

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к антителам, специфично связывающимся с белком активации фибробласта (FAP α). 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 многочисленными 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 варибельные 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 гиперварибельных участков (CDR) из варибельных областей в варибельные области антител человека и затем соединения этих "преобразованных" варибельных 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 Khzaeli 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, гуманизованное 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. Несответствующая 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 гиперварибельные участки моноклонального антитела F19 (АТСС регистрационный номер НВ 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., Gottesman 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 Чотхия и Леск (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 α), 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 avidность 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: MGWSWVFLFLLSGTAGVLS.

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 А, В и С, приведены на фиг. 1-6.

Для версий А, В и С переменных областей легкой цепи обнаружена в значительной степени повышенная продуктивность в CHO-клетках (см. пример 11). Хотя версии А и С переменных областей легкой цепи отличаются от версии В 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 В преобразованной легкой цепи антитела человека F19 и версиями А или С. Аминокислотные последовательности версий А и В 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 В переменной области легкой цепи, может оказаться косвенным, если заменить 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}I , ^{125}I , ^{186}Re , ^{188}Re или ^{90}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 β -излучением. Наиболее предпочтительными из радиоизотопов с β -излучением, позволяющими осуществлять локализованное облучение и разрушение злокачественных опухолевых клеток, являются ^{186}Re , ^{188}Re , ^{131}I и ^{90}Y . Таким образом, радиоизотопы, выбранные из группы, включающей ^{186}Re , ^{188}Re , ^{131}I и ^{90}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, внутривисцеральный, 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/м², предпочтительно от 5 до 50 мг/м² 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 большого 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 фибробластом стромы в опухоли, где опухоль представляет собой опухоль, включающую раковые клетки, выбранную из группы злокачественных опухолей, включающей колоректальные опухоли, мелкоклеточный 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 вариательной области легкой цепи F19 (hF19L_A), SEQ ID NO:1.

Фиг. 2. Аминокислотная последовательность версии А преобразованной человеческой вариательной области легкой цепи F19 (hF19L_A), SEQ ID NO:2.

Фиг. 3. Последовательность ДНК версии В преобразованной человеческой вариательной области легкой цепи F19 (hF19L_B), SEQ ID NO:3. Отличные от версии А нуклеотиды подчеркнуты и выделены жирным шрифтом.

Фиг. 4. Аминокислотная последовательность версии В преобразованной человеческой вариательной области легкой цепи F19 (hF19L_B), SEQ ID NO:4. Отличные от версии А аминокислоты подчеркнуты и выделены жирным шрифтом.

Фиг. 5. Последовательность ДНК версии С преобразованной человеческой вариательной области легкой цепи F19 (hF19L_C), 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_C), SEQ ID NO:6. Отличные от версии А аминокислоты подчеркнуты и выделены жирным шрифтом.

Фиг. 7. Последовательность ДНК версии А преобразованной человеческой вариательной области тяжелой цепи F19 (hF19H_A), SEQ ID NO:7.

Фиг. 8. Аминокислотная последовательность версии А преобразованной человеческой вариательной области тяжелой цепи F19 (hF19H_A), SEQ ID NO:8.

Фиг. 9. Последовательность ДНК версии В преобразованной человеческой вариательной области тяжелой цепи F19 (hF19H_B), SEQ ID NO:9. Отличные от версии А нуклеотиды подчеркнуты и выделены жирным шрифтом.

Фиг. 10. Аминокислотная последовательность версии Б преобразованной человеческой вариательной области тяжелой цепи F19 (hF19H_B), SEQ ID NO:10. Отличные от версии А аминокислоты подчеркнуты и выделены жирным шрифтом.

Фиг. 11. Последовательность ДНК версии С преобразованной человеческой вариательной области тяжелой цепи F19 (hF19H_C), SEQ ID NO:11. Отличные от версии А нуклеотиды подчеркнуты и выделены жирным шрифтом.

Фиг. 12. Аминокислотная последовательность версии В преобразованной человеческой вариательной области тяжелой цепи F19 (hF19H_C), SEQ ID NO:12. Отличные от версии А аминокислоты подчеркнуты и выделены жирным шрифтом.

Фиг. 13. Последовательность ДНК версии D преобразованной человеческой вариательной области тяжелой цепи F19 (hF19H_D), SEQ ID NO:13. Отличные от версии А нуклеотиды подчеркнуты и выделены жирным шрифтом.

Фиг. 14. Аминокислотная последовательность версии D преобразованной человеческой вариательной области тяжелой цепи F19 (hF19H_D), 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_E), 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_E), 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 HCMV_i (человеческий цитомегаловирус)

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 = 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 spc2

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 HCMV_i-KST)

7852-8068 = искусственная терминирующая последовательность spc2.

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 G1m (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

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 G1m (non-a, z,-x), также известный как аллотип Gm(17), для которого характерно наличие остатка глутаминовой кислоты (E) в положении 356 (согласно E_u-нумерации), остатка метионина (M) в положении 358 (согласно E_u-нумерации) и остатка лизина (K) в положении 214 (согласно E_u-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 A, B и C преобразованных человеческих переменных областей легкой цепи F19. Проведен анализ нуклеотидной и выведенной аминокислотной последовательностей и сравнение с последовательностями версии A, 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_A (версия A 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 A 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 CoIEI 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_A (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 CoIEI 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 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 Eu-нумерации), остатка метионина (M) в положении 358 (согласно Eu-нумерации) и остатка лизина (K) в положении 214 (согласно Eu-нумерации). Эти остатки подчеркнуты в приведенной выше последовательности.

Фиг. 34. Случай 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_AH_A с CD8-FAP от концентрации.

Фиг. 36. Связывание биотинилированного L_AH_A с человеческим FAP.

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

Примеры

Пример 1. Конструирование мышинных-человеческих химерных генов.

Создавали химерное антитело F19 (сF19), включающее мышинные 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 мышинные V_L- и V_H-области, использовали ПЦР-праймеры (табл. 1). Конструировали ГТЦР-праймеры, специфичные для V-области легкой цепи F19. Затем эти адаптированные мышинные переменные 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 переменные 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) переменных 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 мышинных 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 мышинного 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. Варибельная 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. Варибельная область тяжелой цепи

1. Праймер для конструирования 5'-конца (37-мерный)
5'-CAGA AAGCTT GCCGCCACC ATG GGA TGG AGC TGG GTC-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 аликватам по 0,8 мл, включающим 1x10⁶ клеток/мл, в забуферном фосфатом физиологическом растворе (ЗФР, без Ca²⁺ и Mg²⁺). 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_L-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 трансфегирующего 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_A-L_C)преобразованной человеческой легкой цепи F19.

Конструирование первой версии преобразованной человеческой V_L-области (L_A) 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_L-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 MgCl₂. 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 (v1a2-v1a5 или v1a6-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_L-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_L-области (L_B) F19 конструировали, используя такую же схему, которая описана для LA, но в которой праймеры v1a4 и v1a7 были заменены на v1b4 и v1b7 соответственно (табл. 3). Последовательность ДНК L_B приведена на фиг. 29.

Третью версию преобразованной человеческой V_L-области (L_C) 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_C-смысловой и F19L_C-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_A в векторе pKN100. Точковую мутацию подтверждали с помощью секвенирования ДНК полной V_L-области. Последовательность ДНК L_C приведена на фиг. 29. Для устранения возможности возникновения случайной мутации в pKN100 в процессе ПЦР, V_L-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 варибельных областей легкой цепи F19 I. Праймеры для синтеза версии "А"

F19v1a1 (36 mer):

5' GTCATCACAATGTCTCCGGAGGAACCTGGAACCCAG 3'

F19v1a2 (29 mer):

5' CTCCGGAGACATTGTGATGACCCAATCTC 3'

F19v1a3 (45 mer):

5' GAATATAAAAGGCTCTGACTGGACTTGCAGTTGATGGTGGCCCTC 3'

F19v1a4 (72 mer):

5' CAGTCAGAGCCTTTTATATTCTAGAAATCAAAAGAACTACTTGGCCT
GGTATCAGCAGAAACCAGGACAGCC 3'

F19v1a5 (44 mer):

5' ACCCCAGATTCCCTAGTGCTAGCCAAAAGATGAGGAGTTTGGG 3'

F19v1a6 (67 mer):

5' TAGCACTAGGGAATCTGGGGTACCTGATAGGTTCACTGGCAGTGGGTTTG
GGACAGACTTCACCCTC 3'

F19v1a7 (53 mer):

5' GTCCCTTGTCCGAACGTGAGCGGATAGCTAAAATATTGCTGACAGTAA
TAAAC 3'

F19v1a8 (33 mer):

5' GCTCACGTTCCGGACAAGGGACCAAGGTGGAAAT 3'

2. Праймеры для синтеза версии "В"

F19v1b4 (72 mer):

5' CAGTCAGAGCCTTTTATATTCTAGAAATCAAAAAGAACTACTTGGCCTGG
TTCCAGCAGAAACCAGGACAGCC 3'

F19v1b7 (57 mer):

5' GTCCCTTGTCCGAACGTGAGCGGATAGCTAAAATATTGCTGACAGTCATA
AACTGCC 3'

3. Праймеры для синтеза версии "С"

F19Lc-смысловой (34 mer):

5' CCCAAAACCTCCTCATCTATTGGGCTAGCACTAGGG 3'

F19Lc-антисмысловой (34 mer):

5' CCCTAGTGCTAGCCCAATAGATGAGGAGTTTGGG 3'

4. Праймеры для гибридизации с фланкирующими последовательностями вектора pUC19

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

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

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

UP (-40) (17 mer, 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 F19VHbd6 (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 F19V_HHindIII (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 (NH₄)₂SO₄, 20мМ трис-HCl (pH

4. Праймеры, гибридизирующиеся 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' CСТТТGGCCAGGGGCCTGTCTAACCCAGTGTATGGTGTATTCAGTGAAGGTG

MscI

TATCCASTAGTTTCCASTAGTTT 3'

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

НСM1 (28 мер, смысловой) 5'-GTCACCGTCCCTTGACACGCGTCTCGGGA-3'

Нисуу (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 γ 1/К
Тяжелая цепь	Легкая каппа-цепь	Концентрация (мкг/мл)
H _A	L _A	2,50
H _A	L _B	0,18
H _B	L _A	1,25
H _B	L _B	0,10
H _D	L _A	1,15
H _D	L _B	0,18
H _A	L _A	1,50
H _A	L _C	1,56
H _C	L _A	1,47
H _C	L _C	1,97
cF19	L _A	1,54
cF19	L _B	0,07
cF19	L _C	2,14

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

Компоненты трансфектирующего антитела		Человеческий γ 1/К
Тяжелая цепь	Легкая каппа-цепь	Концентрация (мкг/мл)
H _A	L _A	2,00
H _A	L _C	2,50
H _C	L _A	2,90
H _C	L _C	3,00
H _E	L _A	2,80
H _E	L _C	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 вариативной 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_AH_C с экспрессирующими FAP человеческими клетками.

Оценивали способность L_AH_C связываться как с рекомбинантным, так и с эндогенно экспрессируемым на клеточной поверхности FAP.

Пример определения связывания L_AH_C 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 мышиноного 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 5×10^5 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 5×10^5 клеток линии опухолевых клеток инкубировали с определенными концентрациями меченого биотинина 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 5×10^5 клеток линии опухолевых клеток инкубировали с определенными концентрациями немеченого тестируемого или контрольного антитела вместе с 1 мкг/мл меченого биотинина 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 _A H _C
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 _A H _C
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 _A H _C
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 _A H _C
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

Конкуренционное 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 _A H _C	1,00	8,0
L _A H _C	3,16	5,5
L _A H _C	10,00	2,9
L _A H _C	31,66	1,7

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

Пример 7. Иммуноэффektorные функции моноклонального антитела L_AH_C в опытах *in vitro*.

Этот эксперимент проводили с целью выявления потенциальной активности моноклонального антитела (МАт) L_AH_C 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_AH_C 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 ⁵¹Сг клетки-мишени инкубировали в присутствии L_AH_C с человеческой сывороткой в качестве источника комплемента или с человеческими MNC (мононуклеары периферической крови) в качестве клеток-эффektorов. Для количественной оценки лизиса клеток-мишеней использовали выделение ⁵¹Сг.

Использовали следующие антитела и линии клеток: L_AH_C (преобразованное человеческое антитело к человеческому FAP, подкласс IgG1), hIgG1 (человеческий изотип IgG1, контроль), 3S193 (мышинное моноклональное антитело к IgG3 Lewis^y (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_AH_C

Опухолевые клетки метили с помощью радиоактивного изотопа путем инкубации в среде RPMI1640 с 100 мкКи ⁵¹Сг (фирма NEN) при 37°C в течение 1 ч. Затем клетки промывали дважды средой без ⁵¹Сг 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% CO₂) 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}Cr при 37°C в течение 1 ч. Затем клетки промывали дважды средой без ^{51}Cr и ресуспендировали в концентрации 2×10^5 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 (ЛАК-клетки) получали из MNC (мононуклеары периферической крови) инкубацией в течение 5 дней при 37° С в термостате (95% воздуха, 5% 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 добавляли из маточного раствора до соответствующей концентрации средой для культуры клеток RPMI1640.

1×10^4 радиоактивно меченных опухолевых клеток из исследуемой линии клеток инкубировали в течение 5 ч при 37°C в атмосфере 5% 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^y антитела 3S193 с известной способностью к активации комплемента (табл. 15б).

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 ЛАК-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 NT-1080FAP, опосредованный человеческим моноклональным антителом к FAP L_AH_C

Источник человеческой сыворотки:	Клон 33 NT-1080	
	hIgG1	L _A H _C
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 NT-1080	
	hIgG1	L _A H _C
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^y 3S193

Источник человеческой сыворотки:	MCF-7	
	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	
	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 компонента

Таблица 16. АЗКЦ (зависящая от антитела клеточная цитотоксичность) (удельный лизис в %) в отношении клона 33 линии опухолевых клеток-мишеней HT-1080FAP человеческих MNC (мононуклеары периферической крови), опосредованная L_AH_C Клон 33 HT-1080FAP

Концентрация антитела (в мкг/мл)	Клон 33 HT-1080FAP	
	hIgG1	L _A H _C
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, 10⁴ клеток-мишеней и соотношение эффекто-ры:клетки-мишени 50:1.

Таблица 17. АЗКЦ (зависящая от антитела клеточная цитотоксичность) (удельный лизис в %) в отношении клона 33 линии опухолевых клеток-мишеней HT-1080FAP LAK-клетками (лимфокинактивированные киллеры), опосредованная L_AH_C

Концентрация антитела (в мкг/мл)	Клон 33 HT-1080FAP	
	hIgG1	L _A H _C
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_AH_C с нормальной и неопластической тканями человека.

Этот эксперимент осуществляли для того, чтобы определить характеристики связывания гуманизированного МАт L_AH_C с нормальной и неопластической тканями человека.

Использовали следующие антитела: L_AH_C, 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 мг/мл в 2% БСА/ЗФР (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/ЗФР.

Для иммунохимических анализов использовали следующие реагенты: комплекс стрептавидин-пероксидаза (фирма Vector Labs, Burligame, 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 свежемороженые 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 мышиноного 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 bronхи: -эпителий бронхов -гиалиновый хрящ -соединительная ткань -слизистые железы альвеолы: -пневоциты (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	№	BIBH 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	№	BIBH 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_AH_C в срезах тканей Этот эксперимент проводили для оценки с помощью иммуногистохимических методов реактивности L_AH_C 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_AH_C, 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_AH_C, ни с cF19 (табл. 1).

В примененных в качестве положительного контроля человеческих панкреатических железах обнаружено, что L_AH_C и cF19 связываются с подгруппой эндокринных клеток в островках Лангерганса, как ранее установлено для F19. Кроме того, связывание L_AH_C 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_AH_C, ни cF19.

Таблица 20. Связывание L_AH_C 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 фармакопеи 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 каппа-цепи (A 3813) получали от фирмы Sigma Chemical (Сент-Луис, MO, США). 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°C до употребления.

Очистка L_AH_C

Все стадии очистки проводили при 4°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°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 невидимой. Элюцию антитела начинали при 280 нм и собирали 1 мл фракции элюированного продукта в пробирку, 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°C . Сенсibilизирующее антитело удаляли и планшеты блокировали 2%-ным БСА в ЗФР в течение 2 ч. Все последующие стадии проводили при 37°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 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 _A H _C	7-10 мг/л	~5-7 мг/л	500-700
L _A H _A	5-7 мг/л	~3-4 мг/л	300-400
L _B H _B	0,5-1 мг/л	~0,2-0,5 мг/л	20-50
L _B H _D	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_AH_C с выделенным рекомбинантным человеческим FAP.

Целью этого исследования была характеристика связывания L_AH_C с выделенным рекомбинантным человеческим FAP.

Оценка с помощью ELISA CD8-FAP

Планшеты для ELISA покрывали (сенсibilizировали) в течение ночи 100 мкл мышинового антикри-синого 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 мкл 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 нетрансфектированных клеток. Лунки промывали и добавляли 100 мкл мышинового 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 субстрат 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 сF19. Согласно описанному выше способу давали связаться с этими планшетами FAP (рекомбинантный человеческий FAP, см. пример 13) и затем добавляли биотинилированное L_AH_C (~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 ВВ (фирма Calbochem) 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_AH_C

L_AH_C (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) котрансфектировали электропорацией векторами, кодирующими тяжелую и легкую цепь L_AH_C.

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_AH_C, серийно разбавляли и добавляли в лунки, содержащие иммобилизованный CD8-FAP. L_AH_C 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_AH_C связывалось рекомбинантным человеческим FAP, иммобилизованным с помощью cF19 (фиг. 36) в зависимости от концентрации.

Антитело L_AH_C распознавало выделенный иммобилизованный рекомбинантный человеческий FAP, несущий эпитоп мышинового F19. Антитело L_AH_C 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_AH_C 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 сенсibiliзированные cF19 титрационные микропланшеты. Добавляли биотинилированное L_AH_C и связывание биотинилированного L_AH_C 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}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 L_{AHC} -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 α (Genbank M12825), связывали с кДНК внеклеточного домена FAP (аминокислоты 27-760), в основном согласно методу, описанному Lane с соавторами (Lane P., Brocker 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 FiveTM (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

<110> Boehringer Ingelheim International GmbH

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

<130> 12-196-РСТ

<140> РСТ/EP99/02711

<141> 1999-04-22

<150> EP 98107925.4

<151> 1998-04-30

<160> 101

<170> PatentIn ver. 2.1

<210> 1

<211> 339

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

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

```

<210> 2

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 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

```

<210> 3

<211> 339

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 3
gacattgtga tgaccaatc tccagactct ttggctgtgt ctctagggga gagggccacc 60
atcaactgca agtccagtca gaggccttta tattctagaa atcaaaagaa ctacttggcc 120
tggttccagc agaaaccagg acagccaccc aaactcctca tcttttgggc tagcactagg 180
gaatctgggg tacctgatag gttcagtggc agtggggttg ggacagactt caccctcacc 240
attagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttatgact gtcacaata 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 gaggccttta 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
 cagggtgcaac tagtgcagtc cggcgccgaa gtgaagaaac cgggtgcttc cgtgaaagtc 60
 agctgtaaaa ctagtagata caccttcact gaatacacca tacactgggt tagacaggcc 120
 cctggcctaaa ggctggagt gataggagt attaatccta acaatgggt tcctaactac 180
 aaccagaagt tcaagggccg ggccaccttg accgtaggca agtctgccag caccgcctac 240
 atggaactgt ccagcctgcg ctccgaggac actgcagtct actactgcgc cagaagaaga 300
 atcgcctatg 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 cgggtgcttc cgtgaaagtc 60
 agctgtaaaa ctagtagata caccttcact gaatacacca tacactgggt tagacaggcc 120
 cctggccaaa ggctggagtg gataggaggt attaatccta acaatgggtat tcctaactac 180
 aaccagaagt tcaagggcgg ggccaccttg accgtaggca agtctgccag caccgctac 240
 atggaactgt ccagcctgcg ctccgaggac actgcagtct acttctgcg cagaagaaga 300
 atgcctatg gttacgacga gggccatgct atggactact ggggtcaagg aacccttgtc 360
 accgtctct 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 cgggtgcttc cgtgaaagtc 60
 agctgtaaaa ctagtagata caccttcact gaatacacca tacactgggt tagacaggcc 120
 cctggccaaa ggctggagtg gataggaggt attaatccta acaatgggtat tcctaactac 180
 aaccagaagt tcaagggcgg ggccaccttg accgtaggca cctctgccag caccgctac 240
 atggaactgt ccagcctgcg ctccgaggac actgcagtct actactgcg cagaagaaga 300
 atgcctatg gttacgacga gggccatgct atggactact ggggtcaagg aacccttgtc 360
 accgtctct 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

<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 15
 caggtgcaac tagtgcagtc cggcgccgaa gtgaagaaac ccggtgcttc cgtgaaagtc 60
 agctgtaaaa ctagtggata caccttcaact gaatacacca tacactgggt tagacaggcc 120
 cctggccaaa ggctggagtg gataggaggt attaatccta acaatggat tcctaactac 180
 aaccagaagt tcaagggccg ggtcaccatc accgtagaca cctctgccag caccgcctac 240
 atggaactgt ccagcctgcg ctccgaggac actgcagtct actactgcgc cagaagaaga 300
 atcgcctatg gttacgacga gggccatgct atggactact ggggtcaagg aacccttgc 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

<210> 18

<211> 453

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: химерная переменная область тяжелой цепи

<400> 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 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

<210> 19
 <211> 321
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 19
 cgtactgtgg ctgcaccatc tgtcttcate ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60
 ggaactgcct ctggtgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120
 tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
 agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
 aaacacaaag tctacgctg 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 agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60
 ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg 120
 tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctctca 180
 ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300
 aaatcttgtg acaaaaactca cacatgccca ccgtgccag cacctgaact cctgggggga 360
 ccgtcagtct tctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct 420
 gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgagggtcaa gttcaactgg 480
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540
 agcacgtacc ggggtggtcag cgtcctcacc gtccctgacc aggactggct 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 gaggcagggtg 900
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 960
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 990

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

<400> 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

<210> 23

<211> 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 ctctctaaact gctgattttc 240
tgggcatcca ctagggaatc tggggtcctt gatcgcctca caggcagtggt atttggggacg 300
gatttcaatc tcaccatcag cagtgtgcag gctgaggacc tggcagttta tgactgtcag 360
caatattttta gctatccgct cacgttcggt gctggggacca 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 tgccttgcaa gacttctaga tacacattca ctgaatacac catacactgg 180
gtgagacaga gccatggaaa gagccttgag tggattggag gtattaatcc taacaatggt 240
attcctaact acaaccagaa gttcaagggc agggccacat tgactgtagg caagtcctcc 300
agcaccgcct acatggagct cgcagcctg acatctgagg attctgcggt ctatttctgt 360
gcaagaagaa gaatcgccta tggttacgac gagggccatg ctatggacta ctgggggtcaa 420
ggaacctcag tcaccgtctc ctcagggtgag tggatcc 457

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

<213> Homo sapiens

<400> 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

<210> 27

<211> 8068

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 27

gaattccagc aactggcgg cgttactag ttattaatag taatcaatta cggggtcatt 60
 agttcatagc ccatatatgg agttccgctg tacataactt acggtaaatg gcccgctgg 120
 ctgaccgccc aacgaccccc gccattgac gtcaataatg acgtatgttc ccatagtaac 180
 gccaataggg actttccatt gacgtcaatg ggtggagatg ttacggtaaa ctgcccactt 240
 ggcagtacat caagtgtatc atatgccaag tacgccccct attgacgtca atgacggtaa 300
 atggccccgc tggcattatg cccagtacat gaccttatgg gactttccta cttggcagta 360
 catctacgta ttagtcatcg ctattaccat ggtgatgagg ttttggcagt acatcaatgg 420
 gcgtggatag cggtttgact cacggggatt tccaagtctc caccaccattg acgtcaatgg 480
 gagtttggtt tggcaccaaa atcaacggga ctttccaaaa tgcgtaaca actccgcccc 540
 attgacgcaa atgggcggtg ggcgtgtacg gtgggaggtc tatataagca gagctcgttt 600
 agtgaaccgt cagatgcctt ggagacgcca tccacgctgt tttgacctcc atagaagaca 660
 ccgggaccga tccagcctcc gcggccggga acggtgcatt ggaacgcgga tccccgtgc 720
 caagagtgc gtaagtaccg cctatagagt ctataggccc acccccttgg cttcttatgc 780
 atgctatact gtttttggct tggggctctat acacccccgc ttcctcatgt tataggtgat 840
 ggtatagctt agcctatagg tgtgggttat tgaccattat tgaccactcc cctattgggtg 900
 acgatacttt ccattactaa tccataacat ggctctttgc cacaactctc tttattggct 960
 atatgccaat aactgtcctt tcagagactg acacggactc tgtattttta caggatgggg 1020
 tctcatttat tatttcaaaa ttcacatata caacaccacc gtccccagtg cccgcagttt 1080
 ttattaaaca taacgtggga tctccacgcg aatctcgggt acgtgttccg gacatgggct 1140
 cttctccggt agcggcggtg cttctacatc cgagccctgc tcccatgcct ccagcgactc 1200
 atggctcgtc ggcagctcct tgctcctaac agtggaggcc agacttaggc acagcagat 1260
 gccaccacc accagtgtgc cgcacaaggc cgtggcggtg gggatgtgt ctgaaaatga 1320
 gctcggggag cgggcttgca ccgctgacgc atttggaga cttaggcag cggcagaaga 1380
 agatgcaggc agctgagttg ttgtgttctg ataagagtca gaggtaactc ccgttgcggt 1440
 cgtgtaaacg gtggagggca gtgtagtctg agcagtactc gttgctgccc 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
 gccttttata 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
tcctaacat	gccctgtgat	tatgcgcaa	caacacaccc	aagggcagaa	ctttgttact	2100
taaacaccat	cctgtttgct	tctttcctca	ggaactgtgg	ctgcaccatc	tgtcttcatc	2160
ttcccgccat	ctgatgagca	gttgaaatct	ggaactgcct	ctgttgtgtg	cctgctgaat	2220
aacttctatc	ccagagaggc	caaagtacag	tggaaagtgg	ataacgccct	ccaatcgggt	2280
aactcccagg	agagtgtcac	agagcaggac	agcaaggaca	gcacctacag	cctcagcagc	2340
accctgacgc	tgagcaaagc	agactacgag	aaacacaaaag	tctacgcctg	cgaagtcacc	2400
catcagggcc	tgagctcgcc	cgtcacaaaag	agcttcaaca	ggggagagtg	ttagagggag	2460
aagtgcccc	acctgctcct	cagttccagc	ctgacccctt	cccatccttt	ggcctctgac	2520
cctttttcca	caggggacct	acccctattg	cggtcctcca	gctcatcttt	cacctcacc	2580
ccctcctcct	ccttggcttt	aattatgcta	atgttggagg	agaatgaata	aataaagtga	2640
atctttgcac	ctgtggtgga	tctaataaaa	gatatttatt	ttcattagat	atgtgtgttg	2700
gttttttgtg	tgagtgccct	ctatctggag	gccaggtagg	gctggccttg	ggggaggggg	2760
aggccagaat	gactccaaga	gctacaggaa	ggcaggtcag	agaccccact	ggacaaaacg	2820
tggctggact	tgacaccata	acacacacat	aacaggggag	tgagctgga	atgtctagc	2880
gaattcctga	agacgaaagg	gcctcgtgat	acgcctatct	ttataggtta	atgtctatgat	2940
aataatgggt	tcttagacgt	caggtggcac	ttttcgggga	aatgtgcgcg	gaaccctat	3000
ttgtttatct	ttctaataac	attcaaatat	gtatccgctc	atgagacaat	aaccctgata	3060
aatgcttcaa	taatattgaa	aaaggaagag	tatgagtatt	caacatttcc	gtgtcgccct	3120
tattcccttt	tttgccgcat	tttgccctcc	tgtttttgct	caccagaaa	cgctggtgaa	3180
agtaaaagat	agtggaagtc	agttgggtgc	acgagtgggt	tacatcgaac	tggatgaagc	3240
cagaaagta	atccttgaga	gttttcgccc	cgaagaacct	ttccaatga	tgagcacttt	3300
taaagtctcg	ctatgtggcg	cggtattatc	ccgtgttgac	gccgggcaag	agcaactcgg	3360
tcgccgcata	cactattctc	agaatgactt	ggttgagtac	tcaccagtca	cagaaaagca	3420
tcttacggat	ggcatgacag	taagagaatt	atgcagtgct	gccataacca	tgagtataaa	3480
cactgcggcc	aacttacttc	tgacaacgat	cgaggaccg	aaggagctaa	ccgctttttt	3540
gcacaacatg	gggatcatg	taactcgcct	tgatcgttgg	gaaccggagc	tgaatgaagc	3600
cataccaac	gacgagcgtg	acaccacgat	gcctgcagca	atggcaacaa	cgttgcgcaa	3660
actattaact	ggcgaactac	ttactctagc	ttcccggcaa	caattaatag	actggatgga	3720
ggcggataaa	gttgaggac	cacttctgcg	ctcggccctt	ccggctggct	ggtttattgc	3780
tgataaatct	ggagccgggtg	agcgtgggtc	tcgcggtatc	attgcagcac	tggggccaga	3840
tgtaaaagccc	tcctgtatcg	tagttatcta	cacgacgggg	agtcaggcaa	ctatggatga	3900
acgaaataga	cagatcgctg	agataggtgc	ctcactgatt	aagcattggt	acagtcaga	3960
ccaagtttac	tcatatatac	tttagattga	tttaaaactt	catttttaat	ttaaaaggat	4020
ctaggtgaag	atcctttttg	ataatctcat	gaccaaatac	ccttaacgtg	agttttcggt	4080
ccactgagcg	tcagaccccg	tagaaaagat	caaaggatct	tcttgagatc	ctttttttct	4140
gcgcgtaatc	tgtctgttgc	aaacaaaaaa	accaccgcta	ccagcgggtg	tttgtttgcc	4200
ggatcaagag	ctaccaactc	tttttcggaa	ggtaactggc	ttcagcagag	cgcatgacc	4260
aaatactgtc	cttctagtgt	agccgtagtt	agccaccac	ttcaagaact	ctgtagcacc	4320
gcctacatac	ctcgtctctg	taatcctggt	accagtggtc	gctgccagtg	gcgataagtc	4380
gtgtcttacc	gggttggact	caagacgata	gttaccggat	aaggcgcagc	ggtcgggctg	4440
aacgggggtg	tcgtgcacac	agcccagctt	ggagcgaacg	acctacaccg	aactgagata	4500
cctacagcgt	gagctatgag	aaagcggcac	gcttcccga	gggagaaagg	cggacaggta	4560
tccggtaaag	ggcaggtcgt	gaacaggaga	gcgcacgagg	gagcttccag	gggaaacgc	4620
ctggtatctt	tatagctctg	tcgggtttcg	ccacctctga	cttgagcgtc	gttttttgtg	4680
atgctcgtca	ggggggcgga	gcctatggaa	aaacgccagc	aacgcggcct	ttttacgggt	4740
cctggccttt	tgctggcctt	ttgctcacat	gttctttcct	gcgttatccc	ctgattctgt	4800
ggataaccgt	attaccgcct	ttgagtgagc	tgataaccgt	cgccgcagcc	gaacgaccga	4860
gcgcagcgag	tcagtgagcg	aggaagcgga	agagcgcctg	atgcggtatt	ttctccttac	4920
gcactctgtc	ggtatttcac	accgcatatg	gtgcactctc	agtacaatct	gctctgatgc	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	tgctcagttag	ggtgtggaaa	gtcccagcc	5220
tcccagcagc	gcagaagtat	gcaaagcatg	catctcaatt	agtcagcaac	caggtccccc	5280
agcaggcaga	agtagcaaa	gcatgcatct	caattagtca	gcaaccatag	tcccggccct	5340
aactccgccc	atcccggccc	taactccgcc	cagttccgcc	cattctccgc	cccatggctg	5400
actaatTTTT	tttattttatg	cagaggccga	ggccgcctcg	gcctctgagc	tattccagaa	5460
gtagttagga	ggcttttttg	gaggcctagg	cttttgcaaa	aagctagctt	cacgctgccg	5520
caagcactca	gggcgcaagg	gctgctaaag	gaagcggaac	acgtagaaa	ccagtcggca	5580
gaaacgtgac	tgaccccgga	tgaatgtcag	ctactgggct	atctggacaa	gggaaaacgc	5640
aagcgcgaa	agaaagcagg	tagcttgcag	tgggcttaca	tggcगतagc	tgactgggc	5700
ggttttatgg	acagcaagcg	aaccggaatt	gccagctggg	gcgccctctg	gtaaggttgg	5760
gaagccctgc	aaagtaact	ggatggcttt	cttgcggcca	aggatctgat	ggcgcagggg	5820

```

atcaagatct gatcaagaga caggatgagg atcgtttcgc atgattgaac aagatggatt 5880
gcacgcaggt tctccggccg cttgggtgga gaggctattc ggctatgact gggcacaaca 5940
gacaaatcggc tgctctgatg ccgccgtgtt ccggctgtca gcgcaggggc gcccggttct 6000
ttttgtcaag accgacctgt ccggtgcccct gaatgaactg caggacgagg cagcgcggct 6060
atcgtggctg gccacgacgg gcgttccttg cgcagctgtg ctcgacgttg tcaactgaagc 6120
gggaagggac tggctgctat tgggcgaagt gccggggcag gatctcctgt catctcacct 6180
tgctcctgcc gagaaagtat ccatcatggc tgatgcaatg cggcggctgc atacgcttga 6240
tccggctacc tgcccattcg accaccaagc gaaacatcgc atcgagcgag cacgtactcg 6300
gatggaagcc ggtcctgtcg atcaggatga tctggacgaa gagcatcagg ggctcgcgcc 6360
agccgaactg ttcgccaggc tcaaggcgcg catgcccgcac ggcgaggatc tcgtcgtgac 6420
ccatggcgat gcctgcttgc cgaatatcat ggtggaaaat ggccgctttt ctggattcat 6480
cgactgtggc cggctgggtg tggcggaccg ctatcaggac atagcgttgg ctaccctgta 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 ttcggaatcg ttttccggga cgcggctgg 6780
atgatcctcc agcgcgggga tctcatgctg ggttcttctg cccaccccgg gctcgatccc 6840
ctcgcgagtt ggttcagctg ctgcctgagg ctggacgacc tcgcgagtt ctaccggcag 6900
tgcaaatccg tcggcatcca ggaaaccagc agcggctatc cgcgcatcca tgccccgaa 6960
ctgcaggagt ggggaggcac gatggccgct ttggtcccgg atctttgtga aggaacctta 7020
cttctgtggt gtgacataat tggacaaact acctacagag atttaaagct ctaaggtaaa 7080
tataaaattt ttaagtgtat aatgtgtaa actactgatt ctaattgttt gtgtatttta 7140
gattccaacc tatggaactg atgaatggga gcagtggagg aatgccttta atgaggaaaa 7200
cctgttttgc tcagaagaaa tgccatctag tgatgatgag gctactgctg actctcaaca 7260
ttctactcct ccaaaaaaga agagaaaggt agaagacccc aaggactttc cttcagaatt 7320
gctaagtttt ttgagtcatg ctgtgttttag taatagaact cttgcttgcct 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
gttacaataa aagcaatagc atcacaatc tcaaaaataa 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                                     8068

```

<210> 28

<211> 239

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 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

<210> 29

<211> 7731

<212> DHK

<213> Homo sapiens

<400> 29

ttgaagacga aaggcctcg tgatacgcct atttttatag gttaatgtca tgataataat 60
 ggtttcttag acgtcaggtg gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaacct ctatttgttt 120
 atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataacctt gataaatgct 180
 tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc 240
 cttttttgcg gcattttgcc ttccctgttt tgctcaccga gaaacgctgg tgaaagtaaa 300
 agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg 360
 taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaaagt 420
 tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgtgt tgacgccggg caagagcaac tcggtcgccc 480
 catacactat tctcagaatg acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac 540
 ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataactctgc 600
 ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt tttgacaaa 660
 catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc 720
 aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgc agcaatggca acaacgttgc gcaaacctt 780
 aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcggg 840
 taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ccttccggct ggctggttta ttgctgataa 900
 atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcggcg tatcattgca gcaactgggc cagatggtaa 960
 gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa 1020
 tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggttaactgt cagaccaagt 1080
 ttactcatat atactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt 1140
 gaagatcctt tttgataaat tcatgaccaa aatcccctaa cgtgagtttt cgttccactg 1200
 agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt 1260
 aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttggt tgccggatca 1320
 agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac 1380
 tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac 1440
 atacctcgct ctgctaattc tgttaccagt ggtgctgccc agtggcgata agtcgtgtct 1500
 taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg 1560
 gggttcgtgc acacagccca gcttgagcgc aacgacctac accgaactga gatacctaca 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 ggttccctggc 1860
 cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tcttgcgta tccccgtatt ctgtggataa 1920
 ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcggcgc agccgaacga ccgagcgcag 1980
 cgagtcagtg agcaggaag cggaagagcg cctgatgcgg tattttctcc ttacgcctct 2040
 gtgcggtatt tcacaccgca tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atgccgcata 2100
 gttaagccag tatacactcc gctatcgtca cgtgactggg tcatggctgc gccccgacac 2160

ccgccaacac	ccgctgacgc	gccctgacgg	gcttgtctgc	tcccggcacc	cgcttacaga	2220
caagctgtga	ccgtctccgg	gagctgcatg	tgtcagaggt	tttcaccgct	atcaccgaaa	2280
cgcgcgaggc	agcatgcacc	tcaattagtc	agcaaccata	gtcccgcacc	taactccgcc	2340
catcccggcc	ctaactccgc	ccagttccgc	ccattctccg	ccccatggct	gactaatttt	2400
ttttatttat	gcagaggccg	aggccgcctc	ggcctctgag	ctattccaga	agtagtgagg	2460
aggctttttt	ggaggcctag	gcttttgcaa	aaagctagct	tacagctcag	ggctgcgatt	2520
tcgcgccaaa	cttgacggca	atcctagcgt	gaaggctggg	aggattttat	ccccgctgcc	2580
atcatggttc	gaccattgaa	ctgcatcgtc	gccgtgtccc	aaaatatggg	gattggcaag	2640
aacggagacc	taccctggcc	tccgctcagg	aacgagttca	agtacttcca	aagaatgacc	2700
acaacctctt	cagtggaagg	taaacagaat	ctggtgatta	tgggtaggaa	aacctggttc	2760
tccattcctg	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	tgaaagtga	cacgtttttc	ccagaaattg	atltggggaa	atataaaott	3060
ctcccagaat	accacggcgt	cctctctgag	gtccaggagg	aaaaggcat	caagtataag	3120
tttgaagtct	acgagaagaa	agactaacag	gaagatgctt	tcaagttctc	tgctcccctc	3180
ctaaagctat	gcatttttat	aagaccatgg	gacttttgct	ggctttagat	ctttgtgaag	3240
gaaccttact	tctgtggtgt	gacataattg	gacaaactac	ctacagagat	ttaaagctct	3300
aaggtaaata	taaaattttt	aagtgtataa	tgtgttaaac	tactgattct	aattgtttgt	3360
gtattttaga	ttccaacctt	tggaaactgt	gaatgggagc	agtgggtgaa	tgcttttaat	3420
gaggaaaccc	tgttttgctc	agaagaaatg	ccatctagtg	atgatgaggc	tactgtgac	3480
tctcaacatt	ctactctccc	aaaaagaag	agaaaggtag	aagaccccaa	ggactttcct	3540
tcagaattgc	taagtttttt	gagtcatgct	gtgtttagta	atagaactct	tgcttgcttt	3600
gctattttaca	ccacaaagga	aaaagctgca	ctgctataca	agaaaattat	ggaaaaatat	3660
tctgtaacct	ttataagtag	gcataacagt	tataatcata	acatactggt	ttttcttact	3720
ccacacaggg	atagagtgtc	tgctattaat	aactatgctc	aaaaattgtg	tacctttagc	3780
tttttaattt	gtaaagggtt	taataaggaa	tatttgatgt	atagtgcctt	gactagagat	3840
cataatcagc	cataccacat	ttgtagaggt	tttacttgct	ttaaaaaacc	tcccacacct	3900
ccccctgaac	ctgaaacata	aaatgaaatg	aattgttggt	gttaacttgt	ttattgcagc	3960
ttataatggt	tacaaataaa	gcaatagcat	cacaaatttc	acaaataaag	catttttttc	4020
actgcattct	agttgtgggt	tgtocaaact	catcaatgta	tottatcatg	tctggatcta	4080
ataaaaagata	tttattttca	ttagatatgt	gtggtgggtt	tttgtgtgca	gtgctctat	4140
ctggaggcca	ggtagggctg	gccttggggg	agggggaggc	cagaatgact	ccaagagcta	4200
caggaaggca	ggtcagagac	cccactggac	aaacagtggt	tggactctgc	accataacac	4260
acaatcaaca	ggggagtggg	ctggaaattt	gctagogaat	tccagcacac	tggcggccgt	4320
tactagttat	taatagtaat	caattacggg	gtcattagtt	catagcccat	atatggagtt	4380
ccgcgttaca	taacttacgg	taaattggccc	gcctggtgta	ccgcccaacg	acccccgcc	4440
attgacgtca	ataatgaagt	atgttcccat	agtaacgcca	atagggactt	tccattgacg	4500
tcaatgggtg	gagtatttac	ggtaaactgc	ccacttggca	gtacatcaag	tgatcatat	4560
gccaaagtacg	ccccctattg	acgtcaatga	cggtaaattg	ccgcctggc	attatgcca	4620
gtacatgacc	ttatgggact	ttcctacttg	gcagtacatc	tacgtattag	tcatcgctat	4680
taccatgggtg	atgcggtttt	ggcagtagat	caatgggctg	ggatagcggg	ttgactcacg	4740
gggatttcca	agtctccacc	ccattgacgt	caatgggagt	ttgttttggc	acaaaaatca	4800
acgggacttt	ccaaaatgct	gtaacaactc	gcgccattg	acgcaaatgg	tccgtaggcg	4860
tgtacgggtg	gaggtctata	taagcagagc	tcgtttagtg	aaccgtcaga	tcgcctggag	4920
acgccatcca	cgctgttttg	acctccatag	aagacacggg	gaccgatcca	gcctccgcgg	4980
ccgggaacgg	tgcatgggaa	cgcggtattc	ccgtgccaag	agtgacgtaa	gtaccgccta	5040
tagagtctat	aggccccacc	ccttggtctc	ttatgcatgc	tatactgttt	ttggcttggg	5100
gtctatacac	ccccgcttcc	tcatgttata	ggtgatggta	tagcttagcc	tataggtgtg	5160
ggttattgac	cattattgac	cactccccta	ttggtgacga	tactttccat	tactaatcca	5220
taacatgggt	ctttgccaca	actctcttta	ttggctatat	gccaatacac	tgctctcag	5280
agactgacac	ggactctgta	tttttacagg	atggggtctc	atltattatt	tacaaattca	5340
catatacaac	accaccgtcc	ccagtgcccc	cagtttttat	taaacataac	gtgggatctc	5400
cacgcgaatc	tgggttacgt	gttccggaca	tgggtctctc	tccggtagcg	gcgagacttc	5460
tacatccgag	cctgctccc	atgcctccag	cgactcatgg	tcgctcggca	gctcctgtct	5520
cctaacagtg	ccgtccagac	ttaggcacag	cacgatgccc	accaccacca	gtgtgcccga	5580
caaggccgtg	gcggtagggt	atgtgtctga	aaatgagctc	ggggagcggg	cttgcaaccg	5640
tgacgcattt	ggaagactta	aggcagcggc	agaagaagat	gcaggcagct	gagttgttgt	5700
gttctgataa	gagtcagagg	taactcccg	tgcgggtgctg	ttaacgggtg	agggcaggtg	5760
agtctgagca	gtactcgttg	ctgccgcggc	cgccaccaga	cataatagct	gacagactaa	5820
cacactgttc	ccttccatgg	gtcttttctg	cagtcaccgt	ccttgacacg	cgctcggga	5880
agcttgcgc	caccatggga	tggagctggg	tcttctctt	tctcctgtca	ggagctgcag	5940
gtgtcctctc	tgaggctccag	ctgcaacagt	ctggacctga	gctgggtgag	cctggggctt	6000
cagtaaagat	gtcctgcaag	acttctagat	acacattcac	tgaatacacc	atacactggg	6060
tgagacagag	ccatggaaag	agccttgagt	ggattggagg	tattaatcct	aacaatggta	6120
ttcctaacta	caaccagaag	ttcaagggca	ggccacatt	gactgtaggg	aagtctcca	6180

```

gcaccgccta catggagctc cgcagcctga catctgagga ttctgcggtc tattttctgtg 6240
caagaagaag aatcgcctat ggttacgacg agggccatgc tatggactac tggggccaag 6300
gaacctcagt caccgtctcc tcagggtgagt ggatcctctg cgcctgggcc cagctctgtc 6360
ccacaccgcg gtcacatggc accacctctc ttgcagcctc caccaagggc ccatcggtct 6420
tcccctggc accctcctcc aagagcacct ctggggggcac agcggccctg ggctgcctgg 6480
tcaaggacta cttccccgaa cgggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg 6540
gcggtgcacac 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 tccccccaa 6780
aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg 6840
tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata 6900
atgccaagac aaagccgchg gaggagcagt acaacagcac gtaccgggtg gtcagcgtcc 6960
tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag gtctccaaca 7020
aagccctccc agcccccatc gagaaaacca totccaaagc caaagggcag ccccgagaac 7080
cacaggtgta caacctgcc ccattcccgg aggatgac caagaaccag gtcagcctga 7140
cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt 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 ctccccgggc tctcgcggtc gcaagaggat 7440
gcttggcagc taccctctgt acatacttcc cgggcgccc gcatggaaat aaagcaccgg 7500
atctaataaa agatatttat tttcattaga ctgtgtgtt ggtttttgt gtgcagtgcc 7560
tctatctgga ggccaggtag ggctggcctt gggggagggg gaggccagaa tgactccaag 7620
agctacagga aggcaggtca gagacccac tggacaaaca gtggctggac tctgaccat 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
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
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

<210> 31

<211> 339

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 31

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

gaatctgggg 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

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 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

<210> 35
<211> 8068
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 35

```

gaattccagc acactggcgg cggttactag ttattaatag taatcaatta cggggctcatt 60
agttcatagc ccatatatgg agttccgcgt tacataactt acggtaaatt gccgcctgg 120
ctgaccgccc aacgaccccc gccattgac gtcaataatg acgtatgttc ccatagtaac 180
gccaataggg actttccatt gacgtcaatg ggtggagtat ttacggtaaa ctgcccactt 240
ggcagtagac caagtgtatc atatgccaa gacgccccct attgacgtca atgacggtaa 300
atggccccgc tggcattatg cccagtacat gacottatgg gactttccta cttggcagta 360
catctacgta ttagtcatcg ctattaccat ggtgatgcgg ttttggcagt acatcaatgg 420
gcgtggatag cggtttgact cacggggatt tccaagtctc caccocattg acgtcaatgg 480
gagtttgttt tggcaccaaa atcaacggga ctttccaaaa tgtcgtaca actccgcccc 540
attgacgcaa atggggcggt ggcggtgacg gtggggaggtc tatataagca gagctcgttt 600
agtgaaccgt cagatgcctc ggagacgcca tccacgctgt tttgacctcc atagaagaca 660
ccgggaccga tccagcctcc gggccggga acgggtgcatt ggaacgcgga ttccccgtg 720
caagagtac gtaagtaccg cctatagagt ctataggccc acccccttgg cttcttatgc 780
atgctatact gtttttggct tggggtctat acacccccgc ttccctcatg tataggatgat 840
ggtagtagct agcctatagg tgtgggttat tgaccattat tgaccactcc cctattgggtg 900
acgatacttt ccattactaa tccataacat ggctctttgc cacaactctc tttattggct 960
atatgccaat acactgtcct tcagagactg acacggactc tgtattttta caggatgggg 1020
tctcatttat tatttaciaa tccacatata caacaccacc gtccccagtg cccgcagttt 1080
ttattaaaca taacgtggga tctccacgcg aatctcgggt acgtgttccg gacatgggct 1140
cttctccggt agcggcggag cttctacatc cgagccctgc tcccatgcct ccagcgactc 1200
atggctcgctc ggcagctcct tgctcctaac agtggaggcc agacttaggc acagcacgat 1260
gccaccacc accagtgtgc cgcacaaggc cgtggcggta gggtagtgtt ctgaaaatga 1320
gctcggggag cgggcttgca ccgctgacgc atttggaga ctttaaggcag cggcagaaga 1380
agatgcagcg agctgagttg ttgtgtctc ataagagtca gaggtactc cgttgcggt 1440
gctgttaacg gtggagggca gtgtagtctg agcagtactc gttgctgccg cgcgcgccac 1500
cagacataat agctgacaga ctaacagact gttcctttcc atgggtcttt tctgcagtca 1560
ccgtccttga cacgctctc gggaaagctt cccccaacct ggagacagac aactcctgc 1620
tatgggtgct gctgctctgg gttccaggtt cctccggaga cattgtgatg acccaatctc 1680
cagactcttt ggctgtgtct ctaggggaga gggccacct caactgcaag tccagtcaga 1740
gccttttata ttctagaact caaagaact acttggcctg gtatcagcag aaaccaggac 1800
agccacccaa actcctcact 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	tatgcgcaaa	caacacaccc	aagggcagaa	ctttgttact	2100
taaacaccat	cctggttgct	tctttcctca	ggaactgtgg	ctgcaccatc	tgtcttcatc	2160
ttcccgccat	ctgagagca	gttgaatct	ggaactgcc	ctggtgtgtg	cctgctgaat	2220
aacttctatc	ccagagaggc	caaagtacag	tgggaaggtg	ataacgccct	ccaatcgggt	2280
aactcccagg	agagtgtcac	agagcaggac	agcaaggaca	gcacctacag	cctcagcagc	2340
accctgacgc	tgagcaaagc	agactacgag	aaacacaaag	tctacgcctg	cgaagtcacc	2400
catcagggcc	tgagctcgcc	cgtcacaaag	agcttcaaca	ggggagagtg	ttagagggag	2460
aagtgcccc	acctgctcct	cagttccagc	ctgaccccc	cccatccttt	ggcctctgac	2520
cctttttcca	caggggacct	acccctattg	cggtcctcca	gctcatcttt	cacctcacc	2580
ccctcctcct	ccttggcttt	aattatgcta	atgttggagg	agaatgaata	aataaagtga	2640
atctttgcac	ctgtggtgga	tctaataaaa	gatatttatt	ttcattagat	atgtgtgttg	2700
gtttttgtg	tgcagtgcct	ctatctggag	gccaggtagg	gctggccttg	ggggaggggg	2760
aggccagaat	gactccaaga	gctacaggaa	ggcaggtcag	agacccccact	ggacaaacag	2820
tggctggact	ctgcaccata	acacacaatc	aacaggggag	tgagctggaa	atttgcctagc	2880
gaattcttga	agacgaaagg	gcctcgtgat	acgcctattt	ttataggtta	atgtcatgat	2940
aataatgggt	tcttagacgt	caggtggcac	ttttcgggga	aatgtgcgcg	gaacccctat	3000
ttgtttattt	ttctaataac	attcaaatat	gtatccgctc	atgagacaat	aaccctgata	3060
aatgcttcaa	taatattgaa	aaaggaagag	tatgagtatt	caacatttcc	gtgtcggcct	3120
tattcccttt	tttgcggcat	tttgccttcc	tgtttttgct	caccagaaa	cgctggtgaa	3180
agtaaaagat	gctgaagatc	agttgggtgc	acgagtggtg	tacatcgaac	tggatctcaa	3240
cagcggtaag	atccttgaga	gttttcgccc	cgaagaacgt	ttccaatga	tgagcacttt	3300
taaagttctg	ctatgtggcg	cggtattatc	ccgtgttgac	gccgggcaag	agcaactcgg	3360
tcgccgcata	cactattctc	agaatgactt	ggttgagtac	tcaccagtca	cagaaaagca	3420
tcttacggat	ggcatgacag	taagagaatt	atgcagtgct	gccataacca	tgagtgataa	3480
cactgcgggc	aacttacttc	tgacaacgat	cggaggaccg	aaggagctaa	ccgctttttt	3540
gcacaacatg	ggggatcatg	taactcgcct	tgatcgttgg	gaaccggagc	tgatgcagc	3600
cataccaaac	gacgagcgtg	acaccacgat	gcctgcagca	atggcaacaa	cgttgcgcaa	3660
actattaact	ggcgaactac	ttactctagc	ttcccggcaa	caattaatag	actggatgga	3720
ggcggataaa	gttgcaggac	cacttctgcg	ctcggccctt	ccggctggct	ggtttattgc	3780
tgataaatct	ggagccgggtg	agcgtgggtc	tcgcggtatc	attgcagcac	tggggccaga	3840
tggtaagccc	tcccgatcgc	tagttatcta	cacgacgggg	agtcaggcaa	ctatggatga	3900
acgaaataga	cagatcgctg	agatagggtc	ctcactgatt	aagcattggg	aactgtcaga	3960
ccaagtttac	tcatatatac	tttagattga	tttaaaactt	catttttaat	ttaaaaggat	4020
ctaggtgaag	atcctttttg	ataatctcat	gaccaaatac	ccttaacgtg	agttttcgtt	4080
ccactgagcg	tcagaccccc	tagaaaagat	caaaggatct	tcttgagatc	ctttttttct	4140
gcgcgtaatc	tgctgcttgc	aaacaaaaaa	accaccgcta	ccagcgggtg	tttgtttgcc	4200
ggatcaagag	ctaccaactc	tttttccgaa	ggtaactggc	ttcagcagag	cgcagatacc	4260
aaataactgtc	agccgtagtt	agccaccac	agccaccac	ttcaagaact	ctgtagcacc	4320
gcctacatac	ctcgcctcgc	taatcctggt	accagtggct	gctgccagtg	gcgataagtc	4380
gtgtcttacc	gggttggact	caagacgata	gttaccggat	aaggcgcagc	ggtcgggctg	4440
aacggggggg	tcgtgcacac	agcccagctt	ggagcgaacg	acctacaccg	aactgagata	4500
cctacagcgt	gagctatgag	aaagcggcac	gcttcccga	gggagaaagg	cggacaggta	4560
cccggtaaag	ggcagggctg	gaacaggaga	gcgcacgagg	gagcttccag	ggggaaacgc	4620
ctggtatctt	tatagtcctg	tcgggttctg	ccacctctga	cttgagcgtc	gattttgtg	4680
atgctcgtca	ggggggcgga	gcctatggaa	aaacgccagc	aacgcggcct	ttttacggtt	4740
cctggccttt	tgctggcctt	ttgctcacat	gttctttcct	gcgttatccc	ctgattctgt	4800
ggataaccgt	attaccgcct	ttgagtgagc	tgataaccgct	cgccgcagcc	gaacgaccga	4860
gcgcagcag	tcagtgagcg	aggaagcggg	agagcgcctg	atgcggtatt	ttctccttac	4920
gcatctgtgc	ggtatttcac	accgcatacg	gtgcactctc	agtacaatct	gctctgatgc	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	tgctcagttag	ggtgtggaaa	gtccccaggc	5220
tccccagcag	gcagaagtat	gcaaagcatg	catctcaatt	agtcagcaac	caggctcccc	5280
agcaggcaga	agtatgcaaa	gcatgcatct	caattagtca	gcaaccatag	tcccggcctt	5340
aactccgccc	atcccggccc	taactccgcc	cagttccgcc	catttccgc	cccatggctg	5400
actaattttt	tttatttatg	cagaggccga	ggccgcctcg	gcctctgagc	tattccagaa	5460
gtagtgagga	ggcttttttg	gaggcctagg	cttttgcaaa	aagctagctt	cacgctgccc	5520
gaagcactca	gggcgcaagg	gctgctaaag	gaagcggaac	acgtagaaaag	ccagtccgca	5580
caaacggtgc	tgaccccgga	tgaatgtcag	ctactgggct	atctggacaa	gggaaaacgc	5640
aagcgcgaaag	agaaaagcag	tagcttgcag	tgggcttaca	tggcgatagc	tagactgggc	5700
ggttttatgg	acagcaagcg	aaccggaatt	gccagctggg	gcgccctctg	gtaagggttg	5760
gaagccctgc	aaagtaaact	ggatggcttt	cttgccgcca	aggatctgat	ggcgcagggg	5820
atcaagatct	gatcaagaga	caggatgagg	atcgtttcgc	atgattgaac	aagatggatt	5880
gcacgcaggt	tctccggccc	cttgggtgga	gaggctattc	ggctatgact	gggcacaaca	5940
gacaatcggc	tgctctgatg	ccgccgtggt	ccggctgtca	gcgcaggggc	gcccggttct	6000

```

ttttgtcaag accgacctgt ccggtgcctt gaatgaactg caggacgagg cagcgcggct 6060
atcgtggctg gccacgacgg gcgttccttg cgcagctgtg ctcgacgttg tcaactgaagc 6120
gggaagggac tggctgctat tgggcgaagt gccggggcag gatctcctgt catctcacct 6180
tgctcctgcc gagaaagtat ccatcatggc tgatgcaatg cggcggctgc atacgcttga 6240
tccggctacc tgcccattcg accaccaagc gaaacatcgc atcgagcgag cacgtactcg 6300
gatggaagcc ggtcttgtcg atcaggatga tctggacgaa gagcatcagg ggctcgcgcc 6360
agccgaactg ttcgccaggc tcaaggcgcg catgcccagc ggcgaggatc tcgtcgtgac 6420
ccatggcgat gcctgcttgc cgaatatcat ggtggaaaat ggccgctttt ctggattcat 6480
cgactgtggc cggctgggtg tggcggaccg ctatcaggac atagcgttgg ctaccctgga 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 ttcggaatcg ttttccggga cgcggctgg 6780
atgactctcc agcgcgggga tctcatgctg gagttcttgc cccaccccgg gctcgatccc 6840
ctcgcgagtt ggttcagctg ctgcctgagg ctggacgacc tcgcgagatt ctaccggcag 6900
tgcaaatccg tcggcatcca ggaaaccagc agcggctatc cgcgcatacca tgccccgaa 6960
ctgcaggagt ggggaggcac gatggccgct ttggtcccgg 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 agagaaaggc agaagacccc aaggactttc cttcagaatt 7320
gctaagtttt ttgagtcatg ctgtgtttag taatagaact cttgcttgcct 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 atttgtagag gttttacttg ctttaaaaaa cctcccacac ctccccctga 7680
acctgaaaca taaaatgaat gcaattgttg ttgctaaact gtttattgca gcttataatg 7740
gttacaaata aagcaatagc atcacaatc tcaaaaataa agcatttttt tcaactgcatt 7800
ctagttgtgg tttgtccaaa ctcatcaatg tatcttatca tgtctggatc taataaaaga 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

```

```

<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                               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> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 37
 caggtgcaac tagtgcagtc cggcgccgaa gtgaagaaac ccggtgcttc cgtgaaagtc 60
 agctgtaaaa ctagtagata caccttact gaatacacca tacactgggt tagacaggcc 120
 cctggccaaa ggctggagtg gataggaggt attaatccta acaatgggtat tcctaactac 180
 aaccagaagt tcaagggccg ggccaccttg accgtaggca agtctgccag caccgcctac 240
 atggaactgt ccagcctgcg ctccgaggac actgcagtct actactgccc cagaagaaga 300
 atcgcctatg 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

<400> 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

<210> 42

<211> 7731

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 42

ttgaagacga aagggcctcg tgatacgcct 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 gcatttttggc ttctgtttt tgctcaccga gaaacgctgg tgaaagtaaa 300
 agatgctgaa gatcagttgg gtgcaagagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg 360
 taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaaagt 420
 tctgctatgt ggcgcggtat tatcccggtg tgacgcgggg caagagcaac tgggtcgcgg 480
 catacactat tctcagaatg acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac 540
 ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataacactgc 600
 ggccaactta cttctgacaa ogatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgacaaa 660
 catgggggat gatgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc 720
 aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgc agcaatggca acaacgcttc gcaaactatt 780
 aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcggg 840
 taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ccttccggct ggctggttta ttgctgataa 900
 atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcgcgg tatcattgca gcaactgagg gcaactatgg atgaacgaaa 1020
 gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa 1020
 tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt 1080
 ttactcatat atactttaga ttgatttaaa acttcathtt taatttaaaa ggatctaggt 1140
 gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccctaa cgtgagtttt cgttccactg 1200
 agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt 1260
 aatctgctgc ttgcaaaaca aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttggt tgccggatca 1320
 agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccataaac 1380
 tgtccttcta gtgtagccgt agttagcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac 1440
 atacctcgct ctgctaacc tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtctgtctt 1500
 taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggctcg gctgaacggg 1560
 gggttcgtgc acacagcca gcttgagcgc aacgacctac accgaactga gataacctaca 1620
 cgcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt 1680
 aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagcct ccagggggaa acgctggtta 1740
 tctttatagt cctgtcgggt ttccgccact ctgacttgag cgtcgttttt tgtgatgctc 1800
 gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttctctgc 1860
 cttttgctgg ccttttgcct acatgttctt tctcgcgtta tcccctgatt ctgtggataa 1920
 ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgcggc agccgaacga ccgagcgcag 1980
 cgagtcagtg agcaggaag cggaagagcg cctgatgcgg tattttctcc ttacgcatct 2040
 gtgcgggtatt tcacaccgca tatggtgcac tctcagtaaa atctgctctg atgccgcata 2100

gttaagccag	tatacactcc	gctatcgcta	cgtgactggg	tcatggctgc	gccccgacac	2160
ccgccaacac	ccgctgacgc	gccctgacgg	gcttgtctgc	tcccggcatc	cgcttacaga	2220
caagctgtga	ccgtctccgg	gagctgcatg	tgctcagaggt	tttcaccgtc	atcaccgaaa	2280
cgcgcgaggc	agcatgcatc	tcaattagtc	agcaaccata	gtcccggccc	taactccgcc	2340
catcccggcc	ctaactccgc	ccagttccgc	ccattctccg	ccccatggct	gactaatfff	2400
ttttatffat	gcagaggccg	aggccgcctc	ggcctctgag	ctattccaga	agtagtgagg	2460
aggctttttt	ggagggcctag	gcttttgcaa	aaagctagct	tacagctcag	ggctgcgatt	2520
tcgcgccaaa	cttgacggca	atcctagcgt	gaaggctggt	aggatfftat	ccccgctgcc	2580
atcatgggtc	gaccattgaa	ctgcatcgtc	gccgtgtccc	aaaatatggg	gattggcaag	2640
aacggagacc	taccctggcc	tccgctcagg	aacgagttca	agtacttcca	aagaatgacc	2700
acaacctctt	cagtggaagg	taaacagaat	ctggtgatta	tgggtaggaa	aacctggttc	2760
tccattcctg	agaagaatcg	acctttaaag	gacagaatta	atatagttct	cagtagagaa	2820
ctcaaagaac	caccacgagg	agctcatttt	cttgccaaaa	gtttgatga	tgcttaaga	2880
cttattgaac	aaccggaatt	ggcaagtaaa	gtagacatgg	tttgatagt	cggaggcagt	2940
tctgtttacc	aggaagccat	gaatcaacca	ggccacctca	gactctttgt	gacaaggatc	3000
atcgaggaat	ttgaaagtga	cacgtttttc	ccagaaattg	atftggggaa	atataaactt	3060
ctcccagaat	accgagcgt	cctctctgag	gtccaggagg	aaaaaggcat	caagataaag	3120
tttgaagtct	ccgagaagaa	agactaacag	gaagatgctt	tcaagttctc	tgctcccctc	3180
ctaaagctat	gcattttttat	aagaccatgg	gacttttgc	ggctttagat	ctttgtgaag	3240
gaaccttact	tctgtggtgt	gacataattg	gacaaactac	ctacagagat	ttaaagctct	3300
aaggtaaata	taaaatfftt	aagtgtataa	tgtgttaaac	tactgattct	aattgftttg	3360
gtatffttaga	ttccaacctc	tggaaactgat	gaatgggagc	agtggtgga	tgctfftaat	3420
gaggaaaacc	tgffttgctc	agaagaaatg	ccatctagtg	atgatgaggc	tactgtgac	3480
tctcaacatt	ctactcctcc	aaaaagaag	agaaaggtag	aagaccctca	ggactttcct	3540
tcagaattgc	taagttfftt	gagtcatgct	gtgtttagta	atagaactct	tgcttgcttt	3600
gctatfftaca	ccacaaagga	aaaagctgca	ctgctataca	agaaaattat	ggaaaaatat	3660
tctgtaacct	ttataagtag	gcataacagt	tataatcata	acatactgft	ttttcttact	3720
ccacacaggg	atagagtgtc	tgctattaat	aactatgctc	aaaaattgtg	tacctttagc	3780
ttfftaattt	gtaaaggggt	taataaggaa	tatttgatgt	atagtgcctt	gactagagat	3840
cataatcagc	cataccacat	ttgtagaggt	tttacttgct	ttaaaaacc	tcccacacct	3900
ccccctgaac	ctgaaacata	aatgaatgc	aattgttgtt	gttaacttgt	ttattgcagc	3960
ttataatggt	tacaaataaa	gcaatagcat	cacaaatffc	acaaataaag	cattfftttc	4020
actgcattct	agttgtggft	tgtccaaact	catcaatgta	tcttatcatg	tctggatcta	4080
ataaaagata	ttatffttca	ttagatattg	gtgtggfttt	ttgtgtgca	gtgcctctat	4140
ctggagggcca	ggtagggctg	gccttggggg	agggggaggc	cagaatgact	ccaagagcta	4200
caggaaggca	ggtcagagac	cccactggac	aaacagtggc	tggactctgc	accataacac	4260
acaatcaaca	ggggagtgag	ctggaatff	gctagcgaat	tccagcacac	tggcgccgt	4320
tactagtffat	taatagtaat	caattacggg	gtcattagtt	catagcccat	atatggagtt	4380
ccgctgtaca	taacttacgg	taaatggccc	gcctggctga	ccgcccacg	acccccgcc	4440
attgacgtca	ataatgacgt	atgffcccat	agtaacgcca	atagggactt	tccattgacg	4500
tcaatgggtg	gagtatttac	ggtaaaactgc	ccacttggca	gtacatcaag	tgtatcatat	4560
gccaaagtacg	ccccctattg	acgtcaatga	cggtaaatgg	cccgctggc	attatgccc	4620
gtacatgacc	ttatgggact	ttcctacttg	gcagtacatc	tacgtattag	tcatcgctat	4680
taccatgggtg	atgctgfttt	ggcagtacat	caatggcgt	ggatagcgg	ttgactcacg	4740
gggatttcca	agctctccacc	ccattgacgt	caatgggagt	ttgtffttggc	acaaaaatca	4800
acgggactff	ccaaaaatgc	gtaacaactc	gcgccattg	acgcaaatg	cggtaggcg	4860
tgtagcgggtg	gaggtctata	taagcagagc	tcgtttagtg	aaccgtcaga	tcgctggag	4920
acgccatcca	cgctgftttg	acctccatag	aagacaccgg	gaccgatcca	gcctccgctg	4980
ccgggaacgg	tgcatggaa	cgcgattcc	ccgtgccaa	agtgacgtaa	gtaccgccta	5040
tagagtctat	aggcccaccc	ccttggcttc	ttatgcatgc	tatactgftt	ttggcttggg	5100
gtctatacac	ccccgcttcc	tcatgfttata	ggtgatggta	tagcttagcc	tataggtgtg	5160
ggttattgac	cattattgac	cactccccta	ttggtgacga	tactffccat	tactaatcca	5220
taacatggct	ctttgccaca	actctcttta	ttggctatat	gccaatcac	tgctcttcag	5280
agactgacac	ggactctgta	ttffttacagg	atggggctctc	atffattatt	tacaaattca	5340
catatacaac	accaccgtcc	ccagtggccc	cagftffttat	taaacataac	gtgggatctc	5400
cacgcgaatc	tcgggtacgt	gftccggaca	tgggctcttc	tccggtagcg	gctggacttc	5460
tactatcag	ccctgctccc	atgctccag	cgactcatgg	tcgctcgga	gctcctgtct	5520
cctaacagtg	gaggccagac	ttaggcacag	cacgatgccc	accaccacca	gtgtgcccga	5580
caaggccgtg	gcggtaggg	atgtgtctga	aaatgagctc	ggggagcggg	cttgcaccgc	5640
tgacgcattt	ggaagactta	aggcagcggc	agaagaagat	gcaggcagct	gagttgtttg	5700
gftctgataa	gagtcagagg	taactcccgt	tgcggtgctg	ttaacgggtg	agggcagttg	5760
agtctgagca	gtactcgttg	ctgcccgcgc	cgccaccaga	cataatagct	gacagactaa	5820
cagactgftc	ctffccatgg	gtctffttctg	cagtcaccgt	ccttgacacg	cgctcggga	5880
agcttgcgc	caccatggac	tggacctggc	gcgtgftttg	cctgctcgc	gtggctcctg	5940
gggcccacag	ccaggtgcaa	ctggtgcagt	ccggcgcga	agtgaagaaa	ccccgtgctt	6000
ccgtgaaagt	cagctgtaaa	actagtagat	acaccttcac	tgaatacacc	atacactggg	6060
ttagacaggg	ccctggccaa	aggctggagt	ggataggagg	tattaatcct	aacaatggta	6120

```

ttcctaacta caaccagaag ttcaagggcc gggccacctt gaccgtaggc aagtctgcca 6180
gcaccgccta catggaactg tccagcctgc gctccgagga cactgcagtc tactactgcg 6240
ccagaagaag aatcgcctat ggttacgacg agggccatgc tatggactac tggggcaag 6300
gaacccttgt caccgtctcc tcaggtgagt ggatcctctg cgcctgggcc cagctctgtc 6360
ccacaccgcy 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 aagaaagtgt agcccaaate ttgtgacaaa actcacacat 6720
gcccaccgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttctc ttcccccaa 6780
aacccaagga caccctcatg atctccccga cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg 6840
tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gagggtgcata 6900
atgccaaagc aaagcgcggg gaggagcagt acaacagcac gtaccgggtg gtcagcgtcc 6960
tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag gtctccaaca 7020
aagccctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac 7080
cacaggtgta caccctgccc ccatccccgg aggagatgac caagaaccag gtcagcctga 7140
cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatgcctgt ggagtgggag agcaatgggc 7200
agccggagaa caactacaag accacgcctc cctgctgga ctccgacggc tcttcttcc 7260
tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct 7320
ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg 7380
gtaaattgagt gogacggccg gcaagccccg ctccccggc tctcgcggtc gcacgaggt 7440
gcttggcacg taccctctgt acatacttcc cgggcgcccc gcatggaaat aaagcaccgg 7500
atctaataaa agatatttat tttcattaga tatgtgtgtt ggtttttgt gtgcagtgcc 7560
tctatctgga ggccaggtag ggctggcctt gggggagggg gaggccagaa tgactccaag 7620
agctacagga aggcaggtca gagacccac tggacaaaaca gtggctggac tctgcacat 7680
aacacacaat caacagggga gtgagctgga aatttgctag cgaattaatt c 7731

```

<210> 43
<211> 472
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 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

<210> 44
 <211> 25
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 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 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
 cagaagctt gccgccacca tggattcaca ggcscag

37

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

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

<210> 65
 <211> 35

<210> 71
 <211> 45
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР

 <400> 71
 gaatataaaa ggctctgact ggacttgacg ttgatgggtg cctc 45

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

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР

 <400> 72
 cagtcagagc cttttatatt ctagaatca aaagaactac ttggcctggt atcagcagaa 60
 accaggacag cc 72

<210> 73
 <211> 44
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР

 <400> 73
 accccagatt ccctagtgt 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
 gtcscctgtc cgaacgtgag cggatagcta aaatattgct gacagtaata aac 53

<210> 76
 <211> 33
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР

 <400> 76
 gctcacgttc ggacaagggg 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
 gtcsccttgtc 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
 ccctagtgct agccsaatag atgaggagt tggg 34

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

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР

 <400> 81
 tacgcaaac 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 tсасgac 17

<210> 85
 <211> 47
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР

 <400> 85
 gtgtattcag tgaagggtgta tctactagtt ttacagctga ctttcac 47

<210> 86
 <211> 53
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР

 <400> 86
 tagtagatac acsttcastg 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 ccattggttag gattaatacc 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 gtaggсааgt ctgсссagсac 60
 сгсстасатg g 71

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

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР

<400> 89
 гсатггссct cgtcгтаacc атаggсgatt cttcttctgг сгсagtagta gactgсagtg 60
 tcc 63

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

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР

<400> 90
 ctatggttac gacgagggcc atgctatgga ctactggggt сааггаас 48

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

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР

<400> 91
 таастасаас сагаагттса агггсccггггt сaccatcacc gtagacacct ctgсссagсac 60
 сгсстасатg g 71

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

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР

<400> 92
 гgасactgса gtctacttct гсгссag 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 tatgcsqgt 18

<210> 95
 <211> 75
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР

 <400> 95
 cctttggcca ggggcctgtc taaccsagtg tatggtgtat 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 gaccsaatct cc 22

<210> 99
<211> 25
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР

<400> 99
gacagtcata aactgссаса tcttc 25

<210> 100
<211> 23
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР

<400> 100
ttgacacgсg tctcgгgaag ctt 23

<210> 101
<211> 22
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: ПРАЙМЕР

<400> 101
ggсgсаgаg atссactсac ct 22

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, имеющее гипервариабельные участки моноклонального антитела F19 мыши (АТСС НВ 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 СОС-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 СОС-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 β -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 γ -излучением.

43. Антитело по п.42, отличающееся тем, что радиоизотоп представляет собой ^{125}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 (АТСС НВ 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}I , ^{125}I , ^{186}Re , ^{188}Re или ^{90}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
ATCAAAAAGAA	CTACTTGGCC	TGGTATCAGC	AGAAACCAGG	ACAGCCACCC
151	161	171	181	191
AAACTCCTCA	TCTTTTGGGC	TAGCACTAGG	GAATCTGGGG	TACCTGATAG
201	211	221	231	241
GTTCAGTGCC	AGTGGGTTTG	GGACAGACTT	CACCCTCACC	ATTAGCAGCC
251	261	271	281	291
TGCAGGCTGA	AGATGTGGCA	GTTTATTACT	GTCAGCAATA	TTTTAGCTAT
301	311	321	331	339
CCGCTCACGT	TCGGACAAGG	GACCAAGGTG	GAAATAAAA	

Фиг. 1

1	11	21	31	41
DIVMTQSPDS	LAVSLGERAT	INCKSSQSLI	YSRNQKNYLA	WYQQKPGQPP
51	61	71	81	91
KLLIFWASTR	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
ATCAAAAAGAA	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	GTTTATG <u>A</u> CT	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
ATCAAAAAGAA	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 ATGGAACTGT
 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 ATGGAACTGT
 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
 TACTACTGGGT TAGACAGGCC CCTGGCCAAA GGCTGGAGTG GATAGGAGGT
 151
 ATTAATCCTA ACAATGGTAT TCCTAACTAC AACCAGAAGT TCAAGGGCCG
 201
 GGTCACCATC ACCGTAGACA CCTCTGCCAG CACCGCCTAC ATGGAACTGT
 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	NQKFKGR <u>VTI</u>	TVD <u>TSASTAY</u>	MELSSLRSED	TAVYYCARRR
101	111	121-124		
IAYGYDEGHA	MDYWGQGLV	TVSS		

Фиг. 12

1
 CAGGTGCAAC TAGTGCAGTC CGGCGCCGAA GTGAAGAAAC CCGGTGCTTC
 51
 CGTGAAAGTC AGCTGTAAAA CTAGTAGATA CACCTTCACT GAATACACCA
 101
 TACTACTGGGT TAGACAGGCC CCTGGCCAAA GGCTGGAGTG GATAGGAGGT
 151
 ATTAATCCTA ACAATGGTAT TCCTAACTAC AACCAGAAGT TCAAGGGCCG
 201
 GGTCACCATC ACCGTAGACA CCTCTGCCAG CACCGCCTAC ATGGAACTGT
 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	NQKFKGR <u>VTI</u>	TVD <u>TSASTAY</u>	MELSSLRSED	TAVY <u>FCARRR</u>
101	111	121-124		
IAYGYDEGHA	MDYWGQGLV	TVSS		

Фиг. 14

1
 CAGGTGCAAC TAGTGCAGTC CGGCGCCGAA GTGAAGAAAC CCGGTGCTTC
 51
 CGTGAAAGTC AGCTGTAAAA CTAGTGGATA CACCTTCACT GAATACACCA
 101
 TACTGCGGT TAGACAGGCC CCTGGCCAAA GGCTGGAGTG GATAGGAGGT
 151
 ATTAATCCTA ACAATGGTAT TCCTAACTAC AACCAGAAGT TCAAGGGCCG
 201
 GGTCACCATC ACCGTAGACA CCTCTGCCAG CACCGCCTAC ATGGAACTGT
 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	MDYWGQGLV	TVSS		

Фиг. 16

1
 DIVMSQSPSS LAVSVGEKVT MSCKSSQSLL 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 DYWGQGTSVT 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

005401

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	CGAAGTACCC	CATCAGGGCC	TGAGCTCGCC	CGTCACAAAG
640	650	660		
AGCTTCAACA	GGGGAGAGTGT			

Фиг. 19

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

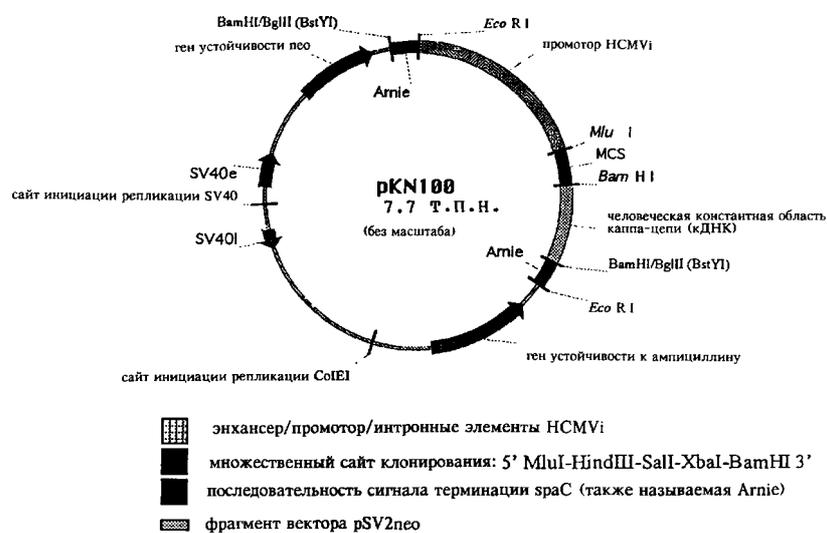
Фиг. 20

373				
GCCTCCACCA	AGGGCCCATC	GGTCTTCCCC	CTGGCACCCCT	CCTCCAAGAG
423				
CACCTCTGGG	GGCACAGCGG	CCCTGGGCTG	CCTGGTCAAG	GACTACTTCC
473				
CCGAACCGGT	GACGGTGTG	TGGAAGTCA	GCGCCCTGAC	CAGCGGCGTG
523				
CACACCTTCC	CGGCTGTCCT	ACAGTCCTCA	GGACTCTACT	CCCTCAGCAG
573				
CGTGGTGACC	GTGCCCTCCA	GCAGCTTGGG	CACCCAGACC	TACATCTGCA
623				
ACGTGAATCA	CAAGCCCAGC	AACACCAAGG	TGGACAAGAA	AGTTGAGCCC
673				
AAATCTTGTG	ACAAAATCA	CACATGCCCA	CCGTGCCCCAG	CACCTGAACT
723				
CCTGGGGGGA	CCGTCACTCT	TCCTCTTCCC	CCCAAAACCC	AAGGACACCC
773				
TCATGATCTC	CCGGACCCCT	GAGGTACAT	GCGTGGTGGT	GGACGTGAGC
823				
CACGAAGACC	CTGAGGTCAA	GTCAACTGG	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	GAGAACAAC	ACAAGACCAC	GCCTCCCGTG	CTGGACTCCG
1223				
ACGGCTCCTT	CTCCTCTAC	AGCAAGCTCA	CCGTGGACAA	GAGCAGGTGG
1273				
CAGCAGGGGA	ACGTCTTCTC	ATGCTCCGTG	ATGCATGAGG	CTCTGCACAA
1323			1362	
CCACTACACG	CAGAAGAGCC	TCTCCCTGTC	TCCGGGTAAG	

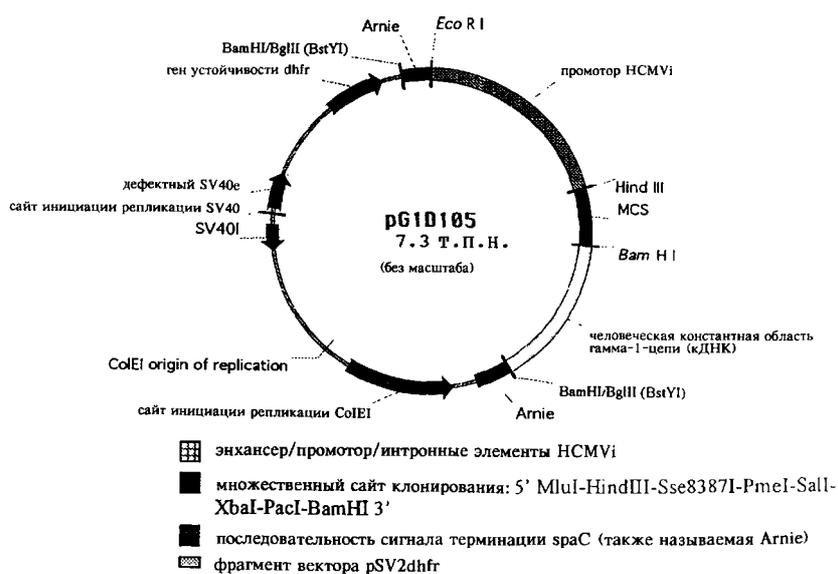
Фиг. 21

125
 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
 175
 HTFFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHNKPS NTKVDKKVEP
 225
 KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVS
 275
 HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
 325
 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC
 375
 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
 425
 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 454

Фиг. 22



Фиг. 23А



Фиг. 23Б

HindIII
 aagcttGCCGCCACCatggattcacaggcccagggttcttatggttactgccgctatgggta
 1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 ttcgaaCGGCGGTGGTtacctaagtgtccgggtccaagaatacaatgacggcgatacccat
последовательность Козака
 M D S Q A Q V L M L L P L W V

tctggtagctgtggggacattgtgatgtcacagtctccatcctccctagctgtgtcagtt
 61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 agaccatggacaccccctgtaacactacagtgtcagaggtaggagggatcgacacagtcaa
 S G T C G D I V M S Q S P S S L A V S V

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

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

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

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

caatatttttagctatccgctcacgttcgggtgctgggaccaagctggagctgaAACGTGAG
 361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 gttataaaatcgatagggcagtgcaagccacgaccctgggttcgacctcgactTTGCACTG
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
 AAGCTTGCCGCCACCATGGGATGGAGCTGGGTCTTTCTCTTTCTCCTGTCAGGAACTGCA
 1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TTCGAACGGCGGTGGTACCCTACCTCGACCCAGAAAGAGAAAGAGGACAGTCCTTGACGT
последовательность Козака
 M G W S W V F L F L L S G T A
 GGTGTCCTCTCTGAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCT
 61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CCACAGGAGAGACTCCAGGTTCGACGTTGTCAGACCTGGACTCGACCACTTCGGACCCCGA
 G V L S E V Q L Q Q S G P E L V K P G A
 TCAGTAAAGATGTCCTGCAAGACTTCTAGATACACATTCACTGAATACACCATACTGG
 121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AGTCATTTCTACAGGACGTTCTGAAGATCTATGTGTAAGTGACTTATGTGGTATGTGACC
 S V K M S C K T S R Y T F T E Y T I H W
 CDR 1
 GTGAGACAGAGCCATGGAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGGTATTAATCCTAACAAATGGT
 181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CACTCTGTCTCGGTACSTTTCTCGGAACCTACCTAACCTCCATAATTAGGATTGTTACCA
 V R Q S H G K S L E W I G G I N P N N G
 CDR 2
 ATTCCTAACTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAGGGCCACATTGACTGTAGGCAAGTCCTCC
 241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TAAGGATTGATGTTAGTCTTCAAGTCCCCTCCCGGTGTAAGTACATCCGTTCCAGGAGG
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 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CGTTCTTCTTCTAGCGGATACCAATGCTGCTCCCGGTACGATACCTGATGACCCCAAGT
 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

Spe I

1 gaattccagc acactggcgg ccggtACTAG TTATTAATAG TAATCAATTA

51 CGGGGTCATT AGTTCATAGC CCATATATGG AGTTCCGCGT TACATAACTT

101 ACGGTAAATG GCCCGCCTGG CTGACCGCCC AACGACCCCC GCCCATTGAC

151 GTCAATAATG ACGTATGTTC CCATAGTAAC GCCAATAGGG ACTTTCCATT

201 GACGTCAATG GGTGGAGTAT TTACGGTAAA CTGCCCACTT GGCAGTACAT

251 CAAGTGTATC ATATGCCAAG TACGCCCCCT ATTGACGTCA ATGACGGTAA

301 ATGGCCCGCC TGGCATTATG CCCAGTACAT GACCTTATGG GACTTTCCTA

SnaB I

351 CTTGGCAGTA CATTACGTA TTAGTCATCG CTATTACCAT GGTGATGCGG

401 TTTTGGCAGT ACATCAATGG GCGTGGATAG CGGTTTACT CACGGGGATT

451 TCCAAGTCTC CACCCCATTTG ACGTCAATGG GAGTTTGTFT TGGCACCAA

501 ATCAACGGGA CTTTCCAAA TGTCGTAACA ACTCCGCCCC ATTGACGCAA

551 ATGGGCGGTA GGCCTGTACG GTGGGAGGTC TATATAAGCA GAGCTCGTTT

601 AGTGAACCGT CAGATCGCCT GGAGACGCCA TCCACGCTGT TTTGACCTCC

Sac II

651 ATAGAAGACA CCGGGACCGA TCCAGCCTCC GCGGCCGGGA ACGGTGCATT

701 GGAACGCGGA TTCCCCGTGC CAAGAGTGAC GTAAGTACCG CCTATAGAGT

751 CTATAGGCC ACCCCCTTGG CTTCTTATGC ATGCTATACT GTTTTTGGCT

801 TGGGGTCTAT ACACCCCGC TTCCTCATGT TATAGGTGAT GGTATAGCTT

851 AGCCTATAGG TGTGGTTAT TGACCATTAT TGACCACTCC CCTATTGGTG

901 ACGATACTTT CCATTAATAA TCCATAACAT GGCTCTTTGC CACAACCTC

951 TTTATTGGCT ATATGCCAAT ACACTGTCTT TCAGAGACTG ACACGGACTC

1001 TGTATTTTAA CAGGATGGGG TCTCATTTAT TATTTACAAA TTCACATATA

1051 CAACACCACC GTCCCCAGTG CCCGAGTTT TTATTAACA TAACGTGGGA

BspE I

1101 TCTCCACGCG AATCTCGGGT ACGTGTTCCG GACATGGGCT CTTCTCCGGT

1151 AGCGGCGGAG CTTCTACATC CGAGCCCTGC TCCCATGCCT CCAGCGACTC

1201 ATGGTCGCTC GGCAGCTCCT TGCTCCTAAC AGTGGAGGCC AGACTTAGGC

1251 ACAGCACGAT GCCCACCACC ACCAGTGTGC CGCACAAGGC CGTGGCGGTA

Фиг. 26/1

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 CCTTTTTCCA CAGGGGACCT ACCCCTATTG
 2551 CGGTCCTCCA GCTCATCTTT CACCTCACCC CCCTCCTCCT CCTTGCTTT
 2601 AATTATGCTA ATGTTGGAGG AGAATGAATA AATAAAGTGA ATCTTTGCAC
 2651 CTGTGGTGGA TCTAATAAAA GATATTTATT TTCATTAGAT ATGTGTGTTG
 2701 GTTTTTTG TG CAGTGCCT 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 TATTCCTTT TTTGCGGCAT TTTGCCTTCC
 3151 TGTTTTTGCT CACCCAGAAA CGCTGGTGAA AGTAAAAGAT GCTGAAGATC
 3201 AGTTGGGTGC ACGAGTGGGT TACATCGAAC TGGATCTCAA CAGCGGTAAG
 3251 ATCCTTGAGA GTTTTCGCC CGAAGAACGT TTTCCAATGA TGAGCACTTT
 3301 TAAAGTTCTG CTATGTGGCG CGGTATTATC CCGTGTTGAC GCCGGGCAAG
 3351 AGCAACTCGG TCGCCGATA CACTATTCTC AGAATGACTT GGTTGAGTAC
 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 CATAACAAAC GACGAGCGTG ACACCACGAT GCCTGCAGCA ATGGCAACAA

Фиг. 26/3

3651 CGTTGCGCAA ACTATTA ACT GCGGA ACTAC T TACTCTAGC TTCCCGGCAA
 3701 CAATTAATAG ACTGGATGGA GCGGATAAAA GTTGCAGGAC CACTTCTGCG
 3751 CTCGGCCCTT CCGGCTGGCT GGT T TATTGC TGATAAATCT GGAGCCGGTG
 3801 AGCGTGGGTC TCGCGGTATC ATTGCAGCAC TGGGGCCAGA TGGTAAGCCC
 3851 TCCCGTATCG TAGTTATCTA CACGACGGGG AGTCAGGCAA CTATGGATGA
 3901 ACGAAATAGA CAGATCGCTG AGATAGGTGC CTCACTGATT AAGCATTGGT
 3951 AACTGTCAGA CCAAGTTTAC TCATATATAC TTTAGATTGA TTTAAA ACTT
 4001 CATTTTTAAT TTAAAAGGAT CTAGGTGAAG ATCCTTTTTG ATAATCTCAT
 4051 GACCAAAATC CCTTAACGTG AGTTTTCGTT CCACTGAGCG TCAGACCCCG
 4101 TAGAAAAGAT CAAAGGATCT TCTTGAGATC CTTTTTTTCT GCGCGTAATC
 4151 TGCTGCTTGC AAACAAAAAA 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 GGGTTGGACT
 4401 CAAGACGATA GTTACCGGAT AAGGCGCAGC GGTCGGGCTG AACGGGGGGT
 4451 TCGTGACAC ACAGCCAGCTT 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 TGCTCACAT GTTCTTTCCCT GCGTTATCCC CTGATTCTGT
 4801 GGATAACCGT ATTACCGCCT TTGAGTGAGC TGATAACCGCT CGCCGCAGCC
 4851 GAACGACCGA GCGCAGCGAG TCAGTGAGCG AGGAAGCGGA AGAGCGCCTG
 4901 ATGCGGTATT TTCTCCTTAC GCATCTGTGC GGTATTTTAC ACCGCATATG

Фиг. 26/4

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 ACCGTCATCA 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 TAGCTTGCAAG TGGGCTTACA TGGCGATAGC TAGACTGGGC

5701 GGTTTTATGG ACAGCAAGCG AACCAGGAATT GCCAGCTGGG GCGCCCTCTG

5751 GTAAGGTTGG GAAGCCCTGC AAAGTAAACT GGATGGCTTT CTTGCCGCCA

Bgl II/Bcl I

5801 AGGATCTGAT GCGCAGGGG 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 GGAAGGGAC TGGCTGCTAT TGGGCGAAGT

6151 GCCGGGGCAG GATCTCCTGT CATCTCACCT TGCTCCTGCC GAGAAAGTAT

6201 CCATCATGGC TGATGCAATG CGGCGGCTGC ATACGCTTGA TCCGGCTACC

7551 GCTTTTTAAT TTGTAAAGGG GTTAATAAGG AATATTTGAT GTATAGTGCC
7601 TTGACTAGAG ATCATAATCA GCCATACCAC ATTTGTAGAG GTTTTACTTG
7651 CTTTAAAAAA CCTCCACAC CTCCCCTGA 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 TTTTTGTGTG
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 GGTTCCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTT
121 ATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCT
181 TCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCC
241 CTTTTTIGCGGCATTTTGCCTTCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAA
301 AGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGG
361 TAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAAGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGT
421 TCTGCTATGTGGCGGGTATTATCCCGTGTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCG
481 CATACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTAC
541 GGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAAGTGC
Pvu I
601 GGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAA
661 CATGGGGGATCATGTAACCTGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACC
Fsp I
721 AAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTTGCGCAAACTATT
781 AACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGA

Фиг. 27/1

841 TAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAA
 901 ATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAA
 961 GCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAA
 1021 TAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGT
 1081 TTAATCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTCATTTTTAAATTTAAAAGGATCTAGGT
 1141 GAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAAATCCCTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTG
 1201 AGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGT
 1261 AATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCA
 1321 AGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATAC
 1381 TGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCAGCCTAC
 1441 ATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCT
 1501 TACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCAGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGGCTGAACGGG
 1561 GGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACA
 1621 GCGTGAGCTATGAGAAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAAGGCGGACAGGTATCCGGT
 1681 AAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTA
 1741 TCTTTATAGTCCGTGTCGGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTC
 1801 GTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGC
 BspLU111
 1861 CTTTTGCTGGCCTTTTGCTCCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAA
 1921 CCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCGAACGACCGAGCGCAG
 1981 CGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTCTCCTTACGCATCT
 2041 GTGCGGTATTTACACCCGCATATGGTGCCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATA
 Bst1107 I
 2101 GTTAAGCCAGTATACACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGGTATGGCTGCGCCCCGACAC
 2161 CCGCCAACACCCGCTGACCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGA
 2221 CAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGAGGTTTTACCGTCATCACCGAAA
 2281 CGCGCGAGGCAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACCTCCGCC
 2341 CATCCCGCCCCCTAACTCCGCCAGTTCGCCCATTTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTT
 Sfi I
 2401 TTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATCCAGAAGTAGTGAGG
 Stu I/Avr II
 2461 AGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTAGCTTACAGCTCAGGGCTGCGATT

Фиг. 27/2

2521 TCGCGCCAAACTTGACGGCAATCCTAGCGTGAAGGCTGGTAGGATTTTATCCCCGCTGCC
 2581 ATCATGGTTCGACCATTGAACTGCATCGTCGCCGTGTCCCAAATATGGGGATTGGCAAG
 2641 AACGGAGACCTACCCTGGCCTCCGCTCAGGAACGAGTTCAAGTACTTCCAAAGAATGACC
 2701 ACAACCTCTTCAGTGGAAGGTAAACAGAATCTGGTGATTATGGGTAGGAAAACCTGGTTC
 2761 TCCATTCCCTGAGAAGAATCGACCTTTAAAGGACAGAATTAATATAGTTCTCAGTAGAGAA
 2821 CTCAAAGAACCACCACGAGGAGCTCATTCTTCCAAAAGTTTGGATGATGCCTTAAGA
 2881 CTTATTGAACAACCGGAATTGGCAAGTAAAGTAGACATGGTTTGGATAGTCGGAGGCAGT
 2941 TCTGTTTACCAGGAAGCCATGAATCAACCAGGCCACCTCAGACTCTTTGTGACAAGGATC
 3001 ATGCAGGAATTTGAAAGTGACACGTTTTTCCAGAAATGATTTGGGGAAATATAAACTT
 3061 CTCCCAGAATACCCAGGCGTCTCTCTGAGGTCCAGGAGGAAAAAGGCATCAAGTATAAG
 3121 TTTGAAGTCTACGAGAAGAAAGACTAACAGGAAGATGCTTTCAAGTTCTCTGCTCCCCTC
 3181 CTAAAGCTATGCATTTTTATAAGACCATGGGACTTTTGCTGGCTTTAGATCTTTGTGAAG
 3241 GAACCTTACTTCTGTGGTGTGACATAATTGGACAAACTACCTACAGAGATTTAAAGCTCT
 3301 AAGGTAAATATAAAATTTTTAAGTGTATAATGTGTTAAACTACTGATTCTAATTGTTTGT
 3361 GTATTTTAGATTCCAACCTATGGAAGTATGAATGGGAGCAGTGGTGGAAATGCCTTTAAT
 3421 GAGGAAAACCTGTTTTGCTCAGAAGAAATGCCATCTAGTGATGATGAGGCTACTGCTGAC
 3481 TCTCAACATTCTACTCCTCCAAAAAGAAGAGAAAGGTAGAAGACCCCAAGGACTTTCTCT
 3541 TCAGAATTGCTAAGTTTTTTGAGTCATGCTGTGTTTAGTAATAGAACTCTTGCTTGCTTT
 3601 GCTATTTACACCACAAAGGAAAAAGCTGCACTGCTATAACAAGAAAATTATGGAAAAATAT
 3661 TCTGTAACCTTTATAAGTAGGCATAACAGTTATAATCATAACATACTGTTTTTTCTTACT
 3721 CCACACAGGCATAGAGTGTCTGCTATTAATAACTATGCTCAAAAATTGTGTACCTTTAGC
 3781 TTTTTAATTTGTAAAGGGTTAATAAGGAATATTTGATGTATAGTGCCTTGACTAGAGAT
 3841 CATAATCAGCCATAACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCCACACCT
 3901 CCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGC
 3961 TTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTC
 4021 ACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCAAAACCTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCTA
 4081 ATAAAAGATATTTATTTTCATTAGATATGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGCAGTGCCTCTAT
 4141 CTGGAGGCCAGGTAGGGCTGGCCTTGGGGGAGGGGAGGCCAGAATGACTCCAAGAGCTA
 4201 CAGGAAGGCAGGTGAGAGACCCCACTGGACAAACAGTGGCTGGACTCTGCACCATAACAC

Фиг. 27/3

(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 CAGTAAAGATGTCCTGCAAGACTTCTAGATACACATTCCTGAATACACCATACTGGG
 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 GAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGGTGAGTGGATCCTCTGCGCCTGGGCCAGCTCTGTC
 G T S V T V S S

6361 CCACACCGCGGTACATGGCACCACCTCTCTTGCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCT
 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 TCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCG
 V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S

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

6601 TGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGC
 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 GCCCACCGTGGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCCTTCCCCCAA
 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 TCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACA
 L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N

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 AGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC
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 GTAAATGAGTGCAGCGGCCGCAAGCCCCGCTCCCCGGGCTCTCGCGGTGCACGAGGAT
G K *

7441 GCTTGGCACGTACCCCCTGTACATACTTCCCGGGCGCCCAGCATGGAAATAAAGCACCGG

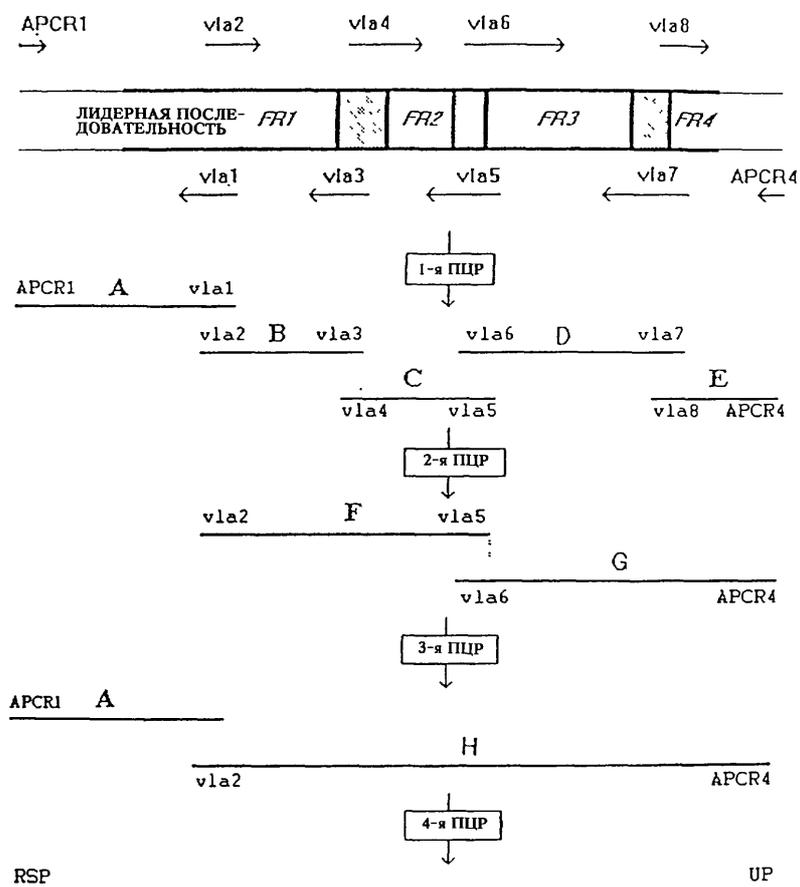
7501 ATCTAATAAAAGATATTTATTTTCATTAGATATGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGCAGTGCC

7561 TCTATCTGGAGGCCAGGTAGGGCTGGCCTTGGGGGAGGGGGAGGCCAGAATGACTCCAAG

7621 AGCTACAGGAAGGCAGGTCAGAGACCCCACTGGACAAACAGTGGCTGGACTCTGCACCAT

7681 AACACACAATCAACAGGGGAGTGAGCTGGaaatttgctagcgaattaattc 7731

Фиг. 27/6



Фиг. 28

Spe I

1 gaattccagc aactggcgg ccgttACTAG TTATTAATAG TAATCAATTA

51 CGGGGTCATT AGTTCATAGC CCATATATGG AGTTCCGCGT TACATAACTT

101 ACGGTAAATG GCCCGCCTGG CTGACCGCCC AACGACCCCC GCCCATTGAC

151 GTCAATAATG ACGTATGTC CCATAGTAAC GCCAATAGGG ACTTTCATT

201 GACGTCAATG GGTGGAGTAT TTACGGTAAA CTGCCCACTT 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 CACCCCAT TG ACGTCAATGG GAGTTTGTTT TGGCACCAAA

501 ATCAACGGGA CTTTCCAAAA TGTCGTAACA ACTCCGCCCC ATTGACGCAA

551 ATGGGCGGTA GGCCTGTACG GTGGGAGGTC TATATAAGCA GAGCTCGTTT

601 AGTGAACCGT CAGATCGCCT GGAGACGCCA TCCACGCTGT TTTGACCTCC

Sac II

651 ATAGAAGACA CCGGGACCGA TCCAGCCTCC GCGGCCGGGA ACGGTGCATT

701 GGAACGCGGA TTCCCCGTGC CAAGAGTGAC GTAAGTACCG CCTATAGAGT

751 CTATAGGCC ACCCCCTTGG CTTCTTATGC ATGCTATACT GTTTTTGGCT

801 TGGGGTCTAT ACACCCCGC TTCCTCATGT TATAGGTGAT GGTATAGCTT

851 AGCCTATAGG TGTGGGTTAT TGACCATTAT TGACCACTCC CCTATTGGTG

901 ACGATACTTT CCATTAATAA TCCATAACAT GGCTCTTTGC CACAACCTCT

951 TTTATTGGCT ATATGCCAAT ACACTGTCC T CAGAGACTG ACACGGACTC

1001 TGTATTTTTA CAGGATGGGG TCTCATTTAT TATTTACAAA TTCACATATA

1051 CAACACCACC GTCCCCAGTG CCCGAGTTT TTATTAACA TAACGTGGGA

(BspE I)

1101 TCTCCACGCG AATCTCGGGT ACGTGTTCCG GACATGGGCT CTTCTCCGGT

1151 AGCGGCGGAG CTTCTACATC CGAGCCCTGC TCCCATGCCT CCAGCGACTC

1201 ATGGTCGCTC GGCAGCTCCT TGCTCCTAAC AGTGGAGGCC AGACTTAGGC

Фиг. 30/1

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 CAGTTCAGC CTGACCCCCT
 * Psp5 II
 2501 CCCATCCTTT GGCCTCTGAC CCTTTTTCCA CAGGGGACCT ACCCCTATTG

 2551 CGGTCCTCCA GTCATCTTT CACCTCACCC CCCTCCTCCT CCTTGGCTTT

 2601 AATTATGCTA ATGTTGGAGG AGAATGAATA AATAAAGTGA ATCTTTGCAC

 2651 CTGTGGTGGG TCTAATAAAA GATATTTATT TTCATTAGAT ATGTGTGTTG

 2701 GTTTTTTG TG CAGTGCCT 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 TATTCCTTT TTTGCGGCAT TTTGCCTTCC

 3151 TGTTTTTGCT CACCCAGAAA CGCTGGTGAA AGTAAAAGAT GCTGAAGATC

 3201 AGTTGGGTGC ACGAGTGGGT TACATCGAAC TGGATCTCAA CAGCGGTAAG

 3251 ATCCTTGAGA GTTTTCGCCC CGAAGAACGT TTTCCAATGA TGAGCACTTT

 3301 TAAAGTTCTG CTATGTGGCG CGGTATTATC CCGTGTGAC 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 ACTATTAACT GCGAACTAC TTA CTCTAGC TTCCCGCAA
 3701 CAATTAATAG ACTGGATGGA GCGGATAAAA GTTGCAGGAC CACTTCTGCG
 3751 CTCGGCCCTT CCGGCTGGCT GGT TATTGC TGATAAATCT GGAGCCGGTG
 3801 AGCGTGGGTC TCGCGGTATC ATTGCAGCAC TGGGGCCAGA TGGTAAGCCC
 3851 TCCCGTATCG TAGTTATCTA CACGACGGGG AGTCAGGCAA CTATGGATGA
 3901 ACGAAATAGA CAGATCGCTG AGATAGGTGC CTCACTGATT AAGCATTGGT
 3951 AACTGTCAGA CCAAGTTTAC TCATATATAC TTTAGATTGA TTTAAA ACTT
 4001 CATTTTTAAT TTAAAAGGAT CTAGGTGAAG ATCCTTTTTG ATAATCTCAT
 4051 GACCAAAATC CCTTAACGTG AGTTTTCGTT CCACTGAGCG TCAGACCCCG
 4101 TAGAAAAGAT CAAAGGATCT TCTTGAGATC CTTTTTTTCT GCGCGTAATC
 4151 TGCTGCTTGC AAACAAAAA ACCACCGCTA CCAGCGGTGG TTTGTTGCC
 4201 GGATCAAGAG CTACCAACTC TTTTCCGAA GGTA ACTGGC 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 ACAGCCAGCTT 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 GTTCTTTCCT GCGTTATCCC CTGATTCTGT
 4801 GGATAACCGT ATTACCGCCT TTGAGTGAGC TGATACCGCT CGCCGCAGCC

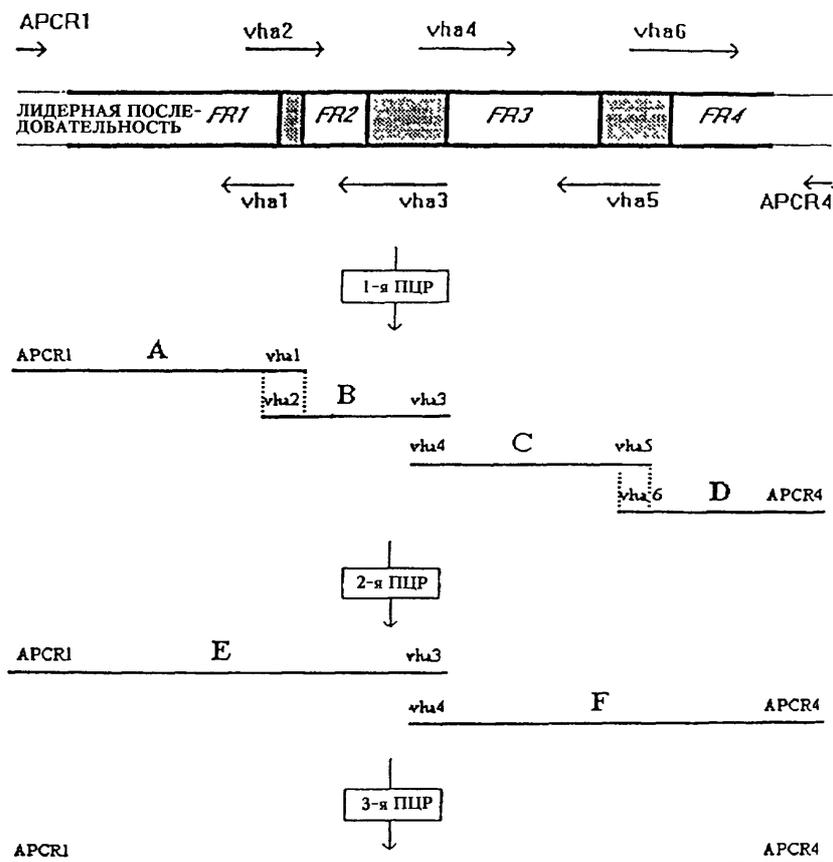
Фиг. 30/4

4851 GAACGACCGA GCGCAGCGAG TCAGTGAGCG AGGAAGCGGA AGAGCGCCTG
 4901 ATGCGGTATT TTCTCCTTAC GCATCTGTGC GGTATTTTAC ACCGCATATG
 4951 GTGCACTCTC AGTACAATCT GCTCTGATGC CGCATAGTTA AGCCAGTATA ^{Bst1107I}
 5001 CACTCCGCTA TCGCTACGTG ACTGGGTCAT GGCTGCGCCC CGACACCCGC
 5051 CAACACCCGC TGACGCGCCC TGACGGGCTT GTCTGCTCCC GGCATCCGCT
 5101 TACAGACAAG CTGTGACCGT CTCCGGGAGC TGCATGTGTC AGAGGTTTTT
 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 CAGTTCGCC CATTCTCCGC CCCATGGCTG
 5401 ACTAATTTTT TTTATTTATG CAGAGGCCGA GGCCGCTCG GCCTCTGAGC
 5451 TATTCAGAA GTAGTGAGGA GGCTTTTTTG GAGGCCTAGG CTTTTGCAAA
 5501 AAGCTAGCTT CACGCTGCCG CAAGCACTCA GGGCGCAAGG GCTGCTAAAG
 5551 GAAGCGGAAC ACGTAGAAAG CCAGTCCGCA GAAACGGTGC TGACCCCGGA
 5601 TGAATGTCAG CTACTGGGCT ATCTGGACAA GGGAAAACGC AAGCGCAAAG
 5651 AGAAAGCAGG TAGCTTGACG TGGGCTTACA TGGCGATAGC TAGACTGGGC
 5701 GGTTTTATGG ACAGCAAGCG AACCGBAATT GCCAGCTGGG GCGCCCTCTG
 5751 GTAAGGTTGG GAAGCCCTGC AAAGTAACT GGATGGCTTT CTGCCGCCA
 5801 AGGATCTGAT GGCGCAGGGG ATCAAGATCT GATCAAGAGA CAGGATGAGG
 5851 ATCGTTTTGC ATGATTGAAC AAGATGGATT GCACGCAGGT TCTCCGGCCG
 5901 CTTGGGTGGA GAGGCTATTC GGCTATGACT GGGCACAACA GACAATCGGC
 5951 TGCTCTGATG CCGCCGTGTT CCGGCTGTCA GCGCAGGGGC GCCCGTTCT
 6001 TTTTGTCAAG ACCGACCTGT CCGGTGCCCT GAATGAACTG CAGGACGAGG
 6051 CAGCGCGGCT ATCGTGGCTG GCCACGACGG GCGTTCCTTG CGCAGCTGTG
 Msc I

Фиг. 30/5

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 CTCCCCTGA ACCTGAAACA TAAAATGAAT
 Mun I
 7701 GCAATTGTG TTGTAACTT GTTTATTGCA GCTTATAATG GTTACAAATA
 7751 AAGCAATAGC ATCACAAATT TCACAAATAA AGCATTTTTT TCACTGCATT
 7801 CTAGTTGTGG TTTGTCCAAA CTCATCAATG TATCTTATCA TGTCTGGATC
 7851 TAATAAAAAGA TATTTATTTT CATAGATAT GTGTGTTGGT TTTTGTGTG
 7901 CAGTGCCTCT ATCTGGAGGC CAGGTAGGGC TGGCCTGGG GGAGGGGGAG
 7951 GCCAGAATGA CTCCAAGAGC TACAGGAAGG CAGGTCAGAG ACCCCACTGG
 8001 ACAAACAGTG GCTGGACTCT GCACCATAAC ACACAATCAA CAGGGGAGTG
 8051 AGCTGGAAAT TTGCTAGC

Фиг. 30/7



Фиг. 31

	1									10								19	
A	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K
	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		
A	V	S	C	K	T	S	R	Y	T	F	T	E	Y	T	I	H	W	V	R
	GTC	AGC	TGT	AAA	ACT	AGT	AGA	TAC	ACC	TTC	ACT	GAA	TAC	ACC	ATA	CAC	TGG	GTT	AGA
B	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
D	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
E	---	---	---	---	---	---	G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	39									49	52 A 53					56			
A	Q	A	P	G	Q	R	L	E	W	I	G	G	I	N	P	N	N	G	I
	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	
A	P	N	Y	N	Q	K	F	K	G	R	A	T	L	T	V	G	K	S	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	---	---
	76					82	A	B	C	83									91
A	S	T	A	Y	M	E	L	S	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y
	AGC	ACC	GCC	TAC	ATG	GAA	CTG	TCC	AGC	CTG	CGC	TCC	GAG	GAC	ACT	GCA	GTC	TAC	TAC
B	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	F
C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
D	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	F
E	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	T

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 TCAATAATATTGAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCC
 241 CTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAA
 301 AGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGG
 361 TAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGT
 421 TCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCG
 481 CATACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTAC
 541 GGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACACTGC
 601 GGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAA
 661 CATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACC
 721 AAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATT
 781 AACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGA

Фиг. 33/1

841 TAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAA
 901 ATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAA
 961 GCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAA
 1021 TAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGT
 1081 TTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGT
 1141 GAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTG
 1201 AGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGT
 1261 AATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGGCCGGATCA
 1321 AGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAAGAACTCTGTAGCACCAGCTAC
 1381 TGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAAGTCTGTAGCACCAGCTAC
 1441 ATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCT
 1501 TACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGGCTGAACGGG
 1561 GGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACA
 1621 GCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGT
 1681 AAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTA
 1741 TCTTTATAGTCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTC
 1801 GTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGC
 1861 CTTTTGCTGGCCTTTTGCTCCATGTTCCTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAA
 1921 CCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAG
 1981 CGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCT
 2041 GTGCGGTATTTACACCGCATATGGTGCCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATA
 2101 GTTAAGCCAGTATACACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGTTCATGGCTGCGCCCCGACAC
 2161 CCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGA
 2221 CAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCGTCATCACCGAAA
 2281 CGCGCGAGGCAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACCTCCGCC
 2341 CATCCCGCCCCTAACCTCCGCCAGTTCGCCCCATTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTT
 2401 TTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGG
 2461 AGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTAGCTTACAGCTCAGGGCTGCGATT

Фиг. 33/2

2521 TCGCGCCAAACTTGACGGCAATCCTAGCGTGAAGGCTGGTAGGATTTTATCCCCGCTGCC
 2581 ATCATGGTTCGACCATTGAACTGCATCGTCGCCGTGTCCCAAATATGGGGATTGGCAAG
 2641 AACGGAGACCTACCCTGGCCTCCGCTCAGGAACGAGTTC AAGTACTTCCAAAGAATGACC
 2701 ACAACCTCTTCAGTGAAGGTAAACAGAATCTGGTGATTATGGGTAGGAAAACCTGGTTC
 2761 TCCATTCCCTGAGAAGAATCGACCTTTAAAGGACAGAATTAATATAGTTCTCAGTAGAGAA
 2821 CTCAAAGAACCACCACGAGGAGCTCATTTTCTTGCCAAAAGTTTGGATGATGCCTTAAGA
 2881 CTTATTGAACAACCGGAATTGGCAAGTAAAGTAGACATGGTTTGGATAGTCGGAGGCAGT
 2941 TCTGTTTACCAGGAAGCCATGAATCAACCAGGCCACCTCAGACTCTTTGTGACAAGGATC
 3001 ATGCAGGAATTTGAAAGTGACACGTTTTTCCCAGAAATTGATTTGGGGAAATATAAACTT
 3061 CTCCCAGAATACCCAGGCGTCTCTCTGAGGTCCAGGAGGAAAAAGGCATCAAGTATAAG
 3121 TTTGAAGCTACGAGAAGAAAGACTAACAGGAAGATGCTTTCAAGTTCTCTGCTCCCCTC
 3181 CTAAAGCTATGCATTTTTATAAGACCATGGGACTTTTGCTGGCTTTAGATCTTTGTGAAG
 3241 GAACCTTACTTCTGTGGTGTGACATAATTGGACAAACTACCTACAGAGATTTAAAGCTCT
 3301 AAGGTAAATATAAAATTTTTAAGTGTATAATGTGTTAAACTACTGATTCTAATTGTTTGT
 3361 GTATTTTAGATTCCAACCTATGGAAGTGAATGGGAGCAGTGGTGGAAATGCCTTTAAT
 3421 GAGGAAAACCTGTTTTGCTCAGAAGAAATGCCATCTAGTGATGATGAGGCTACTGCTGAC
 3481 TCTCAACATTCTACTCCTCCAAAAAGAAGAGAAAGGTAGAAGACCCCAAGGACTTTCCT
 3541 TCAGAATTGCTAAGTTTTTTGAGTCATGCTGTGTTTAGTAATAGAACTCTTGCTTGCTTT
 3601 GCTATTTACACCACAAAGGAAAAAGCTGCACTGCTATAACAAGAAAATTATGGAAAAATAT
 3661 TCTGTAACCTTTATAAGTAGGCATAACAGTTATAATCATAACATACTGTTTTTTCTTACT
 3721 CCACACAGGCATAGAGTGTCTGCTATTAATAACTATGCTCAAAAATTGTGTACCTTTAGC
 3781 TTTTAAATTTGTAAAGGGTTAATAAGGAATATTTGATGTATAGTGCCTTGACTAGAGAT
 3841 CATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCCACACCT
 3901 CCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTTTTATTGCAGC
 3961 TTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTC
 4021 ACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCTA
 4081 ATAAAAGATATTTATTTTCATTAGATATGTGTGTGGTTTTTTGTGTGCAGTGCCTCTAT
 4141 CTGGAGGCCAGGTAGGGCTGGCCTTGGGGGAGGGGAGGCCAGAATGACTCCAAGAGCTA

Bgl II

BsaB I

Mun I

Hind III

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

5941 GGGCCACAGCCAGGTGCAACTGGTGCAGTCCGGCGCCGAAGTGAAGAAACCCGGTGCTT
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 CCGTGAAAGTCAGCTGTAAACTAGTAGATACACCTTCACTGAATACACCATACACTGGG
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 TTCCTAACTACAACCAGAAGTTCAAGGGCCGGCCACCTTGACCGTAGGCAAGTCTGCCA
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 GAACCCTGTACCGTCTCCTCAGGTGAGTGGATCCTCTGCGCCTGGGCCAGCTCTGTC
G T L V T V S S

6361 CCACACCGCGGTACATGGCACCACCTCTCTTGCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCT
S T K G P S V

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

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

6541 GCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGG
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

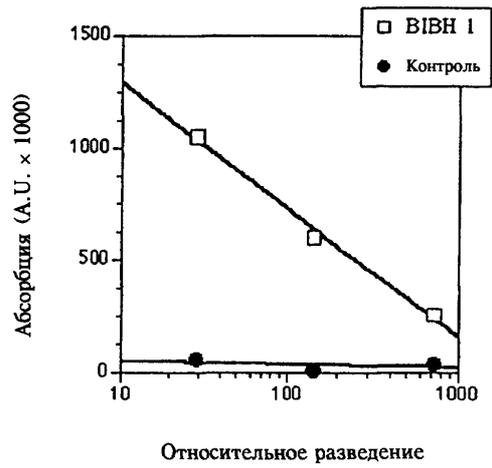
6661 CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACAT
P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T

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

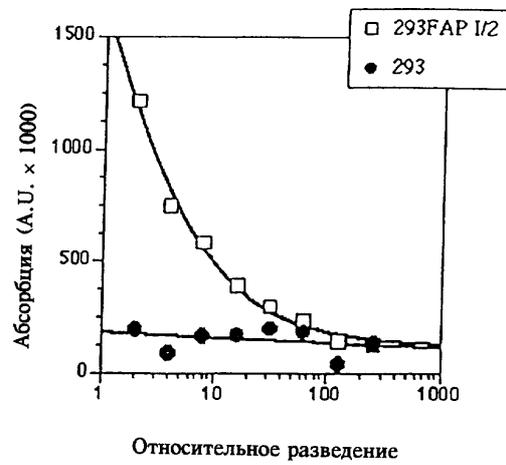
6781 AACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACG
K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D

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

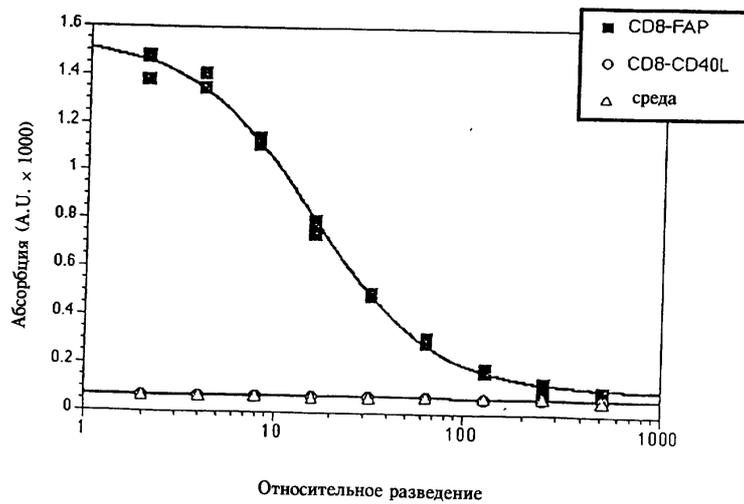
6901 ATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAAGCTCC
N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V



Фиг. 35



Фиг. 36



Фиг. 37

