  
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Arg Ile Ala Tyr Gly Tyr Asp Glu Gly His  
115 120 125

Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ser  
130 135 140

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr  
145 150 155 160

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro  
165 170 175

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val  
 180 185 190  
 His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser  
 195 200 205  
 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile  
 210 215 220  
 Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val  
 225 230 235 240  
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala  
 245 250 255  
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro  
 260 265 270  
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val  
 275 280 285  
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val  
 290 295 300  
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln  
 305 310 315 320  
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln  
 325 330 335  
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala  
 340 345 350  
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro  
 355 360 365  
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr  
 370 375 380  
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  
 385 390 395 400  
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr  
 405 410 415  
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr  
 420 425 430  
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe  
 435 440 445  
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
 450 455 460  
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 465 470

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 339

&lt;212&gt; DHK

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 31

gacattgtga tgacccaatc tccagactct ttggctgtgt ctctagggga gagggccacc 60  
 atcaactgca agtccagtc gagcctttta tattctagaa atcaaaagaa ctacttggcc 120  
 tggatatcagg agaaaccagg acagccaccc aaactcctca tcttttgggc tagcactagg 180

```

gaatctggggg tacctgatag gttcagtggc agtggggttg ggacagactt caccctcacc 240
attagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttttagctat 300
ccgctcacgt tcggacaagg gaccaagggtg gaaataaaa 339

```

```

<210> 32
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 32
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1             5             10             15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
      20             25             30
Arg Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
      35             40             45
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Phe Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
      50             55             60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Phe Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
      65             70             75             80
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
      85             90             95
Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
      100            105            110

```

Lys

```

<210> 33
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

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

```

Lys

```

<210> 34
<211> 113

```

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 34

```

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

```

Lys

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 8068

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 35

```

gaattccagc acactggcgg cggttactag ttattaatag taatcaatta cgggggtcatt 60
agttcatagc ccatatatgg agttccgcgt tacataactt acggtaaatt gccgcgctgg 120
ctgaccgccc aacgaccccc gccattgac gtcaataatg acgtatgttc ccatagtaac 180
gccaataggg actttccatt gacgtcaatg ggtggagtat ttacggtaaa ctgcccactt 240
ggcagtagac caagtgtatc atatgccaag tacgccccct attgacgtca atgacggtaa 300
atggccccgc tggcattatg cccagtacat gaccttatgg gactttccta cttggcagta 360
catctacgta ttagtcatcg ctattaccat ggtgatgcgg ttttggcagt acatcaatgg 420
gcgtggatag cggtttgact cacggggatt tccaagtctc caccctattg acgtcaatgg 480
gagtttggtt tggcaccaaa atcaacggga ctttccaaaa tgtcgttaaca actccgcccc 540
attgacgcaa atggggcggt ggcggtgtac gtggggaggtc tatataagca gagctcggtt 600
agtgaaccgt cagatcgctc ggagacgcca tccacgctgt tttgacctcc atagaagaca 660
ccgggaccga tccagcctcc gcggccggga accgtgcatt ggaacgcgga ttccccgtgc 720
caagagtgc gtaagtaccg cctatagagt ctataggccc accccttgg cttcttatgc 780
atgctatact gtttttggtc tggggtctat acacccccgc ttcctcatgt tatagggtgat 840
ggtatagctt agcctatagg tgtgggttat tgaccattat tgaccactcc cctattgggtg 900
acgatacttt ccattactaa tccataacat ggctctttgc cacaactctc tttattgggt 960
atatgccaat acactgtcct tcagagactg acacggactc tgtattttta caggatgggg 1020
tctcatttat tatttataaa ttcacatata caacaccacc gtccccagtg cccgcagttt 1080
ttattaaaca taacgtggga tctccacgcg aatctcgggt acgtgttccg gacatggggt 1140
cttctccggt agcggcggag cttctacatc cgagccctgc tcccatgcct ccagcgactc 1200
atggctcgctc ggcagctcct tgctcctaac agtggaggcc agacttaggc acagcacgat 1260
gccaccacc accagtgtgc cgcacaaggc cgtggcggtg gggtagtgtt ctgaaaatga 1320
gctcggggag cgggcttgca ccgctgacgc atttgaaga ctttaaggcag cggcagaaga 1380
agatgcaggc agctgagttg ttgtgttctg ataagagtca gaggttaactc cgtttgcggt 1440
gctgttaacg gtggagggca gtgtagtctg agcagtactc gttgctgccg cgcgcgccac 1500
cagacataat agctgacaga ctaacagact gttcctttcc atgggtcttt tctgcagtca 1560
ccgtccttga cagcgtctc gggaagcttg ccgccaccat ggagacagac aactcctgc 1620
tatgggtgct gctgctctgg gttccaggtt cctccggaga cattgtgatg acccaatctc 1680
cagactcttt ggctgtgtct ctaggggaga gggccaccat caactgcaag tccagtcaga 1740
gccttttata ttctagaaat caaaagaact acttggcctg gtatcagcag aaaccaggac 1800
agccacccaa actcctcatc ttttgggcta gcactaggga atctggggta cctgataggt 1860
tcagtggcag tgggtttggg acagacttca cctcaccat tagcagcctg caggctgaag 1920
atgtggcagt ttattactgt cagcaatatt ttagctatcc gctcacgttc ggacaaggga 1980

```

ccaaggtgga	aataaaacgt	gagtggatcc	atctgggata	agcatgctgt	tttctgtctg	2040
tccctaacat	gccctgtgat	tatgocgaaa	caacacacccc	aagggcagaa	ctttgttact	2100
taaacacccat	cctgttttgt	tctttcctca	ggaactgttg	ctgcaccatc	tgtcttcatc	2160
ttcccgcctat	ctgatgagca	gttgaaatct	ggaactgcct	ctgttggtgtg	cctgctgaat	2220
aacttctatc	ccagagaggc	caaagtacag	tgggaaggtgg	ataacgccct	ccaatcgggg	2280
aactcccagg	agagtgtcac	agagcaggac	agcaaggaca	gcacctacag	cctcagcagc	2340
accctgacgc	tgagcaaagc	agactacgag	aaacacaaag	tctacgcctg	cgaagtcacc	2400
catcagggcc	tgagctcgcc	cgtcacaaag	agcttcaaca	ggggagagtg	ttagagggag	2460
aagtgcctcc	acctgctcct	cagttccagc	ctgacccccct	cccatccttt	ggcctctgac	2520
cctttttcca	caggggacct	acccctattg	cggtcctcca	gctcatcttt	cacctcacc	2580
ccctcctcct	ccttggcttt	aattatgcta	atgttggagg	agaatgaata	aataaagtga	2640
atctttgcac	ctgtggtgga	tctaataaaa	gatatatttt	ttcattagat	atgtgtgttg	2700
gttttttgtg	tgcagtgcct	ctatctggag	gccaggtagg	gctggccttg	ggggaggggg	2760
aggccagaat	gactccaaga	gctacaggaa	ggcaggtcag	agacccccact	ggacaaacag	2820
tggctggact	ctgcaccata	acacacaatc	aacaggggag	tgagctggaa	atttgctagc	2880
gaattcttga	agacgaaagg	gcctcgtgat	acgcctattt	ttatagggtta	atgtcatgat	2940
aataatgggt	tcttagacgt	caggtggcac	ttttcgggga	aatgtgcgcg	gaacccctat	3000
ttgtttattt	ttctaataac	attcaaatac	gtatccgctc	atgagacaat	aacctgata	3060
aatgcttcaa	taatattgaa	aaaggaagag	tatgagtatt	caacatttcc	gtgtcgccct	3120
tattcccttt	tttgcgcat	tttgcccttc	tgtttttgtc	caccagaaa	cgctggtgaa	3180
agtaaaagat	agtgagatc	agttgggtgc	acagagtggt	tacatcgaa	tggatgcaac	3240
cagcggttaag	atccttgaga	gttttcgccc	cgaagaacgt	ttccaatga	tgagcacttt	3300
taaagtctctg	ctatgtggcg	cggtattatc	ccgtgttgac	gccgggcaag	agcaactcgg	3360
tcgccgcata	cactattctc	agaatgactt	ggttgagtac	tcaccagtca	cagaaaagca	3420
tcttacggat	ggcatgacag	taagagaatt	atgcagtgct	gccataacca	tgagtataaa	3480
cactgcggcc	aacttacttc	tgacaacgat	cggaggaccg	aaggagctaa	ccgctttttt	3540
gcacaacatg	ggggatcatg	taactcgcc	tgactcgttg	gaaccggagc	tgaatgaagc	3600
cataccaaac	gacgagcgtg	acaccacgat	gcctgcagca	atggcaacaa	cgttgcgcaa	3660
actattaact	ggcgaactac	ttactctagc	ttcccgccaa	caattaatag	actggatgga	3720
ggcggataaa	gttgaggagc	cacttctgcg	ctcgcccttt	ccggctggct	ggtttattgc	3780
tgataaatct	ggagccgggtg	agcgtgggtc	tcgccgtatc	attgcagcac	tggggccaga	3840
tggtaagccc	tcccgatatc	tagttatcta	cacgacgggg	agtcaggcaa	ctatggatga	3900
acgaaataga	cagatcgctg	agatagggtc	ctcactgatt	aagcattggg	aactgtcaga	3960
ccaagtttac	tcatatatac	tttagattga	tttaaaactt	catttttaat	ttaaaaggat	4020
ctaggtgaag	atcctttttg	ataatctcat	gaccaaatac	ccttaacgtg	agttttcggt	4080
ccactgagcg	tcagaccccg	tagaaaagat	caaaggatct	tcttgagatc	ctttttttct	4140
gcgcgtaatc	tgctgcttgc	aaacaaaaaa	accaccgcta	ccagcgggtg	tttgtttgcc	4200
ggatcaagag	ctaccaactc	tttttccgaa	ggtaactggc	ttcagcagag	cgcagatacc	4260
aaataactga	cttctagtgt	agccgtagtt	agccaccac	ttcaagaact	ctgtagcacc	4320
gcctacatac	ctcgcctctg	taatcctgtt	accagtggct	gctgccagtg	gcgataagtc	4380
gtgtcttacc	gggttggaact	caagacgata	gttaccggat	aaggcgcagc	ggtcgggctg	4440
aacggggggg	tcgtgcacac	agcccagctt	ggagcgaacg	acctacaccg	aactgagata	4500
cctacagcgt	gagctatgag	aaagcgccac	gcttcccga	gggagaaaag	cggacaggta	4560
tccggttaag	ggcagggctg	gaacaggaga	gcgcacgagg	gagcttccag	ggggaaacgc	4620
ctgggtatct	tatagtcctg	tcgggtttcg	ccacctctga	cttgagcgtc	gatttttgtg	4680
atgctcgtca	ggggggcgga	gcctatggaa	aaacgccagc	aacgcggcct	ttttacgggt	4740
cctggccttt	tgtgtgcctt	ttgtcacat	gttctttcct	gcgttatccc	ctgattctgt	4800
ggataaccgt	attaccgcct	ttgagtgaac	tgataaccgt	cgccgcagcc	gaacgaccga	4860
gcgcagcag	tcagtgaagc	aggaagcgga	agagcgccct	atgcggtatt	ttctccttac	4920
gcactctgtc	ggatatttcac	accgcatatg	gtgcactctc	agtacaatct	gctctgatgc	4980
cgcatagtta	agccagtata	cactccgcta	tcgctacgtg	actgggtcat	ggctgcgccc	5040
cgacacccgc	caacacccgc	tgacgcgccc	tgacgggctt	gtctgctccc	ggcatccgct	5100
tacagacaag	ctgtgaccgt	ctccgggagc	tgcatgtgtc	agagggtttc	accgtcatca	5160
ccgaaacgcg	cgaggcagct	gtggaatgtg	tgctcagttg	gggtgtgaaa	gtccccaggc	5220
tcccagcag	gcagaagtat	gcaaagcatg	catctcaatt	agtcagcaac	caggctcccc	5280
agcaggcaga	agtatgcaaa	gcatgcatct	caattagtca	gcaaccatag	tcccgcctct	5340
aactccgccc	atcccgcccc	taactccgcc	cagttccgcc	cattctccgc	cccatggctg	5400
actaattttt	tttatatttg	cagaggccga	ggccgcctcg	gcctctgagc	tattccagaa	5460
gtagttagga	ggcttttttg	gaggccctag	cttttgcaaa	aagctagctt	cacgctgccg	5520
caagcactca	gggcgcaagg	gctgctaaag	gaagcggaac	acgtagaaaag	ccagtccgca	5580
gaagcgggtg	tgaccccgga	tgaatgtcag	ctactgggct	atctggacaa	gggaaaacgc	5640
aaacgcaag	agaaagcagg	tagcttgcag	tgggcttaca	tggcgatagc	tagactgggc	5700
ggttttatgg	acagcaagcg	aaccggaatt	gccagctggg	gcgccctctg	gtaagggttg	5760
gaagccctgc	aaagtaaaact	ggatggcttt	cttgccgcca	aggatctgat	ggcgaggggg	5820
atcaagatct	gatcaagaga	caggatgagg	atcgtttcgc	atgattgaac	aagatggatt	5880
gcacgcaggt	tctccggccg	cttgggtgga	gaggctattc	ggctatgact	gggcacaaca	5940
gacaatcggc	tgctctgatg	ccgccgtggt	ccggctgtca	gcgcaggggc	gcccgtttct	6000

```

ttttgtcaag accgacctgt ccggtgccct gaatgaactg caggacgagg cagcgcggt 6060
atcgtggctg gccacgacgg gcgttccttg cgcagctgtg ctgcagcttg tcaactgaagc 6120
gggaagggac tggctgctat tgggcgaagt gccggggcag gatctcctgt catctcacct 6180
tgctcctgcc gagaaagtat ccatcatggc tgatgcaatg cggcggtgc atacgcttga 6240
tccggctacc tgccattcg accaccaagc gaaacatcgc atcgagcgag cactactcg 6300
gatggaagcc ggtcttgctg atcaggatga tctggacgaa gagcatcagg ggctcgcgcc 6360
agccgaactg ttgcgcaggc tcaaggcgcg catgcccgac ggcgaggatc tcgtcgtgac 6420
ccatggcgat gcctgcttgc cgaatatcat ggtggaaaat ggccgctttt ctggattcat 6480
cgactgtggc cggctgggtg tggcggaccg ctatcaggac atagcgttgg ctaccgctga 6540
tattgctgaa gagcttggcg gcgaatgggc tgaccgcttc ctcgtgcttt acggtatcgc 6600
cgctcccgat tcgcagcgca tcgccttcta tcgccttctt gacgagttct tctgagcggg 6660
actctggggt tcgaaatgac cgaccaagcg acgcccacc tgccatcacg agatttcgat 6720
tccaccgccc ccttctatga aaggttgggc ttcggaatcg ttttcgggga cgccggctgg 6780
atgacccctc agcgcgggga tctcatgctg gagttcttgc cccaccccg gctcgatccc 6840
ctcgcgagtt ggttcagctg ctgcctgagg ctggacgacc tcgcggagtt ctaccggcag 6900
tgcaaatccg tcggcatcca ggaaaccagc agcggctatc cgcgcaccca tgccccgaa 6960
ctgcaggagt ggggaggcac gatggcgcgt ttggtcccg atctttgtga aggaacctta 7020
cttctgtggt gtgacataat tggacaaact acctacagag atttaaagct ctaaggtaaa 7080
tataaaattt ttaagtgtat aatgtgttaa actactgatt ctaattgttt gtgtatttta 7140
gattccaacc tatggaactg atgaatggga gcagtgggtg aatgccttta atgaggaaaa 7200
cctgttttgc tcagaagaaa tgccatctag tgatgatgag gctactgctg actctcaaca 7260
ttctactcct ccaaaaaaga agagaaagggt agaagacccc aaggactttc cttcagaatt 7320
gctaagtttt ttgagtcatg ctgtgttttag taatagaact cttgcttgct ttgctattta 7380
caccacaaag gaaaaagctg cactgctata caagaaaatt atggaaaaat attctgtaac 7440
ctttataagt aggcataaca gttataatca taacatactg ttttttctta ctccacacag 7500
gcatagagtg tctgctatta ataactatgc tcaaaaattg tgtaccttta gctttttaat 7560
ttgtaaaggg gttaataagg aatatttgat gtatagtgcc ttgactagag atcataatca 7620
gccataccac attttagtag gttttacttg ctttaaaaaa cctccacac ctccccctga 7680
acctgaaaca taaaatgaat gcaattgttg ttgttaactt gtttattgca gcttataatg 7740
gttacaaata aagcaatagc atcacaaatt tcacaaataa agcatttttt tcaactgcatt 7800
ctagttgtgg tttgtccaaa ctcatcaatg tatcttatca tgtctggatc taataaaaga 7860
tatttatttt cattagatat gtgtgttggg tttttgtgtg cagtgcctct atctggaggc 7920
caggtagggc tggccttggg ggaggggggag gccagaatga ctccaagagc tacaggaagg 7980
caggtcagag accccactgg acaaacagtg gctggactct gcaccataac acacaatcaa 8040
caggggagtg agctggaaat ttgctagc

```

<210> 36  
 <211> 234  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

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

Lys Val Glu Ile Lys Arg Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
 130 135 140  
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
 145 150 155 160  
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
 165 170 175  
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
 180 185 190  
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
 195 200 205  
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
 210 215 220  
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230

<210> 37  
 <211> 372  
 <212> DHK  
 <213> Homo sapiens

<400> 37  
 caggtgcaac tagtgagtc cggcgccgaa gtgaagaaac ccggtgcttc cgtgaaagtc 60  
 agctgtaaaa ctagtagata caccttcact gaatacacca tacactgggt tagacaggcc 120  
 cctggccaaa ggctggagt gataggagt attaataccta acaatgggtat tcctaactac 180  
 aaccagaagt tcaagggccg ggccaccttg accgtaggca agtctgccag caccgcctac 240  
 atggaactgt ccagcctgcg ctccgaggac actgcagtct actactgccc cagaagaaga 300  
 atcgccatg gttacgacga gggccatgct atggactact ggggtcaagg aacccttgtc 360  
 accgtctcct ca 372

<210> 38  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 38  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Arg Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr  
 20 25 30  
 Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Ile Pro Asn Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Gly Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Arg Arg Ile Ala Tyr Gly Tyr Asp Glu Gly His Ala Met Asp  
 100 105 110  
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 39  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 39  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
   1                  5                  10                  15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Arg Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr  
           20                  25                  30  
 Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile  
           35                  40                  45  
 Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Ile Pro Asn Tyr Asn Gln Lys Phe  
   50                  55                  60  
 Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Gly Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr  
   65                  70                  75                  80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys  
           85                  90                  95  
 Ala Arg Arg Arg Ile Ala Tyr Gly Tyr Asp Glu Gly His Ala Met Asp  
           100                  105                  110  
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
           115                  120

<210> 40  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

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

<210> 41  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens



&lt;400&gt; 41

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

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 7731

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 42

ttgaagacga aagggcctcg tgatacgccct atttttatag gttaatgtca tgataataat 60  
 ggtttcttag acgtcagggtg gcacttttctg gggaaatgtg cgcggaaccc ctatttgttt 120  
 atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct 180  
 tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc 240  
 cttttttgcg gcatttttgc ttccgtgttt tgctcaccga gaaacgctgg tgaaagtaaa 300  
 agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt ggggttacat gaactggatc tcaacagcgg 360  
 taagatcctt gagagttttc gcccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaaagt 420  
 tctgctatgt ggcgcggtat tatcccggtg tgacgcgggg caagagcaac tcgggtcgccg 480  
 catacactat tctcagaatg acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac 540  
 ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataactctgc 600  
 ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgcacaa 660  
 catgggggat catgttaact gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc 720  
 aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgc agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt 780  
 aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga 840  
 taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ccttcgggct ggctggttta ttgctgataa 900  
 atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcgcg tatcattgca gcaactatgg atgaacgaaa 960  
 gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa 1020  
 tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt 1080  
 ttactcatat atactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt 1140  
 gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg 1200  
 agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt 1260  
 aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttggt tgccggatca 1320  
 agagctacca actctttttc cgaaggtaac ttgcttcagc agagcgagca taccataatc 1380  
 tgtccttcta gtgtagccgt agttagcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac 1440  
 atacctcgct ctgctaattc tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct 1500  
 taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg 1560  
 gggttcgtgc acacagccca gcttgagcgg aacgacctac accgaactga gataacctaca 1620  
 gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt 1680  
 aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta 1740  
 tctttatagt cctgtcgggt ttccgccact ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc 1800  
 gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttctctggc 1860  
 cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tctgcggtta tcccttgatt ctgtggataa 1920  
 ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgag 1980  
 cgagtcagtg agcaggaag cggaagagcg cctgatgcgg tattttctcc ttacgcctct 2040  
 gtgcgggtatt tcacaccgca tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atgccgcata 2100

gttaagccag	tatacaactcc	gctatcgcta	cgtgactggg	tcatggctgc	gccccgacac	2160
ccgccaaacac	ccgctgacgc	gccctgacgg	gcttgtctgc	tccccgcatc	cgcttacaga	2220
caagctgtga	ccgtctccgg	gagctgcatg	tgctagaggt	tttcaccgtc	atcaccgaaa	2280
cgcgcgaggc	agcatgcatc	tcaattagtc	agcaaccata	gtcccccccc	taactccgcc	2340
catccccccc	ctaactccgc	ccagttccgc	ccatttccgc	ccccatggct	gactaathtt	2400
ttttatttat	gcagagggcg	aggccgcctc	ggcctctgag	ctattccaga	agtagtgagg	2460
aggctttttt	ggagggcctag	gcttttgcaa	aaagctagct	tacagctcag	ggctgcgatt	2520
tcgcgccaaa	cttgacggca	atcctagcgt	gaaggctggg	aggattttat	ccccgctgcc	2580
atcatgggtc	gaccattgaa	ctgcatcgtc	gccgtgtccc	aaaatatggg	gattggcaag	2640
aacggagacc	taccctggcc	tccgctcagg	aacgagttca	agtacttcca	aagaatgacc	2700
acaacctctt	cagtgggaag	taaacagaat	ctggtgatta	tgggtaggaa	aacctgggtc	2760
tccattccctg	agaagaatcg	acctttaaag	gacagaatta	atatagttct	cagtagagaa	2820
ctcaaagaac	caccacgagg	agctcatttt	cttgccaaaa	gtttggatga	tgcttaaga	2880
cttattgaac	aaccggaatt	ggcaagtaaa	gtagacatgg	tttggatagt	cggaggcagt	2940
tctgtttacc	aggaagccat	gaatcaacca	ggccacctca	gactctttgt	gacaaggatc	3000
atgcaggaat	ttgaaagtga	cacgtttttc	ccagaaattg	atttggggaa	atataaactt	3060
ctccagaat	accaggcgt	cctctctgag	gtccaggagg	aaaaaggcat	caagtaag	3120
tttgaagtct	acgagaagaa	agactaacag	gaagatgctt	tcaagttctc	tgctccctc	3180
ctaaagctat	gcatttttat	aagaccatgg	gacttttgc	ggcttttagat	ctttgtgaag	3240
gaaccttact	tctgtggtgt	gacataattg	gacaaactac	ctacagagat	ttaaagctct	3300
aaggtaaata	taaaattttt	aagtgtataa	tgtgttaaac	tactgattct	aattgtttgt	3360
gtattttaga	ttccaacctt	tggaaactgat	caatgggagc	agtggtgga	tgctttta	3420
gaggaaaacc	tgttttgctc	agaagaaatg	gactctagtg	atgatgaggc	tgcctgtgac	3480
tctcaacatt	ctactcctcc	aaaaaagaag	agaaaggtag	aagaccccaa	ggactttcct	3540
tcagaattgc	taagtttttt	gagtcatgct	gtgttttagta	atagaactct	tgcttgcttt	3600
gctattttaca	ccacaaagga	aaaagctgca	ctgctataca	agaaaattat	ggaaaaatat	3660
tctgtaacct	ttataagtag	gcataacagt	tataatcata	acatactgtt	ttttcttact	3720
ccacacaggg	atagagtgtc	tgctattaat	aactatgctc	aaaaattgtg	tacctttagc	3780
tttttaattt	gtaaaggggg	taataaggaa	tatttgatgt	atagtgcctt	gactagagat	3840
cataatcagc	cataccacat	ttgtagagg	tttacttgct	ttaaaaaacc	ttccacacct	3900
ccccctgaac	ctgaaacata	aatgaatgc	aattgttggt	gttaacttgt	ttattgcagc	3960
ttataatggt	tacaaataaa	gcaatagcat	cacaaatttc	acaaataaag	catttttttc	4020
actgcattct	agttgtgggt	tgtccaaact	catcaatgta	tcttatcatg	tctggatcta	4080
ataaaagata	tttattttca	ttagatatgt	gtgttggttt	tttgtgtgca	gtgcctctat	4140
ctggaggcca	ggtagggtcg	gccttggggg	agggggaggc	cagaatgact	ccaagagcta	4200
caggaaggca	ggtcagagac	cccactggac	aaacagtggc	tggactctgc	accataacac	4260
acaatcaaca	ggggagttag	ctggaaattt	gctagcgaat	tccagcacac	tgccggccgt	4320
tactagttag	taatagtaat	caattacggg	gtcattagtt	catagcccat	atatggagtt	4380
ccgcgttaca	taacttacgg	taaatggccc	gcctggctga	ccgcccacag	acccccgcc	4440
atgacgttca	ataatgacgt	atgttcccat	agtaacgcc	atagggaact	tccattgacg	4500
tcaatgggtg	gagtattttac	ggtaaaactgc	gcacttggca	gtacatcaag	tgtatcatat	4560
gccaaagtacg	ccccctattg	acgtcaatga	cggtaaatgg	cccgccctggc	attatgccca	4620
gtacatgacc	ttatgggact	ttcctacttg	gcagtacatc	tacgtattag	tcatcgctat	4680
taccatgggtg	atgcggtttt	ggcagtacat	caatgggcgt	ggatagcggg	ttgactcacg	4740
gggattttcca	agctctccacc	ccattgacgt	caatgggagt	ttgtttttggc	acccaaatca	4800
acgggactttt	ccaaaaatgtc	gtaacaactc	cgccccattg	acgcaaaatg	gcggtaggcg	4860
tgtagcgggtg	gaggtctata	taagcagagc	tcgttttagtg	aaccgtcaga	tcgcctggag	4920
acgccatcca	cgctgttttg	acctccatag	aagacaccgg	gaccgatcca	gcctccgcgg	4980
ccgggaacgg	tgcatgtgaa	cgcggtattc	ccgtgccaa	agtgcgtaa	gtaccgccta	5040
tagagtctat	aggccccacc	ccttggtctc	ttatgcatgc	tatactgttt	ttggcttggg	5100
gtctatacac	ccccgcttcc	tcatgttata	ggtgatggta	tagcttagcc	tataggtgtg	5160
ggttattgac	cattattgac	cactccccca	ttggtgacga	tactttccat	tactaatcca	5220
taacatggct	ctttgccaca	actctcttta	ttggctatat	gccaatacac	tgctcttcag	5280
agactgacac	ggactctgta	ttttttacagg	atggggctctc	atttattatt	tacaaattca	5340
catatacaac	accaccgtcc	ccagtgcctg	cagtttttat	taaacataac	gtgggatctc	5400
cacgcgaatc	tcgggtacgt	gttcgggaca	tgggctcttc	tccggtagcg	gcggagcttc	5460
tacatccgag	ccctgctccc	atgcctccag	cgactcatgg	tcgctcgga	gtccttgctc	5520
cctaacagtg	gagggcagac	ttaggcacag	cacgatgccc	accaccacca	gtgtgcccga	5580
caaggccgtg	gcggtagggg	atgtgtctga	aaatgagctc	ggggagcggg	cttgaccgcg	5640
tgacgcattt	ggaagactta	aggcagcggc	agaagaagat	gcaggcagct	gagttgttgt	5700
gttctgataa	gagtcagagg	taactcccgt	tgcggtgctg	ttaacgggtg	agggcagttg	5760
agtctgagca	gtactcgttg	ctgcgcgcg	cgccaccaga	cataatagct	gacagactaa	5820
cagactgttc	ctttccatgg	gtcttttctg	cagtcaccgt	ccttgacacg	cgctcggga	5880
agcttgccgc	cattatggac	tggacctggc	gcgtgttttg	cctgctcgcc	gtggctcctg	5940
gggcccacag	ccaggtgcaa	ctggtgcagt	ccggcgccga	agtgaagaaa	cccggtgctt	6000
ccgtgaaagt	cagctgtaaa	actagtagat	acaccttcac	tgaatacacc	atacactggg	6060
ttagacaggc	ccctggccaa	aggctggagt	ggataggagg	tattaatcct	aacaatggta	6120

```

ttcctaacta caaccagaag ttcaagggcc gggccacctt gaccgtaggc aagtctgcc 6180
gcaccgccta catggaactg tccagcctgc gctccgagga cactgcagtc tactactgcg 6240
ccagaagaag aatcgcttat ggttacgacg agggccatgc tatggactac tggggctcaag 6300
gaacccttgt caccgtctcc tcaggtgagt ggatcctctg cgcctggggc cagctctgtc 6360
ccacaccgcg gtcacatggc accacctctc ttgcagcctc caccaagggc ccatcggtct 6420
tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctggggggcac agcggccctg ggctgcctgg 6480
tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg 6540
gcgtgcacac cttccccggt gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg 6600
tgaccgtgcc ctccagcagc ttggggcacc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc 6660
ccagcaacac caaggtggac aagaaagttg agcccaaate ttgtgacaaa actcacacat 6720
gcccaccgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttctc ttcccccaa 6780
aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg 6840
tgagccacga agacctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata 6900
atgccaaagc aaagcgcggg gaggagcagt acaacagcac gtaccgggtg gtcagcgtcc 6960
tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag gtctccaaca 7020
aagccctccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac 7080
cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg aggagatgac caagaaccag gtcagcctga 7140
cctgcctggt caaaggcttc tatcccgagc acatgcctgt ggagtgggag agcaatgggc 7200
agccggagaa caactacaag accacgcctc cctgctgga ctccgacggc tcttctctcc 7260
tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct 7320
ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg 7380
gtaaatgagt gogacggcgg gcaagcccg ctccccgggc tctcgcggtc gcacgaggat 7440
gcttggcagc taccctctgt acatacttcc cggcgcccca gcatggaaat aaagcaccgg 7500
atctaataaa agatatttat tttcattaga tatgtgtgtt ggttttttgt gtgcagtgcc 7560
tctatctgga ggccaggtag ggctggcctt gggggagggg gaggccagaa tgactccaag 7620
agctacagga aggcagggtc gagacccac tggacaaaca gtggctggac tctgcaccat 7680
aacacacaat caacagggga gtgagctgga aatttgctag cgaattaatt c 7731

```

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 472

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 43

```

Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly
 1              5              10              15

```

```

Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
      20              25              30

```

```

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

```

```

Thr Glu Tyr Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu
      50              55              60

```

```

Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Ile Pro Asn Tyr Asn
      65              70              75              80

```

```

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Gly Lys Ser Ala Ser
      85              90              95

```

```

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
      100              105              110

```

```

Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Arg Ile Ala Tyr Gly Tyr Asp Glu Gly His
      115              120              125

```

```

Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ser
      130              135              140

```

```

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
      145              150              155              160

```

```

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
      165              170              175

```

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val  
 180 185 190  
 His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser  
 195 200 205  
 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile  
 210 215 220  
 Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val  
 225 230 235 240  
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala  
 245 250 255  
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro  
 260 265 270  
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val  
 275 280 285  
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val  
 290 295 300  
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln  
 305 310 315 320  
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln  
 325 330 335  
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala  
 340 345 350  
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro  
 355 360 365  
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr  
 370 375 380  
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  
 385 390 395 400  
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr  
 405 410 415  
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr  
 420 425 430  
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe  
 435 440 445  
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
 450 455 460  
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 465 470

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 44

accgtctcct caggtgagtg gatcc

<210> 45  
 <211> 14  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<400> 45  
 cctctcttgc agcc 14

<210> 46  
 <211> 14  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<400> 46  
 cctctcttgc agcc 14

<210> 47  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 47  
 Thr Val Ser Ser  
 1

<210> 48  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 48  
 Ser Thr Lys Gly  
 1

<210> 49  
 <211> 27  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<400> 49  
 accgtctcct cagcctccac caagggc 27

<210> 50  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 50  
 Thr Val Ser Ser Ser Thr Lys Gly  
 1 5

<210> 51  
 <211> 27  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<400> 51  
 accgtctcct cagcctccac caagggc 27

<210> 52

<211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 52  
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly  
 1 5

<210> 53  
 <211> 22  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<400> 53  
 gaaataaaac gtgagtggat cc 22

<210> 54  
 <211> 27  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<400> 54  
 cttcttttct caggaactgt ggctgca 27

<210> 55  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 55  
 Thr Val Ala Ala  
 1

<210> 56  
 <211> 24  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<400> 56  
 gaaataaaac gaactgtggc tgca 24

<210> 57  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 57  
 Glu Ile Lys Thr Val Ala Ala  
 1 5

<210> 58  
 <211> 24  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<400> 58  
 gaaataaaac gaactgtggc tgca 24

<210> 59  
 <211> 8

<212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 59  
 Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
     1                    5

<210> 60  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 60  
 Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Met Leu Leu Leu Trp Val Ser  
     1                    5                    10                    15

Gly Thr Cys Gly  
                     20

<210> 61  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 61  
 Met Gly Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly  
     1                    5                    10                    15

Val Leu Ser

<210> 62  
 <211> 9  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<400> 62  
 gccgccacc

9

<210> 63  
 <211> 37  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР

<400> 63  
 cagaaagctt gccgccacca tggattcaca ggcccgag

37

<210> 64  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 64  
 Met Asp Ser Gln Ala Gln  
     1                    5

<210> 65  
 <211> 35

<212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР  
  
 <400> 65  
 ccgaggatcc actcacgttt cagctccagc ttggt 35

<210> 66  
 <211> 37  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР  
  
 <400> 66  
 cagaagctt gccgscacca tgggatggag ctgggtc 37

<210> 67  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 67  
 Met Gly Trp Ser Trp Val  
 1 5

<210> 68  
 <211> 35  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР  
  
 <400> 68  
 ccgaggatcc actcacctga ggagacggtg actga 35

<210> 69  
 <211> 36  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР  
  
 <400> 69  
 gtcatsacaa tgtctccgga ggaacstgga acccag 36

<210> 70  
 <211> 29  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР  
  
 <400> 70  
 ctccggagac attgtgatga cccaatctc 29



<210> 71  
 <211> 45  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР  
  
 <400> 71  
 gaatataaaa ggctctgact ggacttgacg ttgatgggtg ccctc 45  
  
 <210> 72  
 <211> 72  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР  
  
 <400> 72  
 cagtcagagc cttttatatt ctagaatca aaagaactac ttggcctggg atcagcagaa 60  
 accaggacag cc 72  
  
 <210> 73  
 <211> 44  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР  
  
 <400> 73  
 accccagatt ccctagtgc agcccaaaag atgaggagtt tggg 44  
  
 <210> 74  
 <211> 67  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР  
  
 <400> 74  
 tagcactagg gaatctgggg tacctgatag gttcagtggc agtggggttg ggacagactt 60  
 caccctc 67  
  
 <210> 75  
 <211> 53  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР  
  
 <400> 75  
 gtcccttgtc cgaacgtgag cggatagcta aaatattgct gacagtaata aac 53  
  
 <210> 76  
 <211> 33  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР  
 <400> 76  
 gctcacgttc ggacaaggga ccaaggtgga aat 33

<210> 77  
 <211> 72  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:primer  
 <400> 77  
 cagtcagagc cttttatatt ctagaaatca aaagaactac ttggcctggt tccagcagaa 60  
 accaggacag cc 72

<210> 78  
 <211> 57  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР  
 <400> 78  
 gtcccttgtc cgaacgtgag cggatagcta aaatattgct gacagtcata aactgcc 57

<210> 79  
 <211> 34  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР  
 <400> 79  
 cccaaactcc tcactctattg ggctagcact aggg 34

<210> 80  
 <211> 34  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР  
 <400> 80  
 ccctagtgtc agccsaatag atgaggagtt tggg 34

<210> 81  
 <211> 17  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР  
 <400> 81  
 tacgcaaacc gcctctc 17

<210> 82  
 <211> 18  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР  
  
 <400> 82  
 gagtgcacca tatgcsagt 18

<210> 83  
 <211> 16  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР  
  
 <400> 83  
 aacagstatg accatg 16

<210> 84  
 <211> 17  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР  
  
 <400> 84  
 gttttccsag tcacgac 17

<210> 85  
 <211> 47  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР  
  
 <400> 85  
 gtgtattcag tgaaggtgta tctactagtt ttacagctga ctttcac 47

<210> 86  
 <211> 53  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР  
  
 <400> 86  
 tagtagatac accttcastg aatacaccat acactggggtt agacaggccc ctg 53

<210> 87  
 <211> 71  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР

<400> 87  
 cccttgaact tctggttgta gtttaggaata ccattgttag gattaataacc tcctatccac 60  
 tccagccttt g 71

<210> 88  
 <211> 71  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР

<400> 88  
 таастасаас сагаагттса агггсccгггс сасcttgacc gtaggсаagt ctgccagcac 60  
 cgcctacatg g 71

<210> 89  
 <211> 63  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР

<400> 89  
 gcatggccct cgtcgтаасс ataggсgatt cttcttctgg cgcagtagta gactgcagtg 60  
 tcc 63

<210> 90  
 <211> 48  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР

<400> 90  
 ctatggttac gacgagggcc atgctatgga ctactgggggt сааgгаас 48

<210> 91  
 <211> 71  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР

<400> 91  
 таастасаас сагаагттса агггсccггггт сaccatcacc gtagacacct ctgccagcac 60  
 cgcctacatg g 71

<210> 92  
 <211> 27  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР

<400> 92  
 ggacactgca gtctacttct gcgссag 27

<210> 93  
 <211> 17  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР  
  
 <400> 93  
 tacgcaaaacc gcctctc 17  
  
 <210> 94  
 <211> 18  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР  
  
 <400> 94  
 gagtgcacca tatgcggt 18  
  
 <210> 95  
 <211> 75  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР  
  
 <400> 95  
 cctttggcca ggggcctgtc taaccsagtg tatgggtgtat tcagtgaagg tgtatccact 60  
 agtttccact agttt 75  
  
 <210> 96  
 <211> 28  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР  
  
 <400> 96  
 gtcaccgtcc ttgacacgcg tctcggga 28  
  
 <210> 97  
 <211> 17  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР  
  
 <400> 97  
 ttggaggagg gtgccaag 17  
  
 <210> 98  
 <211> 22  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>

<223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР

<400> 98

gagacattgt gacccaatct cc

22

<210> 99

<211> 25

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР

<400> 99

gacagtcata aactgccaca tcttc

25

<210> 100

<211> 23

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР

<400> 100

ttgacacgsg tctcgggaag ctt

23

<210> 101

<211> 22

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР

<400> 101

ggcgcagagg atccactcac ct

22

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, имеющее гипервариабельные участки моноклонального антитела F19 мыши (ATCC HB 8269), специфически связывающееся с белком активации фибробластов, отличающееся тем, что оно имеет модификации каркасного участка, которые приводят к повышенной продуктивности данного антитела в клетках-хозяевах по сравнению с химерным антителом, содержащим вариабельные области указанного антитела F19 и чужеродные константные области, причем уровень его продуктивности в неочищенных образцах сред, который определен с помощью ELISA и/или по выходу очищенных антител, превышает уровень продуктивности и/или выход указанных очищенных химерных антител, не имеющих модификации каркасного участка, по меньшей мере в 10 раз, а аминокислота в положении 87 по Кэбату в его легкой цепи является любой аминокислотой, за исключением аспарагина.

2. Антитело, отличающееся тем, что оно имеет вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи антитела по п.1, каждая из которых соединена с константной областью антитела человека.

3. Антитело по п.2, отличающееся тем, что константная область легкой цепи антитела человека представляет собой область каппа-цепи.

4. Антитело по п.2, отличающееся тем, что константная область тяжелой цепи антитела человека представляет собой область гамма-1-цепи.

5. Антитело по любому из пп.1-4, отличающееся тем, что уровень его продуктивности в неочищенных образцах сред, который определен с помощью ELISA и/или по выходу очищенных антител, превышает уровень продуктивности и/или выход указанных очищенных химерных антител, не имеющих модификации каркасного участка, по меньшей мере в 20 раз.

6. Антитело по любому из пп.1-4, отличающееся тем, что уровень его продуктивности в неочищенных образцах сред, который определен с помощью ELISA и/или по выходу очищенных антител, превышает уровень продуктивности и/или выход указанных очищенных химерных антител, не имеющих модификации каркасного участка, по меньшей мере в 100 раз.

7. Антитело по любому из пп.1-6, отличающееся тем, что оно обладает повышенной продуктивностью в эукариотических клетках.
8. Антитело по п.7, отличающееся тем, что эукариотическая клетка представляет собой клетку яичника китайского хомячка (СНО).
9. Антитело по п.8, отличающееся тем, что аминокислота в положении 87 по Кэбату в легкой цепи выбрана из ароматических или алифатических аминокислот.
10. Антитело по п.9, отличающееся тем, что ароматическая аминокислота в положении 87 по Кэбату в легкой цепи представляет собой тирозин или фенилаланин.
11. Антитело по любому из пп.1-10, отличающееся тем, что аминокислота в положении 36 по Кэбату в легкой цепи выбрана из ароматических аминокислот.
12. Антитело по любому из пп.1-11, отличающееся тем, что оно содержит переменную область легкой цепи, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2, как указано в списке последовательностей.
13. Антитело по п.12, отличающееся тем, что переменная область легкой цепи кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:1, как указано в Списке последовательностей.
14. Антитело по любому из пп.1-11, отличающееся тем, что оно содержит переменную область легкой цепи, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, как указано в списке последовательностей.
15. Антитело по п.14, отличающееся тем, что переменная область легкой цепи кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:5, как указано в Списке последовательности.
16. Антитело по любому из пп.1-15, отличающееся тем, что оно содержит переменную область тяжелой цепи, которая имеет любую из последовательностей SEQ ID NO:8, 10, 12, 14.
17. Антитело по п.16, отличающееся тем, что переменная область тяжелой цепи кодируется нуклеотидной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO:7, 9, 11, 13.
18. Антитело по любому из пп.12-17, отличающееся тем, что оно содержит переменную область легкой цепи, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2, и переменную область тяжелой цепи, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12.
19. Антитело по п.18, отличающееся тем, что переменная область легкой цепи кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:1, а переменная область тяжелой цепи кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:11.
20. Антитело по п.18 или 19, отличающееся тем, что оно содержит константную область легкой цепи, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20, и константную область тяжелой цепи, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22.
21. Антитело по любому из пп.1-12, 16 или 17, отличающееся тем, что оно содержит переменную область легкой цепи, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2, и переменную область тяжелой цепи, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8.
22. Антитело по п.21, отличающееся тем, что переменная область легкой цепи кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:1, а переменная область тяжелой цепи кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:7.
23. Нуклеотидная последовательность, кодирующая антитело по любому из пп.1-22.
24. Вектор на основе рекомбинантной ДНК, который содержит нуклеотидную последовательность по п.23.
25. Вектор на основе рекомбинантной ДНК по п.24, представляющий собой экспрессионный вектор.
26. Клетка-хозяин, которая содержит вектор по п.24 или 25.
27. Клетка-хозяин по п.26, отличающаяся тем, что представляет собой эукариотическую клетку.
28. Клетка-хозяин по п.27, отличающаяся тем, что представляет собой клетку млекопитающего.
29. Клетка-хозяин по п.28, отличающаяся тем, что представляет собой СНО- или COS-клетку.
30. Способ получения антитела по любому из пп.1-22, включающий стадии
  - (а) культивирования клетки-хозяина по любому из пп.26-29 в условиях, обеспечивающих экспрессию антитела клеткой-хозяином, и
  - (б) выделения антитела.
31. Способ по п.30, отличающийся тем, что клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего, предпочтительно СНО- или COS-клетку.
32. Способ получения антитела по любому из пп.1-22, заключающийся в том, что культивируют клетку-хозяин, которую предварительно подвергли совместной трансфекции (котрансфекции) двумя плазмидами, несущими экспрессионные единицы легкой и тяжелой цепей соответственно, и выделяют антитело.
33. Антитело по любому из пп.1-22, отличающееся тем, что оно конъюгировано с терапевтическим агентом.
34. Антитело по п.33, отличающееся тем, что терапевтический агент выбран из группы, включающей радиоизотопы, токсины, токсины, воспалительные агенты и химиотерапевтические агенты.

35. Антитело по п.34, отличающееся тем, что радиоизотоп представляет собой радиоизотоп с  $\beta$ -излучением.

36. Антитело по п.35, отличающееся тем, что радиоизотоп выбран из группы, включающей  $^{186}\text{Рений}$ ,  $^{188}\text{Рений}$ ,  $^{131}\text{Иод}$  и  $^{90}\text{Иттрий}$ .

37. Антитело по любому из пп.1-22, отличающееся тем, что оно является меченым.

38. Антитело по п.37, отличающееся тем, что метка представляет собой выявляемый маркер.

39. Антитело по п.38, отличающееся тем, что выявляемый маркер выбран из группы, включающей ферменты, красители, радиоизотопы, диоксигенин и биотин.

40. Антитело по любому из пп.1-22, конъюгированное с визуализирующим агентом.

41. Антитело по п.40, отличающееся тем, что визуализирующий агент представляет собой радиоизотоп.

42. Антитело по п.41, отличающееся тем, что радиоизотоп представляет собой изотоп с  $\gamma$ -излучением.

43. Антитело по п.42, отличающееся тем, что радиоизотоп представляет собой  $^{125}\text{I}$ .

44. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп.1-22 и фармацевтически приемлемый носитель.

45. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп.33-36 и фармацевтически приемлемый носитель.

46. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп.40-43 и фармацевтически приемлемый носитель.

47. Фармацевтическая композиция по пп.44-46, предназначенная для лечения или визуализации опухолей, связанных с активированными фибробластами стромы и предпочтительно представляющих собой опухоли, выбранные из группы злокачественных опухолей, включающей колоректальные опухоли, немелкоклеточный рак легкого, опухоли молочной железы, рак головы и шеи, опухоли яичника, опухоли легкого, опухоли мочевого пузыря, опухоли поджелудочной железы и метастатические опухоли головного мозга.

48. Применение антитела по любому из пп.1-22 для лечения раковых заболеваний, связанных с активированными фибробластами.

49. Применение антитела по любому из пп.33-36 для лечения раковых заболеваний, связанных с активированными фибробластами.

50. Применение антитела по любому из пп.40-43 для визуализации активированных фибробластов стромы.

51. Применение антитела по любому из пп.37-39 для обнаружения в образце активированных фибробластов стромы.

52. Способ лечения опухолей, связанных с активированными фибробластами стромы, обладающими способностью образовывать специфический комплекс с антителами по любому из пп.1-22 или 33-36, предусматривающий осуществление контакта опухоли с количеством указанных антител, эффективным для лечения опухоли.

53. Способ по п.52, отличающийся тем, что опухоль выбрана из группы злокачественных опухолей, включающей колоректальные опухоли, немелкоклеточный рак легкого, опухоли молочной железы, рак головы и шеи, опухоли яичника, опухоли легкого, опухоли мочевого пузыря, опухоли поджелудочной железы и метастатические опухоли головного мозга.

54. Способ по п.52, отличающийся тем, что контакт осуществляют *in vitro*.

55. Способ по п.52, отличающийся тем, что контакт осуществляют *in vivo*.

56. Способ обнаружения активированных фибробластов стромы в области заживления раны, воспаления или в опухоли, отличающийся тем, что

(а) осуществляют контакт образца, который может содержать активированные фибробласты стромы с антителом по любому из пп.1-22 или 37-39 в условиях, обеспечивающих формирование комплекса между антителом и антигеном, и

(б) обнаруживают комплекс, тем самым выявляя присутствие активированных фибробластов стромы в области заживления раны, воспаления или в злокачественной опухоли.

57. Способ по п.56, отличающийся тем, что опухоль выбрана из группы злокачественных опухолей, включающей колоректальные опухоли, немелкоклеточный рак легкого, опухоли молочной железы, рак головы и шеи, опухоли яичника, опухоли легкого, опухоли мочевого пузыря, опухоли поджелудочной железы и метастатические опухоли головного мозга.

58. Способ по п.56 или 57, отличающийся тем, что антитело представляет собой антитело по любому из пп.37-39.

59. Способ визуализации активированных фибробластов стромы в области заживлении раны, воспаленной кожи или в опухоли больного человека, отличающийся тем, что

(а) больному вводят антитело по любому из пп.1-22, конъюгированное с визуализирующим агентом в условиях, обеспечивающих образование комплекса антитело-антиген, и



(б) осуществляют визуализацию любого полученного таким образом комплекса.

60. Способ по п.59, отличающийся тем, что опухоль выбрана из группы злокачественных опухолей, включающей колоректальные опухоли, немелкоклеточный рак легкого, опухоли молочной железы, рак головы и шеи, опухоли яичника, опухоли легкого, опухоли мочевого пузыря, опухоли поджелудочной железы и метастазирующие опухоли головного мозга.

61. Способ обнаружения стромы опухоли, отличающийся тем, что

(а) осуществляют контакт тестируемого образца с антителом по любому из пп.1-22 в условиях, обеспечивающих образование комплекса антитело-антиген,

(б) обнаруживают любой полученный таким образом комплекс и

(в) устанавливают взаимосвязь между выявленным комплексом и наличием стромы опухоли.

62. Способ по п.60, отличающийся тем, что антитело метят выявляемым маркером.

63. Способ визуализации стромы опухоли у больного человека, предусматривающий

(а) введение больному антитела по любому из пп.40-43 в условиях, обеспечивающих образование комплекса антитело-антиген, и

(б) выявляют любой полученный таким образом комплекс, тем самым осуществляя визуализацию стромы опухоли у больного человека.

64. Антитело, имеющее гипервариабельные участки моноклонального антитела F19 мыши (ATCC HB 8269), специфически связывающееся с белком активации фибробластов, содержащее вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2.

65. Антитело по п.64, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12.

66. Антитело по пп.64 или 65, содержащее константную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20, и константную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22.

67. Молекула ДНК, кодирующая антитело по любому из пп.64-66.

68. Клетка-хозяин, содержащая молекулу ДНК по п.67.

69. Способ получения антитела по любому из пп.64-66, предусматривающий стадии

(а) культивирования клетки-хозяина по п.68 в условиях, обеспечивающих экспрессию антитела клеткой-хозяином, и

(б) выделения антитела.

70. Антитело по любому из пп.64-66, конъюгированное с радиоизотопом, предпочтительно с  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$  или  $^{90}\text{Y}$ .

71. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп. 64-66 или 70 и фармацевтически приемлемый носитель.

1	11	21	31	41
GACATTGTGA	TGACCCAATC	TCCAGACTCT	TTGGCTGTGT	CTCTAGGGGA
51	61	71	81	91
GAGGGCCACC	ATCAACTGCA	AGTCCAGTCA	GAGCCTTTTA	TATTCTAGAA
101	111	121	131	141
ATCAAAAGAA	CTACTTGGCC	TGGTATCAGC	AGAAACCAGG	ACAGCCACCC
151	161	171	181	191
AAACTCCTCA	TCTTTTGGGC	TAGCACTAGG	GAATCTGGGG	TACCTGATAG
201	211	221	231	241
GTTTCAGTGGC	AGTGGGTTTG	GGACAGACTT	CACCCTCACC	ATTAGCAGCC
251	261	271	281	291
TGCAGGCTGA	AGATGTGGCA	GTTTATTACT	GTCAGCAATA	TTTTCAGCTAT
301	311	321	331	339
CCGCTCACGT	TCCGACAAGG	GACCAAGGTG	GAAATAAAA	

Фиг. 1

1	11	21	31	41
DIVMTQSPDS	LAVSLGERAT	INCKSSQSLL	YSRNQKNYLA	WYQQKPGQPP
51	61	71	81	91
KLIFWASTR	ESGVPDRFSG	SGFGTDFTLT	ISSLQAEDVA	VYYCQQYFSY
101	111			
PLTFGQGTKV	EIK			

Фиг. 2

1	11	21	31	41
GACATTGTGA	TGACCCAATC	TCCAGACTCT	TTGGCTGTGT	CTCTAGGGGA
51	61	71	81	91
GAGGGCCACC	ATCAACTGCA	AGTCCAGTCA	GAGCCTTTTA	TATTCTAGAA
101	111	121	131	141
ATCAAAAGAA	CTACTTGGCC	TGGT <u>T</u> CCAGC	AGAAACCAGG	ACAGCCACCC
151	161	171	181	191
AAACTCCTCA	TCTTTTGGGC	TAGCACTAGG	GAATCTGGGG	TACCTGATAG
201	211	221	231	241
G TTCAGTGGC	AGTGGGTTTG	GGACAGACTT	CACCCTCACC	ATTAGCAGCC
251	261	271	281	291
TGCAGGCTGA	AGATGTGGCA	GTTTAT <u>G</u> ACT	GTCA <u>A</u> CAATA	TTTTAGCTAT
301	311	321	331	339
CCGCTCACGT	TCGGACAAGG	GACCAAGGTG	GAAATAAAA	

Фиг. 3

1	11	21	31	41
DIVMTQSPDS	LAVSLGERAT	INCKSSQSL	YSRNQKNYLA	W <u>F</u> QQKPGQPP
51	61	71	81	91
KLIFWASTR	ESGVPDRFSG	SGFGTDFTLT	ISSLQAEDVA	VY <u>D</u> CQQYFSY
101	111			
PLTFGQGTKV	EIK			

Фиг. 4

1	11	21	31	41
GACATTGTGA	TGACCCAATC	TCCAGACTCT	TTGGCTGTGT	CTCTAGGGGA
51	61	71	81	91
GAGGGCCACC	ATCAACTGCA	AGTCCAGTCA	GAGCCTTTTA	TATTCTAGAA
101	111	121	131	141
ATCAAAAGAA	CTACTTGGCC	TGGTATCAGC	AGAAACCAGG	ACAGCCACCC
151	161	171	181	191
AAACTCCTCA	TCTAT <u>T</u> GGGC	TAGCACTAGG	GAATCTGGGG	TACCTGATAG
201	211	221	231	241
G TTCAGTGGC	AGTGGGTTTG	GGACAGACTT	CACCCTCACC	ATTAGCAGCC
251	261	271	281	291
TGCAGGCTGA	AGATGTGGCA	GTTTATTACT	GTCAGCAATA	TTTTAGCTAT
301	311	321	331	339
CCGCTCACGT	TCGGACAAGG	GACCAAGGTG	GAAATAAAA	

Фиг. 5

1	11	21	31	41
DIVMTQSPDS	LAVSLGERAT	INCKSSQSL	YSRNQKNYLA	WYQQKPGQPP
51	61	71	81	91
KLIIYWASTR	ESGVPDRFSG	SGFGTDFTLT	ISSLQAEDVA	VYYCQQYFSY
101	111			
PLTFGQGTKV	EIK			

Фиг. 6

1  
 CAGGTGCAAC TAGTGCAGTC CGGCGCCGAA GTGAAGAAAC CCGGTGCTTC  
 51  
 CGTGAAAGTC AGCTGTAAAA CTAGTAGATA CACCTTCACT GAATACACCA  
 101  
 TACACTGGGT TAGACAGGCC CCTGGCCAAA GGCTGGAGTG GATAGGAGGT  
 151  
 ATTAATCCTA ACAATGGTAT TCCTAACTAC AACCAGAAGT TCAAGGGCCG  
 201  
 GGCCACCTTG ACCGTAGGCA AGTCTGCCAG CACCGCCTAC ATGGAAGTGT  
 251  
 CCAGCCTGCG CTCCGAGGAC ACTGCAGTCT ACTACTGCGC CAGAAGAAGA  
 301  
 ATCGCCTATG GTTACGACGA GGGCCATGCT ATGGACTACT GGGGTCAAGG  
 351 372  
 AACCCTTGTC ACCGTCTCCT CA

Фиг. 7

1	11	21	31	41
QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKTSRYTFT	EYTIHWVRQA	PGQRLEWIGG
51	61	71	81	91
INPNNGIPNY	NQKFKGRATL	TVGKSASTAY	MELSSLRSED	TAVYYCARRR
101	111	121-124		
IAYGYDEGHA	MDYWGQGLV	TVSS		

Фиг. 8

1  
 CAGGTGCAAC TAGTGCAGTC CGGCGCCGAA GTGAAGAAAC CCGGTGCTTC  
 51  
 CGTGAAAGTC AGCTGTAAAA CTAGTAGATA CACCTTCACT GAATACACCA  
 101  
 TACACTGGGT TAGACAGGCC CCTGGCCAAA GGCTGGAGTG GATAGGAGGT  
 151  
 ATTAATCCTA ACAATGGTAT TCCTAACTAC AACCAGAAGT TCAAGGGCCG  
 201  
 GGCCACCTTG ACCGTAGGCA AGTCTGCCAG CACCGCCTAC ATGGAAGTGT  
 251  
 CCAGCCTGCG CTCCGAGGAC ACTGCAGTCT ACTTCTGCGC CAGAAGAAGA  
 301  
 ATCGCCTATG GTTACGACGA GGGCCATGCT ATGGACTACT GGGGTCAAGG  
 351 372  
 AACCCTTGTC ACCGTCTCCT CA

Фиг. 9

1	11	21	31	41
QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKTSRYTFT	EYTIHWVRQA	PGQRLEWIGG
51	61	71	81	91
INPNNGIPNY	NQKFKGRATL	TVGKSASTAY	MELSSLRSED	TAVY <u>F</u> CARRR
101	111	121-124		
IAYGYDEGHA	MDYWGQGLV	TVSS		

Фиг. 10

1  
 CAGGTGCAAC TAGTGCAGTC CGGCGCCGAA GTGAAGAAAC CCGGTGCTTC  
 51  
 CGTGAAAGTC AGCTGTAAAA CTAGTAGATA CACCTTCACT GAATACACCA  
 101  
 TAACTGGGT TAGACAGGCC CCTGGCCAAA GGCTGGAGTG GATAGGAGGT  
 151  
 ATTAATCCTA ACAATGGTAT TCCTAACTAC AACCAGAAGT TCAAGGGCCG  
 201  
 GGTCACCATC ACCGTAGACA CCTCTGCCAG CACCGCCTAC ATGGAAGTGT  
 251  
 CCAGCCTGCG CTCCGAGGAC ACTGCAGTCT ACTACTGCGC CAGAAGAAGA  
 301  
 ATCGCCTATG GTTACGACGA GGGCCATGCT ATGGACTACT GGGGTCAAGG  
 351 372  
 AACCTTGTC ACCGTCTCCT CA

Фиг. 11

1	11	21	31	41
QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKTSRYTFT	EYTIHWVRQA	PGQRLEWIGG
51	61	71	81	91
INPNNGIPNY	NQKFKGRV <u>TI</u>	TV <u>DT</u> SASTAY	MELSSLRSED	TAVYYCARRR
101	111	121-124		
IAYGYDEGHA	MDYWGQGLV	TVSS		

Фиг. 12

1  
 CAGGTGCAAC TAGTGCAGTC CGGCGCCGAA GTGAAGAAAC CCGGTGCTTC  
 51  
 CGTGAAAGTC AGCTGTAAAA CTAGTAGATA CACCTTCACT GAATACACCA  
 101  
 TAACTGGGT TAGACAGGCC CCTGGCCAAA GGCTGGAGTG GATAGGAGGT  
 151  
 ATTAATCCTA ACAATGGTAT TCCTAACTAC AACCAGAAGT TCAAGGGCCG  
 201  
 GGTCACCATC ACCGTAGACA CCTCTGCCAG CACCGCCTAC ATGGAAGTGT  
 251  
 CCAGCCTGCG CTCCGAGGAC ACTGCAGTCT ACTTCTGCGC CAGAAGAAGA  
 301  
 ATCGCCTATG GTTACGACGA GGGCCATGCT ATGGACTACT GGGGTCAAGG  
 351 372  
 AACCTTGTC ACCGTCTCCT CA

Фиг. 13

1	11	21	31	41
QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKTSRYTFT	EYTIHWVRQA	PGQRLEWIGG
51	61	71	81	91
INPNNGIPNY	NQKFKGRV <u>TI</u>	TV <u>DT</u> SASTAY	MELSSLRSED	TAVY <u>F</u> CARRR
101	111	121-124		
IAYGYDEGHA	MDYWGQGLV	TVSS		

Фиг. 14

1  
 CAGGTGCAAC TAGTGCAAGTC CGGCGCCGAA GTGAAGAAAC CCGGTGCTTC  
 51  
 CGTGAAAGTC AGCTGTAAAA CTAGTGGATA CACCTTCACT GAATACACCA  
 101  
 TACACTGGGT TAGACAGGCC CCTGGCCAAA GGCTGGAGTG GATAGGAGGT  
 151  
 ATTAATCCTA ACAATGGTAT TCCTAACTAC AACCAGAAGT TCAAGGGCCG  
 201  
 GGTCACCATC ACCGTAGACA CCTCTGCCAG CACCGCCTAC ATGGAAGTGT  
 251  
 CCAGCCTGCG CTCCGAGGAC ACTGCAGTCT ACTACTGCGC CAGAAGAAGA  
 301  
 ATCGCCTATG GTTACGACGA GGGCCATGCT ATGGACTACT GGGGTCAAGG  
 351 372  
 AACCTTGTC ACCGTCTCCT CA

Фиг. 15

1	11	21	31	41
QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKTSGYTFT	EYTIHWVRQA	PGQRLEWIGG
51	61	71	81	91
INPNNGIPNY	NQKFKGRVTI	TVDT <u>S</u> ASTAY	MELSSLRSED	TAVYYCARRR
101	111	121-124		
IAYGYDEGHA	MDYWGQGTLV	TVSS		

Фиг. 16

1  
 DIVMSQSPSS LAVSVGEKVT MSCKSSQSL L YSRNQKNYLA WFQQKPGQSP  
 51  
 KLLIFWASTR ESGVPDRFTG SGFGTDFNLT ISSVQAEDLA VYDCQQYFSY  
 101  
 PLTFGAGTKL ELKRTVAAPS VFIFPPSDEQ LKSGTASVVC LLNNFYPREA  
 151  
 KVQWKVDNAL QSGNSQESVT EQDSKDSTYS LSSTLTLSKA DYEKHKVYAC  
 201  
 EVTHQGLSSP VTKSFNRGEC

Фиг. 17

1  
 VQLQQSGPEL VKPGASVKMS CKTSRYTFTE YTIHWVRQSH GKSLEWIGGI  
 51  
 NPNNGIPNYN QKFKGRATLT VGKSSSTAYM ELRSLTSEDS AVYFCARRRI  
 101  
 AYGDEGHAM DYWGQGTSTV VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC  
 151  
 LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG  
 201  
 TQTYICNVNH KPSNTKVDKK VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP  
 251  
 PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE  
 301  
 QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR  
 351  
 EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT  
 401  
 PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSL  
 451  
 PGK

Фиг. 18

340	350	360	370	380
CGTACTGTGG	CTGCACCATC	TGTCTTCATC	TTCCCGCCAT	CTGATGAGCA
390	400	410	420	430
GTTGAAATCT	GGAAGTGCCT	CTGTTGTGTG	CCTGCTGAAT	AACTTCTATC
440	450	460	470	480
CCAGAGAGGC	CAAAGTACAG	TGGAAGGTGG	ATAACGCCCT	CCAATCGGGT
490	500	510	520	530
AACTCCCAGG	AGAGTGTAC	AGAGCAGGAC	AGCAAGGACA	GCACCTACAG
540	550	560	570	580
CCTCAGCAGC	ACCCTGACGC	TGAGCAAAGC	AGACTACGAG	AAACACAAAG
590	600	610	620	630
TCTACGCCTG	CGAAGTCACC	CATCAGGGCC	TGAGCTCGCC	CGTCACAAAG
640	650	660		
AGCTTCAACA	GGGGAGAGTGT			

Фиг. 19

114	124	134	144	154
RTVAAPSVFI	FPPSDEQLKS	GTASVVCLLN	NFYPREAKVQ	WKVDNALQSG
164	174	184	194	204
NSQESVTEQD	SKDSTYSLSS	TLTSLKADYE	KHKVYACEVT	HQGLSSPVTK
214-220				
SFNRGEC				

Фиг. 20

373  
GCCTCCACCA AGGGCCCATC GGTCTTCCCC CTGGCACCCCT CCTCCAAGAG

423  
CACCTCTGGG GGCACAGCGG CCCTGGGCTG CCTGGTCAAG GACTACTTCC

473  
CCGAACCGGT GACGGTGTGCG TGGAAGTCAG GCGCCCTGAC CAGCGGCGTG

523  
CACACCTTCC CGGCTGTCCT ACAGTCCTCA GGACTCTACT CCCTCAGCAG

573  
CGTGGTGACC GTGCCCTCCA GCAGCTTGGG CACCCAGACC TACATCTGCA

623  
ACGTGAATCA CAAGCCCAGC AACACCAAGG TGGACAAGAA AGTTGAGCCC

673  
AAATCTTGTTG ACAAAGTCA CACATGCCCA CCGTGCCCAG CACCTGAACT

723  
CCTGGGGGGA CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCAAAAACCC AAGGACACCC

773  
TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC

823  
CACGAAGACC CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT

873  
GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC

923  
GGGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG

973  
GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA

1023  
AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC

1073  
TGCCCCCATC CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC

1123  
CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA

1173  
TGGGCAGCCG GAGAACAACCT ACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG

1223  
ACGGCTCCTT CTTCTCTAC AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG

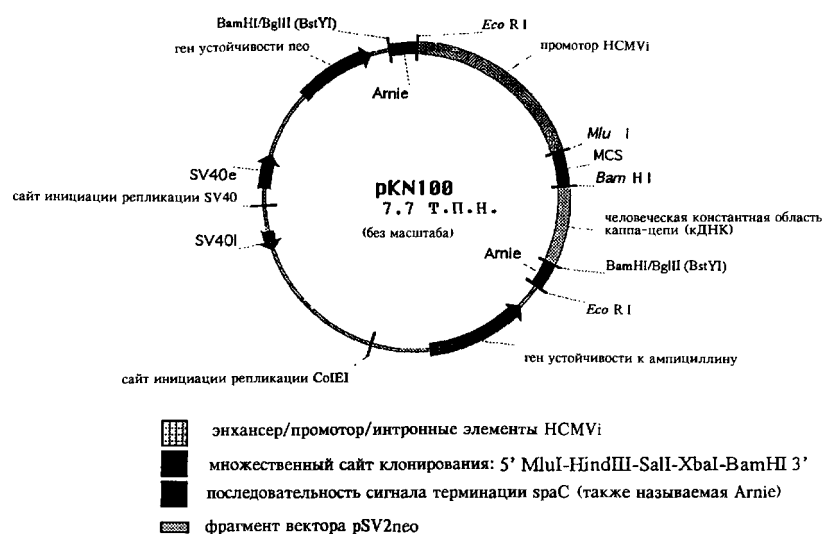
1273  
CAGCAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA

1323 1362  
CCTACTACAG CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC TCCGGGTAAA

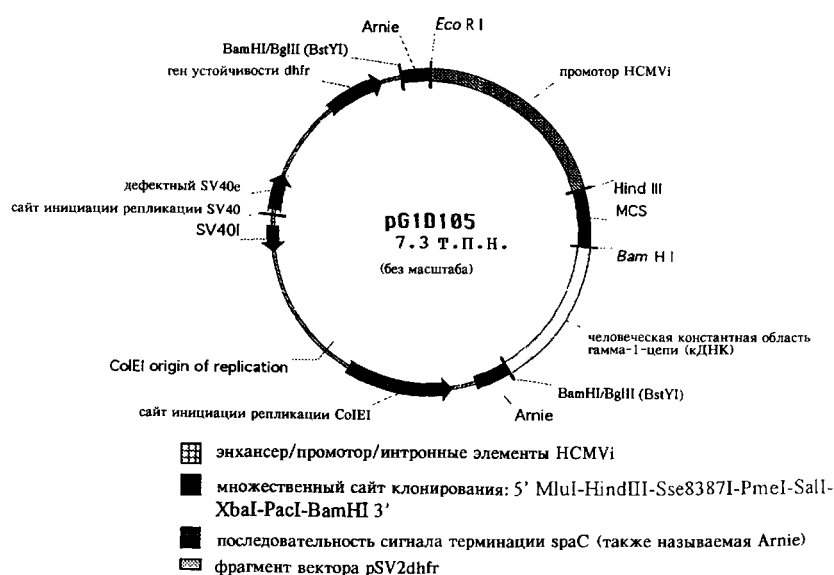
Фиг. 21

125  
 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV  
 175  
 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP  
 225  
 KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMIS RTP EVTCVVVDVS  
 275  
 HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLNQDWLNGK  
 325  
 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC  
 375  
 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW  
 425  
 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 454

Фиг. 22



Фиг. 23А



Фиг. 23Б

HindIII  
 aagcttGCGGCCACCatggattcacagggccagggttcttatgttactgccgctatgggta  
 1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 ttcgaaCGGCGGTGGTaccctaagtgtccgggtccaagaatacaatgacggcgatacccat  
последовательность Козака  
 M D S Q A Q V L M L L P L W V

tctgggtacctgtggggacattgtgatgtcacagtctccatcctccctagctgtgtcagtt  
 61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 agaccatggacacccctgtaacactacagtgtcagaggtaggagggatcgacacagtcaa  
 S G T C G D I V M S Q S P S S L A V S V

ggagagaagggttactatgagctgcaagtccagtcagagccttttatatagtcgtaaatcaa  
 121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 cctctcttccaatgatactcgacgttcagggtcagtcctcgaaaatatatcagcattagtt  
 G E K V T M S C K S S Q S L L Y S R N Q  
 CDR 1

aagaactacttggcctgggtccagcagaagccagggcagtcctcctaaactgctgattttc  
 181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 ttcttgatgaaccggaccaagggtcgtcttcgggtcccgtcagaggatttgacgactaaaag  
K N Y L A W F Q Q K P G Q S P K L L I F

tgggcatccactaggggaatctggggccctgatcgcttcacaggcagtggtttgggacg  
 241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 acccgtaggtgatcccttagaccccagggtactagcgaagtgtccgtcacctaaaccctgc  
W A S T R E S G V P D R F T G S G F G T  
 CDR 2

gatttcaatctcaccatcagcagtggtgcagggtgaggacctggcagtttatgactgtcag  
 301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 ctaaagttagagtggtagtcgtcacacgtccgactcctggaccgtcaaatactgacagtc  
 D F N L T I S S V Q A E D L A V Y D C Q

caatatttttagctatccgctcacgttcgggtgctgggaccaagctggagctgaAACGTGAG  
 361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 gttataaaatcgataggcgagtgcaagccacgaccctgggttcgacctcgactTTGCACTG  
сайт сплайсинга донора  
Q Y F S Y P L T F G A G T K L E L K  
 CDR 3

BamHI  
 Tggatcc  
 421 ----- 427  
 Acctagg

Фиг. 24



HindIII  
 AAGCTTGCCGCCACCATGGGATGGAGCTGGGTCTTTCTCTTTCTCCTGTCAGGAAGTCA  
 1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 TTCGAACGGCGGTGGTACCCTACCTCGACCCAGAAAGAGAAAGAGGACAGTCCTTGACGT  
последовательность Козака  
 M G W S W V F L F L L S G T A

GGTGTCTCTCTGAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCT  
 61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 CCACAGGAGAGACTCCAGGTTCGACGTTGTCAGACCTGGACTCGACCACTTCGGACCCCCGA  
 G V L S E V Q L Q Q S G P E L V K P G A

TCAGTAAAGATGTCCTGCAAGACTTCTAGATACACATTCAGTGAATACACCATACTGG  
 121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 AGTCATTTCTACAGGACGTTCTGAAGATCTATGTGTAAGTGACTTATGTGGTATGTGACC  
 S V K M S C K T S R Y T F T E Y T I H W  
 CDR 1

GTGAGACAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGGTATTAATCCTAACAAATGGT  
 181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 CACTCTGTCTCGGTACCTTTCTCGGAACCTACCTAACCTCCATAATTAGGATTGTTACCA  
 V R Q S H G K S L E W I G G I N P N N G  
 CDR 2

ATTCCTAACTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAGGGCCACATTGACTGTAGGCAAGTCCTCC  
 241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 TAAGGATTGATGTTAGTCTTCAAGTTCCCGTCCCGGTGTAAGTACATCCGTTTCAGGAGG  
I P N Y N Q K F K G R A T L T V G K S S

AGCACCGCCTACATGGAGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGATTCTGCGGTCTATTTCTGT  
 301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 TCGTGGCGGATGTACCTCGAGGCGTCGGACTGTAGACTCCTAAGACGCCAGATAAAGACA  
 S T A Y M E L R S L T S E D S A V Y F C

GCAAGAAGAAGAATCGCCTATGGTTACGACGAGGGCCATGCTATGGACTACTGGGGTCAA  
 361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 CGTTCTTCTTCTTAGCGGATACCAATGCTGCTCCCGGTACGATACCTGATGACCCCAGTT  
 A R R R I A Y G Y D E G H A M D Y W G Q  
 CDR 3

BamHI  
 GGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGGTGAGTGGATCC  
 421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 468  
 CCTTGGAGTCAGTGGCAGAGGAGTCCACTCACCTAGG  
сайт сплайсинга донора  
 G T S V T V S S

Фиг. 25

1	gaattccagc	acactggcgg	ccggtt	<u>ACTAG</u>	TTATTAATAG	TAATCAATTA
51	CGGGGTCATT	AGTTCATAGC	CCATATATGG	AGTTCCGCGT	TACATAACTT	
101	ACGGTAAATG	GCCCGCCTGG	CTGACCGCCC	AACGACCCCC	GCCCATTGAC	
151	GTCAATAATG	ACGTATGTTC	CCATAGTAAC	GCCAATAGGG	ACTTTCCATT	
201	GACGTCAATG	GGTGGAGTAT	TTACGGTAAA	CTGCCCACCT	GGCAGTACAT	
251	CAAGTGTATC	ATATGCCAAG	TACGCCCCCT	ATTGACGTCA	ATGACGGTAA	
301	ATGGCCCGCC	TGGCATTATG	CCCAGTACAT	GACCTTATGG	GACTTTCCTA	
351	CTTGGCAGTA	CATC	<u>TACGTA</u>	TTAGTCATCG	CTATTACCAT	GGTGATGCGG
401	TTTTTGGCAGT	ACATCAATGG	GCGTGGATAG	CGGTTTGACT	CACGGGGATT	
451	TCCAAGTCTC	CACCCCATTG	ACGTCAATGG	GAGTTTGTTT	TGGCACCAAA	
501	ATCAACGGGA	CTTTCCAAAA	TGTCGTAACA	ACTCCGCCCC	ATTGACGCAA	
551	ATGGGCGGTA	GGCGTGTACG	GTGGGAGGTC	TATATAAGCA	GAGCTCGTTT	
601	AGTGAACCGT	CAGATCGCCT	GGAGACGCCA	TCCACGCTGT	TTTGACCTCC	
651	ATAGAAGACA	CCGGGACCGA	TCCAGCCTCC	<u>GCGGCCGGA</u>	ACGGTGCATT	
701	GGAACGCGGA	TTCCCCGTGC	CAAGAGTGAC	GTAAGTACCG	CCTATAGAGT	
751	CTATAGGCCC	ACCCCCTTGG	CTTCTTATGC	ATGCTATACT	GTTTTTGGCT	
801	TGGGGTCTAT	ACACCCCCGC	TTCCTCATGT	TATAGGTGAT	GGTATAGCTT	
851	AGCCTATAGG	TGTGGGTTAT	TGACCATTAT	TGACCACTCC	CCTATTGGTG	
901	ACGATACTTT	CCATTACTAA	TCCATAACAT	GGCTCTTTGC	CACAACTCTC	
951	TTTATTGGCT	ATATGCCAAT	AACTGTCTCT	TCAGAGACTG	ACACGGACTC	
1001	TGTATTTTTA	CAGGATGGGG	TCTCATTTAT	TATTTACAAA	TTCACATATA	
1051	CAACACCACC	GTCCCCAGTG	CCCGCAGTTT	TTATTAACAA	TAACGTGGGA	
1101	TCTCCACGCG	AATCTCGGGT	ACGTGTTCCG	<u>GACATGGGCT</u>	CTTCTCCGGT	
1151	AGCGGCGGAG	CTTCTACATC	CGAGCCCTGC	TCCCATGCCT	CCAGCGACTC	
1201	ATGGTCGCTC	GGCAGCTCCT	TGCTCCTAAC	AGTGGAGGCC	AGACTTAGGC	
1251	ACAGCACGAT	GCCCACCACC	ACCAGTGTGC	CGCACAAGGC	CGTGGCGGTA	

ФИГ. 26/1

1301	GGGTATGTGT	CTGAAAATGA	GCTCgggggag	cgggcttgca	cgctgacgc
		Afl II			
1351	at tt t t g g a a g a	<u>ct ta ag g c</u> a g	c g g c a g a a g a	a g a t g c a g g c	a g c t g a g t t g
1401	t t g t g t t c t g	a t a a g a g t c a	g a g g t a a c t c	c c g t t g c g g t	g c t g t t a a c g
1451	g t g g a g g g c a	g t g t a g t c t g	a g c a g t a c t c	g t t g c t g c c g	c g c g c g c c a c
1501	c a g a c a t a a t	a g c t g a c a g a	c t a a c a g a c t	g t t c c t t t c c	a t g g g t c t t t
		Mlu I		Hind III	
1551	t c t g c a g t c a	c c g t c c t t g a	<u>c a c g c g t</u> c t c	<u>g g g a a g c t t</u> G	C C G C C A C C A T
					M
					Kpn I
1601	G G A T T C A C A G	G C C C A G G T T C	T T A T G T T A C T	G C C G C T A T G G	G T A T C T <u>G G T A</u>
	D S Q A Q V	L M L L	P L W	V S G	
1651	<u>C C T G T G G G G A</u>	C A T T G T G A T G	T C A C A G T C T C	C A T C C T C C C T	A G C T G T G T C A
	T C G D I V M	S Q S	P S S L	A V S	
1701	G T T G G A G A G A	A G G T T A C T A T	G A G C T G C A A G	T C C A G T C A G A	G C C T T T T A T A
	V G E K V T M	S C K	S S Q	S L L Y	
	<u>Xba I</u>			<u>CDR 1</u>	
1751	<u>T T C T A G A A A T</u>	C A A A G A A C T	A C T T G G C C T G	G T T C C A G C A G	A A G C C A G G G C
	<u>S R N Q K N</u>	<u>Y L A W</u>	<u>F Q Q</u>	<u>K P G</u>	
1801	A G T C T C C T A A	A C T G C T G A T T	T T C T G G G C A T	C C A C T A G G G A	A T C T G G G G T C
	Q S P K L L I	F W A	S T R E	S G V	
				<u>CDR 2</u>	
1851	C C T G A T C G C T	T C A C A G G C A G	T G G A T T T G G G	A C G G A T T T C A	A T C T C A C C A T
	P D R F T G S	G F G	T D F	N L T I	
1901	C A G C A G T G T G	C A G G C T G A G G	A C C T G G C A G T	T T A T G A C T G T	C A G C A A T A T T
	S S V Q A E	D L A V	Y D C	<u>Q Q Y</u>	
1951	T T A G C T A T C C	G C T C A C G T T C	G G T G C T G G G A	C C A A G C T G G A	G C T G A A A C <u>G T</u>
	<u>F S Y P L T</u>	<u>F G A G</u>	<u>T K L E</u>	<u>L K R</u>	
	<u>CDR 3</u>				
	BamH I				
2001	<u>G A G T g g a t c c</u>	A T C T G G G A T A	A G C A T G C T G T	T T T C T G T C T G	T C C C T A A C A T
2051	G C C C T G T G A T	T A T G C G C A A A	C A A C A C A C C C	A A G G G C A G A A	C T T T G T T A C T
2101	T A A A C A C C A T	C C T G T T T G C T	T C T T T C C T C A	<u>G G A A C T G T G G</u>	C T G C A C C A T C
				T V	A A P S
2151	T G T C T T C A T C	T T C C C G C C A T	C T G A T G A G C A	G T T G A A A T C T	G G A A C T G C C T
	V F I F P P	S D E Q	L K S	G T A	
2201	C T G T T G T G T G	C C T G C T G A A T	A A C T T C T A T C	C C A G A G A G G C	C A A A G T A C A G
	S V V C L L N	N F Y	P R E A	K V Q	
2251	T G G A A G G T G G	A T A A C G C C C T	C C A A T C G G G T	A A C T C C C A G G	A G A G T G T C A C
	W K V D N A L	Q S G	N S Q	E S V T	
2301	A G A G C A G G A C	A G C A A G G A C A	G C A C C T A C A G	C C T C A G C A G C	A C C C T G A C G C
	E O D S K D	S T Y S	L S S	T L T	

ФИГ. 26/2

2351 TGAGCAAAGC AGACTACGAG AAACACAAAG TCTACGCCTG CGAAGTCACC  
 L S K A D Y E K H K V Y A C E V T  
 2401 CATCAGGGCC TGAGCTCGCC CGTCACAAG AGCTTCAACA GGGGAGAGTG  
 H Q G L S S P V T K S F N R G E C  
 2451 TTAGAGGGAG AAGTGCCCCC ACCTGCTCCT CAGTTCCAGC CTGACCCCCT  
 \*  
 2501 CCCATCCTTT GGCCTCTGAC CCTTTTTCCT CAGGGGACCT ACCCCTATTG  
 2551 CGGTCCTCCA GCTCATCTTT CACCTCACCC CCCTCCTCCT CCTTGGCTTT  
 2601 AATTATGCTA ATGTTGGAGG AGAATGAATA AATAAAGTGA ATCTTTGCAC  
 2651 CTGTGGTGGA TCTAATAAAA GATATTTATT TTCATTAGAT ATGTGTGTTG  
 2701 GTTTTTTGTG TGCAGTGCCT CTATCTGGAG GCCAGGTAGG GCTGGCCTTG  
 2751 GGGGAGGGGG AGGCCAGAAT GACTCCAAGA GCTACAGGAA GGCAGGTCAG  
 2801 AGACCCCACT GGACAAACAG TGGCTGGACT CTGCACCATA ACACACAATC  
 2851 AACAGGGGAG TGAGCTGGAA ATTTGCTAGC GAATTCTTGA AGACGAAAGG  
 2901 GCCTCGTGAT ACGCCTATTT TTATAGGTTA ATGTCATGAT AATAATGGTT  
 2951 TCTTAGACGT CAGGTGGCAC TTTTCGGGGA AATGTGCGCG GAACCCCTAT  
 3001 TTGTTTATTT TTCTAAATAC ATTCAAATAT GTATCCGCTC ATGAGACAAT  
 3051 AACCTGATA AATGCTTCAA TAATATTGAA AAAGGAAGAG TATGAGTATT  
 3101 CAACATTTCC GTGTCGCCCT TATTCCTTTT TTTGCGGCAT TTTGCCTTCC  
 3151 TGTTTTTGCT CACCCAGAAA CGCTGGTGAA AGTAAAAGAT GCTGAAGATC  
 3201 AGTTGGGTGC ACGAGTGGGT TACATCGAAC TGGATCTCAA CAGCGGTAAG  
 3251 ATCCTTGAGA GTTTTCGCCC CGAAGAACGT TTTCCAATGA TGAGCACTTT  
 3301 TAAAGTTCTG CTATGTGGCG CGGTATTATC CCGTGTTGAC GCCGGGCAAG  
 3351 AGCAACTCGG TCGCCGCATA CACTATTCTC AGAATGACTT GGTGAGTAC  
 3401 TCACCAGTCA CAGAAAAGCA TCTTACGGAT GGCATGACAG TAAGAGAATT  
 3451 ATGCAGTGCT GCCATAACCA TGAGTGATAA CACTGCGGCC AACTTACTTC  
 Pvu I  
 3501 TGACAACGAT CGGAGGACCG AAGGAGCTAA CCGCTTTTTT GCACAACATG  
 3551 GGGGATCATG TAACTCGCCT TGATCGTTGG GAACCGGAGC TGAATGAAGC  
 3601 CATACCAAAC GACGAGCGTG ACACCACGAT GCCTGCAGCA ATGGCAACAA

Фиг. 26/3

3651 CGTTGCGCAA ACTATTA ACT GGC GAACTAC TTACTCTAGC TTCCCGGCAA  
 3701 CAATTAATAG ACTGGATGGA GCGGATAAAA GTTGCAGGAC CACTTCTGCG  
 3751 CTCGGCCCTT CCGGCTGGCT GGT TTTATTGC TGATAAATCT GGAGCCGGTG  
 3801 AGCGTG GGTTC TCGCGGTATC ATTGCAGCAC TGGGGCCAGA TGGTAAGCCC  
 3851 TCCCGTATCG TAGTTATCTA CACGACGGGG AGTCAGGCAA CTATGGATGA  
 3901 ACGAAATAGA CAGATCGCTG AGATAGGTGC CTCACTGATT AAGCATTGGT  
 3951 AACTGTCAGA CCAAGTTTAC TCATATATAC TTTAGATTGA TTTAAACTT  
 4001 CATTTTAAAT TTAAAAGGAT CTAGGTGAAG ATCCTTTTGT ATAATCTCAT  
 4051 GACCAAAATC CCTTAACGTG AGTTTTTCGT CCACTGAGCG TCAGACCCCG  
 4101 TAGAAAAGAT CAAAGGATCT TCTTGAGATC CTTTTTTTCT GCGCGTAATC  
 4151 TGCTGCTTGC AAACAAAAAA ACCACCGCTA CCAGCGGTGG TTTGTTTGCC  
 4201 GGATCAAGAG CTACCAACTC TTTTCCGAA GGTAAGTGGC TTCAGCAGAG  
 4251 CGCAGATACC AAATACTGTC CTTCTAGTGT AGCCGTAGTT AGGCCACCAC  
 4301 TTCAAGAACT CTGTAGCACC GCCTACATAC CTCGCTCTGC TAATCCTGTT  
 4351 ACCAGTGGCT GCTGCCAGTG GCGATAAGTC GTGTCTTACC GGGTTGGACT  
 4401 CAAGACGATA GTTACCGGAT AAGGCGCAGC GGTCGGGCTG AACGGGGGGT  
 4451 TCGTGACAC AGCCCAGCTT GGAGCGAACG ACCTACACCG AACTGAGATA  
 4501 CCTACAGCGT GAGCTATGAG AAAGCGCCAC GCTTCCCGAA GGGAGAAAGG  
 4551 CGGACAGGTA TCCGGTAAGC GGCAGGGTCG GAACAGGAGA GCGCACGAGG  
 4601 GAGCTTCCAG GGGGAAACGC CTGGTATCTT TATAGTCCTG TCGGGTTTCG  
 4651 CCACCTCTGA CTTGAGCGTC GATTTTGTG ATGCTCGTCA GGGGGGCGGA  
 4701 GCCTATGGAA AAACGCCAGC AACGCGGCCT TTTTACGGTT CCTGGCCTTT  
 4751 TGCTGGCCTT TTGCTCACAT GTTCTTTCCCT GCGTTATCCC CTGATTCTGT  
 4801 GGATAACCGT ATTACCGCCT TTGAGTGAGC TGATAACCGCT CGCCGCAGCC  
 4851 GAACGACCGA GCGCAGCGAG TCAGTGAGCG AGGAAGCGGA AGAGCGCCTG  
 4901 ATGCGGTATT TTCTCCTTAC GCATCTGTGC GGTATTTTAC ACCGCATATG

BspLU11I

Bst1107I

4951 GTGCACTCTC AGTACAATCT GCTCTGATGC CGCATAGTTA AGCCAGTATA

5001 CACTCCGCTA TCGCTACGTG ACTGGGTCAT GGCTGCGCCC CGACACCCGC

5051 CAACACCCGC TGACGCGCCC TGACGGGCTT GTCTGCTCCC GGCATCCGCT

5101 TACAGACAAG CTGTGACCGT CTCCGGGAGC TGCATGTGTC AGAGGTTTTTC

5151 ACCGTCAATCA CCGAAACGCG CGAGGCAGCT GTGGAATGTG TGTCAGTTAG

5201 GGTGTGGAAA GTCCCCAGGC TCCCCAGCAG GCAGAAGTAT GCAAAGCATG

5251 CATCTCAATT AGTCAGCAAC CAGGCTCCCC AGCAGGCAGA AGTATGCAAA

5301 GCATGCATCT CAATTAGTCA GCAACCATAG TCCCGCCCCT AACTCCGCCC

5351 ATCCCGCCCC TAACTCCGCC CAGTTCCGCC CATTCTCCGC CCCATGGCTG

Sfi I

5401 ACTAATTTTT TTTATTTATG CAGAGGCCGA GGCCGCTCG GCCTCTGAGC

Stu I/Avr II

5451 TATTCCAGAA GTAGTGAGGA GGCTTTTTTG GAGGCCTAGG CTTTTGCAAA

5501 AAGCTAGCTT CACGCTGCCG CAAGCACTCA GGGCGCAAGG GCTGCTAAAG

5551 GAAGCGGAAC ACGTAGAAAG CCAGTCCGCA GAAACGGTGC TGACCCCGGA

5601 TGAATGTCAG CTACTGGGCT ATCTGGACAA GGGAAAACGC AAGCGCAAAG

5651 AGAAAGCAGG TAGCTTGCAG TGGGCTTACA TGGCGATAGC TAGACTGGGC

5701 GGTTTTATGG ACAGCAAGCG AACCGBAATT GCCAGCTGGG GCGCCCTCTG

5751 GTAAGGTTGG GAAGCCCTGC AAAGTAAACT GGATGGCTTT CTTGCCGCCA

Bgl II/Bcl I

5801 AGGATCTGAT GGCGCAGGGG ATCAAGATCT GATCAAGAGA CAGGATGAGG

5851 ATCGTTTCGC ATGATTGAAC AAGATGGATT GCACGCAGGT TCTCCGGCCG

5901 CTTGGGTGGA GAGGCTATTC GGCTATGACT GGGCACAACA GACAATCGGC

5951 TGCTCTGATG CCGCCGTGTT CCGGCTGTCA GCGCAGGGGC GCCCGGTTCT

6001 TTTTGTCAAG ACCGACCTGT CCGGTGCCCT GAATGAACTG CAGGACGAGG

Msc I

6051 CAGCGCGGCT ATCGTGGCTG GCCACGACGG GCGTTCCTTG CGCAGCTGTG

6101 CTCGACGTTG TCACTGAAGC GGGAAGGGAC TGGCTGCTAT TGGGCGAAGT

6151 GCCGGGGCAG GATCTCCTGT CATCTCACCT TGCTCCTGCC GAGAAAGTAT

6201 CCATCATGGC TGATGCAATG CGGCGGCTGC ATACGCTTGA TCCGGCTACC

6251	TGCCCCATTCTG	ACCACCAAGC	GAAACATCTGC	ATCGAGCGAG	CACGTACTCG
6301	GATGGAAGCC	GGTCTTGTCTG	ATCAGGATGA	TCTGGACGAA	GAGCATCAGG
6351	GGCTCGCGCC	AGCCGAACTG	TTCGCCAGGC	TCAAGGCGCG	CATGCCCCGAC
6401	GGCGAGGATC	TCGTCGTGAC	CCATGGCGAT	GCCTGCTTGC	CGAATATCAT
6451	GGTGGA <sup>AAAT</sup>	GGCCGCTTTT	CTGGATTCAT	CGACTGTGGC	CGGCTGGGTG
6501	<sup>Rsr II</sup> TGG <u>CGGACCG</u>	CTATCAGGAC	ATAGCGTTGG	CTACCCGTGA	TATTGCTGAA
6551	GAGCTTG <sup>GCG</sup>	GCGAATGGGC	TGACCGCTTC	CTCGTGCTTT	ACGGTATCGC
6601	CGCTCCC <sup>GAT</sup>	TCGCAGCGCA	TCGCCTTCTA	TCGCCTTCTT	GACGAGTTCT
6651	TCTGAGCGGG	ACTCTGGGGT	<sup>Nsp V</sup> T <u>CGAAAT</u> GAC	CGACCAAGCG	ACGCCCAACC
6701	TGCCATCACG	AGATTTTCGAT	TCCACCGCCG	CCTTCTATGA	AAGGTTGGGC
6751	TTCGGAATCG	TTTTCCGGGA	CGCCGGCTGG	ATGATCCTCC	AGCGCGGGGA
6801	TCTCATGCTG	GAGTTCTTCG	<sup>Sma I</sup> CCCAC <u>CCCCG</u>	<sup>Nru I</sup> GCTCGATCCC	<u>CTCGCGAGTT</u>
6851	GGTTCAGCTG	CTGCCTGAGG	CTGGACGACC	TCGCGGAGTT	CTACCGGCAG
6901	TGCAAATCCG	TCGGCATCCA	GGAAACCAGC	AGCGGCTATC	CGCGCATCCA
6951	TGCCCCCGAA	CTGCAGGAGT	GGGGAGGCAC	GATGGCCGCT	TTGGTCCCGG
7001	ATCTTTGTGA	AGGAACCTTA	CTTCTGTGGT	GTGACATAAT	TGGACAAACT
7051	ACCTACAGAG	ATTTAAAGCT	CTAAGGTAAA	TATAAAATTT	TTAAGTGTAT
7101	AATGTGTTAA	ACTACTGATT	CTAATTGTTT	GTGTATTTTA	GATTCCAACC
7151	TATGGA <sup>ACTG</sup>	ATGAATGGGA	GCAGTGGTGG	AATGCCTTTA	ATGAGGAAAA
7201	CCTGTTTTTG	TCAGAAGAAA	TGCCATCTAG	TGATGATGAG	GCTACTGCTG
7251	ACTCTCAACA	TTCTACTCCT	CCAAAAAGA	AGAGAAAGGT	AGAAGACCCC
7301	AAGGACTTTC	CTTCAGAATT	GCTAAGTTTT	TTGAGTCATG	CTGTGTTTAG
7351	TAATAGA <sup>ACT</sup>	CTTGCTTGCT	TTGCTATTTA	CACCACAAAG	GAAAAAGCTG
7401	CACTGCTATA	CAAGAAAATT	ATGGAAAAAT	ATTCTGTAAC	CTTTATAAGT
7451	AGGCATAACA	GTTATAATCA	TAACATACTG	TTTTTTCTTA	CTCCACACAG
7501	GCATAGAGTG	TCTGCTATTA	ATAACTATGC	TCAAAAATTG	TGTACCTTTA

ФИГ. 26/6

7551 GCTTTTAAAT TTGTAAAGGG GTTAATAAGG AATATTTGAT GTATAGTGCC  
 7601 TTGACTAGAG ATCATAATCA GCCATACCAC ATTTGTAGAG GTTTTACTTG  
 7651 CTTTAAAAAA CCTCCACAC CTCCCCCTGA ACCTGAAACA TAAAATGAAT  
       Mun I  
 7701 GCAATTGTTG TTGTAACTT GTTTATTGCA GCTTATAATG GTTACAAATA  
 7751 AAGCAATAGC ATCACAAATT TCACAAATAA AGCATTTTTT TCACTGCATT  
 7801 CTAGTTGTGG TTTGTCCAAA CTCATCAATG TATCTTATCA TGTCTGGATC  
 7851 TAATAAAAGA TATTTATTTT CATTAGATAT GTGTGTTGGT TTTTGTGTG  
 7901 CAGTGCCTCT ATCTGGAGGC CAGGTAGGGC TGGCCTTGGG GGAGGGGGAG  
 7951 GCCAGAATGA CTCCAAGAGC TACAGGAAGG CAGGTCAGAG ACCCCACTGG  
 8001 ACAACAGTG GCTGGACTCT GCACCATAAC ACACAATCAA CAGGGGAGTG  
 8051 AGCTGGAAAT TTGCTAGC

Фиг. 26/7

1 TTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAAT  
 61 GGTTCCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTT  
 121 ATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCT  
 181 TCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCC  
 241 CTTTTTTCGCGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAA  
 301 AGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGG  
 361 TAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAAGCTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGT  
 421 TCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCG  
 481 CATACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTAC  
 541 GGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAAGTGC  
       Pvu I  
 601 GGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAA  
 661 CATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACC  
       Fsp I  
 721 AAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTTGCGCAACTATT  
 781 AACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGA

Фиг. 27/1



841 TAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAA  
 901 ATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAA  
 961 GCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAA  
 1021 TAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGT  
 1081 TTAATCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTTAATTTAAAGGATCTAGGT  
 1141 GAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTG  
 1201 AGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGT  
 1261 AATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTGCGGATCA  
 1321 AGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATAC  
 1381 TGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTAC  
 1441 ATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCT  
 1501 TACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGG  
 1561 GGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACA  
 1621 GCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGT  
 1681 AAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTA  
 1741 TCTTTATAGTCCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTC  
 1801 GTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGC  
 1861 CTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCCTTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAA  
 1921 CCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAG  
 1981 CGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTCTCCTTACGCATCT  
 2041 GTGCGGTATTTACACCGCATATGGTGCCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATA  
 2101 GTTAAGCCAGTATACACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGGTATGGCTGCGCCCCGACAC  
 2161 CCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGA  
 2221 CAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGAGGTTTTACCGTCATCACCGAAA  
 2281 CGCGCGAGGCAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCCTAACTCCGCC  
 2341 CATCCCGCCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTT  
 2401 TTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATTCAGAAGTAGTGAGG  
 2461 AGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAGCTAGCTTACAGCTCAGGGCTGCGATT

Фиг. 27/2

2521 TCGCGCCAACTTGACGGCAATCCTAGCGTGAAGGCTGGTAGGATTTTATCCCCGCTGCC  
 2581 ATCATGGTTCGACCATTGAACTGCATCGTCGCCGTGTCCCAAATATGGGGATTGGCAAG  
 2641 AACGGAGACCTACCCTGGCCTCCGCTCAGGAACGAGTTCAAGTACTTCCAAAGAATGACC  
 2701 ACAACCTCTTCAGTGGAAGGTAAACAGAATCTGGTGATTATGGGTAGGAAAACCTGGTTC  
 2761 TCCATTCCCTGAGAAGAATCGACCTTTAAAGGACAGAATTAATATAGTTCTCAGTAGAGAA  
 2821 CTCAAAGAACCACCACGAGGAGCTCATTTTCTTGCCAAAAGTTTGGATGATGCCTTAAGA  
 2881 CTTATTGAACAACCGGAATTGGCAAGTAAAGTAGACATGGTTTGGATAGTCGGAGGCAGT  
 2941 TCTGTTTACCAGGAAGCCATGAATCAACCAGGCCACCTCAGACTCTTTGTGACAAGGATC  
 3001 ATGCAGGAATTTGAAAGTGACACGTTTTTCCCAGAAATTGATTTGGGGAAATATAAACTT  
 3061 CTCCCAGAATACCCAGGCGTCCTCTCTGAGGTCCAGGAGGAAAAAGGCATCAAGTATAAG  
 3121 TTTGAAGTCTACGAGAAGAAAGACTAACAGGAAGATGCTTTCAAGTTCTCTGCTCCCCTC  
 3181 CTAAAGCTATGCATTTTTATAAGACCATGGGACTTTTGCTGGCTTTAGATCTTTGTGAAG  
 3241 GAACCTTACTTCTGTGGTGTGACATAATTGGACAAACTACCTACAGAGATTTAAAGCTCT  
 3301 AAGGTAAATATAAAATTTTTAAGTGTATAATGTGTAAACTACTGATTCTAATTGTTTGT  
 3361 GTATTTTAGATTCCAACCTATGGAAGTATGAATGGGAGCAGTGGTGGAAATGCCTTTAAT  
 3421 GAGGAAAACCTGTTTTGCTCAGAAGAAATGCCATCTAGTGATGATGAGGCTACTGCTGAC  
 3481 TCTCAACATTCTACTCCTCCAAAAAGAGAGAAAGGTAGAAGACCCCAAGGACTTTTCT  
 3541 TCAGAATTGCTAAGTTTTTTGAGTCATGCTGTGTTTAGTAATAGAACTCTTGCTTGCTTT  
 3601 GCTATTTACACCACAAAGGAAAAAGCTGCACTGCTATACAAGAAAATTATGGAAAAATAT  
 3661 TCTGTAACCTTTATAAGTAGGCATAACAGTTATAATCATAACATACTGTTTTTTCTTACT  
 3721 CCACACAGGCATAGAGTGTCTGCTATTAATAACTATGCTCAAAAATTGTGTACCTTTAGC  
 3781 TTTTAAATTTGTAAAGGGTTAATAAGGAATATTTGATGTATAGTGCCTTGACTAGAGAT  
 3841 CATAATCAGCCATAACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCCACACCT  
 3901 CCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGC  
 3961 TTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTC  
 4021 ACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCTA  
 4081 ATAAAAGATATTTATTTTCATTAGATATGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGCAGTGCCTCTAT  
 4141 CTGGAGGCCAGGTAGGGCTGGCCTTGGGGGAGGGGAGGCCAGAATGACTCCAAGAGCTA  
 4201 CAGGAAGGCAGGTGAGAGACCCCACTGGACAAACAGTGGCTGGACTCTGCACCATAACAC

Фиг. 27/3

4261 ACAATCAACAGGGGAGTGAGCTGGAAATTTGCTAGCGAATTCcagcacactggcgccgt  
 Spe I  
 4321 tACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTT  
 4381 CCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCC  
 4441 ATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACG  
 4501 TCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATAT  
 4561 GCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCA  
 SnaB I  
 4621 GTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTTACGTATTAGTCATCGCTAT  
 4681 TACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACG  
 4741 GGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAATCA  
 4801 ACGGGACTTTCCAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCG  
 4861 TGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAG  
 4921 ACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGG  
 4981 CCGGGAACGGTGCAATTGGAACGCGGATTCCCCGTGCCAAGAGTGACGTAAGTACCGCCTA  
 5041 TAGAGTCTATAGGCCACCCCCCTGGCTTCTTATGCATGCTATACTGTTTTTGGCTTGGG  
 Bpu1102I  
 5101 GTCTATACACCCCGCTTCTCATGTTATAGGTGATGGTATAGCTTAGCCTATAGGTGTG  
 Xcm I  
 5161 GGTATTGACCATTATTGACCACTCCCTATTGGTGACGATACTTCCATTACTAATCCA  
 5221 TAACATGGCTCTTTGCCACAACCTCTCTTATTGGCTATATGCCAATACACTGTCCTTCAG  
 5281 AGACTGACACGGACTCTGTATTTTTACAGGATGGGGTCTCATTTATTATTTACAAATTCA  
 5341 CATATACAACACCACCGTCCCCAGTGCCCGCAGTTTTTTATTAAACATAACGTGGGATCTC  
 BspE I  
 5401 CACGCGAATCTCGGGTACGTGTTCCGGACATGGGCTCTTCTCCGGTAGCGGCGGAGCTTC  
 5461 TACATCCGAGCCCTGCTCCCATGCCTCCAGCGACTCATGGTCGCTCGGCAGCTCCTTGCT  
 5521 CCTAACAGTGGAGGCCAGACTTAGGCACAGCACGATGCCCCACCACCAGTGTGCCGCA  
 .....  
 5581 CAAGGCCGTGGCGGTAGGGTATGTGTCTGAAAATGAGCTCggggagcgggcttgaccgc  
 (Pvu II)  
 5641 tgacgcatttggaagacttaaggcagcggcagaagaagatgcaggcagctgagttgttgt  
 5701 gttctgataagagtcagaggttaactcccggttgcggtgctgttaacggtggagggcagtg  
 5761 agtctgagcagtagctcggtgctgccgcgcgcgccaccagacataatagctgacagactaa  
 Mlu I  
 5821 cagactgttcctttccatgggtctttctgcagtcaccgtccttgacACGCGTCTCGGGA  
 Hind III  
 5881 AGCTTGCCGCCACCATGGGATGGAGCTGGGTCTTTCTCTTTCTCCTGTGAGGAAGTGCAG  
 M G W S W V F L F L L S G T A

(Pvu II)

5941 GTGTCCTCTCTGAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTT  
 G V L S E V Q L Q Q S G P E L V K P G A  
 Xba I Dra III

6001 CAGTAAAGATGTCCTGCAAGACTTCTAGATACACATTCACTGAATACACCATACACTGGG  
 S V .K M S C K T S R Y T F T E Y T I H W  
 CDR 1

6061 TGAGACAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGGTATTAATCCTAACAATGGTA  
 V R Q S H G K S L E W I G G I N P N N G

6121 TTCCTAACTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAGGGCCACATTGACTGTAGGCAAGTCTCCA  
 I P N Y N Q K F K G R A T L T V G K S S  
 CDR 2

6181 GCACCGCCTACATGGAGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGATTCTGCGGTCTATTTCTGTG  
 S T A Y M E L R S L T S E D S A V Y F C

6241 CAAGAAGAAGAATCGCCTATGGTTACGACGAGGGCCATGCTATGGACTACTGGGGTCAAG  
 A R R R I A Y G Y D E G H A M D Y W G Q  
 CDR 3 BamH I

6301 GAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGGTGAGTGGATCCTCTGCGCCTGGGCCCAGCTCTGTC  
 G T S V T V S S

6361 CCACACCGCGGTACATGGCACCACCTCTCTTGACGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCT  
 S T K G P S V

6421 TCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGG  
 F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L  
 Age I

6481 TCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCG  
 V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S

6541 GCGTGCACACCTTCCCGGTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGG  
 G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V  
 BstE II

6601 TGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGC  
 V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K

6661 CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACAT  
 P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T

6721 GCCCACCCTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAA  
 C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P

6781 AACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACG  
 .... K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D

6841 TGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATA  
 V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H

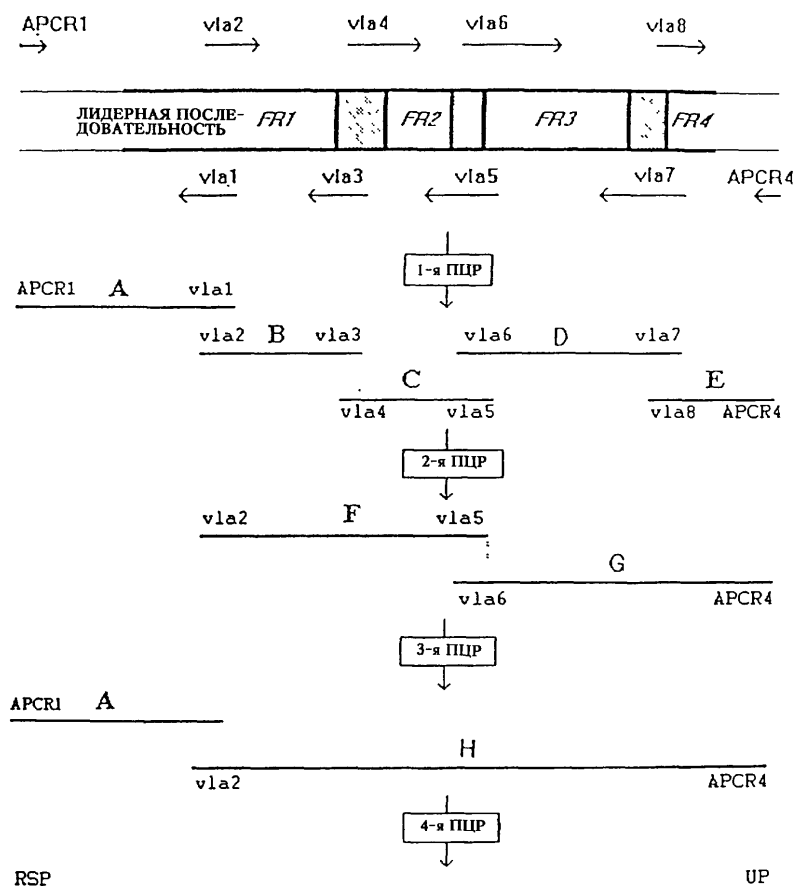
6901 ATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCC  
 N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V

6961 TCACCGTCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACA  
 L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N

Фиг. 27/5

7021 AAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC  
 K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E  
 7081 CACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGA  
 P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L  
 7141 CCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC  
 T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G  
 7201 AGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC  
 Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F  
 7261 TCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCT  
 L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C  
 7321 CCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG  
 S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P  
 Ngom I  
 7381 GTAAATGAGTGCACGCGCCGCAAGCCCCGCTCCCCGGGCTCTCGCGGTTCGCACGAGGAT  
 G K \*  
 7441 GCTTGGCACGTACCCCCTGTACATACTTCCCGGGCGCCCAGCATGGAAATAAAGCACCGG  
 7501 ATCTAATAAAAGATATTTATTTTCATTAGATATGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGCAGTGCC  
 7561 TCTATCTGGAGGCCAGGTAGGGCTGGCCTTGGGGGAGGGGGAGGCCAGAATGACTCCAAG  
 7621 AGCTACAGGAAGGCAGGTCAGAGACCCCCACTGGACAAACAGTGGCTGGACTCTGCACCAT  
 7681 AACACACAATCAACAGGGGAGTGAGCTGGaaatttgctagcgaattaattc 7731

Фиг. 27/6



Фиг. 28

	1																		19
	D	I	V	M	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A
A	GAC	ATT	GTG	ATG	ACC	CAA	TCT	CCA	GAC	TCT	TTG	GCT	GTG	TCT	CTA	GGG	GAG	AGG	GCC
B	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
C	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	20																			
	T	I	N	C		CDR1	27	A	B	C	D	E	F	28					32	
A	ACC	ATC	AAC	TGC		K	S	S	Q	S	L	L	Y	S	R	N	Q	K	N	Y
						AAG	TCC	AGT	CAG	AGC	CTT	TTA	TAT	TCT	AGA	AAT	CAA	AAG	AAC	TAC
B	-----	-----	-----	-----		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
C	-----	-----	-----	-----		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	33																			51
	L	A		W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	P	P	K	L	L	I	F	W	A
A	TTG	GCC		TGG	TAT	CAG	CAG	AAA	CCA	GGA	CAG	CCA	CCC	AAA	CTC	CTC	ATC	TTT	TGG	GCT
					F															
B	-----	-----		-----	TC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
																		Y		
C	-----	-----		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-A-	-----	-----

	52																			70
	S	T	R	E	S		G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	F	G	T	D
A	AGC	ACT	AGG	GAA	TCT		GGG	GTA	CCT	GAT	AGG	TTC	AGT	GGC	AGT	GGG	TTT	GGG	ACA	GAC
B	-----	-----	-----	-----	-----		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
C	-----	-----	-----	-----	-----		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	71																			88
	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	A	E	D	V	A	V	Y	Y	C		
A	TTC	ACC	CTC	ACC	ATT	AGC	AGC	CTG	CAG	GCT	GAA	GAT	GTG	GCA	GTT	TAT	TAC	TGT		
																		D		
B	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G	-----	-----
C	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	89																			107
	Q	Q	Y	F	S	Y	P	L	T		F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K
A	CAG	CAA	TAT	TTT	AGC	TAT	CCG	CTC	ACG		TTC	GGA	CAA	GGG	ACC	AAG	GTG	GAA	ATA	AAA
B	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	-A	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----											
C	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Фиг. 29/1

Spe I

1 gaattccagc acactggcgg ccgttACTAG TTATTAATAG TAATCAATTA

51 CGGGGTCATT AGTTCATAGC CCATATATGG AGTTCCGCGT TACATAACTT

101 ACGGTAAATG GCGCGCCTGG CTGACCGCCC AACGACCCCC GCCCATTGAC

151 GTCAATAATG ACGTATGTTC CCATAGTAAC GCCAATAGGG ACTTTCCATT

201 GACGTCAATG GGTGGAGTAT TTACGGTAAA CTGCCCCTT GGCAGTACAT

251 CAAGTGTATC ATATGCCAAG TACGCCCCCT ATTGACGTCA ATGACGGTAA

301 ATGGCCCGCC TGGCATTATG CCCAGTACAT GACCTTATGG GACTTTCCTA

SnaB I

351 CTTGGCAGTA CATCTACGTA TTAGTCATCG CTATTACCAT GGTGATGCGG

401 TTTTGGCAGT ACATCAATGG GCGTGGATAG CGGTTTGA CT CACGGGGATT

451 TCCAAGTCTC CACCCCATTG ACGTCAATGG GAGTTTGTTT TGGCACCAAA

501 ATCAACGGGA CTTTCCAAAA TGTCGTAACA ACTCCGCCCC ATTGACGCAA

551 ATGGGCGGTA GCGGTGTACG GTGGGAGGTC TATATAAGCA GAGCTCGTTT

601 AGTGAACCGT CAGATCGCCT GGAGACGCCA TCCACGCTGT TTTGACCTCC

Sac II

651 ATAGAAGACA CCGGGACCGA TCCAGCCTCC GCGGCCGGGA ACGGTGCATT

701 GGAACGCGGA TTCCCCGTGC CAAGAGTGAC GTAAGTACCG CCTATAGAGT

751 CTATAGGCCC ACCCCCTTGG CTTCTTATGC ATGCTATACT GTTTTTGGCT

801 TGGGGTCTAT ACACCCCGC TTCCTCATGT TATAGGTGAT GGTATAGCTT

851 AGCCTATAGG TGTGGGTAT TGACCATTAT TGACCACTCC CCTATTGGTG

901 ACGATACTTT CCATTACTAA TCCATAACAT GGCTCTTTGC CACAACCTCT

951 TTTATTGGCT ATATGCCAAT ACACTGTCCT TCAGAGACTG ACACGGACTC

1001 TGTATTTTTA CAGGATGGGG TCTCATTTAT TATTTACAAA TTCACATATA

1051 CAACACCACC GTCCCCAGTG CCCGCACTTT TTATTAAACA TAACGTGGGA

(BspE I)

1101 TCTCCACGCG AATCTCGGGT ACGTGTTTCCG GACATGGGCT CTTCTCCGGT

1151 AGCGGCGGAG CTTCTACATC CGAGCCCTGC TCCCATGCCT CCAGCGACTC

1201 ATGGTCGCTC GGCAGCTCCT TGCTCCTAAC AGTGGAGGCC AGACTTAGGC

Фиг. 30/1

- 96 -



2351 TGAGCAAAGC AGACTACGAG AAACACAAAG TCTACGCCTG CGAAGTCACC  
 L S K A D Y E K H K V Y A C E V T  
 2401 CATCAGGGCC TGAGCTCGCC CGTCACAAAG AGCTTCAACA GGGGAGAGTG  
 H Q G L S S P V T K S F N R G E C  
 2451 TTAGAGGGAG AAGTGCCCCC ACCTGCTCCT CAGTTCCAGC CTGACCCCCT  
 \* Psp5 II  
 2501 CCCATCCTTT GGCCTCTGAC CCTTTTCCA CAGGGGACCT ACCCCTATTG  
 2551 CGGTCCTCCA GCTCATCTTT CACCTCACCC CCCTCCTCCT CCTTGGCTTT  
 2601 AATTATGCTA ATGTTGGAGG AGAATGAATA AATAAAGTGA ATCTTTGCAC  
 2651 CTGTGGTGGG TCTAATAAAA GATATTTATT TTCATTAGAT ATGTGTGTTG  
 2701 GTTTTTTGTG TGCAGTGCCT CTATCTGGAG GCCAGGTAGG GCTGGCCTTG  
 2751 GGGGAGGGGG AGGCCAGAAT GACTCCAAGA GCTACAGGAA GGCAGGTCAG  
 2801 AGACCCCACT GGACAAACAG TGGCTGGACT CTGCACCATA ACACACAATC  
 2851 AACAGGGGAG TGAGCTGGAA ATTTGCTAGC GAATTCTTGA AGACGAAAGG  
 2901 GCCTCGTGAT ACGCCTATTT TTATAGGTTA ATGTCATGAT AATAATGGTT  
 2951 TCTTAGACGT CAGGTGGCAC TTTTCGGGGA AATGTGCGCG GAACCCCTAT  
 3001 TTGTTTATTT TTCTAAATAC ATTCAAATAT GTATCCGCTC ATGAGACAAT  
 3051 AACCCTGATA AATGCTTCAA TAATATTGAA AAAGGAAGAG TATGAGTATT  
 3101 CAACATTTCC GTGTCGCCCT TATTCCTTTT TTTGCGGCAT TTTGCCTTCC  
 3151 TGTTTTTGCT CACCCAGAAA CGCTGGTGAA AGTAAAAGAT GCTGAAGATC  
 3201 AGTTGGGTGC ACGAGTGGGT TACATCGAAC TGGATCTCAA CAGCGGTAAG  
 3251 ATCCTTGAGA GTTTTCGCCC CGAAGAACGT TTTCCAATGA TGAGCACTTT  
 3301 TAAAGTTCTG CTATGTGGCG CGGTATTATC CCGTGTTGAC GCCGGGCAAG  
 3351 AGCAACTCGG TCGCCGCATA CACTATTCTC AGAATGACTT GGTGAGTAC  
 3401 TCACCAGTCA CAGAAAAGCA TCTTACGGAT GGCATGACAG TAAGAGAATT  
 3451 ATGCAGTGCT GCCATAACCA TGAGTGATAA CACTGCGGCC AACTTACTTC  
 Pvu I  
 3501 TGACAACGAT CGGAGGACCG AAGGAGCTAA CCGCTTTTTT GCACAACATG  
 3551 GGGGATCATG TAACTCGCCT TGATCGTTGG GAACCGGAGC TGAATGAAGC

3601 CATACCAAAC GACGAGCGTG ACACCACGAT GCCTGCAGCA ATGGCAACAA  
 3651 CGTTGCGCAA ACTATTA ACT GGCGAACTAC TTA CTCTAGC TTCCCGGCAA  
 3701 CAATTAATAG ACTGGATGGA GCGGATAAAA GTTGCAGGAC CACTTCTGCG  
 3751 CTCGGCCCTT CCGGCTGGCT GGT TTATTGC TGATAAATCT GGAGCCGGTG  
 3801 AGCGTGGGTC TCGCGGTATC ATTGCAGCAC TGGGGCCAGA TGGTAAGCCC  
 3851 TCCCGTATCG TAGTTATCTA CACGACGGGG AGTCAGGCAA CTATGGATGA  
 3901 ACGAAATAGA CAGATCGCTG AGATAGGTGC CTCACTGATT AAGCATTTGGT  
 3951 AACTGTCAGA CCAAGTTTAC TCATATATAC TTTAGATTGA TTTAAACTT  
 4001 CATTTTTAAT TTAAAAGGAT CTAGGTGAAG ATCCTTTTTG ATAATCTCAT  
 4051 GACCAAAATC CCTTAACGTG AGTTTTTCGT CCACTGAGCG TCAGACCCCG  
 4101 TAGAAAAGAT CAAAGGATCT TCTTGAGATC CTTTTTTTCT GCGCGTAATC  
 4151 TGCTGCTTGC AAACAAAAA ACCACCGCTA CCAGCGGTGG TTTGTTTGCC  
 4201 GGATCAAGAG CTACCAACTC TTTTCCGAA GGTA ACTGGC TTCAGCAGAG  
 4251 CGCAGATACC AAATACTGTC CTTCTAGTGT AGCCGTAGTT AGGCCACCAC  
 4301 TTCAAGAACT CTGTAGCACC GCCTACATAC CTCGCTCTGC TAATCCTGTT  
 4351 ACCAGTGGCT GCTGCCAGTG GCGATAAGTC GTGTCTTACC GGGTTGGA CT  
 4401 CAAGACGATA GTTACCGGAT AAGGCGCAGC GGTCGGGCTG AACGGGGGGT  
 4451 TCGTGACAC AGCCAGCTT GGAGCGAACG ACCTACACCG AACTGAGATA  
 4501 CCTACAGCGT GAGCTATGAG AAAGCGCCAC GCTTCCCGAA GGGAGAAAGG  
 4551 CGGACAGGTA TCCGGTAAGC GGCAGGGTCG GAACAGGAGA GCGCACGAGG  
 4601 GAGCTTCCAG GGGGAAACGC CTGGTATCTT TATAGTCCTG TCGGGTTTCG  
 4651 CCACCTCTGA CTTGAGCGTC GATTTTTGTG ATGCTCGTCA GGGGGGCGGA  
 4701 GCCTATGGAA AAACGCCAGC AACGCGGCCT TTTTACGGTT CCTGGCCTTT  
 4751 TGCTGGCCTT TTGCTCACAT GTTCTTTCT GCGTTATCCC CTGATTCTGT  
 4801 GGATAACCGT ATTACCGCCT TTGAGTGAGC TGATACCGCT CGCCGCAGCC

BspLU11I

4851 GAACGACCGA GCGCAGCGAG TCAGTGAGCG AGGAAGCGGA AGAGCGCCTG  
 4901 ATGCGGTATT TTCTCCTTAC GCATCTGTGC GGTATTTTAC ACCGCATATG  
 4951 GTGCACTCTC AGTACAATCT GCTCTGATGC CGCATAGTTA AGCCAGTATA <sup>Bst1107I</sup>  
 5001 CACTCCGCTA TCGCTACGTG ACTGGGTCAT GGCTGCGCCC CGACACCCGC  
 5051 CAACACCCGC TGACGCGCCC TGACGGGCTT GTCTGCTCCC GGCATCCGCT  
 5101 TACAGACAAG CTGTGACCGT CTCCGGGAGC TGCATGTGTC AGAGGTTTTTC  
 5151 ACCGTCATCA CCGAAACGCG CGAGGCAGCT GTGGAATGTG TGTCAGTTAG  
 5201 GGTGTGAAA GTCCCCAGGC TCCCCAGCAG GCAGAAGTAT GCAAAGCATG  
 5251 CATCTCAATT AGTCAGCAAC CAGGCTCCCC AGCAGGCAGA AGTATGCAAA  
 5301 GCATGCATCT CAATTAGTCA GCAACCATAG TCCCGCCCT AACTCCGCCC  
 5351 ATCCCGCCCC TAACTCCGCC CAGTTCCGCC CATTCTCCGC CCCATGGCTG  
 5401 ACTAATTTTT TTTATTTATG CAGAGGCCGA GGCCGCTCG GCCTCTGAGC  
 5451 TATTCCAGAA GTAGTGAGGA GGCTTTTTTG GAGGCCTAGG CTTTTGCAAA  
 5501 AAGCTAGCTT CACGCTGCCG CAAGCACTCA GGGCGCAAGG GCTGCTAAAG  
 5551 GAAGCGGAAC ACGTAGAAAG CCAGTCCGCA GAAACGGTGC TGACCCCGGA  
 5601 TGAATGTCAG CTA CTGGGCT ATCTGGACAA GGGAAAACGC AAGCGCAAAG  
 5651 AGAAAGCAGG TAGCTTGACG TGGGCTTACA TGGCGATAGC TAGACTGGGC  
 5701 GGTTTTATGG ACAGCAAGCG AACCGBAATT GCCAGCTGGG GCGCCCTCTG  
 5751 GTAAGGTTGG GAAGCCCTGC AAAGTAACT GGATGGCTTT CTTGCCGCCA  
 5801 AGGATCTGAT GGCGCAGGGG ATCAAGATCT GATCAAGAGA CAGGATGAGG  
 5851 ATCGTTTCGC ATGATTGAAC AAGATGGATT GCACGCAGGT TCTCCGGCCG  
 5901 CTTGGGTGGA GAGGCTATTG GGCTATGACT GGGCACAACA GACAATCGGC  
 5951 TGCTCTGATG CCGCCGTGTT CCGGCTGTCA GCGCAGGGGC GCCCGGTTCT  
 6001 TTTTGTCAAG ACCGACCTGT CCGGTGCCCT GAATGAACTG CAGGACGAGG  
 6051 CAGCGCGGCT ATCGTGGCTG GCCACGACGG GCGTTCCTTG CGCAGCTGTG  
<sup>Msc I</sup>

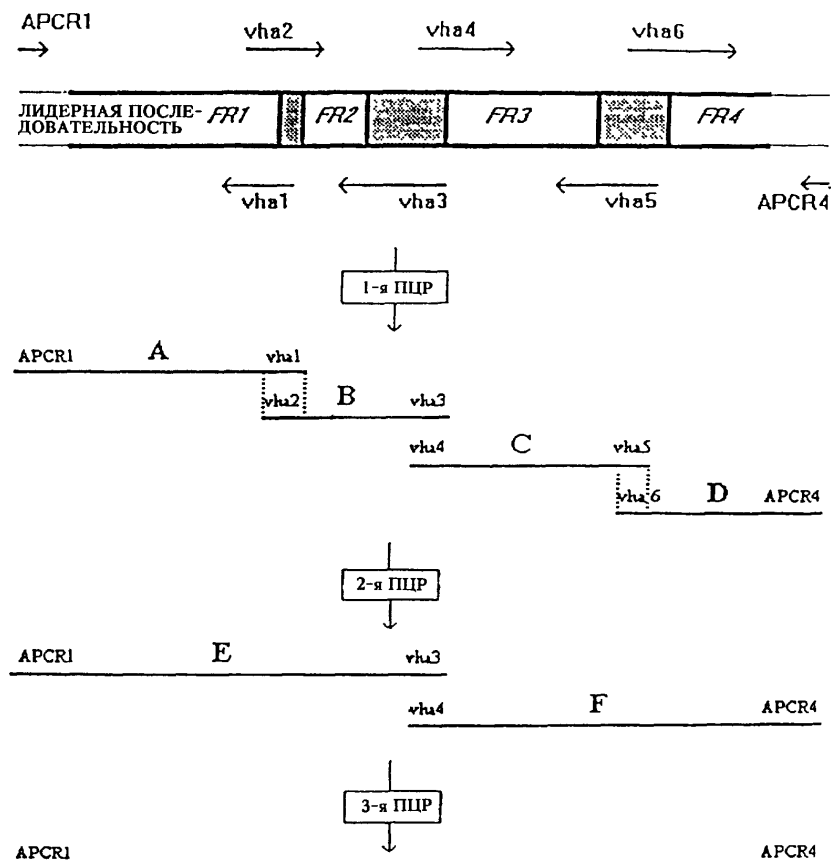
Фиг. 30/5

6101 CTCGACGTTG TCACTGAAGC GGGAAGGGAC TGGCTGCTAT TGGGCGAAGT  
 6151 GCCGGGGCAG GATCTCCTGT CATCTCACCT TGCTCCTGCC GAGAAAGTAT  
 6201 CCATCATGGC TGATGCAATG CGGCGGCTGC ATACGCTTGA TCCGGCTACC  
 6251 TGCCCATTCG ACCACCAAGC GAAACATCGC ATCGAGCGAG CACGTACTCG  
 6301 GATGGAAGCC GGTCTTGTCG ATCAGGATGA TCTGGACGAA GAGCATCAGG  
 6351 GGCTCGCGCC AGCCGAACTG TTCGCCAGGC TCAAGGCGCG CATGCCCCGAC  
 6401 GGCGAGGATC TCGTCGTGAC CCATGGCGAT GCCTGCTTGC CGAATATCAT  
 6451 GGTGGAAAAT GGCCGCTTTT CTGGATTTCAT CGACTGTGGC CGGCTGGGTG  
 6501 Rsr II  
 TGGCGGACCG CTATCAGGAC ATAGCGTTGG CTACCCGTGA TATTGCTGAA  
 6551 GAGCTTGCGC GCGAATGGGC TGACCGCTTC CTCGTGCTTT ACGGTATCGC  
 6601 CGCTCCCGAT TCGCAGCGCA TCGCCTTCTA TCGCCTTCTT GACGAGTTCT  
 6651 Nsp V  
 TCTGAGCGGG ACTCTGGGGT TCGAAATGAC CGACCAAGCG ACGCCCAACC  
 6701 TGCCATCACG AGATTTTCGAT TCCACCGCCG CCTTCTATGA AAGGTTGGGC  
 6751 TTCGGAATCG TTTTCCGGGA CGCCGGCTGG ATGATCCTCC AGCGCGGGGA  
 6801 Sma I Nru I  
 TCTCATGCTG GAGTTCTTCG CCCACCCCGG GCTCGATCCC CTCGCGAGTT  
 6851 GGTTCAGCTG CTGCCTGAGG CTGGACGACC TCGCGGAGTT CTACCGGCAG  
 6901 TGCAAATCCG TCGGCATCCA GGAAACCAGC AGCGGCTATC CGCGCATCCA  
 6951 TGCCCCCGAA CTGCAGGAGT GGGGAGGCAC GATGGCCGCT TTGGTCCCGG  
 7001 ATCTTTGTGA AGGAACCTTA CTTCTGTGGT GTGACATAAT TGGACAAACT  
 7051 ACCTACAGAG ATTTAAAGCT CTAAGGTAAA TATAAAATTT TTAAGTGTAT  
 7101 AATGTGTAA ACTACTGATT CTAATTGTTT GTGTATTTTA GATTCCAACC  
 7151 TATGGAAGCT ATGAATGGGA GCAGTGGTGG AATGCCTTTA ATGAGGAAAA  
 7201 CCTGTTTTGC TCAGAAGAAA TGCCATCTAG TGATGATGAG GCTACTGCTG  
 7251 ACTCTCAACA TTCTACTCCT CCAAAAAAGA AGAGAAAGGT AGAAGACCCC  
 7301 AAGGACTTTC CTTCAGAATT GCTAAGTTTT TTGAGTCATG CTGTGTTTAG

Фиг. 30/6

7351 TAATAGAACT CTTGCTTGCT TTGCTATTTA CACCACAAAG GAAAAAGCTG  
 7401 CACTGCTATA CAAGAAAATT ATGGAAAAAT ATTCTGTAAC CTTTATAAGT  
 7451 AGGCATAACA GTTATAATCA TAACATACTG TTTTTTCTTA CTCCACACAG  
 7501 GCATAGAGTG TCTGCTATTA ATAACTATGC TCAAAAATTG TGTACCTTTA  
 7551 GCTTTTTAAT TTGTAAAGGG GTTAATAAGG AATATTTGAT GTATAGTGCC  
 7601 TTGACTAGAG ATCATAATCA GCCATACCAC ATTTGTAGAG GTTTTACTTG  
 7651 CTTTAAAAAA CCTCCCACAC CTCCCCCTGA ACCTGAAACA TAAAATGAAT  
 Mun I  
 7701 GCAATTGTTG TTGTAACTT GTTTATTGCA GCTTATAATG GTTACAAATA  
 7751 AAGCAATAGC ATCACAAATT TCACAAATAA AGCATTTTTT TCACTGCATT  
 7801 CTAGTTGTGG TTTGTCCAAA CTCATCAATG TATCTTATCA TGTCTGGATC  
 7851 TAATAAAAGA TATTTATTTT CATTAGATAT GTGTGTTGGT TTTTGTGTG  
 7901 CAGTGCCTCT ATCTGGAGGC CAGGTAGGGC TGGCCTTGGG GGAGGGGGAG  
 7951 GCCAGAATGA CTCCAAGAGC TACAGGAAGG CAGGTCAGAG ACCCCACTGG  
 8001 ACAACAGTG GCTGGACTCT GCACCATAAC ACACAATCAA CAGGGGAGTG  
 8051 AGCTGGAAAT TTGCTAGC

Фиг. 30/7



Фиг. 31

	1									10									19			
	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K			
A	CAG	GTG	CAA	CTA	GTG	CAG	TCC	GGC	GCC	GAA	GTG	AAG	AAA	CCC	GGT	GCT	TCC	GTG	AAA			
B	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---			
C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---			
D	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---			
E	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---			
	20									30		CDR1							38			
	V	S	C	K	T	S	R	Y	T	F	T	E	Y	T	I	H	W	V	R			
A	GTC	AGC	TGT	AAA	ACT	AGT	AGA	TAC	ACC	TTC	ACT	GAA	TAC	ACC	ATA	CAC	TGG	GTT	AGA			
B	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---			
C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---			
D	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---			
E	---	---	---	---	---	---	G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---			
							G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---			
	39									49		52	A	53					56			
	Q	A	P	G	Q	R	L	E	W	I	G	G	I	N	P	N	N	G	I			
A	CAG	GCC	CCT	GGC	CAA	AGG	CTG	GAG	TGG	ATA	GGA	GGT	ATT	AAT	CCT	AAC	AAT	GGT	ATT			
B	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---			
C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---			
D	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---			
E	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---			
	57											CDR2							70			75
	P	N	Y	N	Q	K	F	K	G	R	A	T	L	T	V	G	K	S	A			
A	CCT	AAC	TAC	AAC	CAG	AAG	TTC	AAG	GGC	CGG	GCC	ACC	TTG	ACC	GTA	GGC	AAG	TCT	GCC			
B	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---			
C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	V	---	I	---	---	D	T	---	---			
D	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	T	---	A-C	---	---	A	CC	---	---			
E	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	V	---	I	---	---	D	T	---	---			
											T	---	A-C	---	---	A	CC	---	---			
	76									82	A	B	C	83					91			
	S	T	A	Y	M	E	L	S	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y			
A	AGC	ACC	GCC	TAC	ATG	GAA	CTG	TCC	AGC	CTG	CGC	TCC	GAG	GAC	ACT	GCA	GTC	TAC	TAC			
B	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	F			
C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	T			
D	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	T			
E	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---			

Фиг. 32/1

	92				CDR3					100	A	B	C	D	I	J	K	101		103
	C	A	R		R	R	I	A	Y	G	Y	D	E	G	H	A	M	D	Y	W
A	TGC	GCC	AGA		AGA	AGA	ATC	GCC	TAT	GGT	TAC	GAC	GAG	GGC	CAT	GCT	ATG	GAC	TAC	TGG
B	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
C	---	---	---		---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
D	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
E	---	---	---		---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

	104									113	
	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	
A	GGT	CAA	GGA	ACC	CTT	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA	
B	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
D	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
E	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	

Фиг. 32/2

1 TTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAAT  
 61 GGTTCCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTT  
 121 ATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGATAAATGCT  
 181 TCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCC  
 241 CTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAA  
 301 AGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGG  
 361 TAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGT  
 421 TCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCG  
 481 CATACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTAC  
 541 GGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGC  
 601 GGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGACAAA  
 661 CATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACC  
 721 AAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTTGCGCAAACTATT  
 781 AACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGA

Фиг. 33/1

841 TAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAA  
 901 ATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAA  
 961 GCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAA  
 1021 TAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGT  
 1081 TTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGT  
 1141 GAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTG  
 1201 AGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGT  
 1261 AATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCA  
 1321 AGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATAC  
 1381 TGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTAC  
 1441 ATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCT  
 1501 TACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGGCTGAACGGG  
 1561 GGGTTCTGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACA  
 1621 GCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGT  
 1681 AAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTA  
 1741 TCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTC  
 1801 GTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGC  
 1861 CTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAA  
 1921 CCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAG  
 1981 CGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCT  
 2041 GTGCGGTATTTACACCGCATATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATA  
 2101 GTTAAGCCAGTATACACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGGTATGGCTGCGCCCCGACAC  
 2161 CCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGA  
 2221 CAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCGTCATCACCAGAA  
 2281 CGCGCGAGGCAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACCTCCGCC  
 2341 CATCCCGCCCCTAACCTCCGCCAGTTCGCCCATTTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTT  
 2401 TTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGG  
 2461 AGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGAAAAAGCTAGCTTACAGCTCAGGGCTGCGATT

BspLU11I

Bst1107 I

Sfi I

Stu I/Avr II



2521 TCGCGCCAACTTGACGGCAATCCTAGCGTGAAGGCTGGTAGGATTTTATCCCCGCTGCC  
 2581 ATCATGGTTCGACCATTGAACTGCATCGTCGCCGTGTCCCAAATATGGGGATTGGCAAG  
 2641 AACGGAGACCTACCCTGGCCTCCGCTCAGGAACGAGTTCAAGTACTTCCAAAGAATGACC  
 2701 ACAACCTCTTCAGTGAAGGTAAACAGAATCTGGTGATTATGGGTAGGAAAACCTGGTTC  
 2761 TCCATTCCCTGAGAAGAATCGACCTTTAAAGGACAGAATTAATATAGTTCTCAGTAGAGAA  
 2821 CTCAAAGAACCACCACGAGGAGCTCATTTTCTTGCCAAAAGTTTGGATGATGCCTTAAGA  
 2881 CTTATTGAACAACCGGAATTGGCAAGTAAAGTAGACATGGTTTGGATAGTCGGAGGCAGT  
 2941 TCTGTTTACCAGGAAGCCATGAATCAACCAGGCCACCTCAGACTCTTTGTGACAAGGATC  
 3001 ATGCAGGAATTTGAAAGTGACACGTTTTTCCCAGAAATTGATTTGGGGAAATATAAACTT  
 3061 CTCCCAGAATACCCAGGCGTCTCTCTGAGGTCCAGGAGGAAAAAGGCATCAAGTATAAG  
 3121 TTTGAAGTCTACGAGAAGAAAGACTAACAGGAAGATGCTTTCAAGTTCTCTGCTCCCCTC  
 3181 CTAAAGCTATGCATTTTTATAAGACCATGGGACTTTTGCTGGCTTTAGATCTTTGTGAAG  
 3241 GAACCTTACTTCTGTGGTGTGACATAATTGGACAACTACCTACAGAGATTTAAAGCTCT  
 3301 AAGGTAAATATAAAATTTTTAAGTGTATAATGTGTTAAACTACTGATTCTAATTGTTTGT  
 3361 GTATTTTAGATTCCAACCTATGGAAGTGAATGGGAGCAGTGGTGGAAATGCCTTTAAT  
 3421 GAGGAAAACCTGTTTTGCTCAGAAGAAATGCCATCTAGTGATGATGAGGCTACTGCTGAC  
 3481 TCTCAACATTCTACTCCTCCAAAAAGAAGAGAAAGGTAGAAGACCCCAAGGACTTTCCT  
 3541 TCAGAATTGCTAAGTTTTTTGAGTCATGCTGTGTTTAGTAATAGAACTCTTGCTTGCTTT  
 3601 GCTATTTACACCACAAAGGAAAAAGCTGCACTGCTATACAAGAAAATTATGGAAAAATAT  
 3661 TCTGTAACCTTTATAAGTAGGCATAACAGTTATAATCATAACATACTGTTTTTTCTTACT  
 3721 CCACACAGGCATAGAGTGTCTGCTATTAATAACTATGCTCAAAAATTGTGTACCTTTAGC  
 3781 TTTTAAATTTGTAAAGGGGTTAATAAGGAATATTTGATGTATAGTGCCTTGACTAGAGAT  
 3841 CATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCCACACCT  
 Mun I  
 3901 CCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGC  
 3961 TTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTC  
 4021 ACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCTA  
 4081 ATAAAAGATATTTATTTTCATTAGATATGTGTGTGGTTTTTTGTGTGCAGTGCCTCTAT  
 4141 CTGGAGGCCAGGTAGGGCTGGCCTTGGGGGAGGGGAGGCCAGAATGACTCCAAGAGCTA

- 106 -

Hind III

5881 AGCTTGCCGCCACCATGGACTGGACCTGGCGCGTGTTTTGCCTGCTCGCCGTGGCTCCTG  
M D W T W R V F C L L A V A P

5941 GGGCCACAGCCAGGTGCAACTGGTGCACTCCGGCGCCGAAGTGAAGAAACCCGGTGCTT  
G A H S Q V Q L V Q S G A E V K K P G A  
(Pvu II) (Spe I)

6001 CCGTGAAAGTCAGCTGTAAAACTAGTAGATACACCTTCACTGAATACACCATACACTGGG  
S V K V S C K T S R Y T F T E Y T I H W  
Msc I CDR I

6061 TTAGACAGGCCCTGGCCAAAGGCTGGAGTGGATAGGAGGTATTAATCCTAACAATGGTA  
V R Q A P G Q R L E W I G G I N P N N G

6121 TTCCTAACTACAACCAGAAGTTCAAGGGCCGGGCCACCTTGACCGTAGGCAAGTCTGCCA  
I P N Y N Q K F K G R A T L T V G K S A  
CDR 2

6181 GCACCGCCTACATGGAAGTGTCCAGCCTGCGCTCCGAGGACACTGCAGTCTACTACTGCG  
S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C

6241 CCAGAAGAAGAATCGCCTATGGTTACGACGAGGGCCATGCTATGGACTACTGGGGTCAAG  
A R R R I A Y G Y D E G H A M D Y W G Q  
CDR 3 BamH I

6301 GAACCCTTGTCACCGTCTCCTCAGGTGAGTGGATCCTCTGCGCCTGGGCCCAGCTCTGTC  
G T L V T V S S

6361 CCACACCGCGGTACATGGCACCACCTCTCTTGCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCT  
S T K G P S V

6421 TCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGG  
F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L  
Age I

6481 TCAAGGACTACTTCCCCGAACCGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCG  
V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S

6541 GCGTGACACCTTCCCGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGG  
G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V  
BstE II

6601 TGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGC  
V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K

6661 CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGAGACAAAACCTCACACAT  
P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T

6721 GCCCACCCTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAA  
C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P

6781 AACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACG  
K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D

6841 TGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATA  
V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H

6901 ATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCC  
N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V

Фиг. 33/5

6961 TCACCGTCCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAAC  
L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N

7021 AAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC  
K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E

7081 CACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGA  
P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L

7141 CCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC  
T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G

7201 AGCCGGAGAAACAATAACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC  
Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F

7261 TCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCT  
L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C

7321 CCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG  
S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P  
                    NgoM I

7381 GTAAATGAGTGCAGCGGCCCGCAAGCCCCGCTCCCCGGGCTCTCGCGGTGCGACGAGGAT  
G K \*

7441 GCTTGGCACGTACCCCTGTACATACTTCCCGGGCGCCAGCATGGAAATAAAGCACCGG

7501 ATCTAATAAAAGATATTTATTTTCATTAGATATGTGTGTTGGTTTTTTTGTGTGCAGTGCC

7561 TCTATCTGGAGGCCAGGTAGGGCTGGCCTTGGGGGAGGGGGAGGCCAGAATGACTCCAAG

7621 AGCTACAGGAAGGCAGGTGAGAGACCCCACTGGACAAAACAGTGGCTGGACTCTGCACCAT

7681 AACACACAATCAACAGGGGAGTGAGCTGGaaattttqctaagcaattaattc 7731

ФИГ. 33/6

## ИНТРОН

3'-конец V-гена ----- 5'-конец CH1

ACC GTC TCC TCA G::GTGAGTGGATCC-(N)<sub>48</sub>-CCTCTCTTGAG::CC-

T V S S сайт сплайсинга BamHI сайт сплайсинга

донора акцептора

-TCC ACC AAG GGC  
S T K G

U

ACC GTC TCC TCA G:::CC TCC ACC AAG GGC  
T V S S S T K G

↓

ACC GTC TCC TCA GCC TCC ACC AAG GGC  
T V S S A S T K G

ФИГ. 34А

ИНТРОН

3'-конец V-гена ----- 5'-конец константной области каппа-цепи  
GAA ATA AAA C::GTGAGTGGATCC-(N)<sub>108</sub>-CTTCTTTCTCTAG::GA-  
Е I К сайт сплайсинга донора BamHI сайт сплайсинга акцептора

-ACT GTG GCT GCA  
T V A A

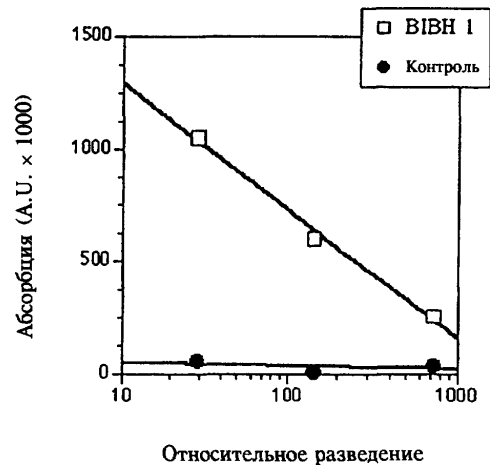
⇓

GAA ATA AAA C:::GA ACT GTG GCT GCA  
E I K T V A A

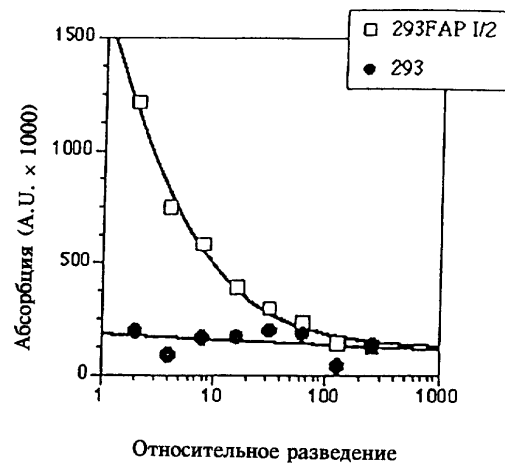
↓

GAA ATA AAA CGA ACT GTG GCT GCA  
E I K R T V A A

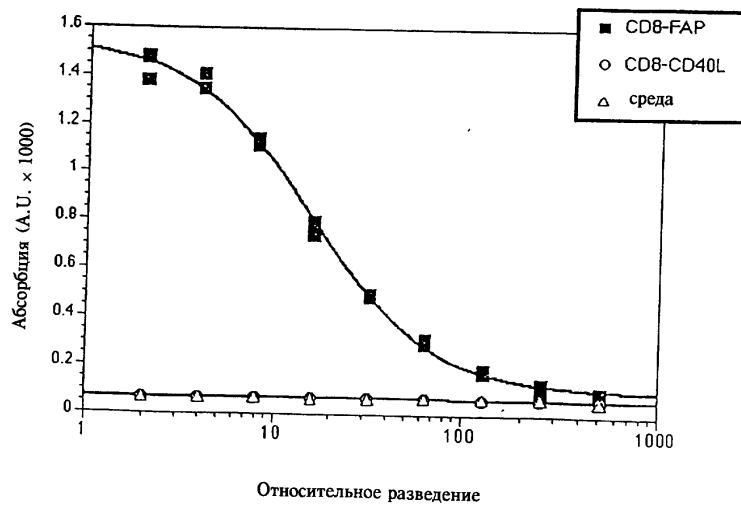
Фиг. 34Б



Фиг. 35



Фиг. 36



Фиг. 37

