

Заявка на данный патент претендует на приоритет по предварительной заявке США № 60/348980, поданной 9 ноября 2001 г.

Характеристика известного уровня техники

Антиген CD40 представляет собой гликопротеин клеточной поверхности в 50 кДа, который относится к семейству рецепторов фактора некроза опухолей (TNF-R). (Stamenkovic et al., EMBO J. 8:1403-10 (1989)). CD40 экспрессируется во многих типах нормальных и опухолевых клеток, включая В-лимфоциты, дендритные клетки, моноциты, макрофаги, эпителий вилочковой железы, эндотелиальные клетки, фибробласти и клетки гладкой мускулатуры. (Paulie S. et al., Cancer Immunol. Immunother. 20:23-8 (1985); Banchereau J. et al., Adv. Exp. Med. & Biol. 378:79-83 (1995); Alderson M.R. et al., J. of Exp. Med. 178:669-74 (1993); Ruggiero G. et al., J. of Immunol. 156:3737-46 (1996); Hollenbaugh D. et al., J. of Exp. Med. 182:33-40 (1995); Yellin M.J. et al., J. of Leukocyte Biol. 58:209-16 (1995); и Lazaar A.L. et al., J. of Immunol. 161:3120-7 (1998)). CD40 экспрессируется во всех В-лимфомах и в 70% всех солидных опухолей. Несмотря на конститутивную экспрессию, CD40 хорошо регулируется в антигенпрезентирующих клетках с помощью сигналов созревания, таких как LPS, IL-1 β , IFN- γ и GM-CSF.

Активация CD40 играет решающую роль в регуляции гуморального и клеточного иммунных ответов. Антигенная презентация без активации CD40 может привести к толерантности, а CD40-сигнализация может способствовать обратимости такой толерантности, усилить антигенную презентацию с помощью всех антигенпрезентирующих клеток (АПК), привести к секреции хелперных цитокинов и хемокинов, повысить экспрессию костимулирующих молекул и передачу сигналов, а также стимулировать цитолитическую активность иммунных клеток.

CD40 играет ключевую роль в пролиферации В-клеток, созревании и переключении класса иммуноглобулинов. (Foy T.M. et al., Ann. Rev. of Immunol. 14:591-617 (1996)). Нарушение сигнального пути CD40 ведет к аномальному распределению изотипов сывороточного иммуноглобулина, к отсутствию CD4+-T-клеточного примирения и к дефектам вторичных гуморальных ответов. Например, X-сцепленный синдром избыточного образования IgM представляет собой заболевание, связанное с мутацией у человека гена CD40L, которое характеризуется неспособностью пораженных индивидов вырабатывать антитела, отличные от IgM-изотипа, и свидетельствующее о том, что для эффективного иммунного ответа необходимо продуктивное взаимодействие между CD40 и CD40L.

Захват CD40 с помощью CD40L приводит к ассоциации цитоплазматического домена CD40 с TRAF (TNF-R-ассоциируемые факторы). (Lee H.H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:1421-6 (1999); Pullen S.S. et al., Biochemistry 37:11836-45 (1998); Grammar A.C. et al., J. of Immunol. 161:1183-93 (1998); Ishida T.K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:9437-42 (1996); Pullen S.S. et al., J. of Biol. Chem. 274:14246-54 (1999)). Такое взаимодействие с TRAF может завершать активацию обоих путей - NF κ B и Jun/AP1. (Tsukamoto N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:1234-9 (1999); Sutherland C.L. et al., J. of Immunol. 162:4720-30 (1999)). В зависимости от типа клеток, данная сигнализация приводит к усилению секреции цитокинов, таких как IL-6 (Jeppson J.D. et al., J. of Immunol. 161:1738-42 (1998); Uejima Y. et al., Int. Arch. of Allergy & Immunol. 110:225-32, (1996), IL-8 (Gruss H.J. et al., Blood 84:2305-14 (1994); von Leoprechting A. et al., Cancer Res. 59:1287-94 (1999); Denfeld R.W. et al., Europ. J. of Immunol. 26:2329-34 (1996)), IL-12 (Cella M. et al., J. of Exp. Med. 184:747-52 (1996); Ferlin W.G. et al., Europ. J. of Immunol. 28:525-31 (1998); Armant M. et al., Europ. J. of Immunol. 26:1430-4 (1996); Koch F. et al., J. of Exp. Med. 184:741-6 (1996); Seguin R. and L.H. Kasper, J. of Infect. Diseases 179:467-74 (1999); Chaussabel D. et al., Infection & Immunity 67:1929-34 (1999)), IL-15 (Kuniyoshi J.S. et al., Cellular Immunol. 193:48-58 (1999)) и хемокинов (MIP1 α , MIP1 β , RANTES и другие) (McDyer J.F. et al., J. of Immunol. 162:3711-7 (1999); Schaniel C. et al., J. of Exp. Med. 188:451-63 (1998); Altenburg A. et al., J. of Immunol. 162:4140-7 (1999); Deckers J.G. et al., J. of the Am. Society of Nephrology 9:1187-93 (1998)), повышает экспрессию МНС класса I и II (Santos-Argumedo L. et al., Cellular Immunol. 156:272-85 (1994)), и повышает экспрессию адгезивных молекул (например, ICAM) (Lee H.H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:1421-6 (1999); Grousson J. et al., Archives of Dermatol. Res. 290:325-30 (1998); Katada Y. et al., Europ. J. of Immunol. 26:192-200 (1996); Mayumi M. et al., J. of Allergy & Clin. Immunol. 96:1136-44 (1995); Flores-Romo L. et al., Immunol. 79:445-51 (1993) и костимулирующих молекул (например, B7) (Roy M. et al., Europ. J. of Immunol. 25:596-603 (1995); Jones K.W. and C.J. Hackett, Cellular Immunol. 174:42-53 (1996); Caux C. et al., Journal of Exp. Med. 180:1263-72 (1994); Kiener P.A. et al., J. of Immunol. 155:4917-25 (1995)). Цитокины индуцировали в результате захвата CD40, что повышает выживаемость и активацию Т-клеток.

Помимо усиления клеточной и иммунной функции, эффекты CD40-активации включают в себя рекрутинг клеток и их дифференцировку с помощью хемокинов и цитокинов; активацию моноцитов, повышение цитолитической активности цитолитических Т-лимфоцитов (CTL) и природных киллерных (NK) клеток; индукцию апоптоза в CD40-позитивных злокачественных опухолях; усиление иммуногенности CD40-позитивных злокачественных опухолей; и образование антител, специфичных в отношении злокачественных опухолей. Установлена также роль CD40-активации в опосредованных клеткой иммунных ответах, которая рассматривается у Grewall et al., Ann. Rev. of Immunol. 16:111-35 (1998); Mackey et al., J. of Leukocyte Biol. 63:418-28 (1998); и Noelle R.J., Agents & Actions - Suppl. 49:17-22 (1998).

Исследования с использованием модельной системы перекрестного примиривания показывают, что CD40-активация АПК может заменить потребность в хелперных Т-клетках, необходимых для образования цитолитических Т-лимфоцитов (CTL). (Bennett et al., *Nature* 393:478-480 (1998)). Данные, полученные на мышах с недостатком CD40L, свидетельствуют о явной потребности в CD40-сигналах для инициации хелперных Т-клеток. (Grewal I.S. et al., *Science* 273:1864-7 (1996); Grewal I.S. et al., *Nature* 378:617-20 (1995)). CD40-активация преобразует в противном случае толерогенные, антиген несущие В-клетки в компетентные АПК. (Buhlmann J.E. et al., *Immunity* 2:645-53 (1995)). CD40-активация индуцирует созревание и дифференцировку клеток-предшественников пуповинной крови в дендритные клетки. (Flores-Romo L. et al., *J. of Exp. Med.* 185:341-9 (1997); Mackey M.F. et al., *J. of Immunol.* 161:2094-8 (1998)). CD40-активация индуцирует также дифференцировку моноцитов в функциональные дендритные клетки. (Brossart P. et al., *Blood* 92:4238-47 (1998)). Кроме того, CD40-активация повышает цитолитическую активность NK-клеток с помощью АПК-CD40 индуцированных цитокинов. (Carbone E. et al., *J. of Exp. Med.* 185:2053-60 (1997); Martin-Fontech A. et al., *J. of Immunol.* 162:5910-6 (1999)). Данные наблюдения свидетельствуют о том, что CD40 играет существенную роль в инициации и усилении иммунных ответов путем индукции созревания АПК, секреции хелперных цитокинов, улучшенной регуляции костимулирующих молекул, а также в усилении эффекторных функций.

Ключевая роль CD40-сигналов в инициации и развитии гуморального и цитотоксического иммунных ответов делает данную систему идеальной мишенью для иммунного усиления. Такое усиление может быть особенно важным для поддержания эффективных иммунных ответов на антигены злокачественных опухолей, которые, как правило, представляются иммунной системе через примирение перекрестнореагирующим антигеном активированных АПК. (Huang A.Y. et al., *Ciba Foundation Symp.* 187:229-44 (1994); Toes R.E.M. et al., *Seminars in Immunol.* 10:443-8 (1998); Albert M.L. et al., *Nature* 392:8 6-9 (1998); Bennett S.R. et al., *J. of Exp. Med.* 186:65-70 (1997)).

Несколько групп исследователей продемонстрировали эффективность CD40-активации в отношении противоопухолевых ответов *in vitro* и *in vivo* (Toes R.E.M. et al., *Seminars in Immunol.* 10:443-8 (1998)). Две группы исследователей, используя модель легочных метастазов почечно-клеточной карциномы и подкожные опухоли, вызванные с помощью трансформированных вирусом клеток, независимо показали, что активация CD40 может обратить толерантность к опухолеспецифичным антигенам, вызывая эффективную противоопухолевую инициацию Т-клеток. (Sotomayor E.M. et al., *Nature Medicine* 5:780-787 (1999); Diehl L. et al., *Nature Medicine* 5:774-9 (1999)). О противоопухолевой активности в отсутствие иммунных клеток сообщается также для обработанной с помощью CD40L и антитела к CD40 модельной линии злокачественных клеток молочной железы человека у SCID-мышей (Hirano A. et al., *Blood* 93:2999-3007 (1999)). На мышиных моделях недавно показана ликвидация лимфом CD40+ и CD40- в результате CD40-активации с помощью антител к CD40. (French R.R. et al., *Nature Medicine* 5:548-53 (1999)). Более того, в предыдущих исследованиях Glennie и соавторов сделан вывод о том, что сигнальная активность антител к CD40 более эффективна для индукции клиренса опухоли *in vivo*, чем сигнальная активность других антител к поверхностным маркерам, способных вызывать рекрутинг эффекторов. (Tutt A.L. et al., *J. of Immunol.* 161:3176-85 (1998)). Согласно этим наблюдениям, при тестировании антитела к CD40 на активность против CD40+-злокачественных клеток *in vivo* в большинстве случаев, хоть и не всегда, туморицидная активность ассоциируется скорее с CD40-сигналом, чем с ADCC. (Funakoshi S. et al., *J. of Immunotherapy with Emphasis on Tumor Immunol.* 19:93-101 (1996)). В другом исследовании дендритные клетки костного мозга обрабатывали *ex vivo* различными агентами, и тестировали *in vivo* противоопухолевую активность. Эти исследования показали, что ДК, стимулированные CD40L, являются наиболее зрелыми и наиболее эффективными клетками, повышающими противоопухолевый ответ.

Существенная роль CD40 в противоопухолевом иммунитете показана также при сравнении ответов на противоопухолевые вакцины у мышей дикого типа и у мышей CD40^{-/-}. Эти исследования показали, что мыши CD40^{-/-} не способны реализовать противоопухолевый иммунитет, присущий нормальным мышам. (Mackey M.F. et al., *Cancer Research* 57:2569-74 (1997)). В другом исследовании спленоциты мышей, носителей опухоли, стимулированные опухолевыми клетками и обработанные активирующими *ex vivo* антителами к CD40, показали повышенную опухолеспецифичную CTL-активность. (Donepudi M. et al., *Cancer Immunol. Immunother.* 48:153-164 (1999)). Эти исследования показали, что CD40 занимает ключевую позицию в противоопухолевом иммунитете, как в позитивных, так и в негативных по CD40 злокачественных опухолях. Поскольку CD40 экспрессируется в лимфомах, лейкозах, множественной миеломе, в большинстве карцином носоглотки, мочевого пузыря, яичника и печени, а также в некоторых карциномах молочной железы и прямой кишки, активация CD40 может иметь широкий диапазон клинического применения.

Активация моноклональных антител к CD40 может способствовать ликвидации злокачественной опухоли с помощью нескольких важных механизмов. Первый из них заключается в активации хозяйственных дендритных клеток для усиления процессинга опухолевого антигена и его презентации, а также повышения антигенной презентации или иммуногенности самих опухолевых CD40-позитивных клеток, что приводит к активации опухолеспецифичных CD4⁺- и CD8⁺-лимфоцитов. Дополнительная противоопухолевая активность может быть опосредована иными усиливающими иммунитет эффектами CD40-сигналов

(выработка хемокинов и цитокинов, набор и активирование моноцитов, повышение CTL- и NK-цитолитической активности), а также прямым уничтожением CD40⁺-опухолей в результате индукции апоптоза или путем стимуляции гуморального ответа, приводящего к ADCC. Клетки апоптозной и погибающей опухоли могут также являться важным источником опухолеспецифичных антигенов, которые процессируются и презентируются АПК, активированными CD40.

В соответствии с изложенным существует острая необходимость в терапевтических, клинически пригодных антител против CD40-агонистов.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1А-1Н представлены выравнивания предсказанных аминокислотных последовательностей для выделенных вариабельных доменов легкой и тяжелой цепей моноклонального антитела к CD40 с аминокислотными последовательностями соответствующих легкой и тяжелой цепей генов зародышевой линии. Различия между клонами и соответствующей последовательностью зародышевой линии оттенены. Последовательности зародышевых линий CDR1, CDR2 и CDR3 подчеркнуты. В выровненных последовательностях тяжелой цепи появление инсерций на CDR3-участке в последовательности зародышевой линии указаны знаком тире (-), появление в последовательности данного клона делеции в CDR3-участке указаны знаком тире (-).

Фиг. 1А: предсказанные аминокислотные последовательности вариабельной области легкой каппа-цепи из монАТ 3.1.1 и 7.1.2 с $V_k=A3/A19$ и $J=J_k1$ аминокислотные последовательности гена зародышевой линии;

фиг. 1В: аминокислотные последовательности предсказанной вариабельной области легкой каппа-цепи из клона 15.1.1 и аминокислотная последовательность ($V_k=A3/A19$ и $J=J_k2$) клеток зародышевой линии;

фиг. 1С: аминокислотные последовательности предсказанной вариабельной области легкой каппа-цепи из монАТ 10.8.3 и 21.4.1 и аминокислотная последовательность ($V_k=L5$ (DP5) и $J=J_k4$) клеток зародышевой линии;

фиг. 1Д: аминокислотная последовательность предсказанной вариабельной области тяжелой цепи из монАТ 3.1.1 и аминокислотная последовательность ($V_H=3-30+$ (DP-49), $D=D4+DIR3$ и $J=J_H6$) клеток зародышевой линии;

фиг. 1Е: аминокислотная последовательность предсказанной вариабельной области тяжелой цепи из монАТ 7.1.2 и аминокислотная последовательность ($V_H=3-30+$ (DP-49), $D=DIR5+D1-26$ и $J=J_H6$) клеток зародышевой линии;

фиг. 1F: аминокислотные последовательности предсказанной вариабельной области тяжелой цепи из монАТ 10.8.3 и аминокислотная последовательность ($V_H=4-35$ (VIV-4), $D=DIR3$ и $J=J_H6$) клеток зародышевой линии;

фиг. 1G: аминокислотные последовательности предсказанной вариабельной области тяжелой цепи из монАТ 15.1.1 и аминокислотная последовательность ($V_H=4-59$ (DP-71), $D=D4-23$ и $J=J_H4$) клеток зародышевой линии;

фиг. 1Н: аминокислотные последовательности предсказанной вариабельной области тяжелой цепи из монАТ 21.4.1 и аминокислотная последовательность ($V_H=1-02$ (DP-75), $D=DLR1$ и $J=J_H4$) клеток зародышевой линии.

На фиг. 2А-2Н представлено выравнивание предсказанных аминокислотных последовательностей выделенных доменов легкой и тяжелой цепи моноклонального антитела к CD40 и аминокислотных последовательностей соответствующих легкой и тяжелой цепи генов зародышевой линии. Различия между клонами и данной последовательностью зародышевой линии выделены жирным шрифтом. Последовательности клеток зародышевой линии CDR1, CDR2 и CDR3 подчеркнуты. При выравнивании последовательностей тяжелой цепи появление вставок на CDR3-участке зародышевой линии указаны знаком тире (-), появление в последовательности данного клона делеции в CDR3-участке указаны знаком тире (-).

Фиг. 2А: предсказанные аминокислотные последовательности легкой каппа-цепи из монАТ 22.1.1, 23.5.1 и 23.29.1 и аминокислотная последовательность ($V_k=A3/A19$ и $J=J_k1$) клеток зародышевой линии;

фиг. 2В: предсказанные аминокислотные последовательности легкой каппа-цепи из монАТ 21.2.1 и аминокислотная последовательность ($V_k=A3/A19$ и $J=J_k3$) клеток зародышевой линии;

фиг. 2С: предсказанные аминокислотные последовательности легкой каппа-цепи из монАТ 23.28.1, 23.28.1L-C92A и 24.2.1 и аминокислотная последовательность ($V_k=A27$ и $J=J_k3$) клеток зародышевой линии;

фиг. 2Д: предсказанная аминокислотная последовательность тяжелой цепи из монАТ 21.2.1 и аминокислотная последовательность ($V_H=3-30+$, $D=DIR3+D6-19$ и $J=J_H4$) клеток зародышевой линии;

фиг. 2Е: предсказанная аминокислотная последовательность тяжелой цепи из монАТ 21.1.1, 22.1.1Н-C109А и аминокислотная последовательность ($V_H=3-30+$, $D=D1-1$ и $J=J_H6$) клеток зародышевой линии;

фиг. 2F: предсказанная тяжелая цепь аминокислотной последовательности из монАТ 23.5.1 и аминокислотная последовательность ($V_H=3-30+$, $D=D4-17$ и $J=J_H6$) клеток зародышевой линии;

фиг. 2G: предсказанная аминокислотная последовательность тяжелой цепи из монАТ 23.29.1 и ами-

нокислотная последовательность ($V_H=3-30.3$, $D=D4-17$ и $J=J_{H6}$) клеток зародышевой линии;

фиг. 2Н: предсказанные аминокислотные последовательности тяжелой цепи из монАТ 23.28.1, 23.28.1Н-D16E и 24.2.1 и аминокислотная последовательность клеток зародышевой линии ($V_H=4-59$, $D=DIR1+D4-17$ и $J=J_{H5}$).

На фиг. 3 представлена кривая зависимости "доза-эффект", которая иллюстрирует способность антитела против CD40 согласно изобретению (21.4.1) повышать образование IL-12p40 дендритными клетками человека.

На фиг. 4 представлена кривая зависимости "доза-эффект", которая иллюстрирует способность антитела против CD40 согласно изобретению (21.4.1) повышать образование IL-12p70 дендритными клетками человека.

На фиг. 5 представлен график, который иллюстрирует способность антитела против CD40 согласно изобретению (21.4.1) повышать иммуногенность стимулирующих клеток Ju и усиливать CTL-активность против клеток-мишеней Ju.

На фиг. 6 представлена кривая ингибирования роста злокачественной опухоли, которая иллюстрирует снижение роста позитивных по CD40 злокачественных опухолей Daudi у SCID-beige мышей, обработанных антителом к CD40 (21.4.1) согласно изобретению.

На фиг. 7 представлена кривая ингибирования роста злокачественной опухоли, которая иллюстрирует снижение роста негативных по CD40 злокачественных опухолей K562 у мышей SCID-beige, обработанных антителом к CD40 (21.4.1) согласно изобретению и дендритными клетками человека, а также Т-клетками.

На фиг. 8 показано ингибирование роста негативных по CD40 злокачественных опухолей K562 у SCID-мышей разными концентрациями агониста монАТ 23.29.1 к CD40.

На фиг. 9 показано ингибирование роста негативных по CD40 злокачественных опухолей K562 разными концентрациями агониста монАТ 3.1.1 к CD40.

На фиг. 10 показано ингибирование роста позитивных по CD40 злокачественных опухолей Raji в присутствии или отсутствие Т-клеток и дендритных клеток у SCID-мышей с помощью агониста монАТ к CD40.

На фиг. 11 показано ингибирование роста позитивных по CD40 злокачественных опухолей Raji у SCID-мышей с помощью агониста антител к CD40.

На фиг. 12 показано ингибирование роста клеток BT 474 злокачественной опухоли молочной железы у мышей SCID-beige с помощью агониста антител к CD40.

На фиг. 13 показано ингибирование роста злокачественных опухолей PC-3 предстательной железы у мышей SCID-beige с помощью агониста антител к CD40.

На фиг. 14 представлена кривая выживаемости для мышей SCID-beige, инъецированных (iv) злокачественными клетками Daudi и обработанных агонистом антител к CD40.

На фиг. 15 представлен Вестерн-блот-анализ к CD40-агонисту антител для редуцированного (R) и нередуцированного (NR) CD40 человека.

На фиг. 16 представлены результаты выравнивания D1-D4-доменов CD40 мыши и человека.

На фиг. 17 представлены результаты выравнивания аминокислотных последовательностей CD40 мыши и человека, демонстрирующих положение сайтов слияния в данных химерах.

На фиг. 18 схематически представлена группа диаграмм для химерных CD40-конструкций.

Краткое изложение существа изобретения

В настоящем изобретении представлено выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые связывает CD40 и действуют в качестве CD40-агониста.

В настоящем изобретении представлена композиция, содержащая антитело к CD40 или его антигенсвязывающую часть, и фармацевтически приемлемый носитель. Кроме того, созданная композиция может включать в себя второй компонент, такой как противоопухолевый агент или визуализирующий агент. В настоящем изобретении разработаны также диагностические и терапевтические способы.

В настоящем изобретении представлена выделенная клеточная линия, такая как гибридома, которая производит антитело к CD40 или его антигенсвязывающую часть.

В настоящем изобретении представлены также молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие тяжелую и/или легкую цепь антитела к CD40 или его антигенсвязывающую часть.

В настоящем изобретении представлены векторы и хозяйские клетки, содержащие молекулы нуклеиновых кислот, а также способы рекомбинантного получения полипептидов, кодируемых молекулами нуклеиновых кислот.

Предусмотрены также не принадлежащие человеческому роду трансгенные животные, которые экспрессируют тяжелую и/или легкую цепь антитела к CD40 или его антигенсвязывающую часть.

В настоящем изобретении разработан также способ лечения пациента, нуждающегося в этом, эффективным количеством молекул нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую и/или легкую цепь антитела к CD40 или его антигенсвязывающую часть.

Подробное описание изобретения

Определения и общие методики.

За исключением особо оговоренных случаев, научные и технические термины, используемые в связи с настоящим изобретением, подразумевают их обычное понимание рядовыми специалистами в данной области. Кроме того, если не оговорено в контексте, употребление терминов в единственном числе подразумевает также и множественное толкование, и наоборот. Вообще терминология и методы, используемые применительно к культуре клеток и культуре тканей, к молекулярной биологии, иммунологии, микробиологии, генетике, а также к белковой химии и химии нуклеиновых кислот и описанной здесь гибридизации, представляют собой хорошо известную терминологию и методы, обычно используемые в данной области.

Способы и методы настоящего изобретения, как правило, осуществляют в соответствии с традиционными способами, хорошо известными в данной области, а также описанными в разных общих и более конкретных ссылках, которые цитируются и обсуждаются в настоящем описании, если не указано иначе. См., например, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) и Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992), а также Harlow and Lane Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990), которые включены здесь путем ссылки. Ферментативные реакции и методы выделения очисткой осуществляют в соответствии с предписаниями производителей, как обычно принято в данной области или как описано здесь. Терминология, используемая в этой связи, а также лабораторные операции и методы аналитической химии, синтетической органической химии, а также медицинской и фармацевтической химии, описываемые здесь, относятся к лабораторным операциям и методам, хорошо известным и обычно используемым в данной области. Стандартные методы используют для химического синтеза, химического анализа, для получения фармацевтического препарата, в технологии приготовления лекарственного средства, а также для доставки и лечения пациентов.

Если не указано иначе, нижеследующие термины имеют следующие значения.

Термин "полипептид" подразумевает природные или синтетические белки, белковые фрагменты и полипептидные аналоги белковой последовательности. Полипептид может быть мономерным или полимерным.

Термин "выделенный белок", "выделенный полипептид" или "выделенное антитело" представляет собой белок, полипептид или антитело, которое в силу своего происхождения или источника получения (1) не ассоциируется с естественно связанными компонентами, которые сопровождают его в своем нативном состоянии, (2) свободно от других белков из одних и тех же видов, (3) экспрессируется клетками разных видов или (4) не встречается в природе. Таким образом, полипептид, который химически синтезирован или синтезирован в клеточной системе, отличной от клетки, из которой он естественным образом произошел, должен быть "выделенным" из своих естественно связанных компонентов. Любой белок можно также практически освободить от естественно связанных компонентов путем выделения, применения методы выделения очистки белка, хорошо известные в данной области.

Примеры выделенных антител включают в себя антитело к CD40, которое выделяют путем очистки по сродству с использованием CD40, антитело к CD40, которое синтезируют с помощью гибридомной или иной линии клеток *in vitro*, и антитело человека к CD40, получаемое из трансгенной мыши.

Белок или полипептид является "практически чистым", "практически гомогенным" или "практически очищенным", если по меньшей мере около 60-75% образца представлено одним видом полипептида. Данный белок или полипептид может быть мономерным или мультимерным. Практически чистый полипептид или белок обычно содержит около 50, 60, 70, 80 или 90% мас./мас. белкового образца, чаще около 95% и предпочтительно выше 99% чистоты. Степень очистки белка или степень гомогенности можно показать несколькими способами, хорошо известными в данной области, такими как электрофорез белкового образца в поликарбамидном геле с последующей визуализацией одиночной полипептидной полосы после окраски геля красителем, хорошо известным в данной области. Для некоторых целей, что касается выделения очисткой, высокое разрешение можно получить путем использования ВЭЖХ или иными способами, хорошо известными в данной области.

Используемый здесь термин "полипептидный фрагмент" относится к полипептиду, который имеет аминоконцевую и/или карбоксиконцевую делецию, а остальная аминокислотная последовательность идентична по соответствующим положениям встречающейся в природе последовательности. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения длина фрагментов составляет по меньшей мере 5, 6, 8 или 10 аминокислот. В других вариантах осуществления настоящего изобретения длина фрагментов составляет по меньшей мере 14, по меньшей мере 20, по меньшей мере 50 или по меньшей мере 70, 80, 90, 100, 150 или 200 аминокислот.

Используемый здесь термин "полипептидный аналог" относится к полипептиду, который включает в себя сегмент, практически идентичный части аминокислотной последовательности и который обладает, по меньшей мере, следующими характеристиками:

- (1) специфически связывается с CD40 в подходящих условиях связывания,
- (2) способен активировать CD40,

(3) способен хорошо регулировать экспрессию молекул на поверхности клетки, таких как ICAM, MHC-II, B7-1, B7-2, CD71, CD23 и CD83, или

(4) способен повышать секрецию цитокинов, таких как IFN- β 1, IL-2, IL-8, IL-12, IL-15, IL-18 и IL-23.

Как правило, полипептидные аналоги включают в себя консервативную аминокислотную замену (или вставку, или делецию) во встречающейся в природе последовательности. Как правило, аналоги содержат в длину по меньшей мере 20 или 25 аминокислот, предпочтительно по меньшей мере 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150 или 200 аминокислот или больше, и часто могут обладать такой же длиной, как и естественно встречающийся полноразмерный полипептид.

Предпочтительными аминокислотными заменами являются те, которые:

- (1) уменьшают чувствительность к протеолизу,
- (2) уменьшают чувствительность к окислению,
- (3) изменяют сродство к связыванию при образовании белковых комплексов и
- (4) придают или модифицируют другие физикохимические или функциональные характеристики таких аналогов.

Аналоги могут содержать различные изменения последовательности, отличающиеся от изменений в естественно встречающейся пептидной последовательности. Например, одиночную или множественные аминокислотные замены (предпочтительно консервативные аминокислотные замены) можно создать в естественно встречающейся последовательности (предпочтительно на участке полипептида, находящемся вне домена(ов), образующего межмолекулярные контакты). Консервативная аминокислотная замена не должна существенно изменять структурные характеристики родительской последовательности (например, замена аминокислоты не должна приводить к разрушению спирали, которая существует в данной родительской последовательности, или разрушать другие виды вторичной структуры, которая характеризует данную родительскую последовательность). Примеры общеизвестных вторичных и третичных полипептидных структур описаны в Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, Ed., W.H. Freeman and Company, New York (1984)); Introduction to Protein Structure (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); and Thornton et al., Nature 354:105 (1991), каждая из которых включена в данное описание путем ссылки.

Непептидные аналоги обычно используют в фармацевтической промышленности в виде лекарственных средств с характеристиками, аналогичными характеристикам данного матриксного пептида. Данные виды непептидного фармацевтического соединения называют "пептидными миметиками" или "пептидомиметиками", Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15:29 (1986); Veber and Freidinger, TINS p.392 (1985); и Evans et al., J. Med. Chem. 30:1229 (1987), включены здесь путем ссылки. Такие соединения часто создаются с помощью компьютерного молекулярного моделирования. Пептидные миметики, которые структурно сходны с терапевтически пригодными пептидами, можно использовать для получения эквивалентного терапевтического или профилактического эффекта. Вообще пептидомиметики структурно сходны с образцовым полипептидом (т.е. полипептидом, который обладает требуемым биохимическим свойством или фармакологической активностью), таким как антитело человека, но обладает одним или несколькими пептидными связями, необязательно замещенными связью, выбранной из группы, состоящей из -CH₂NH-, -CH₂S-, CH₂-CH₂-, -CH=CH-(циклический и транс), -COCH₂-, -CH(OH)CH₂- и -CH₂SO-, способами, хорошо известными в данной области. Для получения более стабильных пептидов можно также использовать системную замену одной или нескольких аминокислот консенсусной последовательности D-аминокислотой такого же типа (например, D-лизин вместо L-лизина). Кроме того, связанные пептиды, содержащие консенсусную последовательность или практически идентичную вариацию консенсусной последовательности, можно получить способами, хорошо известными в данной области (Rizo and Gerasch, Ann. Rev. Biochem. 61:387 (1992), включены сюда в виде ссылки); например, путем добавления внутренних цистеиновых остатков, способных образовывать межмолекулярные дисульфидные мостики, которые циклизуют данный пептид.

"Антитело" относится к полному антителу или к его антигенсвязывающему участку, которые конкурируют с интактным антителом за специфическое связывание. См., главным образом, Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)) (включенную во всей полноте для всех целей). Антигенсвязывающие участки можно получить с помощью методов рекомбинантной ДНК или путем ферментативного или химического расщепления интактных антител. Антигенсвязывающие участки включают в себя, в частности, Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb и фрагменты, определяющие участок комплементарности (CDR), одноцепочечные антитела (scFv), химерные антитела, диательца и полипептиды, которые содержат, по меньшей мере, участок антитела, который достаточен для придания специфичности связывания антигена с данным полипептидом.

От N-конца до C-конца вариабельные домены тяжелой и легкой цепи включают в себя участки FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Отнесение аминокислот к каждому из доменов производят в соответствии с определениями Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), или Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Chothia et al., Nature 342:878-883 (1989).

Здесь антитело, которое обозначается числом, представляет собой моноклональное антитело, которое получено из гибридомы с тем же числом. Например, моноклональное антитело 3.1.1 получают из гибридомы 3.1.1.

Здесь Fd-фрагмент означает фрагмент антитела, который состоит из доменов V_H и C_H 1; Fv-фрагмент состоит из доменов V_L и V_H одноплечевого антитела; и dAb-фрагмент (Ward et al., *Nature* 341:544-546 (1989)), который состоит из V_H -домена.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения данное антитело представляет собой одноцепочечное антитело (scFv), в котором домены V_L и V_H спарены с помощью синтетического линкера с образованием моновалентных молекул, что позволяет им образовывать одноцепочечный белок. (Bird et al., *Science* 242:423-426 (1988) и Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988)). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения данные антитела представляют собой диательца, т.е. представляют собой бивалентные антитела, в которых домены V_H и V_L экспрессируются в одной полипептидной цепи, но использующие линкер, который слишком короток, чтобы позволить образовать пару между этими двумя доменами в этой же цепи, тем самым вынуждая эти домены образовывать пару с комплементарными доменами другой цепи и создавая два антигенсвязывающих сайта (см., например, Holliger P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993) и Poljak R.J. et al., *Structure* 2:1121-1123 (1994)). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения один или несколько CDR антитела согласно изобретению могут быть ковалентно или нековалентно включены в молекулу с превращением ее в иммуноадгезин, который специфически связывается с CD40. В таких вариантах осуществления настоящего изобретения CDR может встраиваться в качестве участка большей полипептидной цепи, может ковалентно присоединяться к другой полипептидной цепи или может встраиваться нековалентно.

В вариантах осуществления настоящего изобретения с одним или несколькими связывающими сайтами эти связывающие сайты могут быть идентичны друг другу, а могут быть и разными.

В качестве используемого здесь термин "антитело человека" подразумевает любое антитело, в котором все вариабельные и константные доменные последовательности представляют собой последовательности человека. Данные антитела можно получить разнообразными способами, как описано ниже.

Используемый здесь термин "химерное антитело" подразумевает антитело, которое содержит области из двух или нескольких разных антител. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения один или несколько CDR получают из антитела человека к CD40. В другом варианте осуществления настоящего изобретения все указанные CDR получают из антитела человека к CD40. В другом варианте осуществления настоящего изобретения указанные CDR из более чем одного антитела человека к CD40 объединяют в химерное антитело. Например, химерное антитело может включать в себя CDR1 легкой цепи первого антитела человека к CD40, CDR2 легкой цепи второго антитела человека к CD40, а также CDR3 и CDR3 легкой цепи третьего антитела человека к CD40, а CDR из тяжелой цепи можно получить из одного или нескольких других антител к CD40. Кроме того, каркасные области можно получить из одних и тех же антител к CD40 или из одного или нескольких разных антител человека.

"Активирующее антитело" (именуемое также здесь "агонист антитела"), использование которого подразумевает антитело, которое при добавлении к клетке, ткани или организму, экспрессирующему CD40, повышает одну или несколько активностей CD40 по меньшей мере приблизительно на 20%. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения данное антитело активирует CD40-активность по меньшей мере на 40, 50, 60, 70, 80, 85%. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения активирующее антитело добавляют в присутствии CD40L. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения активность активирующего антитела измеряют с использованием анализа повышающей регуляции молекулярной поверхности клеток цельной крови. См. пример VII. В другом варианте осуществления настоящего изобретения активность активирующего антитела измеряют с использованием анализа дендритных клеток для измерения высвобождения IL-12. См. пример VIII. В другом варианте осуществления настоящего изобретения активность активирующего антитела измеряют с использованием *in vivo*-модели злокачественной опухоли. См. пример X.

Фрагменты или аналоги антител или иммуноглобулиновых молекул могут легко получить рядовые специалисты в данной области, следуя указаниям данного описания. Предпочтительны амино- и карбоксиконцевые фрагменты или аналоги, встречающиеся вблизи границ функциональных доменов. Структурные и функциональные домены можно идентифицировать путем сравнения нуклеотидной и/или аминокислотной последовательности с последовательностью, опубликованной или зарегистрированной в базах данных. Для идентификации мотивов последовательности или предсказанной белковой конформации доменов, которые встречаются в белках известной структуры и/или функции, предпочтительно использовать методы компьютерного сравнения. Способы идентификации белковых последовательностей, которые упакованы в известную трехмерную структуру, известны. См. Bowie et al., *Science* 253:164 (1991).

Используемый здесь термин "поверхностный плазмонный резонанс" относится к оптическому феномену, который позволяет анализировать в реальном времени биоспецифичные взаимодействия путем детектирования изменений концентрации белка в биосенсорной матрице, например, с использованием

системы BIACore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.). Дальнейшее описание см. Jonsson U. et al., Ann. Biol. Clin. 51:19-26 (1993); Jonsson U. et al., Biotechniques 11:620-627 (1991); Jonsson B. et al., J. Mol. Recognit. 8:125-131 (1995); и Johnsson B. et al., Anal. Biochem. 198:268-277 (1991).

Термин "K_D" относится к константе диссоциации конкретного взаимодействия антиген-антитело.

Термин "эпитоп" включает в себя любую белковую детерминанту, способную специфически связываться с иммуноглобулином или Т-клеточным рецептором. Эпитопные детерминанты обычно состоят из химически активных сгруппированных на поверхности молекул, таких как аминокислоты или сахарные боковые цепочки, и обычно обладают специфичными трехмерными структурными характеристиками, а также определенными значениями заряда. Считается, что антитело специфически связывает антиген при константе диссоциации ≤ 1 мкМ, предпочтительно ≤ 100 нМ и наиболее предпочтительно ≤ 10 нМ.

Используемые здесь двадцать стандартных аминокислот и их аббревиатуры соответствуют общепринятым использованию. См. Immunology - A Synthesis (2nd Edition, E.S.Golub and D.R.Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)), которая включена здесь путем ссылки.

Приводимый здесь термин "полинуклеотид" подразумевает полимерную форму нуклеотидов, состоящую по меньшей мере из 10 оснований в длину, любых рибонуклеотидов или дезоксинуклеотидов, либо модифицированную форму, состоящую из нуклеотидов любого типа. Данный термин включает в себя одноцепочные и двухцепочные формы.

Используемый здесь термин "выделенный полинуклеотид" подразумевает полинуклеотид геномного, кДНК-го или синтетического происхождения или их некоторую комбинацию, который в силу того, что он является "выделенным полинуклеотидом" (1), не связывается со всеми или с частью полинуклеотидов, с которыми "выделенный полинуклеотид" обнаруживается в природе, (2) присоединяется путем сшивки к полинуклеотиду, с которым в природе он не связывается, или (3) не встречается в природе в виде части большей последовательности.

Используемый здесь термин "олигонуклеотид" включает в себя естественно встречающиеся и модифицированные нуклеотиды, соединенные вместе с помощью естественно встречающихся или не встречающихся в природе олигонуклеотидных связей.

Олигонуклеотиды представляют собой полинуклеотидную подгруппу, как правило, длиной в 200 оснований или меньше. Предпочтительно олигонуклеотиды содержат 10-60 оснований и наиболее предпочтительно 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20-40 оснований. Олигонуклеотиды, как правило, являются одноцепочечными, например, праймеры и зонды; хотя олигонуклеотиды могут быть и двухцепочечными, например, для использования в конструировании генного мутанта. Олигонуклеотиды согласно изобретению могут представлять собой либо смысловые, либо антисмысловые олигонуклеотиды.

Используемый здесь термин "естественно встречающиеся олигонуклеотиды" включают в себя дезоксирибонуклеотиды и рибонуклеотиды. Используемый здесь термин "модифицированные нуклеотиды" включают в себя нуклеотиды с модифицированными или замещенными сахарными группами и т.п. Приводимый здесь термин "олигонуклеотидные связи" включает в себя олигонуклеотидные связи, такие как тиофосфатная, дитиофосфатная, фосфоселеноатная, фосфодиселеноатная, фосфоанилотиоатная, фосфоаниладатная, фосфоамилатная и т.п. См., например, LaPlanche et al., Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stec et al., J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984); Stein et al., Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988); Zon et al., Anti-Cancer Drug Design 6:539 (1991); Zon et al., Oligonucleotides and Analogous: A Practical Approach, pp.87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); патент США № 5151510; Uhlmann and Peyman, Chemical Reviews 90:543 (1990), раскрытие которых включено тем самым путем ссылки. При необходимости, олигонуклеотид может включать метку для детектирования.

Последовательности, "присоединенные путем сшивки", включают в себя и экспрессирующие контрольные последовательности, которые соприкасаются с представляющим интерес геном, и экспрессирующие контрольные последовательности для контроля за интересующим геном и которые действуют в транс-положении или на расстоянии. Используемый здесь термин "экспрессирующая контрольная последовательность" подразумевает полинуклеотидные последовательности, которые необходимы для воздействия на экспрессию и процессинг кодирующих последовательностей, с которыми они лигированы. Экспрессирующие контрольные последовательности включают в себя соответствующие последовательности инициации транскрипции, терминации, промоторную и энхансерную последовательности; эффективные сигналы процессинга РНК, такие как сигналы сплайсинга и полиаденилирования; последовательности, которые стабилизируют цитоплазматическую мРНК; последовательности, которые повышают эффективность трансляции (т.е. консенсусную Козак-последовательность); последовательности, которые повышают стабильность белка; и, при необходимости, последовательности, которые повышают секрецию белка. Природа таких контрольных последовательностей различна и зависит от организма хозяина; у прокариот такие контрольные последовательности, как правило, содержат промотор, сайт связывания рибосом, и последовательность терминации транскрипции; у эукариот, как правило, такие контрольные последовательности включают в себя промоторы и последовательность терминации транскрипции. Термин "контрольные последовательности" подразумевает включение, как минимум, всех компонентов, присутствие которых существенно для экспрессии и процессинга, и может также включать в себя дополнительные компоненты, присутствие которых создает преимущество, например, лидерные последовательности.

тельности и последовательности партнеров слияния.

Используемый здесь термин "вектор" подразумевает молекулу нуклеиновой кислоты, способную переносить другую нуклеиновую кислоту, к которой она прикреплена. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вектор представляет собой плазмиду, т.е. кольцевую двухцепочечную ДНК-петлю, в которую могут быть лигированы дополнительные ДНК-сегменты. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вектор представляет собой вирусный вектор, в вирусный геном которого могут быть дополнительно лигированы ДНК-сегменты. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения векторы могут автономно реплицироваться в клетке-хозяине, в которую они интродуцированы (например, бактериальные векторы, обладающие бактериальным oriджином репликации или эпизомные векторы млекопитающих). В других вариантах осуществления настоящего изобретения векторы могут интегрироваться в геном клетки-хозяина после внедрения в хозяйственную клетку и, таким образом, реплицироваться одновременно с хозяйственным геномом. Вместе с тем, некоторые векторы способны управлять экспрессией генов, к которым они присоединены путем сшивки. Такие векторы именуют здесь "рекомбинантные экспрессирующие векторы" (или просто "экспрессирующие векторы").

Используемый здесь термин "рекомбинантная клетка-хозяин" (или просто "клетка-хозяин") подразумевает клетку, в которую внедрен рекомбинантный экспрессирующий вектор. Следует иметь в виду, что "рекомбинантная клетка-хозяин" и "клетка-хозяин" подразумевает не только отдельную клетку пациента, но также и потомство такой клетки. Поскольку из-за какой-либо мутации или влияния окружающей среды в последующих поколениях могут происходить некоторые модификации, то такое потомство в действительности не может быть идентично родительской клетке, но все же его включают в рамки используемого здесь термина "клетка-хозяин".

Приводимый здесь термин "селективно гибридизуется" подразумевает обнаружение и специфическое связывание. Полинуклеотиды, олигонуклеотиды и их фрагменты в соответствии с настоящим изобретением селективно гибридизуются с цепями нуклеиновой кислоты в условиях гибридизации и отмычки, которые минимизируют существенный уровень детектируемого связывания с неспецифическими нуклеиновыми кислотами. "Очень жесткие" или "исключительно жесткие" условия можно использовать для осуществления условий селективной гибридизации, которые известны в данной области и рассматриваются здесь. Один из примеров "очень жестких" или "исключительно жестких" условий представляет собой инкубацию полинуклеотида с другим полинуклеотидом, где один из полинуклеотидов может быть прикреплен к твердой поверхности, такой как мембрана, в гибридизационном буфере, состоящем из 6X SSPE или SSC, 50% формамида, 5X раствора Денхардта, 0,5% SDS, 100 мкг/мл денатурированной, фрагментированной ДНК спермы лосося, при температуре гибридизации 42°C в течение 12-16 ч, с последующей двукратной отмывкой при 55°C с использованием буфера для отмычки, состоящего из 1X SSC, 0,5% SDS. См. также Sambrook et al., выше, pp. 9.50-9.55.

Термин "процентная идентичность последовательности" применительно к последовательностям нуклеиновой кислоты подразумевает нуклеотидные остатки в двух последовательностях, которые одинаковы при выравнивании на максимальное соответствие. Длина идентичной сравниваемой последовательности может быть удлинена по меньшей мере почти на девять нуклеотидов, как правило, по меньшей мере почти на 18 нуклеотидов, в большинстве случаев, как правило, по меньшей мере почти на 24 нуклеотида, обычно по меньшей мере почти на 28 нуклеотидов, чаще по меньшей мере почти на 32 нуклеотида и предпочтительно по меньшей мере почти на 36, 48 или более нуклеотидов. Существует ряд различных алгоритмов, известных в данной области, которые можно использовать для измерения идентичности нуклеотидной последовательности. Например, полинуклеотидные последовательности можно сравнивать с использованием FASTA, Gap или Bestfit, которые представляют собой программы в Wisconsin Package Version 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin. FASTA, которая включает в себя, например, программы FASTA2 и FASTA3, производит выравнивания и определяет процентную идентичность областей с наилучшим перекрыванием между запрашиваемой и исследуемой последовательностями (Pearson, Methods Enzymol. 183:63-98 (1990); Pearson, Methods Mol. Biol. 132:185-219 (2000); Pearson, Methods Enzymol. 266:227-258 (1996); Pearson, J. Mol. Biol. 276:71-84 (1998); включенные здесь путем ссылки). Если не оговорено иначе, используют параметры по умолчанию для конкретной программы или алгоритма. Например, процентную идентичность между последовательностями нуклеиновых кислот можно определить с использованием FASTA и ее параметрами по умолчанию (размер слова из 6 и NOPAM-фактор для матрицы оценок) или с использованием GAP и его параметров по умолчанию, которые разработаны для GCG Version 6.1, включенные здесь путем ссылки.

Ссылка на нуклеотидную последовательность включает в себя комплементарную ей последовательность, если не оговорено иначе. Таким образом, следует иметь в виду, что ссылка на нуклеиновую кислоту, обладающую конкретной последовательностью, относится также к комплементарной ей цепи и ее комплементарной последовательности.

В молекулярной биологии исследователи используют взаимозаменяемые термины "процентная идентичность последовательности", "процентное сходство последовательности" и "процентная гомоло-

гия последовательности". В данном патенте эти термины имеют то же значение и относятся только к последовательностям нуклеиновых кислот.

Термин "существенно сходный" или "существенно сходная последовательность" в отношении нуклеиновой кислоты или ее фрагмента означает, что оптимальное выравнивание, при соответствующем числе нуклеотидных вставок или делеций, с другой нуклеиновой кислотой (или с ее комплементарной цепью), означает идентичность нуклеотидной последовательности по меньшей мере на 85%, предпочтительно по меньшей мере почти на 90% и наиболее предпочтительно по меньшей мере почти на 95, 96, 97, 98 или 99% нуклеотидных оснований, и это измеряется с помощью хорошо известного алгоритма идентичности последовательностей, такого как FASTA, BLAST или Gap, рассматриваемого выше.

Применительно к полипептидам термин "существенно идентичный" подразумевает, что две пептидные последовательности при оптимальном выравнивании с помощью таких программ как GAP или BESTFIT, использующих по умолчанию взвешенные пробелы, обладают по меньшей мере 70-, 75- или 80-процентной идентичностью последовательностей, предпочтительно по меньшей мере 90- или 95-процентной идентичностью последовательностей и наиболее предпочтительно по меньшей мере 97-, 98- или 99-процентной идентичностью последовательностей. Предпочтительно остальные неидентичные позиции отличаются по консервативным аминокислотным заменам. "Консервативная аминокислотная замена" представляет собой замену, в которой аминокислотный остаток замещается другим аминокислотным остатком, обладающим боковой цепью в виде R-группы, с аналогичными химическими характеристиками (например, зарядом или гидрофобностью). В целом, консервативная аминокислотная замена не должна существенно изменять функциональные характеристики белка. В случае, когда две или более аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными аминокислотными заменами, процентная идентичность последовательности или степень сходства может быть повышена введением поправок на консервативную природу данной замены. Способы такого повышения хорошо известны специалистам в данной области. См., например, Pearson, *methods Mol. Biol.* 243:307-31 (1994). Примеры аминокислотных групп, которые обладают боковыми цепями со сходными химическими характеристиками, включают в себя: 1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; 2) алифатические с гидроксильной группой боковые цепи: серин и треонин; 3) амидсодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; 4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; 5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; 6) кислотные боковые цепи: аспарагиновая и глутаминовая кислота; и 7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин. Предпочтительные аминокислотные группы с консервативными заменами представляют собой валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тироzin, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамин-аспарагиновая кислота и аспарагин-глутамин.

В качестве альтернативы, консервативная замена представляет собой любое изменение, обладающее положительной величиной в логарифмической матрице правдоподобия PAM250, раскрытой у Gonnet et al., *Science* 256:1443-45 (1992), включенной здесь путем ссылки. "Умеренно консервативная" замена представляет собой любое изменение, обладающее неотрицательной величиной в логарифмической матрице правдоподобия PAM250.

Сходство последовательностей полипептидов, которое также именуют идентичностью последовательностей, как правило, измеряют с использованием программ анализа последовательности. Белковая аналитическая программа сопоставляет сходные последовательности с использованием измерения сходства, выравниваемые по разным заменам, делециям и иным модификациям, в том числе и консервативным аминокислотным заменам. Например, GCG содержит программы, такие как "Gap" и "Bestfit", которые можно использовать с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды разных видов организмов или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG Version 6.1. Полипептидные последовательности можно также сравнивать с помощью FASTA, используя параметры по умолчанию или рекомендуемые параметры, программа для GCG Version 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивание и процентную идентичность последовательности в областях наилучшего перекрывания между запрашиваемой и исследуемой последовательностями (Pearson, *Methods Enzymol.* 183:63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.* 132:185-219 (2000)). Другой предпочтительный алгоритм для сравнения последовательности согласно изобретению с базой данных, содержащей большое число последовательностей из разных организмов, представляет собой компьютерная программа BLAST, в частности, blastp или blastn, с использованием параметров по умолчанию. См., например, Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990); Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402 (1997); включенные здесь путем ссылки.

Длины полипептидных последовательностей, сравниваемых на предмет гомологии, составляет, как правило, по меньшей мере около 16 аминокислотных остатков, обычно по меньшей мере около 20 остатков, чаще обычно по меньшей мере около 24 остатков, обычно, как правило, по меньшей мере около 28 остатков и предпочтительно свыше около 35 остатков. Если поисковая база данных содержит последовательности большого числа разных организмов, она является предпочтительной для сравнения аминокислотных последовательностей.

Используемые здесь термины "метка" или "меченный" относятся к внедрению другой молекулы в данное антитело. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения метка представляет собой детектируемый маркер, например, включенную в аминокислоту радиоактивную метку или присоединенную к полипептиду биотинилированную составляющую, которая может обнаруживаться с помощью маркируемого авидина (например, стрептавидина, содержащего флуоресцентный маркер или ферментативную активность, которую можно детектировать оптическим или колориметрическим способами). В другом варианте осуществления настоящего изобретения метка или маркер могут быть терапевтическими, например, лекарственным конъюгатом или токсином. В данной области известны и могут использоваться различные способы мечения полипептидов и гликопротеинов. Примеры меток для полипептидов включают в себя, не ограничиваясь ими, радиоизотопы или радионуклиды (например, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), флуоресцентные метки (например, FITC, родамин, фосфатные лантаноиды), ферментные метки (например, пероксидаза хрена, β -галактозидаза, люцифераза, щелочная фосфатаза), хемилюминесцентные маркеры, биотинильные группы, предопределенные полипептидные эпитопы, узнаваемые вторичным репортером (например, лейциновая застежка парных последовательностей, связывающие сайты вторичных антител, металло связывающие домены, эпитопные метки), магнитные агенты, такие как хелатные соединения гадолиния, токсины, такие как коклюшный токсин, таксол, цитохалин B, грамицидин D, этидийбромид, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидроксантрациндион, митоксанtron, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пуромицин, а также его аналоги и гомологи. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения метки присоединяют с помощью "ножки" разной длины для уменьшения возможного пространственного затруднения.

Термин пациент включает человека и животных.

В рамках данного описания и формулы изобретения слово "включать" или его варианты, такие как "включает" или "включающий", подразумевает включение установленного целого числа или группы чисел, а не исключение любого иного целого числа или группы целых чисел.

Антитела человека к CD40 и их характеристика.

Антитела человека помогают избежать некоторых проблем, связанных с ассоциацией антител, которыми обладают вариабельная и/или константная области антител животных, не являющихся человеком (например, грызунов). Такие осложнения включают в себя быстрый клиренс антител или иммунную реакцию против этого антитела. Поэтому в одном из вариантов осуществления настоящего изобретения созданы гуманизированные антитела к CD40. В другом варианте осуществления настоящего изобретения получены антитела человека к CD40. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитела человека к CD40 получают путем иммунизации грызуна, геном которого включает в себя гены иммуноглобулина человека, с тем, чтобы данный грызун продуцировал антитела человека. Предполагается, что антитела человека к CD40 минимизируют иммуногенность и аллергические реакции, свойственные антителам, не принадлежащим человеку, или моноклональным антителам, не производимым человеком (монАТ), и, следовательно, повышают эффективность и безопасность вводимых антител. Использование полностью человеческих антител можно рассматривать предположительно для создания существенного преимущества при лечении хронических и возвратных заболеваний человека, таких как воспаление и злокачественная опухоль, которые могут потребовать повторного введения антител.

В настоящем изобретении создано одиннадцать активирующих моноклональных антител человека к CD40 (монАТ) и производящих их гибридомных клеточных линий. В табл. А приведен список идентификаторов последовательностей (SEQ ID NO:) нуклеиновых кислот, кодирующих полноразмерные тяжелые и легкие цепи (включая лидерную последовательность), соответствующие полноразмерные выведенные аминокислотные последовательности, а также нуклеотидная и выведенная на ее основе аминокислотная последовательность вариабельных областей тяжелой и легкой цепи.

Таблица А

Антитела человека к CD40								
Идентификатор последовательности (SEQ ID NO:)								
монАТ	Вариабельная область				Полная длина			
	Тяжелая		Легкая		Тяжелая		Легкая	
	ДНК	Белок	ДНК	Белок	ДНК	Белок	ДНК	Белок
3.1.1	1	2	3	4	5	6	7	8
7.1.2	9	10	11	12	13	14	15	16
10.8.3	17	18	19	20	21	22	23	24
15.1.1	25	26	27	28	29	30	31	32
21.2.1	33	34	35	36	37	38	39	40
21.4.1	41	42	43	44	45	46	47	48
22.1.1	49	50	51	52	53	54	55	56
23.5.1	57	58	59	60	61	62	63	64
23.28.1	65	66	67	68	69	70	71	72
23.29.1	73	74	75	76	77	78	79	80
24.2.1	81	82	83	84	85	86	87	88

Кроме того, в настоящем изобретении предусмотрены монАТ 23.25.1 человека к CD40 и линия гибридомных клеток, которая их продуцирует.

Кроме того, в настоящем изобретении предусмотрены варианты тяжелой и/или легкой цепи некоторых вышеперечисленных монАТ человека к CD40, содержащих одну или несколько аминокислотных замен. В настоящем изобретении созданы два варианта монАТ 3.1.1 тяжелых цепей. В одном из них 78 остаток аланина заменен на треонин, в другом 78 остаток аланина заменен на треонин, а 88 и 97 остатки валина заменены аланином. В настоящем изобретении создан также вариант монАТ 3.1.1 легкой цепи, в котором 4 остаток лейцина и 83 остаток лейцина заменены, соответственно, на метионин и валин. Сочетания измеренной тяжелой или легкой цепи с легкой или тяжелой цепью дикого типа обозначается, соответственно, как мутантная цепь. Таким образом, антитело, содержащее легкую цепь дикого типа и тяжелую цепь, включающую изменение аланина на треонин по остатку 78, обозначено в виде 3.1.1Н-A78T. Однако в других вариантах осуществления настоящего изобретения включены антитела, содержащие любое сочетание измененной тяжелой цепи и измененной легкой цепи из 3.1.1.

Далее в настоящем изобретении создан вариант монАТ 22.1.1 тяжелой цепи, в которой 109 остаток цистеина заменен на аланин. Моноклональное антитело, включающее измененную тяжелую цепь и легкую цепь 22.1.1, обозначено монАТ 22.1.1 Н-C109A. Еще в настоящем изобретении созданы два варианта тяжелой цепи и вариант легкой цепи монАТ 23.28.1. В одном из вариантов тяжелой цепи 16 остаток аспарагиновой кислоты заменен на глутаминовую кислоту. монАТ, включающее вариантную тяжелую цепь и легкую цепь 23.28.1, обозначено 23.28.1 Н-D16E. Настоящее изобретение включает также 23.28.1-вариант легкой цепи, в которой 92 остаток цистеина заменен на аланин. монАТ, включающее 23.28.1-тяжелую цепь и вариант легкой цепи, обозначено 23.28.1 L C92A. В настоящем изобретении созданы также монАТ, включающие любой из вариантов тяжелой цепи 23.28.1 с вариантом легкой цепи 23.28.1.

Легкая цепь, продуцируемая гибридомой 23.29.1, содержит мутацию в константной области по остатку 174. Легкая цепь, продуцируемая данной гибридомой, в этом положении несет аргинин вместо канонического лизина. В соответствии с этим в настоящем изобретении создана также легкая цепь 23.2.9.1 с каноническим лизином по остатку 174 и монАТ, обозначенным 23.29.1L-R174K, содержащим тяжелую цепь 23.29.1 и измененную легкую цепь.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антитело к CD40 представляет собой 3.1.1, 3.1.1Н-A78T, 3.1.1Н-A78T-V88A-V97A, 3.1.1L-L4M-L83V, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1Н-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1Н-D16E, 23.28.1L-C92A, 23.29.1, 23.29.1L-R174K и 24.2.1. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело к CD40 содержит легкую цепь, включающую в себя аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72, 80, 88 или 102, либо ее вариабельную область, или же кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 7, 15, 23, 31, 39, 47, 55, 63, 71, 79, 87 или 101. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело к CD40 включает в себя легкую цепь, содержащую, по меньшей мере, CDR2 одного из перечисленных антител, одну из идентифицированных выше аминокислотных последовательностей (как показано на фиг. 1А-1С и 2А-2С), либо кодируемую одной из идентифицированных выше последовательностей нуклеиновой кислоты. В другом варианте осуществления настоящего изобретения данная легкая цепь дополнительно содержит CDR1 и CDR3, независимо выбранные из вариабельной области легкой цепи, которая включает в себя не более десяти аминокислот из аминокислотной последовательности, кодируемой геном зародышевой линии V_k A3/A19, L5 или A27, либо включает в себя CDR1 и CDR3, независимо выбранные из CDR1 и CDR3 (1) антитела, выбранного из 3.1.1, 3.1.1L-L4M-L83V, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1L-C92A, 23.29.1, 23.29.1L-R174K или 24.2.1; (2) аминокислотной последовательности SEQ

ID NO: 4, 12, 20, 28, 36, 44, 52, 60, 68, 76, 84, 94, 100 или (3) кодируемой последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 3, 11, 19, 27, 35, 43, 51, 59, 67, 75, 83, 93, 99 или 101.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антитело к CD40 включает в себя тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 6, 14, 22, 30, 38, 46, 54, 62, 70, 78 или 86, либо ее вариабельную область, или кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 5, 13, 21, 29, 37, 45, 53, 61, 69, 77 или 85. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело против CD40 включает в себя тяжелую цепь, содержащую, по меньшей мере, CDR3 одного из перечисленных антител, одну из вышеуказанных аминокислотных последовательностей (как показано на фиг. 1A-1C и 2A-2C), либо кодируемую одной из вышеуказанных последовательностей нуклеиновой кислоты. В другом варианте осуществления настоящего изобретения данная тяжелая цепь дополнительно включает CDR1 и CDR2, независимо выбранные из вариабельной области тяжелой цепи, которая включает не более восемнадцати аминокислот из аминокислотной последовательности, кодируемой геном зародышевой линии V_H3-30+, 4-59, 1-02, 4.35 или 3-30.3, либо включает CDR1 и CDR2, независимо выбранные из CDR1 или CDR2 (1) антитела, выбранного из 3.1.1, 3.1.1H-A78T, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1H-D16E, 23.29.1 и 24.2.1; (2) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, 10, 18, 26, 34, 42, 50, 58, 66, 74, 82, 90, 92, 96 или 98, либо (3) кодируемой последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1, 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57, 65, 73, 81, 89, 91, 95 или 97. В другом варианте осуществления настоящего изобретения антитело к CD40 включает в себя тяжелую цепь и легкую цепь, как указано выше.

Используемое здесь антитело 3.1.1H-A78T идентично антителу 3.1.1 за тем исключением, что остаток 78 тяжелой цепи представляет собой треонин вместо аланина. Аналогично, в антителе 3.1.1H-A78T-V88A-V97A остаток 78 заменен на А, а остатки 88 и 97 заменены в данной тяжелой цепи с валина на аланин. Антитело 3.1.1L-L4M-L83V идентично антителу 3.1.1, за тем исключением, что остаток 4 представляет собой метионин вместо лейцина, а остаток 83 представляет собой в данной легкой цепи валин вместо лейцина. Антитело 22.1.1H-C109A идентично антителу 22.1.1, за тем исключением, что остаток 109 данной тяжелой цепи заменен с цистеина на аланин. Антитела 23.28.1H-D16E и 23.28.1L-C92A идентичны антителу 23.28.1, за тем исключением, что остаток 16 данной тяжелой цепи заменен с аспартата на глутамат, а остаток 92 данной легкой цепи заменен, соответственно, с цистеина на аланин. Антитело 23.29.1L-R174K идентично антителу 23.29.1, за тем исключением, что остаток 174 данной легкой цепи заменен с аргинина на лизин.

Классы и подклассы антител к CD40.

Классы и подклассы антител к CD40 можно определить любым способом, известным в данной области. Вообще класс и подкласс любого антитела можно определить с использованием антител, которые специфичны для конкретного класса и подкласса любого антитела. Такие антитела коммерчески доступны. Класс и подкласс можно определить с помощью ИФА или Вестерн-блота, также как и другими методами. В качестве альтернативы, класс и подкласс можно определить путем секвенирования всех или части константных доменов данной тяжелой и/или легкой цепей определенных антител, сравнивая их аминокислотные последовательности с известными аминокислотными последовательностями разных классов и подклассов иммуноглобулинов и определяя класс и подкласс антител.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело к CD40 представляет собой моноклональное антитело. Антитело к CD40 может представлять собой молекулу IgG, IgM, IgE, IgA или IgD. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антитело к CD40 представляет собой IgG и соответствует подклассу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антитела к CD40 представлены подклассом IgG2.

Видовая и молекулярная селективность.

В другом аспекте настоящего изобретения антитела к CD40 демонстрируют и видовую, и молекулярную селективность. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело к CD40 связывается с CD40 приматов и человека. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело к CD40 связывается с CD40 человека, cynomolgus или резус-обезьяны. В других вариантах осуществления настоящего изобретения антитело к CD40 не связывается с CD40 мыши, крысы, собаки или кролика. Следуя указаниям настоящего описания, можно определить видовую селективность антитела к CD40, применяя способы, хорошо известные в данной области. Например, можно определить видовую селективность с использованием Вестерн-блота, FACS, ИФА или РИА. (См., например, пример IV).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело к CD40 обладает селективностью в отношении CD40, которая в 100 раз выше, чем его селективность в отношении RANK (рецепторный активатор ядерного фактора каппа-цепи В-клеток), 4-1BB (CD137), TNRF-1 (Рецептор-1 Фактора Некроза Опухоли) и TNRF-2 (Рецептор-2 Фактора Некроза Опухоли). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело к CD40 не обнаруживает какого-либо существенного специфичного связывания с любым другим белком, отличающимся от CD40. Можно определить селективность антитела к CD40 в отношении CD40, используя способы, хорошо известные в данной области, сле-

для указаниям данного описания. Например, можно определить селективность, используя Вестерн-блот, FACS, ИФА или РИА. (См., например, пример V).

Идентификация СР40-эпитопов, распознаваемых антителом к CD40.

Далее, в настоящем изобретении создано моноклональное антитело человека к CD40, которое связывает CD40 и перекрестно конкурирует, и/или связывается, с тем же эпитопом и/или связывается с CD40 с той же K_D , что и антитело человека к CD40, выбранное из антител 3.1.1, 3.1.1H-A78T, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A, 3.1.1L-L4M-L83V, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1H-D16E, 23.28.1L-C92A, 23.29.1, 23.29.1L-R174K или 24.2.1; или антитело человека к CD40, которое включает в себя вариабельную область тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 10, 18, 26, 34, 42, 50, 58, 66, 74, 82, 90, 92, 96 или 98, либо антитело человека к CD40, которое включает в себя вариабельную область легкой цепи, имеющей последовательность SEQ ID NO: 4, 12, 20, 28, 36, 44, 52, 60, 68, 76, 84, 94, 100 или 102.

Представляется возможным определить, действительно ли связывается антитело с одним и тем же эпитопом или перекрестно конкурирует за связывание с антителом против CD40, используя любой способ, известный в данной области. В одном из вариантов осуществления согласно изобретению можно позволить данному антителу к CD40 настоящего изобретения связать CD40 в условиях насыщения, а затем измерить способность тестируемого антитела связывать CD40. Если тестируемое антитело способно связывать CD40 одновременно с антителом к CD40, тогда это тестируемое антитело связывается с другим эпитопом в качестве антитела к CD40. Однако если тестируемое антитело не способно одновременно связываться с CD40, тогда тестируемое антитело связывается с тем же самым эпитопом, перекрывающимся эпитопом, или эпитопом, который находится в непосредственной близости к эпитопу, связанному антителом человека к CD40. Данный эксперимент можно осуществить с использованием ИФА, РИА, FACS или поверхностного плазмонного резонанса. (См., например, пример VI). В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения данный эксперимент осуществляют с использованием поверхностного плазмонного резонанса. В более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения используют BIACore.

Связывание антител против CD40 с CD40 по сродству.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело против CD40 связывается с CD40 с высоким сродством. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело против CD40 связывается с CD40 с $K_D 2 \times 10^{-8}$ М или с K_D меньшего значения. В других предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения антитело против CD40 связывается с CD40 с $K_D 2 \times 10^{-9}, 2 \times 10^{-10}, 4,0 \times 10^{-11}$ М или с K_D меньшего значения. В наиболее предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антитело связывается с CD40 с $K_D 2,5 \times 10^{-12}$ М или с K_D меньшего значения. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело связывается с CD40 практически с той же K_D , что и антитело, выбранное из 3.1.1, 3.1.1H-A78T, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A, 3.1.1L-L4M-L83V, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1H-D16E, 23.28.1L-C92A, 23.29.1, 23.29.1L-R174K или 24.2.1. В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антитело связывается с CD40 практически с той же K_D , что и антитело, которое включает в себя CDR2 легкой цепи, и/или CDR3 тяжелой цепи антитела, выбранного из 3.1.1, 3.1.1H-A78T, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A, 3.1.1L-L4M-L83V, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1H-D16E, 23.28.1L-C92A, 23.29.1, 23.29.1L-R174K и 24.2.1. Еще в одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антитело связывается с CD40 практически с той же K_D , что и антитело, которое включает в себя вариабельную область тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 10, 18, 26, 34, 42, 50, 58, 66, 74, 82, 90, 92, 96 или 98, или которое включает в себя легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, 12, 20, 28, 36, 44, 52, 60, 68, 76, 84, 94, 100 или 102. В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антитело связывается с CD40 практически с той же K_D , что и антитело, которое включает в себя CDR2 вариабельной области легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, 12, 20, 28, 36, 44, 52, 60, 68, 76, 84, 94, 100 или 102, либо CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 10, 18, 26, 34, 42, 50, 58, 66, 74, 82, 90, 92, 96 или 98.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения данное антитело против CD40 имеет низкую скорость диссоциации. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело против CD40 имеет $K_{off} 2,0 \times 10^{-4}$ или менее. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения K_{off} составляет 2×10^{-7} или менее. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения K_{off} практически такая же, что и для описанного здесь антитела, включая антитело, выбранное из 3.1.1, 3.1.1H-A78T, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A, 3.1.1L-L4M-L83V, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1H-D16E, 23.28.1L-C92A, 23.29.1, 23.29.1L-R174K и 24.2.1. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело связывается с CD40 практически с таким же значением K_{off} , что и у антитела, которое включает в себя CDR3 тяжелой цепи или CDR2 легкой цепи антитела, выбранного из 3.1.1, 3.1.1H-A78T, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A, 3.1.1L-L4M-L83V,

7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1H-D16E, 23.28.1L-C92A, 23.29.1, 23.29.1L-R174K и 24.2.1. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело связывается с CD40 практически с таким же значением K_{off} , что и у антитела, которое включает в себя вариабельную область тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 10, 18, 26, 34, 42, 50, 58, 66, 74, 82, 90, 92, 96 или 98, либо которая включает в себя вариабельную область легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, 12, 20, 28, 36, 44, 52, 60, 68, 76, 84, 94, 100 или 102. В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антитело связывается с CD40 практически с такой же K_{off} , что и у антитела, которое включает в себя CDR2 вариабельной области легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, 12, 20, 28, 36, 44, 52, 60, 68, 76, 84, 94, 100 или 102, либо CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, 14, 22, 30, 38, 46, 54, 62, 70, 78, 86, 90, 92, 96 или 98.

Связывание по сродству и скорость диссоциации антитела против CD40 с CD40 можно определить любым способом, известным в данной области. Связывание по сродству можно измерить конкурентными ИФА, РИА или поверхностным плазмонным резонансом, таким как BIACore. Скорость диссоциации можно также измерить с помощью поверхностного плазмонного резонанса. Предпочтительно, связывание по сродству и скорость диссоциации измеряют поверхностным плазмонным резонансом. Более предпочтительно связывание по сродству и скорость диссоциации измеряют с использованием BIACoreTM. См., например, пример XIV.

Использование генов легкой и тяжелой цепи.

Антитело к CD40 согласно изобретению может включать в себя легкую каппа- или лямбда-цепь человека или аминокислотную последовательность, полученную из них. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, включающих легкую каппа-цепь, вариабельный домен (V_L) легкой цепи частично кодируется геном человека A3/A19 (DPK-15), L5 (DP5) или A27 (DPK-22) V_k .

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения V_L антитела к CD40 содержит одну или несколько аминокислотных замен в сравнении с аминокислотной последовательностью клеток зародышевой линии. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения V_L антитела к CD40 содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен в сравнении с аминокислотной последовательностью клеток зародышевой линии. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения одна или несколько из этих замен клеток зародышевой линии находятся в CDR-участках легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения эти аминокислотные замены, по сравнению с клетками зародышевой линии, находятся в одной или в нескольких одинаковых положениях, как и замены в сравнении с клетками зародышевой линии для одного или нескольких V_L антител 3.1.1, 3.1.1L-L4M-L83V, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1L-C92A, 23.29.1, 23.29.1L-R174K и 24.2.1. Например, V_L антитела к CD40 может содержать одну или несколько аминокислотных замен, в сравнении с клетками зародышевой линии, обнаруживаются в антителе 21.4.1, а другие аминокислотные замены, в сравнении с клетками зародышевой линии, обнаруживаются в антителе 10.8.3, которое использует тот же V_k -ген, что и ген антитела 21.4.1. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аминокислотные изменения происходят в одном или нескольких одних и тех же положениях, но вызывает их иная мутация, чем в данном эталонном антителе.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аминокислотные изменения, по сравнению с зародышевой линией, происходят в одном или нескольких одних и тех же положениях, что и в любой из V_L антител 3.1.1, 3.1.1L-L4M-L83V, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1L-C92A, 23.29.1, 23.29.1L-R174K и 24.2.1, но данные изменения могут соответствовать консервативным аминокислотным заменам в этом положении(ях) относительно аминокислоты в эталонном антителе. Например, когда конкретное положение в одном из этих антител изменяется по отношению к клеткам зародышевой линии и представлено глутаматом, в этом положении можно консервативно заменить аспартат. Аналогично, если аминокислотное замещение в сравнении с замещением клеток зародышевой линии представлено серином, в этом положении можно консервативно заменить треонин на серин. Консервативные аминокислотные замены рассматриваются выше.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения легкая цепь антитела человека к CD40 включает в себя аминокислотную последовательность, которая представляет собой ту же аминокислотную последовательность, что и аминокислотная последовательность V_L антитела 3.1.1 (SEQ ID NO: 4), 3.1.1L-L4M-L83V (SEQ ID NO: 94), 7.1.2 (SEQ ID NO: 12), 10.8.3 (SEQ ID NO: 20), 15.1.1 (SEQ ID NO: 28), 21.4.1 (SEQ ID NO:), 21.2.1 (SEQ ID NO: 36), 21.4.1 (SEQ ID NO: 44), 22.1.1 (SEQ ID NO: 52), 23.5.1 (SEQ ID NO: 60), 23.28.1 (SEQ ID NO: 68), 23.28.1L-C92A (SEQ ID NO: 100), 23.29.1 (SEQ ID NO: 76), 23.29.1L-R174K (SEQ ID NO: 102) или 24.2.1 (SEQ ID NO: 84), или указанная аминокислотная последовательность имеет до 1, 2, 3, 4, 6, 8 или 10 консервативных аминокислотных замен и/или в общей сложности до 3-х неконсервативных аминокислотных замен.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения легкая цепь антитела человека к CD40 включает в себя, по меньшей мере, легкую цепь CDR2 и может также включать в себя участки CDR1 и CDR3 в последовательности клеток зародышевой линии, как описано здесь. В другом варианте

осуществления настоящего изобретения легкая цепь может включать CDR1 и CDR2 из антитела, независимо выбранного из 3.1.1, 3.1.1L-L4M-L83V, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1L-C92A, 23.29.1 и 24.2.1, или CDR-участки, каждый, обладающий менее 8, менее 6, менее 4 или менее 3 консервативных замен и/или в общей сложности тремя или менее неконсервативными аминокислотными заменами. В других вариантах осуществления настоящего изобретения легкая цепь указанного антитела к CD40 включает в себя, по меньшей мере, легкую цепь CDR2, и может также включать в себя CDR1- и CDR3-участки, каждый из которых независимо выбран из CDR1- и CDR3-участков антитела, обладающего вариабельной областью легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 4, 12, 20, 28, 36, 44, 52, 60, 68, 76, 84, 94 или 100, или кодируемую молекулой нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 3, 11, 19, 27, 35, 43, 51, 59, 67, 75, 83, 93 или 99.

Что касается тяжелой цепи, то в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вариабельная область аминокислотной последовательности тяжелой цепи частично кодируется геном человека V_H 3-30+, V_H 4-59, V_H 1-02, V_H 4.35 или V_H 3-30.3. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения V_H антитела к CD40 содержит одну или несколько аминокислотных замен, делеций или вставок (добавок) по сравнению с аминокислотной последовательностью клеток зародышевой линии. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вариабельный домен тяжелой цепи содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 мутаций по сравнению с аминокислотной последовательностью клеток зародышевой линии. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мутация(ии) представляют собой неконсервативные замены по сравнению с аминокислотной последовательностью клеток зародышевой линии. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения данные мутации находятся в CDR-участках данной тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аминокислотные изменения произведены в одном или нескольких одинаковых положениях по сравнению с мутациями в последовательности клеток зародышевой линии в любой одной или в нескольких V_H антител 3.1.1, 3.1.1H-A78T, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1H-D16E, 23.29.1 и 24.2.1. В других вариантах осуществления настоящего изобретения аминокислотные изменения происходят в одном или в нескольких одинаковых позициях, но содержат другую мутацию по сравнению с эталонным антителом.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения тяжелая цепь включает в себя аминокислотную последовательность вариабельного домена (V_H) антитела 3.1.1 (SEQ ID NO: 2), 3.1.1H-A78T (SEQ ID NO: 90), 3.1.1H-A78T-V88A-V97A (SEQ ID NO: 92), 7.1.2 (SEQ ID NO: 10), 10.8.3 (SEQ ID NO: 18), 15.1.1 (SEQ ID NO: 26), 21.2.1 (SEQ ID NO: 34), 21.4.1 (SEQ ID NO: 42), 22.1.1 (SEQ ID NO: 50), 22.1.1H-C109A (SEQ ID NO: 96), 23.5.1 (SEQ ID NO: 58), 23.28.1 (SEQ ID NO: 66), 23.28.1H-D16E (SEQ ID NO: 98), 23.29.1 (SEQ ID NO: 74) и 24.2.1 (SEQ ID NO: 82) или указанную аминокислотную последовательность, обладающую до 1, 2, 3, 4, 6, 8 или 10 консервативных аминокислотных замен и/или до 3 неконсервативных аминокислотных замен.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения тяжелая цепь включает в себя тяжелую цепь CDR1-, CDR2- и CDR3-участков антитела 3.1.1, 3.1.1H-A78T, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1H-D16E, 23.29.1 и 24.2.1 (как показано на фиг. 1D-1H или 2D-2H), или указанных CDR-участков, каждый, обладающий менее 8, менее 6, менее 4 или менее 3 консервативных аминокислотных замен или до трех или меньше неконсервативных аминокислотных замен.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения тяжелая цепь включает в себя CDR3 и может также включать CDR1- и CDR2-участки последовательности клеток зародышевой линии, как описано выше, или может включать CDR1 и CDR2 антитела, каждое из которых независимо выбрано из антитела, включающего в себя тяжелую цепь антитела, выбранного из 3.1.1, 3.1.1H-A78T, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1H-D16E, 23.29.1 и 24.2.1. В другом варианте осуществления настоящего изобретения данная тяжелая цепь включает в себя CDR3 и может также содержать CDR1- и CDR2-участки, каждый из которых независимо выбран из CDR1- и CDR2-участков вариабельной области тяжелой цепи, включающей в себя аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2, 10, 18, 26, 34, 42, 50, 58, 66, 74, 82, 90, 92, 96 или 98 (как показано на фиг. 1D-1H или на фиг. 2D-2H) или кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 1, 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57, 65, 73, 81, 89, 91, 95 или 97. В другом варианте осуществления настоящего изобретения антитело включает в себя тяжелую цепь, как описано выше, и легкую цепь, как описано выше.

Один из видов аминокислотной замены, которую можно произвести, представляет собой замену одного или нескольких цистеинов в данном антителе, которые могут быть химически реакционноспособными, на другой остаток, такой, каким, без ограничения, являются аланин или серин. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения замену цистеина осуществляют в каркасной области вариабельного домена или в константном домене антитела. В другом варианте осуществления настоящего изобретения указанный цистеин находится в некаркасной области данного антитела. Другой вид

аминокислотной замены, которую можно произвести, заключается в замене любого потенциального из протеолитических сайтов в данном антителе, в частности, тех из них, которые находятся в каркасной области вариабельного домена, в константном домене антитела или в неканонической области данного антитела. Замена цистеиновых остатков и удаление протеолитических сайтов может снизить риск любой гетерогенности в данном антителном продукте и, таким образом, увеличить его гомогенность. Другой вид аминокислотной замены заключается в элиминации пар аспарагин-глицин, которые образуют потенциальные сайты дезамидирования, путем изменения одного или обоих остатков. Это предпочтительно осуществлять в каркасных областях, константном домене или неканонических областях антитела.

Активация CD40 с помощью антитела к CD40.

Другой аспект настоящего изобретения включает в себя антитело к CD40, которое представляет собой активирующее антитело, т.е. CD40-агонист. Активирующее антитело усиливает или заменяет действие CD40L относительно CD40. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения активирующее антитело представляет собой, по существу, имитатор CD40L, и конкурирует с CD40L за связывание с CD40. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело не конкурирует с CD40L за связывание с CD40, но усиливает эффект связывания CD40L с CD40. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело к CD40 активирует CD40 в присутствии или в отсутствие CD40L.

Ингибирование опухолевого роста *in vivo* антителами к CD40.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения предусмотрено антитело к CD40, которое ингибирует пролиферацию опухолевых клеток *in vitro* или рост опухоли *in vivo*.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения данное антитело подавляет рост опухоли по меньшей мере на 50, 55, 60, 65, 70, 75%. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения данное антитело подавляет рост опухоли на 75%. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения ингибирование роста опухоли детектируется через 14 дней после начала ее обработки антителом. В других вариантах осуществления настоящего изобретения ингибирование роста опухоли детектируется через 7 дней после начала ее обработки антителом. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения животному вводят другой противоопухолевый агент вместе с антителом к CD40. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения противоопухолевый агент дополнительно ингибирует рост опухоли. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения противоопухолевый агент представляет собой адриамицин или таксол. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения совместное введение противоопухолевого агента и антитела к CD40 ингибирует рост опухоли по меньшей мере на 50% через 22-24 дня после начала обработки, по сравнению с ростом опухоли у необработанного животного.

Индукция апоптоза антителами к CD40.

Другая цель настоящего изобретения - создать антитело к CD40, которое индуцирует клеточную смерть в CD40-позитивных клетках. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения данное антитело вызывает апоптоз CD40-позитивных клеток либо *in vivo*, либо *in vitro*.

Усиление экспрессии молекул клеточной поверхности.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело к CD40 усиливает экспрессию молекул В-клеточной поверхности, в том числе, но не ограничиваясь ими, ICAM, MHC-II, B7-2, CD71, CD23 и CD83. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения концентрация антитела 1 мкг/мл усиливает экспрессию молекулы ICAM В-клеточной поверхности в цельной крови, повышая ее содержание по меньшей мере в 2 раза или более предпочтительно по меньшей мере в 4 раза. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения концентрация антитела 1 мкг/мл усиливает экспрессию молекулы MHC-II В-клеточной поверхности в цельной крови, повышая ее содержание по меньшей мере в 2 раза или более предпочтительно по меньшей мере в 3 раза. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения концентрация антитела 1 мкг/мл усиливает экспрессию молекулы CD23 поверхности В-клетки в цельной крови, повышая ее содержание по меньшей мере в 2 раза или более предпочтительно по меньшей мере в 5 раз. См., например, пример VII, табл. 25.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело к CD40 усиливает экспрессию молекул, в том числе, но не ограничиваясь этим, MHC-II, ICAM, B7-2, CD83 и B7-1, на поверхности дендритных клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения диапазон повышенного содержания аналогичен диапазону повышенного содержания, наблюдаемого в В-клетках. См., например, табл. 25 и 26 ниже. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело предпочтительно повышает экспрессию молекул поверхности дендритных клеток, таких как B7-2 и MHC-II, по сравнению с экспрессией этих молекул на поверхности В-клеток. См., например, табл. 27.

Усиление секреции клеточных цитокинов.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело усиливает клеточную секрецию цитокинов, включая, но не ограничиваясь ими, IL-8, IL-12, IL-15, IL-18 и IL-23.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело усиливает секрецию цитокинов дендритными клетками и прилипающими моноцитами. В некоторых вариантах осуществления

настоящего изобретения образование цитокинов усиливается в результате костимуляции одним или несколькими LPS, IFN- γ или IL-1 β . Еще в одном аспекте настоящего изобретения в опыте с дендритными клетками антитело вместе с LPS костимулирует усиление образования IL-12p70 в отношении EC₅₀ почти на 0,48 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело усиливает образование IL-12p40 в дендритных клетках в отношении EC₅₀ почти на 0,21 мкг/мл. (См., например, пример VIII).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело усиливает секрецию гамма-IFN T-клетками в опыте с T-клетками/дендритными клетками, как описано в примере VIII. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело усиливает секрецию гамма-IFN в опыте с T-клетками/дендритными клетками, что касается EC₅₀, почти на 0,3 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело усиливает секрецию гамма-IFN в опыте с T-клетками/дендритными клетками, что касается EC₅₀, почти на 0,2 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело усиливает секрецию гамма-IFN в опыте с T-клетками/дендритными клетками, что касается EC₅₀, почти на 0,03 мкг/мл.

Способы получения антител и антителопродуцирующих клеточных линий.

Иммунизация.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитела человека получают путем иммунизации животного, не являющегося человеком, антигеном CD40, содержащего в своем геноме некоторые или все локусы тяжелой и легкой цепи иммуноглобулина человека. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения не являющееся человеком животное представляет собой XenоМouseTM-животное (ксеногенная мышь).

XenоМouse-мыши представлены генно-инженерными мышиными линиями, которые содержат большие фрагменты тяжелой цепи и легкой цепи иммуноглобулиновых локусов человека и являются дефектными в отношении выработки мышных антител. См., например, Green et al., *Nature Genetics* 7:13-21 (1994) и патенты США № 5916771, 5939598, 5985615, 5998209, 6075181, 6091001, 6114598, 6130364, 6162963 и 6150584. См. также WO 91/10741, WO 94/02602, WO 96/34096, WO 96/33735, WO 98/16654, WO 98/24893, WO 98/50433, WO 99/45031, WO 99/53049, WO 00/09560 и WO 00/037504.

В другом аспекте в настоящем изобретении разработан способ получения антител у животных, не принадлежащих человеческому роду и не относящихся к мышам, путем иммунизации антигеном CD40, а также у не принадлежащих человеческому роду трансгенных животных, которые включают иммуноглобулиновые локусы человека. Таких животных можно получить, используя способы, описанные в цитированных выше документах. Способы, раскрытие в этих документах, можно модифицировать, как описано в патенте США № 5994619. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения не принадлежащие человеческому роду животные представляют собой крыс, овец, свиней, коз, крупный рогатый скот и лошадей.

XenоМouseTM-мыши, подобно взрослому человеку, продуцируют набор полноразмерных человеческих антител и синтезируют антиген-специфичные антитела человека. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения XenоМouseTM-мыши содержат приблизительно 80% набора антител человеческого гена V, полученного в результате введения участка искусственной дрожжевой хромосомы (YAC) с конфигурацией клеток зародышевой линии и размером до одной т.н., содержащей локусы тяжелой и легкой каппа-цепи человека. См. Mendez et al., *Nature Genetics* 15:146-156 (1997), Green and Jakobovits, *J. Exp. med.* 188:483-495 (1998) и WO 98/24893, раскрытие которых включено здесь путем ссылки.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения не принадлежащее человеческому роду животное, включающее иммуноглобулиновые гены человека, представляет собой животное, которое обладает иммуноглобулиновым "минилокусом" человека. В таком "минилокусном" методе экзогенный Ig-локус имитируется путем включения индивидуальных генов из Ig-локуса. В соответствии с этим один или несколько V_H-генов, один или несколько D_H-генов, один или несколько J_H-генов, константный домен ти, и второй константный домен (предпочтительно константный гамма-домен) вводят в конструкцию для внедрения в животное. Данный метод описан, в частности, в патентах США № 5545807, 5545806, 5569825, 5625126, 5633425, 5661016, 5770429, 5789650, 5814318, 5591669, 5612205, 5721367, 5789215 и 5643763, включенных таким образом путем ссылки.

Преимущество мини-локусного метода заключается в быстроте, с которой могут быть образованы и внедрены животным конструкции, содержащие части IG-локуса. Вместе с тем, потенциальное неудобство данного мини-локусного метода заключается в отсутствие достаточного разнообразия иммуноглобулинов, необходимого для поддержания полного развития В-клеток, что может снижать продукцию антител.

В другом аспекте в настоящем изобретении разработан способ получения гуманизированных антител к CD40. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, не являющихся человеком животных иммунизируют CD40-антигеном, как описано ниже, в условиях, которые предоставляют возможность для получения антител. Из иммунизированных животных выделяют антителопродуцирующие клетки, сливают с миеломными клетками для получения гибридом, из которых выделяют нуклеиновые

кислоты, кодирующие тяжелую и легкую цепи представляющего интерес CD40-антитела. Данные нуклеиновые кислоты последовательно создают, используя генно-инженерные методы, известные специалистам в данной области и, как описано ниже, уменьшают размер нечеловеческой последовательности, т.е. гуманизируя данное антитело для уменьшения иммунной реакции у людей.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитела CD40 отделяют и/или выделяют очисткой. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антитела CD40 представляет собой CD40 человека. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитела CD40 представляет собой фрагмент CD40. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения фрагмент антитела CD40 представляет собой внеклеточный домен CD40. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения фрагмент антитела CD40 включает в себя по меньшей мере один эпитоп из CD40. В других вариантах осуществления настоящего изобретения антитела CD40 представляет собой клетку, которая на своей поверхности экспрессирует или сверхэкспрессирует CD40 или его иммуногенный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитела CD40 представляет собой слитый белок CD40.

Иммунизацию животных можно осуществить любым способом, известным в данной области. См., например, Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Press, 1990. Способы иммунизации отличных от человека животных, таких как мыши, крысы, овцы, козы, свиньи, крупный рогатый скот и лошади, хорошо известны в данной области. См., например, Harlow and Lane, выше, а также патент США № 5994619. В предпочтительном варианте осуществления антитела CD40 вводят с адьювантом для стимуляции иммунного ответа. Образцы адьювантов включают в себя полный или неполный адьювант Фрейнда, RIBI (мурамильные дипептиды) или ISCOM (иммуностимулирующие комплексы). Такие адьюванты могут защитить данный полипептид от рассасывания путем его связывания в локальный осадок, или же они могут содержать вещества, которые стимулируют хозяина выделять факторы, вызывающие хемотаксис макрофагов и других компонентов данной иммунной системы. Предпочтительно при введении полипептида режим иммунизации растягивать на несколько недель и включать два или более введения данного полипептида.

Пример I описывает получение моноклональных антител к CD40.

Получение антител и антителопродуцирующих клеточных линий.

После иммунизации животного антителом CD40 из этого животного можно получить антитела и/или антителопродуцирующие клетки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сыворотку, содержащую антитело к CD40, получают от животного путем взятия крови или умерщвления животного. Эту сыворотку можно использовать в качестве полученной от животного для получения из нее иммуноглобулиновой фракции или для выделения путем очистки из сыворотки антител к CD40. Специалистам в данной области хорошо известно, что сыворотка или иммуноглобулины, полученные данным способом, являются поликлональными. Неудобство использования получаемых из сыворотки поликлональных антител заключается в том, что количество получаемых антител ограничено, и данное поликлональное антитело обладает совокупностью разных характеристик.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антителопродуцирующие иммортализованные клеточные линии получают из клеток, выделенных из иммунизированного животного. После иммунизации животное умерщвляют, а лимфатические узлы и/или В-клетки селезенки иммортализируют. Способы иммортализации клеток включают в себя, не ограничиваясь этим, перенесение их вместе с онкогенами, заражение их онкогенным вирусом, культивирование их в условиях, в которых отбирают иммортализованные клетки, воздействие на них канцерогенных и мутагенных соединений, слияние их с иммортализованной клеткой, например, с миеломной клеткой, и инактивация опухолевого генасупрессора. См., например, Harlow and Lane выше. Если используют слияние с миеломными клетками, то такие миеломные клетки предпочтительно не секретируют иммуноглобулиновые полипептиды (несекретирующая клеточная линия). Иммортализованные клетки скренируют с использованием CD40, его участка, или с использованием клетки, экспрессирующей CD40. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения начальное скренирование осуществляют с использованием иммуноферментного анализа или радиоиммуноанализа. Пример ИФА-скренирования описан в WO 00/37504, включенной здесь путем ссылки.

Клетки, продуцирующие антитело к CD40, например гибридомы, отбирают, клонируют и в дальнейшем скренируют на предмет выявления нужных характеристик, включая устойчивый рост, высокий выход и требуемые свойства антител, что рассматривается далее ниже. Гибридомы можно размножить *in vivo* в организме синтетических животных, в организме животных с недостаточной иммунной системой, например у голых мышей, или в культуре клеток *in vitro*. Способы селекции, клонирования и размножения гибридом хорошо известны рядовым специалистам в данной области.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения иммунизированное животное представляет собой не принадлежащее человеческому роду животное, которое экспрессирует иммуноглобулиновые гены человека, а его В-клетки селезенки сливают с миеломной клеточной линией животного того же вида, что и указанное иммунизированное животное, не являющееся человеком. В более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения иммунизированное животное явля-

ется XenoMouseTM-животным, а миеломная клеточная линия представлена несекретирующей мышиной миеломой. В еще более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения миеломная клеточная линия представляет собой Р3-Х63-АГ8.653. См., например, пример I.

Кроме того, в настоящем изобретении созданы гибридомы, вырабатывающие антитела человека к CD40. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения данные гибридомы представляют собой мышиные гибридомы, которые описаны выше. В других вариантах осуществления настоящего изобретения такие гибридомы создают в организме животных (но не человека), в организме таких животных, как крысы, овцы, свиньи, козы, крупный рогатый скот или лошади, но не мыши. В другом варианте осуществления настоящего изобретения гибридомы представляют собой гибридомы человека.

Нуклеиновые кислоты, векторы, хозяйские клетки и способы создания рекомбинантных антител.

Нуклеиновые кислоты.

Настоящее изобретение включает в себя молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела против CD. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения разные молекулы нуклеиновой кислоты кодируют тяжелую цепь и легкую цепь иммуноглобулина к CD. В других вариантах осуществления настоящего изобретения одна и та же молекула нуклеиновой кислоты кодирует тяжелую цепь и легкую цепь иммуноглобулина к CD40.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая вариабельный домен легкой цепи, включает в себя генную последовательность человека А3/А19 (DPK-15), L5 (DP5) или А27 (DPK-22) V_k или полученную из них последовательность. В других вариантах осуществления настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты включает в себя нуклеотидную последовательность гена А3/А19 V_k и гена J_k1, J_k2 или J_k3, либо последовательность, полученную из них. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения данная молекула нуклеиновой кислоты включает в себя нуклеотидную последовательность гена L5 V_k и гена J_k4. В других вариантах осуществления настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты включает в себя нуклеотидную последовательность гена А27 V_k и гена J_k3.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая легкую цепь, кодирует аминокислотную последовательность, содержащую 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мутаций из аминокислотной последовательности клеток зародышевой линии. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты включает в себя нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность V_L, содержащую 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 неконсервативных аминокислотных замен и/или 1, 2 или 3 неконсервативных замен по сравнению с последовательностью из клеток зародышевой линии. Замены могут находиться в CDR-участках, в каркасных участках или в константном домене.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая вариабельный домен легкой цепи (V_L), кодирует аминокислотную последовательность V_L, содержащую одну или несколько мутаций по сравнению с последовательностью из клеток зародышевой линии, которые идентичны мутациям, обнаруживаемым в V_L одного из антител 3.1.1, 3.1.1L-L4M-L83V, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1L-C92A, 23.29.1 и 24.2.1. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты кодирует по меньшей мере три аминокислотные мутации, по сравнению с последовательностью из клеток зародышевой линии, обнаруживаемые в V_L одного из антител 3.1.1, 3.1.1L-L4M-L83V, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1L-C92A, 23.29.1 и 24.2.1.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты включает в себя нуклеотидную последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность V_L моноклонального антитела 3.1.1 (SEQ ID NO: 4), 3.1.1L-L4M-L83V (SEQ ID NO: 94), 7.1.2 (SEQ ID NO: 12), 10.8.3 (SEQ ID NO: 20), 15.1.1 (SEQ ID NO: 28), 21.2.1 (SEQ ID NO: 36), 21.4.1 (SEQ ID NO: 44), 22.1.1 (SEQ ID NO: 52), 23.5.1 (SEQ ID NO: 60), 23.28.1 (SEQ ID NO: 68), 23.28.1L-C92A (SEQ ID NO: 100), 23.29.1 (SEQ ID NO: 76) или 24.2.1 (SEQ ID NO: 84) либо ее часть. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная часть включает в себя, по меньшей мере, CDR3-участок. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеиновая кислота кодирует аминокислотную последовательность легкой цепи CDR указанного антитела. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная часть представляет собой смежную часть, включающую в себя CDR1-CDR3.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты включает в себя нуклеотидную последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 4, 12, 20, 28, 36, 44, 52, 60, 68, 76, 84, 94 или 100, или указанную последовательность без сигнальной последовательности. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты включает в себя нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 3, 11, 19, 27, 35, 43, 51, 59, 67, 75, 83, 93 или 99 или ее часть, причем в указанной последовательности необязательно отсутствует сигнальная последовательность.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная часть кодирует V_L-

область. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная часть кодирует, по меньшей мере, область CDR2. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеиновая кислота кодирует аминокислотную последовательность легкой цепи CDR указанного антитела. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная часть кодирует прилежащий участок из CDR1-CDR3.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты кодирует аминокислотную последовательность V_L , которая идентична по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99% V_L -аминокислотной последовательности одного из антител 3.1.1, 3.1.1L-L4M-L83V, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1L-C92A, 23.29.1 или 24.2.1, либо V_L -аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 4, 12, 20, 28, 36, 44, 52, 60, 68, 76, 84, 94 или 100. Молекулы нуклеиновой кислоты согласно изобретению включают в себя нуклеиновые кислоты, которые гибридизуются в жестких условиях, таких, которые описаны выше, с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность из числа SEQ ID NO: 4, 12, 20, 28, 36, 44, 52, 60, 68, 76, 84, 94 или 100, либо которая обладает последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 3, 11, 19, 27, 35, 43, 51, 59, 67, 75, 83, 93 или 99.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения последовательность нуклеиновой кислоты кодирует полноразмерную легкую цепь антитела, выбранного из 3.1.1, 3.1.1L-L4M-L83V, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1L-C92A, 23.29.1, 23.29.1L-R174K или 24.2.1, либо легкую цепь, включающую в себя аминокислотную последовательность из числа SEQ ID NO: 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72, 80, 88, 94, 100 или 102, либо легкую цепь, содержащую такую мутацию, как раскрыта здесь мутация. Кроме того, нуклеиновая кислота может включать в себя нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7, 15, 23, 31, 39, 47, 55, 63, 71, 79 или 87, либо молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую легкую цепь, содержащую одну из мутаций, которая раскрыта здесь.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты кодирует вариабельный домен тяжелой цепи (V_H), который включает в себя генную последовательность V_H человека 3-30+, 4-59, 1-02, 4.35 или 3-30.3 или последовательность, полученную из нее. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты включает в себя V_H -ген человека 3-30+, ген D4 (DIR3) и ген J_H6 человека; V_H -ген человека 3-30+, ген D4 (DIR3) и ген J_H6 человека; V_H -ген человека 4.35, ген DIR3 и ген J_H6 человека; V_H -ген человека 4-59, ген D4-23 и ген J_H4 человека; V_H -ген человека 1-02, ген DLR1 и ген J_H4 человека; V_H -ген человека 3-30+, ген D6-19 (DIR3) и ген J_H4 человека; V_H -ген человека 3-30+, ген D1-1 и ген J_H6 человека; V_H -ген человека 3-30+, ген D4-17 и ген J_H6 человека; V_H -ген человека 3-30.3, ген D4-17 и ген J_H6 человека; V_H -ген человека 4-59, ген D4-17 (DIR1) и ген J_H5 человека, или последовательность, полученную из этих генов человека.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты кодирует аминокислотную последовательность, содержащую 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 мутаций по сравнению с аминокислотной последовательностью генов клеток зародышевой линии человека V, D или J. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанные мутации находятся в V_H -области. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанные мутации находятся в CDR-участках.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты кодирует одну или несколько аминокислотных мутаций, в сравнении с последовательностью из клеток зародышевой линии, которые идентичны аминокислотным мутациям, обнаруживаемым в V_H моноклонального антитела 3.1.1, 3.1.1H-A78T, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1H-D16E, 23.29.1 и 24.2.1. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеиновая кислота кодирует по меньшей мере три аминокислотные мутации по сравнению с последовательностями из клеток зародышевой линии, которые идентичны по меньшей мере трем аминокислотным мутациям, обнаруживаемым в одном из вышеперечисленных моноклональных антител.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты включает в себя нуклеотидную последовательность, которая кодирует по меньшей мере часть аминокислотной последовательности V_H антитела 3.1.1 (SEQ ID NO: 2), 3.1.1H-A78T (SEQ ID NO: 90), 3.1.1H-A78T-V88A-V97A (SEQ ID NO: 92), 7.1.2 (SEQ ID NO: 10), 10.8.3 (SEQ ID NO: 18), 15.1.1 (SEQ ID NO: 26), 21.2.1 (SEQ ID NO: 34), 21.4.1 (SEQ ID NO: 42), 22.1.1 (SEQ ID NO: 50), 22.1.1H-C109A (SEQ ID NO: 96), 23.5.1 (SEQ ID NO: 58), 23.28.1 (SEQ ID NO: 66), 23.28.1H-D16E (SEQ ID NO: 98), 23.29.1 (SEQ ID NO: 74) или 24.2.1 (SEQ ID NO: 82), либо указанная последовательность обладает консервативными аминокислотными мутациями и/или в общей сложности тремя или менее неконсервативными аминокислотными заменами. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения данная последовательность кодирует один или несколько CDR-участков, предпочтительно CDR3-участок, все три CDR-участка, смежную часть, включающую в себя CDR1-CDR3, или полную V_H -область с сигнальной последовательностью или без нее.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты включает в себя нуклеотидную последовательность, которая кодирует аминокислотную последователь-

ность из числа SEQ ID NO: 2, 10, 18, 26, 34, 42, 50, 58, 66, 74, 82, 90, 92, 96 или 98, или указанную последовательность без сигнальной последовательности. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты включает в себя по меньшей мере часть нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1, 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57, 65, 73, 81, 89, 91, 95 или 97, либо указанную последовательность без сигнальной последовательности.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная часть кодирует V_H -область (с сигнальной последовательностью или без нее), CDR3-участок, все три CDR-участка или прилежащую смежную область, содержащую CDR1-CDR3.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты кодирует аминокислотную последовательность V_H , которая идентична по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 или 99% аминокислотной последовательности V_H , представленной на фиг. 1А-1С или 2А-2С, или аминокислотной последовательности V_H из любой SEQ ID NO: 2, 10, 18, 26, 34, 42, 50, 58, 66, 74, 82, 90, 92, 96 или 98. Молекулы нуклеиновой кислоты согласно изобретению включают в себя нуклеиновые кислоты, которые гибридизуются в жестких условиях, таких, которые описаны выше, с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 10, 18, 26, 34, 42, 50, 58, 66, 74, 82, 90, 92, 96 или 98, или которая обладает последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1, 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57, 65, 73, 81, 89, 91, 95 или 97. Последовательность нуклеиновой кислоты согласно изобретению включает в себя молекулу нуклеиновой кислоты, которая гибридизуется в жестких условиях, таких, которые описаны выше, с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей только что описанную выше V_H .

В другом варианте осуществления настоящего изобретения нуклеиновая кислота кодирует полноразмерную тяжелую цепь антитела, выбранного из 3.1.1, 3.1.1H-A78T, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1H-D16E, 23.29.1 и 24.2.1, или тяжелую цепь, обладающую аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6, 14, 22, 30, 38, 46, 54, 62, 70, 78 или 86, либо тяжелую цепь, содержащую мутацию, такую как одна из мутаций, рассматриваемых здесь. Кроме того, нуклеиновая кислота включает в себя нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5, 13, 21, 29, 37, 45, 53, 61, 69, 77, 85 или 89 или последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую тяжелую цепь, содержащую мутацию, такую как одна из рассматриваемых здесь мутаций.

Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая тяжелую или полную легкую цепь антитела к CD40 или их части, может быть выделена из любого источника, который производит такое антитело. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения молекулы нуклеиновой кислоты выделяют из В-клетки, выделенной из животного, иммунизированного CD40, или из иммортализированной клетки, произведенной от такой В-клетки, экспрессирующей антитело к CD40. Способы выделения мРНК, кодирующей антитело, хорошо известны в данной области. См., например, Sambrook et al. Выделенную мРНК можно применять для получения кДНК при использовании в полимеразной цепной реакции (ПЦР) или для кДНК-клонирования антителных генов. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения молекулу нуклеиновой кислоты выделяют из гибридомы, содержащей в качестве одного из своих партнеров слияния иммуноглобулин-продуцирующую клетку, выделенную из трансгенного животного, не принадлежащего человеческому роду. В еще более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения клетку, продуцирующую иммуноглобулин человека, выделяют из XenoMouse™-животного. В другом варианте осуществления настоящего изобретения клетка, продуцирующая иммуноглобулин человека, происходит от любого трансгенного животного, как описано выше, но не от человека и не от мыши. В другом варианте осуществления настоящего изобретения нуклеиновую кислоту выделяют из нетрансгенного животного, но не человека. Молекулы нуклеиновой кислоты, выделяемые из такого нетрансгенного животного, могут использоваться, например, для получения гуманизированных антител.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая тяжелую цепь антитела к CD40 согласно изобретению, может включать в себя нуклеотидную последовательность, кодирующую V_H -домен согласно изобретению, объединенную в одной рамке считывания с нуклеотидной последовательностью, кодирующей тяжелую цепь константного домена из любого источника. Аналогичным образом, молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая легкую цепь антитела к CD40 согласно изобретению, может включать в себя нуклеотидную последовательность, кодирующую V_L -домен согласно изобретению, объединенную в одной рамке считывания с нуклеотидной последовательностью, кодирующей легкую цепь константного домена из любого источника.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие вариабельный домен тяжелой (V_H) и легкой (V_L) цепей, преобразуют в полноразмерные антителенные гены. В одном из вариантов настоящего изобретения молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие домены V_H или V_L , преобразуют в полноразмерные гены антител путем встраивания в экспрессирующий вектор константные домены, уже кодирующие, соответственно, тяжелую цепь или легкую цепь, и встраивают так, чтобы в данном векторе присоединить путем сшивки V_H -сегмент к C_H -сегменту(ам), а V_L -сегмент присоединить путем сшивки к C_L -сегменту. В другом варианте осуществления настоящего

изобретения, используя стандартные методы молекулярной биологии, молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие домены V_H и/или V_L , преобразуют в полноразмерные гены антител путем сшивки (например, лигирования) молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей домены C_H и/или C_L . Последовательности нуклеиновой кислоты константных доменов тяжелой и легкой цепи иммуноглобулиновых генов известны в данной области. См., например, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., NIH Publ. № 91-3242, 1991. Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие полноразмерные тяжелую и/или легкую цепи, можно затем экспрессировать во встроенной клетке и выделить антитело к CD40.

Молекулы нуклеиновой кислоты можно использовать для рекомбинантной экспрессии больших количеств антител к CD40. Ниже описано, как данные молекулы нуклеиновой кислоты можно использовать для получения химерных антител, биспецифических антител, одноцепочечных антител, иммуноадгезинов, диателец, мутировавших антител и производных антител. Если данные молекулы нуклеиновой кислоты получены не из человека, а из нетрансгенного животного, то эти молекулы нуклеиновой кислоты можно использовать для гуманизации антитела, что также описано ниже.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения молекулу нуклеиновой кислоты согласно изобретению используют в качестве зонда или ПЦР-праймера для специфичной антителной последовательности. Например, нуклеиновую кислоту можно использовать в качестве зонда в диагностических способах или в качестве ПЦР-праймера для амплификации участков ДНК, которые можно было бы использовать, в частности, для выделения дополнительных молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих вариабельные домены антител к CD40. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения молекулы нуклеиновой кислоты представляют собой олигонуклеотиды. В других вариантах осуществления настоящего изобретения олигонуклеотиды происходят из высоковариабельных участков тяжелой и легкой цепей представляющего интерес антитела. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения олигонуклеотиды кодируют полностью или частично один или несколько CDR антитела 3.1.1, 3.1.1H-A78T, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A, 3.1.1L-L4M-L83V, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1H-D16E, 23.28.1L-C92A, 23.29.1 или 24.2.1.

Векторы.

В настоящем изобретении созданы векторы, включающие в себя молекулы нуклеиновой кислоты, которые кодируют тяжелую цепь антитела к CD40 согласно изобретению или его антигенсвязывающую часть. В настоящем изобретении созданы также векторы, включающие в себя молекулы нуклеиновой кислоты, которые кодируют легкую цепь таких антител или их антигенсвязывающую часть. Кроме того, в настоящем изобретении созданы векторы, включающие в себя молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие сливные белки, модифицированные антитела, антителные фрагменты и их зонды.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитела к CD40 или антигенсвязывающие части согласно изобретению экспрессируются путем встраивания ДНК, кодирующих неполные или полноразмерные легкую и тяжелую цепи, полученные, как описано выше, в экспрессирующие векторы, так, чтобы эти гены оказались присоединенными путем сшивки к требуемым экспрессионным контрольным последовательностям, таким как транскрипционные и трансляционные контрольные последовательности. Экспрессирующие векторы включают в себя плазмиды, ретровирусы, аденонассоциированные вирусы (AAV), растительные вирусы, такие как вирус мозаики цветной капусты, вирус табачной мозаики, космиды, YAC, производные EBV эпизомы и т.п. Ген антитела лигируют в вектор так, чтобы транскрипционная и трансляционная контрольные последовательности в векторе выполняли свою предполагаемую функцию регуляции транскрипции и трансляции антителного гена. Выбирают экспрессирующий вектор и экспрессионные контрольные последовательности, которые совместимы с используемой экспрессирующей хозяйской клеткой. Ген легкой цепи антитела и ген тяжелой цепи антитела можно встроить в разные векторы. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения оба гена встраивают в один и тот же экспрессирующий вектор. Антителные гены встраивают в экспрессирующий вектор с помощью стандартных способов (например, лигированием комплементарных сайтов рестрикции фрагмента антителного гена и вектора или лигированием по тупым концам, если сайты рестрикции не представлены).

Удобным вектором является вектор, который кодирует функционально полную, иммуноглобулиновую последовательность C_H или C_L человека с соответствующими сконструированными сайтами рестрикции, так, чтобы последовательности V_H или V_L можно было легко встроить и экспрессировать, как описано выше. В таких векторах сплайсинг обычно происходит между донорным сайтом сплайсинга, во встраиваемом J-участке, и акцепторным сайтом сплайсинга, предшествующим человеческому С-домену, а также на участках сплайсинга, которые находятся в C_H -экзонах человека. Полиаденилирование и терминация транскрипции происходят в нативных хромосомных сайтах правее от кодирующих областей. Рекомбинантный экспрессирующий вектор может также кодировать сигнальную последовательность, которая обеспечивает секрецию антителной цепи из хозяйской клетки. Ген антителной цепи можно клонировать в вектор так, чтобы сигнальный пептид оказывался присоединенным к аминоконцу иммуноглобулиновой цепи. Сигнальный пептид может представлять собой иммуноглобулиновый сигнальный пептид или гетерологичный сигнальный пептид (т.е. сигнальный пептид неиммуноглобулинового белка).

Помимо генов антителных цепей, рекомбинантные экспрессирующие векторы несут регуляторные

последовательности, которые контролируют экспрессию генов антителных цепей в хозяйской клетке. Специалистам в данной области следует иметь в виду, что создание экспрессионного вектора, включая выбор регуляторных последовательностей, может зависеть от таких факторов, как выбор клетки-хозяина, которая будет трансформирована, уровня экспрессии требуемого белка и т.д. Предпочтительные регуляторные последовательности экспрессии клетки-хозяина млекопитающего включают в себя вирусные элементы, которые контролируют высокие уровни белковой экспрессии в клетках млекопитающего, такие как промоторы и/или энхансеры, полученные из ретровирусных LTR, цитомегаловируса (CMV) (такой как CMV-промотор/энхансер), вируса 40 иммунодефицита обезьян (SV40) (такой как SV40-промотор/энхансер), аденоовируса (например, большой поздний промотор аденоовируса (AdMLP)), полиомы и сильные промоторы млекопитающего в виде иммуноглобулинового и актинового промоторов. Более полное описание вирусных регуляторных элементов и их последовательностей см., например, в патентах США № 5168062, 4510245 и 4968615. Способы экспрессии антител у растений, включая описание промоторов и векторов, а также трансформация растений, известны в данной области. См., например, патент США № 6517529, включенный здесь путем ссылки. Способы экспрессии полипептидов в бактериальных клетках или клетках грибов, например, в дрожжевых клетках, также хорошо известны в данной области.

Помимо генов антителных цепей и регуляторных последовательностей, рекомбинантные экспрессионные векторы согласно изобретению могут нести дополнительные последовательности, такие, например, как последовательности, которые регулируют репликацию данного вектора в хозяйских клетках (например, ордигины репликации) и селективные маркерные гены. Селективный маркерный ген обеспечивает селекцию хозяйских клеток, в которые вектор встроен (см., например, патенты США № 4399216, 4634665 и 5179017). Например, типично селективный маркерный ген придает резистентность к лекарственным средствам, таким как G418, гигромицин или метотрексат, хозяйской клетке, в которую встроен данный вектор. Предпочтительные селективные маркерные гены включают в себя ген дигидрофолатредуктазы (DHFR) (для использования в dhfr-хозяйских клетках с селекцией/амплификацией по метотрексату), neo-ген (для G418-селекции), и ген глутаматсинглетазы.

Негибридомные хозяйственные клетки и способы рекомбинантного получения белка.

Молекулы нукleinовой кислоты, кодирующие антитела к CD и векторы, включающие эти молекулы нукleinовой кислоты, можно использовать для трансфекции хозяйских клеток соответствующего млекопитающего, растения, бактерии или дрожжевой клетки. Трансформацию можно осуществлять с помощью любого известного способа внедрения полинуклеотидов в хозяйскую клетку. Способы внедрения гетерологичных полинуклеотидов в клетки млекопитающих хорошо известны в данной области и включают в себя опосредованную декстраном трансфекцию, кальций-фосфатное осаждение, polybgen-опосредованную трансфекцию, слияние протопластов, электропорацию, инкапсулирование полинуклеотида(ов) в липосомы и прямую микроинъекцию ДНК в ядро. Кроме того, молекулы нукleinовой кислоты можно внедрить в клетки млекопитающего с помощью вирусных векторов. Способы трансформации клеток хорошо известны в данной области. См., например, патенты США № 4399216, 4912040, 4740461 и 4959455 (патенты, которые таким образом включены здесь путем ссылки). Способы трансформации растительных клеток хорошо известны в данной области, включая, например, опосредованную Agrobacterium трансформацию, трансформацию путем бомбардировки микрочастицами, прямую инъекцию, электропорацию и вирусную трансформацию.

Способы трансформации бактериальных и дрожжевых клеток хорошо известны в данной области.

Клеточные линии млекопитающих, доступные в качестве хозяйственных для экспрессии, хорошо известны в данной области и включают в себя многочисленные линии иммортализованных клеток, доступных из Американской коллекции типовых культур (ATCC). В частности, они включают в себя овариальные клетки китайского хомячка (CHO), NSO, SP2-клетки, клетки HeLa, клетки почки детеныша хомяка (BHK), клетки почки обезьяны (COS), клетки гепатоцеллюлярной карциномы (например, Нер G2), A549-клетки и ряд других клеточных линий. Особенность предпочтительными клеточными линиями являются клеточные линии, выбранные путем определения того, какие клеточные линии обладают высокими уровнями экспрессии. Другие клеточные линии, которые можно использовать, являются клеточными линиями насекомых, например, такие как Sf9-клетки. Когда рекомбинантные экспрессионные векторы, кодирующие антителные гены, внедряют в хозяйственные клетки млекопитающего, соответствующие антитела продуцируются путем культивирования хозяйственных клеток в течение периода времени, достаточного для осуществления экспрессии данного антитела в этих хозяйственных клетках или, более предпочтительно, путем секреции антитела в культуральную среду, в которой выращивают хозяйственные клетки. Антитела можно извлечь из культуральной среды с использованием стандартных способов выделения белка путем очистки. Растительные хозяйственные клетки включают в себя, например, Nicotiana, Arabidopsis, рис, кукурузу, пшеницу, картофель и др. Бактериальные хозяйственные клетки включают в себя E. coli и виды Streptomyces. Дрожжевые клетки включают в себя Schizosaccharomyces pombe, Saccharomyces cerevisiae и Pichia pastoris.

Далее, экспрессию антител согласно изобретению (или другие их составляющие) в продуцирующих клеточных линиях можно усилить с использованием ряда известных методов. Например, экспрессион-

щая система глутаминсинтетазного гена (GS-система) представляет собой обычное решение усиления экспрессии в определенных условиях. GS-система рассматривается целиком или частично в связи с Европейскими патентами № 0216846, 0256055 и 0323997 и Европейской патентной заявкой № 89303964.4.

Возможно, что антитела, экспрессируемые разными клеточными линиями или в трансгенных животных, будут обладать отличающимся друг от друга гликозилированием. Однако все антитела, кодируемые созданными здесь молекулами нуклеиновой кислоты или содержащие представленные здесь аминокислотные последовательности, являются частью настоящего изобретения, независимо от гликозилирования антител.

Трансгенные животные и растения.

Антитела к CD40 согласно изобретению можно получить трансгенно путем создания млекопитающего или растения, которое является трансгенным в отношении представляющих интерес иммуноглобулиновых последовательностей тяжелой и легкой цепей и многократного получения из них антитела. В связи с трансгенной продукцией у млекопитающих, антитела к CD40 можно получить и извлечь из молока коз, коров или иных млекопитающих. См., например, патенты США № 5827690, 5756687, 5750172 и 5741957. В других вариантах осуществления настоящего изобретения не принадлежащих человеческому роду трансгенных животных, которые содержат иммуноглобулиновые локусы человека, иммунизируют CD40 или его иммуногенной частью, как описано выше. Способы создания антител у растений описаны, например, в патентах США № 6046037 и 5959177.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения не принадлежащие человеческому роду трансгенные животные или растения получают путем внедрения в данное животное или растение с помощью стандартных трансгенных методик одной или нескольких молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих антитело к CD40 согласно изобретению. См. Hogan и патент США № 6417429 выше. Трансгенные клетки, используемые для создания трансгенного животного, могут представлять собой эмбриональные стволовые клетки или соматические клетки. Трансгенные, не принадлежащие человеческому роду, животные могут представлять собой химерные, нехимерные гетерозиготы и нехимерные гомозиготы. См., например, Hogan et al., *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual* 2ed., Cold Spring Harbor Press (1999); Jackson et al., *Mouse Genetics and Transgenics: A Practical Approach*, Oxford University Press (2000); и Pinkert, *Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook*, Academic Press (1999). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения не принадлежащие человеческому роду трансгенные животные имеют направленный разрыв и замену в конструкции-мишени, которая кодирует представляющую интерес тяжелую цепь и/или легкую цепь. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения трансгенные животные содержат и экспрессируют молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие тяжелую и легкую цепи, специфически связывающие CD40, предпочтительно CD40 человека. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения трансгенные животные содержат молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие модифицированное антитело, такое как одноцепочечное антитело, химерное антитело или гуманизированное антитело. Антитела к CD40 можно создать в любом трансгенном животном. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения не принадлежащие человеческому роду животные представляют собой мышей, крыс, овец, свиней, коз, крупный рогатый скот или лошадей. Не принадлежащее человеческому роду трансгенное животное экспрессирует указанные кодируемые полипептиды в крови, молоке, моче, слюне, слезах, слизи и других организменных жидкостях.

Библиотеки фагового дисплея.

В настоящем изобретении разработан способ получения антитела к CD40 или его антигенсвязывающей части, включающий в себя стадии синтеза библиотеки антител человека в фаге, скрининга библиотеки для CD40 или его части, выделения фага, который связывает CD40, и получения антитела из данного фага. В примере осуществления один из способов получения библиотеки антител, основанный на использовании методики фагового дисплея, включает в себя определенные стадии иммунизации не принадлежащего человеческому роду животного, содержащего иммуноглобулиновые локусы человека для CD40 или его антигенной части, для создания иммунного ответа, извлечения антителопродуцирующих клеток из данного иммунизированного животного; стадии выделения РНК из извлеченных клеток, обратного транскрибирования РНК с образованием кДНК, амплификации кДНК с использованием праймера, встраивания кДНК в вектор фагового дисплея, так, чтобы антитела экспрессировались в фаге. Рекомбинантные антитела к CD40 согласно изобретению можно получитьенным путем.

Рекомбинантные антитела к CD40 согласно изобретению можно выделить путем скринирования рекомбинантной комбинаторной библиотеки антител. Предпочтительно данная библиотека представляет собой scFv-библиотеку фагового дисплея, образуемую с использованием V_L - и V_H -кДНК, получаемых из мРНК, выделяемой из В-клеток. Методы получения и скринирования таких библиотек известны в данной области. Существуют коммерчески доступные наборы для создания библиотек фагового дисплея (например, *Pharmacia Recombinant Phage Antibody System*, № по каталогу 27-9400-01; и *Stratagene SurfZAP™ phage display kit*, № по каталогу 240612). Существуют также и другие способы и реагенты, которые можно использовать для создания и скринирования антителных дисплейных библиотек (см., например, патент США № 5223409; публикации РСТ № WO 92/18619, WO 91/17271, WO 92/20791, WO 92/15679, WO

93/01288, WO 92/01047, WO 92/09690; Fuchs et al., Bio/Technology 9:1370-1372 (1991); Hay et al., Hum. Antibod. Hybridomas 3:81-85 (1992); Huse et al., Science 246:1275-1281 (1989); McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990); Griffiths et al., EMBO J. 12:725-734 (1993); Hawkins et al., J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992); Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991); Gram et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3576-3580 (1992); Garrad et al., Bio/Technology 9:1373-1377 (1991); Hoogenboom et al., Nuc. Acid Res. 19:4133-4137 (1991); и Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7978-7982 (1991)).

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения для выделения антител человека к CD40 с требуемыми характеристиками антитело человека к CD40, как описано здесь, впервые используют для отбора последовательностей тяжелой и легкой цепи, обладающих подобной связывающей активностью по отношению к CD40, применяя способы эпитопного импринтинга, описанные в публикации РСТ № WO 93/06213. Библиотеки антител, используемые в данном способе, предпочтительно представляют собой scFv-библиотеки, полученные и скринированные, как описано в публикации РСТ № WO 92/01047, McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990); и Griffiths et al., EMBO J. 12:725-734 (1993). Библиотеку антител scFv предпочтительно скринируют с использованием в качестве антигена CD40 человека.

После того как исходные домены V_L и V_H человека выбраны, осуществляют эксперименты "смешать и сопоставить", в которых различные пары исходно выбранных V_L - и V_H -сегментов скринируют в отношении CD40-связывания с выбранными предпочтительными V_L/V_H -парными сочетаниями. Кроме того, для последующего улучшения качества данного антитела, в сегментах V_L и V_H из предпочтительной пары (пар) V_L/V_H случайным образом вызывают мутации, предпочтительно в CDR3-участке V_H и/или V_L ; в процессе, аналогичном соматическому мутационному процессу *in vivo*, ответственному за созревание по сродству антител в течение естественного иммунного ответа. Созревание по сродству *in vitro* можно осуществить путем амплификации доменов V_H и V_L с использованием ПЦР-праймеров, комплементарных, соответственно, V_H CDR3 или V_L CDR3, в которой праймеры "скрепляют" с помощью случайной смеси из четырех нуклеотидных оснований в определенных положениях, так, что результирующие ПЦР-продукты кодируют сегменты V_H и V_L , в которые были интродуцированы случайные мутации по V_H и/или V_L CDR3-участков. Эти случайным образом мутировавшие сегменты V_H и V_L можно скринировать повторно в отношении связывания с CD40.

После скринирования и выделения из рекомбинантной дисплейной библиотеки иммуноглобулина к CD40 согласно изобретению нуклеиновые кислоты, кодирующие отобранное антитело, можно извлечь из дисплейного пакета (например, из фагового генома) и субклонировать в другие экспрессирующие векторы с помощью стандартных методов рекомбинантной ДНК. При необходимости, извлеченную нуклеиновую кислоту в последующем можно использовать для создания других форм антител согласно изобретению, как описано ниже. Чтобы экспрессировать рекомбинантное антитело человека, выделенное путем скринирования комбинаторной библиотеки, ДНК, кодирующую антитело, клонируют в рекомбинантный экспрессирующий вектор и внедряют в хозяйские клетки млекопитающего, как описано выше.

Переключение класса.

Другая цель настоящего изобретения заключается в разработке способа преобразования данного класса или подкласса антитела к CD40 в другой класс или подкласс. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая V_L или V_H , которая не включает какие-либо последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие C_L или C_H , выделяют с использованием способов, хорошо известных в данной области. Затем молекулу нуклеиновой кислоты присоединяют путем сшивки к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей C_L или C_H требуемого класса или подкласса иммуноглобулинов. Это можно осуществить с использованием вектора или молекулы нуклеиновой кислоты, которая содержит C_L - или C_H -цепь, как описано выше. Например, антитело к CD40, которое изначально представляет собой IgM, можно переключить (переделать) в класс IgG. Далее, класс переключения можно использовать для преобразования одного IgG-подкласса в другой, например, из IgG1 в IgG2. Другой способ получения антитела согласно изобретению, содержащего требуемый изотип, включает в себя стадии выделения нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь антитела к CD40, и нуклеиновой кислоты, кодирующей легкую цепь антитела к CD40, выделение последовательности, кодирующей V_H -участок, лигирование данной V_H -последовательности с последовательностью, кодирующей константный домен тяжелой цепи требуемого изотипа, экспрессию гена легкой цепи и конструирование тяжелой цепи в клетке, и сборку антитела к CD40 с требуемым изотипом.

Деиммунизированные антитела.

Другой путь получения антител со сниженной иммуногенностью заключается в деиммунизации антител. В другом аспекте настоящего изобретения данное антитело можно деиммунизировать с использованием методов, описанных, например, в публикациях РСТ № WO 98/52976 и WO 00/34317 (которые включены здесь путем ссылки в их полноте).

Мутантные антитела.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения молекулы нуклеиновой кислоты, векторы и хозяйские клетки можно использовать для создания мутантных антител против CD40. Антитела можно изменить с помощью мутаций по вариабельным доменам тяжелой и/или легкой цепей, например,

изменить характеристику связывания антитела. Например, мутацию можно осуществить по одному или нескольким CDR-участкам для увеличения или уменьшения K_D данного антитела к CD40, для увеличения или уменьшения K_{off} или для изменения специфичности связывания антитела. Методы сайт-направленного мутагенеза хорошо известны в данной области. См., например, Sambrook et al. и Ausubel et al. выше. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения мутации осуществляют по аминокислотному остатку, так, чтобы он был измененным по сравнению с остатком в вариабельном домене антитела против CD40 у клеток зародышевой линии. В другом варианте осуществления настоящего изобретения одну или несколько мутаций осуществляют по аминокислотному остатку, который известным образом изменен по сравнению с остатком из клеток зародышевой линии на CDR-участке или в области рамки считывания вариабельного домена, или в константном домене моноклонального антитела 3.1.1, 3.1.1H-A78T, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A, 3.1.1L-L4M-L83V, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1H-D16E, 23.28.1L-C92A, 23.29.1, 23.29.1L-R174K и 24.2.1. В другом варианте осуществления настоящего изобретения одну или несколько мутаций осуществляют по аминокислотному остатку, который известным образом изменен по сравнению с остатком из клеток зародышевой линии на CDR-участке или в области рамки считывания вариабельного домена аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 4, 12, 20, 28, 36, 44, 52, 60, 68, 76, 84, 94, 100, 102, 2, 10, 18, 26, 34, 42, 50, 58, 66, 74, 82, 90, 92, 96, 98, 100 или 102, или последовательности нуклеиновой кислоты, которая представлена в SEQ ID NO: 3, 11, 19, 27, 35, 43, 51, 59, 67, 75, 83, 93, 99, 101, 1, 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57, 65, 73, 81, 89, 91, 95, 97, 99 и 101.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения область рамки считывания видоизменяют таким образом, чтобы полученный участок (участки) обладал аминокислотной последовательностью соответствующего гена клеток зародышевой линии. Мутацию можно осуществить в области рамки считывания или константного домена для увеличения времени полужизни антитела к CD40. См., например, публикацию РСТ № WO 00/09560, включенную здесь путем ссылки. Мутацию в области рамки считывания или константного домена можно также осуществить для изменения иммуногенности антитела, для создания сайта ковалентного или нековалентного связывания с другой молекулой или для изменения таких характеристик, как фиксация комплемента, FcR-связывание и ADCC. В соответствии с настоящим изобретением одиночное антитело может обладать мутациями в любом одном или нескольких участках рамки считывания, в константном домене и в вариабельных областях.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения существует от 1 до 18 аминокислотных мутаций в любом из V_H - или V_L -доменов мутантного антитела к CD40 (в том числе любое число мутаций между ними) по сравнению с антителом против CD40 до мутирования. В любой из вышеуказанных ситуаций данные мутации могут происходить в одном или в нескольких CDR-участках. Далее, любая мутация может быть представлена консервативными аминокислотными заменами. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения существует не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотных замен в константных доменах.

Модифицированные антитела.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения слитое антитело или иммуноадгезин можно осуществить так, чтобы оно включало антитело к CD40 согласно изобретению, целиком или частично, присоединенное к другому полипептиду. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения только вариабельные домены антитела к CD40 соединены с другим полипептидом. В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения V_H -домен антитела к CD40 присоединен к первому полипептиду, а V_L -домен антитела к CD40 присоединен ко второму полипептиду, который связан с первым полипептидом таким образом, что домены V_H и V_L могут взаимодействовать друг с другом с образованием сайта связывания антитела. В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения V_H -домен отделен от V_L -домена линкером таким образом, что домены V_H и V_L могут взаимодействовать друг с другом (см. ниже в разделе "Одноцепочечные Антитела"). В последующем V_H -линкер присоединяется к представляющему интерес полипептиду. Такое слияние антитела полезно для направленного перехода полипептида в клетку или ткань, экспрессирующие CD40. Полипептид может представлять собой терапевтический агент, такой как токсин, фактор роста или иной регуляторный белок, или может представлять собой диагностический агент, такой как фермент, который можно легко визуализировать, такой как пероксидаза хрина. Кроме того, можно создать слитые антитела, в которых соединены друг с другом два (или более) одноцепочечных антитела. Это удобно, когда хотят создать бивалентное или поливалентное антитело в одной полипептидной цепи или когда хотят создать антитело с двойной спецификой.

Для создания одноцепочечного антитела (scFv) фрагменты V_H - и V_L -кодирующей ДНК присоединяют путем сшивки к другому фрагменту, кодирующему гибкий линкер, например, кодирующему данную аминокислотную последовательность (Gly₄-Ser)₃, так, чтобы последовательности V_H и V_L могли экспрессироваться в виде соответствующего смежного одноцепочечного белка, содержащего объединенные гибким линкером V_L - и V_H -домены. См., например, Bird et al., Science 242:423-426 (1988); Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988); McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990). Одноцепочечное антитело может быть одновалентным, если используются только единичные V_H и V_L , может быть

бивалентным, если используются два V_H и V_L , или поливалентным, если используется более двух V_H и V_L . Можно создать биспецифические или поливалентные антитела, которые специфически связываются с CD40 и с другой молекулой.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения могут быть получены другие модифицированные антитела с использованием молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих антитело к CD40. Например, "Каппа-тельца" (III et al., Protein Eng. 10:949-57 (1997)), "Минительца" (Martin et al., EMBO J. 13:5303-9 (1994)), "Диательца" (Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)), или "Janusins" (Traunecker et al., EMBO J. 10:3655-3659 (1991) и Traunecker et al., Int. J. Cancer (Suppl.) 7:51-52 (1992)) можно получить с использованием стандартных методов молекулярной биологии, следуя указаниям соответствующих описаний.

Биспецифические антитела или антигенсвязывающие фрагменты можно получить разнообразными способами, в том числе слиянием гибридом или соединением Fab'-фрагментов. См., например, Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990), Kostelnik et al., J. Immunol. 148:1547-1553 (1992). Кроме того, биспецифические антитела можно образовать в виде "диателец" или "Janusins". В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения биспецифические антитела связывают два разных эпитопа CD40. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения биспецифическое антитело обладает первой тяжелой цепью и первой легкой цепью моноклонального антитела 3.1.1, 3.1.1H-A78T, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A, 3.1.1L-L4M-L83V, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1H-D16E, 23.28.1L-C92A, 23.29.1, 23.29.1L-R174K и 24.2.1, и дополнительной тяжелой цепью и легкой цепью антитела. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения дополнительная легкая цепь и тяжелая цепь также представлены цепями одного из вышеуказанных моноклональных антител, но отличаются от указанной первой тяжелой и легкой цепей.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вышеописанные модифицированные антитела получают с использованием одного или нескольких вариабельных доменов или CDR-участков созданного здесь моноклонального антитела человека к CD40, из аминокислотной последовательности указанного моноклонального антитела или из тяжелой цепи или легкой цепи, кодируемой последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей указанное моноклональное антитело.

Антитела преобразованные и мечены.

Антитело к CD40 или его антигенсвязывающую часть согласно изобретению можно преобразовать или соединить с другой молекулой (например, другого пептида или белка). Вообще данное антитело или его часть преобразуют так, чтобы связывание CD40 не оказывало отрицательного влияния на преобразование или мечение. В соответствии с этим антитела или части антител согласно изобретению распространяются как на интактные, так и на модифицированные формы описанных здесь антител человека против CD40. Например, антитело или часть антитела согласно изобретению можно функционально соединить (путем химического присоединения, генетического слияния, нековалентного связывания или иначе) с одним или несколькими другими молекулярными элементами, такими как другое антитело (например, биспецифическое антитело или диательце), детектирующий агент, цитотоксический агент, фармацевтический агент и/или белок или пептид, которые могут опосредовать связь антитела или его части с другой молекулой (такой как коровая область стрептавидина или полигистидиновая метка).

Один из типов преобразованного антитела получают путем перекрестного связывания двух или нескольких антител (одного и того же типа или разных типов, например, для создания биспецифических антител). Соответствующие перекрестные линкеры включают в себя линкеры, которые являются гетеробифункциональными, обладающими двумя разными реакционными группами, разделенными подходящим спейсером (например, сложный эфир мета-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинида) или гомобифункциональными (например, дисукцинидилсуберат). Такие линкеры доступны от Pierce Chemical Company, Rockford, Ill.

Другой тип преобразованного антитела представляет собой меченоное антитело. Пригодные детектирующие агенты, с помощью которых антитело или антигенсвязывающую часть согласно изобретению можно преобразовать, включают в себя флуоресцентные соединения, в том числе флуоресцеин, флуоресцеинизотиоцианат, родамин, 5-диметиламин-1-нафтилинсульфонилхлорид, фикоэретрин, лантаноидные фосфаты и т.п. Антитело можно также пометить с помощью ферментов, которые используются для детекции, таких как пероксидаза хрена, β -галактозидаза, люцифераза, щелочная фосфатаза, глюкооксидаза и тому подобное. Если антитело метят с помощью детектируемого фермента, то его выявляют при добавлении дополнительных реагентов, чтобы использовать фермент для получения продукта реакции, который можно визуально распознать. Например, если агент представляет собой пероксидазу хрена, то добавление пероксида водорода и диаминобензидина дает цветной продукт реакции, который и детектируется. Антитело можно также метить биотином и детектировать путем непрямого измерения ацидино-вого или стрептавидинового связывания. Антитело можно также метить с помощью эпитопа заранее установленного полипептида, узнаваемого вторичным репортером (например, парными последовательностями лейциновой застежки, сайтами связывания вторичных антител, металло связывающими доменами, эпитопными метками). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения метки присоединяют с помощью "ножек" разной длины, чтобы уменьшить возможное пространственное затруднение.

Антитело к CD40 можно также метить аминокислотой с радиоактивной меткой. Радиоактивная метка может использоваться для диагностических и терапевтических целей. Например, радиоактивная метка может использоваться для детекции опухолей, экспрессирующих CD40, методами рентгенодиагностики или иными методами диагностики. Далее, радиоактивная метка может использоваться терапевтически в виде токсина для раковых клеток или опухолей. Примеры меток для полипептидов включают в себя, не ограничиваясь ими, следующие радиоизотопы или радионуклиды - ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I .

Антитело против CD40 можно также преобразовать с помощью химической группы, такой как полиэтиленгликоловая (PEG), метиловая или этиловая группа или с помощью углеводной группы.

Данные группы используют для улучшения биологических характеристик антитела, например, для увеличения времени полужизни сыворотки или для повышения тканевого связывания.

Фармацевтические композиции и наборы.

Настоящее изобретение относится также к композициям, содержащим агонист антитела против CD40 для лечения пациентов, нуждающихся в иммунной стимуляции. Такие композиции используют для лечения, предупреждения, снижения частоты или тяжести инфицированности, включая вирусную и бактериальную инфицированность, для лечения гиперпролиферативного нарушения, включая злокачественное и предраковое состояния, для лечения генетических иммунодефицитных состояний у животных, в том числе и у людей, таких как синдром гиперсекреции IgM и для лечения первичных или комбинированных иммунодефицитных состояний, включая состояния, характеризующиеся нейтропенией. Пациенты, подвергающиеся лечению с помощью терапии агонистом антитела против CD40, включают пациента, нуждающегося в усилении иммунитета, включают, не ограничиваясь ими, людей пожилого возраста и индивидов, у которых иммунитет подавлен, например из-за химиотерапии.

Гиперпролиферативные нарушения, которые можно подвергнуть лечению с помощью агониста антитела против CD40 согласно изобретению, могут затрагивать любую ткань или орган и включают в себя, не ограничиваясь этим, злокачественные опухоли головного мозга, легких, сквамозных клеток, мочевого пузыря, желудка, поджелудочной железы, молочной железы, головы, шеи, печени, почки, яичника, предстательной железы, прямой кишki, пищевода, гинекологические, носоглотки, или злокачественные опухоли щитовидной железы, меланомы, лимфомы, лейкозные или множественные миеломы. В частности, агонисты антител человека против CD40 согласно изобретению пригодны для лечения карцином молочной железы, предстательной железы, ободочной кишки и легкого.

Лечение может включать в себя введение одного или нескольких агонистов моноклональных антител против CD40 согласно изобретению или их антигенсвязывающих фрагментов, отдельно или вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Используемый здесь "фармацевтически приемлемый носитель" означает любой или все растворители, диспергирующие среды, сенсибилизаторы, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и задерживающие адсорбцию агенты и им подобные, которые физиологически совместимы. Некоторые примеры фармацевтически приемлемых носителей представляют собой воду, физиологический раствор, фосфатно-солевой буферный раствор, декстрозу, глицерин, этанол и им подобные, а также их сочетания. Во многих случаях в данную композицию предпочтительно включать изотонические растворы, например, сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит, либо хлорид натрия. Дополнительные примеры фармацевтически совместимых веществ представляют собой увлажняющие агенты, или миорные количества вспомогательных веществ, таких как увлажняющие или эмульгирующие агенты, консерванты или буферы, которые повышают срок годности при хранении или эффективность данного антитела.

Агонисты антител против CD40 согласно изобретению и композицию, включающие их, можно вводить в сочетании с одним или несколькими другими терапевтическими, диагностическими или профилактическими агентами. Дополнительные терапевтические агенты включают в себя другие антибластомные, противораковые, антиangiогенные или химиотерапевтические агенты. Такие дополнительные агенты могут быть включены в одну композицию или могут быть введены раздельно. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения один или несколько агонистов антител против CD40 согласно изобретению могут использоваться в качестве вакцины или в качестве адьювантов к вакцине.

Композиции согласно изобретению могут быть разнообразными по форме, например, жидкими, полужидкими и твердыми дозированными формами, такими как жидкие растворы (например, инъецируемые и инфузионные растворы), дисперсии или супспензии, таблетки, пилюли, порошки, липосомы или свечи. Предпочтительная форма зависит от предполагаемого режима введения и терапевтического применения. Типичные предпочтительные композиции представлены в форме инъецируемых или инфузионных растворов, таких как композиции, аналогичные композициям для пассивной иммунизации человека. Предпочтительным режимом введения является парентеральный (например, внутривенный, подкожный, внутрибрюшинный, внутримышечный). В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения данное антитело вводят путем внутривенного вливания или внутривенной инъекции. В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения данное антитело вводят путем внутримышечной или подкожной инъекции.

Как правило, терапевтические композиции должны быть стерильными и стабильными в условиях

изготовления и хранения. Данную композицию можно создать в виде раствора, микроэмulsionи, дисперсии, липосомы или иной упорядоченной структуры, пригодной для высококонцентрированного лекарственного средства. Стерильные инъецируемые растворы можно получить путем включения антител к CD40 в требуемом количестве в соответствующий растворитель с одним или, при необходимости, с сочетанием вышеперечисленных ингредиентов с последующей стерилизацией фильтрованием. В основном, дисперсии готовят путем включения данного активного соединения в стерильный наполнитель, который содержит щелочную дисперсионную среду и требуемые другие ингредиенты из вышеперечисленных ингредиентов. Что касается стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов, предпочтительные способы их получения представлены вакуумной сушкой и замораживанием-оттаиванием, что дает не только активный порошкообразный ингредиент, но и любой необходимый дополнительный ингредиент из его ранее стерилизованного фильтрованием раствора. Надлежащую текучесть раствора можно сохранить, например, путем нанесения слоя, такого как лецитин, путем поддержания размера частиц, что касается дисперсии, и путем использования поверхностно-активных соединений. Поглощение инъцированных композиций можно пролонгировать путем включения в данную композицию агента, задерживающего поглощение, например, солей моностеарата и желатины.

Антитела настоящего изобретения можно вводить разнообразными способами, известными в данной области, хотя для многих терапевтических применений предпочтительным путем/способом введения является подкожное, внутримышечное или внутривенное вливание. Квалифицированным младшим специалистам следует иметь в виду, что путь и/или способ введения варьирует в зависимости от желаемых результатов.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, композиции антител активного соединения можно приготовить с носителем, который защищает данное антитело от быстрого высвобождения, таким носителем, который контролирует высвобождение композиции, в том числе, имплантаты, чрескожные пэты, и микроинкапсулируемые системы доставки. Можно использовать рассасывающиеся, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевую кислоту, коллаген, эфиры жирных ортоциклот и многоатомных спиртов, и полимолочную кислоту. Многие способы получения таких композиций запатентованы и, как правило, известны специалистам в данной области. См., например, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems* (Продолжительное и контролируемое высвобождение систем доставки лекарственных средств) (J.R.Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело против CD40 согласно изобретению можно вводить перорально, например, вместе с инертным разбавителем или усвояемым пищевым носителем. Данное соединение (и, при необходимости, другие ингредиенты) можно также заключить в капсулу из твердой или мягкой желатиновой оболочки, запрессовать в таблетки, или включить непосредственно в диету пациента. Для перорального терапевтического введения антитело к CD40 можно включить вместе с наполнителями и использовать в форме проглатываемых таблеток, защечных таблеток, пастилок, капсул, эликсиров, суспензий, сиропов, облаток и тому подобное. Для введения соединения настоящего изобретения непарентеральным путем введения может возникнуть потребность покрыть данное соединение или ввести данное соединение совместно с веществом, защищающим его от инактивации.

В данные композиции можно также включить дополнительные активные соединения. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело к CD40 настоящего изобретения составляют совместно и/или вводят совместно с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами. Данные агенты включают, без ограничения, антитела, которые связывают другие мишени (например, антитела, такие как антитела к CTL4, которые связывают один или несколько ростовых факторов или цитокинов с их рецепторами на клеточной поверхности), антиblastомные средства, противоопухолевые агенты, химиотерапевтические агенты, пептидные аналоги, которые активируют CD40, растворимый CD40L, один или несколько химических агентов, которые активируют CD40, и/или иные агенты, известные в данной области, которые усиливают иммунный ответ против клеток злокачественной опухоли, например, IFN- β 1, IL-2, IL-8, IL-12, IL-15, IL-18, IL-23, IFN- γ и GM-CSF. При таком комбинированном лечении могут понадобиться более низкие дозы антитела к CD40, а также совместно вводимых агентов, с тем, чтобы исключить возможные токсикозы или осложнения, связанные с той или иной монотерапией.

Агонисты антитела против CD40 согласно изобретению и композиции, включающие их, также можно вводить в сочетании с другими лечебными режимами, в частности, в сочетании с радиационным лечением.

Композиции согласно изобретению могут включать в себя "терапевтически эффективное количество" или "профилактически эффективное количество" антитела или его антигенсвязывающей части согласно изобретению. "Терапевтически эффективное количество" относится к эффективному количеству для достижения требуемого терапевтического результата в необходимых дозах и в течение необходимых интервалов времени. Терапевтически эффективное количество данного антитела или части антитела может изменяться в соответствии с такими факторами, как состояние больного, возраст, пол и масса тела

данного пациента, а также способности антитела или части антитела вызывать требуемый ответ у пациента. Терапевтически эффективное количество представляет собой также количество, при котором токсичный или приносящий ущерб эффект данного антитела или части антитела перевешивается терапевтически положительными последствиями. "Профилактически эффективное количество" относится к эффективному количеству для достижения требуемого профилактического результата в необходимых дозах и в течение необходимых интервалов времени. Как правило, поскольку профилактическую дозу используют у пациентов перед заболеванием или на ранней стадии заболевания, это профилактически эффективное количество должно быть меньше терапевтически эффективного количества.

Режим дозировки можно установить для создания оптимального нужного ответа (например, терапевтического или профилактического ответа). Например, можно ввести единственный болюс, можно вводить разделенные общие дозы длительное время, или же данную дозу можно пропорционально снижать или повышать, в зависимости от складывающейся терапевтической ситуации. Особенно полезно составлять парентеральные композиции в стандартной дозированной форме для удобства введения и единобразия дозировки. Используемая здесь стандартная дозированная форма относится к физическим дискретным единицам, пригодным в качестве унифицированных доз для лечения представителей млекопитающих; каждую единицу, содержащую заранее установленное количество активного соединения совместно с требуемым терапевтическим носителем, рассчитывают для получения требуемого терапевтического эффекта. Инструкция для стандартных дозированных лекарственных форм настоящего изобретения продиктована и прямо зависит от (a) уникальных характеристик антитела к CD40 или его части и от достижения конкретного терапевтического или профилактического эффекта, и (b) присущих в данной области ограничений рецептуры такого антитела для лечения восприимчивых к нему пациентов.

Не ограничивающий диапазон для терапевтически или профилактически эффективного количества антитела или части антитела настоящего изобретения составляет, примерно, 0,025-50 мг/кг, более предпочтительно 0,1-50 мг/кг, еще более предпочтительно 0,1-25, 0,1-10 или 0,1-3 мг/кг. Следует отметить, что величины доз могут изменяться от вида и тяжести состояния, которое пытаются облегчить. Кроме того, следует иметь в виду, что в отношении любого конкретного пациента необходимо длительное время осуществлять индивидуальный режим дозирования в соответствии с потребностью в нем, а также в соответствии с профессиональным усмотрением специалиста, вводящего или контролирующего введение данных композиций, и что изложенные здесь диапазоны дозирования являются лишь иллюстративными и не предназначены для ограничения объема или применения заявленной композиции.

Другая цель настоящего изобретения заключается в создании наборов, содержащих антитело к CD40 или часть антитела согласно изобретению, или композицию, содержащую такое антитело. Набор может включать, кроме данного антитела или композиции, диагностические или терапевтические агенты. Набор может также содержать инструкции для использования диагностического или терапевтического способа. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения набор включает в себя антитело или композицию, включающую их, и диагностический агент, который можно использовать в описанном ниже способе. В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, набор включает в себя антитело или композицию, включающую его, и один или несколько терапевтических агентов, которые можно использовать в описанном ниже способе.

Настоящее изобретение относится также к композициям для ингибиования у млекопитающего роста аномальной клетки, включающих в себя любое количество любого антитела согласно изобретению в сочетании с любым количеством химиотерапевтического агента, в которых определенные количества соединения, соли, сольваты или пролекарства и химиотерапевтического агента совместно являются эффективными для ингибиования роста аномальной клетки. В настоящее время в данной области известно множество химиотерапевтических агентов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения химиотерапевтический агент выбран из группы, состоящей из ингибиторов митоза, алкилирующих агентов, антиметаболитов, интеркалирующих антибиотиков, ингибиторов фактора роста, ингибиторов клеточного цикла, ферментов, ингибиторов топоизомеразы, модификаторов биологической реакции, антигормонов, например, антиандрогенов, и антиangiогенных агентов.

Антиangiогенные агенты, такие как ингибиторы MMP-2 (матриксная металлопротеиназа 2), ингибиторы MMP-9 (матриксная металлопротеиназа 9) и ингибиторы COX-II (циклооксигеназа II), могут использоваться в сочетании с антителом к CD40 согласно изобретению. Примеры используемых COX-II-ингибиторов включают в себя CELEBREX™ (алекоксис), валдекоксис и рофекоксис. Примеры используемых ингибиторов матриксных металлопротеиназ описаны в международной публикации WO 96/33172 (опубликованной 24 октября 1996 г.), WO 96/27583 (опубликованной 7 марта 1996 г.), в Европейской патентной заявке № 97304971.1 (поданной 8 июля 1997 г.), в Европейской патентной заявке № 99308617.2 (поданной 29 октября 1999 г.), в международной публикации WO 98/07697 (опубликованной 26 февраля 1998 г.), WO 98/03516 (опубликованной 29 января 1998 г.), WO 98/34918 (опубликованной 13 августа 1998 г.), WO 98/34915 (опубликованной 13 августа 1998 г.), WO 98/33768 (опубликованной 6 августа 1998 г.), WO 98/30566 (опубликованной 16 июля 1998 г.), в Европейской патентной публикации 606046 (опубликованной 13 июля 1994 г.), в Европейской патентной публикации 931788 (опубликованной 28 июля 1999 г.), WO 90/05719 (опубликованной 31 мая 1990 г.), WO 99/52910 (опубликован-

ной 21 октября 1999 г.), WO 99/52889 (опубликованной 21 октября 1999 г.), WO 99/29667 (опубликованной 17 июня 1999 г.), международной заявке PCT №PCT/1B98/01113 (поданной 21 июля 1998 г.), в Европейской патентной заявке № 99302232.1 (поданной 25 марта 1999 г.), в патентной заявке Великобритании за номером 9912961.1 (поданной 3 июня 1999 г.), в Предварительной Заявке США № 60/148464 (поданной 12 августа 1999 г.), патенте США № 5863949 (изданном 26 января 1999 г.), патенте США № 5861510 (опубликованном 19 января 1999 г.), и в Европейской патентной публикации 780386 (опубликованной 25 июня 1997 г.), которые все включены здесь в их полноте путем ссылки. Предпочтительные MMP-ингибиторы представляют собой ингибиторы, которые не вызывают артрита. Более предпочтительными являются ингибиторы, которые избирательно ингибируют MMP-2 и/или MMP-9, по сравнению с другими матриксными металлопротеиназами (т.е. MMP-1, MMP-3, MMP-4, MMP-5, MMP-6, MMP-7, MMP-8, MMP-10, MMP-11, MMP-12 и MMP-13). Некоторые конкретные примеры MMP-ингибиторов, используемых в настоящем изобретении, представляют собой AG-3340, R0 32-3555, RS 13-0830, а данные соединения повторно перечислены в нижеследующем списке:

3-[[4-(4-фторфенокси)бензолсульфонил]-1-гидроксикарбамоилцикlopентил]пропионовая кислота;

3-экзо-3-[4-(4-фторфенокси)бензолсульфониламино]-8-оксабицикло[3.2.1]октан-3-карбоновой кислоты гидроксиамид;

(2R, 3R) 1-[4-(2-хлор-4-фторбензилокси)бензолсульфонил]-3-гидрокси-3-метилпиперидин-2-карбоновой кислоты гидроксиамид;

4-[4-(4-фторфенокси)бензолсульфониламино]тетрагидропиран-4-карбоновой кислоты гидроксиамид;

3-[[4-(4-фторфенокси)бензолсульфонил]-1-гидроксикарбамоилцикlobутил]пропионовая кислота;

4-[4-(4-хлорфенокси)бензолсульфониламино]тетрагидропиран-4-карбоновой кислоты гидроксиамид;

(R) 3-[4-(4-(хлорфенокси))бензолсульфониламино]тетрагидропиран-3-карбоновой кислоты гидроксиамид;

(2R, 3R) 1-[4-(4-фторо-2-метилбензилокси)бензолсульфонил]-3-гидрокси-3-метилпиперидин-2-карбоновой кислоты гидроксиамид;

3-[[4-(4-фторфенокси)бензолсульфонил]-1-гидроксикарбамоил-1-метилэтил]пропионовая кислота;

3-[[4-(4-фторфенокси)бензолсульфонил]-4-гидроксикарбамоилтетрагидропиран-4-ил]пропионовая кислота;

3-экзо-3-[4-(4-хлорфенокси)бензолсульфониламино]-8-оксабицикло[3.2.1]октан-3-карбоновой кислоты гидроксиамид;

3-эндо-3-[4-(4-фторфенокси)бензолсульфониламино]-8-оксабицикло[3.2.1]октан-3-карбоновой кислоты гидроксиамид; и

(R) 3-[4-(4-фторфенокси)бензолсульфониламино]тетрагидрофуран-3-карбоновой кислоты гидроксиамид;

а также фармацевтически приемлемые соли и сольваты указанных соединений.

Соединение согласно изобретению можно также использовать совместно с ингибиторами трансдукции сигнала, такими как агенты, ингибирующие EGF-R (рецептор эпидермального фактора роста), такими как EGF-R-антитела, EGF-антитела, и молекулы, которые являются EGF-R-ингибиторами, VEGF-ингибиторами (фактора роста сосудистого эндотелия), такими как VEGF-рецепторы, и молекулы, которые могут ингибировать VEGF; и ингибиторами рецептора erbB2, такими как органические молекулы или антитела, которые связываются с рецептором erbB2, например, HERCEPTINTM (Genentech, Inc.). EGF-R-ингибиторы описаны, например, в WO 95/19970 (опубликованной 27 июля 1995 г.), WO 98/14451 (опубликованной 9 апреля 1998 г.), WO 98/02434 (опубликованной 22 января 1998 г.), и в патенте США № 5747498 (выпущенного 5 мая 1998 г.), и такие вещества могут использоваться в настоящем изобретении, которое описывается здесь. EGFR-ингибирующие агенты включают в себя, но не ограничиваясь этим, моноклональные антитела C225 и анти-EGFR 22МонАТ (ImClone Systems Incorporated), ABX-EGF (Abgenix/Cell Genesys), EMD-7200 (Merck KgaA), EMD-5590 (Merck KgaA), MDX-447/H-477 (Medarex Inc. and Merck KgaA), и соединения ZD-1834, ZD-1838 и ZD-1839 (AstraZeneca), PKI-166 (Novartis), PKI-166/CGP-75166 (Novartis), PTK 787 (Novartis), CP 701 (Cephalon), leflunomide (Pharmacia/Sugen), CI-1033 (Warner Lambert Parke Davis), CI-1033/PD 183805 (Warner Lambert Parke Davis), CL-387785 (Wyeth-Ayerst), BBR-1611 (Boehringer Mannheim GmbH/Roche), Naamidine A (Bristol Myers Squibb), RC-3940-II (Pharmacia), BIBX-1382 (Boehringer Ingelheim), OLX-103 (Merck & Co.), VRCTC-310 (Ventech Research), EGF-сливный токсин (Seragen Inc.), DAB-389 (Seragen/Lilgand), ZM-252808 (Imperial Cancer Research Fund), RG-50864 (INSERM), LFM-A12 (Parker Hughes Cancer Center), WHI-P97 (Parker Hughes Cancer Center), GW-282974 (Glaxo), KT-8391 (Kyowa Hakko) и EGF-R-вакцина (York Medical/Centro de Immunologia Molecular (CIM)). Эти и другие EGFR-ингибирующие агенты могут использоваться в настоящем изобретении.

VEGF-ингибиторы, например, SU-5416 и SU-6668 (Sugen Inc.), SH-268 (Schering) и NX-1838 (NeXstar) можно также сочетать с соединением согласно изобретению. VEGF-ингибиторы описаны, например, в WO 99/24440 (опубликованной 20 мая 1999 г.), международной заявке PCT PCT/IB99/00797 (поданной 3 мая 1999 г.), в WO 95/21613 (опубликованной 17 августа 1995 г.), WO 99/61422 (опубликованной 2 декабря 1999 г.), патенте США № 5834504 (опубликованном 10 ноября 1998 г.), WO 98/50356 (опубликованной 12 ноября 1998 г.), патенте США № 5883113 (опубликованном 16 марта 1999 г.), патенте США № 5886020 (опубликованном 23 марта 1999 г.), патенте США № 5792783 (опубликованном 11 августа 1998 г.), WO 99/10349 (опубликованной 4 марта 1999 г.), WO 97/32856 (опубликованной 12 сентября 1997 г.), WO 97/22596 (опубликованной 26 июня 1997 г.), WO 98/54093 (опубликованной 3 декабря 1998 г.), WO 98/02438 (опубликованной 22 января 1998 г.), WO 99/16755 (опубликованной 8 апреля 1999 г.), и WO 98/02437 (опубликованной 22 января 1998 г.), которые все включены здесь в их полноте путем ссылки. Другие примеры некоторых специфичных VEGF-ингибиторов, используемых в настоящем изобретении, представляют собой IM862 (Cytran Inc.); моноклональное антитело к VEGF от Genentech Inc.; и ангиозим, синтетический рибозим от Ribozyme and Chiron. Эти и другие VEGF-ингибиторы можно использовать в настоящем изобретении, как здесь описано. Ингибиторы рецептора ErbB2, такие как GW-282971 (Glaxo Wellcome plc), и моноклональные антитела AR-209 (Aronex Pharmaceuticals Inc.) и 2B-1 (Chiron), можно, кроме того, объединить с соединением настоящего изобретения, и которые, например, рассматриваются в WO 98/02434 (опубликованной 22 января 1998 г.), WO 99/35146 (опубликованной 15 июля 1999 г.), WO 99/35132 (опубликованной 15 июля 1999 г.), WO 98/02437 (опубликованной 22 января 1998 г.), WO 97/13760 (опубликованной 17 апреля 1997 г.), WO 95/19970 (опубликованной 27 июля 1995 г.), патенте США № 5587458 (опубликованном 24 декабря 1996 г.) и патенте США № 5877305 (опубликованном 2 марта 1999 г.), которые настоящим все включены здесь в их полноте путем ссылки. Ингибиторы рецептора ErbB2 описаны также в предварительной заявке США № 60/117341, поданной 27 января 1999 г., и в предварительной заявке США № 60/117346, поданной 27 января 1999 г., обе из которых включены здесь в их полноте путем ссылки. В соответствии с настоящим изобретением соединения, ингибирующие рецептор erbB2, и вещество, описанное в вышеупомянутых РСТ заявках, патентах США и предварительных заявках США, а также другие соединения и вещества, которые ингибируют рецептор erbB2, можно использовать совместно с соединением согласно изобретению.

Агенты, связанные с выживаемостью, включают в себя анти-IGF-IR-антитела и антиинтегриновые агенты, такие как антиинтегриновые антитела.

Применение диагностических способов.

Кроме того, в настоящем изобретении разработаны диагностические способы. Антитела к CD40 можно использовать для обнаружения CD40 в биологическом образце *in vitro* или *in vivo*. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения разработан способ диагностирования присутствия или местонахождения у пациента, нуждающегося в диагностировании, опухоли, экспрессирующей CD40, включающий в себя стадии инъектирования данного антитела данному пациенту, определения экспрессии у данного пациента CD40 путем локализации места обнаружения антитела, экспрессии у данного пациента с экспрессией у нормального контрольного индивида или с эталонной экспрессией, и диагностирования присутствия или местоположения опухоли.

Антитела к CD40 можно использовать в традиционном иммунологическом анализе, включая, без ограничения, ИФА, РИА, FACS, тканевую иммуногистохимию, Вестерн-блот или иммунопреципитацию. Антитела к CD40 согласно изобретению можно использовать для обнаружения CD40 у человека. В другом варианте осуществления настоящего изобретения антитела к CD40 можно использовать для обнаружения CD40 у обезьян Старого Света, таких как *сүномолгус* и *резус-макак*, *шимпанзе* и *человекообразных обезьян*. В настоящем изобретении разработан способ детекции CD40 в биологическом образце, включающий в себя контактирование биологического образца с антителом к CD40 согласно изобретению и детектирование связавшегося антитела. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело к CD40 непосредственно метят детектируемой меткой. В другом варианте осуществления настоящего изобретения антитело к CD40 (первое антитело) является немеченным, а второе антитело или другую молекулу, которая может связаться с анти-CD40-антителом, метят. Специалистам в данной области хорошо известно, что второе антитело выбирают таким образом, чтобы оно было способно специфически связывать конкретные виды и класс первого антитела. Например, если антитело к CD40 представляет собой IgG человека, то вторичное антитело может представлять собой антитело к IgG человека. Другие молекулы, которые могут связываться с антителами, включают в себя, без ограничения, белок A и белок G, оба из которых коммерчески доступны, например, от Pierce Chemical Co.

Подходящие метки для данного антитела или вторичного антитела раскрыты выше и включают в себя различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные вещества, люминесцентные вещества и радиоактивные вещества. Примеры подходящих ферментов включают в себя пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, β -галактозидазу или ацетилхолинэстеразу; примеры подходящих сложных простетических групп включают в себя стрептавидин/биотин и авидин/биотин; примеры подходящих флуоресцентных веществ включают умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеинизотиоцианат, родамин, дихлортиазиниламинофлуоресцеин, дансилхлорид или фикоэритрин; пример люминесцентного вещества вклю-

чает в себя люминол; а примеры подходящих радиоактивных веществ включают в себя ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S или ^{3}H .

В других вариантах осуществления настоящего изобретения присутствие CD40 в биологическом образце можно установить с помощью конкурентного иммуноанализа, использующего CD40-стандарты, помеченные детектируемым веществом, и немеченое антитело к CD40. В данном анализе биологический образец, меченный CD40-стандартами и антителом к CD40, объединяют и определяют количество меченого CD40-стандарта, связавшегося с данным немеченым антителом. Количество CD40 в данном биологическом образце обратно пропорционально количеству меченого CD40-стандарта, связавшегося с антителом к CD40.

Вышеописанный анализ можно использовать для ряда целей. Например, антитела к CD40 можно использовать для обнаружения CD40 в клетках культуры клеток. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антитела к CD40 используют, чтобы определить количество CD40 на поверхности клеток, которые обрабатывают различными соединениями. Данный способ можно применять при идентификации соединений, которые используют для активирования или ингибиции CD40. В соответствии с данным способом один образец клеток обрабатывают тест-соединением в течение какого-то периода времени, а другой образец оставляют необработанным. При измерении общего уровня CD40 эти клетки лизируют, и общий уровень CD40 измеряют с использованием одного из вышеописанных иммуноанализов. Для определения эффекта данного тест-соединения сравнивают общий уровень CD40 в обработанных и необработанных клетках.

Предпочтительным иммуноанализом для измерения общего уровня CD40 является ИФА или Вестерн-блот. При измерении уровня CD40 на поверхности клетки анализируемые клетки не лизируют и уровень CD40 на поверхности данных клеток измеряют с использованием одного из вышеописанных иммуноанализов. Предпочтительный иммуноанализ для определения уровня CD40 на поверхности клеток включает в себя стадии мечения белков на поверхности клетки с помощью детектируемой метки, такой как биотин или ^{125}I , иммунопреципитации CD40 с антителом к CD40 и последующего детектирования меченого CD40. Другой предпочтительный иммуноанализ для определения локализации уровня CD40, например, на клеточной поверхности, осуществляют с использованием иммуногистохимии. Способы, такие как ИФА, РИА, Вестерн-блоттинг, иммуногистохимические способы, способы мечения интегральных мембранных белков клеточной поверхности и иммунопреципитация, хорошо известны в данной области. См., например, Harlow and Lane, выше. Кроме того, перечисленные иммуноанализы можно масштабировать для высокопроизводительного скринирования с целью тестировать большое число соединений в отношении активации или ингибиции CD40.

Антитела к CD40 согласно изобретению можно также использовать для определения уровня CD40 в ткани или в клетках, полученных из данной ткани. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ткань представляет собой больную ткань. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ткань представляет собой опухоль или ее биоптат. В некоторых вариантах осуществления данного способа ткань или ее биоптат вырезают у пациента. Затем больную ткань или биоптат используют в иммуноанализе для определения, например, общего уровня CD40, уровня CD40 на поверхности клетки, или для локализации CD40 вышеописанными способами.

Вышеописанный диагностический способ можно использовать для определения того, экспрессирует ли опухоль высокие уровни CD40, что могло бы свидетельствовать о том, что опухоль представляет собой мишень для обработки антителами к CD40. Далее, этот же способ можно также использовать, чтобы проследить эффект лечения антителом к CD40, детектируя гибель клеток в опухоли. Этот диагностический способ можно также использовать, чтобы определить, экспрессирует ли ткань или клетка недостаточный уровень CD40 или активированного CD40 и, следовательно, является ли кандидатом для лечения активирующими антителами к CD40, CD40L и/или иными терапевтическими агентами в целях повышения уровня CD40 или его активности.

Антитела согласно изобретению можно также использовать *in vivo* для идентификации тканей и органов, которые экспрессируют CD40. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитела к CD40 используют для идентификации опухолей, экспрессирующих CD40. Одним из преимуществ использования антител человека к CD40 согласно изобретению заключается в том, что их можно, не опасаясь, использовать *in vivo*, не вызывая иммунную реакцию на данное антитело после его введения, в отличие от антител, производимых не человеческим организмом, или гуманизированных антител.

Данный способ включает в себя стадии введения детектируемых меченых антител к CD40 или композиции, включающей их, пациенту, нуждающемуся в таком диагностическом teste, и анализ изображения для определения у пациента местоположения тканей, экспрессирующих CD40. Анализ изображения хорошо известен в медицинской области и включает в себя, без ограничения перечисленным, рентгенографический анализ, магнитно-резонансную томографию (МРТ) или компьютерную томографию (СЕ). Данное антитело можно пометить с помощью любого агента, подходящего для *in vivo*-изображения, например, контрастного агента, такого как барий, который может использоваться в рентгенографическом анализе, или магнитного контрастного вещества, такого как хелат гадолиния, который можно использовать в МРТ или СЕ. Другие вещества-метки включают в себя, не ограничиваясь этим, радиоизотопы, та-

кие как ^{99}Tc . В другом варианте осуществления настоящего изобретения антитело к CD40 должно быть немеченным и должно визуализироваться после введения второго антитела или иной молекулы, которая детектируема и которая может связать данное антитело к CD40. В варианте осуществления настоящего изобретения биоптат получают от пациента, чтобы определить, экспрессирует ли представляющая интерес ткань CD40.

Применение терапевтических способов.

Кроме того, в настоящем изобретении разработаны терапевтические способы, использующие антитело против CD40 согласно изобретению.

Агонист антитела человека против CD40 согласно изобретению можно ввести человеку или млекопитающему, не принадлежащему человеческому роду, которые экспрессируют перекрестно реагирующий CD40. Данное антитело можно ввести такому не принадлежащему человеческому роду млекопитающему (т.е. примату, супомолгус или резус-макаке) с ветеринарными целями или же в качестве изучения его действия на животной модели заболевания человека. Такие модельные животные полезны для оценки терапевтической эффективности антител настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения данное антитело к CD40 вводят пациенту, который страдает от первичного и/или комбинированного иммунодефицитов, в том числе, CD40-зависимого иммунодефицита с синдромом гиперсекреции IgM, общего вариабельного иммунодефицита, агаммаглобулинемии Брутона (Bruton), дефицитов субкласса IgG и X-сцепленного SCID (общие мутации гамма-цепи). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело к CD40 вводят для лечения пациента, который иммуносупрессивен, например, из-за химиотерапии, или обладает иммунослабляющим заболеванием, в том числе, заболеванием приобретенного иммунодефицита, таким как ВИЧ. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело к CD40 вводят, чтобы повысить иммунитет пожилого пациента. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело к CD40 вводят для лечения пациента, который обладает бактериальной, вирусной, грибковой или паразитарной инфекцией. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения агонист антитела человека против CD40 согласно изобретению можно профилактически вводить пациенту, который, вследствие возраста, нездоровья или общего слабого здоровья подвержен инфицированию, чтобы предупредить или уменьшить число или тяжесть инфекций.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело к CD40 вводят пациенту, который обладает гиперпролиферативным нарушением.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело к CD40 вводят для лечения пациенту, который обладает опухолью. В других вариантах осуществления настоящего изобретения опухоль является CD40-позитивной. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения опухоль является CD40-негативной. Опухоль может представлять собой солидную или несолидную опухоль, такую как лимфома. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело к CD40 вводят пациенту, который обладает опухолью, являющейся раковой. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения данное антитело ингибитирует пролиферацию раковой клетки, подавляет или предотвращает увеличение массы опухоли или ее объема, и/или вызывает уменьшение массы опухоли или ее объема.

Пациенты, которых можно лечить с помощью антител к CD40 или участками антитела настоящего изобретения, включают, но не ограничиваются, пациентов, у которых диагностируют наличие злокачественной опухоли головного мозга, злокачественной опухоли легкого, злокачественной опухоли кости, злокачественной опухоли поджелудочной железы, рака кожи, злокачественной опухоли головы и шеи, меланомы кожи или внутрглазной меланомы, злокачественной опухоли матки, злокачественной опухоли яичника, злокачественной опухоли прямой кишки, злокачественной опухоли анальной области, злокачественной опухоли желудка, желудочной злокачественной опухоли, колоректальной злокачественной опухоли, злокачественной опухоли ободочной кишки, злокачественной опухоли молочной железы, гинекологической злокачественной опухоли (например, маточные саркомы, карцинома фаллопиевой трубы, карцинома эндометрия, карцинома шейки матки, карцинома влагалища или карцинома вульвы), злокачественной опухоли пищевода, злокачественной опухоли тонкого кишечника, злокачественной опухоли эндокринной системы (например, злокачественная опухоль щитовидной, парашитовидной или надпочечной железы), сарком мягких тканей, лейкоза, миеломы, множественной миеломы, злокачественной опухоли уретры, злокачественной опухоли пениса, злокачественной опухоли предстательной железы, хронического или острого лейкоза, детских злокачественных опухолей, болезни Ходжкина, лимфоцитарных лимфом, лимфомы не Ходжкина, злокачественной опухоли мочевого пузыря, злокачественной опухоли печени, почечной злокачественной опухоли, злокачественной опухоли почки или мочеточника (например, гипернефроидный рак, злокачественная опухоль почечной лоханки), или новообразований центральной нервной системы (например, первичная лимфома ЦНС, злокачественные опухоли позвоночного столба, глиомы ствола мозга или аденома гипофиза), глиомы или фиброзаркомы.

Данное антитело можно вводить от трех раз ежедневно до одного раза каждые шесть месяцев и, предпочтительно, можно вводить через рот, слизистую, защечно, интраназально, вдыханием, внутривенно, подкожно, внутримышечно, парентерально, внутриопухолево, чрескожно или местно. Данное анти-

тело можно также вводить непрерывно с помощью микронасоса. Как правило, данное антитело следует вводить до тех пор, пока данная опухоль присутствует, и при условии, что данное антитело приводит к остановке роста опухоли или рака или к уменьшению ее (его) массы или объема. Как правило, дозировка антитела колеблется в диапазоне от 0,025 до 50 мг/кг, более предпочтительно 0,1-50 мг/кг, более предпочтительно 0,1-20, 0,1-10, 0,1-5 мг/кг или еще более предпочтительно 0,1-2 мг/кг. Данное антитело можно также вводить профилактически.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения данное антитело к CD40 вводят в виде элемента лечебной схемы, которая включает введение пациенту, который обладает гиперпролиферативным нарушением, таким как рак или опухоль, одного или нескольких дополнительных противоопухолевых лекарственных средств или молекул. Типичные противоопухолевые агенты включают, но не ограничиваются, ингибиторы митоза, алкилирующие агенты, антиметаболиты, интеркалирующие агенты, ингибиторы фактора роста, ингибиторы клеточного цикла, ферменты, ингибиторы топоизомеразы, модификаторы биологического ответа, антигормоны, киназные ингибиторы, ингибиторы матриксной металлопротеиназы, генетические терапевтические агенты и антиандрогены. В более предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения антитело к CD40 вводят вместе с противоопухолевым агентом, таким как адриамицин или таксол. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения терапию против CD40 осуществляют вместе с радиотерапией, химиотерапией, фототерапией, хирургией или иной иммунотерапией. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело к CD40 вводят вместе с одним или несколькими дополнительными антителами. Например, антитело к CD40 можно вводить вместе с антителами, о которых известно, что они ингибируют клеточную пролиферацию опухоли или рака. Такие антитела включают, но не ограничиваются, антитело, которое ингибитирует CTLA4, рецептор erbB2, EGF-R, IGF-1R, CD20 или VEGF.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело к CD40 метят с помощью радиоактивной метки, иммунотоксина или токсина, или слитым белком, содержащим токсичный пептид. Антитело к CD40 или антитело к CD40-слитый белок направляет радиоактивную метку, иммунотоксин, токсин или токсичный пептид к клетке опухоли или к раковой клетке. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения данная радиоактивная метка, иммунотоксин, токсин или токсичный пептид интернализуются клеткой опухоли или раковой клеткой после связывания антитела к CD40 с CD40 на поверхности искомой клетки.

Кроме того, антитело к CD40 можно использовать терапевтически для индукции у пациента апоптоза конкретных клеток. Во многих случаях клетки, мишенированные для апоптоза, представляют собой раковые клетки или клетки опухоли. Таким образом, в настоящем изобретении разработан способ индукции апоптоза путем введения пациенту антитела к CD40, нуждающегося в нем.

Кроме того, в настоящем изобретении разработан способ введения пациенту активирующего антитела к CD40 для увеличения CD40-активности. Антитело к CD40 вводят вместе с одним или несколькими другими факторами, которые увеличивают CD40-активность. Такие факторы включают CD40L и/или аналоги CD40L, которые активируют CD40.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело к CD40 вводят вместе с одним или несколькими дополнительными иммунными усиливающими агентами, в том числе, без ограничения, IFN- β 1, IL-2, IL-8, IL-12, IL-15, IL-18, IL-23, IFN- γ и GM-CSF.

В некоторых вариантах осуществления согласно изобретению агонист антитела человека против CD40 используют в качестве адьюванта для повышения эффективности вакцины. При использовании данным образом, антитело против антитела к CD40 активирует CD40 в антигенпрезентирующих клетках, в том числе, в В-клетках, дендритных клетках и в моноцитах, а также усиливает образование иммуномодуляторных молекул, таких как цитокины и хемокины. Иммуностимуляторное действие данного антитела усиливает иммунную реакцию вакцинированного пациента к вакцинному антигену.

Кроме того, в настоящем изобретении разработан способ получения дендритно-клеточной вакцины для раковых клеток или для иммунотерапии дендритных клеток. В соответствии с данным способом дендритные клетки ракового больного культивируют в течение 1-5 дней с лизатом или гомогенатом опухоли, с клетками опухоли, убитыми облучением или с помощью других средств, или с помощью опухолеспецифичных антигенов (например, пептидов, идиотипов), а также с помощью 1-10 мкг/мл антитела к CD40. Обученные антигеном дендритные клетки реинъецируют данному пациенту, чтобы стимулировать противоопухолевые иммунные ответы, в частности противоопухолевые CTL-ответы. Для использования в данном способе моноцитные дендритные клетки можно получить из образца периферической крови путем культивирования в IL4 и GM-CSF. Дендритные клетки можно также получить из костного мозга пациента путем выделения очисткой с помощью магнита или сортировкой CD34-позитивных клеток, с последующим культивированием в IL-4 и GM-CSF.

Генная терапия.

Молекулы нуклеиновой кислоты настоящего изобретения можно вводить пациенту, нуждающемуся в этом, с помощью генной терапии. Генную терапию можно осуществлять либо *in vivo*, либо *ex vivo*. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения пациенту вводят молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие и тяжелую цепь, и легкую цепь. В более предпочтительном варианте осу-

ществления настоящего изобретения молекулы нуклеиновой кислоты вводят таким образом, чтобы они стабильно интегрировались в хромосомы В-клеток, так как эти клетки специализированы для образования антител. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения предшественники В-клеток трансфицируют или инфицируют *ex vivo* и ретрансплантируют нуждающемуся в этом пациенту. В другом варианте осуществления настоящего изобретения предшественники В-клеток или других клеток инфицируют *in vivo*, используя известный вирус для заражения представляющих интерес клеток определенного типа. Обычные векторы, используемые для генной терапии, включают липосомы, плазмиды и вирусные векторы. Типичные вирусные векторы представляют собой ретровирусы, адено-вирусы и аденоассоциированные вирусы. После инфицирования *in vivo* либо *ex vivo*, отслеживают уровень экспрессии антитела в образце, взятом у подвергающегося лечению пациента, и используют любой иммуноанализ, известный в данной области или рассматриваемый здесь.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения предлагаемый способ генной терапии включает стадии введения выделенной молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь или ее антигенсвязывающую часть антитела к CD40, и экспрессирования молекулы нуклеиновой кислоты. В другом варианте осуществления настоящего изобретения предлагаемый способ генной терапии включает стадии введения выделенной молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей легкую цепь или ее антигенсвязывающую часть антитела к CD40 и экспрессирования молекулы нуклеиновой кислоты. В более предпочтительном способе данный способ генной терапии включает стадии введения выделенной молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь или ее антигенсвязывающую часть, и выделенной молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей легкую цепь или ее антигенсвязывающую часть антитела к CD40 настоящего изобретения, и экспрессирования молекул нуклеиновой кислоты. Данный способ генной терапии может также включать стадию введения другого противоопухолевого агента, такого как таксол или адриамицин.

Для того чтобы лучше понять данное изобретение, ниже изложены примеры. Эти примеры преследуют лишь иллюстративные цели и не рассматриваются в качестве какого-либо ограничения смысла настоящего изобретения.

Пример I.

Создание гибридом, продуцирующих антитело к CD40.

Антитела настоящего изобретения получают, селектируют и анализируют следующим образом.

Иммунизация и создание гибридомы.

Мышей Xenomice™ в возрасте восемь-девять недель иммунизируют внутрибрюшинно или в подушечку задней лапы либо слитым белком CD40-IgG (10 мкг/дозу/мышь) либо клетками 300.19-CD40, которые представляют собой линию трансфицирующих клеток, которые экспрессируют CD40 человека на своей плазматической мембране (10×10^6 клеток/дозу/мышь). Введение данной дозы повторяют пять-семь раз на протяжении трех-восьми недель. За четыре дня до слияния мышам делают заключительную инъекцию внеклеточного домена CD40 человека в PBS. Осуществляют слияние лимфоцитов селезенки и лимфатического узла из иммунизированных мышей с несекретирующими клеточной линией миеломы P3-X63-Ag8.653, и подвергают слитые клетки HAT-селекции, как описано раньше (Galfre and Milstein, methods Enzymol. 73:3-46, 1981). Выделяют панель гибридом, которые все секретируют CD40-специфичные антитела человека IgG2к. Отбирают одиннадцать гибридом для дальнейшего исследования и обозначают их 3.1.1, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 23.5.1, 23.25.1, 23.29.1 и 24.2.1.

В соответствии с Будапештским Договором, гибридомы 3.1.1, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1 и 21.4.1 депонируют в Американской Коллекции Типовых Культур (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, 6 августа 2001 г. Гибридомы 21.2.1, 22.1.1, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.29.1 и 24.2.1 депонируют в ATCC 16 июля 2002 г. Данным гибридомам присвоены следующие регистрационные номера:

<u>Гибридома</u>	<u>№ регистрации</u>
3.1.1 (LN 15848)	PTA-3600
7.1.2 (LN 15849)	PTA-3601
10.8.3 (LN 15850)	PTA-3602
15.1.1 (LN 15851)	PTA-3603
21.4.1 (LN 15853)	PTA-3605
21.2.1 (LN 15874)	PTA-4549
22.1.1 (LN 15875)	PTA-4550
23.5.1 (LN 15855)	PTA-4548
23.25.1 (LN 15876)	PTA-4551
23.28.1 (LN 15877)	PTA-4552
23.29.1 (LN 15878)	PTA-4553
24.2.1 (LN 15879)	PTA-4554

Пример II.

Последовательности антител к CD40, полученные в соответствии с настоящим изобретением.

Для анализа структуры антител, полученных в соответствии с настоящим изобретением, клонируют нуклеиновые кислоты, кодирующие фрагменты тяжелой и легкой цепи гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к CD40. Клонирование и секвенирование осуществляют следующим образом.

С помощью набора Fast-Track (Invitrogen) выделяют Poly(A)⁺ мРНК, примерно из 2×10^5 гибридомных клеток, полученных от мышей XenoMouseTM, иммунизированных CD40 человека, как описано в примере I. После чего с помощью ПЦР получают случайным образом приморванную кДНК. Используют праймеры из специфичных вариабельных областей V_H человека или семейства V_k (Marks et al., "Oligonucleotide primers for polymerase chain reaction amplification of human immunoglobulin variable genes and design of family-specific oligonucleotide probes" (Олигонуклеотидные праймеры для амплификации иммуноглобулиновых вариабельных генов человека и создание специфичного семейства олигонуклеотидных зондов с помощью полимеразной цепной реакции), Eur. J. Immunol. 21:985-991 (1991)) или универсальный праймер V_H человека, MG-30, CAGGTGCAGCTGGAGCAGTCIGG (SEQ ID NO: 118), в сочетании с праймерами, специфичными для константной области C_{J2} человека, MG-40d, 5'-GCTGAGGGAGTAGAGTCCTGAGGA-3' (SEQ ID NO: 119), или для константной области С_k (hκP2; как описано раньше у Green et al., 1994). Путем прямого секвенирования ПЦР-продуктов, образованных из poly(A⁺)-РНК с использованием вышеописанных праймеров, получают молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие транскрипты тяжелой цепи и легкой каппа-цепи человека из гибридом, продуцирующих антитела к CD40. ПЦР-продукты клонируют в pCRII, используя TA-набор для клонирования (Invitrogen), и секвенируют обе цепи с использованием Prism dye-наборов для терминирующего секвенирования и секвенатора ABI 377. Анализируют все последовательности путем выравнивания по "V BASE sequence directory" (Tomlinson et al., MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, Великобритания) с использованием программного обеспечения MacVector и Geneworks.

Далее, подвергают клонированию и секвенированию полноразмерную ДНК моноклональных антител 3.1.1, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 23.5.1, 23.28.1, 23.29.1 и 24.2.1. Для такого секвенирования выделяют РНК, примерно, из 4×10^6 гибридомных клеток с использованием набора для выделения РНК QIAGEN RNeasy (QIAGEN). мРНК подвергают обратному транскрибированию с использованием oligo-dT(18) и набора Advantage RT/PCR (Clonetech). Используется V Base для создания прямых амплификационных праймеров, которые включают сайты рестрикции, оптимальную последовательность Козака, стартовый ATG-сайт и часть сигнальной последовательности данной тяжелой цепи. В табл. 1 приведен список прямых амплификационных праймеров, применяемых к последовательностям клонов данного антитела.

Таблица 1

Клон	Прямой праймер тяжелой цепи
3.1.1	5'-TATCTAAGCTTCTAGACTCGACGCCACCATGGAGTTGGCTGAGCTG-3' (SEQ ID NO:120)
7.1.2	5'-TATCTAAGCTTCTAGACTCGACGCCACCATGGAGTTGGCTGAGCTG-3' (SEQ ID NO:121)
10.8.3	5'-TATCTAAGCTTCTAGACTCGACGCCACCATGAAACACCTGTGGTTCTTCC-3' (SEQ ID NO:122)
15.1.1	5'-TATCTAAGCTTCTAGACTCGACGCCACCATGAAACATCTGTGGTTCTTCC-3' (SEQ ID NO:123)
21.4.1	5'-TATCTAAGCTTCTAGACTCGACGCCACCATGGACTGGACCTGGAGGATCC-3' (SEQ ID NO:124)
21.2.1	5'-TATCTAAGCTTCTAGACTCGACGCCACCATGGAGTTGGCTGAGCTG-3' (SEQ ID NO:128)
22.1.1	5'-TATCTAAGCTTCTAGACTCGACGCCACCATGGAGTTGGCTGAGCTG-3' (SEQ ID NO:129)
23.5.1	5'-TATCTAAGCTTCTAGACTCGACGCCACCATGGAGTTGGCTGAGCTG-3' (SEQ ID NO:130)
23.28.1	5'-TATCTAAGCTTCTAGACTCGACGCCACCATGAAACATCTGTGGTTCTTCC-3' (SEQ ID NO:131)
23.29.1	5'-TATCTAAGCTTCTAGACTCGACGCCACCATGGAGTTGGCTGAGCTG-3' (SEQ ID NO:132)
24.2.1	5'-TATCTAAGCTTCTAGACTCGACGCCACCATGAAACATCTGTGGTTCTTCC-3' (SEQ ID NO:133)

Этот же способ используют для создания праймера, который включает 3'-кодирующие последовательности, стоп-кодон константной области JgG2, (5'-TTCTCTGATCAGAATTCCSTATCATTACCCGGAGACAGGGAGAG-3')(SEQ ID NO: 125) и сайты рестрикций.

Этот же способ используют также для создания праймера, расположенного около стартового ATG-сайта каппа-цепи, (5'-CTTCAAGCTTACCCGGGCCACCATGAGGCTCCCTGCTCAGC-3') (SEQ ID NO: 126). Оптимальную последовательность Козака добавляют по 5'-концу к стартовому ATG-сайту. Данный праймер используют для ПЦР-клонирования легких цепей следующих клонов антител: 3.1.1, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 23.5.1 и 23.29.1. Для клонирования легких цепей из клонов 23.28.1 и 24.2.1 используется второй прямой праймер

5'-TCTTCAAGCTTGCCTGGGGCCACCATGGAAACCCCAGCGCAG-3' (SEQ ID NO: 134). Этот же способ используется для создания праймера, расположенного около стоп-кодона константной каппа-области (5'-TTCTTTGATCAGAATTCTCACTAACACTCTCCCTGTTGAAGC-3') (SEQ ID NO: 127). Используется пара праймеров для амплификации кДНК с использованием ПЦР-набора Advantage High Fidelity (Clontech). Последовательность указанного ПЦР-продукта получают путем прямого секвенирования с использованием стандартных методов (например, с использованием случайной затравки), используя наборы для секвенирования с терминирующим красителем и ABI-секвенатор. В экспрессирующий вектор млекопитающего клонируют полученный ПЦР-продукт и секвенируют клоны для подтверждения соматических мутаций. Для каждого клона проверяют последовательности обеих цепей по меньшей мере в трех реакциях.

Анализ утилизации гена.

В соответствии с настоящим изобретением в табл. 2 показана утилизация гена с помощью селективных гибридомных клонов.

Таблица 2
Утилизация генов тяжелой и легкой цепи

Клон	Тяжелая цепь			Легкая каппа-цепь	
	VH	D	JH	VK	JK
3.1.1	(3-30+) DP-49	D4+ DIR3	JH6	A3/A19 (DPK-15)	JK1
7.1.2	(3-30+) DP-49	DIR5+ D1-26	JH6	A3/A19 (DPK-15)	JK1
10.8.3	(4.35) VIV-4	DIR3	JH6	L5 (DP5)	JK4
15.1.1	(4-59) DP-71	D4-23	JH4	A3/A19 (DPK-15)	JK2
21.4.1	(1-02) DP-75	DLR1	JH4	L5 (DP5)	JK4
21.2.1	(3-30+) DP-49	DIR-3+ D6-19	JH4	A3/A19 (DPK-15)	JK1
22.1.1	(3-30+) DP-49	D1-1	JH6	A3/A19 (DPK-15)	JK1
23.5.1	(3-30+) DP-49	D4-17	JH6	A3/A19 (DPK-15)	JK1
23.28.1	(4-59) DP-71	DIR1+ D4-17	JH5	A27 (DPK-22)	JK3
23.29.1	(3-30.3) DP46	D4-17	JH6	A3/A19 (DPK-15)	JK1
24.2.1	(4-59) DP-71	DIR1+ D4-17	JH5	A27 (DPK-22)	JK3

Анализ последовательности и мутационный анализ.

Следует иметь в виду, что анализ утилизации гена создает лишь общее представление о структуре антитела. Поскольку В-клетки животных XenoMouse™ стохастически производят транскрипты тяжелой V-D-J или легкой V-J-каппа-цепи, происходит ряд вторичных процессов, включающих, без ограничения, соматическую гипермутацию, делеции, N-добавки и CDR3-удлинения. См., например, Mendez et al., *Nature Genetics* 15:146-156 (1997) и международную патентную публикацию WO 98/24893. В соответствии с этим для дальнейшего изучения структуры антитела, на основании последовательности кДНК, полученных из данных клонов, предсказаны аминокислотные последовательности антител. В табл. А представлены идентификаторы последовательностей для каждой нуклеотидной и предсказанной из нее аминокислотной последовательности секвенированных антител.

В табл. 3-7 представлены нуклеотидные и предсказанные из них аминокислотные последовательности тяжелой и легкой каппа-цепи антител 3.1.1 (табл. 3), 7.1.2 (табл. 4), 10.8.3 (табл. 5), 15.1.1 (табл. 6), 21.4.1 (табл. 7).

В табл. 8-13 представлены нуклеотидные и предсказанные аминокислотные последовательности вариабельного домена тяжелой цепи и легкой каппа-цепи антител 21.2.1 (табл. 8), 22.1.1 (табл. 9), 23.5.1 (табл. 10), 23.28.1 (табл. 11), 23.29.1 (табл. 12) и 24.2.1 (табл. 13).

ДНК-последовательность из полноразмерного секвенированного моноклонального антитела 23.28.1 отличается от ДНК-последовательностей, полученных из секвенирования VH-области начального ПЦР-продукта, по одной паре оснований (С на G), что приводит к изменению остатка 16 с D на E в природной тяжелой цепи.

В табл. 14-19 представлены нуклеотидные и предсказанные аминокислотные последовательности тяжелой и легкой каппа-цепи антител 21.2.1 (табл. 14), 22.1.1 (табл. 15), 23.5.1 (табл. 16), 23.25.1 (табл. 17), 23.29.1 (табл. 18) и 24.2.1 (табл. 19). В данных таблицах сигнальная пептидная последовательность (или основания, кодирующие ее) подчеркнуты.

Созданы два мутантных антитела, 22.1.1 и 23.28.1. Тяжелая цепь антитела 22.1.1 смутировала, заменив цистеиновый остаток в положении 109 на аланиновый остаток. Мутантный клон обозначен 22.1.1H-C019A. Легкая цепь антитела 23.28.1 в положении 92 также смутировала, заменив цистеиновый остаток на аланиновый остаток. Мутантный клон обозначен 23.28.1L-C92A.

Мутагенез специфических остатков осуществляют с помощью сконструированных праймеров и с использованием набора для сайт-направленного мутагенеза QuickChange от Stratagene, в соответствии с

рекомендациями производителя. Мутации подтверждены автоматизированным секвенированием, а мутационные вставки субклонируют в экспрессирующие векторы.

В табл. 20 представлены нуклеотидная и аминокислотная последовательности мутантной тяжелой цепи антитела 22.1.1H-C019A. В табл. 21 представлены нуклеотидная и аминокислотная последовательности мутантной легкой цепи антитела 23.28.1. Мутантные ДНК-кодоны изображены курсивом. Мутантный аминокислотный остаток выделен шрифтом.

Таблица 3

Последовательности ДНК и белковые последовательности антитела 3.1.1

ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ (сигнальная последовательность подчеркнута)
ДНК-последовательность тяжелой цепи	<u>ATGGAGTTGGGCTGAGCTGGGTTTCCCTCGTTGC</u> <u>TCTTTAAGAGGTGTCAGTGTCAAGGTGCAAGCTG</u> GTGGAGTCTGGGGAGGGCGTGGTCCAGCCTGGG AGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAT TCACCTTCAGTAGTTATGGCATGCACTGGTCCG CCAGGCTCCAGGCAAGGGCTGGAGTGGGTGGC AGTTATATCAAAGGATGGAGGTAATAAATACCAT GCAGACTCCGTGAAGGCCGATTCACCATCTCCA GAGACAATTCCAAGAATGCGCTGTATCTGCAAAT GAATAGCCTGAGAGTTGAAGACACGGCTGTGTAT TACTGTGTGAGAAGAGGGCATCAGCTGGTCTGG GATACTACTACAAACGGTCTGGACGTCTGGGG CCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCCTAGCCTCC ACCAAGGGCOCATCGGTCTCCCTGGCGCCCT GCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGAACAGCGGCCCT GGGCTGCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCG GTGACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCTCTGACCA GCGCGTGCACACCTTCCAGCTGTCTACAGTC CTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACC GTGCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACA CCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAA GGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTGTGTC GAGTGCCCACCGTGCCAGCACCCACCTGTGGCAG GACCGTCAGTCTCCCTTCCCCAAAACCCAA GGACACCCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTC ACGTGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC CCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGG AGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAG CGTCCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAAC GGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCAAACAAA GGCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCA AAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCCACAGGTGT ACACCCCTGCCCTCATCCCGGAGGAGATGACCAA GAACCCAGGTCAGCCTGACCTGCCCTGGTCAAAGGC TCTCTACCCCTAGGGACATGCCGTGGAGTGGGAGA GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCA CACCTCCCAGTGTGGACTCCGACGGCTCCCTCTC CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGT GGCAGCAGGGGAACGTCTCTCATGCTCCGTGAT GCATGAGGTCTGCACAAACCACTACACGCAGAAG AGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGA

Белковая последовательность тяжелой цепи	<u>MEFGLSWVFLVALLRGVOCQVQLVESGGGVVQPG</u> RSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA VISKDGGNKYHADSVKGRFTISRNSKNALYLQMN SLRVEDTAVYYCVRRGHQLVLGYYYYNGLDVWG QGTTVTVSSASTKGPSVPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLY SLSSVVTVPSSNFGTQTYYTCNVDHKPSNTKVDKTV ERKCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVS NKGLPAPIEKTSKTKGQPREPVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PMLDSDGSSFLYSLKTVDKSRWQQGNFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
ДНК-последовательность легкой цепи	<u>ATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCCTGGGCTGCTAA</u> TGCTCTGGGTCTCTGGATCCAGTGGGATATTGT GCTGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCGTACCC CTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCTGCAGGTCTAG TCAGAGCCTTGTATAGTAATGGATACAACCTTT TGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCC ACAGCTCTGATCTATTGGGTTCTAATCAGGCT CCGGGGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATC AGGCACAGATTACACTGAAAATCAGCAGATTG GAGGCTGAGGATGTTGGGTTATTACTGCATGC AAGCTCTACAAACTCCCTCGGACGTTGGCCAAGG GACCAAGGTGAAATCAAACGAACGTGGCTGC ACCATCTGTCTTCATCTCCGCCATCTGATGAGC AGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGCCT GCTGAATAACTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTA CAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGTA ACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGAC GCTGAGCAAAGCAGACTACAGAGAAACACAAAGT CTACGCCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCTGAGC TCGCCCGTACAAAGAGCTCAACAGGGGAGAGT GTAG
Белковая последовательность легкой цепи	<u>MRLPAOLLGLLMLWVSGSSGDIVLTQSPLSLPVTPG</u> EPASISCRSSQSLLYSNGYNFLDWYLQKPGQSPQLLI YLGSNRASGVPDFSGSGSGTDFTLKISRLEAEDVGG VYYCMQALQTPTFGQGKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

ДНК-последовательность зрелого вариабельного домена тяжелой цепи	CAGGTGCAGCTGGTGGAGCTGGGGAGGCCTG GTCCAGCCTGGAGGTCCCTGAGACTCTCCGTG CAGCCTCTGGATTACCCCTCAGTAGTTATGGCAT GCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGCTG GAGTGGGTGGCAGTTATATCAAAGGATGGAGGT AATAAAATACCATGCAGACTCCGTGAAGGGCGAT TCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAATCGCCT GTATCTGAAATGAATAGCCTGAGAGTTGAAGAC ACGGCTGTGTATTACTGTGTGAGAAGAGGGCATC AGCTGGTTCTGGGATACTACTACTACAAACGGTCT GGACGTCTGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTC TCCTCA
Белковая последовательность зрелого вариабельного домена тяжелой цепи	QVQLVESGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVISKDGGNKYHADSVKGRFT ISRDNSKNALYQLQMNSLRVEDTAVYYCVRGRHQL VLGYYYYNGLDVWGQQTTVTVSS
ДНК-последовательность зрелого вариабельного домена легкой цепи	GATATTGTGCTGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCC CGTCACCCCTGGAGAGGCCGGCCTCCATCTCCGTG AGGTCTAGTCAGAGCCTCTGTATAGTAATGGAT ACAACCTTTGGATTGGTACCTGCAGAACGCCAGG GCAGTCTCCACAGCTCTGATCTATTGGGTTCTA ATCGGGCCTCCGGGCTCCCTGACAGGTTCACTGG CAGTGGATCAGGCACAGATTTCACACTGAAAATC AGCAGATTGGAGGCTGAGGATTTGGGGTTATT ACTGCATGCAAGCTCTACAAACTCCTCGGACGTT CGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA
Белковая последовательность зрелого вариабельного домена легкой цепи	DIVLTQSPLSLPVTPGEPAISCRSSQSLLYSNGYNFL DWYLQKPGQSPQLIYLGSNRASGVPDFSGSGSGT DFTLKISRLEADVGVYYCMQALQTPTFGQGTKV EIK
ДНК тяжелой цепи (вариабельный домен) (3.1.1H-A78T) SEQ ID NO:99	CAGGTGCAGCTGGTGGAGCTGGGGAGGCCTG GTCCAGCCTGGAGGTCCCTGAGACTCTCCGTG CAGCCTCTGGATTACCCCTCAGTAGTTATGGCAT GCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGCTG GAGTGGGTGGCAGTTATATCAAAGGATGGAGGT AATAAAATACCATGCAGACTCCGTGAAGGGCGAT TCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAATCGCCT GTATCTGAAATGAATAGCCTGAGAGTTGAAGAC ACGGCTGTGTATTACTGTGTGAGAAGAGGGCATC AGCTGGTTCTGGGATACTACTACTACAAACGGTCT GGACGTCTGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTC TCCTCA

Белок тяжелой цепи (вариабельный домен) (3.1H-A78T) SEQ ID NO:90	QVQLVESGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVISKDGGNKYHADSVKGRFT ISRDNSKN7LYLQMNSLRVEDTAVYYCVRRGHQLV LGYYYYNGLDVWGQGTTVTVSS
ДНК тяжелой цепи (вариабельный домен) (3.1H-A78T-V88A-V97A) SEQ ID NO:91	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTG GTCCAGCCTGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCCTCTGGATTACCCCTCAGTAGTATGGCAT GCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGCTG GAGTGGGTGGCAGTTATATCAAAGGATGGAGGT AATAAAATACCATGCAGACTCCGTGAAGGCCAT TCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAATaCGCT GTATCTGAAATGAATAGCCTGAGAGcTGAAGAC ACGGCTGTGTATTACTGTGcGAGAAGAGGGCATC AGCTGGTCTGGGATACTACTACTACAACGGCT GGACGTCTGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTC TCCTCA
Белок тяжелой цепи (вариабельный домен) (3.1H-A78T-V88A-V97A) SEQ ID NO:92	QVQLVESGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVISKDGGNKYHADSVKGRFT ISRDNSKN7LYLQMNSLR4EDTAVYYCARRGHQLV LGYYYYNGLDVWGQGTTVTVSS
ДНК легкой цепи (вариабельный домен) (3.1L-L4M-L83V) SEQ ID NO:93	GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCC CGTCACCCCTGGAGAGGCCGCCCTCCATCTCCTGC AGGTCTAGTCAGAGCCCTTGATAGTAAATGGAT ACAACCTTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGG GCAGTCTCCACAGCTCTGATCTATTGGGTCTA ATCGGGCCTCCGGGTCCCTGACAGGTTAGTGG CAGTGGATCAGGCACAGATTACACTGAAAATC AGCAGAgtGGAGGCTGAGGATGTGGGGTTATT ACTGCATGCAAGCTCTACAAACTCCTCGGACGTT CGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAA
Белок легкой цепи (вариабельный домен) (3.1L-L4M-L83V) SEQ ID NO:94	DIVMTQSPLSLPVTPGEPAISCRSSQSLLYSNGYNF LDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDFSGSGSG TDFTLKRIVEAEDVGVYYCMQALQTPTFGQGTK VEIK

Таблица 4

Последовательности ДНК и белковые последовательности антитела 7.1.2

ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ (сигнальная последовательность подчеркнута)
ДНК-последовательность тяжелой цепи	<u>ATGGAGTTGGGCTGAGCTGGGTTTCCCTCGTTGC</u> TCTTTAAGAGGTGTCCAGTGTCAAGGTGCAGCTG GTGGAGTCTGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGG AGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAT TCACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCGG CCAGGCTCCAGGCAAGGGCTGGAGTGGGTGGC AGTTATATCAAATGATGGAGATAATAAATACCAT GCAGACTCCGTGTGGGCCGATTCAACCATCTCCA GAGACAATTCCAGGAGCACGCTTATCTGCAAAT GAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTATAT TACTGTGCAGAGAAGAGGCATGGGTCTAGTGGG AGCCGTGGGGATTACTACTACTACGGTTTGG ACGCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC CTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATGGCTTCCCC CTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCA CAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAGGACTACTT CCCCGAACCGGTGACGGTGTGGAACTCAGGC GCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTG TCCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAG CGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAACTTCGGCACC CAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCA GCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCA AATGTTGTGTCAGTGCCCCACCGTGCCCCAGCACC ACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTCCTCTCCCC CAAAACCCAAGGGACACCCCATGATCTCCGGAC CCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGACGTGAGC CACGAAGACCCCGAGGTCCAGTCAACTGGTACG TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA AGCCACGGGAGGGAGCAGTCAACAGCACGTCC GTGTGGTCAGCGTCTCACCGTTGTGCACCAAGGA CTGGCTGAACGGCAAGGGAGTACAAGTGAAGGT CTCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAA ACCATCTCCAAAACCAAAAGGGCAGCCCCGAGAA CCACAGGTGTACACCTGCCCATCCGGAGG AGATGACCAAGAACCAAGGTCAACAGCACGTCC GGTCAAAGGCTCTACCCCAAGCGACATGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGCAGCCGGAGAACAAAC TACAAGACCACACCTCCCAGTGGACTCCGACG GCTCCCTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGAC AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTCTCAT GCTCCGTATGCATGAGGCTCTGCACAACCAACTA CACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAA TGA

Белковая последовательность тяжелой цепи	<u>M</u> EFGLSW <u>V</u> F <u>V</u> ALLRG <u>V</u> O <u>C</u> QVQL <u>V</u> ESGGVVQPG RSLRLSCAAS <u>G</u> TFSSYGMHWW <u>R</u> QAP <u>G</u> K <u>G</u> LEWVA VISNDGDN <u>K</u> YHADSVWGRFTISRDNSRSTLYLQM <u>N</u> SLRAEDTA <u>V</u> YYCARRGMGSSGSRGDYYYYYGLDV WGQGTTVTVSSASTK <u>G</u> PSV <u>F</u> PLAPCSRSTSESTAAL GCLVK <u>D</u> YFPEPVTV <u>W</u> NSGALT <u>S</u> G <u>V</u> H <u>T</u> PPAVLQSS GLYS <u>L</u> SSVVT <u>V</u> PSSN <u>F</u> GT <u>Q</u> TYTCNV <u>D</u> H <u>K</u> PSNTKVD KTVERKCC <u>V</u> ECPPCPAPPVAG <u>P</u> SVFL <u>F</u> PP <u>K</u> PKDTLM ISRTPEV <u>T</u> CVV <u>D</u> VSHEDPEV <u>Q</u> FNWY <u>D</u> GVE <u>H</u> N <u>A</u> KTKPREE <u>Q</u> FN <u>S</u> TRVV <u>S</u> LT <u>V</u> V <u>H</u> QDWLNGKEY <u>K</u> KVS <u>N</u> KL <u>P</u> API <u>E</u> KT <u>S</u> TK <u>G</u> Q <u>R</u> EP <u>Q</u> V <u>T</u> L <u>P</u> SREEM TKN <u>Q</u> SL <u>T</u> CL <u>V</u> K <u>G</u> F <u>P</u> SDIA <u>V</u> E <u>W</u> ESNGQ <u>P</u> ENNY <u>K</u> TPPM <u>L</u> SD <u>G</u> SF <u>L</u> YS <u>K</u> LT <u>V</u> DKSRW <u>Q</u> Q <u>N</u> V <u>F</u> CSVM HEALHN <u>H</u> YT <u>Q</u> KS <u>L</u> SL <u>SP</u> u
ДНК-последовательность легкой цепи	<u>A</u> TGAGGG <u>C</u> CCCT <u>G</u> CT <u>C</u> AG <u>C</u> CC <u>T</u> GGGG <u>C</u> T <u>G</u> CTAA <u>T</u> G <u>C</u> CT <u>G</u> GG <u>G</u> T <u>C</u> T <u>G</u> G <u>A</u> CC <u>C</u> AG <u>T</u> GGGG <u>A</u> T <u>T</u> GT GAT <u>G</u> ACT <u>C</u> AG <u>T</u> CT <u>C</u> CA <u>T</u> CT <u>C</u> CC <u>T</u> G <u>CC</u> CG <u>T</u> C <u>AC</u> CC CT <u>G</u> GG <u>A</u> G <u>G</u> CC <u>GG</u> CC <u>T</u> CC <u>AT</u> CT <u>C</u> CT <u>G</u> C <u>AG</u> GT <u>T</u> AG TC <u>AG</u> AG <u>C</u> CT <u>T</u> T <u>G</u> T <u>A</u> T <u>AG</u> T <u>A</u> T <u>GG</u> A <u>T</u> AC <u>A</u> ACT <u>T</u> TT T <u>GG</u> A <u>T</u> GG <u>T</u> AC <u>T</u> G <u>C</u> A <u>G</u> A <u>G</u> CC <u>AG</u> GG <u>C</u> AG <u>T</u> CT <u>CC</u> AC <u>A</u> G <u>C</u> T <u>C</u> CT <u>G</u> A <u>T</u> CT <u>T</u> AT <u>T</u> GG <u>G</u> IT <u>T</u> CA <u>A</u> T <u>CC</u> GG <u>C</u> CT CC <u>GG</u> GG <u>T</u> CC <u>CT</u> G <u>A</u> C <u>AG</u> GT <u>T</u> CA <u>G</u> T <u>GG</u> C <u>AG</u> T <u>GG</u> G <u>A</u> T <u>C</u> AG <u>G</u> CA <u>C</u> AG <u>A</u> T <u>T</u> TA <u>C</u> ACT <u>G</u> AA <u>A</u> AT <u>C</u> AG <u>C</u> AG <u>A</u> GT <u>G</u> G <u>AG</u> GT <u>G</u> AG <u>G</u> AT <u>G</u> T <u>G</u> GG <u>G</u> TT <u>T</u> AT <u>T</u> ACT <u>G</u> C <u>AT</u> G <u>C</u> A <u>A</u> G <u>C</u> T <u>C</u> TA <u>C</u> AA <u>A</u> CT <u>C</u> CT <u>C</u> GG <u>A</u> CG <u>T</u> TC <u>GG</u> CC <u>A</u> AG <u>G</u> G <u>AC</u> CA <u>A</u> GG <u>T</u> GG <u>A</u> AA <u>A</u> AT <u>C</u> AA <u>A</u> CG <u>A</u> ACT <u>G</u> T <u>GG</u> CT <u>G</u> C AC <u>C</u> CA <u>T</u> G <u>T</u> CT <u>C</u> AT <u>T</u> CC <u>CG</u> CC <u>C</u> AT <u>T</u> G <u>A</u> T <u>G</u> G <u>A</u> G <u>C</u> A <u>G</u> T <u>G</u> AA <u>A</u> AT <u>T</u> GG <u>A</u> CT <u>G</u> C <u>CT</u> CT <u>G</u> T <u>G</u> T <u>G</u> G <u>C</u> CT G <u>C</u> T <u>G</u> A <u>A</u> TA <u>A</u> CT <u>T</u> CT <u>A</u> T <u>T</u> CC <u>CA</u> G <u>A</u> G <u>G</u> AG <u>G</u> CC <u>A</u> AG <u>T</u> A C <u>A</u> G <u>T</u> GG <u>A</u> AG <u>G</u> GT <u>G</u> T <u>C</u> AC <u>A</u> G <u>G</u> C <u>AG</u> G <u>A</u> C <u>AG</u> CA A <u>GG</u> A <u>C</u> AG <u>C</u> AC <u>T</u> AC <u>G</u> C <u>CT</u> C <u>AG</u> C <u>AG</u> C <u>AC</u> CC <u>T</u> G <u>AC</u> G <u>C</u> T <u>G</u> A <u>G</u> C <u>AA</u> AG <u>G</u> C <u>AG</u> A <u>C</u> T <u>AC</u> G <u>A</u> G <u>G</u> AA <u>A</u> C <u>A</u> AA <u>A</u> G <u>T</u> CT <u>AC</u> CC <u>CT</u> G <u>CG</u> A <u>AG</u> T <u>C</u> AC <u>C</u> CC <u>C</u> AT <u>C</u> AG <u>GG</u> CC <u>T</u> G <u>AG</u> C TC <u>G</u> CC <u>CG</u> T <u>C</u> AC <u>AA</u> AG <u>G</u> G <u>C</u> T <u>C</u> AC <u>A</u> AG <u>GG</u> G <u>A</u> G <u>A</u> G <u>T</u> G <u>T</u> AG
Белковая последовательность легкой цепи	<u>M</u> RLPA <u>Q</u> LL <u>G</u> LL <u>M</u> W <u>V</u> SG <u>S</u> GD <u>I</u> VM <u>T</u> QS <u>P</u> SL <u>P</u> V <u>T</u> P GEP <u>A</u> S <u>I</u> CR <u>S</u> S <u>Q</u> S <u>L</u> LY <u>S</u> NG <u>Y</u> N <u>F</u> LD <u>W</u> Y <u>L</u> Q <u>K</u> P <u>G</u> Q <u>S</u> Q <u>L</u> LI <u>L</u> GS <u>N</u> R <u>A</u> SG <u>V</u> P <u>D</u> RF <u>S</u> G <u>S</u> G <u>S</u> G <u>T</u> D <u>FT</u> L <u>K</u> IS <u>R</u> VE <u>A</u> ED <u>V</u> GV <u>Y</u> YC <u>M</u> Q <u>AL</u> Q <u>T</u> P <u>R</u> T <u>F</u> G <u>Q</u> G <u>T</u> K <u>V</u> E <u>I</u> K <u>R</u> T <u>V</u> A <u>P</u> S <u>V</u> F <u>I</u> F <u>P</u> PS <u>D</u> E <u>Q</u> L <u>K</u> S <u>G</u> T <u>A</u> S <u>V</u> V <u>C</u> LL <u>N</u> N <u>F</u> P <u>R</u> E <u>A</u> K <u>V</u> Q <u>W</u> K <u>V</u> D <u>N</u> A L <u>Q</u> SG <u>N</u> S <u>Q</u> E <u>S</u> V <u>T</u> E <u>Q</u> DS <u>K</u> D <u>ST</u> Y <u>S</u> S <u>ST</u> L <u>T</u> L <u>S</u> K <u>A</u> D <u>Y</u> E <u>K</u> K <u>V</u> Y <u>A</u> C <u>E</u> V <u>T</u> H <u>Q</u> GL <u>S</u> P <u>V</u> T <u>K</u> S <u>F</u> N <u>R</u> G <u>E</u> C

ДНК-последовательность зрелого вариабельного домена тяжелой цепи	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCCTG GTCCAGCCTGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCCTCTGGATTACCCCTCAGTAGCTATGGCAT GCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGCTG GAGTGGGTGGCAGTTATATCAAATGATGGAGATA ATAAAATACCATGCAGACTCCGTGTGGGCCGATT CACCATCTCCAGAGACAATTCCAGGAGCACGCTT TATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACA CGGCTGTATATTACTGTGCGAGAAGAGGCATGGG GTCTAGTGGAGCCGTGGGATTACTACTAC TACGGTTGGACGTCTGGGCCAAGGGACCACGG TCACCGTCTCCTCA
Белковая последовательность зрелого вариабельного домена тяжелой цепи	QVQLVESGGVVQPGRSLRLSCAASGFTSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVISNDGDNKYHADSVWGRF TISRDNSRSTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGMGS SGSRGDYYYYYGLDVWGQGTVTVSS
ДНК-последовательность зрелого вариабельного домена легкой цепи	GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCC CGTCACCCCTGGAGAGGCCGGCTCCATCTCCTGC AGGTCTAGTCAGAGCCTCTGTATAGTAATGGAT ACAACTTTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGG GCAGTCTCCACAGCTCCCTGATCTATTGGGTTCTA ATCGGGCTCCGGGGTCCCTGACAGGTCAGTGG CAGTGGATCAGGCACAGATTACACTGAAAATC AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTATT ACTGCATGCAAGCTCTACAAACTCCTCGGACGTT CGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAA
Белковая последовательность зрелого вариабельного домена легкой цепи	DIVMTQSPLSLFVTPGEPAISCRSSQSLLYSNGYNF LDWYLQKPGQSPQQLIYLGSNRASGPDRFSGSGSG TDFTLKRISRVEAEDVGVYYCMQALQTPTFGQGTK VEIK

Таблица 5

Последовательности ДНК и белковые последовательности антитела 10.8.3

ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ (сигнальная последовательность подчеркнута)
ДНК-последовательность тяжелой цепи	<u>ATGAAACACCTGTGGTCTTCCCTGCTGGTGGC</u> AGCTCCCAGATGGGTCTCTGCCCAGGTGCAGCTG CAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTCGG AGACCCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGC TCCATCAGTAGTTACTACTGGATCTGGATCCGGC AGCCCGCCGGAAGGGACTGGAATGGATTGGC GTGTCATAACCACTGGGAGCACCACACTACAACCC CTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATGTCAGTAGAC ACGTCCAAGAACCAAGCTCTCCCTGAAGCTGAGCT CTGTGACCGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTG TGCGAGAGATGGTCTTACAGGGGGTACGGTATG GACGTCTGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCT CCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATGGTCTTCCC CCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGC ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACT TCCCCGAACCGGTGACGGTGTGGAAACTCAGG CGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTCCAGCT GTCCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCA GCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCAC CCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCC AGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGC AAATGTTGTGTCAGTGCCCACCGTGCCAGCAC CACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCITCCTCTCCCC CCAAAACCAAGGACACCCCTATGATCTCCGGA CCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGACGTGAG CCACGAAGACCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTAC GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA AAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTT CGTGTGGTCAAGCGTCTCACCAGTGTGACCCAGG ACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG TCTCCAACAAAGGCTCCAGCCCCATCGAGAA AACCATCTCCAAAACCAAGGGCAGCCCCGAGA ACCACAGGTGTACACCCCTGCCCATCCGGAG GAGATGACCAAGAACCAAGGTCAAGCTGACCTGCC TGGTCAAAGGCTCTACCCAGCGACATCGCGT GGAGTGGGAGAGCAATGGGAGCCGGAGAACAA CTACAAGACCAACACCTCCCATGCTGGACTCCGAC GGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGG ACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTCT CATGCTCCGTGATGCACTGAGGCTCTGCACAACCA CTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT AAATGA

Белковая последовательность тяжелой цепи	<u>MKHLWFFLLVAAPRWVLSQVQLQESGPGLVKPSE</u> TLSLTCTVSGGSISYYWIWIQPAKGLEWIGRVY TSGSTNYNPSLKSRTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCARDGLYRGYGMDVWGQGITVTVSSAS TKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS NFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPC PAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR VVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESENQQPENNYKTPPMMLSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHTQKSL SLSPGK
ДНК-последовательность лёгкой цепи	<u>ATGAGGGCTCCCTGCTCAGCTCCCTGGGGCTCCCTGC</u> <u>TGCTCTGGTTCCCAAGGTCCAGATGCGACATCCA</u> GATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTG TAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCTGGCGAG TCAGCCTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAG CAGAAACCAGGGAAAGCCCTAAACTCCTGATTT ATTCTGCCTCCGGTTTGCAAAGTGGGTCCCATC AAGGTTAGCGGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTC ACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATT TTGCAACTTACTATTGTCAACAGACTGACAGTTTC CCGCTCACTTTCGGCGGGGACCAAGGTGGAGA TCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCAT CTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAATCTGGA ACTGCCTCTGTTGTGCTGCTGAATAACTCTA TCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAGGTGG TAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGT GTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTAC AGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCA GAATCAGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGC GTCACCCATCAGGGCTGAGCTCGCCCGTCACAA AGAGCTTCAACAGGGAGAGTGTAG
Белковая последовательность лёгкой цепи	<u>MRLPAOLLGLLLWFPGSRCIDIQMTQSPSSVSASVG</u> DRVTTTCRASQPISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYSAS GLQSGVPSRFSGSGSTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QTDSFPLTGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDBQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

ДНК-последовательность зрелого вариабельного домена тяжелой цепи	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTG GTGAAGCCTCGGAGACCCCTGTCCTCACCTGCA CTGTCCTGGTGGCTCCATCAGTAGTTACTACTGG ATCTGGATCCGGCAGCCCAGGGAAAGGGACTG GAATGGATTGGCGTGTCTATACCACTGGGAGCA CCAACCTACAAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCAC CATGTCAGTAGACACGTCCAAGAACCACTCC CTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGGACACGG CCGTGTATTACTGTGCGAGAGATGGTCTTACAG GGGGTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGAC CACGGTCACCGTCTCCCTCA
Белковая последовательность зрелого вариабельного домена тяжелой цепи	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGSISYYWIWI RQPAGKGLEWIGRVYTSGSTNYNPSLKSRTMSVD TSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDGLYRGYGM DVWGQGTVTVSS
ДНК-последовательность зрелого вариабельного домена легкой цепи	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTCCGTGT CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG TCGGCGAGTCAGCCTATTAGCAGCTGGTTAGCC TGGTATCAGCAGAAACCAAGGGAAAGCCCCCTAAA CTCCTGATTATTCTGCCTCCGGTTTGCAAAGTGG GGTCCCCTCAAGGTTCAAGCGGCAGTGGATCTGGG ACAGATTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGC CTGAAGATTTGCAACTTACTATTGTCAACAGAC TGACAGTTCCGCTCACTTCGGCGGCGGGACC AAGGTGGAGATCAAA
Белковая последовательность зрелого вариабельного домена легкой цепи	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTTICRASQPISSWLAWY QQKPGKAPKLLIYSASGLQSGVPSRFSGSGSGIDFT LTSSLQPEDFATYYCQQTDSFPLTFGGTKVEIK

Таблица 6

Последовательности ДНК и белковые последовательности антитела 15.1.1

ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ (сигнальная последовательность подчеркнута)
ДНК-последовательность тяжелой цепи	<u>ATGAAACATCTGGTCTCCCTCTGGTGGC</u> AGCTCCCAGATGGGTCTGTCCCAGGTGCAGCTG CAGGAGTCGGGCCAGGA CTGGTGAAGCCTCGG AGACCC GTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGC TCCATCAGAAGTTACTACTGGACCTGGATCCGGC AGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGAT ATATCTATTACAGTGGGAGCACC AACTACAATCC CTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGAC ATGTCCAAGAAC AGTCTCCCTGAAGCTGAGTT CTGTGACCGCTGCGGACACGGCGTTATTACTG TGCGAGAAAGGGT GACTACGGTGGTAATTAAAC TACTTCACCA GAGTGGGCCAGGAAACCTGGTCA CCGTCTCC TAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGT CTTCCCCCTGGC GGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCC GAGAGCACAGCGGCC CTGGCTGCCTGGTCAAG GACTACTCCCCGAACCGGT GACGGTGTGTTGGA ACTCAGGCGCTCTGACCAGCGCGTGCACACCTT CCCAGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCC TCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAACTT CGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTT GAGCGCAAATGTTGTGTCAGTGCCCACCGTGCC CAGCACCCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTCCT CTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCCATGATC TCCC GGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGG ACGTGAGTCACGAAGACCCGAGGTCCAGTTCAA CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTAACAGC ACGTTCCGTGGT CAGCGTCTCACCGTTGTGC ACCAGGA CTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGT GCAAGGTCT CCAACAAAGGCCCTCCAGCCCCAT CGAGAAAACC ATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCC CCGAGAAC CACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCC CGGGAGGAGATGACCAAGAAC CCAGGTCAGCGCTG ACCTG CCGTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACA TCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAATGGCAGCCGG AGAACAA ACTACAAGACCAACACCTCCCATGCTGGA CTCCGACGGCT CTTCTCCTCTACAGCAAGCTCA CCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACG TCTTCTCATG CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC AACCACTACACG CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC CGGGTAAATGA

Белковая последовательность тяжелой цепи	<u>MKHLWFLLLVAA</u> PRWYLSQVQLQESGPGLVKPSE TLSLTCTVSGGSIRSYYWTVIRQPPGKGLEWIGYIY YSGSTNYNPSLKSRTVTISVDMSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCARKGDYGGNFNYFHQWGQGTLTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVP SNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVEC CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VSHEDPEVQFNWYVDGVEHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEK TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTI ^{PP} MLSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
ДНК-последовательность легкой цепи	<u>ATGAGGGCTCCCTGCTCAGCT</u> CTGGGCTGCTAA <u>TGCTCTGGGTCTCTGGATCCAGTGGGGATATTGT</u> GATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCGTACCC CTGGAGAGCCGGCTCCATCTCCTGCAGGTCTAG TCAGAGCCTCTACATACTAATGGATAACAACATAT TTCGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTC CACAACCTGTATCTATTGGGTTCTAATCGGCC TCCGGGGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGAT CAGGCACAGATTTACACTGAAAATCAGCAGAGT GGAGGCTGAGGATGTTGGGTTTATTACTGCATG CAAGCTCTACAAACTCCGTACAGTTTGGCAGG GGACCAAGCTGGAGATCAAACGAACGTGGCTG CACCACTGTCTTCATCTCCGCCATCTGATGAG CAGTTGAAATCTGAACCTGCCTCTGTTGTGCT GCTGAATAACTCTATCCCAGAGAGAGGCCAAAGTA CAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGT ACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCGTAC GCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAACACAAAGT CTACGCCCTGCGAAGTCACCCATCAGGCCCTGAGC TCGCCGTACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGT GTTAG
Белковая последовательность легкой цепи	<u>MRLPAOLLGLI</u> MLWVSGSSGDIVMTQSPLSLPVTP GEPASISCRSSQSLLHTNGYNFWDWYLQKPGQSPQL LIYLGSNRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADV GVYYCMQALQTPYSFGQQTKLEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTSKADYEKH KVVACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

ДНК-последовательность зрелого вариабельного домена тяжелой цепи	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTG GTGAAGCCTCGGAGACCTGTCCCTCACSTGCA CTGTCCTGGTGGCTCCATCAGAAGTTACTACTG GACCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAAGGGACT GGAGTGGATTGGATATACTTACAGTGGGAGC ACCAACTACAAATCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCA CCATATCAGTAGACATGTCCAAGAACCAAGTCTC CCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCTGCGGACACG GCCGTTTAACTTAACTGTGCGAGAAAGGGTGAACAG GTGGTAAATTAACTTACACTTACCCAGTGGGGCCA GGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCCTCA
Белковая последовательность зрелого вариабельного домена тяжелой цепи	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIRSYWYW IRQPPGKGLEWIGIYIYSGSTNYNPSLKSRTVTISVD MSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARKGDYGGNFN YFHQWGQGTLTVSS
ДНК-последовательность зрелого вариабельного домена легкой цепи	GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCC CGTCACCCCTGGAGAGGCCGGCCTCCATCTCCCTGC AGGTCTAGTCAGAGCCTCCTACATACTAAATGGAT ACAACTATTCGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGG GCAGTCTCCACAACCTCTGATCTATTGGGTTCTA ATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTAGTGG CAGTGGATCAGGCACAGATTACACTGAAAATC AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTATT ACTGCATGCAAGCTCTACAAACTCCGTACAGTT TGGCCAGGGACCAAGCTGGAGATCAA
Белковая последовательность зрелого вариабельного домена легкой цепи	DIVMTQSPLSLPVTPGEPAISCRSSQSLLHTNGNY FDWYLQKPGQSPQLLIYLSNRASGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPYSFGQGTK LEIK

Таблица 7

Последовательности ДНК и белковые последовательности антитела 21.4.1

ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ (сигнальная последовательность подчеркнута)
ДНК-последовательность тяжелой цепи	<u>ATGGACTGGACCTGGAGGGATCCTCTTGGTGG</u> CAGCAGCCACAGGAGCCCACSTCCCAGGTGCAGCT GGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGG GGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTCTGGA TACACCTTCACCCGCTACTATATGCACTGGGTGC GACAGGCCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGG GATGGATCAACCCCTGACAGTGGTGGCACAAACSTA TGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCATGACC AGGGACACGTCCATCAGCACAGCCTACATGGAGC TGAACAGGCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTA TTACTGTGCGAGAGATCAGCCCCTAGGATATTGT ACTAATGGTGTATGCTCTACTTTGACTACTGGG GCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTC CACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCC TGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGACACAGCGGCC TGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACC GGTGAACGGTGTGTTGAACTCAGGCCTCTGACC AGCGGCCTGACACCTTCCCAGCTGTCTACAGT CCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA CGTCCCCCTCAGCAACTCAGCACCCAGACCTAC ACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCA AGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTGTGT CGAGTGGCCCACCGTGGCCAGCACCACCTGTGGCA GGACCGTCAGTCCTCTTCCCCCAAAACCCA AGGACACCCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGT CACGTGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGA CCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGG GAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCA GCGTCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAA CGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCAAACAA AGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCC AAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCCACAGGTG TACACCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCA AGAACCCAGGTCAAGCTGACCTGCTGGTCAAAGG CTTCTACCCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAAGCCGGAGAACAAACTACAAGACC ACACCTCCCAGCTGACTCCGACGGCTCTTCTT CCTCTACAGCAAGCTACCCGTGGACAAGAGCAGG TGGCAGCAGGGAAACGTCTCTCATGCTCCGTGA TGCATGAGGTCTGCACAACCAACTACACGCAGAA GAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

Белковая последовательность тяжелой цепи	<u>MDWTWRILFLVAAATGAHSQVQLVQSGAEVKPG</u> ASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWM GWINPDGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMEL NRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWG QGILVTVSSASTKGPSVPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTWSNNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV ERKCCVECPCPAPPVAGPSVFLFPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTFRVSVLTWVHQDWLNGKEYKCKVS NKGLPAPIEKTSKTKGQPREPVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PMLDSDGSSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVNMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
ДНК-последовательность легкой цепи	<u>ATGAGGGCTCCCTGCTCAGCTCCCTGGGGCTCCCTGC</u> TGCTCTGGTCTCCAGGTCCAGATGCGACATCCA GATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGCTGCATCTG TAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCTGGCGAG TCAGGGTATTACAGCTGGTAGCCTGGTATCAG CAGAAACCAGGGAAAGCCCTAACCTCCTGATCT ATACTGCATCCACTTACAAAGTGGGTCCCATC AAGGTTAGCGGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTC ACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAACCTGAAGATT TTGCAACTTACTATTGTCAACAGGCTAACATTTTC CCGCTCACCTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGA TCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTCAT CTTCCCAGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGA ACTGCCTCTGTGTGCTGCTGAATAACTCTA TCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAGGTGG TAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGT GTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTAC AGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCA GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTGCGAA GTCACCCATCAGGGCTGAGCTCGCCCGTCACAA AGAGCTCAACAGGGAGAGTGTAG
Белковая последовательность легкой цепи	<u>MRLPAOLLGLLLWFPGSRCDIQMTQSPSSVSASVG</u> DRVTTICRASQGIYSWLAZYQQKPGKAPNLLIYTA STLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC QQANIFPLTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCUUNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

ДНК-последовательность зрелого вариабельного домена тяжелой цепи	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCTGAGGTGA AGAACGCTGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAA GGCTTCTGGATACACCTCACCGGCTACTATATG CACTGGGTGCCACAGGCCCTGGACAAGGGCTTG AGTGGATGGGATGGATCAACCTGACAGTGGTGG CACAAACTATGCACAGAAGTTTCAAGGCAGGGTC ACCATGACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCT ACATGGAGCTGAACAGGCTGAGATCTGACGACA CGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATCAGCCCT AGGATATTGTACTAATGGTGTATGCTCTACTTTG ACTACTGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTC CTCA
Белковая последовательность зрелого вариабельного домена тяжелой цепи	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYIFTGYYM HWVRQAPGQGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGR VTMTRDTSISTAYMELNRLRSDDTAVYYCARDQPL GYCTNGVCSYFDYWGQGTLVTVSS
ДНК-последовательность зрелого вариабельного домена легкой цепи	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTCCGTGT CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG TCGGCGAGTCAGGGTATTACAGCTGGTAGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCTAAC CTCCTGATCTACTGCATCCACTTACAAAGTGG GGTCCCCTCAAGGTCAGCGGAGTGGATCTGGG ACAGATTCTACTCTACCATCAGCAGCTGCAAC CTGAAGATTGCAACTACTATTGTCAACAGGC TAACATTTCGGCTCACTTCGGCGGAGGGACC AAGGTGGAGATCAAA
Белковая последовательность зрелого вариабельного домена легкой цепи	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGIYSWLA WYQQKPGKAPNLLIYTASTLQSGVPSRFSGS GSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQANIFPLTFGGGT KVEIK

Таблица 8
Последовательности ДНК и белковые последовательности зрелых
вариабельных доменов антитела 21.2.1

ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
ДНК тяжелой цепи	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTG GTCCAGCCTGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCCTCTGGATTACACCTTCAGTAGCTATGTATG CACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGCTGG AGTGGGTGGCAGTTATGTATGATGGAAGTAG TAAATACTATGCAAACACTCCGTGAAGGGCCGATT ACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGT ATCTGCAAATAAACAGCCTGAGAGCTGAGGACA CGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATGGGGTAA AGCAGTGCCTGGTCCCTGACTACTGGGCCAGGGA ATCCTGGTCACCGTCTCCTCAG
Белок тяжелой цепи	QVQLVESGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYVMH WVRQAPGKGLEWVAVMSYDGSSKYYANSVKGRF TISRDNISKNTLYLQINSLRAEDTAVYYCARDGGKA VPGPDYWQGILTVSS
ДНК легкой цепи	GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCC CGTCACCCCTGGAGAGGCCGGCCTCCATCTCCTGC AGGTCTAGTCAGAGTGTCTGTATAGTAATGGAT ACAACATTTGGATTGGTACCTGCAGAACGCCAGG GCAGTCTCCACAGCTCTGATCTATTGGGTCTA ATCGGGCCTCCGGGTCCCTGACAGGTTAGTGG CAGTGGATCAGGCACAGATTACACTGAAAATC AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTATT ACTGCATGCAAGTTTACAAACTCCATTCACTTTC GGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAAC
Белок легкой цепи	DIVMTQSPLSLPVTPGEPAISCRSSQSVLYSNGNY LDWYLQKPGQSPQLIYLGSNRASGVPDFSGSGSG TDFTLKRVEAEDVGVYYCMQVLQTPFTFGPGTK VDIK

Таблица 9

Последовательности ДНК и белковые последовательности зрелых
вариабельных доменов антитела 22.1.1

ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
ДНК тяжелой цепи	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTG GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCCTCTGGATTACCCCTCAGTCGCTATGGCAT GCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTG GAGTGGGTGGCAGTTATATCATCTGATGGAGGTA ATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATT CACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTG TATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACA CGGCTGTGTATTACTGTACGAGAAGAGGGACTGG AAAGACTTACTACCAACTACTGTGGTATGGACGTC TGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAG
Белок тяжелой цепи	QVQLVESGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSRYGMH WVRQAPGKGLEWVAVISSLGGNKYYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRGTGKT YYHYCGMDVWGQGTTVTVSS
ДНК легкой цепи	GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCC CGTCACCCCTGGAGAGGCCGCCCTCCATCTCCTGC AGGTCTAGTCAGAGCCTCTGTATAGTAATGGAT ATAACTATTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGG GCAGTCTCCACACCTCCTGATCTATTGGGTCTA ATCGGGCCTCCGGGTCCCTGACAGGTTCACTGG CAGTGGTTCAAGGCCTGATTTACACTGAAAATC AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTATT ACTGCATGCAAGCTCTACAAACTCCTCGGACGTT CGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAAC
Белок легкой цепи	DIVMTQSPLSLPVTPGEPAISCRSSQSLLYSNGYNY LDWYLQKPGQSPHLLIYLGSNRASGVPDFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPTFGQGTTK VEIK

Таблица 10
Последовательности ДНК и белковые последовательности
зрелых вариабельных доменов антитела 23.5.1

ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
ДНК тяжелой цепи	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCCTG GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG TAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAACATGGCAT GCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGCTG GAGTGGGTGGCAATTATATCATATGATGGAAGTA ATAAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCGATT CACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTG TATGTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGAC ACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGACGCGGTCACT ACGGGAGGGATTACTACTCCTACTACGGTTGGA CGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCC TCAG
Белок тяжелой цепи	QVQLVESGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSNYGMH WVRQAPGKGLEWVAIISYDGSNKKYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYVQMNSLRAEDTAVYYCARRGHYGR DYYSYYGLDVWQGTTVTVSS
ДНК легкой цепи	GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCC CGTCACCCCTGGAGAGGCCGCCCTCCATCTCCTGC AGGTCTAGTCAGAGCCTCCCTGCCTGGTAATGGAT ACAACATATTGGATTGGTACCTGCAGAACGCCAGG GCAGTCTCCACAGCTCCGTATCTATTGGGTTCTA ATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCACTGG CAGTGGATCAGGCACAGATTACACTGAAAATC AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTATT ACTGCATGCAAGCTCTACAAACTCCTCGGACGTT CGGCCAAGGGACCAAGGTGAAATCAAAC
Белок легкой цепи	DIVMTQSPLSLPVTPGEPAISCRSSQSLLPGNGYNY LDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPTFGQGTTK VEIK

Таблица 11

Последовательности ДНК и белковые последовательности
зрелых вариабельных доменов антитела 23.28.1

ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
ДНК тяжелой цепи	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTG GTGAAGCCTCGGACACCCCTGTCCCTCACCTGCA CTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGAGGTTACTACTG GAGCTGGATCCGGCAGCCCCCTGGGAAGGGACT GGAGTGGATTGGGTATATCTATTACAGTGGGAGC ACCAACTACAAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCA CCATATCAGTAGACACGGTCCAAGAACCAAGAGTC CCTGAAGCTGAACCTCTGTGACCGCTGCGGACACG GCCGTGTATTATTGTGCGAGAAAGGGGGCCTCT ACGGTGAACACGGCTGGTTCGCCCCCTGGGGCCA GGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCAG
Белок тяжелой цепи	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCTVSGGSIRGYWS WIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRTISV DTSKNQFSLKLNSTVTAADTAVYYCARKGGLYG DY GWFAPWGQGTLVTVSS
ДНК легкой цепи	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCGT CTTGTCTCCAGGGAAAGAGGCCACCCCTCCTG CAGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCAGCGACTTA GCCTGGCACCAGCAGAAACCTGCCAGGGCTCCCA GAECTCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGCCAC TGGCATCCCAGACAGGGTCACTGGCAGTGGTCT GGGACAGACTCACTCTCACCATCAGCAGACTGG AGCCTGAAGATTTGCACTGTATTACTGTCA CTGTCGTAGCTTATTCACTTCCGCCCCCTGGGACCA AAGTGGATATCAAAC
Белок легкой цепи	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSDLAWH QQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQHCRSLFTFGPGTKVDIK
ДНК тяжелой цепи (вариабельный домен) (23.28.1H-D16E) (SEQ ID NO:97)	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTG GTGAAGCCTCGGACACCCCTGTCCCTCACCTGCA CTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGAGGTTACTACTG GAGCTGGATCCGGCAGCCCCCTGGGAAGGGACT GGAGTGGATTGGGTATATCTATTACAGTGGGAGC ACCAACTACAAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCA CCATATCAGTAGACACGGTCCAAGAACCAAGAGTC CCTGAAGCTGAACCTCTGTGACCGCTGCGGACACG GCCGTGTATTATTGTGCGAGAAAGGGGGCCTCT ACGGTGAACACGGCTGGTTCGCCCCCTGGGGCCA GGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCAG
ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
Белок тяжелой цепи (вариабельный домен) (23.28.1H-D16E) (SEQ ID NO:98)	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIRGYWS WIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRTISV DTSKNQFSLKLNSTVTAADTAVYYCARKGGLYG DY GWFAPWGQGTLVTVSS

Таблица 12

Последовательности ДНК и белковые последовательности
зрелых вариабельных доменов антитела 23.29.1

ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
ДНК тяжелой цепи	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTG GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCCTCTGGATTACACCTTCAGTAGCTATGCCAT GCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGCTG GAGTGGGTGGCAGTTATCATATGATGGAAGTA ATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCATT CACCACATCTACAGAGACAATTCCAAGAACACGCTG TATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACA CGGCTGTGTATTACTGTGCGAGACGCGGTCACTA CGGGAATAATTACTACTCCTATTACGGTTGGAC GTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCT CAG
Белок тяжелой цепи	QVQLVESGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMH WVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFT IYRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGHYG NNYYSSYGLDVWGGQGTTVTVSS
ДНК легкой цепи	GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCC CGTCACCCCTGGAGAGGCCGCCATCTCCTGC AGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCCTGGTAATGGAT ACAACATATTGGATTGGTACCTGCAGAACGCCAGG GCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTGGGTTCTA ATCGGGCCTCCGGGTCCCTGACAGGTTAGTGG CAGTGGCTCAGGCACAGATTACACTGAAAATC AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGATTATT ACTGCATGCAAGCTCTACAAACTCCTCGGACGTT CGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAAC
Белок легкой цепи	DIVMTQSPLSLPVTPGEPAISCRSSQSLLPGNGNY LDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGIYYCMQALQTPRTFGQGTK VEIK

Таблица 13
Последовательности ДНК и белковые последовательности
зрелых вариабельных доменов антитела 24.2.1

ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
ДНК тяжелой цепи	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTG GTGAAGCCTTCGGAGACCCCTGTCCCTCACCTGCA CTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGAGGTTACTACTG GAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACT GGAGTGGATTGGGTATATCTATTACAGTGGGAGC ACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCA CCATATCAGTAGACACGGTCCAAGAACCAAGTCTC CCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCTGCGGACACG GCCGTGTATTACTGTGCGAGAAGGGGGGCCCT ACGGTGACTACGGCTGGTCGCCCTGGGCCA GGGAACCTGGTCACCGTCTCCAG
Белок тяжелой цепи	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIRGYYWS WIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRTVTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARRGGLYGDY GWFAPWGQGTLVTVSS
ДНК легкой цепи	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCCTGT CTTGTCTCCAGGGAAAGAGCCACCCCTCTCCTG CAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCACCTACTTA GCCTGGTACCAAGCAGAAACCTGCCAGGCTCCCA GGCTCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGCCAC TGGCATCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGTCT GGGACAGACTTCACCTCACCACAGCAGACTGG AGCCTGAAGATTTGCAGTGTATTACTGTCA GTATAGTAGCTTATTCACTTCGCCCTGGGACC AAAGGGATATCAAAC
Белок легкой цепи	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSTYLA WYQQKPGQAPRLIYGASSRATGIPDRFSGSGSTDF LTISRLEPEDFAVYYCQQYSSLFTFGPGTKVDIK

Таблица 14

Последовательности ДНК и белковые последовательности антитела 21.2.1

ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ (сигнальная последовательность подчеркнута)
ДНК тяжелой цепи	<u>ATGGAGTTGGGCTGAGCTGGGTTTCCCTCGTTGC</u> TCTTTAAGAGGTGTCCAGTGTCAAGGTGCAGCTG GTGGAGTCTGGGGAGGCCTGGTCCAGCCTGGG AGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTGGAT TCACCTTCAGTAGCTATGTCATGCACTGGTCCG CCAGGCTCCAGGCAAGGGCTGGAGTGGTGGC AGTTATGTCATATGATGGAAGTAGTAAATACTAT GCAAACCTCGTGAAGGGCCATTCAACCATCTCCA GAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAT AAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTAT TACTGTGCAGAGATGGGGTAAAGCAGTGCCTG GTCCCTGACTACTGGGCCAGGGAAATCCTGGTCAC CGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGTC TTCCCCCTGGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCG AGAGCACAGCGGCCCTGGCTGCCTGGTCAAGG ACTACTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGGAA CTCAGGCGCTCTGACCAGCGCGTGCACACCTTC CCAGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCT CAGCAGCGTGGTGAACCGTGCCTCCAGCAACTTC GGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATACA AGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGITG AGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCACCCTGCCCC AGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTCCTC TTCCCCCCTAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCT CCCGGACCCCTGAGGTACAGTGCCTGGTGGTGG CGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTAAC TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCA AGACAAAGCCACGGGAGGGAGCAGTTAACAGCA CGTCCGTGTGGTCAGCGCTCTCACCGTTGTCAC CAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTCTCCAACAAAGGCCCTCCAGCCCCCATCG AGAAAAACCATCTCCAAAACCAAAAGGGCAGCCCC GAGAACACAGGTGTACACCCCTGCCCTCATCCCG GGAGGAGATGACCAAGAACCGAGTCAGCTGAC CTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAAGCGACATC GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAAGCCGGAG AACAACTACAAGACCACACCTCCATGCTGGACT CCGACGGCTCTTCTTCCCTACAGCAAGCTCACC GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTC TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACCGAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCTC GGTAAATGA

Белок тяжелой цепи	<u>MEFGLSWVFLVALLRGVOCQVQLVESGGGVVQPG</u> RSLRLSCAASGFTFSSYVMHWVRQAPGKGLEWVA VMSYDGSSKYYANSVKGRFTISRDN SKNTLYLQINS LRAEDTAVYYCARDGGKAVPGPDYWGQGILVTVS SASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA LGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECP PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEK TISKTKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQOPENNYKTPPM LDSDGSSL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
ДНК легкой цепи	<u>ATGAGGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTGCTAA</u> TGCTCTGGGTCTCTGGATCCAGTGGGGATATTGT GATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCGTACCC CTGGAGAGCCGGCTCCATCTCCTGCAGGTCTAG TCAGAGTGTCTGTATAGTAATGGATAACA ACTAT TTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTC CACAGCTCCTGATCTATTGGGTCTAATCGGGCC TCCGGGGTCCCTGACAGGTTCA GTGGCAGTGGAT CAGGCACAGATTACACTGAAAATCAGCAGAGT GGAGGGCTGAGGA GTTGGGGTTATTACTGCATG CAAGTTTACAAACTCCATTCACTTCGGCCCTGG GACCAAAGTGGATATCAAACGA ACTGTGGCTGCA CCATCTGTCITCATCTCCGCCATCTGATGAGCA GTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTGTGTGCCTGC TGAATAACTCTATCCCAGAGAGGGCAAAGTACA GTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAAC TCC CAGGAGAGTGTCA CAGAGCAGGACAGCAAG GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGC TGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCT ACGCCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCTGAGCTC GCCCGTCACAAAGAGCTCAACAGGGGAGAGTG TTAG
Белок легкой цепи	<u>MRLPAQLLGLLMLWVSGSSGDIVMTQSPLSLPVTP</u> GEPASISCRSSQSVLYSNGNYLDWYLQKPGQSPQL LIYLGNSNRASGV PDRFSGSGSGTDFILKISRVEAEDV GVYYCMQVLQTPFTFGPGT KVDIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSLTLSKADYEKH K VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Таблица 15

Последовательности ДНК и белковые последовательности антитела 22.1.1

ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ (сигнальная последовательность подчеркнута)
ДНК тяжелой цепи	ATGGAGTTGGGCTGAGCTGGGTTTCCCTCGTTGC TCTTTAAGAGGTGTCCAGTGTCAAGGTGCAACTG GTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCCAGCCTGGG AGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTGGAT TCACCTTCAGTCGCTATGGCATGCACGGTCCG CCAGGCTCCAGGCAAGGGCTGGAGTGGGTGGC AGTTATATCATCTGATGGAGGTAAATAAACTAT GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCA GAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAT GAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTAT TACTGTACGAGAAGAGGGACTGGAAAGACTTACT ACCAACTACTGTGGTATGGACGTCTGGGCCAAGG GACCACGGTCACCGTCTCCCTAGCCTCCACCAAG GGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCA GGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGAC GGTGTGTTGGAACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGC GTGCACACCTTCCCAGCTGTCTACAGTCCTCAG GAECTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCC CTCCAGCAACTCGGCACCCAGACCTACACCTGC AACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTG GACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTGTGTCGAGT GCCCACCGTCCCCAGCACCCACCTGTGGCAGGACC GTCAGTCTCCTCTTCCCCCAAAACCAAGGAC ACCCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACGT GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCCG AGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGA GCAGTTCAACACGACGTTCCGTGTTGGTCAGCGTC CTCACCGTTGTGCACCAAGGACTGGCTGAACGGCA AGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCC TCCCAAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAAC CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCCACAGGTGTACAC CCTGCCCTCATCCCCGGAGGAGATGACCAAGAAC CAGGTCAAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCT ACCCCAAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA ATGGGCAGCCGGAGAACAAACTACAAGACACAC CTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCCTTCTCCTC TACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG CAGCAGGGGAACGTCTCTCATGCTCCGTGATGC ATGAGGCTCTGCACAACCAACTACACGCAGAAGA GCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGA

Блок тяжелой цепи	<u>MEEGLSWVFLVALLRGVOCQVQLVESGGGVVQPG</u> RSLRLSCAASGFTPSRYGMHWVRQAPGKGLEWVA VISSDGGNKKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRRGTGKTYHYCGMDVWQGQG TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SVVTVPSSNFTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK CCVECPCPAPPVAGPSVLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTFRVSVLTVVHWDWLNGKEYKCKVSNKG LPAPIEKTKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMILD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
ДНК легкой цепи	<u>ATGAGGGCTCCCTGCTCAAGCTCCCTGGGCTGCTAA</u> <u>TGCTCTGGGTCTCTGGATCCAGTGGGATATTGT</u> GATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCGTACCC CTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAG TCAGAGCCTCCGTATAGTAATGGATATAACTAT TTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTC CACACCTCCTGATCTATTGGGTTCTAATCGGGCC TCCGGGGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGTT CAGGCACTGATTTACACTGAAAATCAGCAGAGT GGAGGCTGAGGAATGTTGGGTTTATTACTGCATG CAAGCTCTACAAACTCCTCGGACGTTGGCCAAG GGACCAAGGTGGAAATCAAACGAACGTGGCTG CACCACATGTCTTCATCTTCCCACATCTGATGAG CAGTTGAAATCTGAACTGCCTCTGTTGTGCCT GCTGAATAACTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTA CAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA ACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCYTGAC GCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAACACAAAGT CTACGCCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCTGAGC TCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGAGAGT GTAG
Блок легкой цепи	<u>MRLPAOLLGLLMLWVSGSSGDIVMTQSPLSLPVTP</u> GEPASISCRSSQSLLYSNGNYLDWYLQKPGQSPHL LIYLGSRASGVPDFRSQSGSGTDFTLKISRVEAEDV GVYYCMQALQTPTFGQGQTKVEIKRTVAAPSVFIPP PSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQBSVTEQDSKDSTYSLSSLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Таблица 16

Последовательности ДНК и белковые последовательности антитела 23.5.1

ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ (сигнальная последовательность подчеркнута)
ДНК тяжелой цепи	<u>ATGGAGTTGGGCTGAGCTGGGTTTCCTCGTTGC</u> TCTTTAAGAGGTGTCCAGTGTCAAGGTGCAGCTG GTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCCAGCCTGGG AGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGATT CACCTTCAGTAACATATGGCATGCAGTGGTCCGC CAGGCTCCAGGCAAGGGCTGGAGTGGTGGCA ATTATATCATATGATGAAAGTAATAAAATATG CAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAG AGACAAATTCCAAGAACAGCTGTATGTGCAAATG AACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTATT ACTGTGCGAGACGCGGTCACTACGGGAGGGATT CTACTCCTACTACGGTTGGACGTCTGGGCCAA GGGACACGGTCACCGTCCTCAGCCTCCACCA AGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTC CAGGAGCACCTCCGAGAGACAGCGGCCCTGGG CTGCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTG ACGGTGTGTTGGAACCTAGGCGCTCTGACCGAGCG GCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTACAGTCCTC AGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTG CCCTCCAGCAACTTGGCACCCAGACCTACACCT GCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGG TGGACAAGACAGTTGAGCGAAATGTTGTCGA GTGCCACCGTGTCCCAGCACCACTGTGGCAGGA CCGTCACTTCCCTTCCCCCAAAACCCAAGG ACACCCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTAC GTGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCC GAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG AGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGG AGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAAGCGT CCTCACCGTTGTGACCCAGGACTGGCTGAACGGC AAGGAGTACAAGTCAAGGTCTCCAACAAAGGC CTCCCCAGCCCCATCGAGAAAACCCTCTCCAAAA CCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCCACAGGTGTACA CCCTGCCCTCATCCGGGAGGAGATGACCAAGAA CCAGGTCAAGCTGACCTGCTGGTCAAAGGCTTC TACCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGGAGAGC AATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAAGACCACA CCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCT CTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGAAACGTCTCATGCTCCGTGATG CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGA GCCTCTCCCTGCTCCGGTAAATGA

Блок тяжелой цепи	<u>MEFGLSWVFLVALLRGVOCQVQLVESGGGVVQPG</u> RSLRLSCVASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVA IISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYVQMNS LRAEDTAVYYCARRGHYGRDYYSYYGLDVWGQG TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLS SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK CCVECPPCPAPPVAGPSVLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAAKTKPRE EQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKG LPAPIEKTIISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMIL SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
ДНК легкой цепи	<u>ATGAGGGCTCCCTGCTCAGCTCCCTGGGGCTGCTAA</u> <u>TGCTCTGGGTCTCTGGATCCAGTGGGATATTGT</u> GATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCCGTACCC CTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAG TCAGAGCCTCTGCCTGGTAATGGATACAACATAT TTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTC CACAGCTCCTGATCTATTGGGTCTAATCGGGCC TCCGGGGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGAT CAGGCACAGATTTACACTGAAAATCAGCAGAGT GGAGGGCTGAGGATGTTGGGTTTATTACTGCATG CAAGCTCTACAAACTCCTCGGACGTTGGCAAG GGACCAAGGTGGAAATCAAACGAACACTGTGGCTG CACCACATCTGTCTCATCTTCCGCCATCTGATGAG CAGTTGAAATCTGGAACTGCCTSTGTTGTGTC GCTGAATAACTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTA CAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA ACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCYTGAC GCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAACACAAAGT CTACGCCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCTGAGC TCGCCCGTACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGT GTAA
Блок легкой цепи	<u>MRLPAQOLLGLIIMLWVSGSSGDIVMTQSPLSLPVTP</u> GEPASISCRSSQSLLPGNGNYLDWYLQKPGQSPQL LIYLGSNRASGPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV GVYYCMQALQTPTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTAXVCLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTSKADYEKH KVVACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Таблица 17

Последовательности ДНК и белковые последовательности антитела 23.28.1

ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ (сигнальная последовательность подчеркнута)
ДНК тяжелой цепи	<u>ATGAAACATCTGGTCTCCCTCTCCTGGTGGC</u> AGCTCCCAGATGGGTCTGTCCCAGGTGCAGCTG CAGGAGTCGGGCCAGGA <u>CTGGTGAAGCCTCGG</u> AGACCC <u>GTCCCTCACCTGC</u> ACTGTCTCTGGTGGC TCCATCAGAGGTT <u>ACTACTGGAGCTGGATCCGGC</u> AGCCCC <u>CTGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGT</u> ATATCTATTACAGTGGGAGC <u>ACCAACTACAA</u> CC CTCC <u>CTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGAC</u> ACGT <u>CCAAGAACCAAGT</u> CTCC <u>CTGAAGCTGA</u> ACT CTGTGACCG <u>CTGC</u> GGACACGGCC <u>GT</u> GTATTATG TGC <u>GAGAAAGGGGGGC</u> CTACGGT <u>GACTACGG</u> CTGGT <u>TCGCCCTGGGCCAGGGAA</u> CCCTGGT <u>AC</u> ACC <u>GTCTCC</u> T <u>AGCCTCCACCAAGGGCC</u> ATCGG TCTT <u>CCCCCTGGCGCC</u> CTG <u>CTCCAGGAGCAC</u> CTCC GAGAG <u>CACAGCGGCC</u> CTGGG <u>CTGC</u> CTGGT <u>CAAG</u> GA <u>CTACTCCCCGAA</u> CCGGT <u>GACGGTGT</u> CGTGG <u>AA</u> ACT <u>CAGGC</u> GCT <u>GTGACCA</u> GGCG <u>GTG</u> CAC <u>AC</u> CTT CCC <u>AGCTG</u> CT <u>ACAGT</u> CC <u>TCA</u> GG <u>ACTCTA</u> CTCC TCAG <u>CAGCGTGGT</u> G <u>ACCGT</u> G <u>CCCTCC</u> <u>AGCA</u> ACTT CGG <u>CACCCAGAC</u> CT <u>ACAC</u> CT <u>GC</u> AA <u>CGTAGAT</u> CAC AAG <u>CCCAGCAACACCA</u> AGGTGG <u>ACAAGACAGT</u> GAG <u>CGCAAATG</u> TT <u>GTGTC</u> G <u>AGT</u> G <u>CCCACCGT</u> G <u>CC</u> CAG <u>CACCAC</u> CT <u>GTGG</u> C <u>AGGACC</u> GT <u>CAGT</u> CT <u>CC</u> CTT <u>CCCCC</u> AAA <u>ACCAAGG</u> A <u>CAC</u> CT <u>CATG</u> AT <u>G</u> ATC T <u>CCCGGACCC</u> CT <u>GAGGT</u> C <u>ACGT</u> G <u>CGT</u> GG <u>GTGG</u> ACGT <u>GAGCC</u> ACGA <u>AGAC</u> CC <u>CGAGGT</u> CC <u>AGT</u> CAA CTGGT <u>ACGT</u> GG <u>ACGGCG</u> GT <u>GGAGGT</u> GC <u>ATA</u> AT <u>G</u> CC AAG <u>ACAAAGCC</u> ACGG <u>AGGAG</u> GC <u>AGT</u> CA <u>ACAGC</u> ACGT <u>CCGT</u> GT <u>GGT</u> C <u>AGCG</u> T <u>CC</u> T <u>ACCG</u> T <u>GT</u> GC ACC <u>AGGACTG</u> GT <u>GAAC</u> GG <u>CAAGGAGT</u> AC <u>AGT</u> G <u>CAAGGT</u> CT <u>CCAACAAAGG</u> C <u>CTCC</u> A <u>GCCCC</u> AT CG <u>AGAAAACC</u> AT <u>CTCC</u> AA <u>ACCAAGGG</u> C <u>AGCC</u> CC <u>GAGAACCACAGGT</u> GT <u>ACAC</u> CT <u>GCCCC</u> AT <u>CC</u> CGG <u>AGGAG</u> AT <u>GACCA</u> AG <u>AAACCAGGT</u> C <u>AGC</u> CT <u>G</u> AC <u>CTG</u> CC <u>GTGGT</u> CA <u>AAAGG</u> CT <u>CTAC</u> CC <u>AGCG</u> A <u>CA</u> TC <u>GCCGT</u> GG <u>AGT</u> GG <u>AGAG</u> CA <u>AT</u> GG <u>GCAGCC</u> GG AG <u>AAACA</u> ACT <u>ACAAG</u> AC <u>ACAC</u> CT <u>CCC</u> AT <u>G</u> CT <u>GG</u> CT <u>CCGACGG</u> CT <u>CTT</u> CT <u>CC</u> CT <u>CTAC</u> AG <u>CAAG</u> CT <u>CA</u> CC <u>GTGG</u> AC <u>AAAGAG</u> C <u>AGCAGGT</u> GG <u>CAGCAGGG</u> AA <u>CG</u> T <u>CTT</u> CT <u>CATG</u> GT <u>CC</u> GT <u>GATG</u> C <u>ATG</u> AG <u>GGCT</u> GT <u>CAC</u> A <u>ACCA</u> CT <u>ACAC</u> CG <u>CAGAAGAG</u> GC <u>CT</u> CC <u>CTGT</u> CT <u>CC</u> CGGGTAA <u>ATG</u> A

Белок тяжелой цепи	<u>MKHLWFFLLLVAAPRWVL</u> SQVQLQESGPGLVKPSE TLSLTCTVSGGSIRGYYW WSWIRQPPGKGLEWIGYIY YSGSTNYPNSLKSRTV TISVDTSKNQFLKLN SVTAA DTAVYYCARKGGLY GDYGWFWAPWGQGTL VT SS ASTKGPSVFPLAPCS RSTSE STAALGCLVKD YFPEPV TV SWNSGALTSGV HTFP AVLQSSGLY SLSSVV TVPS SNGTQTYTC NVDHKPSNT KVDKT VERKCC VECPP CPAPPVAGPSV FLFPPKPKD TL MISRT PEV TCV VVD VSHEDPEV QFNWY V DGVEV HNA TKP REEQFN NSTF RV VSV LT V V H QDW LNG KEY KCKV SNK GL PAIEK TIS TKG Q PRE P Q V Y TL P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T P P M L D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S P G K
ДНК легкой цепи	ATGGAAACCCAGCGCAGCTTCTCTCCCTCTGCT ACTCTGGCTCCCAGAAATCCACCGGAGAAATGTG TTGACCGAGTCCTCCAGGCACCCCTCCTGCAGGGCCAGT AGGGAAAGAGGCCACCCCTCCTGCAGGGCCAGT CAGAGTGTAGCAGCAGCGACTTAGCCTGGCACC AGCAGAAAACCTGGCCAGGCTCCAGACTCCTCAT CTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCA GACAGGTTAGTGGCAGTGGGCTGGGACAGACT TCACCTCACCATTAGCAGACTGGAGCCTGAAGA TTTGCACTGTATTACTGTCAGCAGTGTCTAGCT TATTCACCTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATAT CAAACGAACCTGGCTGCACCATCTGTCTTCATC TTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA CTGCCCTGTGTTGTCGCTGCTGAATAACTTCTAT CCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAGGTGGAT AACGCCCTCCAATGGGTAACCTCCAGGAGAGTG TCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA GCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAG ACTACGGAGAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGT CACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG AGCTTCAACAGGGAGAGTGTAG
Белок легкой цепи	METPAOLLFLLLWLPESTGEIVLTQSPGTLISLSPGE RATLSCRASQSVSSSDLAWHQQKPGQAPRLLIYGA SSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QHCRSLFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSITYSLSSTLTLKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Таблица 18
Последовательности ДНК и белковые последовательности антитела 23.29.1

ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ (сигнальная последовательность подчеркнута)
ДНК тяжелой цепи	<u>ATGGAGTTGGGCTGAGCTGGGTTTCCCTCGTTGC</u> TCTTTAAGAGGTGTCCAGTGTCAAGGTGCAACTG GTGGAGTCTGGGGAGGGCGTGGTCCAGCCTGGG AGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAT TCACCCITCAGTAGCTATGCCATGCACGTGGTCCG CCAGGCTCCAGGCAAGGGCTGGAGTGGGTGGC AGTTATATCATATGATGGAAGTAATAAACTAT GCAGACTCCGTGAAGGCCGATTCAACCATCTACA GAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAT GAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTAT TACTGTGCGAGACGCGGTCACTACGGGAATAATT ACTACTCCTATTACGGTTGGACGTCTGGGGCCA AGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACC AAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCT CCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGG GCTGCCTGGTCAAGGACTACTCCCCGAACCGGT GACGGTGTGTTGGAACTCAGGCCCTGTGACCAGC GGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTACAGTCCT CAGGACTCTACTCCTCAGCAGCGTGGTGACCGT GCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACC TGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTCG AGTGCCCAACCGTGCCAGCACCACCTGTGGCAGG ACCGTCAGTCTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAG GACACCCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTCA CGTGCCTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC CGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTG GAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAG GAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCG TCCTCACCGTTGTGCACCAAGGACTGGCTGAACGG CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGG CCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA ACCAAAGGGCAGCCCCAGAAACCACAGGTGTAC ACCTGCCCAATCCCGGGAGGAGATGACCAAGA ACCAGGTCAAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTT CTACCCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGGAGAGC AATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCCACA CCTCCCAGCTGGACTCCGACGGCTCTTCTCCT CTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGAAACGTCTCATGCTCCGTGATG CATGAGGCTCTGCACAAACCAACTACACGCAGAAGA GCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGA

Белок тяжелой цепи	<u>MEFGLSWVFLVALRGVOCQVQLVESGGGVVQPG</u> RSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVA VISYDGSNKYYADSVKGRFTIYRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARRGHYGNYYSYGLDVWQGQ GTTVTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSL SSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVER KCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPAPIEKTIKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPM LSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
ДНК легкой цепи	<u>ATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGGCTGCTAA</u> <u>TGCTCTGGGTCTCTGGATCCAGTGGGATATTGT</u> GATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCGTACCC CTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAG TCAGAGCCTCTGCCCTGGTAATGGATAACAATAT TTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTC CACAGCTCCTGATCTATTGGGCTAATCGGGCC TCCGGGGTCCCTGACAGGTTCA GTGGCAGTGGCT CAGGCACAGATTTACACTGAAAATCAGCAGAGT GGAGGGCTGAGGA TGTGGGATTATTACTGCATG CAAGCTCTACAAACTCCTCGGACGTTGGCCAAG GGACCAAGGTGGAAATCAAACGAACTGTGGCTG CACCATCTGTCCTCATCTTCCC GCCATCTGATGAG CAGTGAAATCTGAACTGCCTCTGTTGTGCGCT GCTGAATAACTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGT CAGTGGAGGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA ACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGAC GCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGT CTACGCCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGC TCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGT GTTAG
Белок легкой цепи	<u>MRLPAQLLGLLMLWVSGSSGDIVMTQSPLSLPVTP</u> GEPASISCRSSQSLLPGNGYNYLDWYLQKPGQSPQL LIYLGSNRASGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADV GIYYCMQALQTPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWRVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKH K VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

ДНК лепкой цепи (23.29.1LR174K) (SEQ ID NO:101)	<u>ATGAGGGCTCCCTGCTCAGCTCCGGGGCTGCTAA</u> <u>TGCTCTGGGTCTCTGGATCCAGTGGGGATATTGT</u> GATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCCGTACCC CTGGAGAGCCGGGCCATCTCCTGCAGGTCTAG TCAGAGCCTCCCTGCCCTGTAATGGATACAACAT TTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTC CACAGCTCCTGATCTATTTGGGTCTAATCGGGCC TCCGGGGTCCCTGACAGGGTCAGTGGCAGTGGCT CAGGCACAGATTTACACTGAAAATCAGCAGAGT GGAGGCTGAGGATGTTGGGATTATTACTGCATG CAAGCTCTACAAACTCCTCGGACGTTGGCCAAG GGACCAAGGTGGAAATCAAACGAACGTGGCTG CACCACATGTCTTCATCTCCGCCATCTGATGAG CAGTTGAAATCTGGAACTGCCCTGTGTGTGCCT GCTGAATAACTCTATCCCAGAGAGGGCAAAGTT CAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTCCAATGGGTA ACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGAC GCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAACACAAAAGT CTACGCCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCTGAGC TCGCCGTACAAAGAGCTCAACAGGGGAGAGT GTTAG
Белок лепкой цепи (23.29.1LR174K) (SEQ ID NO:101)	<u>MRLPAQLLGLLMLWVSGSSGDIVMTQSPLSLPVTP</u> <u>GEPAISICRSSQSLLPGNGNYLDWYLQKPGQSPQL</u> LIYLGSNRASGVPDFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV GIYYCMQALQTPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Таблица 19

Последовательности ДНК и белковые последовательности антитела 24.2.1

ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ (сигнальная последовательность подчеркнута)
ДНК тяжелой цепи	<u>ATGAAACATCTGGTTCTCCTCTCCTGGTGGC</u> AGCTCCCAGATGGGTCTGTCCCAGGTGCAGCTG CAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTCGG AGACCCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGC TCCATCAGAGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGGC AGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGT ATATCTATTACAGTGGGAGCACCAACTACAACCC CTCCCTCAAGAGATCGAGTCACCATATCAGTAGAC ACGTTCAAGAACCAAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTT CTGTGACCGCTCGGGACACGGCCGTGTATTACTG TGCAGAGAAGGGGGGGCCTACCGGTGACTACGG CTGGTTGCCCCCTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTC ACCGTCTCCTCAGCCTCACCACGGGCCATCGG TCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCC GAGAGCACAGGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG GACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGG ACTCAGGCCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTT CCCAGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCC TCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCAGCAACTT CGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTT GAGCGAAATGTTGTGTCAGTGCCCACCGTGCC CAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCAGTCTCCT CTTCCCCCCTGGAGGTACCGTGCCTGGTGG ACGTGAGCCACGAAGACCCCAGGTCCAGTCAA CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGITCAACAGC ACGTCCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTGTGC ACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGT GCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCAGCCCCAT CGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAGGGCAGCC CCGAGAACCAACAGGTGTACACCCCTGGCCCCATCC CGGGAGGAGATGACCAAGAACCGAGTCAGCCTG ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAAGCGACA TCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGAGCCGG AGAACAACTACAAGACCCACACCTCCATGCTGG CTCCGACGGCTCCTCTTCTACAGCAAGCTCA CCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACG TCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC AACCACACCGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC CGGGTAAATGA

Блок тяжелой цепи	<u>MKHLWFLLLVAAPRWVLSQLQESGPGLVKPSE</u> TLSLTCTVSGGSIRGYYWSWIRQPPGKGLEWIGYTY YSGSTNYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLNSVTAA DTAVYYCARKGGLYGDYGVFAPWGQGTLTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPVLQSSGLYSISSLVVTVPS SNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECAPP CPAPPVAGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEK TISKTKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMULDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
ДНК легкой цепи	<u>ATGGAAACCCAGCGCAGCTCTCTTCCCTCTGCT</u> ACTCTGGCTCCCAGAAATCCACCGGAGAAATTGTG TTGACGCAGTCTCCAGGCACCCCTGTCTTGTCTCC AGGGGAAAGAGGCCACCCCTCTCCGCAGGGCCAGT CAGAGTGTAGCAGCAGCGACTTAGCCTGGCACC AGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGACTCCTCAT CTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCA GACAGGTTCACTGGCAGTGGCTGGGACAGACT TCACTCTCACCACATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGA TTTGCACTGTATTACTGTCAGCACACTGCGTAGCT TATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATAT CAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATC TTCCCGCCATCTGATGAGCAGITGAAATCTGGAA CTGCCCTGTTGTGCTGCTGAATAACTCTAT CCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAGGGTGGAT AACGCCCTCCAATCGGTAACCTCCAGGAGAGTG TCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA GCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAG ACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGT CACCCATCAGGGCCTGAGCTGCCCGTCACAAAG AGCTTCAACAGGGAGAGTGTAG
Блок легкой цепи	<u>METPAOLLFLLLWLPESTGEIVLTQSPGTLSSLSPGE</u> RATLSCRASQSVSSSDLAWHQHQKPGQAPRLLIYGA SSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYC QHCRSLFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGBC

Таблица 20

Последовательности ДНК и белковые последовательности
зрелых вариабельных доменов антитела 22.1.1H-C109A

ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ (сигнальная последовательность подчеркнута)
ДНК тяжелой цепи (SEQ ID NO:95)	CAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGAGGC GT TG GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCCTCTGGATT CAC CTTCAGTCGCTATGGCAT GCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGCTG GAGTGGGTGGCAGTTATATCATCTGATGGAGGT A ATAAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATT CACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTG TATCTGCAAATGAACAGC CT GAGAGCTGAGGACA CGGCTGTGTATTACTGTACGAGAAGAGGGACTGG AAAGACTTAC TA CCACTACGCCGTATGGACGTC TGGGCCAAGGGACCACGGT C ACCGTCTCCTCAG
Белок тяжелой цепи (SEQ ID NO:96)	QVQLVESGGVVQ P GRSLRLSCAASGFTFSRYGMH WVRQAPGKGLEWVA V ISDGGN K YYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA V YYCTRRGTGKT YYHYAGMDVWGQGTTVTVSS

Таблица 21

Последовательности ДНК и белковые последовательности
зрелых вариабельных доменов антитела 23.28.1L-C92A

ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ (сигнальная последовательность подчеркнута)
ДНК легкой цепи (SEQ ID NO:99)	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCC T TG CTTGTC T CCAGGGAAAGAGCCACCC T TG CAGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCAGCGACTTA GCCTGGCACCA G CAGAAAC T GGCCAGGCTCCCA GA T CC T CATCAT T GGTGCATCCAGCAGGGCCAC TGGCATCCCAGACAGGTT C AGTGGCAGTGGTCT GGGACAGACTCACTCTCACCATCAGCAGACTGG AGCCTGAAGA T TTGCAGTGTATTACTGT C AGCA CGCCCGTAGCTATTCA T T C GGCC T GGGACC AAAGTGGATATCAAAC
Белок легкой цепи (SEQ ID NO:100)	EIVLTQSPGTL S PG E ATLSCRASQSVSSDLAWH Q Q KPGQAPRL L IY G ASSRATGIPDRFSGSG G TDF L TISRLEPEDFAVYYCQH A RS L FTFGPGTKVDIK

Пример III.

Анализ аминокислотных замен тяжелой и легкой цепи.

На фиг. 1D-1H и 2D-2H представлено выравнивание последовательностей между предсказанными аминокислотными последовательностями вариабельного домена тяжелой цепи моноклональных антител 3.1.1, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.28.1, 23.28.1L-D16E, 23.29.1 и 24.2.1-антитела, и аминокислотными последовательностями их соответствующих генов клеток зародышевой линии. Большинство CDR3-участков тяжелой цепи содержат аминокислотные вставки.

Ген DLR1, используемый для V_H-домена антитела 21.4.1, кодирует два цистеиновых (Cys) остатка. Масс-спектрометрический анализ и моделирование гомологии демонстрируют, что два Cys-остатка связаны дисульфидной связью, и что данная дисульфидная связь не нарушает структуру данного антитела.

На фиг. 1A-1C и 2A-2C представлено выравнивание последовательностей между предсказанными аминокислотными последовательностями вариабельного домена легкой цепи моноклональных антител 3.1.1, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 23.5.1, 23.28.1, 23.28.1L-C92A, 23.29.1 и 24.2.1-клонов, и аминокислотными последовательностями их соответствующих генов клеток зародышевой линии. Легкие цепи этих антител получены из трех разных V_k-генов. Семь из одиннадцати антител используют V_k-ген A3/A19, шесть из которых обладает двумя мутациями на участке CDR1. Кроме того, пять из семи антител, которые используют V_k-ген A3/A19, также используют V_k-ген; у всех этих антител первая аминокислота, производимая J_k-геном, последовательно заменена с W на R.

Следует иметь в виду, что многие из вышеперечисленных аминокислотных замен или вставок существуют в непосредственной близости или в пределах CDR. По-видимому, такие замены оказы-

вают некоторое влияние на связывание данного антитела с CD40-молекулой. Кроме того, такие замены могли бы оказывать существенное влияние на сродство данных антител.

Пример IV.

Перекрестная реактивность видов антител настоящего изобретения.

Осуществляют FACS-анализ для определения связывания и сродства антител настоящего изобретения с CD40 разных видов животных, в частности, некоторых видов обезьян Старого Света. Аликвоты цельной крови человека и обезьяны инкубируют в течение 1 ч на льду с увеличивающимися концентрациями проиллюстрированных здесь антител настоящего изобретения к CD40, или с антителом к гемоцианину запирающейся улитки-блюдечка (KLH) в качестве негативного контроля. Затем данные образцы инкубируют в течение 30 мин на льду с антителами человека к IgG2, конъюгированными с RPE (фика-эритрином). Проточной цитометрией измеряют CD19/CD20-позитивные В-клетки и с использованием программного обеспечения CellQuest анализируют гистограммы интенсивности флуоресценции (F12-H) в зависимости от числа клеток (Counts). По графикам средней интенсивности флуоресценции, в зависимости от концентрации антител, оценивают связывание (K_D) для каждого антитела. Истощение антител контролируют путем измерения связывания в ряду клеточных концентраций.

Тестируют связывание антител 3.1.1, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1 и 21.4.1 с В-клетками человека, резус-макака и супомолгус. Тестируют также связывание антител 21.2.1, 22.1.1, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.29.1 и 24.2.1 с В-клетками человека и супомолгус.

Наблюдают, что максимальный сигнал и концентрация для половины максимального связывания антител с клетками обезьяны находятся в пределах коэффициента, изменяющего свое значение от двух единиц и до значения соответствующих параметров для В-клеток человека. Связывание не наблюдается в аналогичных экспериментах для крови мыши, крысы, кролика и собаки.

Пример V. Селективность антител по CD40.

Для определения селективности антител настоящего изобретения в отношении CD40 осуществляют другой *in vitro*-анализ.

ИФА-селективность по CD40. Материалы и методы.

96-луночный FluoroNUNC-планшет (Nunc Cat № 475515) покрывают четырьмя антигенами: CD40/Ig, CD44/Ig, RANK/Ig, 4-1BB/Ig, TNFR-1/Ig и TNFR-2/Ig (антигены собственного изготовления), в течение ночи при +4°C по 100 мкл/лунку, из расчета 1 мкг/мл в 0,1 М натрийбикарбонатном буфере, pH 9,6.

Затем этот планшет промывают три раза PBST (PBS + 0,1% Твин-20), и промытый планшет блокируют с помощью PBST+0,5%BSA в концентрации 150 мкл/лунку. Блокированный планшет инкубируют при комнатной температуре в течение 1 ч, после чего промывают трижды PBST. Далее, разбавляют полученные в примере I антитела против CD40 до концентрации 1 мкг/мл и приливают разбавленные антитела в этот планшет. Инкубируют данный планшет при комнатной температуре в течение 1 ч, затем трижды промывают PBST. После этого для блокирования обрабатывают данные лунки, которые содержат антитела, полученные в примере I, с помощью 100 мл/лунку конъюгированных с HRP антител к IgG2 человека (Southern Biotech Cat № 9070-05) в разведении 1:4000. Кроме того, один ряд лунок обрабатывают антителом к IgG человека (Jackson Cat № 209-035-088), разведенного 1:5000 для блокирования и добавляемого в количестве 100 мкл/лунку для нормализации сенсибилизации планшета. Один ряд лунок обрабатывают также конъюгированным с HRP антителом человека к CD40 (Pharmingen Cat № 345815/Custora HRP conjugated) с разведением 0,05 мкг/мл в качестве позитивного контроля. Данный планшет инкубируют при комнатной температуре в течение 1 ч и затем трижды промывают PBST. К 100 мкл/лунку добавляют TMB-субстрат (K & P Labs) и этот планшет инкубируют в течение 5-10 мин. Затем прочитывают инкубированный планшет с использованием спектрофотометра Spectra-Max™. Полученные результаты свидетельствуют о том, что данные антитела обладают селективностью в отношении CD40 по меньшей мере в 100 раз выше, чем их селективность в отношении RANK, 4-1BB, TNFR-1 и TNFR-2, для которых специфичный сигнал CD4-- (CD40-сигнал минус фон) по меньшей мере 100X выше, чем соответствующий сигнал для других молекул.

Пример VI. Изучение классификации эпитопов.

Продемонстрировав, что антитела настоящего изобретения селективны в отношении CD40, осуществляют анализ конкурентного связывания с использованием BIAcore и FACS.

Изучение BIAcore-конкуренции.

Осуществляют BIAcore-конкурентное исследование, чтобы определить, связываются ли антитела настоящего изобретения к CD40 с одними и теми же или с разными участками на молекуле CD40.

В данных экспериментах используют прибор BIAcore 2000, следуя протоколам производителя. На поверхностях сенсорного чипа BIAcore иммобилизуют белок-А. CD40-Ig в насыщающей концентрации, который включает внеклеточный домен CD40, связывают с сенсорным чипом. Затем связывают агонист первого антитела человека настоящего изобретения к CD40, коммерческое антитело к CD40 или CD40L с сенсорным чипом, содержащим связанный в насыщающих условиях CD40. После этого измеряют способность агониста второго антитела человека настоящего изобретения к CD40 конкурировать с указан-

ным первым антителом, коммерческим антителом или CD40L за связывание с CD40. Данный метод позволяет определить антитела с разными связывающими группами. Связывание с CD40 свидетельствует об узнавании независимого эпитопа. Отсутствие связывания может свидетельствовать об узнавании одного и того же эпитопа, или о перекрывании эпитопов.

FACS-исследования.

Осуществляют FACS-исследования, чтобы определить, связываются ли антитела человека настоящего изобретения к CD40 с одним и тем же или с разными участками на данной CD-молекуле, и связываются ли они с одним и тем же или отличающимся участком на CD-молекуле, как у коммерчески доступных антител к CD40 EA5 (Alexis Cat. № ANC-300-050), LOB7/6 (Serotec MCA/590PE) и 5C3 (Pharminogen # 555458 (немеченный) и 555460 (меченный PE для FACS)).

Контрастноокрашенные дендритные клетки, обработанные антителами к CD40 настоящего изобретения, мечтят на льду в течение 30 мин с помощью PE-меченого антитела EA5 или PE-меченого антитела LOB7/6. После промывки окрашенные клетки анализируют на B-D-калибровочном цитометре. Уменьшенное связывание коммерческих антител интерпретируют в качестве указания того, что данное тестируемое антитело связано с одним и тем же, или с перекрывающимся эпитопом.

Анализ конкурентного связывания с помощью BIAcore и FACS показывает, что эпитопы, распознаваемые монат 21.4.1-антителами, перекрываются с эпитопом, распознаваемым EA5-антителом, но не перекрываются с эпитопом, распознаваемым коммерчески доступным LOB7/6-антителом, и не перекрываются с сайтом, связывающим CD40L.

Эпитопы, распознаваемые остальными антителами перекрываются с сайтом, связывающим CD40L.

В табл. 22 суммированы результаты изучения классификации эпитопов.

Таблица 22

BIAcore-конкурентная классификация эпитопов некоторых антител к CD40 настоящего изобретения

	EA5	5C3	LOB7/6	3.1.1, 21.2.1, 22.1.1, 23.5.1, 23.29.1	21.4.1	23.25.1, 23.28.1, 24.2.1	CD40L
EA5	X	X			X		X
5C3	X	X			X	X	X
LOB7/6			X	X		X	X
3.1.1, 21.2.1, 22.1.1, 23.5.1, 23.29.1,			X	X			X
21.4.1	X	X			X		
23.25.1, 23.28.1, 24.2.1		X	X			X	X
CD40L	X	X	X	X		X	X

Пример VII.

Регуляция поверхностных молекул антителами к CD40.

Осуществляют анализ цельной крови, чтобы выяснить регулируют ли антитела к CD40 настоящего изобретения экспрессию молекул на поверхности В-клеток.

Цельную кровь человека или обезьяны разбавляют 1:1 средой RPMI и инкубируют 24 ч с разными концентрациями агониста CD40-антител или контрольными антителами. Клетки окрашивают в течение 30 мин (на льду, в темноте) на HLA-DR, ICAM, B7-1, B7-2, CD19/CD20, CD40, CD23 и CD71 с использованием коммерчески доступных реагентов для флуорохромного мечения антител. Затем окрашенные клетки анализируют на FACS-калибраторе (Becton-Dickinson). В-клетки идентифицируют путем пропускания через CD19- или CD20-позитивные клетки, а активацию маркеров определяют по этому прохождению.

Максимальное кратное увеличение средней флуоресценции (при ≤ 1 мкг/мл антитела), и среднюю EC₅₀, получают с использованием одного из заявленных в настоящем изобретении антител к CD40 (21.4.1), которые представлены в табл. 23.

Таблица 23

Регуляция молекул на поверхности В-клеток с помощью антитела к CD40 настоящего изобретения

	Максимальная кратность увеличения	EC ₅₀ (нг/мл)
	Средняя +/- ст. откл.	Средняя +/- ст. откл.
MHC II	4,50+/-0,52	3,85+/-0,35
CD71	2,30+/-0,77	0,73+/-0,28
ICAM	4,52+/-2,42	15,3+/-7,3
CD23	69,9+/-25,8	19,0+/-4,4
B7-2	2,74+/-0,14	16,0+/-21,9

Осуществляют также эксперименты по определению способности антител человека к CD40 настоящего изобретения регулировать экспрессию молекул на поверхности происходящей из моноцита дендритной клетки.

Получение моноцит-производных дендритных клеток.

Периферическую кровь собирают от здоровых людей-добровольцев. Выделяют моноядерные клетки с использованием пробирок Sigma Accuspin (St. Louis, MO), которые ополаскивают средой RPMI (Gibco BRL, Rockville, MD) и помещают их в колбы для тканевого культивирования с концентрацией клеток 5×10^6 /мл в полной среде RPMI (содержащей 100 Ед./мл пенициллина/стрептомицина, 10 mM буфера HEPES, 2 mM глутамина, 0,1 mM заменимых аминокислот; все от Gibco BRL); и 10% околоплодной сыворотки теленка (Hyclone, Logan, Utah). После 3 ч инкубации при 37°C (5% CO₂), удаляют не прилипшие клетки и выделяют Т-клетки с использованием селективных колонок (R&D systems, Minneapolis, MN). Прилипшие клетки промывают средой RPMI и инкубируют в течение 7 дней в полной среде RPMI с добавлением 10 нг/мл IL-4 (R&D systems) и 100 нг/мл GM-CSF (R&D systems). Затем выделяют не прилипшие клетки и применяют их во всех экспериментах в качестве моноцит-производных дендритных клеток (mDC). Оставшиеся прилипшие клетки удаляют с использованием трипсина/ЭДТА и применяют в экспериментах, использующих прилипшие моноциты.

Для определения способности антител к CD40 настоящего изобретения регулировать экспрессию маркеров клеточной поверхности, моноцит-производные дендритные клетки культивируют с разными концентрациями агонистов антител в течение 48-72 ч с последующим окрашиванием (30 мин на льду, в темноте) на наличие HLA-DR, ICAM, B7-1, B7-2, CD40 и CD83 с использованием коммерчески доступных меченых флуорохромом антителенных реагентов. Затем окрашенные клетки анализируют на FACS-калибраторе (Becton-Dickinson).

Максимальная кратность увеличения средней флуоресценции (при ≤ 1 мкг/мл антитела) и среднее EC₅₀, получаемые с использованием одного из заявленных в настоящем изобретении антител к CD40 (21.4.1), представлены в табл. 24.

Таблица 24

Регуляция молекул на поверхности дендритных клеток с помощью антитела настоящего изобретения к CD40

	Максимальная кратность увеличения	EC ₅₀ (нг/мл)
	Среднее +/- ст. откл.	Среднее +/- ст. откл.
MHC II	7,7+/-5,6	252+/-353
CD83	36,3+/-42,2	233+/-262
ICAM	10,4+/-4,8	241+/-140
B7-2	21,9+/-9,4	71,4+/-44,4

Аналогичные эксперименты осуществляют с В-клетками и mDC с использованием разных антител настоящего изобретения к CD40 и дополнительных маркеров. Измеряют экспрессию молекул на поверхности В-клеток (MHC-II, ICAM, B7-1, B7-2 и CD23), как описано выше, но с использованием 1 мкг/мл антитела к CD40. Результаты данного эксперимента представлены в табл. 25. Экспрессию молекул на поверхности дендритных клеток (MHC-II, ICAM, B7-1, B7-2 и CD83) измеряют через 72 ч, как указано выше, но с использованием 1 мкг/мл антитела к CD40. Результаты данного эксперимента представлены в табл. 26. В табл. 25-26 представлены кратность увеличения средней интенсивности±стандартное отклонение.

Таблица 25

Регуляция молекул на поверхности В-клеток с помощью
антител настоящего изобретения к CD40

	MHC, Класс II	ICAM (CD54)	B7-1 (CD80)	B7-2 (CD86)	CD23
	В-клетка	В-клетка	В-клетка	В-клетка	В-клетка
3.1.1	3,2+/-2,6	1,3+/-0,2	1,7+/-0,2	1,2+/-0,4	5,6+/-4,8
21.2.1	1,2+/-0,2	1,3+/-0,9	0,9+/-0,5	1,0+/-0,04	1,0+/-0,1
21.4.1	3,6+/-3,0	5,0+/-3,0	1,9+/-0,8	1,8+/-0,7	21,5+/-34,8
22.1.1	1,4+/-0,5	1,1+/-0,2	1,2+/-0,3	1,0+/-0,1	1,3+/-0,2
23.5.1	1,4+/-0,5	1,1+/-0,2	1,4+/-0,6	1,0+/-0,1	1,1+/-0,2
23.25.1	2,5+/-1,1	2,5+/-0,9	1,6+/-0,4	1,3+/-0,2	4,3+/-2,3
23.28.1	1,1+/-0,2	1,1+/-0,2	1,8+/-0,6	1,0+/-0,1	1,1+/-0,4
23.29.1	1,2+/-0,2	1,0+/-0,2	1,3+/-0,6	0,9+/-0,2	1,1+/-0,1
24.2.1	1,8+/-1,0	1,6+/-0,8	1,1+/-0,4	1,1+/-0,2	0,9+/-0,6

Таблица 26

Регуляция молекул на поверхности дендритных клеток
с помощью антител настоящего изобретения к CD40

	MHC, Класс II	ICAM (CD54)	B7-1 (CD80)	B7-2 (CD86)	CD23
	DC	DC	DC	DC	DC
3.1.1	4,4+/-2,4	1,5+/-0,7	1,8+/-0,9	23,7+/-33,5	15,2+/-18,2
21.2.1	1,8+/-1,3	1,5+/-0,9	0,9+/-0,4	7,4+/-10,5	10,8+/-16,5
21.4.1	5,0+/-3,8	3,7+/-1,4	1,5+/-1,1	12,9+/-13,3	48,6+/-49,5
22.1.1	2,3+/-1,2	1,6+/-0,7	1,4+/-1,0	16,3+/-25,5	12,0+/-17,0
23.5.1	2,3+/-1,8	1,2+/-0,5	1,1+/-0,6	10,7+/-17,5	9,2+/-11,1
23.25.1	2,1+/-1,8	2,4+/-1,0	1,1+/-0,5	3,3+/-4,2	13,6+/-28,9
23.28.1	2,4+/-1,7	2,7+/-2,1	1,3+/-0,6	10,6+/-17,5	18,3+/-22,6
23.29.1	2,0+/-1,5	1,2+/-0,4	0,9+/-0,5	8,4+/-10,6	10,6+/-13,1
24.2.1	4,7+/-3,0	2,1+/-1,2	3,8+/-3,8	56,6+/-95,8	31,2+/-28,4

В табл. 27 сравнивают регуляцию молекул клеточной поверхности дендритных клеток относительно В-клеток по соотношению среднего кратного увеличения в дендритных клетках относительно среднего кратного увеличения в В-клетках.

Таблица 27

Регуляция молекул клеточной поверхности
дендритных клеток относительно В-клеток

	B7-1 (CD80)	B7-2 (CD86)	MHC, Класс II	ICAM (CD54)
3.1.1	1,08	19,40	1,38	1,15
21.2.1	1,01	7,37	1,49	1,12
21.4.1	0,77	7,04	1,37	0,74
22.1.1	1,18	16,36	1,61	1,44
23.5.1	0,83	10,54	1,59	1,06
23.25.1	0,66	2,57	0,85	0,98
23.28.1	0,71	10,81	2,16	2,57
23.29.1	0,73	9,07	1,66	1,23
24.2.1	3,48	52,30	2,64	1,35

Пример VIII.

Усиление секреции цитокинов.

Осуществляют анализ моноцит-производных дендритных клеток, чтобы выяснить, усиливают ли антитела человека к CD40 настоящего изобретения секрецию IL-12p40, IL-12p70 и IL-8.

Моноцит-производные дендритные клетки и адгезивные моноциты получают, как описано выше.

Клетки культивируют в присутствии антитела настоящего изобретения к CD40 (21.4.1) или с гемоцианином запирающейся улитки-блюдечка (KLN). Через 24 ч в супернатантах измеряют содержание данных цитокинов с помощью ИФА (R&D systems). В некоторых исследованиях (см. табл. 28) моноцит-производные дендритные клетки обрабатывают данным антителом, которое костимулируют либо 100 нг/мл LPS (Sigma), 1000 Ед./мл IFN γ (R&D systems) или 25 нг/мл IL-1 β (R&D systems).

Антитело к CD40 усиливает образование IL-12p40, IL-12p70 и IL-8 и в моноцит-производных дендритных клетках и в адгезивных моноцитах. Присутствие LPS дополнительно усиливает образование IL-12p40 и IL-12p70. И только в супернатантах дендритных клеток, инкубируемых с изотипом контрольного антитела к KLN, детектируются минимальные уровни цитокинов. Репрезентативные результаты представлены в табл. 28 и на фиг. 3 и 4. В табл. 28 суммируются данные по основным цитокинам, производимым дендритными клетками или адгезивными моноцитами, под воздействием 1 мкг/мл антитела настоящего изобретения к CD40 (21.4.1) \pm 100 нг/мл LPS. Как показано на фиг. 3, антитело к CD40 усиливает образование IL-12p40, благодаря дендритным клеткам человека. Фиг. 4 иллюстрирует усиленное образование IL-12p70, благодаря дендритным клеткам человека в присутствии данного антитела и 100 нг/мл LPS.

Таблица 28

Усиление секреции IL-12p40, IL-12p70 и IL-8 под воздействием антитела настоящего изобретения к CD40

Тип клетки	Обработка		Индуцируемый цитокин		
	Антитело 1 мкг/мл	LPS 100 нг/мл	IL-12p40 пг/мл	IL-12p70 пг/мл	IL-8 пг/мл
Дендритные клетки	21.4.1	+	32252	1000	НО
	21.4.1	-	1200	76	1200
	анти-KLN	+	14280	352	НО
Адгезивный моноцит	анти-KLN	-	200	4	150
	21.4.1	-	НО	НО	7000
	21.4.1	+	НО	425	НО
	анти-KLN	-	НО	НО	400
	анти-KLN	+	НО	30	НО

НО = не определено

Аналогичные эксперименты осуществляют с использованием многих антител настоящего изобретения к CD40. Моноцит-производные дендритные клетки получают, как описано выше, и культивируют в присутствии разных концентраций антител к CD40 и костимулируют с помощью 100 нг/мл LPS (Sigma). Содержание IL-12p70 измеряют в супернатанте через 24 ч с помощью ИФА (R&D systems) и для каждого антитела определяют EC₅₀. Результаты данных экспериментов представлены в табл. 29.

Таблица 29

Усиление секреции IL-12p70 дендритными клетками

Клон антитела	DC IL-12p70	
	EC ₅₀ мкг/мл	Max пг/мл
21.4.1	0,3	1796-7004
22.1.1	0,1	720-1040
23.25.1	0,2	540-960
23.5.1	0,1	676-1112
24.2.1	0,2	754-3680
3.1.1	0,2	668-960
23.28.1	0,2	1332-1404
23.29.1	0,1	852-900
21.2.1	0,03	656-872

Протестирована также способность антител настоящего изобретения против CD40 усиливать секрецию гамма-IFN Т-клеток в анализе аллогенных Т-клеток/дендритных клеток. Для осуществления данного анализа из периферической крови здоровых добровольцев выделяют Т-клетки и моноциты. Моно-

циты дифференцируют на дендритные клетки с использованием вышеописанных способов. 1×10^5 Т-клеток, полученных от индивида, культивируют с 1×10^5 дендритными клетками, полученными от разных индивидов в присутствии антитела настоящего изобретения к CD40 или в присутствии контрольного антитела. После 4 дней культивирования, полученные супернатанты анализируют с помощью ИФА относительно секреции гамма-IFN. Результаты данного анализа представлены в табл. 30.

Таблица 30

Усиление секреции гамма-IFN с помощью антител
настоящего изобретения к CD40

Клон антитела	Алло-DC/INF γ	
	EC ₅₀ мкг/мл	Макс пг/мл
21.4.1	0,3	212
22.1.1	0,3	110-180
23.25.1	0,3	180-232
23.5.1	0,2	150-240
24.2.1	0,2	111-194
3.1.1	0,1	100-195
23.28.1	0,2	120-190
23.29.1	0,3	134-150
21.2.1	0,03	230-256

Пример IX.

Индукция воспалительных цитокинов антителами настоящего изобретения к CD40.

Антитела 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1 и 3.1.1 тестируют в анализе по высвобождению цитокинов в цельной крови, описанном у Wing et al., Therapeutic. Immunol. 2:183-90 (1995), чтобы определить, индуцируются ли воспалительные цитокины под воздействием антител в концентрации 1, 10 и 100 мкг/мл. С данными антителами при указанных концентрациях в крови от 10 нормальных доноров существенного высвобождения TNF- α , IL-1 β , IFN- γ или IL-6 не наблюдается.

Пример X.

Усиление иммуногенности клеточной линии Ju с помощью антител к CD40.

CD-позитивные JIYOYE-клетки (ATCC CCL 87) ("Ju-клетки") культивируют и поддерживают в RPMI-среде. JIYOYE-клетки инкубируют в течение 24 ч с антителом настоящего изобретения к CD40 (21.4.1), или с изотипом соответствующего антитела (против KLH), в полной RPMI-среде. Затем клетки промывают и обрабатывают 25 мг митомицина С (Sigma)/7 мл среды в течение 60 мин. Затем эти клетки инкубируют с выделенными Т-клетками человека в соотношении 1:100 в течение 6 дней при 37°C (5% CO₂). После этого Т-клетки собирают, промывают и определяют уровень CTL-активности против JIYOYE-клеток, недавно помеченных ⁵¹хромом (New England Nuclear, Boston, MA). Специфическую CTL-активность вычисляют в виде % специфического цитолиза=(цитолиз Ju (с rpt) - спонтанный цитолиз (с rpt))/(полный цитолиз (с rpt) - спонтанный цитолиз (с rpt)).

Как следует из иллюстрации на фиг. 5, антитело настоящего изобретения к CD40 (21.4.1) существенно повышает иммуногенность против Ju-клеток, обработанных с помощью данного антитела.

Пример XI.

Животная модель опухоли.

Для дальнейшего исследования противоопухолевой активности антител к CD40, сделанных в соответствии с настоящим изобретением, создают SCID-beige-мышиную модель для проверки *in vivo* влияния данного антитела на рост злокачественной опухоли.

Из Charles River получают SCID-beige-мышей и в течение недели акклимируют их перед использованием в опыт. Клетки опухоли Daudi-клетки (ATCC CCL 213), CD40(-), K562-клетки (ATCC CCL 243) и CD40(+) Raji-клетки (ATCC CCL 86), злокачественные клетки молочной железы BT474 (ATCC HTB 20) или PC-3-клетки предстательной железы (ATCC CRL 1435) инъектируют подкожно в концентрации 1×10^7 клеток/животное. В некоторых случаях Т-клетки (5×10^5) и дендритные клетки (1×10^5) от одного и того же человека-донора инъектируют вместе с клетками опухоли. Инъектируют также антитело настоящего изобретения к CD40, или соответствующий контрольный изотип (против KLH), внутрибрюшинно, непосредственно перед инъекцией клеток опухоли (только одна инъекция). Затем измеряют рост опухоли. Конкретные эксперименты описываются ниже.

В одном из экспериментов инъектируют антитело настоящего изобретения к CD40 (21.4.1), или соответствующий контрольный изотип (против KLH), внутрибрюшинно, в дозе 10 мг/кг непосредственно

перед инъекцией клеток опухоли (только одна инъекция). Клетки опухоли (Daudi-клетки) инъецируют подкожно в концентрации 1×10^7 клеток/животное. Рост опухоли измеряют с помощью штангенциркуля на 17, 19, 20, 21, 25, 26, 27 и 28 дни после имплантации в присутствии Т-клеток человека и дендритных клеток. Как показано на фиг. 6, антитело к CD40 подавляет рост опухоли, примерно, на [60]%.

В другом эксперименте антитело настоящего изобретения к CD40 (21.4.1), или соответствующий контрольный изотип (против KLH), инъецируют внутрибрюшинно в дозе 0,1 мг/кг или 10 мг/кг непосредственно перед инъекцией клеток опухоли (только одна инъекция). Клетки опухоли (K562-клетки) инъецируют подкожно в концентрации 1×10^7 клеток/животное. В данном эксперименте Т-клетки (5×10^5) и дендритные клетки (1×10^5) от одного и того же человека-донора инъецируют вместе с клетками опухоли. Рост опухоли измеряют с помощью штангенциркуля на 17, 19, 20, 21, 25, 26, 27 и 28 день после имплантации. Как показано на фиг. 7, антитело к CD40 ингибирует рост опухоли на 60-85%.

В другом эксперименте антитело настоящего изобретения к CD40 (21.4.1, 23.29.1 или 3.1.1), или соответствующий контрольный изотип (против KLH), инъецируют внутрибрюшинно непосредственно перед инъекцией клеток злокачественной опухоли (только одна инъекция). Соответствующий контрольный изотип данного антитела и антитело 21.4.1 инъецируют в дозе 1 мг/мл. Антитела 23.29.1. и 3.1.1 инъецируют в дозе 0,1, 0,01, 0,001 или 0,0001 мг/кг. Клетки злокачественной опухоли (K562-клетки) инъецируют подкожно в концентрации 1×10^7 клеток/животное. В данном эксперименте Т-клетки (5×10^5) и дендритные клетки (1×10^5) от одного и того же человека-донора инъецируют вместе с данными клетками злокачественной опухоли. Затем с помощью штангенциркуля измеряют рост злокачественной опухоли на 28-й день после имплантации. Результаты данного эксперимента представлены на фиг. 8 и 9. Каждая точка на этих фигурах соответствует измерению на отдельном животном.

В другом эксперименте антитело настоящего изобретения к CD40 (21.4.1), или соответствующий контрольный изотип (против KLH), инъецируют внутрибрюшинно непосредственно перед инъекцией клеток опухоли (только одна инъекция). Указанные антитела инъецируют в дозе 0,1, 0,01, 0,001 или 0,0001 мг/кг. Клетки опухоли (Raji-клетки) инъецируют подкожно в концентрации 1×10^7 клеток/животное. Некоторым животным Т-клетки (5×10^5) и дендритные клетки (1×10^5) от одного и того же человека-донора инъецируют вместе с данными клетками опухоли. Затем на 28-й день после имплантации измеряют рост опухоли с помощью штангенциркуля. Результаты данного эксперимента представлены на фиг. 10. Каждая точка на этих фигурах соответствует измерению на отдельном животном.

Еще в одном эксперименте антитело настоящего изобретения к CD40 (21.4.1, 23.28.1, 3.1.1 или 23.5.1), или соответствующий контрольный изотип (против KLH), инъецируют внутрибрюшинно непосредственно перед инъекцией клеток опухоли (только одна инъекция). Указанные антитела инъецируют в дозе 1 или 0,1 мг/кг. Клетки опухоли (Raji-клетки) инъецируют подкожно в концентрации 1×10^7 клеток/животное. Затем на 28-й день после имплантации измеряют рост опухоли с помощью штангенциркуля. Результаты данного эксперимента представлены на фиг. 11. Каждая точка на данной фигуре соответствует измерению на отдельном животном.

Еще в одном эксперименте антитело настоящего изобретения к CD40 (21.4.1, 23.29.1 или 3.1.1), или соответствующий контрольный изотип (против KLH), инъецируют внутрибрюшинно непосредственно перед инъекцией клеток опухоли (только одна инъекция). Указанные антитела инъецируют в дозе 1 мг/кг. Клетки опухоли (BT474-клетки злокачественной опухоли молочной железы) инъецируют подкожно в концентрации 1×10^7 клеток/животное. Т-клетки (5×10^5) и дендритные клетки (1×10^5) от одного и того же донора инъецируют вместе с данными клетками опухоли. Затем с помощью штангенциркуля измеряют рост злокачественной опухоли на 39-й день после имплантации. Как показано на фиг. 12, все указанные антитела ингибируют рост злокачественной опухоли молочной железы. Каждая точка на данной фигуре соответствует измерению на отдельном животном.

Еще в одном эксперименте антитело настоящего изобретения к CD40 (3.1.1), или соответствующий контрольный изотип (против KLH), инъецируют внутрибрюшинно непосредственно перед инъекцией клеток опухоли (только одна инъекция). Указанные антитела инъецируют в дозе 1 мг/кг. Клетки опухоли (PC-3-клетки опухоли предстательной железы) инъецируют подкожно в концентрации 1×10^7 клеток/животное. Затем с помощью штангенциркуля измеряют рост опухоли на 41-й день после имплантации. Как показано на фиг. 13, антитело к CD40 ингибирует рост опухоли предстательной железы, примерно, на 60%. Каждая точка на данной фигуре соответствует измерению на отдельном животном.

Пример XII.

Выживаемость SCID-beige-мышей, инъецированных Daudi-клетками опухоли и обработанных антителами настоящего изобретения к CD40.

В другом эксперименте мышей инъецируют антителом настоящего изобретения к CD40, или соответствующим контрольным изотипом (одна инъекция), внутрибрюшинно, непосредственно перед инъекцией клетками опухоли. Данные антитела инъецируют в дозе 1 или 0,1 мг/кг. Клетки опухоли (Daudi-клетки) инъецируют внутривенно в дозе 5×10^6 клеток/животное. Затем наблюдают за выживаемостью животного. Как показано на фиг. 14, все испытываемые антитела к CD40 пролонгируют выживаемость мышей, инъецированных клетками опухоли по меньшей мере на шесть дней.

В табл. 31 представлены ED₅₀ антител к CD40 в разных моделях солидной опухоли, описанных в примере XI. В табл. 31 суммирована противоопухолевая активность *in vivo* некоторых антител настоящего изобретения к CD40 у SCID-мышей. Кроме того, в данной таблице приведены ED₅₀ антител к CD40 для модели системной злокачественной опухоли Daudi, описанной выше в примере XII.

Таблица 31

ED₅₀ антител настоящего изобретения к CD40 при использовании различных *in vivo*-моделей опухоли у SCID-мышей

Антитело	CD40 (-) K562 & T/DC подкожно (мг/кг)	CD40 (+) Raji & T/DC подкожно (мг/кг)	CD40 (+) Raji подкожно (мг/кг)	CD40 (+) Daudi внутривенно (мг/кг)
21.4.1	0,005	0,0008	0,016	0,1
22.1.1	0,01	НО	>1,0	0,1
23.25.1	≥1,0	НО	>1,0	НО
23.5.1	>1,0	НО	≥1,0	НО
24.2.1	>1,0	НО	>1,0	НО
3.1.1	0,02	НО	≥0,1	≤0,1
23.28.1	>1,0	НО	≥0,1	0,1
23.29.1	0,009	НО	>1,0	≤0,1
21.2.1	≤1,0	НО	НО	НО

НО = не определено

Пример XIII.

Определение констант (K_D) сродства полноразмерных человеческих антител к CD40 с помощью BIAcore.

Осуществляют измерение сродства выделенных очисткой антител с использованием прибора BIAcore 3000, следуя протоколам производителя.

Прибор для анализа биосенсорного биоспецифического взаимодействия (BIAcore) использует поверхностный плазмонный резонанс для измерения молекулярных взаимодействий на сенсорном чипе CM5. Изменения в лучепреломляющих индексах между двумя средами, стеклом и карбоксиметилированным декстраном, вызываемое взаимодействием молекул на декстранный стороне данного сенсорного чипа, измеряют и передают в виде изменений в произвольных единицах отражательной способности (RU), что детализируется в прилагаемых замечаниях производителя.

Карбоксиметилированная декстральная поверхность проточной кюветы в сенсорном чипе активируется при образовании 0,05 М N-гидроксисукциниамида в присутствии 0,2 М N-этил-N'-(диметиламинопропил)карбодиимида в течение 7 мин. Слитый белок CD40-Ig (описанный в примере I) в концентрации 5 мкг/мл, в 10 мМ Na-ацетате, pH 3,5, вручную вливают в проточную кювету со скоростью 5 мкл/мин и ковалентно иммобилизуют на поверхности данной проточной кюветы с требуемым количеством RU. Дезактивирование непрореагировавших сложных эфиров N-гидроксисукциниамида осуществляют с использованием 1 М этиламингидрохлорида, pH 8,5. После иммобилизации данные проточные кюветы очищают от любого непрореагировавшего или неудачно связавшегося материала с помощью пяти восстановливающих добавлений по 5 мкл 50 мМ NaOH до стабильного базового состояния. Проточная кювета 2, с очень плотной поверхностью, измеряет, приблизительно, 300 RU после подготовки поверхности, а проточная кювета 3, с очень низкой плотностью, измеряет, приблизительно, 150 RU. В проточную кювету 1, с активируемой чистой поверхностью, во время иммобилизации вместо антигена вливают 35 мкл 10 мМ Na-ацетатного буфера. Проточная кювета 4 содержит приблизительно 450 RU иммобилизованного CTLA4-Ig, постороннего контрольного антигена.

Последовательные разведения каждого антитела готовят в диапазоне концентраций от 100 до 0,1 мкг/мл. Скорость потока устанавливают 5 мкл/мин и 25 мкл данного образца каждой концентрации вводят в сенсорный чип вместе с регенерационным вливанием 5 мкл 50 мМ NaOH между каждой концентрацией вводимого антитела. Полученные данные анализируют с использованием программного обеспечения BIAevaluation 3.0.

Для обратноориентированных кинетических экспериментов антитело 21.4.1 иммобилизуют на поверхности данного сенсорного чипа с использованием вышеописанного протокола. Антитело против KLH используют в качестве контрольной антильной поверхности. Антиген, слитый белок CD40-Ig, вводят в диапазоне концентраций от 100 до 0,1 мкг/мл.

В табл. 32 представлены результаты измерения сродства для соответствующих антител настоящего изобретения к CD40.

Таблица 32

Измерение сродства для антител настоящего изобретения к CD40

Антитело	K_{on} (1/Ms)	K_{off} (1/s)	K_b (M)
3.1.1	$1,12 \times 10^6$	$3,31 \times 10^{-5}$	$3,95 \times 10^{-11}$
10.8.3	$2,22 \times 10^5$	$4,48 \times 10^{-7}$	$2,23 \times 10^{-12}$
15.1.1	$8,30 \times 10^4$	$2,83 \times 10^{-7}$	$4,05 \times 10^{-12}$
21.4.1	$8,26 \times 10^4$	$2,23 \times 10^{-5}$	$3,48 \times 10^{-10}$
22.1.1	$9,55 \times 10^5$	$1,55 \times 10^{-4}$	$2,79 \times 10^{-10}$
23.25.1	$3,83 \times 10^5$	$1,65 \times 10^{-7}$	$7,78 \times 10^{-12}$
23.28.1	$7,30 \times 10^5$	$8,11 \times 10^{-5}$	$1,61 \times 10^{-10}$
23.29.1	$3,54 \times 10^5$	$3,90 \times 10^{-5}$	$7,04 \times 10^{-11}$

Пример XIV.

Картирование эпитопа антител к CD40.

Анализ связывания осуществляют с использованием выделенного очисткой белком А слитого антитела CD40-FC IgG1 человека. Слитый белок CD40-Fc IgG1 человека клонируют в Pfizer. Слитый белок CD40-IgG1 человека экспрессируют в клеточной линии млекопитающего и выделяют очисткой на колонке с белком А. Степень очистки полученного слитого антитела оценивают с помощью SDS/ПААГ.

CD40 обладает структурой обычного трансмембранных белка типа I. Его зрелая молекула состоит из 277 аминокислот. Внеклеточный домен CD40 состоит из четырех TNFR-подобных богатых цистеином доменов. См., например, Neismith and Sprang, TIBS 23:74-79 (1998); van Kooten and Banchereau, J. Leukocyte Biol. 67:2-17 (2000); Stamenkovic et al., EMBO J. 8:1403-1410 (1989).

Связывание антител к CP40 с восстановленным и невосстановленным CD40 человека.

Так как внеклеточный домен CD40 состоит из четырех богатых цистеином доменов, разрыв внутримолекулярных связей с помощью восстанавливющего агента может изменить реактивность антитела. Чтобы определить, происходит ли разрыв внутримолекулярных связей с помощью восстанавливющего агента, изменяется ли реактивность отобранных антител настоящего изобретения к CD40, выделенный очисткой CD40-hIgG вносят в SDS/ПААГ (4-20%-й гель) в невосстанавливющих (NR) или в восстанавливющих (R) условиях. SDS/ПААГ осуществляют по методу Laemmli с использованием мини-гелевой системы. Разделенные белки переносят на нитроцеллюлозную мембрану. Мембранные блокируют с использованием PBS, содержащим 5% (мас./об.) обезжиренного молока по меньшей мере в течение 1 ч до проявления, и зондируют в течение 1 ч с помощью каждого антитела. Антитела к CD40 детектируют с использованием конъюгированных с HRP антител козы против иммуноглобулинов человека (разведение 1:8000; № по каталогу A-8667 Sigma). Мембранные проявляют с использованием усиленной хемилюминесценции (ECL®; Amersham Bioscience) в соответствии с инструкциями производителя.

Затем полученный вестерн-блот зондируют четырьмя антителами настоящего изобретения к CD40: 21.4.1, 23.25.1, 23.29.1 и 24.2.1 (1 мкг/мл) и затем конъюгированными с HRP антителами козы против IgG человека (разведение 1:8000). Результаты данного эксперимента представлены на фиг. 15. Полученные результаты свидетельствуют, что 21.4.1, 23.25.1, 23.29.1 и 24.2.1 связывают невосстановленный CD40 и не связывают восстановленный CD40, таким образом, данные антитела распознают конформационный эпитоп.

Связывание антител к CD40 с белками человека с удаленным CD40-доменом.

Внеклеточная область CD40 включает четыре TNFR-подобных повторяющихся домена (именуемых D1-D4). См., например, Neismith and Sprang, TIBS 23:74-79 (1998); van Kooten and Banchereau, J. Leukocyte Biol. 67:2-17 (2000); Stamenkovic et al., EMBO J. 8:1403-1410 (1989). На фиг. 16 представлены аминокислотные последовательности CD40-доменов D1-D4 мыши и человека. Чтобы исследовать вклад разных участков CD40-молекулы в представляемом эпитопе, сконструировали ряд мутантов с удаленным доменом.

Для создания конструкций с элюминированным CD40 человека полный внеклеточный домен CD40 человека (аминокислоты 1-193) с помощью ПЦР амплифицируют из кДНК (CD19+) В-клеток человека (кДНК-панели многих тканей, № по каталогу K1428-1, от Clontech) с использованием праймер-специфических последовательностей, а на С-конец прикрепляют 6XHis-метку. 5'-праймер CD40 человека 5'-GCAAGCTTCACCAATGGTTCGTCTGCCTCTGCAGTG-3' (SEQ ID NO: 135) используют в разных сочетаниях с 3'-праймерами для клонирования полноразмерной и укороченной молекулы CD40.

3'-праймер для клонирования полноразмерного внеклеточного домена CD40 человека представляет собой 5'-TCAGTGATGGTGATGGTGATGTCTCAGCCGATCCTGGGGACCA-3' (SEQ ID NO: 136).

3'-праймер, используемый для клонирования D1-D3-доменов CD40 человека, представляет собой 5'-TCAGTGATGGTGATGGTGATGTGGGCAGGGCTCGCGATGGTAT-3' (SEQ ID NO: 137).

3'-праймер, используемый для клонирования D1-D2-доменов CD40, представляет собой 5'-TCAGTGATGGTATGGTATGACAGGTGCAGATGGTGTCTGTT-3' (SEQ ID NO: 138).

После того, как из кДНК укороченного CD40 были созданы данные конструкции, их экспрессируют в клетках линии 293F с использованием вектора pCR3.1 (Invitrogen). Слитые белки CD40-6XHis выделяют очисткой путем элюирования на колонке с никелем.

Аминокислотные последовательности этих четырех делециональных мутантов представлены в табл. 33.

Таблица 33

Слитые белки CD40-His-метка

Делециональный мутант	Аминокислотная последовательность (лидерная последовательность подчеркнута)
CD40-6XHis человека (полноразмерный внеклеточный домен)-	M VRLPLOCVLWGCLLTAV H PEPTACREKQYLINS QCCSLCQPGQKLVSDCTEFTETECLPC GESEFLDTWNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQQKGT SETDTICTCEEGWHCTSEACESCVLHRS CSPGFGVKQIATGVSDTICEPCPVGFFSNVSSAFEK CHPWTSCETKDLVVQQAGTNKTDVV C GPQDRHHHHHH (SEQ ID NO: 139)
CD40 (D1-D3)-6XHis человека	M VRLPLOCVLWGCLLTAV H PEPTACREKQYLINS QCCSLCQPGQKLVSDCTEFTETECLPC GESEFLDTWNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQQKGT SETDTICTCEEGWHCTSEACESCVLHRS CSPGFGVKQIATGVSDTICEPCPVHNNNN (SEQ ID NO: 140)
Делециональный мутант	Аминокислотная последовательность (лидерная последовательность подчеркнута)
CD40 (D1-D2)-6XHis человека	M VRLPLOCVLWGCLLTAV H PEPTACREKQYLINS QCCSLCQPGQKLVSDCTEFTETECLPC GESEFLDTWNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQQKGT SETDTICTCHNNNN (SEQ ID NO: 141)

Для экспрессии этих делециональных конструкций CD40 человека данные конструкции клонируют в вектор pCR3.1 (Invitrogen) и экспрессию оценивают в различных стабильных и кратковременно трансфицированных линиях 293F-клеток. Супернатанты кратковременно трансфицированных 293F-клеток анализируют с помощью ИФА и Вестерн-блота на связывание с антителами 21.4.1, 23.25.1, 23.29.1 и 24.2.1.

ИФА-анализ осуществляют с использованием супернатанта из клеток 293F, трансфицированных различными CD40-конструкциями. ИФА-планшеты покрывают козьими поликлональными антителами к CD40 человека (R&D catalog № AF 632) или козьими поликлональными антителами к CD40 мыши (R&D catalog № AF 440), разбавленными до 1 мкг/мл ИФА-буфером для сенсибилизации поверхности планшета. Экспрессирование CD-конструкций в 293F-клетках подтверждают путем детектирования биотинилированных козьих антител к CD40 человека (R&D № по каталогу AF 632), козьих антител к CD40 мыши (R&D catalog № AF 440), или HRP-конъюгированным антителом против His (C-концевая) (Invitrogen, Catalog № 46-0707). Связывание антител человека к CD40 детектируют с помощью HRP-конъюгированных козьих антител против IgG человека (Fc specific Caltag H10507), разбавленных 1:2000. Полученные результаты, представленные в табл. 34, указывают, что большинство, если не все, эпитопов, распознаваемых с помощью монАТ 21.4.1, 23.28.1 и 23.29.1, локализуются в D1-D2-области CD40, а эпипот для монАТ 24.2.1 локализуется, по меньшей мере, отчасти в домене D3-D4. Слитый белок CD40 человека-Fc кролика используют в качестве контроля для подтверждения специфичности связывания антител.

Таблица 34

ИФА: связывание антител с CD40-делеционными мутантами

	CD40 (D1-D2) человека-6xHis	CD40 (D1-D3) человека-6xHis	CD40 человека- 6xHis
21.4.1	+	+	+
23.25.1	+	+	+
23.29.1	+	+	+
24.2.1	-	+	+
Антитело против His	+	+	+
Антитело против RbIg	НО	НО	НО

CD40-делеционные конструкции анализируют также в Вестерн-блот-анализе. Полученные результаты представлены в табл. 35. Результаты ИФА показывают, что в сайте связывания антител 21.4.1, 23.25.1, 23.29.1 и 24.2.1 участвуют домены D1-D3. Данные результаты показывают также, что сайт связывания антител 21.4.1, 23.25.1 и 23.29.1 содержит домены D1-D2, и что сайт связывания антитела 24.2.1 содержит домен D3.

Таблица 35

Вестерн-блот: связывание антитела с CD40-делеционным мутантом

	CD40 (D1-D3) человека-6xHis	CD40 человека- 6xHis
21.4.1	+	+
23.25.1	+	+
23.29.1	+	+
24.2.1	+	+
Антитело против His	+	+
Антитело против RbIg	НО	НО

Связывание антител к CD40 с CD40 мыши.

Определим способность антител 21.4.1, 23.25.1, 23.29.1 и 24.2.1 связывать CD40 мыши.

Для данного эксперимента CD40 мыши амплифицируют из кДНК В-клеток мыши. Слитый белок CD40(D1-D3) мыши-6xHis клонируют в pCR3.1, в котором используют для запуска транскрипции CMV-промотор.

5'-праймер, используемый для клонирования внеклеточного домена CD40 мыши, представляет собой 5'-TGCAAGCTTCACCATGGTGTCTTGCCTCGGCTGTG-3'.

3'-праймер, используемый для клонирования D1-D3-доменов CD40 мыши, представляет собой 5'-GTCCTCGAGTCAGTGATGGTGATGTGGGCAGGGATGACAGAC-3'.

кДНК-конструкции мыши и человека кратковременно трансфицируют в 293Р-клетки. Экспрессию рекомбинантного CD40 детектируют с помощью ИФА с использованием поликлональных антител против CD40 мыши и человека, антител против His и антителами к CD40 21.4.1, 23.25.1, 23.29.1 и 24.2.1. Результаты этих экспериментов представлены в табл. 36. Данный эксперимент показывает, что все антитела специфичны по CD40 человека и не реагируют перекрестно с CD40 мыши.

Таблица 36

Перекрестная реактивность CD40 мыши и человека

	CD40 (D1-D3) мыши-6Xhis	CD40 (D1-D3) человека-6Xhis
21.4.1	Нет	Да
23.25.1	Нет	Да
23.29.1	Нет	Да
24.2.1	Нет	Да
Козьи антитела против CD40 человека	Нет	Да
Козьи антитела против CD40 мыши	Да	Нет
Антитела против His	Да	Да

Связывание антител к CD40 с химерным человеком/мышью CD40.

Так как антитела 21.4.1, 23.25.1, 23.29.1 и 24.2.1 не связывают CD40 мыши, конструируют химерные белки человек/мышь CD40 для более определенных картированных эпитопов таких антител.

Для создания внутрирамочных слияний химерных белков из CD40 человека и мыши используют уникальные сайты рестрикции на границах CD40-доменов в идентичных позициях кДНК CD40 человека и мыши. Создают различные кДНК-овые конструкции CD40 с использованием сайта рестрикции EcoRI на конце домена 1 (нуклеотид 244, аминокислота 64) и сайта рестрикции BanI на конце домена 2 (нуклеотид 330, аминокислота 94 (фиг. 17)).

Различные CD40-домены амплифицируют с помощью ПЦР и лигируют. Данный подход позволяет заменить всевозможные домены мышевого CD40 гомологичными доменами CD40 человека. Полученные конструкции представлены на фиг. 18.

Затем определяют, способны ли антитела 21.4.1, 23.25.1, 23.29.1 и 24.2.1 связывать химерные мышь/человек CD40-белки в ИФА. Результаты данного эксперимента представлены в табл. 37. Как показано в табл. 37, монАТ 21.4.1 и 23.25.1 распознают эпитоп, который локализован частично в D1 и частично в D2; монАТ 23.29.1 распознает эпитоп, локализованный по большей части, если не полностью, в D2; а монАТ 24.2.1 распознает эпитоп, локализованный в D2 и D3.

Таблица 37

Связывание антител с химерными CD40-белками

Антитело	ЧелD1	ЧелD2	ЧелD3	ЧелD1, D2	ЧелD2, D3	ЧелD1, D3
21.4.1	Нет	Нет	Нет	Да	Нет	Нет
23.25.1	Нет	Нет	Нет	Да	Нет	Нет
23.29.1	Нет	Да	Нет	Да	Да	Нет
24.2.1	Нет	Нет	Нет	Нет	Да	Нет

Все публикации и патентные заявки, цитируемые в настоящем описании, включены здесь путем ссылки, как если бы каждая индивидуальная публикация или патентная заявка были конкретно и индивидуально указаны для включения путем ссылки. Несмотря на то что вышеизложенное изобретение описано в некотором отношении подробно в виде иллюстраций и примеров, в целях внесения ясности в его понимание рядовым специалистам в данной области должно быть очевидным в свете указаний настоящего изобретения, что в нем могут быть сделаны определенные изменения и модификации, не выходящие за рамки существа или содержания настоящего изобретения.

Список последовательностей

<110> ABGENIX, INC.
PFIZER PRODUCTS INC.

<120> АНТИТЕЛА К CD40

<130> ABX-PF/3 PCT

<140> PCT/US02/36107
<141> 2002-11-08

<150> 60/348,980
<151> 2001-11-09

<160> 147

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 378

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 1

caggtgcagc tgggggagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctggggaggc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agttatggca tgcactgggt cccgcaggct 120
ccaggccaagg ggctggagtg ggtggcatt atatcaaagg atggaggtaa taaataccat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaaa tgcgctgtat 240
ctgcaaatga atagcctgag agttgaagac acggctgtgtt attactgtgt gagaagaggg 300
catcagctgg ttctggata ctactactac aacggctctgg acgtctgggg ccaagggacc 360
acggtcaccg ttcctca 378

<210> 2

<211> 126

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ala Val Ile Ser Lys Asp Gly Gly Asn Lys Tyr His Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Val Arg Arg Gly His Gln Leu Val Leu Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Asn Gly
 100 105 110

Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 3
 <211> 336
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 gatattgtgc tgactcagtc tccactctcc ctgccccgtca cccctggaga gccggccctcc 60
 atctcctgcga ggctctgtca gagcctcttg tatagttaatg gataacaactt ttggattgg 120
 tacctgcaga agccagggtca gtctccacag ctccctgatct atttgggttc taatcgggccc 180
 tccgggggtcc ctgacagggtt cagttggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 240
 agcagattgg aggttggatca tgttgggtt tattactgca tgcaagctct acaaactct 300
 cggacgttcg gccaagggtac caaggtggaa atcaaa 336

<210> 4
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 5
 <211> 1416
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgtcttt taagagggtgt ccagtgtcag 60
 gtgcagctgg tggagtcgtgg gggaggcgtg gtccagctcg ggaggccct gtagactctcc 120
 tgtgcacgtt ctggattcac cttcgtatgt tatggatgc actgggtccg ccaggctcca 180

ggcaaggggc tggagtgggt ggcagttata tcaaaggatg gaggtaataa ataccatgca 240
 gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaatgc gctgtatctg 300
 caaatgaata gcctgagagt tgaagacacg gctgtgtatt actgtgttag aagagggcat 360
 cagctggttc tggatacta ctactacaac ggtctggacg tctggggcca agggaccacg 420
 gtcaccgtct ctcagcctc caccaggc ccatcggtt tccccctgge gccccgtctcc 480
 aggagcacct ccgagagac aegggccctg ggtgcctgg tcaaggacta ctccccgaa 540
 ccgggtacgg tgcgtggaa cttaggcgtt ctgaccagcg gcgtgcacac ctccccagct 600
 gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgccc ctccagcaac 660
 ttccggaccc agacctacac ctgcaacgtt gatcacaaac ccagcaacac caagggtggac 720
 aagacagtg agcgcataat ttgtgtcgag tgcccacccgt gcccagcacc acctgtggca 780
 ggaccgttag tcttcctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctccggacc 840
 cctgaggtca cgtgcgtgg ggtggacgtg agccacaag acccccaggt ccagttcaac 900
 tggtaactgg acggcgtgg agtgcataat gccaagacaa agccacggga ggagcagttc 960
 aacagcacgt tccgtgtggt cagcgtctc accgttgtgc accaggactg gctgaacggc 1020
 aaggagtaga agtgcataat ccccaacaaa ggcctccag ccccccatega gaaaaccatc 1080
 tccaaaccca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccccc atccgggag 1140
 gagatgacca agaaccaggt cagcgtgacc tgccctgtca aaggttcta cccagcgcac 1200
 atcgcgtgg agtggagag caatggggcag ccggagaaaca actacaagac cacacccccc 1260
 atgctggact ccgcggctc ctttttctc tacagcaagc tcacccgtgaa caagagcagg 1320
 tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgtcc gtgtatgtca aggctctgca caaccactac 1380
 acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaatga 1416

<210> 6
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Lys Asp Gly Gly Asn Lys Tyr His Ala
 65 70 75 80
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95
 Ala Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Val Arg Arg Gly His Gln Leu Val Leu Gly Tyr Tyr Tyr
 115 120 125
 Tyr Asn Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 130 135 140
 Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
 145 150 155 160

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 165 170 175
 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 180 185 190
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 195 200 205
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln
 210 215 220
 Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 225 230 235 240
 Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 245 250 255
 Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 260 265 270
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 275 280 285
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 290 295 300
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 305 310 315 320
 Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp
 325 330 335
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 340 345 350
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg
 355 360 365
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 370 375 380
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 385 390 395 400
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415
 Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 420 425 430
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 7
<211> 720
<212> ДНК
<213> *Homo sapiens*

```

<400> 7
atgaggctcc ctgtcgact cctggggctg ctaatgtct gggctctgg atccagtgg 60
gatattgtgc tgactcgatc tccactctcc ctggccctca cccctggaga gccggctcc 120
abctccgtca ggtctagtca gagcccttgg tatagttaatg gatacaactt tttggattgg 180
tacctcgaga agccaggcga gtctccacag ctccgtatct atttgggttc taatggggcc 240
tccggggtcc ctgacagggtt cagtggcagt ggatcaggca cagatittac actgaaaatc 300
agcagattgg aggctgagga tgggggtt tattactgca tgcaagctct acaaactct 360
cggacgttcc gccaaggcga caaggtggaa atcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc 420
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagggtt aaatctggaa ctgcctctgt tgggtggctg 480
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtggaa aggtggataa cggccctccaa 540
tcgggttaact cccaggagag tgcacagag caggacacga aggacacgac ctacagcttc 600
agcagcaccct tgacgtgag caaaggcagac tacgagaaaac acaaagatc cggctgcgaa 660
gtcaccctatc agggccctgag ctgcggctgc acaaagatc tcaacagggg agagtgttag 720

```

<210> 8
<211> 239
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 8
Met Arg Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Ser
1 5 10 15

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

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

Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Tyr Asn Phe Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys
50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala
65 70 75 80

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

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Leu Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
100 105 110

Cys Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
 115 120 125

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> 9

<211> 387

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 9

caggtgcagc tgggggagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctggggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcagc cctctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccggccaggct 120
 ccaggcaagg ggtgggagtg ggtggcagtt atataaaatg atggagataaa taaataccat 180
 gcagactccg tggggggccg attcaccatc tccagagaca attccaggag cacgccttat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtat attactgtgc gagaagaggc 300
 atggggctca gtggggagccg tggggattac tactactact acggtttggc cgtctggggc 360
 caaggagacca cggtcaccgt ctccctca 387

<210> 10

<211> 129

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Ala Val Ile Ser Asn Asp Gly Asp Asn Lys Tyr His Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Arg Gly Met Gly Ser Ser Gly Ser Arg Gly Asp Tyr Tyr Tyr
 100 105 110

Tyr Tyr Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 115 120 125

Ser

<210> 11

<211> 336

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 11

gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggccctcc 60
 atctctgcga ggtctagtca gagecttgc tatagtaatg gataacaactt tttggattgg 120
 tacctgcaga agccaggggca gtctccacag ctcctgatct atttgggttc taatcgggccc 180
 tccggggtcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatac 240
 agcagagtgg aggctgagga tgggggtt tattactgca tgcaagctct acaaactcct 300
 cggacgttcg gccaaggggac caaggtggaa atcaaa 336

<210> 12

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95

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

<210> 13

<211> 1425

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 13

atggagtttg ggctgagctg ggttttccctc gttgtcttt taagagggtgt ccagtgtcag 60

gtgcagctgg tggagtctgg gggagggcgtg gtccagcctg ggaggcccct gagactctcc 120
 tgcgcagcct ctggattcac cticagtagc tatggcatgc actgggtccg ccaggctcca 180
 ggcaaggggc tggagtgggt ggcagttata tcaaattatgatc gagataataa ataccatgca 240
 gactccgtgt gggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaggagcac gctttatctg 300
 caaatgaaca gcttgagagc tgaggacacg gctgtatatt actgtgcgag aagaggcatg 360
 gggcttagtgg gggccgtgg ggattactac tactactacg gtggacgt ctggggccaa 420
 gggaccacgg tcaacgtctc cticagcctcc accaaggcc catcggtctt cccctggcg 480
 ccctgtcca ggagcacctc cgagagcaca gggccctgg gctgctggg caaggactac 540
 ttccccaaac cggtgacggt gtctggaaac tcaaggcgtc tggaccagcgg cgtgcacacc 600
 ttccccagctg tcttacagtc ctcaggactc tactccctca gcaagcgtggt gaccgtgccc 660
 tccagcaact tcggcaccca gacctacacc tgcaacgtag attacaagcc cagcaacacc 720
 aagggtggaca agacagtta ggcgaaatgt tgggtcgagt gcccaccgtg cccagcacca 780
 cctgtggcag gaccgtcgtt cttccctctc ccccaaaaac ccaaggacac cctcatgatc 840
 tcccgaccc ctgaggtcac gtgcgtggg gtggacgtga gccacgaaga ccccgaggc 900
 cagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccacgggag 960
 gagcgttca acagcacgtt cctgtgtggc agcgttctca cctgtgtgca ccaggactgg 1020
 ctgaacggca agggatcaa gtgcaagggtc tccaaacaaag gcttcccgac ccccatcgag 1080
 aaaacccatct cccaaacccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctggcccca 1140
 tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggc agcgttctac gctgtgtcaa aggcttctac 1200
 cccagcgaca tcggcgtgga gtgggagagc aatgggcagc cgagaacaa ctacaagacc 1260
 acacctccca tgctggactc cgacggctcc ttcttctct acagcaagct caccgtggac 1320
 aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtctc tcatgtccg tgatgtcatga ggctctgcac 1380
 aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccggta aatga 1425

<210> 14
 <211> 474
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14
 Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Asn Asp Gly Asp Asn Lys Tyr His Ala
 65 70 75 80
 Asp Ser Val Trp Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Arg Ser
 85 90 95
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Gly Met Gly Ser Ser Gly Ser Arg Gly Asp
 115 120 125
 Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 130 135 140

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

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 450 455 460

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 15
 <211> 720
 <212> DHK
 <213> Homo sapiens

<400> 15
 atgaggetcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgcctc gggctctgg atccagtggg 60
 gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 120
 atctcctgca ggtcttagtca gagccttgc tatagttaatg gataacaactt ttggattgg 180
 tacctgcaga agccagggca gtctccacag ctcttgcattt atttgggttc taatcgggcc 240
 tccgggtcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggca cagatttac actgaaaatc 300
 agcagagtgg aggttgagga tgggggtt tattactgca tgcaagctc acaaactcct 360
 cggacgttcg gccaagggac caaggtggaa atcaaacgaa ctgtggctc accatctgtc 420
 ttcatcttc cggccatctga tgagcagttt aaatctggaa ctgccttgtt tgggtgcctg 480
 ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtggaa aggtggataa cggccctccaa 540
 tcgggtaact cccaggagag tggcacagag cagacagca aggacagcac ctacagcctc 600
 agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacagaaaac acaaagtcta cggctgcgaa 660
 gtcaccatc agggcctgag ctgcggcgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttag 720

<210> 16
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 Met Arg Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Ser
 1 5 10 15

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

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

Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Tyr Asn Phe Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys
 50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala
 65 70 75 80

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

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
 100 105 110

Cys Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
 115 120 125

Val Glu Ile 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> 17

<211> 357

<212> DHK

<213> Homo sapiens

<400> 17

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtaaagc cttcgagac cctgtccctc 60
 acctgactg tctctgggtgg ctccatcaatg agttaactact ggatctggat cccgcagccc 120
 gcccggaaagg gactggaatg gattggcgt gtctatacca gtgggagcac caactacaac 180
 ccctccctca agagtcgagt caccatgtca gttagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
 aagctgagct ctgtgaccgc cgccggacacg gcccgttatt actgtgcgag agatggctt 300
 tacaggggggt acggtatgga cgtctgggc caagggacca cggtcaccgt ctccctca 357

<210> 18

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

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

Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Trp Ile Trp Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Arg Val Tyr Thr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80

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

Arg Asp Gly Leu Tyr Arg Gly Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 19

<211> 321

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 19

gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgttaggaga cagagtccacc 60
 atcacttgc gggcagtc gcctatttgc agctggtag cctggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaaactctt gatttattct gcctccggtt tgcaaagtgg ggtccccatca 180
 agtttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcaactctca ccatcageag cctgcagcc 240
 gaagattttg caactacta ttgtcaacag actgacagtt tcccgctcac ttccggcgcc 300
 gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 20

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Pro Ile Ser Ser Trp
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Gly Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 21

<211> 1395

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 21

atgaaacacc tgggttctt ctcctgtcg gtggcagctc ccagatgggt cctgtccag 60
 gtgcagctgc aggagtccggg cccaggactg gtgaagcctt cggagaccc tccctcacc 120
 tgcactgtct ctggtggctc catcagtagt tactactgga tctggatccg gcagcccccc 180
 gggaaaggac tggaatggat tggcggtgc tataccagtg ggagcaccaa ctacaaccc 240
 tccctcaaga gtgcgtcac catgtcaga gacacgtcca agaaccagg tccctgaag 300
 ctgagctcg tgaccgcggc ggacacggcc gtgtattact gtgcgagaga tggtcttac 360
 aggggtacg gtatggacgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctcagctcc 420
 accaagggcc categgctt cccctggcg ccctgtcca ggagcacctc cgagagcaca 480
 gggccctgg gctgcgttgt caaggactac ttcccgaac cggtgacggg gtcgtggaa 540
 tcagggctc tgaccgcgg cgtgcacacc tccctagctg tcctacagtc ctcaggactc 600
 tactccctca gcagcgttgt gaccgtcccc tccagcaact tcggcaccca gacctacacc 660
 tgcaacgttag atacaagcc cagcaacacc aagggtggaca agacagtta ggcggaaatgt 720
 tggtcgagt gcccaccgtg cccagcacca cctgtggcag gaccgtcagt cttecttcc 780
 ccccaaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccgaccc ctgaggtcac gtgcgtggg 840
 gtggacgtga gccacgaaga ccccgaggc cagttcaact ggtacgtggg cggcgtggag 900
 gtgcataatg ccaagacaaa gccacgggg gggcgttca acagcacgg cctgtgtggc 960
 agcgtctca cctttgtgca ctggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcgggtc 1020
 tccaaacaaag gctcccccac cccatcgag aaaaacatct cccaaaaccaa agggcagccc 1080
 cgagaaccac aggtgtacac cctggggggc tcccgaggag agatgaccaa gaaccaggc 1140
 agcctgaccc gcttggtcaa aggcttctac cccagggaca tcgcccgtggg gtgggagagc 1200
 aatggcggc cggagaacaa ctacaagacc acacccccc tgcgtggactc cgacggctcc 1260
 ttcttcctct acagcaagct caccgtggac aagagcagg ggcagcaggg gaacgttcc 1320
 tcatgtccg tcatgtcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag ctctccctg 1380
 tetccggta aatga 1395

<210> 22

<211> 464

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Met	Lys	His	Leu	Trp	Phe	Phe	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	Ala	Pro	Arg	Trp
1			5					10					15		

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

Pro	Ser	Glu	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile
			35				40					45			

Ser	Ser	Tyr	Tyr	Trp	Ile	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Ala	Gly	Lys	Gly	Leu
					50		55					60			

Glu	Trp	Ile	Gly	Arg	Val	Tyr	Thr	Ser	Gly	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro
					65		70					75		80

Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Met	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln
					85				90				95		

Phe	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr
					100			105				110			

Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Gly	Leu	Tyr	Arg	Gly	Tyr	Gly	Met	Asp	Val	Trp
						115		120				125			

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 130 135 140
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
 145 150 155 160
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 165 170 175
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 180 185 190
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 195 200 205
 Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
 210 215 220
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys
 225 230 235 240
 Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
 245 250 255
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 260 265 270
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 275 280 285
 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 290 295 300
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
 305 310 315 320
 Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 325 330 335
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 340 345 350
 Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 355 360 365
 Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 370 375 380
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 385 390 395 400
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
 405 410 415
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 420 425 430

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 435 440 445

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455 460

<210> 23

<211> 705

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 23

atgaggctcc ctgctcagct cctggggctc ctgtgtctct ggttcccagg ttccagatgc 60
 gacatccaga tgacccagtc tecatcttc gtgtctgcat ctgttaggaga cagagtccacc 120
 atcacttgc gggcgagtca gcctattagc agctgggttag cctggtatca gcagaaaacca 180
 gggaaaagccc ctaaactctt gatttattct gcctccgggtt tgc当地agtggg ggtcccatca 240
 aggttcagcg gcagtggtat tgggacagat ttcaactctca ccatcagcag cctgcagect 300
 gaagattttg caacttacttca ttgtcaacag actgacagtt ttcggctcac ttccggccgc 360
 gggaccaagg tgtagatcaa acgaactgtg gctgcacccat ctgtcttcat ctccccccca 420
 tctgtatgagc agttgaaatc tggaaactgccc tctgttggtt gcctgtgaa taacttcat 480
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactccca 540
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacttaca gcctcagcag caccctgac 600
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac agggagagtt 705

<210> 24

<211> 234

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Met Arg Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Phe Pro
 1 5 10 15

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

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

Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Gly Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asp
 100 105 110

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

Thr Val Ala Ala Pro Ser 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> 25

<211> 363

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 25

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccaagga ctggtaagc cttcgagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctgggtgg ctccatcaga agttactact ggacctggat ccggcagccc 120
 ccagggaaagg gactggagtg gattggat atctattaca gtgggagcac caactacaat 180
 ccctccctca agagtcgagt caccatatca gttagatgt ccaagaacca gttctccctg 240
 aagctgagtt ctgtgaccgc tgccggacacg gcccgttatt actgtgcgag aaagggtgac 300
 tacggtgta atttaacta ctttccacca gttggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 26

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Arg Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Met Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80

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

Arg Lys Gly Asp Tyr Gly Gly Asn Phe Asn Tyr Phe His Gln Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 27

<211> 336

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 27

gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcocgtca cccctggaga gccggcctcc 60
 atctcctgca ggtctagtc gaggctctca catactaattg gataacaacta tttcgattgg 120
 tacctgcaga agccaggggca gtctccacaa ctcctgatct atttgggttc taatcgggcc 180
 tccggggtcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggca cagatttac actgaaaatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tgggggtt tattactgca tgcaagctct acaaactccg 300
 tacagtttg gccaggggac caagctggag atcaaa 336

<210> 28

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Thr
 20 25 30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95

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

<210> 29

<211> 1401

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 29

atgaaacatc tgggttctt ccttcctcgt gtggcagctc ccagatgggt cctgtcccaag 60
 gtgcagctgc aggagtccggg cccaggactg gtgaagcctt cggagacccct gtccctcacc 120
 tgcactgtct ctgggtggctc catcagaagt tactactgga cctggatccg gcagccccca 180
 gggaaaggac tggagtggat tggatatac tattacagtg ggagcaccaa ctacaatccc 240
 tccctaaga gtcgagtcac catatcgta gacatgtcca agaaccgtt ctccctgaag 300
 ctgaggctcg tgaccgctgc ggacacggcc gtttattact gtgcgagaaa gggtaactac 360
 ggtgtaatt ttaactactt tcaccagtgg ggcaggaa cccgtgtcac cgtctccca 420
 gcctccacca agggcccatc ggtttcccc ctggcgcctt gctccaggag cacctccgag 480
 agcacagcgg ccctggctg cctggtaag gactacttcc cggaaaccgtt gacgggtcg 540
 tggaaactcg ggcgtctgac cagccggctg cacaccccttcc cagctgtctt acagtctca 600
 ggactctact ccctcagcag cgtggtacc gtgcctccca gcaacttcgg caccagacc 660
 tacacctgca acgttagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc 720
 aaatgttgcg tcgagtgcacccgtggccca gacccacctg tggcaggacc gtcagtccttc 780
 ctctccccc caaaacccaa ggacacccctt atgatctccc ggacccctga ggtcacgtgc 840
 gtgggtgtgg acgtgagtca cgaagacccca gaggtccagt tcaacttgta cgtggacggc 900
 gtggaggtgc ataatgcca gatcaaagcca cggaggagc agttcaacag cacgttccgt 960
 gtggtcagcg tcctcaccgt tggcaccag gactggctga aeggycaagga gtacaagtgc 1020
 aaggcttcca acaaaggccctt cccagccccc atcgagaaaaa ccatttccaa aacccaaagg 1080
 cagcccccgg aaccacagggt gtacaccctt ccccatccc gggaggat gaccaagaac 1140
 caggtcagcc tgacctgcctt ggtcaaaaggc ttctccca gcaacatcgc cgtggagtgg 1200
 gagagcaatg ggcagccggaa gacaactac aagaccacac ctccccatgtt ggactccgac 1260
 ggctcttcat tcctctacag caagcttacc gtggacaaga gcaggtggca gcagggaaac 1320
 gtcttttcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1380
 tccctgtctc cgggtaaaatg a 1401

<210> 30

<211> 466

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15

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

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile
 35 40 45

Arg Ser Tyr Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

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

Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Met Ser Lys Asn Gln
 85 90 95

Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Lys Gly Asp Tyr Gly Gly Asn Phe Asn Tyr Phe His
 115 120 125

Gln Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 130 135 140
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
 145 150 155 160
 Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 165 170 175
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 180 185 190
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 195 200 205
 Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn
 210 215 220
 Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg
 225 230 235 240
 Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
 245 250 255
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 260 265 270
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 275 280 285
 Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 290 295 300
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg
 305 310 315 320
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 325 330 335
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 340 345 350
 Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 355 360 365
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 370 375 380
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 385 390 395 400
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met
 405 410 415
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 420 425 430

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 435 440 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 450 455 460

Gly Lys
465

<210> 31
<211> 720
<212> ДНК
<213> *Homo sapiens*

<400> 31

atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgcctt gggctctgg atccagtgaa 60
gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggccctcc 120
atcteectgcg ggtctagtcg gagecttcata catactaatg gatacaacta tttcgatgg 180
tacctgcaga agccaggggca gtctccacaaa ctctgtatctt atttggggttc taatcgggcc 240
tccggggtcc ctgacaggtt cagttggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 300
agcagagtgg aggtcgagga tgttggggttt tattactgcg tgcaagctct acaaactccg 360
tacagtttg gccaggggac caagctggag atcaaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc 420
ttcatcttcc cgcacatctga tgagcagttt aaatctggaa ctgcctctgt tgggtgcctg 480
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtggaa aggtggataa cgcctccaa 540
tcgggttaact cccaggagag tgcacagag caggacagca aggacagcac ctacagctc 600
agcagcaccc tgacgctgag caaagcgagac tacgagaaac acaaagtctt cgcctgcgaa 660
gtcaccatc agggctgag ctgcggccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttag 720

<210> 32

<211> 239

<212> PBT

<213> *Homo sapiens*

£400> 32

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

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

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

Leu Leu His Thr Asn Gly Tyr Asn Tyr Phe Asp Trp Tyr Leu Gln Lys
50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala
65 70 75 80

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

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
100 105 110

Cys Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Tyr Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys
 115 120 125

Leu Glu Ile 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> 33

<211> 361

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 33

caggtgcagc tgggggagtc tgggggaggc gtggccagc ctggggaggc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatgtca tgcactgggt ccggccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atgtcatatg atggaaagtag taaatactat 180
 gcaaactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaataa acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatggg 300
 ggttaaagcag tgcctggtcc tgactactgg ggccaggaa tcctggtcac cgtctcctca 360
 g 361

<210> 34

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Ala Val Met Ser Tyr Asp Gly Ser Ser Lys Tyr Tyr Ala Asn Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Gly Gly Lys Ala Val Pro Gly Pro Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 35

<211> 337

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 35

gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60
 atctcctgca ggtctagtca gagtgttctg tatagtaatg gataacaatc tttggattgg 120
 tacctgcaga agccagggca gtctccacag ctctgtatct atttgggttc taatcgcc 180
 tccggggtcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tgttgggtt tattactgca tgcaagttt acaaactcca 300
 ttcactttcg gccctggac caaagtggat atcaaac 337

<210> 36

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Val
 85 90 95

Leu Gln Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105 110

<210> 37

<211> 1398

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 37

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgtcttt taagagggtgt ccagtgtcag 60
 gtgcagctgg tgaggtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc 120
 tgtcagccct ctggattcac cttcagtagc tatgtcatgc actgggtccg ccaggttcca 180
 ggcaaggggc tgaggtgggt ggcagttatg tcatatgtg gaagtagtaa atactatgca 240
 aactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300
 ccaaataaaca gcgtgagagc tgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agatgggggt 360
 aaagcagtgc ctggtcctga ctactggggc cagggaaatcc tggtcaccgt ctccctcagcc 420
 tccaccaagg gcccacatcggt ttccccctg gcccctgtcc ccaggagcac ctccgagagc 480
 acagggccc tgggctgcct ggtcaaggac taccccccgg aaccgggtgac ggtgtcggtg 540
 aactcaggcg ctctgaccag cggcgtgcac accttcccg ctgttccatca gtcctcagga 600
 ctctactccc ttagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca acttcggcac ccagacactac 660
 acctgcaacg tagatcacaa gcccacac accaagggtgg acaagacagt tgagcgaaa 720
 tgggtgtcg agtgeccacc gtcacccagca ccacctgtgg caggaccgtc agtcttcctc 780
 ttccccccaa aacccaaggaa caccctcatg atctcccgac ccctcgagg cacgtgcgtg 840
 gtgggtggacg tgagccacga agaccccgag gtccagttca actggtaactg ggacggcggt 900
 gaggtgcata atgccaagac aaagccacgg gaggagcgt tcaacagcac gttccgtgtg 960
 gtcagcggtcc tcaaccgtgt gcaacaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgcag 1020
 gtctccaaca aaggctccc agccccatc gagaaaaacca tctccaaac caaaggcgag 1080
 ccccgagaac cacagggtga caccctggcc ccattccggg aggagatgac caagaaccag 1140
 gtcagcctga cctgcccgtt caaaggcttc taccctcagcg acatcgccgt ggagtggag 1200
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacacctc ccattgttga ctccgacggc 1260
 tcccttctcc tctacagcaa gtcacccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1320
 ttctcatgtc ccgtgtatgc tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagctctcc 1380
 ctgtctccgg gtaaatga 1398

<210> 38

<211> 465

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

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

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30

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

Ser Ser Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Val Met Ser Tyr Asp Gly Ser Ser Lys Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80

Asn Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gly Lys Ala Val Pro Gly Pro Asp Tyr
 115 120 125
 Trp Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 130 135 140
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
 145 150 155 160
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 165 170 175
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 180 185 190
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 195 200 205
 Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val
 210 215 220
 Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys
 225 230 235 240
 Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro
 245 250 255
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 260 265 270
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 275 280 285
 Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 290 295 300
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val
 305 310 315 320
 Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 325 330 335
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 340 345 350
 Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 355 360 365
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 370 375 380
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 385 390 395 400
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu
 405 410 415

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 420 425 430

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 435 440 445

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 450 455 460

Lys
 465

<210> 39

<211> 720

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 39

atgaggtcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgtctt gggctctgg atccagtggg 60
 gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcggcgtca cccctggaga gccggcctcc 120
 atctcctgcg ggtctagtcg tatagtatg gatacacta tttggattgg 180
 tacctgcaga agccaggggca gtctccacag ctccgtatctt atttgggttc taatcgggcc 240
 tccggggctcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggca cagatttac actgaaaatc 300
 agcagagtgg aggtcgagga tgggggtt tattatgcg tgcggatgg acaaactcca 360
 ttcaatttcg gcctgggac caaagtggat atcaaacgaa ctgtggctgc accatctgc 420
 ttcatcttc cggcatctga tgagcagggtt aaatctggaa ctgcctctgt tgggtggctg 480
 ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgg aagggtggataa cggccctccaa 540
 tcgggtaact cccaggagag tgcacagag caggacagca aggacagcac ctacaggctc 600
 agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaasc acaaagtcta cgcctgcgaa 660
 gtcacccatc agggcctgag ctgcggcgtc acaaagatc tcaacagggg agagtggtag 720

<210> 40

<211> 239

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

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

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

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

Val Leu Tyr Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys
 50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala
 65 70 75 80

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

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
 100 105 110
 Cys Met Gln Val Leu Gln Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys
 115 120 125
 Val Asp Ile 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> 41
 <211> 378
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 41
 caggtgcagtc tggcgtggc tggggctgag gtggaaaggc ctggggcc tc agtggggc 60
 tcctgcaggc ctctggata cacccaccggctactata tgcactgggt ggcacaggcc 120
 cctggacaagggcttgatgg atcaaccctg acatgggtgg cacaactat 180
 gcacagaagt ttcaggggcag ggtcaccatg accaggggaca cgtccatcag cacaggctac 240
 atggagctga acaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagatcag 300
 ccccttagat atgtactaa tgggtatgc tcctactttg actactgggg ccagggaaacc 360
 ctggtcaccg tccctca 378

<210> 42
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 42
 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 Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Gln Pro Leu Gly Tyr Cys Thr Asn Gly Val Cys Ser Tyr
 100 105 110

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 43

<211> 321

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 43

gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgttaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtca gggattttac agctggtag cctggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaaccttct gatctatact gcatccactt tacaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcaacttca ccatcagcag cctgcaacct 240
 gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacattt tcccgtcac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 44

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Tyr Ser Trp
 20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ile Phe Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 45
 <211> 1416
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 45
 atggactgga cctggaggat cctcttcttg gtggcagcag ccacaggagc ccactcccag 60
 gtgcagctgg tgcagtcgtgg ggctgaggtg aagaaggctg gggcctcagt gaaggtctcc 120
 tgcaaggctt ctggatacac cttcacccggc tactatatgc actgggtgcg acaggcccc 180
 ggacaagggc tttagtggat gggatggate aaccctgaca gtggtggcac aaactatgca 240
 cagaagtttc agggcagggt caccatgacc agggacacgt ccattcagcac agcctacatg 300
 gagctgaaca ggctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt actgtgcgag agatcagccc 360
 ctaggatatt gtaataatgg tgtatgttcc tactttgact actggggcca gggAACCC 420
 gtcacccgtt cttcagcctc caccaggc ccattggctt tccccctggc gcccgtctcc 480
 aggagcacct ccggagagcac agcggccctg ggctgcgtgg tcaaggacta ctccccggaa 540
 ccgggtacgg ttcgtggaa ctcaggcgct ctgaccagcg ggggtgcacac ctccccagct 600
 gtcctacagt cttcaggact ctactccctc ageacgtgg tgaccgtgcc ctccagcaac 660
 ttccggaccc agacacacac ctgcaacgtt gatcacaaggc ccagcaacac caagggtggac 720
 aagacagttt agcgtcaatgg ttgtgtcgag tgcccccgtt gcccagcacc acettgtggca 780
 ggaccgttag tttttttttt ccccaaaaaa cccaaaggaca ccctcatgtat ctccccggacc 840
 cctgagggtca cgtgcgtggt ggtggacgtg agccacgaaag accccgtgtt ccaggtaac 900
 tggtaactgg acggcgtgg ggtgcataat gccaagacaa agccacggga ggagcagttt 960
 aacagcacgt tccgtgtggt cagcgtctc accgttgtgc accaggactg gctgaacggc 1020
 aaggagtaca atgtcaaggt ctccaaacaaa ggctccctcg ccccccattgtt gaaaaccatc 1080
 tccaaaccca aaggcggcagcc ccgagaacca cagtttaca ccctgtcccc atccccggag 1140
 gagatgacca agaaccaggc cagcgttggacc tgccgtgtca aaggcttca ccccaaggc 1200
 atcgcgtgg agtggggagag caatggcag ccgagaacca actacaagac cacacctccc 1260
 atgctggact ccgacggctc ctttttctc tacagcaagc tcaccgtgg caagagcagg 1320
 tggcggcagg ggaacgtttt ctcatgttcc. gtgtatgttcc aggtctgtca caaccactac 1380
 acgcagaaga gctctccctt gtctccgggtt aaatgt 1416

<210> 46
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 46
 Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr 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 Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asp Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala
 65 70 75 80
 Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Asn Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gln Pro Leu Gly Tyr Cys Thr Asn Gly Val
 115 120 125
 Cys Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 130 135 140
 Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
 145 150 155 160
 Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 165 170 175
 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 180 185 190
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 195 200 205
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln
 210 215 220
 Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 225 230 235 240
 Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 245 250 255
 Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 260 265 270
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 275 280 285
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 290 295 300
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 305 310 315 320
 Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp
 325 330 335
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 340 345 350
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg
 355 360 365
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 370 375 380
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 385 390 395 400
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415

Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 47

<211> 705

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 47

atgaggctcc ctgctcagct cctggggctc ctgctgctct ggttccagg ttccagatgc 60
 gacatccaga tgacccagtc tccatctcc gtgtctgcatt ctgttaggaga cagagtacc 120
 atcacttgc gggcgagtca gggattttac agctggtag cctggatca gcagaaacca 180
 gggaaagccc ctaacctctt gatctatact gcatccactt taaaatgg ggtcccatca 240
 aggttcagcg' gcagtggatc tgggacagat ttcaactctca ccatcagcag cctgcaacct 300
 gaagattttg caacttacta ttgtcaacacg gctaacattt tcccgctcac ttccggcgg 360
 gggaccaagg tggagatcaa acgaactgtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca 420
 tctgtatggc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttggtt gcctgctgaa taacttctat 480
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaaagtg gataacgccc tccaaatcggg taactcccg 540
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 600
 ctgagactcaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgct gcgaagtcaac ccattcaggc 660
 ctgagactcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 705

<210> 48

<211> 234

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Met Arg Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Phe Pro
 1 5 10 15

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

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly
 35 40 45

Ile Tyr Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 50 55 60

Asn Leu Leu Ile Tyr Thr Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn
 100 105 110
 Ile Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 115 120 125
 Thr Val Ala Ala Pro Ser 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> 49
 <211> 373
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 49
 cagggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt cgctatggca tgcactgggt ccgcaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatctg atggaggtaa taaatactat 180
 gcagactccg tgaaggggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgtgtat 240
 ctgcaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtac gagaagaggg 300
 actggaaaga ctactatcca ctactgtggt atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
 accgtctcct cag 373

<210> 50
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

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

Ala Val Ile Ser Ser Asp Gly Gly Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Thr Arg Arg Gly Thr Gly Lys Thr Tyr Tyr His Tyr Cys Gly Met Asp
 100 105 110

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

<210> 51

<211> 337

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 51

gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgccccgtca cccctggaga gccggccctcc 60
 atctctgcga ggtctagtcg aagccctctg tatagtaatg gatataacta tttggattgg 120
 tacctgcaga agccaggggca gtctccacac ctctgtatct atttgggttc taatcgggcc 180
 tccggggtcc ctgacacaggtt cagtggcagt ggttcaggca ctgattttac actgaaaatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tgggggtt tattactgca tgcaagctct acaaactct 300
 cggacgttcg gccaaggggac caaggtggaa atcaaac 337

<210> 52

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95

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

<210> 53
<211> 1410
<212> ДНК
<213> *Homo sapiens*

<400> 53
 atggagtttg ggctgagctg ggttttccctc gttgtctttt taagagggtgt ccagtgtcag 60
 gtgcaactgg tggagtctgg gggaggcggtg gtccacgcgt ggagggtccct gagactctcc 120
 tggcagccct ctggattcac cttcagtcgc tatggcatgc actgggtccg ccaggctcca 180
 ggcaggggc tggagtgggt ggcagttata tcatctgtatc gaggtataaa atactatgca 240
 gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300
 caaatgaaca gcctgagacg tgaggacacg gctgtgtatt actgtacgag aagagggact 360
 ggaaaagactt actaccacta ctgtggatg gacgtctggg gccaaggggac cacggtcacc 420
 gtctccctcag cttccaccaa gggcccatcg gtctccccc tggcgccctg ctccaggagc 480
 acctccgaga gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaacccgtg 540
 acgggtgcgt ggaactcagg cgctctgacc agcggcgtgc acacccccc agctgtctta 600
 cagtcctcag gactctactc cctcagcgcgt gtggtgacccg tgcctccag caacctcgcc 660
 accccagaccc acacctgcaa ctagatcac aagccccagca acaccaaggta ggacaagaca 720
 gttgagcgcga aatgttgtgt cgagtgcaca ccgtgcggcag caccacctgt ggcaggacccg 780
 tcagtcctcc tctcccccggaaa aaaaacccaaag gacacccctca tgatctcccg gaccctcgag 840
 gtcacgtgcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagaccccg aggccaggta caactggta 900
 gtggacggcg tggaggtgca taatgcaccaag acaaaaggccac gggaggagca gttcaacagc 960
 acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 1020
 tacaagtgcg aggtctccaa caaaggccctc ccagccccca tcgagaaaaac catctccaaa 1080
 accaaaagggc agccccggaga accacaggtg tacacccctgc ccccatcccg ggaggagatg 1140
 accaagaacc aggtcagccct gacctgcctg gtcaaaaggct tctaccccgatcgacatcgcc 1200
 gtggagtgaa agagcaatgg gcaagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgtg 1260
 gactccgacg gtccttcattt cctctacacgc aagtcacccg tggacaagag cagggtggcag 1320
 caggggaacg ttttcatgtc tccctgtatgatc catgaggctc tgccacaacca ctacacgc 1380
 aagagccctt ccctgtctcc gggtaaatgaa 1410

<210> 54
<211> 469
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 54
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
20 25 30

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

Ser Arg Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Ser Asp Gly Gly Asn Lys Tyr Tyr Ala
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
85 90 95

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

Tyr Tyr Cys Thr Arg Arg Gly Thr Gly Lys Thr Tyr Tyr His Tyr Cys
 115 120 125
 Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
 130 135 140
 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser
 145 150 155 160
 Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 165 170 175
 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 180 185 190
 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 195 200 205
 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr
 210 215 220
 Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr
 225 230 235 240
 Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro
 245 250 255
 Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 260 265 270
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 275 280 285
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 290 295 300
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
 305 310 315 320
 Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu
 325 330 335
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala
 340 345 350
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 355 360 365
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 370 375 380
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 385 390 395 400
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 405 410 415

Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
420 425 430

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 435 440 445

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
450 455 460

Leu Ser Pro Gly Lys
465

<210> 55
<211> 720
<212> ДНК
<213> *Homo sapiens*

<400> 55

<210> 56
<211> 239
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 56

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

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

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

Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys
50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro His Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala
65 70 75 80

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

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
 100 105 110

Cys Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
 115 120 125

Val Glu Ile 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> 57

<211> 376

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 57

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctggggaggtc cctgagactc 60
 tcctgttag cctctggatt caccttcagt aactatggca tgcactgggt ccgcgcaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcaatt atatcatatg atggaagtaa taaataactat 180
 gcagactccg tgaaggggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgcgttat 240
 gtgcaaataatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgtt attactgtgc gagacgcgggt 300
 cactacggga gggattacta ctctactac ggtttggacg tctggggcca agggaccacg 360
 gtcacccgtct cctcag 376

<210> 58

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

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

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

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

Ala Ile Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Arg Gly His Tyr Gly Arg Asp Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Gly Leu
 100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 59

<211> 337

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 59

gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgccccgtca cccctggaga gccggccctcc 60
 atctcctgca ggtctagtc gaggcctctg cctggtaatg gataacaacta tttggattgg 120
 tacctgcaga agccagggca gtctccacag ctcctgatct atttgggttc taatcgggcc 180
 tccggggtcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaaatc 240
 agcagagtgg aggctgagga ttttttttttattactgca tgcaagctct acaaactct 300
 cggacgttcg gccaaggggac caaggtggaa atcaaac 337

<210> 60

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Pro Gly
 20 25 30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95

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

<210> 61
 <211> 1413
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 61

```
atggagtttg ggctgagctg ggttttctc gttgtcttt taagagggtt ccagtgtcag 60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc 120
tgtgtacccct ctggattcac cttcagaatac tatggcatgc actgggtccg ccaggetcca 180
ggcaaggggc tggagtgggt ggcaattata tcatatgtatg gaagtaataa atactatgca 240
gactccgtga agggcccatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatgtg 300
caaataaca gcctgagacg tgaggacacg gctgtgtatt actgtgcag acgcggcac 360
tacgggaggg attactactc ctactacggt ttggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 420
accgtctctt cagcctccac caagggcca tcgtcttcc ccctggcgc ctgtccagg 480
agcacccctcg agagcacacgc ggccctggc tgctctggca aggactactt cccagaaccg 540
gtgacgggtgt cgtggaaactc aggccgtctg accagcggcg tgcacaccc cccagctgtc 600
ctacagtctt caggactctt cttccctcagc aegctgggtga ccgtgcctc cagaacttc 660
ggcaccacaga cttacacaccc caacgtatg cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag 720
acagttgagc gcaaatgtt gtcgagatgc ccacccgtgcc cagcaccacc tgcggcagga 780
ccgtcagtctt tccctttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 840
gaggtaactg gctgtgggtgt ggacgtgagc cacaagacc ccgagggtcca gttcaactgg 900
tacgtggacg gctgtggaggt gcataatgcc aagacaaacgc cacgggagga gcaaggtaac 960
agcacgttcc gtgtggtcag ctgttccacc gttgtgcacc aggactggct gaacggcaag 1020
gagtacaagt gcaagggtctc caacaaaggc ctcccaagccc ccatacgaaaa aaccatctcc 1080
aaaaccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcggccatc ccgggaggag 1140
atgaccaaga accaggtcag ctgttccacc gttgttccacc cagcggacatc 1200
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaaact acaagaccac acctccatg 1260
ctggactccg acggcttctt ctteccctac agcaagctca ccgtggacaa gagcagggtgg 1320
cagcagggga acgttccacc atgttccgtg atgcgttgcagg ctgtgcacaa ccactacacg 1380
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tga 1413
```

<210> 62
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 62

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

Val	Gln	Cys	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Val	Val	Gln
				20				25				30		

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

Ser	Asn	Tyr	Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
				50				55				60			

Glu	Trp	Val	Ala	Ile	Ile	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Ala
				65				70				75			80

Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn
				85				90				95			

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Gly His Tyr Gly Arg Asp Tyr Tyr Ser Tyr
 115 120 125
 Tyr Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 145 150 155 160
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 165 170 175
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 180 185 190
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 195 200 205
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 210 215 220
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 225 230 235 240
 Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 245 250 255
 Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 260 265 270
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 275 280 285
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 290 295 300
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 305 310 315 320
 Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 325 330 335
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 340 345 350
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 355 360 365
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 370 375 380
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 385 390 395 400
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 405 410 415

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 63

<211> 720

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 63

atgaggtcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgctct gggtctctgg atccagtggg 60
 gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggectcc 120
 atctcctgca ggtcttagtca gagectctg cctggtaatg gataacaacta tttggattgg 180
 tacctgcaga agccagggca gtctccacag ctctgtatct atttgggttc taatcgggcc 240
 tccggggtcc ctgacagggtt cagtggcagt ggatcaggca cagatttac actgaaaatc 300
 agcagagtgg aggctgagga tttgggggtt tattactgca tgcaagctct acaaactcct 360
 cggacgttcg gccaagggac caaggtggaa atcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc 420
 ttcatcttcc cggccatctga tgagcagttt aaatctggaa ctgcctstgt tttgtgcctg 480
 ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtggaa aggtggataa cgccttccaa 540
 tcgggttaact cccaggagag tttcacagag caggacagca aggacacgac ctacagectc 600
 agcagcaccy tgacgctgag caaagcagac tacggagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 660
 gtcacccatc agggcctgag ctgcggcgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttaa 720

<210> 64

<211> 239

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (156)

<223> Вариабельная аминокислота

<400> 64

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

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

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

Leu Leu Pro Gly Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys
 50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala
 65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95
 Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
 100 105 110
 Cys Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
 115 120 125
 Val Glu Ile 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 Xaa 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> 65
 <211> 364
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 65
 caggtgcagtc tgccaggagtc gggccccagga ctgggtgaagc cticggacac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctgggtgg ctccatcaga ggttactact ggagctggat ccggcagccc 120
 cctggaaagg gactggagtg gattgggtat atctattaca gtggggagcac caactacaac 180
 ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
 aagctgaact ctgtgaccgc tgccggacacg gccgtgtatt attgtgcgag aaaggggggc 300
 ctctacggtg actacggctg gttcgccccc tggggccagg gaacccttgt caccgtctcc 360
 tcag 364

<210> 66
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 66
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Asp
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Arg Gly Tyr
 20 25 30

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

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80

Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Lys Gly Gly Leu Tyr Gly Asp Tyr Gly Trp Phe Ala Pro Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 67

<211> 322

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 67

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtgtagc agcagcact tagectggca ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccagact cctcatctat ggtgcattca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgtta ttactgtcag cactgtcgta gettatttcac ttccggccct 300
 gggaccaaaag tggatataaa ac 322

<210> 68

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 68

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Asp Leu Ala Trp His Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Cys Arg Ser Leu Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 69
 <211> 1401
 <212> DHK
 <213> Homo sapiens

<400> 69
 atgaaacatc tgggttctt cttctcttg gtggcagctc ccagatgggt cctgtcccag 60
 gtgcagctgc aggagtccgg cccaggactg gtgaagcctt cggagacccct gtccctcacc 120
 tgcactgtct ctggggctc catcagaggt tactactgga gctggatccg gcagccccct 180
 gggaaaggac tggagtggat tgggtatatac tattacagtg ggagcaccaa ctacaacccc 240
 tccctaaga gtcgagtcac catatca gacacgtcca agaaccagtt ctccctgaag 300
 ctgaactctg tgaccgctgc ggacacggcc gtgtattatt gtgcgagaaa ggggggcctc 360
 tacggtgact acggctgggtt cggccctgg ggccaggaa ccctggtac cgtctccca 420
 gcctccacca agggcccatc ggtttttttt ctggggccct gctccaggag caccctccgag 480
 agcacagegg ccctgggtt cctggtcaag gactacttcc cccaaaccgggt gacgggtgtcg 540
 tggaaacttag ggcgttgcac cccgggttccgacatccatcc 600
 ggactctact ccctcagcag cgtgggtacc gtgcctccca gcaacttccgg caccctggacc 660
 tacacccgtca acgttagatca caagccccc aacaccaagg tggacaagac agtttggcgc 720
 aaatgttgc tggatgtccc acgggtccca gcaccacccctt tggcaggacc gtcagtttc 780
 ctctttttttt caaaacccca ggacacccctt atgatctcc ggaccccttga ggtcacgtgc 840
 gtgggtgggg acgtgagccca cgaagaccccc gaggtccagt tcaactgtta cgtggacggc 900
 gtggaggtgc ataatgccaa gacaaaggcc cggggggggc agttcaacac cacgttccgt 960
 gtggtcagcg tcctcaccgt tggcaccagg gactggctga acggcaagga gtacaagtgc 1020
 aagggttccca acaaaggccccc atcgagaaaaa ccatttccaa aacccaaagg 1080
 cagccccggg aaccacaggt gtacacccctg ccccatccccc gggaggagat gaccaagaac 1140
 caggctcagcc tggatgtccc tggcaaaaggcc ttcttccca gcaacatccg cgtggagtgg 1200
 gagagcaatg ggcagccggaa gacaaactac aagaccacac ctcccatgtt ggactccgac 1260
 ggctcttctt tccttctacag caagcttacc gtggacaaga gcaagggtggca gcaaggaaac 1320
 gtcttctcat gtcctgtat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagccctc 1380
 tccctgttcc cgggttaatg a 1401

<210> 70
 <211> 466
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 70
 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15

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

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile
 35 40 45

Arg Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

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

Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln
							85					90			95
Phe	Ser	Leu	Lys	Leu	Asn	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr
							100				105			110	
Tyr	Cys	Ala	Arg	Lys	Gly	Gly	Leu	Tyr	Gly	Asp	Tyr	Gly	Trp	Phe	Ala
							115				120			125	
Pro	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys
							130				135			140	
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu
							145				150			160	
Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro
							165				170			175	
Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr
							180				185			190	
Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val
							195				200			205	
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn
							210				215			220	
Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg
							225				230			235	
Lys	Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly
							245				250			255	
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile
							260				265			270	
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu
							275				280			285	
Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His
							290				295			300	
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg
							305				310			315	
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys
							325				330			335	
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu
							340				345			350	
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr
							355				360			365	
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
							370				375			380	

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 385 390 395 400

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met
 405 410 415

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 420 425 430

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 435 440 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 450 455 460

Gly Lys
 465

<210> 71

<211> 705

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 71

atggaaaccc cagcgcagct tctcttcctc ctgtctactct ggctcccgaga atccacccgga 60
 gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgttttgtt ctccaggggaa aagagccacc 120
 ctctcctgcg gggccagtcg aagtgttagc agcagcgcact tagcctggca ccagcagaaa 180
 cctggccagg ctccccagact cctcatctat ggtgcattccg gcaggggccac tggcatccca 240
 gacaggttca gttggcagttgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 300
 cctgaagatt ttgcagtgttta ttaactgtcgtt cactgtcgta gcttatttcat ttgcgcctt 360
 gggaccggaa tggatatacgcc acgaaactgtg gctgcaccat ctgttttcat ctcccgccca 420
 tctgtatgacg agttgaaatc tggaaactgccc tctgttgtgtt gctgtgtttaacttttat 480
 cccagagagg cccaaagtaca gtggaaagggtt gataacgccc tccaatcggtttaactcccg 540
 gagatgtca cagagcagga cagcaaggac agcacccatac gcttcagcag cacccttgacg 600
 ctgagccaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcctt gctgtgttac ccattcaggc 660
 ctgagctcgccgttcacaaa gagcttcaac aggggagagt gtttag 705

<210> 72

<211> 234

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15

Glu Ser Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
 20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 35 40 45

Val Ser Ser Ser Asp Leu Ala Trp His Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
 65 70 75 80
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 85 90 95
 Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Cys
 100 105 110
 Arg Ser Leu Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
 115 120 125
 Thr Val Ala Ala Pro Ser 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> 73
 <211> 376
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 73
 caggtgcagc tgggtggagtc tggggggagc gtgggtccagc ctggggaggc cctgagactc 60
 tcctgtgcagc cctctggatt caccttcagt agctatgcca tgcactgggt ccggccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcaattt atatcatatg atggaaagtaa taaatataat 180
 gcagactccg tggaaaggccg attcaccatc tacagagaca attccaagaa caccgtgtat 240
 ctgcataatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgtt attactgtgc gagacgcgggt 300
 cactacggga ataattacta ctccatttac ggttggacg tctggggccca agggaccacg 360
 gtcaccgtct cctcag 376

<210> 74
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 74
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Arg Gly His Tyr Gly Asn Asn Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Gly Leu
 100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 75

<211> 337

<212> DHK

<213> Homo sapiens

<400> 75

gatattgtga tgacttcagtc tccactctcc ctggccgtca cccctggaga gccggcctcc 60
 atctcctgca ggtcttagtca gagcctcctg cctggtaatg gataacaacta tttggattgg 120
 tacctgcaga agccaggcga gtctccacag ctcctgatct atttgggttc taatcgcc 180
 tccggggtcc ctgacaggtt cagtgccagtg ggctcaggca cagatttac actgaaaatc 240
 agcagagtgg aggtgtggaa tgttgggatt tattactgca tgcaagctct acaaaactct 300
 cggacgttcg gccaaggcgc caaggtggaa atcaaac 337

<210> 76

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Pro Gly
 20 25 30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

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

<210> 77
<211> 1413
<212> ДНК
<213> *Homo sapiens*

<210> 78
<211> 470
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 78
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
20 25 30

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

Ser Ser Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Tyr Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Gly His Tyr Gly Asn Asn Tyr Tyr Ser Tyr
 115 120 125
 Tyr Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 145 150 155 160
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 165 170 175
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 180 185 190
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 195 200 205
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 210 215 220
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 225 230 235 240
 Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 245 250 255
 Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 260 265 270
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 275 280 285
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 290 295 300
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 305 310 315 320
 Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 325 330 335
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 340 345 350
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 405 410 415

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 79

<211> 720

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 79

atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgcctc gggctctctgg atccagtggg 60
 gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 120
 atctctcgtca ggtcttagtca gagcctccctg cctggtaatg gataacaacta ttggattgg 180
 tacctgcaga agccaggggca gtctccacag ctccgtatct atttgggttc taatcgggcc 240
 tccgggttcc ctgacaggtt cagtggcagt ggctcaggca cagatttac actgaaaatc 300
 agcagagtgg aggctgagga ttttttttttattactgca tgcaagctct acaaactct 360
 cggacgttcc gcgaaggggac caaggtggaa atcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc 420
 ttcatcttcc cggccatctga tgagcgttg aaatctggaa ctgcctctgt tttgtgtgtc 480
 ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gttcagtggaa ggggtggataaa cggccctccaa 540
 tccggtaact cccaggagag tgcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 600
 agcagcacccc tgacgctgag caaaggcagac tacgagaaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 660
 gtcacccatc agggcctgag ctgcggcgtc acaaaggagct tcaacagggg agagtgttag 720

<210> 80

<211> 239

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 80

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

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

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

Leu Leu Pro Gly Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys
 50 55 60
 Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala
 65 70 75 80
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95
 Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr
 100 105 110
 Cys Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
 115 120 125
 Val Glu Ile 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 Arg 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> 81
 <211> 364
 <212> DMK
 <213> Homo sapiens

<400> 81
 caggtgcagc tgcaggagtc gggcccaagga ctggtaagc cttcgagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctgggtt ctccatcaga ggttactact ggagctggat ccggcagccc 120
 ccagggaaagg gactggagtg gattgggtat atctattaca gtgggagcac caactacaac 180
 ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gtttccttg 240
 aagctgagtt ctgtgaccgc tgccggacacg gcccgttatt actgtgcgag aagggggggc 300
 ctctacggtg actacggctg gttcgccccc tggggccagg gaaccttggt caccgtctcc 360
 tcag 364

<210> 82
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 82
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Arg Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Arg Gly Gly Leu Tyr Gly Asp Tyr Gly Trp Phe Ala Pro Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 83
 <211> 322
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 83
 gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctctgtca gggccagtca gagtgttagc agcacctact tagcctggta ccagcagaaaa 120
 cctggccagg ctccccaggct cctcatctat ggtgcattca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gttggcagtgg gtctggaca gacttcactc tcaccatca gagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgtt ttactgttag cagtatagta gcttattcac tttcggccct 300
 gggaccaaaag tggatatcaa ac 322

<210> 84
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 84
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Thr
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gin Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Leu Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 85
 <211> 1401
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 85
 atgaaacatc tgggttctt ctttccttgc gtggcagctc ccagatgggt cctgtccag 60
 gtgcagctgc aggagtcggg cccaggactg gtgaagcctt cggagacccct gtcacccacc 120
 tgcactgtct ctggggctc catcagagggt tactactgga gctggatccg gcagccccca 180
 gggaaaggac tggagtggat tgggtatatac tattacatgt ggagcaccaa ctacaacccc 240
 tccctcaaga gtcgagtcac catatcgtgtgt gacacgttca agaaacgttt ctccctgtaa 300
 ctgaggctgtc tgaccgtgtc ggacacggcc gtgttattact gtgcgagaag gggggggctc 360
 tacgggtact acgggtgtt cggcccttgg ggccaggaa ccttggtac cgtctccca 420
 gcctccacca agggccatc ggtttccccctt ctggccctt gtcacccaggac caccctccg 480
 agcacagcg ccttgggctg cttggtcaag gactacttcc cggaaacccgt gacgggtgtc 540
 tggaaacttag cgcgttgcac cagccggctg cacaccccttcc cagctgttctt acagttccca 600
 ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccttca gcaacttccgg caccctggacc 660
 tacacccgtca acgttagatca caagccca gacaccaagg tggacaagac agttgagcgc 720
 aaatgttgtc tggatgtccc accgttccca gcaccacccgt tggcaggacc gtcagtcttc 780
 ctcttccccc caaaacccaa ggacaccccttccatgttccca ggaccccttgc ggtcacgttc 840
 gtgggtgtgg acgttggccca cgaagaccccttccatgttccca ggaccccttgc cgtggacccgc 900
 gtggagggtgc ataatgtccaa gacaaaggccca cgggaggagc agttcaacacag cacgttccgt 960
 gtggtcagcg tcttcaccgt tggatgttccca gactgttccca gaccccttgc gttttccgt 1020
 aagggttccca acaaaggcccttccatgttccca gaccccttgc gttttccgt 1080
 cagcccccgg aaccacccgttccatgttccca gaccccttgc gttttccgt 1140
 caggccggcc tggatgttccca ggttccatgttccca gaccccttgc gttttccgt 1200
 gagagcaatg ggcagccggaa gacaaactac aagaccacac cttccatgttccca gttttccgt 1260
 ggcttccatgttccca gaccccttgc gttttccgt 1320
 gtcttccatgttccca gaccccttgc gttttccgt 1380
 tccctgttccca gggtaatgttccca gaccccttgc gttttccgt 1401

<210> 86
 <211> 466
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 86
 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15

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

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile
 35 40 45

Arg Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
 85 90 95
 Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
 100 105 110
 Tyr Cys Ala Arg Arg Gly Gly Leu Tyr Gly Asp Tyr Gly Trp Phe Ala
 115 120 125
 Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 130 135 140
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
 145 150 155 160
 Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 165 170 175
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 180 185 190
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 195 200 205
 Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn
 210 215 220
 Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg
 225 230 235 240
 Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
 245 250 255
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 260 265 270
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 275 280 285
 Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 290 295 300
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg
 305 310 315 320
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 325 330 335
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 340 345 350

Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 355 360 365

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

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
385 390 395 400

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met
405 410 415

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
420 425 430

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
435 440 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
450 455 460

Gly Lys
465

<210> 87
<211> 705
<212> ДНК
<213> *Homo sapiens*

```

<400> 87
atggaaaccc cagcgcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccacccga 60
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtttttgt ctccaggggaa aagagccacc 120
ctctccctgca gggccagtcgatgttagc agcacctact tagcttggta ccacgagaaa 180
cctggccagg ctccccaggttccatctat ggtgcatcca gcaggggccac tggcataccca 240
gacagggtca gtggcagtgg gtctgggaca gacttctact tcaccatcag cagactggag 300
cctgttggat ttgcgttgc ttactgttcag cagtatgtatgatatttcac ttccggccct 360
gggacccaaag tggatataca acgaactgtg gctgcacccat ctgttccat ctccggccca 420
tctgtatgagc agtttgcatttggaaacttggaaacttgccttggttgttgcgttgcataacttctat 480
cccaagagagg ccaaaatatacgttggaaagggtg gataacgccttccaaatccggtaaactccca 540
gagagtgtca cagagcagggcagcaaggac agcacctaca gcttcagcagcaccctgtac 600
ctgagcaaaag cagactacgaaacacacaaa gtctacgcgttgcgttgcacccatcagggc 660
ctgagctcgc cctgttgcacaaa gagtttcaac aggggagagt gtttag 705

```

<210> 88
<211> 234
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 88
Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 35 40 45
 Val Ser Ser Thr Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 50 55 60
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
 65 70 75 80
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 85 90 95
 Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
 100 105 110
 Ser Ser Leu Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
 115 120 125
 Thr Val Ala Ala Pro Ser 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> 89
 <211> 378
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 89
 caggtgcagc tggggagtc tggggaggc gtggccagc ctggggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacccatgt agttatggca tgcactgggt ccggccaggct 120
 ccaggccagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcaaagg atggaggtaa taaataccat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atccaaagaa tacgctgtat 240
 ctgcaatga atagcctgag agttgaagac acggctgtt atactgtgt gagaagaggg 300
 catcagctgg ttctggata ctactactac aacggcttgg acgtctgggg ccaagggacc 360
 acggtcaccg tctcctca 378

<210> 90
 <211> 126

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

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

<210> 91
 <211> 378
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 91
 caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctggggaggc cctgagactc 60
 tcctgtgcagc cctctggatt caccttcagt agttatggca tgcactgggt ccggccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcaaagg atggaggtaa taaataccat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaaagaa tacgctgttat 240
 ctgcaaatga atagcctgag agctgaagac acggctgtgtt attactgtgc gagaagaggg 300
 catcagctgg ttctgggata ctactactac aacggctctgg acgtctgggg ccaagggacc 360
 acggtcacccg ttccttc 378

<210> 92
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 92
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Ser Lys Asp Gly Gly Asn Lys Tyr His Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Arg Gly His Gln Leu Val Leu Gly Tyr Tyr Tyr Asn Gly
 100 105 110

Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 93

<211> 336

<212> DHK

<213> Homo sapiens

<400> 93

gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggccctcc 60
 atctcctgca ggtctagtc gaggcttgc tataatgc gatacaactt tttggattgg 120
 tacctgcaga agccaggcgtca gtttccacag ctcctgatct atttgggttc taatcgggcc 180
 tccggggtcc ctgacagggtt cagtggcagt ggatcaggca cagatttac actgaaaatc 240
 agcagagtgg aggtctggaa tggtgggtt tattactgca tgcaagctct acaaactct 300
 cggacgttcg gccaagggac caaggtggaa atcaa 336

<210> 94

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 94

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95

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

<210> 95
 <211> 373
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 95
 caggtgcaac tgggggaggc gtgggtccagc ctggggaggc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt cgctatggca tgcactgggt cggccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatctg atggaggtaa taaatactat 180
 gcagatccg tgaaggggccg attcaccat tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acacgcctgag agctgaggac acggctgtgtt attactgtac gagaagaggg 300
 actggaaaga cttaatccca ctacccggt atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
 accgttcct cag 373

<210> 96
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 96
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30

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

Ala Val Ile Ser Ser Asp Gly Gly Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Thr Arg Arg Gly Thr Gly Lys Thr Tyr Tyr His Tyr Ala Gly Met Asp
 100 105 110

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

<210> 97
 <211> 364
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 97
 caggtgcagc tgcaaggagtc gggcccaaggc ctgggtgaagc cttcgaggac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctgggtgg ctccatcaga ggttactact ggagctggat cggcagcccc 120
 cctggggagg gactggagtg gatgggtat atctattaca gtggggagcac caactacaac 180
 ccctccctca agagtcgagt caccatataca gttagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
 aagctgaact ctgtgaccgc tgccggacacg gcccgtgtattt attgtgcgag aaaggggggc 300

ctctacggtg actacggctg gttcgccccc tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360
tcag 364

<210> 98
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 98
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Arg Gly Tyr
20 25 30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80
Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Lys Gly Gly Leu Tyr Gly Asp Tyr Gly Trp Phe Ala Pro Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 99
<211> 322
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 99
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctccgc a gggccagtc a gagtgttagc agcagcgact tagcctggca ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccagact cctcatctat ggtgcatacc a c a g a g g g c c a c 180
gacagggtca gtggcagtgg g t c t g g g a c a g a c t t c a c t c a g a c a t g g a g 240
cctgaagatt ttgcagtgt a ttactgtcag c a c g c c c g t a g c t t a t t c a c 300
gggaccas a g t g g a t a t c a a c 322

<210> 100
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 100
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Asp Leu Ala Trp His Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ala Arg Ser Leu Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 101

<211> 720

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 101

atgaggetcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgcctct gggtctctgg atccagtggg 60
 gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgccccgtca cccctggaga gccggcctcc 120
 atctcctgca ggtcttagtca gacccctctg cctggtaatg gataacaacta tttggattgg 180
 tacctcgaga agccagggccgtcgtccacacg ctccctgatct atttgggttc taatcgggccc 240
 tccggggtcc ctgacaggtt cagtggcagt ggctcaggca cagatttac actgaaaatc 300
 agcagagtgg aggctgagga tggggatt tattactgca tcaagctct acasactcct 360
 cggacgttcg gccaagggac caaggtggaa atcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc 420
 ttcatcttcc cgccatctga tgacgatgg aaatctggaa ctgcctctgt tgggtgcctg 480
 ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gttcagtggaa aggtggataa cgcctccaa 540
 tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 600
 agcagcaccc tgacgctgag caaaggagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 660
 gtcacccatc agggcctgag ctgcggcgtc acaaaagact tcaacagggg agagtgttag 720

<210> 102

<211> 239

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 102

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

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

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

Leu Leu Pro Gly Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys
 50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala
 65 70 75 80
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95
 Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr
 100 105 110
 Cys Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
 115 120 125
 Val Glu Ile 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> 103
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 103
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95

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

<210> 104
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 104
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95

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

<210> 105
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 105
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 106
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 106
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly His Gln Leu Leu Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 107
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 107
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Met Gly Ser Ser Gly Ser Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
 100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 108
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 108
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Thr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80

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

Arg Tyr Cys Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 109
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 109
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80

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

Arg Asp Tyr Gly Gly Asn Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 110

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 110

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 Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Cys Thr Asn Gly Val Cys Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

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

<210> 111

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 111

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95

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

<210> 112

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 112

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95

Leu Gln Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105 110

<210> 113

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 113

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 114

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 114

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Tyr Cys Gly Gly Asp Cys Tyr Gly Ile Ala Val Ala Gly Trp
 100 105 110

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

<210> 115

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 115

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Thr Thr Gly Thr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 100 105 110

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

<210> 116

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 116

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Tyr Gly Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 100 105 110

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

<210> 117

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 117

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Tyr Gly Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 100 105 110

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

<210> 118

<211> 23

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: Праймер

<220>

<221> модифицированное основание

<222> (21)

<223> i

<400> 118

caggtgcagc tggagcagtc ngg

23

<210> 119

<211> 24

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: Праймер

<400> 119

gctgagggag tagagtccctg agga

24

<210> 120

<211> 49

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: Праймер

<400> 120		
tatctaagct tcttagactcg accggccacca tggagtttgg gctgagctg		49
<210> 121		
<211> 49		
<212> ДНК		
<213> Синтетическая последовательность		
<220>		
<223> Описание синтетической последовательности: Праймер		
<400> 121		
tatctaagct tcttagactcg accggccacca tggagtttgg gctgagctg		49
<210> 122		
<211> 51		
<212> ДНК		
<213> Синтетическая последовательность		
<220>		
<223> Описание синтетической последовательности: Праймер		
<400> 122		
tatctaagct tcttagactcg agcggccacca tgaaaacacct gtggtttttc c		51
<210> 123		
<211> 51		
<212> ДНК		
<213> Синтетическая последовательность		
<220>		
<223> Описание синтетической последовательности: Праймер		
<400> 123		
tatctaagct tcttagactcg agcggccacca tgaaaacatct gtggtttttc c		51
<210> 124		
<211> 51		
<212> ДНК		
<213> Синтетическая последовательность		
<220>		
<223> Описание синтетической последовательности: Праймер		
<400> 124		
tatctaagct tcttagactcg agcggccacca tggactggac ctggaggatc c		51
<210> 125		
<211> 44		
<212> ДНК		
<213> Синтетическая последовательность		

<220>
 <223> Описание синтетической последовательности: Праймер
 <400> 125
 ttctctgatc agaattccta tcatttaccc ggagacaggg agag 44

<210> 126
 <211> 41
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Описание синтетической последовательности: Праймер
 <400> 126
 cttcaagttt accccgggcca ccatgaggct ccctgtctag c 41

<210> 127
 <211> 43
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Описание синтетической последовательности: Праймер
 <400> 127
 ttctttgatc agaattctca ctatcactct cccctgttga agc 43

<210> 128
 <211> 49
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Описание синтетической последовательности: Праймер
 <400> 128
 tatctaagct tctagactcg accggccacca tggagtttgg gctgagctg 49

<210> 129
 <211> 49
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Описание синтетической последовательности: Праймер
 <400> 129
 tatctaagct tctagactcg accggccacca tggagtttgg gctgagctg 49

<210> 130
 <211> 49

<212> ДНК		
<213> Синтетическая последовательность		
<220>		
<223> Описание синтетической последовательности: Праймер		
<400> 130		
tatctaagct tcttagactcg accggccacca tggagtttgg gctgagctg		49
<210> 131		
<211> 51		
<212> ДНК		
<213> Синтетическая последовательность		
<220>		
<223> Описание синтетической последовательности: Праймер		
<400> 131		
tatctaagct tcttagactcg agcgccacca taaaacatct gtggtttttc c		51
<210> 132		
<211> 49		
<212> ДНК		
<213> Синтетическая последовательность		
<220>		
<223> Описание синтетической последовательности: Праймер		
<400> 132		
tatctaagct tcttagactcg accggccacca tggagtttgg gctgagctg		49
<210> 133		
<211> 51		
<212> ДНК		
<213> Синтетическая последовательность		
<220>		
<223> Описание синтетической последовательности: Праймер		
<400> 133		
tatctaagct tcttagactcg agcgccacca taaaacatct gtggtttttc c		51
<210> 134		
<211> 45		
<212> ДНК		
<213> Синтетическая последовательность		
<220>		
<223> Описание синтетической последовательности: Праймер		
<400> 134		
tcttcaagct tgcccgggcc cgccacccatg gaaaccccaag cgcaag		45

<210> 135
 <211> 36
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Описание синтетической последовательности: Праймер

<400> 135
 gcaagttca ccaatggttc gtctgcctct gcagtg 36

<210> 136
 <211> 43
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Описание синтетической последовательности: Праймер

<400> 136
 tcagtatgg tcatggtgat gtctcagccg atccctggga cca 43

<210> 137
 <211> 43
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Описание синтетической последовательности: Праймер

<400> 137
 tcagtatgg tcatggtgat gtgggcaggg ctccgcatgg tat 43

<210> 138
 <211> 43
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Описание синтетической последовательности: Праймер

<400> 138
 tcagtatgg tcatggtgat gacaggtgca gatggtgtct gtt 43

<210> 139
 <211> 197
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 139
 Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr
 1 5 10 15

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

<210> 140
 <211> 153
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 140
 Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr
 1 5 10 15
 Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu
 20 25 30
 Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val
 35 40 45
 Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu
 50 55 60
 Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His
 65 70 75 80

Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr
 85 90 95

Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr
 100 105 110

Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly
 115 120 125

Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu
 130 135 140

Pro Cys Pro His His His His His
 145 150

<210> 141

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 141

Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr
 1 5 10 15

Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu
 20 25 30

Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val
 35 40 45

Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu
 50 55 60

Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His
 65 70 75 80

Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr
 85 90 95

Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys His His His His His His
 100 105 110

<210> 142

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 142

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 143

<211> 15

<212> PRT

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: Линкерный пептид

<400> 143

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 144

<211> 18

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: Синтетический олигонуклеотид

<400> 144

tttttttttt tttttttt

18

<210> 145

<211> 6

<212> PRT

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: 6-Nia-метка

<400> 145

His His His His His His

1 5

<210> 146

<211> 36

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: Праймер

<400> 146

tgcggacttc accatgggtt ctggccctcg gctgtg

36

<210> 147

<211> 48

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: Праймер

<400> 147

gtccctcgagt cagtgatgggt gatggtgatg tgggcaggaa tgacagac

48

пи с последовательностью SEQ ID NO: 74 и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного домена легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 76 соответственно и

(t) аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного домена тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 82 и аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного домена легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 84 соответственно.

2. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий участок по п.1, которые обладают по меньшей мере одним из следующих свойств:

(a) не связываются с мышиными, крысиными, собачьими и/или кроличьими В-клетками;

(b) связываются с В-клетками человека, макаков-резус и/или обезьян циномолгус;

(c) обладают селективностью в отношении CD40, которая по меньшей мере в 100 раз выше, чем их селективность в отношении рецепторного активатора ядерного фактора каппа-цепи В-клеток (RANK), 4-1BB (CD137), рецептора 1 фактора некроза опухоли (TNFR-1) и рецептора 2 фактора некроза опухоли (TNFR-2);

(d) связываются с CD40 с $K_D 4 \times 10^{-10}$ М или менее;

(e) имеют показатель для CD40 K_{off} , составляющий 2×10^{-4} или менее;

(f) ингибируют рост опухоли *in vivo* в присутствии Т-клеток человека и/или дендритных клеток человека;

(g) ингибируют рост CD40-положительных опухолей в отсутствие иммунных клеток человека;

(h) повышают экспрессию ICAM, МНС-II, B7-2, CD71, CD23 и/или CD71 на поверхности В-клеток человека;

(i) увеличивают секрецию IL-12p40, IL-12p70 и/или IL-8 дендритными клетками человека;

(j) увеличивают экспрессию ICAM, МНС-II, B7-2 и/или CD83 на поверхности дендритных клеток человека;

(k) повышают экспрессию гамма-интерферона Т-клетками человека во время их аллогенной стимуляции;

(l) связывают человеческий CD40 в присутствии человеческого CD40L;

(m) связываются с эпитопом CD40 человека, который находится в пределах домена 1 или домена 2 внеклеточного домена CD40; и

(n) связываются с эпитопом CD40 человека, который находится в пределах домена 2 или домена 3 внеклеточного домена CD40.

3. Моноклональное антитело по п.1, в котором аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи выбраны из группы, состоящей из:

(a) аминокислотной последовательности тяжелой цепи и аминокислотной последовательности легкой цепи моноклонального антитела 3.1.1, причем в обеих указанных аминокислотных последовательностях отсутствует сигнальная последовательность;

(b) аминокислотной последовательности тяжелой цепи и аминокислотной последовательности легкой цепи моноклонального антитела 7.1.2, причем в обеих указанных аминокислотных последовательностях отсутствует сигнальная последовательность;

(c) аминокислотной последовательности тяжелой цепи и аминокислотной последовательности легкой цепи моноклонального антитела 10.8.3, причем в обеих указанных аминокислотных последовательностях отсутствует сигнальная последовательность;

(d) аминокислотной последовательности тяжелой цепи и аминокислотной последовательности легкой цепи моноклонального антитела 15.1.1, причем в обеих указанных аминокислотных последовательностях отсутствует сигнальная последовательность;

(e) аминокислотной последовательности тяжелой цепи и аминокислотной последовательности легкой цепи моноклонального антитела 21.4.1, причем в обеих указанных аминокислотных последовательностях отсутствует сигнальная последовательность;

(f) аминокислотной последовательности тяжелой цепи и аминокислотной последовательности легкой цепи моноклонального антитела 21.2.1, причем в обеих указанных аминокислотных последовательностях отсутствует сигнальная последовательность;

(g) аминокислотной последовательности тяжелой цепи и аминокислотной последовательности легкой цепи моноклонального антитела 22.1.1, причем в обеих указанных аминокислотных последовательностях отсутствует сигнальная последовательность;

(h) аминокислотной последовательности тяжелой цепи и аминокислотной последовательности легкой цепи моноклонального антитела 22.1.1H-C109A, причем в обеих указанных аминокислотных последовательностях отсутствует сигнальная последовательность;

(i) аминокислотной последовательности тяжелой цепи и аминокислотной последовательности легкой цепи моноклонального антитела 23.5.1, причем в обеих указанных аминокислотных последовательностях отсутствует сигнальная последовательность;

(j) аминокислотной последовательности тяжелой цепи и аминокислотной последовательности легкой цепи моноклонального антитела 23.25.1, причем в обеих указанных аминокислотных последователь-

SEQ ID NO: 52 соответственно;

(н) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 58 и аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 60 соответственно;

(о) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 66 и аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 68 соответственно;

(p) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 66 и аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 100 соответственно;

(q) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 98 и аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 68 соответственно;

(f) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 98 и аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 100 соответственно;

(s) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 74 и аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 76 соответственно и

(т) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 82 и аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 84 соответственно.

5. Моноклональное антитело по п.1, в котором аминокислотные последовательности тяжелой цепи

и легкой цепи выбраны из группы, состоящей из:

(а) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6 и аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8 соответственно, причем в обеих указанных аминокислотных последовательностях отсутствует

сигнальная последовательность;

(b) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14 и аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16 соответственно, причем в обеих указанных аминокислотных последовательностях отсут-

ествует сигнальная последовательность;

(с) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 22 и аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 24 соответственно, причем обе аминокислотные последовательности без сигнальной последовательности;

(d) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 30 и аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 32 соответственно, причем в обеих указанных аминокислотных последовательностях отсут-

стует сигнальная последовательность;

(е) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 38 и аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 40 соответственно, причем обе аминокислотные последовательности без сигнальной после-

(f) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 46 и аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 48 соответственно, причем в обеих указанных аминокислотных последовательностях отсутствует сигнальная последовательность;

(g) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 54 и аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 56 соответственно, причем в обеих указанных аминокислотных последовательностях отсутствует сигнальная последовательность;

(h) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 62 и аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 64 соответственно, причем в обеих указанных аминокислотных последовательностях отсутствует сигнальная последовательность;

(i) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 70 и аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 72 соответственно, причем в обеих указанных аминокислотных последовательностях отсутствует сигнальная последовательность;

(ж) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 78 и аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 80 соответственно, причем в обеих указанных аминокислотных последовательностях отсутствует сигнальная последовательность;

(к) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 86 и аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 88 соответственно, причем в обеих указанных аминокислотных последовательностях отсутствует сигнальная последовательность.

6. Моноклональное антитело по п.5, содержащее:
(а) аминокислотную последовательность SEQ ID

(а) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 без сигнальной последовательности, в которой остаток 78 зрелой последовательности изменен с аланина на треонин, остаток 88 зрелой последовательности изменен с валина на аланин и остаток 97 зрелой последовательности изменен с валина на аланин, и

(б) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 без сигнальной последовательности, в которой остаток 4 зрелой последовательности изменен с лейцина на метионин, а остаток 83 зрелой последовательности изменен с лейцина на валин.

(а) аминокислотную последовательность SEQ ID N

(a) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46 без сигнальной последовательности и (b) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48 без сигнальной последовательности.

8. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенные связывающий участок.

8. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антиспецифизирующий участок по

любому из пп.1-7 и фармацевтически приемлемый носитель.

9. Применение антитела или его антигенсвязывающего участка по любому из пп.1-7 для производства лекарственного средства для лечения злокачественной опухоли у человека.

10. Применение антитела или антигенсвязывающего участка по любому из пп.1-7 для производства лекарственного средства для усиления иммунного ответа у человека.

11. Выделенная клеточная линия, которая продуцирует антитело или его антигенсвязывающий участок по любому из пп.1-7 либо тяжелую цепь или легкую цепь указанного антитела или его антигенсвязывающий участок.

12. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь или ее антигенсвязывающий участок или легкую цепь или ее антигенсвязывающий участок антитела или его антигенсвязывающий участок по любому из пп.1-7.

13. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п.12, содержащая нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

(а) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность тяжелой цепи (или ее антигенсвязывающего участка) антитела, выбранного из группы, состоящей из 3.1.1, 3.1.1H-A78T, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A, 3.1.1L-L4M-L83V, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1L-C92A, 23.28.1H-D16E, 23.28H-D16E/23.28.1L-C92A, 23.28.1L-C92A, 23.29.1, 23.29.1L-R174K и 24.2.1, или указанную аминокислотную последовательность, не содержащую сигнальную последовательность;

(б) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность легкой цепи (или ее антигенсвязывающего участка) антитела, выбранного из группы, состоящей из 3.1.1, 3.1.1H-A78T, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A, 3.1.1L-L4M-L83V, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1L-C92A, 23.28.1H-D16E, 23.28H-D16E/23.28.1L-C92A, 23.28.1L-C92A, 23.29.1, 23.29.1L-R174K и 24.2.1, или указанную аминокислотную последовательность, не содержащую сигнальную последовательность;

(с) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность тяжелой цепи или ее вариабельный домен, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46, 50, 54, 58, 62, 66, 70, 74, 78, 82, 86, 90, 92, 96 и 98, или указанные аминокислотные последовательности, не содержащие сигнальной последовательности, если она присутствует;

(д) нуклеотидной последовательности, кодирующей тяжелую цепь или ее вариабельный домен, причем указанная нуклеотидная последовательность выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 49, 53, 57, 61, 65, 69, 73, 77, 81, 85, 89, 91, 95 и 97, или указанная последовательность не содержит сигнальной последовательности, если она присутствует;

(е) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность легкой цепи или ее вариабельный домен, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68, 72, 76, 80, 84, 88, 94, 100 и 102, или указанную аминокислотную последовательность, не содержащую сигнальной последовательности; и

(ф) нуклеотидной последовательности, кодирующей легкую цепь или ее вариабельный домен, причем указанная нуклеотидная последовательность выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, 7, 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35, 39, 43, 47, 51, 55, 59, 63, 67, 71, 75, 79, 83, 87, 93, 99 и 101, или указанная последовательность не содержит сигнальной последовательности, если она присутствует.

14. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.12 или 13, где указанный вектор не обязательно содержит контролирующую экспрессию последовательность, оперативно связанную с молекулой нуклеиновой кислоты.

15. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п.14 или молекулу нуклеиновой кислоты по п.13.

16. Способ получения анти-CD40-антитела или его антигенсвязывающего участка, предусматривающий культивирование клетки-хозяина по п.15 или клеточной линии по п.11 в соответствующих условиях и выделение указанного антитела или его антигенсвязывающего участка.

17. Применение антитела по п.1 для производства лекарственного средства для лечения CD40-отрицательной опухоли у человека.

Выравнивание белковых последовательностей вариабельного домена антитела с (GL) последовательностями клеток зародышевой линии (CDR подчеркнуты, мутации из клеток зародышевой линии выделены жирным шрифтом/оттенены)

A

Зародышевая линия V=A3/A19, J=JK1

3.1.1 DIVMTQSPLS LPVTGPEPAS ISCRSSQSLI TSNGYNFLDW YLQKPGQSPQ LLIYLGNSRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVRAEDVGV YCNCQALQTP RTFGQGKVE IK
7.1.2 DIVMTQSPLS LPVTGPEPAS ISCRSSQSLI TSNGYNFLDW YLQKPGQSPQ LLIYLGNSRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVRAEDVGV YCNCQALQTP RTFGQGKVE IK
GL DIVMTQSPLS LPVTGPEPAS ISCRSSQSLI HSNGYNFLDW YLQKPGQSPQ LLIYLGNSRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVRAEDVGV YCNCQALQTP RTFGQGKVE IK

B

Зародышевая линия V=A3/A19, J=JK2

15.1.1 DIVMTQSPLS LPVTGPEPAS ISCRSSQSLI HSNGYNFLDW YLQKPGQSPQ LLIYLGNSRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVRAEDVGV YCNCQALQTP YTFGQGKVE IK
GL DIVMTQSPLS LPVTGPEPAS ISCRSSQSLI HSNGYNFLDW YLQKPGQSPQ LLIYLGNSRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVRAEDVGV YCNCQALQTP YTFGQGKVE IK

C

Зародышевая линия V=A5, J=JK4

10.8.3 DIVMTQSPSS VSASVGDRTV ITCRASQPSI SWLAWYQKRP GKAPKLLIY ASGLOSGVPSR FGSGSGTDF TLISISSLQF EDFTATYCCQ TDSPFLTFCG GRKVEIK
21.4.1 DIVMTQSPSS VSASVGDRTV ITCRASQGIX SWLAWYQKRP GKAPKLLIYT ASGLOSGVPSR FGSGSGTDF TLISISSLQF EDFTATYCCQ ANIFELTFCG GRKVEIK
GL DIVMTQSPSS VSASVGDRTV ITCRASQGIS SWLAWYQKRP GKAPKLLIYA ASGLOSGVPSR FGSGSGTDF TLISISSLQF EDFTATYCCQ ANIFELTFCG GRKVEIK

D

Зародышевая линия V=3-30+, D=D4+DIR3, J=JH6

3.1.1 QVQLVESGGG VVQPGRSRLR SCRAASGPTFS SYGMHHVRQA PGKGLEWAVV ISKOGGNKHY ADSVKGRFTI SRDNMSKNTLY LOMNSLRAED TAVYVYCARRG HQLVLYGYYY NGLODVGQQT TVTVSS
GL QVQLVESGGG VVQPGRSRLR SCRAASGPTFS SYGMHHVRQA PGKGLEWAVV ISYDGSNKKY ADSVKGRFTI SRDNMSKNTLY LOMNSLRAED TAVYVYCAR-G HQLVLYGYYY YGMHDVGQQT TVTVSS

E

Зародышевая линия V=3-30+, D=DIR5+D1-26, J=JH6

7.1.2 QVQLVESGGG VVQPGRSRLR SCRAASGPTFS SYGMHHVRQA PGKGLEWAVV ISNDGDNKHY ADSVKGRFTI SRDNMSKNTLY LOMNSLRAED TAVYVYCARRG MGSSGSRGDY YYYGLDVNG OCTTVTVSS
GL QVQLVESGGG VVQPGRSRLR SCRAASGPTFS SYGMHHVRQA PGKGLEWAVV ISYDGSNKKY ADSVKGRFTI SRDNMSKNTLY LOMNSLRAED TAVYVYCAR-- MGSSG-DY YYYGMHDVG OCTTVTVSS

F

Зародышевая линия V=4-35, D=DIR3, J=JH6

10.8.3 QVQLQESGPG LVKPSETSLI TCTVSGGSIS SYWYMIROQ AGKGLEWIGR VYTSGSTYN PSLKSRVTMS VDTSKNQFSL KLSVTAAADT AVVYCARGL YNG---YGM DWNGQGTTVTVSS
GL QVQLQESGPG LVKPSETSLI TCTVSGGSIS SYWYMIROQ AGKGLEWIGR VYTSGSTYN PSLKSRVTMS VDTSKNQFSL KLSVTAAADT AVVYCAR--- YGGYYYGM DWNGQGTTVTVSS

G

Зародышевая линия V=4-59, D=D4-23, J=JH4

15.1.1 QVQLQESGAE VVKKPGASAKV SCKASGTYT SYGMHHVRQA PGKGLEWIGR IYVSGSTYN PSLKSRVTIS VDMSKNQFSL KLSVTAAADT AVVYCARGD YGGHMYTBQ WGGQTLTVTVSS
GL QVQLQESGAE VVKKPGASAKV SCKASGTYT SYGMHHVRQA PGKGLEWIGR IYVSGSTYN PSLKSRVTIS VDMSKNQFSL KLSVTAAADT AVVYCAR-- D YGGMS-YFDX WGGQTLTVTVSS

H

Зародышевая линия V=1-02, D=DIR1, J=JH4

21.4.1 QVQLVQSGAE VVKKPGASAKV SCKASGTYT SYGMHHVRQA PGKGLEWIGR IYVSGSTYN PSLKSRVTIS VDMSKNQFSL KLSVTAAADT AVVYCAR-- --GICHTNGVC YTFDINGQQT LTVTVSS
GL QVQLVQSGAE VVKKPGASAKV SCKASGTYT SYGMHHVRQA PGKGLEWIGR IYVSGSTYN PSLKSRVTIS VDMSKNQFSL KLSVTAAADT AVVYCAR-- --GICHTNGVC YTFDINGQQT LTVTVSS

Фиг. 1

Выравнивание белковых последовательностей вариабельного домена антитела с (GL) последовательностями клеток зародышевой линии (CDR подчеркнуты, мутации из клеток зародышевой линии выделены жирным шрифтом/оттенены)

A

Зародышевая линия V=A3/A19, J=JK1

22.1.1 DIVMTQSPLS LPVTGPEPAS ISCRSSQSLI TSNGYNFLDW YLQKPGQSPQ LLIYLGNSRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVRAEDVGV YCNCQALQTP RTFGQGKVEIK
23.5.1 DIVMTQSPLS LPVTGPEPAS ISCRSSQSLI PGKGLYVYDYLQKPGQSPQ LLIYLGNSRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVRAEDVGV YCNCQALQTP RTFGQGKVEIK
23.29.1 DIVMTQSPLS LPVTGPEPAS ISCRSSQSLI PGKGLYVYDYLQKPGQSPQ LLIYLGNSRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVRAEDVGV YCNCQALQTP RTFGQGKVEIK

Зародышевая клетка DIVMTQSPLS LPVTGPEPAS ISCRSSQSLI HSNGYNFLDW YLQKPGQSPQ LLIYLGNSRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVRAEDVGV YCNCQALQTP RTFGQGKVEIK

B

Зародышевая линия V=A3/A19, J=JK3

22.1.2 DIVMTQSPLS LPVTGPEPAS ISCRSSQSLI TSNGYNFLDW YLQKPGQSPQ LLIYLGNSRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVRAEDVGV YCNCQALQTP RTFGQGKVEIK

Зародышевая клетка DIVMTQSPLS LPVTGPEPAS ISCRSSQSLI HSNGYNFLDW YLQKPGQSPQ LLIYLGNSRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVRAEDVGV YCNCQALQTP RTFGQGKVEIK

C

Зародышевая линия V=A27, J=JK3

23.28.1 EIVLTCSPGTLI SLPGERATL SCRASQSVSSSDLAHNCQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGS GSGTDFTLTISRLPEPDEFAVVYCOHCRS-LETFGPGTKVDIK
23.28.1L-C92A EIVLTCSPGTLI SLPGERATL SCRASQSVSSSDLAHNCQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGS GSGTDFTLTISRLPEPDEFAVVYCOHCRS-LETFGPGTKVDIK
24.2.1 EIVLTCSPGTLI SLPGERATL SCRASQSVSSSDLAHNCQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGS GSGTDFTLTISRLPEPDEFAVVYCOQYS-LETFGPGTKVDIK

Зародышевая клетка EIVLTCSPGTLI SLPGERATL SCRASQSVSSSDLAHNCQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGS GSGTDFTLTISRLPEPDEFAVVYCOQYS-LETFGPGTKVDIK

D

Зародышевая линия V=3-30+, D=DIR3+D6-19, J=JH4

21.2.1 QVQLVESGGGVVQPGRSRLR SCRAASGFTFSSYVYHNRQAPGKGLEWAVVMSYDGSSKYYANSVKGRTI SRDNMSKNTLYLQINSLRAEDTAVYVYCAR-DGGK---AVPGPDYNGQILTVTVSS

Зародышевая клетка QVQLVESGGGVVQPGRSRLR SCRAASGFTFSSYVYHNRQAPGKGLEWAVVISYDGNSKYYADSVKGRTI SRDNMSKNTLYLQINSLRAEDTAVYVYCAR-YGGT-NGQTLTVTVSS

E

Зародышевая линия V=3-30+, D=D1-1, J=JH6

22.1.1 QVQLVESGGGVVQPGRSRLR SCRAASGFTFSSYVYHNRQAPGKGLEWAVV18SDGQKYYADSVKGRTI SRDNMSKNTLYLQINSLRAEDTAVYVYCAR-RGGT-GKTYVYHCGDVMGGTTVTVSS
22.1.1H-C109A QVQLVESGGGVVQPGRSRLR SCRAASGFTFSSYVYHNRQAPGKGLEWAVV18SDGQKYYADSVKGRTI SRDNMSKNTLYLQINSLRAEDTAVYVYCAR-RGGT-GKTYVYHCGDVMGGTTVTVSS

Зародышевая клетка QVQLVESGGGVVQPGRSRLR SCRAASGFTFSSYVYHNRQAPGKGLEWAVVISYDGNSKYYADSVKGRTI SRDNMSKNTLYLQINSLRAEDTAVYVYCAR-GTG-TYYYYYGMHDVMGGTTVTVSS

F

Зародышевая линия V=3-30+, D=D4-17, J=JH6

23.5.1 QVQLVESGGGVVQPGRSRLR SCRAASGFTFSSYVYHNRQAPGKGLEWAVV18SDGNSKYYADSVKGRTI SRDNMSKNTLYLQINSLRAEDTAVYVYCAR--DGDYDYYYYYGMHDVMGGTTVTVSS

Зародышевая клетка QVQLVESGGGVVQPGRSRLR SCRAASGFTFSSYVYHNRQAPGKGLEWAVVISYDGNSKYYADSVKGRTI SRDNMSKNTLYLQINSLRAEDTAVYVYCAR--DGDYDYYYYYGMHDVMGGTTVTVSS

G

Зародышевая линия V=3-30+, D=D4-17, J=JH6

23.29.1 QVQLVESGGGVVQPGRSRLR SCRAASGFTFSSYVYHNRQAPGKGLEWAVV18SDGNSKYYADSVKGRTI SRDNMSKNTLYLQINSLRAEDTAVYVYCAR-BGNYYBYYGLDVNGQGTTVTVSS

Зародышевая клетка QVQLVESGGGVVQPGRSRLR SCRAASGFTFSSYVYHNRQAPGKGLEWAVVISYDGNSKYYADSVKGRTI SRDNMSKNTLYLQINSLRAEDTAVYVYCAR--DGDYDYYYYYGMHDVMGGTTVTVSS

H

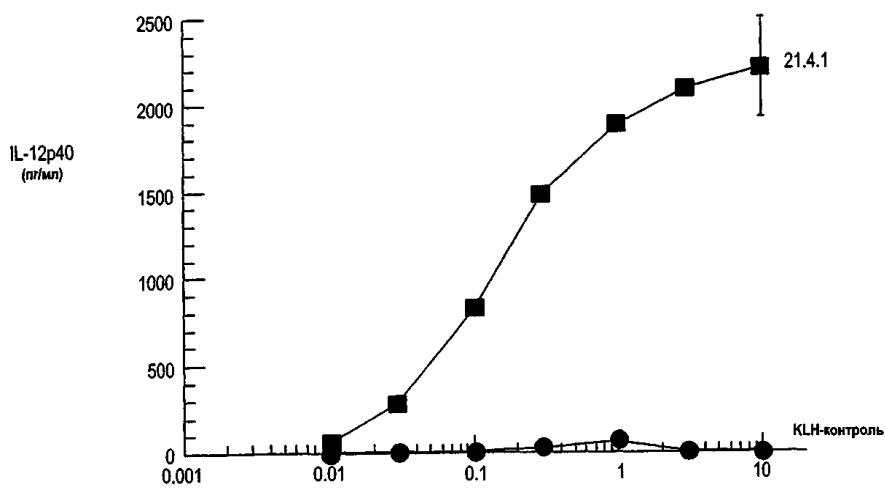
Зародышевая линия V=4-16, D=DIR1+D4-17, J=JH5

23.28.1 QVQLQESGPGFLVKPSETLSITCTVSGGS1RGGYMSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTHYNPSLKSRTV18SDGQKYYADSVKGRTI SRDNMSKNTLYLQINSLRAEDTAVYVYCAR-RGGGGLYGDYGMFAPNGQGTIVTVSS

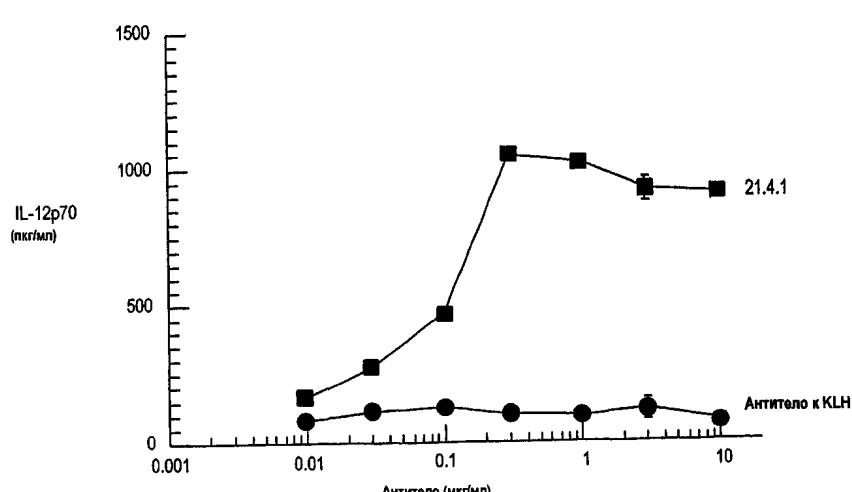
23.28.1H-D16E QVQLQESGPGFLVKPSETLSITCTVSGGS1RGGYMSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTHYNPSLKSRTV18SDGQKYYADSVKGRTI SRDNMSKNTLYLQINSLRAEDTAVYVYCAR-RGGGGLYGDYGMFAPNGQGTIVTVSS

Зародышевая клетка QVQLQESGPGFLVKPSETLSITCTVSGGS1RGGYMSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTHYNPSLKSRTV18SDGQKYYADSVKGRTI SRDNMSKNTLYLQINSLRAEDTAVYVYCAR-DGDYDYYYYYGMHDVMGGTTVTVSS

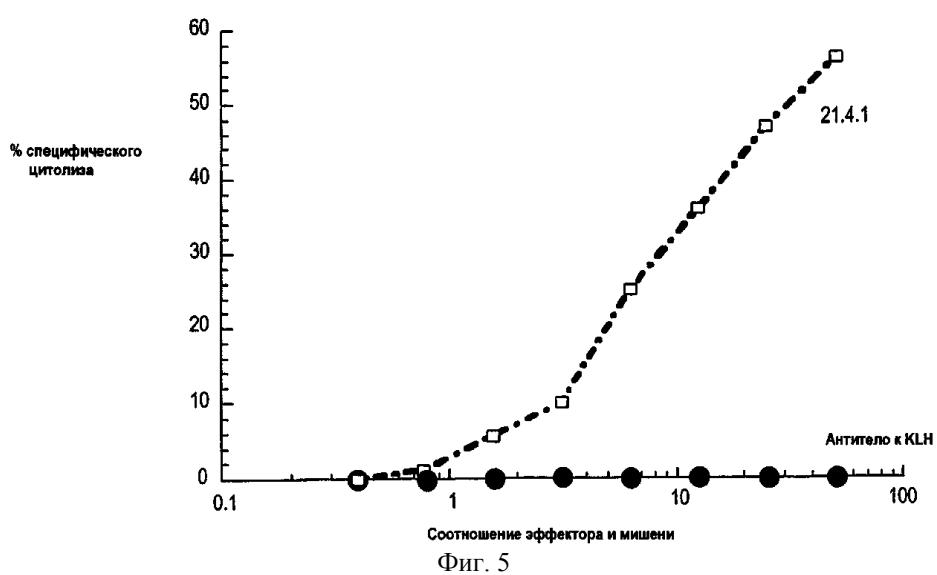
Фиг. 2



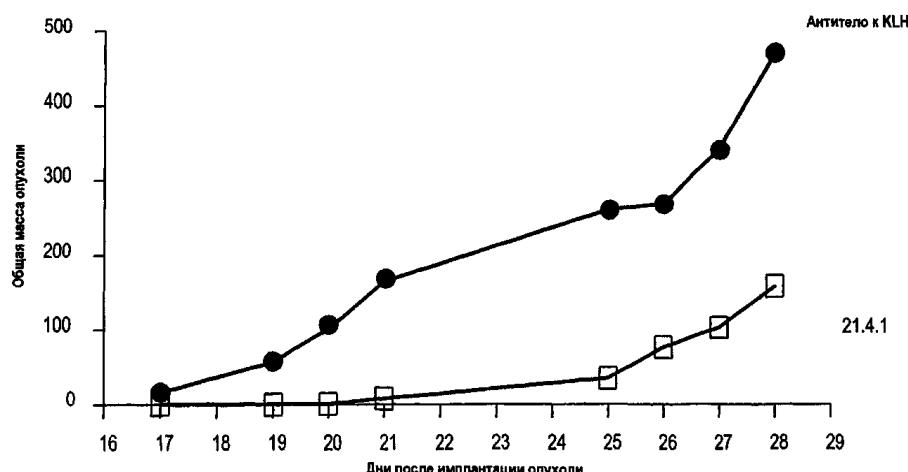
ФИГ. 3



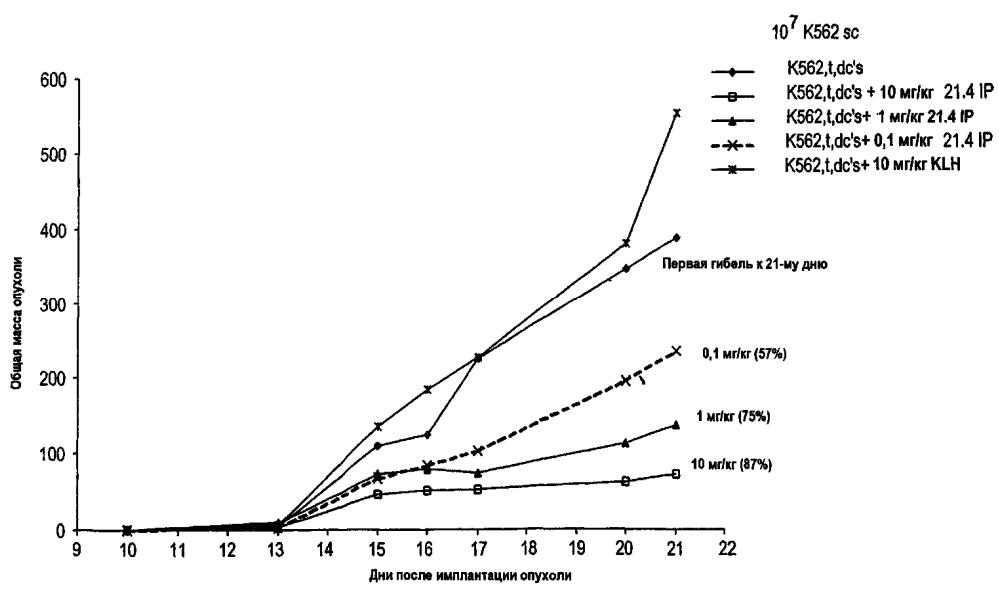
ФИГ. 4



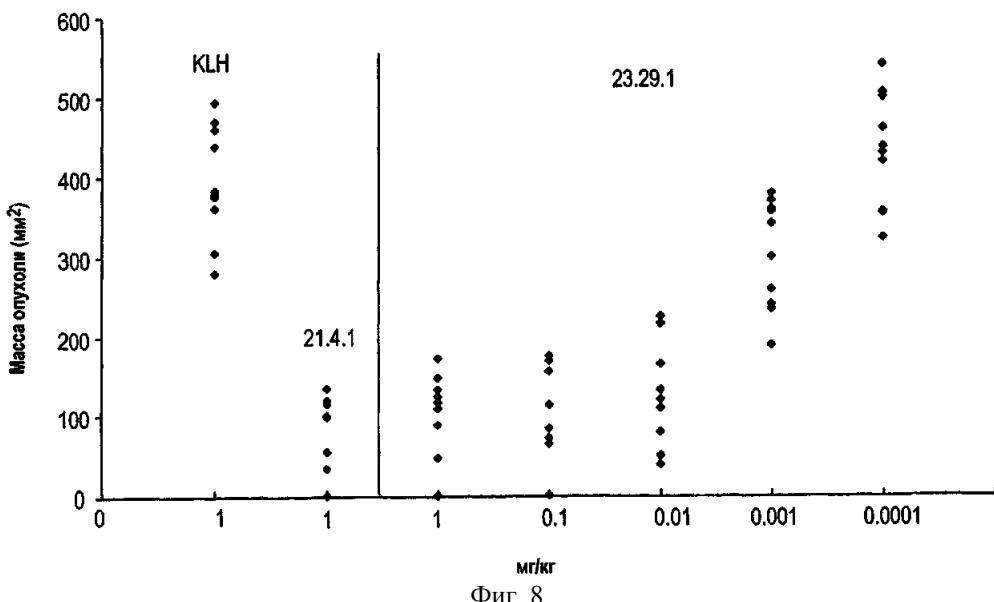
ФИГ. 5



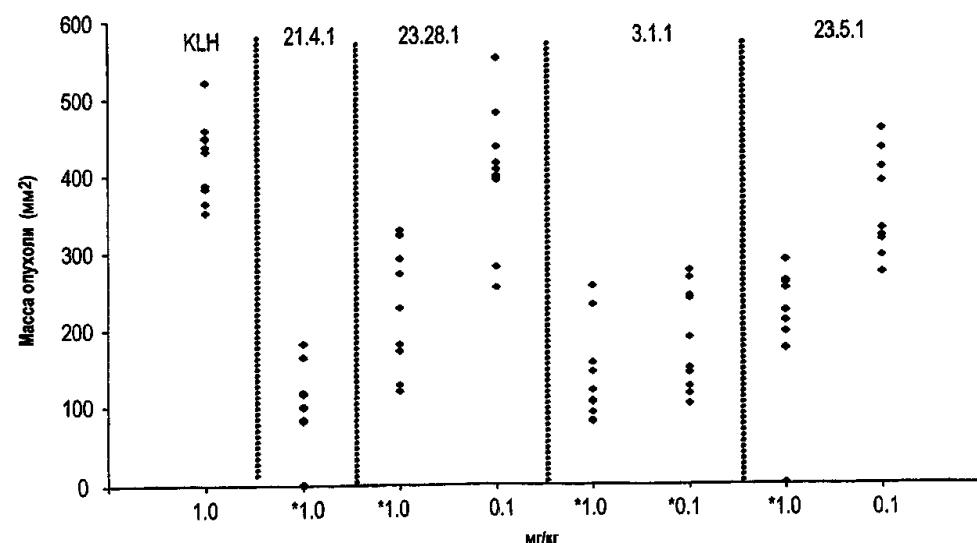
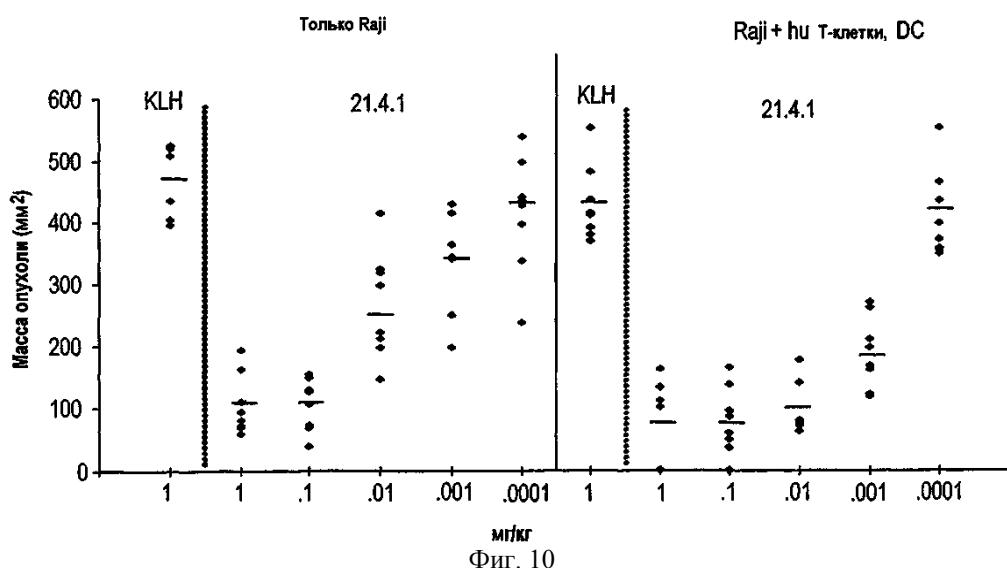
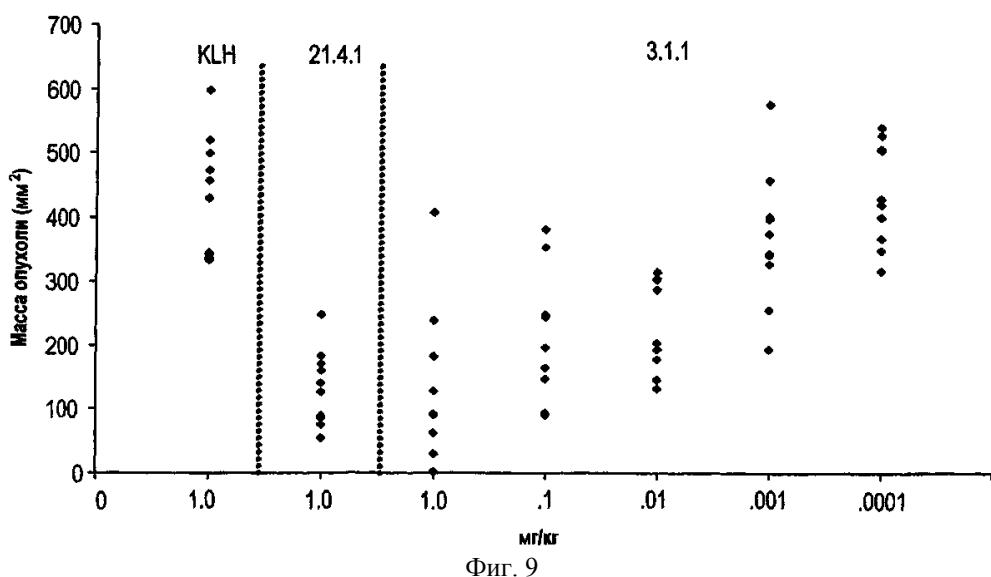
ФИГ. 6



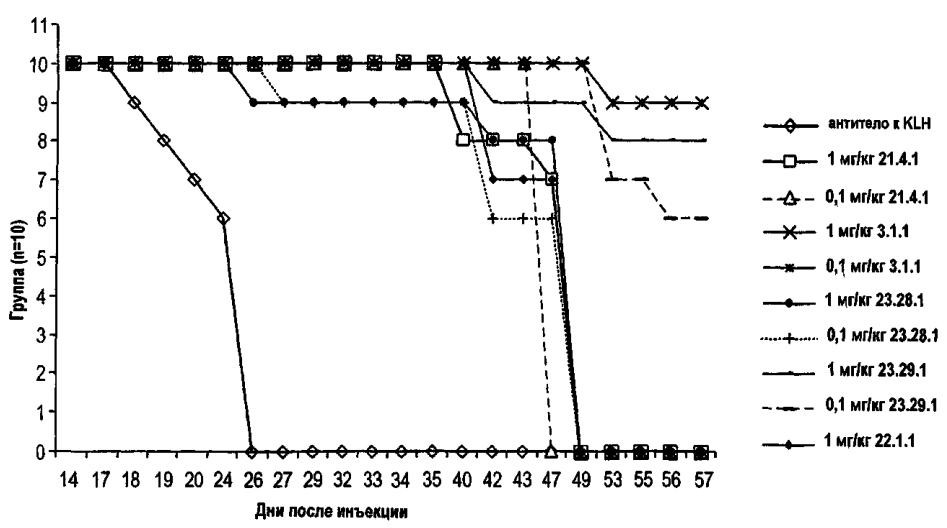
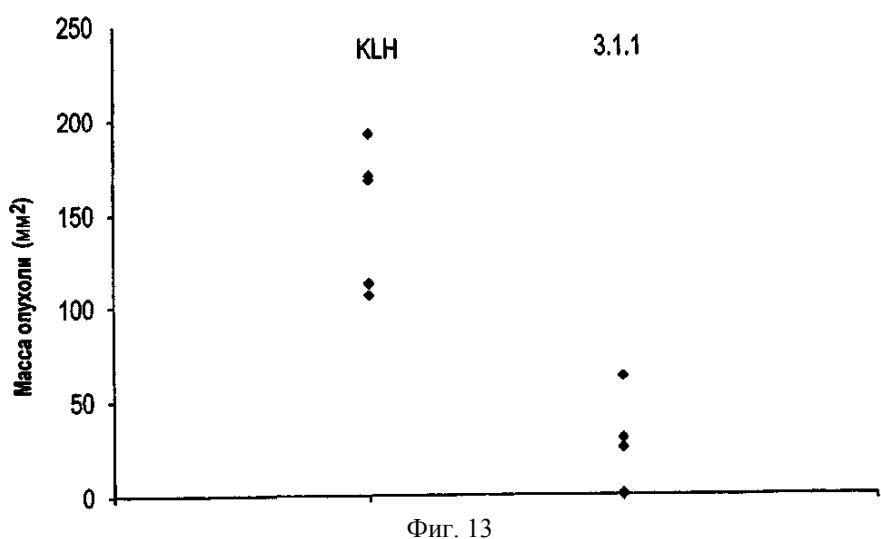
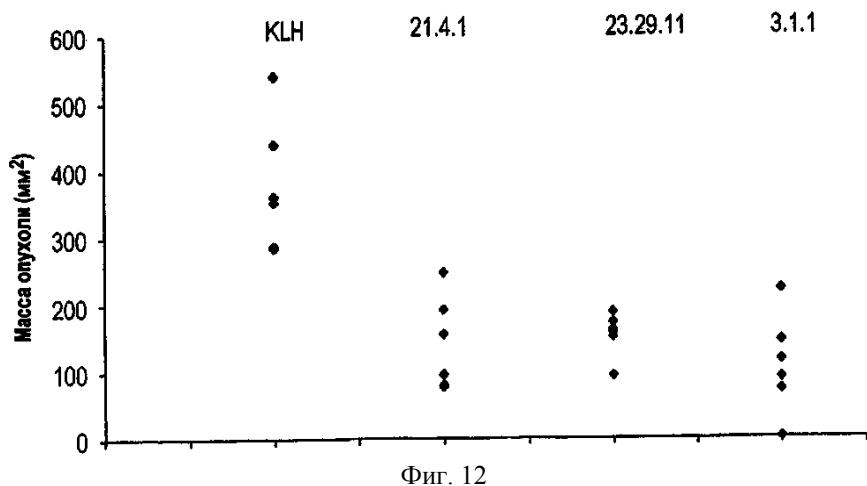
ФИГ. 7

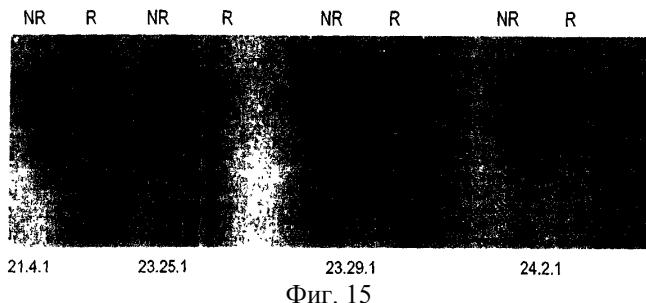


ФИГ. 8



* p<.0001





Фиг. 15

D1

Мышь VTCSDKQYLHDGQCCDLCQPGSRLTSHTALEKTQCH
Человек TACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDCTEFTETECL

D2

Мышь PCDSGEFSAQWNREIRCHQHRHCEPNQGLRVKKEGTAESDTVCT
Человек PCGESEFLDTWNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICT

D3

Мышь CKEGQHCTSVDCEACACQHTPCIPGFGVMEMATETTDTVCHP
Человек CEEGWHCTSEACESCVLHRSCSPGFGVKQIATGVSDTICEP

D4

Мышь CPVGFFSNQSSLFEKCYPWTSCEDKNLEVLQKGTQTNVICG
Человек CPVGFFSNVSSAFEKCHPWTSETKDLVQQAGTNKTDVVCG

Фиг. 16

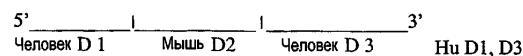
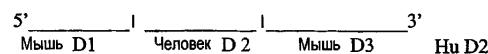
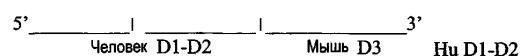
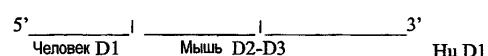
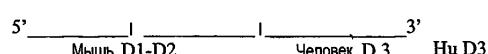
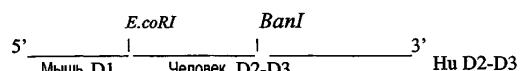
Мышь MVSLPRILCALWGCLLTAVHLGQCVTCSDKQYLHDGQCCDLCQPGSRLTSH
Человек MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSD

Мышь ALEKTQCHPCDSGEFSAQWNREIRCHQHRHCEPNQGLRVKKEGTAESD
Человек EFTETECLPCGESEFLDTWNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQQKGTSETD

*EcoRI**BanI*

Мышь TVCTCKEGQHCTSVDCEACACQHTPCIPGFGVMEMATETTDTVCHPCRHNNH
Человек TICTCEEGWHCTSEACESCVLHRSCSPGFGVKQIATGVSDTICEPCRHNNH

Фиг. 17



Фиг. 18



Евразийская патентная организация, ЕАПО

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2