



Республика Таджикистан

(19)**TJ** (11)**358**

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ
ВЕДОМСТВО

(51) **6 A61K 39/395, A61K 51/00,**
C12N 15/02, C12N 12/13,
C12P 21/08

(12) **Описание изобретения** К ПАТЕНТУ

1

2

(21) 95000049/22
(22) 12.11.1993
(31) 07/978,891, 08/149,099
(32) 13.11.92, 03.11.93
(33) US, US
(46) 31.03.2003, Бюл.№1 (29)
(86) PCT/US 93/10953, 12.11.1993
(72) Даррелл Р. Андерсон (US), Вилльям Х. Растеттер (US), Набил Ханна (US), Джон Е. Леонард (US), Роланд А. Ньюмен (US), Митчелл Е. Рефф (US)
(71)(73) АЙДЕК ФАРМАСЕУТИКАЛЗ КОРПОРЕЙШН (US)
(56) SU 1420020 A1, 30.08.1988
WO 88/04936 A1, 14.06.1988
EP 0421876 A, 14.04.1991
EP 0400464 A1, 05.12.1990
WO 90/15625 A1, 27.12.1990
US 5106738 A, 21.04.1992

(54) СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ЛИМФОМЫ В-КЛЕТОК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ХИМЕРНЫХ И МЕЧЕНЫХ РАДИОАКТИВНЫМИ ИЗОТОПАМИ АНТИТЕЛ В В-ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА С ОГРАНИЧЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЕЙ АНТИГЕНА
(57) Описываются протоколы терапевтического лечения лимфомы В-клеток. Эти протоколы основаны на терапевтических стратегиях, которые включают введение иммунологически активных химерных антител анти-CD20 мыши/человека, меченных радиоактивными изотопами антител анти-CD20, а также на комбинированных стратегиях, включающих применение химерных антител анти-CD20 и меченных радиоактивными изотопами антител анти-CD20.

Часть описания этого патентного документа содержит материал, который подлежит защите авторского права. Владелец авторского права не возражает против воспроизведения любым лицом патентного документа или патентного описания, в том виде, в котором они существуют в делах или материалах заявки в Ведомстве по патентам и товарным знакам, однако сохраняет при этом все права авторского права.

Настоящая заявка - это частично продолжающаяся заявка США под серийным номером 07/978,891 от 13 ноября 1992, которая находится на рассмотрении. Настоящий патентный документ является родственной заявке США под серийным номером 07/977,691 и под названием НЕПАРНАЯ ДОМИНАНТНАЯ СЕЛЕКТИВНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ МАРКЕРНЫХ ГЕНОВ ДЛЯ УСИЛЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ВЗАИМОСВЯЗАННОГО ГЕННОГО ПРОДУКТА И СОДЕРЖАЩИЕ ЕГО СИСТЕМЫ ВЕКТОРА ЭКСПРЕССИИ и одновременно поданной заявке США No -под названием "НЕПАРНАЯ ДОМИНАНТНАЯ СЕЛЕКТИВНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ МАРКЕРНЫХ ГЕНОВ И СТРАТЕГИИ ИНСЕРЦИИ НИТРОНОВ ДЛЯ УСИЛЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕННОГО ПРОДУКТА И СОДЕРЖАЩИЕ ЕГО СИСТЕМЫ ВЕКТОРА ЭКСПРЕССИИ". Родственные патентные документы включены здесь в качестве ссылки.

I. МЕЧЕННОЕ РАДИОАКТИВНЫМИ ИЗОТОПАМИ АНТИТЕЛО 2B8 АНТИ-CD20 A. Получение моноклонального антитела анти-CD20 (мышинного) ("2B8").

B. Подготовка конъюгата 2B8-MX-DTPA.

i. MX-DTPA

ii. Подготовка 2BS

iii. Конъюгация 2BS с MX-DTPA

iv. Определение включения MX-DTPA.

v. Иммунореактивность 2BS-MX-DTPA

vi. Подготовка меченного индием [111] 2BS-MX-DTPA ("I2B8")

vii. Подготовка меченного иттрием [90] 2BS-MX-DTPA ("Y2B8")

C. Исследования животных кроме человека.

i. Распределение меченного радиоактивными изотопами 2BS-MX-DTPA

ii. Локализация опухоли с помощью I2B8

iii. Исследования биораспределения и локализации опухоли при помощи меченного радиоактивными изотопами 2BS-MX-DTPA

D. Исследования человека.

i. 2B8 и 2B8-MX-DTPA: Иммуногистологические исследования тканей человека.

ii. Клинический анализ I2B8 (томография) и Y2B8 (терапия).

a. Клиническое испытание в фазе I/II: исследование терапии однократной дозой.

b. Клиническое испытание в фазе I/II: исследование терапии многократной дозой.

II. ПОЛУЧЕНИЕ ХИМЕРНОГО АНТИ-CD20.

A. Конструкция векторов экспрессии ДНК химерного анти-CD20 иммуноглобулина.

B. Создание химерных анти-CD20 трансфектом, полученных из CHO и SP2/0.

C. Определение иммунологической активности химерных антител анти-CD20.

i. Анализ C1q человека.

ii. Зависимый от комплемента лизис клеток.

iii. Анализ клеточной цитотоксичности фактора в зависимости от антител.

III. ИСТОЩЕНИЕ В-КЛЕТОК IN VIVO ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ХИМЕРНОГО АНТИ-CD20.

A. Исследование приматов кроме человека.

B. Клинический Анализ C2B8.

i. Клиническое испытание в фазе I/II: исследование терапии однократной дозой.

ii. Клиническое испытание в фазе I/II: исследование терапии многократной дозой.

IV. КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ: C2B8 И Y2B8

A. Приготовление Y2B8

B. Приготовление C2B8

C. Результаты

V. СТРАТЕГИИ АЛЬТЕРНАТИВНОЙ ТЕРАПИИ

VI. ИНФОРМАЦИЯ О ДЕПОЗИТАХ

G. ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

H. ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Ссылки, которые рассматриваются в настоящем документе, приведены, поскольку информация описана там до даты подачи настоящего документа, и не должна здесь рассматриваться как явное или неявное признание того, что приведенные для ссылки документы представляют собой "предшествующий уровень техники" или что изобретатели не имеют права датировать задним числом такие описания на основании предшествующих изобретений или приоритета, основанного на ранее поданных заявках.

Настоящее изобретение касается лечения лимфомы В-клеток путем применения химерных и меченных радиоактивными изотопами антител для связывания с поверхностным антигеном Bp35 ("CD20") В-клетки.

Иммунная система позвоночных (например приматов, включая человека, обезьян, и т.д.) состоит из ряда органов и типов клеток, которые эволюционировали для точного и специфического распознавания чужеродных микроорганизмов ("антигенов"), которые проникают в позвоночное животное-хозяина; специфического связывания таких чужеродных микроорганизмов; и уничтожения/разрушения таких чужеродных микроорганизмов. Лимфоциты, прежде всего, являются значимыми для иммунной системы. Лимфоциты образуются в тимусе, селезенке и костном мозге у взрослых и составляют приблизительно 30% всех лейкоцитов крови, находящихся в кровеносной системе

человека (взрослого). Существуют две основных субпопуляции лимфоцитов: Т-клетки и В-клетки. Т-клетки отвечают за промежуточный иммунитет клетки, в то время как В-клетки отвечают за продукцию антител (гуморальный иммунитет). Однако, Т-клетки и В-клетки можно рассматривать как взаимосвязанные в типичном иммунном ответе, Т-клетки активизируются, когда рецептор Т-клетки связан с фрагментами антигена, которые связаны с главным комплексом гистосовместимости ("МНС") из гликопротеинов на поверхности клетки, представляющей антиген; причем такая активация вызывает высвобождение биологических медиаторов ("интерлейкинов"), который, в сущности, стимулируют дифференциацию и продукцию В-клетками антител ("иммуноглобулинов") против антигена.

Каждая В-клетка внутри хозяина экспрессирует различное антитело на своей поверхности. Таким образом одна В-клетка экспрессирует специфическое для одного антигена антитело, в то время как другая В-клетка экспрессирует антитело, специфическое для другого антигена. Таким образом, В-клетки являются совершенно разными, и это многообразие имеет важное значение для иммунной системы. У человека каждая В-клетка может производить огромное количество молекул антител (то есть приблизительно от 107 до 108). Как правило, такая продукция антител обычно прекращается (или значительно снижается) после нейтрализации чужеродного антигена. Иногда, однако, пролиферация определенных В-клеток продолжается непрерывно; причем такая пролиферация может вызывать рак, называемый "лимфомой В-клеток".

Как Т-клетки, так и В-клетки содержат поверхностные протеины, который используют как "маркеры" для дифференциации и идентификации. Одним из таких маркеров В-клеток человека является антиген Вр35 человека с ограниченной дифференциацией В-лимфоцитов, обозначаемый как "CD20". CD20 экспрессируется во время раннего развития пре-В-клеток и сохраняется до дифференциации клеток плазмы. В частности, молекула CD20 может регулировать этап в процессе активации, который необходим для инициации и дифференциации клеточного цикла и обычно экспрессируется на сверхвысоких уровнях неопластических ("опухолевых") В-клеток. CD20, при определении, присутствует как на "здоровых" В-клетках, так и на "злокачественных" В-клетках, то есть на тех В-клетках, непрерывная пролиферация которых может привести к лимфоме В-клеток. Таким образом, у поверхностного антигена CD20 имеется возможность быть "пораженным" лимфомой В-клеток.

В сущности, такое поражение выглядит следующим образом: пациенту, к примеру, вводят антитела, специфические к поверхностному антигену CD20 В-клеток. Эти анти-CD20 антитела специфически связываются с поверхностным антигеном CD20 клетки, очевидно, как с нормальными, так и со злокачественными В-клетками. Анти-CD20 антитело, связанное с поверхностным антигеном CD20, может вызвать разрушение и истощение

неопластических В-клеток. Кроме того, химические вещества или радиоактивные метки, имеющие возможность разрушать опухоль, могут быть конъюгированы с анти-CD20 антителом так, что вещество специально "доставляется", например в неопластические В-клетки. Независимо от способа, основная цель состоит в разрушении опухоли. Специфический способ детерминирован определенным используемым анти-CD20 антителом, и, таким образом, позволяет значительно варьировать способы поражения антигена CD20.

Например, известны попытки поражения поверхностного антигена CD20. По сообщениям, мышинное моноклональное антитело 1F5 (анти-CD20 антитело) вводили пациентам с лимфомой В-клеток путем непрерывной внутривенной инфузии. Согласно сообщениям, для истощения циркулирующих опухолевых клеток требовались чрезвычайно высокие уровни (>2 граммов) 1F5, а результаты описывали как "неустойчивые". Press et al., "Monoclonal Antibody 1F5 (Anti-CD20) Serotherapy of Human B-Cell Lymphomas". Blood 69/2:584-591 (1987). Возможной проблемой при настоящем подходе является то, что моноклональные антитела кроме человеческих (например, мышинные моноклональные антитела) обычно не обладают функциональностью эффекторов человека, то есть они неспособны при этом дополнять зависимый от компонента лизис или лизировать клетки-мишени человека посредством клеточной токсичности, зависящей от антител, или дополненным Fc-рецепторами фагоцитозом. Кроме того, моноклональные антитела кроме человеческих могут быть распознаны человеком-хозяином как чужеродные белки. Следовательно, повторные инъекции таких чужеродных антител могут привести к индукции иммунного ответа, вызывая опасные реакции гиперчувствительности. Для моноклональных антител на основе мышинных часто ссылаются на наличие ответа антимышинных антител человека, или ответ "НАМА". Кроме того, эти "чужеродные" антитела могут быть подвергнуты воздействию иммунной системы хозяина так, что они в действительности нейтрализуются прежде, чем достигнут своей мишени.

Лимфоциты и клетки лимфомы наследственно чувствительны к радиотерапии по нескольким причинам: локальная эмиссия ионизирующей радиации меченных радиоактивными изотопами антител может уничтожать клетки, имеющие или не имеющие целевой антиген (например, CD20) в непосредственной близости с антителами, связанными с антигеном; проникающее излучение может устранять проблему ограниченного доступа к антителу в обширной или слабо васкуляризированной опухоли; общее количество необходимого антитела может быть снижено. Радионуклид испускает радиоактивные частицы, которые могут повреждать клеточную ДНК до стадии, при которой клеточные механизмы репарации неспособны обеспечить жизнедеятельность клетки; следовательно, если целевые клетки являются опухолевыми, то радиоактивная метка преимущественно уничтожает опу-

холевые ячейки. Использование меченных радиоактивными изотопами антител, по определению, включают применение радиоактивного вещества, которое требует соблюдения предосторожностей, как для пациента (например, при возможной трансплантации костного мозга), так и для обслуживающего персонала (то есть необходимость обеспечить высокую степень безопасности при работе с радиоактивными веществами).

Следовательно, для улучшения способности мышиных моноклональных антител осуществлять эффективное лечение нарушений В-клеток требуется конъюгировать радиоактивную метку или токсин с антителом так, чтобы метка или токсин локализовались в месте расположения опухоли. Например, вышеупомянутое антитело IF5 “помечали йодом -131 (“¹³¹I”) и оценивали по биораспределению у двух пациентов. См. Eary, J.F. et al., *Imaging and Treatment of B-Cell Lymphoma*” *J. Nuc. Med.* 31/8:1257-1268 (1990); см. также, Press, O.W. et al., “Treatment of Refractory Non-Hodgkin's Lymphoma with Radiolabeled MB-1 (Anti-CD37) Antibody” *J. Clin. Onc.* 7/8:1027-1038 (1989) (указано, что у одного пациента, которого лечили IF-5, маркируемым ¹³¹I, получен “частичный ответ”); Goldenberg, D.M. et al., “Targeting, Dosimetry and Radioimmunotherapy of B-Cell Lymphomas with Iodine-131-Labeled LL2 Monoclonal Antibody” *J. Clin. Onc.* 9/4:548-564 (1991) (у трех из восьми пациентов, получавших многократные инъекции, зафиксировано развитие ответа НАМА); Appelbaum, F.R. “Radiolabeled Monoclonal Antibodies in the Treatment of Non-Hodgkin's Lymphoma” *Hem. /Onc. Clinics of N.A.* 5/5:1013-1025, (1991) (обзорная статья); Press, O.W. et al *Radiolabeled-Antibody Therapy of B-Cells Lymphoma with Autologous Bone Marrow Support.* “*New England Journal of Medicine* 329/17: 1219-1223 (1993) (анти-CD20 антитело IF5, маркированное подом-131 и B1); и Kaminski, M. G. et al. *Radioimmunotherapy of B-cells Lymphoma with Radiolabeled [¹³¹I] Anti-B1 (Anti-CD20) Antibody*”. *NEJM* 329/7 (1993) (анти-CD20 антитело B1, маркированное подом-131; в дальнейшем “Kaminski”).

Токсины (то есть химиотерапевтические агенты, например доксорубин или митоминин C) также были сконъюгированы с антителами. См., например, публикацию международной заявки WO 92/07466 (опубл. 14 мая 1992).

“Химерные” антитела, то есть антитела, которые включают участки из двух или более различных видов (например, мыши и человека) были разработаны как альтернатива “конъюгированным” антителам. Например, Liu, A.Y. et al., “Production of a Mouse - Human Chimeric Monoclonal Antibody to CD20 with Potent Fc-Dependent Biologic Activity” *J. Immun.* 139/10:3521-3526 (1987), описывает химерное антитело мыши/человека, направленное против антигена CD20. См. также, публикацию № WO 88/04936. Однако, в ссылке нет сообщения, касающегося возможности, эффективности или практической использования таких химерных антител для

лечения нарушений В-клеток. Следует отметить, что функциональные анализы *in vitro* (например опосредованный комплементом лизис (“CDC”); опосредованная антителами клеточная цитотоксичность (“ADCC”), и т.д.) не могут предсказывать *in vivo* способность химерных антител разрушать или истощать целевые клетки, экспрессирующие специфический антиген. См., например, Robinson, R.D. et al., “Chimeric mouse-human anti-carcinoma antibodies that mediate different anti-tumor cell biological activities,” *Hum. Antibod. Hybridomas* 2:84-93 (1991) (химерное антитело мыши/человека с неопределяемой активностью, опосредованной антителами клеточной цитотоксичностью (ADCC). Следовательно, потенциальная терапевтическая эффективность химерных антител может быть верно оценена только при экспериментах *in vivo*.

Таким образом, значительным усовершенствованием в данной области техники является разработка терапевтических способов направленного введения антигена CD20 для лечения лимфом В-клеток у приматов, включая человека, но не ограничиваясь им.

Описываются терапевтические способы, разработанные для лечения нарушений В-клеток, и в частности лимфомы В-клеток. Настоящие протоколы основаны на введении иммунологически активных химерных антител анти-CD20 для истощения В-клеток периферической крови, включая В-клеток лимфомы; введение меченных радиоактивными изотопами антител анти-CD20 для направленного поражения опухолей, связанных с локализованными и периферическими В-клетками; введение химерных антител анти-CD20 и меченных радиоактивными изотопами антител анти-CD20 при комбинированной терапевтической стратегии.

Рисунок 1 - схематическое изображение вектора экспрессии tandemных химерных антител, используемого при получении иммунологически активных химерных антител анти-CD20 (“TCAE 8”);

Рисунки 2А - 2Е - последовательность нуклеиновой кислоты вектора на рисунке 1;

Рисунки 3А - 3Г - последовательность нуклеиновой кислоты вектора на рисунке 1, далее включающие вариабельные участки легких и тяжелых цепочек у мыши (“анти-CD20 в TCAE 8”);

Рисунок 4 - последовательности нуклеиновой кислоты и аминокислот (включая CDR и константные участки) вариабельного участка легкой цепочки у мыши, полученные из мышиного моноклонального антитела 2B8 анти-CD20;

Рисунок 5 - последовательности нуклеиновой кислоты и аминокислот (включая CDR и константные участки) вариабельного участка тяжелой цепочки у мыши, полученные из мышиного моноклонального антитела 2B8 анти-CD20;

Рисунок 6 результаты проточной цитометрии, подтверждающие связывание флуоресцентно маркированного C1q человека с химерным антителом анти-CD20, которое включает в качестве контроль-

ного меченный C1q; меченного C1q с мышинным моноклональным антителом 2B8 анти-CD20; и меченного C1q с человеческим IgG1, k;

Рисунок 7 представляет результаты опосредованного комплементом лизиса, сравнивающие химерное антитело анти-CD20 и мышинное моноклональное антитело 2B8 анти-CD20;

Рисунок 8 представляет результаты клеточной цитотоксичности, опосредованной антителами с эффекторными клетками человека *in vivo*, сравнивающие химерное антитело анти-CD20 и 2B8;

На рисунках 9А, 9В и 9С представлены результаты лимфопении В-клеток периферической крови приматов кроме человека после инфузии 0,4 мг/кг (А); 1,6 мг/кг (В); и 6,4 мг/кг (С) иммунологически активного химерного антитела анти-CD20;

На рисунке 10 представлены результаты лимфопении В-клеток периферической крови приматов кроме человека после инфузии 0,01 мг/кг иммунологически активного химерного антитела анти-CD20;

На рисунке 11 представлены результаты воздействия Y2B8, который уничтожает опухолевые клетки в ксенографической модели мыши, использующей лимфобластическую опухоль В-клеток;

На рисунке 12 представлены результаты воздействия C2B8, который уничтожает опухолевые клетки в ксенографической модели мыши, использующей лимфобластическую опухоль В-клеток;

На рисунке 13 представлены результаты воздействия комбинации Y2B8 и C2B8, которые уничтожают опухолевые клетки в ксенографической модели мыши, использующей лимфобластическую опухоль В-клеток.

На рисунках 14А и 14В представлены результаты клинического анализа фазы I/II, доказывающего истощение популяции В-клеток при воздействии C2B8 через определенное время у пациентов, обнаруживающих частичную ремиссию (14А) и малую ремиссию (14В).

Как правило, антитела состоят из двух легких цепочек и двух тяжелых цепочек молекул. Эти цепочки образуют полную форму "Y", причем легкая и тяжелые цепочки образуют ветви Y, а тяжелые цепочки образуют основание Y. Тяжелые цепочки разделены на домены структурной и функциональной гомологии. Варибельные домены легкой ("VL") и тяжелой ("VH") цепочек обеспечивают распознавание и специфичность. Константные участки доменов легких ("CL") и тяжелых ("CH") цепочек придают важные биологические свойства, например ассоциацию цепочек с антителами, секрецию, трансплацентарную подвижность, связывание с Fc-рецептором, связывание комплемента, и т.д. Последовательность явлений, которые приводят к генной экспрессии иммуноглобулина в клетках, вырабатывающих антитела, является сложной. Варибельные участки доменов генных последовательностей размещаются в отдельных герминальных линиях генных сегментов, обозначаемых как "VH", "D", и "JH", или "VL" и "JL". Эти генные сегменты соединены перегруппировками ДНК для

формирования целых V-участков, экспрессированных в тяжелых и легких цепочках, соответственно. Перегруппированные соединенные V-сегменты (VL-JL и VH -D-JH) кодируют целые варибельные участки или связывающие антигены домены легких и тяжелых цепочек.

Серотерапия лимфомы В клеток человека с применением моноклонального мышинного (1F5) антитела анти-CD20 описана Press et al., (69 Blood 584, 1987, *supra*); к сожалению, полученные терапевтические ответы были неустойчивыми. Кроме того, по сообщениям у 25 % тестируемых пациентов развивался ответ антимышинных антител человека (НАМА) на серотерапию. Press et al. предполагают, что эти антитела, конъюгированные к токсинам или радиоизотопам, могут принести более продолжительный клинический положительный эффект, чем неконъюгированное антитело.

Вследствие ослабляющего воздействия лимфомы В-клеток и самой насущной потребности в практическом лечении этой болезни, были разработаны различные способы, использующие специфическое антитело 2B8 в качестве общего связующего между способами. При одном способе используют способность систем млекопитающих легко и эффективно восстанавливать В-клетки периферической крови. При применении этого способа очищают или истощают В-клетки периферической крови и лимфатической ткани для устранения лимфомы В-клеток. Это осуществляют путем применения иммунологически активных, химерных антител анти-CD20. При другом способе делали попытки целенаправленного поражения клетки опухоли радиоактивными метками для их деструкции.

Используемый здесь термин "антитело анти-CD20" обозначает антитело, которое специфически распознает негликозилированный фосфопротеин массой 35000 Дальтон на поверхности клетки, обычно обозначаемый как антиген Bp35 с ограниченной дифференциацией В-лимфоцитов человека, упоминаемый как CD20. Используемый в отношении антител анти-CD20 термин "химерный" обозначает антитела, которые наиболее предпочтительно получают при использовании рекомбинантных методов дезоксирибонуклеиновой кислоты, которые содержат компоненты человека (включая иммунологически "родственные" виды, например, шимпанзе): константный участок химерного антитела, наиболее предпочтительно идентичный константному участку природного человеческого антитела. Варибельный участок химерного антитела предпочтительно получают от животных кроме человека, причем этот участок имеет желательную антигенность и специфичность к антигену CD20 на поверхности клетки. Животным кроме человека может быть любое позвоночное животное, которое используют для получения антител к антигену CD20 человека на поверхности клетки или материал, включающий антиген CD20 человека на поверхности клетки. Такие животные кроме человека включают (но не ограничены), грызунов: кролик, крыса, мышь; и приматов кроме человека: низшие

узконосые обезьяны, человекообразные обезьяны. Компонент кроме человека (вариабельный участок) получают наиболее предпочтительно от мыши. Используемая здесь фраза иммунологически активный в отношении химерных антител анти-CD20 означает химерное антитело, которое связывает C1q человека и является промежуточным звеном опосредованного комплементом лизиса ("CDC") линий лимфоидных В-клеток человека, и лизиса целевых клеток человека благодаря опосредованной антителами клеточной цитотоксичности ("ADCC").

Используемые здесь обе фразы "непрямое мочение" и принцип непрямого мечения" означают, что хелатный агент ковалентно связан с антителом и по крайней мере один радионуклид встроен в хелатный агент. Предпочтительные хелатные агенты и радионуклиды описаны Srivagtava, S.C. and Mease, R.C., "Progress in Research on Ligands, Nuclides and Techniques for Labeling Monoclonal Antibodies", Nucl. Med. Bio. 18/6: 589-603 (1991) ("Srivagtava"), на который здесь производится ссылка. Наиболее предпочтительным хелатным агентом является 1-изоцисматобензил-3-метилдиотиле триаминпент уксусной кислоты ("MX-DTPA"); предпочтительные радионуклиды для непрямого мочения включают индий [111] и иттрий [90]. Используемые здесь обе фразы "прямое мочение" и принцип прямого мочения" означают, что радионуклид ковалентно присоединен непосредственно к антителу (обычно через аминокислотный остаток). Предпочтительные радионуклиды описаны у Srivagtava; а наиболее предпочтительным радионуклидом для прямого мочения является йод; [131], ковалентно присоединенный через остатки тирозина. Наиболее предпочтительным является принцип непрямого мочения.

Терапевтические способы, изложенные здесь, основаны на способности иммунной системы приматов быстро восстанавливать или омолаживать В-клетки периферической крови. Кроме того, поскольку основной иммунный ответ у приматов осуществляется Т-клетками, то если иммунная система имеет недостаток В-клеток периферической крови, исключается потребность в "экстраординарных" предосторожностях (то есть в изоляции пациента, и т.д.). В результате этих и других особенностей иммунной системы приматов, предлагаемый принцип терапии нарушения В-клеток предусматривает очистку В-клеток периферической крови с помощью иммунологически активных химерных антител анти-CD20.

Поскольку нарушения В-клеток периферической крови, по определению, могут указывать на необходимость осуществления лечения крови, способ введения иммунологически активных химерных антител анти-CD20 и меченных радиоактивными изотопами антител анти-CD20 является предпочтительно парентеральным. Используемый здесь термин "парентеральный" включает внутривенное, внутримышечное, подкожное, ректальное, вагинальное или внутрибрюшинное введение. Сре-

ди них наиболее предпочтительно внутривенное введение.

Иммунологически активные химерные антитела анти-CD20 и меченные радиоактивными изотопами антитела анти-CD20, как правило, получают обычными способами с помощью фармацевтически приемлемого буфера, например, стерильного физиологического раствора, стерильной буферной воды, пропиленгликоля, либо их комбинации, и т.д. Способы приготовления агентов для парентерального введения изложены в Pharmaceutical Carriers & Formulations, Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Ed, (Mack Pub. Co., Easton, PA 1975), на который здесь производится ссылка.

Специфическое, терапевтически эффективное количество иммунологически активных химерных антител анти-CD20, необходимых для оказания уникального терапевтического воздействия на любого данного пациента, может быть определено стандартными методами, хорошо известными обычным специалистам в области техники.

Эффективные дозировки (то есть терапевтически эффективные количества) иммунологически активных химерных антител анти-CD20 располагаются в диапазоне приблизительно от 0,001 до 30 мг/кг веса тела, предпочтительно приблизительно от 0,01 до 25 мг/кг веса тела, и наиболее предпочтительно приблизительно от 0,4 до 20,0 мг/кг веса. Возможны также другие дозировки. Факторы, влияющие на дозировку, включают, но не ограничены, серьезностью заболевания; способами предыдущего лечения; общим состоянием здоровья пациента; наличием других заболеваний, и т.д. Опытный специалист может легко произвести оценку состояния пациента и определить необходимую дозу, которая располагается в указанных диапазонах, либо в случае необходимости - вне этих диапазонов.

Введение иммунологически активных химерных антител анти-CD20 в этих диапазонах дозы может быть осуществлено в виде однократного введения или ряда последовательных введений. Что касается химерных антител, предпочтительно, чтобы такое введение проводилось путем ряда последовательных введений. Настоящий предпочтительный способ выработан на основании методологического лечения настоящего заболевания. Не вдаваясь глубоко в теорию, следует заметить, что поскольку иммунологически активные химерные антитела анти-CD20 являются также иммунологически активными и связанными с CD20, то уже при начальном введении индивиду иммунологически активных химерных антител анти-CD20, начинается истощение В-клеток периферической крови; причем наблюдается почти полное истощение в течение приблизительно 24 часов после инфузии. Вследствие этого, показанием для последующего введений(я) пациенту иммунологически активных химерных антител анти-CD20 (или меченных радиоактивными изотопами антител анти-CD20) является: а) чистые остающиеся В-клетки остальной периферической крови; б) начало истощения В-

клетки лимфатических узлов; в) начало истощения В-клеток из других тканевых источников, например, костного мозга, опухоли, и т.д. При повторных введениях иммунологически активных химерных антител анти-CD20, происходит ряд явлений, каждое из которых рассматривалось как важное для эффективного лечения заболевания. Первое “явление” можно считать преимущественно направленным на истощение в основном В-клеток периферической крови пациента; последующие “явления” можно рассматривать либо как преимущественно направленные на одновременное или последовательное очищение остающихся В-клеток из системы лимфатических узлов, очищающей В-клетки, или очищение В-клеток другой ткани.

В действительности, в то время как одиночная дозировка обеспечивает положительный эффект и может действительно использоваться для лечения и управления ходом заболевания, предпочтительно проводить курс лечения в несколько этапов. Рекомендуется вводить пациенту раз в неделю в течение от 2 до 10 недель, предпочтительно в течение 4 недель, приблизительно от 0,4 до 20 мг/кг веса иммунологически активных химерных антител анти-CD20.

Что касается применения меченных радиоактивными изотопами антител анти-CD20, то предпочтительно, чтобы антитело не было химерным. Это предпочтение основано на значительно более длительном циркуляционном периоде полураспада химерных антител по отношению к мышинным антителам (то есть радионуклид с более длинным циркуляционным периодом полураспада присутствует в организме пациента более длительное время). Однако, меченные радиоактивными изотопами химерные антитела могут давать положительный эффект при более низких дозировках в миллиКюри (“мКи”), при применении вместе с химерным антителом, родственным мышинному антителу. Это позволяет снизить токсичность в костном мозге до приемлемого уровня при сохранении терапевтического эффекта.

Согласно настоящему изобретению можно применять множество разных радионуклидов, и специалисты в области техники смогут легко определить, какой радионуклид является соответствующим при определенных обстоятельствах. Например, йод - [131] - хорошо известный радионуклид, используемый для направленной иммунотерапии. Однако, клиническое воздействие йода [131] может быть ограничено несколькими факторами, включая: восьмидневный физический период полураспада; дегалогенизацию иодируемого антитела как в крови, так и в местах расположения опухоли; и характеристики эмиссии (например, большое гамма-излучения), которые могут являться сверхоптимальными для локализованного введения дозы в опухоль. С появлением превосходных хелатных агентов возможность присоединения металлических хелатных групп к протеинам позволила использовать другие радионуклиды, например, индий [131] и иттрий [90]. Иттрий [90] имеет несколько

преимуществ при применении в радиоиммунотерапии: 64-часовой период полураспада иттрия [90] является достаточно продолжительным для накопления антител в опухоли и, например, в отличие от иода [131], иттрий [90] является чистым эмиттером высокоэнергетического бета-излучения без сопутствующего гамма-излучения при его затухании, с диапазоном в ткани от 100 до 1000 диаметров клеток. Кроме того, минимальное количество проникающего излучения позволяет вводить антитела, помеченные иттрием [90], амбулаторному больному. Кроме того, не требуется интерализация меченого антитела для уничтожения клетки, а локальная эмиссия ионизирующей радиации должна быть летальной для прилегающих клеток опухоли, в которых недостает целевого антигена.

Единственное нетерапевтическое ограничение для иттрия [90] основано на отсутствии значительного гамма-излучения, затрудняющего получение изображения. Эту проблему решают, используя такой диагностический “визуализирующий” радионуклид как индий [111] для определения местонахождения и относительного размера опухоли перед введением терапевтических дозровок анти-CD20, маркированных иттрием [90]. Индий [111] является особенно предпочтительным в качестве диагностического радионуклида, так как приблизительно от 1 до 10 мКи индия [111] можно вводить безопасно без наблюдаемой токсичности; и томографические данные обычно прогнозируют с помощью последующего распределения антитела, помеченного иттрием [90]. В основном при томографических исследованиях используют антитело, помеченное индием [111] в дозировке 5мКи, поскольку эта дозировка является безопасной и увеличивает эффективность томографии по сравнению с более низкими дозировками, причем оптимальное изображение получают на третий-шестой день после введения антител. См., например, J.L. Murray., 26 J. Nuc. Med. 3328 (1985) и Carragullo, J.A. et al, 26 J. Nuc. Med. 67 (1985).

Эффективные однократные лечебные дозировки (то есть терапевтически эффективные количества) антител анти-CD20, маркированных иттрием [90] располагаются в диапазоне приблизительно от 5 до 75 мКи, более предпочтительно от 10 до 40 мКи. Эффективные однократные лечебные для не костного мозга абляционные дозировки антител анти-CD20, маркированных йодом [131], располагаются в диапазоне приблизительно от 5 до 70 мКи, наиболее предпочтительно приблизительно от 5 до 40 мКи. Эффективные однократные лечебные абляционные дозировки антител анти-CD20, маркированных йодом [131] (которые могут потребовать аутогенной трансплантации костного мозга) располагаются в диапазоне приблизительно от 30 до 600 мКи, более предпочтительно от 50 до менее 500 мКи. В соединении с химерным антителом анти-CD20 благодаря более длительному циркуляционному периоду полураспада по сравнению с мышинными антителами, эффективные однократные лечебные для не костного мозга абляционные дози-

ровки химерных антител анти-CD20, маркированных йодом [131], располагаются в диапазоне приблизительно от 5 до 40 мКи, наиболее предпочтительно менее 30 мКи. Необходимая дозировка, например метки индия [111] для получения изображения составляет обычно менее 5 мКи.

Что касается меченных радиоактивными изотопами антител анти-CD20, то терапию можно осуществлять также путем однократного терапевтического лечения, либо многократного лечения. Из-за использования радионуклидного компонента предпочтительно перед проведением лечения сделать сбор периферических стволовых клеток ("PSC") или костного мозга ("BM") у пациентов, проявляющих потенциально смертельную токсичность костного мозга при действии ионизирующего излучения. Сбор BM и/или PSC производили, используя стандартные методы, затем очищали и замораживали для возможных повторных инфузий. Кроме того, предпочтительно, чтобы перед проведением лечения было проведено диагностическое дозиметрическое исследование пациента с использованием диагностики меченных антител (например, при использовании индия [111]), цель которого состоит в том, чтобы удостовериться, что терапевтически меченное антитело (например, при использовании иттрия [90]) не будет без надобности "концентрироваться" в любом здоровом органе или ткани.

Известны химерные антитела мыши/человека. См., например, Morrison, S.L. et al., PNAS 11:6851-6854 (November 1984); Европейский патент № 172494; Baulianne, G.L. et al., Nature 312:642 (December 1984); Neubeiger, M. S. et al., Nature 314:268 (March 1985); Европейский патент № 125023; Tan et al., J. Immunol. 135:8564 (November 1985); Sun, L. K. et al., 5/1:517 Hybridoma (1986); Sahagan et al., J. Immunol. 137:10661074 (1986). См. также, Muron, Nature 312:597 (December 1984); Dickson, Genetic Engineering News 5/3 (March 1985); Marx, Science 229 455 (August 1985); and Morrison Science 229:1202-1207 (September 1985). Robinson et al., в международной заявке WO 88/04936 описывают химерное антитело, имеющее константный участок человека и переменный участок мыши, которое обладает специфичностью к эпитопу CD20; участок мыши химерного антитела согласно Robinson получают из моноклонального антитела 2H7 мыши (гамма 2b, каппа). Хотя в этих ссылках указано, что описанное химерное антитело является "первым кандидатом" при лечении нарушений В-клеток, это утверждение можно рассматривать не более, чем предложение специалистам в данной области техники установить, является ли предложение корректным для данного специфического антитела, в частности, поскольку в ссылках не приводятся данных, подтверждающих терапевтическую эффективность, а также важных данных по испытаниям на высших млекопитающих, например приматах или человеке.

Методологии получения химерных антител известны специалистам в данной области техники.

Например, легкие и тяжелые цепочки могут быть экспрессированы по отдельности, в виде, например, легкой цепочки иммуноглобулина и тяжелых цепочек иммуноглобулина в отдельных плаزمидных. Затем их очищают и собирают *in vitro* в полные антитела. Известны методологии получения таких структур. См., например, Scharff, M., Harvey Lectures 69:125 (1974). Также известны параметры реакции *in vitro* для получения антител IgG из укороченных изолированных легких и тяжелых цепочек. См., например, Beychok, S., Cells of Immunoglobulin Synthesis, Academic Press, New York, p. 69, 1979. Возможна также коэкспрессия легких и тяжелых цепочек в одних и тех же клетках для достижения внутриклеточной ассоциации и связи тяжелых и легких цепочек в полные антитела H2L2 IgG. Такую коэкспрессию можно выполнить, используя те же самые или различные плазмиды в одной и той же клетке хозяина.

Другой способ, наиболее предпочтительный для разработки химерного антитела анти-CD20 кроме человека/человека, основан на использовании вектора экспрессии, включающий *ab initio* ДНК, кодирующую константные участки тяжелых и легких цепочек из источника человека. Такой вектор позволяет вставить ДНК, кодирующую переменный участок кроме человека таким образом, что можно получать ряд антител анти-CD20 кроме человека. Затем проводят скрининг и анализ для различных характеристик (например, специфика связывания, участки связывания эпитопа, и т.д.). После этого в настоящий вектор можно включать кДНК, кодирующую переменные участки легких и тяжелых цепочек предпочтительного или желательного антитела анти-CD20. Предпочтительными являются такие типы векторов как Тандемные Химерные Векторы Экспрессии Антител ("ТСАЕ"). Наиболее предпочтительным вектором ТСАЕ, который использовали для получения иммунологически активных химерных антител анти-CD20 для терапевтического лечения лимфам, является вектор ТСАЕ 8. ТСАЕ 8 является производным вектора, принадлежащего владельцу этого патентного документа, упоминаемого под маркировкой ТСАЕ 5.2. Разница однако заключается в том, что в ТСАЕ 5.2 сайтом начала трансляции доминантного селективного маркера (фосфотрансфераза неомицина, "NEO") является последовательность согласно Kozak, в то время как в ТСАЕ 8, эта область представляет собой частично ослабленную последовательность согласно Kozak. Подробности, касающиеся влияния сайта начала инициации доминантного селективного маркера векторов ТСАЕ (также упоминаемых как "вектор ANEX") по сравнению с экспрессией белка, подробно раскрыты в параллельно рассматриваемой поданной заявке.

ТСАЕ 8 включает: четыре (4) блока транскрипции, расположенные в тандемном порядке, легкую цепочку иммуноглобулина человека без переменного участка; тяжелую цепочку иммуноглобулина человека без переменного участка; DHFR; и NEO. Каждый блок транскрипции содержит

жит собственный эукариотический промотор, и область полиаденирования (см. рисунок 1 - схематическое изображение вектора TCAE 8). В частности:

1) Промотор/энхансер CMV перед тяжелой цепочкой иммуноглобулина является укороченным вариантом промотор/энхансер перед легкой цепочкой, от сайта *Nhe* I около -350 до сайта *Sst* I около -16 (см., 41 Cell 521, 1985).

2) Константный участок легкой цепочки иммуноглобулина человека получали путем амплификации участка PCR в кДНК. В TCAE 8 использовали константные участки капша легких цепочек иммуноглобулина человека (нумерация согласно Kabat, аминокислоты 108-214, аллотип Km 3, (см., Kabat, E.A. "Sequences of proteins of immunological interest," NIH Publication, Fifth Ed. № 91-3242, 1991)), и константный участок гамма 1 тяжелых цепочек иммуноглобулина человека (Kabat, нумерация аминокислот 114-478, аллотип Gmla, Gmlz). Легкую цепочку изолировали от крови здорового человека (IDEC Pharmaceuticals Corporation, La Jolla, CA); РНК оттуда использовали для синтеза кДНК, которую затем амплифицировали, используя методы PCR (праймеры получали в точности согласно Kabat). Тяжелую цепочку изолировали (используя методы PCR) из кДНК, полученной от РНК, которую, в свою очередь, получали из клеток, в которые был трансфектирован вектор человека IgG1 (см., 3 Prot. Eng. 531, 1990; вектор pN(162)). Две аминокислоты заменяли в изолированном IgG1 человека для соответствия последовательности аминокислот согласно Kabat, а именно: в положении 225 аминокислоту валин заменяли на аланин (GTT на GCA), а в положении 287 аминокислоту метионин заменяли на лизин (ATG на AAG);

3) Блоки легких и тяжелых цепочек иммуноглобулина человека содержат искусственные сигнальные последовательности для секреции цепочек иммуноглобулина;

4) Блоки легких и тяжелых цепочек иммуноглобулина человека содержат специфические рестрикционные сайты ДНК, которые позволяют вводить переменные участки легких и тяжелых цепочек иммуноглобулина, которые обеспечивают переход рамки считывания без изменения аминокислот, обычно присутствующих в цепочках иммуноглобулина;

5) Блок DHFR содержит собственный эукариотический промотор (главный промотор на основе глобина мыши, "BETA") и область полиаденирования (полиаденирование бычьего гормона роста, "BGH"); и

6) Блок NEO содержит собственный эукариотический промотор (BETA) и участок полиаденирования (раннее полиаденирование SV40, "SV").

В отношении вектора TCAE 8 и блока NEO участок Kozak был частично ослаблен последовательностью согласно Kozak (который включал левый сайт *Cla* I):

Cla I
-3
+1
 GGGAGCTTGG ATCGAT ccTct ATG Gtt

(В векторе TCAE 5.2 замена между участками *Cla* I и ATG, а именно: ccAcc.)

Перечень полной последовательности TCAE 8 (включая специфические компоненты четырех блоков транскрипции) представлен на рисунке 2 (SEQ. ID. NO. 1).

Специалисты в данной области техники оценят тот факт, что векторы TCAE дают возможность значительно сократить время получения иммунологически активных химерных антител анти-CD20. Получение и изоляция константных участков легких и тяжелых цепочек кроме человека, последующее их включение в константные участки блоков транскрипции легких цепочек у человека и в константные участки блоков транскрипции легких цепочек у человека позволяет производить иммунологически активные химерные антитела анти-CD20.

Наиболее предпочтительный переменный участок кроме человека со специфичностью к антигену CD20 получен из мыши по технологии создания гибридом. С помощью методов полимеразной цепной реакции ("PCR") непосредственно в векторе TCAE 8 клонировали переменные участки легких и тяжелых цепочек мыши, что является наиболее предпочтительным путем включения в вектор TCAE переменных участков кроме человека. Такое предпочтение главным образом основывается на эффективности реакции PCR и точности включения. Однако существуют другие эквивалентные способы выполнения этой задачи. Например, используя TCAE 8 (или эквивалентный вектор) можно получить последовательность переменных участков антитела анти-CD20 кроме человека с последующим синтезом сегментов последовательности или, при необходимости, всей последовательности; после этого полную искусственную последовательность включают в соответствующее местоположение внутри вектора. Специалисты в данной области техники могут выполнить эту задачу.

Согласно изобретению наиболее предпочтительные иммунологически активные химерные антитела анти-CD20 были получены путем использования вектора TCAE 8, включающего переменные участки мыши, полученные от моноклонального антитела к CD20. Это антитело (описываемое подробно ниже), обозначено как "2B8". Полная последовательность переменных участков, полученных от 2B8 в векторе TCAE 8 ("анти-CD20 в TCAE 8") приведена на рисунке 3 (SEQ. ID. NO. 2).

Клеточная линия хозяина, используемая для экспрессии белка, предпочтительно имеет происхождение от млекопитающих. Специалисты в данной области техники способны определить предпочтительные специфические клеточные линии хозяина, которые лучше всего соответствуют желательному генному продукту, который необходимо в них экспрессировать. Стандартные клеточные линии хозяина включают, но не ограничены, DG44 и DUXBII (линию яичника китайского хомяка (CHO), DHFR минус), HELA (цервикальную карциному

человека), CVI (линию почек мартышки), COS (производную CVI с Т-антигеном SV40), R1610 (фибробласты китайского хомяка) BALBC/3T3 (фибробласты мыши), НАК (линию почек хомяка), SP2/0 (миелому мыши), P3x63Ag3.653 (миелому мыши), BFA-IcIBPT (клетки бычьего эндотелия), RAJI (лимфоциты человека) и 293 (почки человека). Клеточные линии хозяина обычно получают из коммерческих источников, из Американской Коллекции Культур Ткани или выбирают из изданной литературы.

Предпочтительной клеточной линией хозяина является DG44 (CHO) или SP2/O. См. Urland, G. et al., Effect of gamma rays and dihydrofolate reductase locus: deletions and inversions. "Som. Cell & Mol. Gen. 12/6:555-566 (1986), и Shulman, M. et al., "A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies." Nature 276:269 (1978), соответственно. Предпочтительной клеточной линией хозяина является DG44. Транфекцию плазмиды в клетку хозяина можно осуществить любым методом, известным в данной области техники. Они включают, но не ограничены, трансфекцию (включая электрофорез и электропорацию), слияние клетки с упакованной ДНК, микроинъекцию и инфекцию интактным вирусом. См., Ridgway, A.A.G. "Mammalian Expression Vectors." Chapter 24.2, pp. 470-472 Vectors, Rodriguez и Denhardt, Eds. (Butterworths, Boston, MA 1988). Наиболее предпочтительно введение плазмиды в хозяина производят путем электропорации.

Г. ПРИМЕРЫ

Следующие примеры не следует рассматривать как ограничивающие изобретение. Примеры иллюстрируют: визуализацию дозы с помощью меченных радиоактивными изотопами антител анти-CD20 ("12B8"); меченное радиоактивными изотопами антитело анти-CD20 ("Y2B8"); и иммунологически активное химерное антитело анти-CD20 ("C2B8"), полученное с использованием специфического вектора ("TCAE 8") и варибельных участков, полученных из мышинового моноклонального антитела анти-CD20 ("2B8").

1. Меченное радиоактивными изотопами антитело 2B8 анти-CD20

А. Получение моноклонального антитела анти-CD20 (мышинового) ("2B8")

Мышей BALB/C неоднократно иммунизировали клеточной линией SB лимфобластов человека (см., Adams, R.A. et. al., "Direct implantation and serial transplantation of human acute lymphoblastic leukemia in hamsters, SB-2." Can Res 28:1121-1125 (1968); эта клеточная линия находится в Американской Коллекции Культур Тканей (ATCC), Rockville, MD., под порядковым номером ATCC CCL 120), путем еженедельных инъекций в течение 3-4 месяцев. Идентифицировали мышей, обнаруживающих высокие титры антител анти-CD20 в сыворотке, что определяли путем ингибирования известных антител специфических для CD20 (использовали анти-

тела анти-CD20-Leu 16, Beckton Dickinson, San Jose, CA, Cat. № 7670; and BI, Coulter Corp., Hialeah, FL, Cat. № 6602201), у таких мышей удаляли селезенки.

Клетки селезенки сливали с клетками миеломы SP2/0 мыши согласно протоколу, описанному у Einfeld, D.A. et. al., EMBO (1988) 7:711 (SP2/0 имеет в ATCC номер ATCC CRL 8006).

Специфичность CD20 анализировали с помощью радиоиммуноанализа. Затем очищенное анти-CD20 BI помечали радиоактивным изотопом I^{125} способом, описанным Valentine, M. A. et. al., (1989) J. Biol. Chem. 264:11282. (I^{125} Sodium Iodine, ICN, Irvine, CA, Cat. №. 28665H). Проводили скрининг гибридом при совместной инкубации 0,05 мл среды в каждой лунке для сливания вместе с 0,05 мл анти-CD20 BI (10 нг), маркированного I^{125} в 1%-ном бычьем сывороточном альбумине (BSA), физиологическом растворе с фосфатным буфером (PBS, pH 7,4), и 0,5 мл того же самого буфера, содержащего 100000 клеток SB. После инкубации в течение 1 часа при комнатной температуре клетки высевали путем переноса в титрационный планшет с 96 лунками (V&P Scientific, San Diego, CA), тщательно промывали. Двойные лунки, содержащие немеченный анти-CD20 BI и лунки, не содержащие ингибирующего антитела, использовали соответственно как положительный и отрицательный контроль. Лунки, содержащие антитела с более чем 50 %-ным ингибированием увеличивали и клонировали. Антитело, проявляющее самое высокое ингибирование, получили от клонируемой клеточной линии, обозначенной здесь как "2B8".

В. Приготовление конъюгата 2B8-MX-DTPA, i. MX-DTPA

1-изотиоцианатобензил-3-

метилдиэтилентриаминпентауксусную кислоту, меченную углеродом-14, ("MX-DTPA, меченный углеродом-14") использовали как хелатный агент для конъюгации меченного радиоактивного изотопа с 2B8. Манипулирования с MX-DTPA проводили таким образом, чтобы поддерживать условия отсутствия металлов, то есть использовали не содержащие металлов реагенты и, по возможности, также применяли пластмассовые полипропиленовые контейнеры (фляги, мензурки, градуированные цилиндры, наконечники пипеток), которые мыли с Alconox и прополаскивали водой Milli-Q. MX-DTPA получали в виде сухого твердого вещества у Dr. Otto Gansow (National Institute of Health, Bethesda, MD) и сохраняли в сухом виде при 4°C (в защищенном от света месте), с основными растворами, приготовленными в воде Milli-Q при концентрации 2-5мМ, которые хранили при -70° C. MX-DTPA был также получали от Immunology Coulter (Hialeah, Флорида) как двунатриевую соль в воде и хранили при -70° C.

ii. Приготовление 2B8

Очищенный 2B8 подготавливали для конъюгации с MX-DTPA, помещая антитело в не содержащий металлов раствор 50мМ бисина-NaOff,

pH 8,6, содержащий 150 mM NaCl, с использованием повторного буферного обмена с помощью вращающихся фильтров CENTRICON 30TM (30,000D, MWCO; Amicon). Как правило, в фильтр добавляли 50-200 мкл белка (10 мг/мл), с последующим добавлением 2 мл буфера бицина. Фильтр центрифугировали при 4°C в роторе Sorval SS-34 (6,000 оборотов в минуту, 45 мин). Поддерживаемый объем составлял приблизительно 50-100 мкл; причем этот процесс повторяли дважды, используя тот же самый фильтр. Поддерживаемый объем помещали в полипропиленовую трубку объемом 1,5 мл с завинчивающимся колпачком, испытывали на белок, разбавляли до 10,0 мг/мл и хранили при 4°C до использования. Аналогично белок помещали в 50 mM цитрата натрия, pH 5.5, содержащий 150 mM NaCl и 0,05 % азида натрия, используя предшествующий протокол.

iii. Конъюгация 2B8 с MX-DTPA

Конъюгацию 2B8 с MX-DTPA выполняли в полипропиленовых трубках при температуре окружающей среды. Замороженные основные растворы MX-DTPA оттаивали немедленно перед применением. 50-200 мл белка при 10 мг/мл вступали в реакцию с MX-DTPA при молярном соотношении MX-DTPA к 2B8, равном 4:1. Реакции инициировали, добавляя запасной раствор MX-DTPA при осторожном перемешивании; конъюгацию проводили накануне вечером (с 14 до 20 часов) при температуре окружающей среды. Нереагировавший MX-DTPA удаляли из конъюгата диализом или повторной ультрафильтрацией, как описано выше в примере I.B.ii, в не содержащем металлов стандартном солевом растворе, (0,9 % вес/объем) содержащем 0,05 % азида натрия. Концентрацию белка доводили до 10 мг/мл и сохраняли при 4°C в полипропиленовой трубке до мочения радиоактивными изотопами.

iv. Определение включения MX-DTPA

Включение MX-DTPA определяли путем подсчета сцинтилляции и сравнения значения, полученного с очищенным конъюгатом, с удельной активностью MX-DTPA, меченного углеродом-[14]. Для некоторых исследований, в которых использовали нерадиоактивный MX-DTPA (Coulter Immunology), включение MX-DTPA определяли, инкубируя конъюгат с избытком раствора радиоактивного носителя иттрия - [90] известной концентрации и удельной активности.

Основной раствор хлорида иттрия известной концентрации готовили в не содержащем металлов растворе 0,05 N HCl, к которому добавляли не содержащий носителя иттрий - [90] (хлорид). Аликвотные пробы этого раствора анализировали путем подсчета сцинтилляции в жидкости для определения точной удельной активности для этого реагента. Объем реагента хлорида иттрия, равный 3-кратному числу молей хелата, которые желательны присоединить к антителу, (как правило, 2 моль/моль антитела), добавляли в полипропиленовую

трубку и pH доводили до 4,0-4,5 при добавлении 2 M натриевого ацетата. Затем добавляли конъюгированное антитело, и смесь инкубировали в течение 15-30 минут при температуре окружающей среды. Реакцию гасили, добавляя 20 mM этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA) к окончательной концентрации 1 mM и pH раствора доводили приблизительно до 6 при добавлении 2M натриевого ацетата.

После 5 минут инкубации весь объем очищали при помощи высокоразрешающей эксклюзионной хроматографии (описанной ниже). Объединяли элюированные фракции, содержащие белок, определяли концентрацию белка, и анализировали аликвотные пробы на радиоактивность. Включение хелата вычисляли с помощью удельной активности препарата хлорида иттрия-[90] и концентрации белка.

v. Иммунореактивность 2B8-MX-DTPA

Оценивали иммунореактивность конъюгированного 2B8, используя для всех клеток твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA). Клетки SB в средней лог-фазе фазы высевали из культуры центрифугированием и промывали два раза с IX HBSS (сбалансированный солевой раствор Хенкса). Клетки разводили до 1-2 X 10⁶ клеток/мл в HBSS и помещали аликвотные пробы в полистирольные микропланшеты с 96 лунками при 50000-100000 клеток на лунку. Микропланшеты высушивали под вакуумом в течение 2 часов при 40- 45°C для фиксации клеток на пластмассе. Микропланшеты хранили в сухом виде при -20°C до их применения. Для анализа микропланшеты нагревали до температуры окружающей среды непосредственно перед использованием, блокировали IX PBS (физиологическим раствором с фосфатным буфером), pH 7,2-7,4, содержащим 1 % BSA (бычьего сывороточного альбумина (2 часа). Образцы для анализов разбавляли в IX PBS 1% BSA, наносили на микропланшеты и последовательно разбавляли (1:2) в том же самом буфере. После инкубации микропланшетов в течение 1 часа при температуре окружающей среды микропланшеты промывали три раза IX PBS. Вторичное антитело (козлий антимышинный специфический к IgG1 HRP конъюгат объемом 50 мкл) добавляли в лунки (разбавление 1:1500 в IX PBS/1% BSA) и инкубировали в течение 1 часа при температуре окружающей среды. Микропланшеты промывали четыре раза в IX PBS при добавлении раствора субстрата ABTS (раствор 50 mM натриевого цитрата, pH 4,5, содержащий 0,01% ATBS и H₂O₂ 0,001%). Микропланшеты читали при 405 им после 15-30 минут инкубации. Антиген-отрицательные клетки HSB включали в анализ для мониторинга нецелевого связывания. Иммунореактивность конъюгата вычисляли с помощью графика значений оптической плотности по отношению к соответствующему фактору разбавления и сравнивали их с полученными значениями, используя природное антитело (представляющее 100 %-ную иммунореактивность), тестируемое на том же

микропланшете; далее несколько значений части линейного титрационного профиля сравнивали и определяли среднее значение (данные не представлены).

vi. Подготовка 2B8-MX-DTPA, меченного индием [111] ("I2B8")

Конъюгаты помечали радиоактивными изотопами индия - [111], свободными от носителя. Аликвотную пробу изотопа (0,1-2 мКи/мг антителя) в 0,05 М HCl перемещали в полипропиленовую трубку и добавляли приблизительно одну десятую часть объема 2 М HCl, не содержащего металлов. После инкубации в течение 5 минут добавляли раствор 2 М натриевого ацетата, не содержащего металлов для доведения pH раствора до величины 4,0-4,4. Приблизительно 0,5 мг 2B8-MX-DTPA добавляли из основного раствора 10,0 мг/мл DTPA в нормальном физиологическом растворе соли, или в 50 мМ натриевого цитрата в 150 мМ NaCl, содержащего 0,05 % азида натрия, и сразу же осторожно перемешивали раствор. Раствор проверяли с помощью лакмусовой бумаги, получали значение 4,0-4,5 и смесь инкубировали при температуре окружающей среды в течение 15-30 минут. Затем реакцию гасили путем добавления 20 мМ EDTA к окончательной концентрации 1 мМ, а pH реакционной смеси доводили приблизительно до 6,0, используя 2 М ацетат натрия.

После 5-10 минут инкубации некомплексообразующий радиоизотоп удаляли при помощи эксклюзионной хроматографии. Блок HPLS (жидкостной хроматографии высокого давления) включал Waters Model 6000 или систему поставки растворителя TosoHaas Model TSK-6110, укомплектованную соответственно инъекционным клапаном Waters U6K или Rheodyne 700. Хроматографические сепарирования выполняли, используя гель-проникающую колонну (BioRad SEC-250; 7,5 x 300 мм или сравнительную колонну TosoHaas) и ограничивающую колонну SEC-250 (7,5 x 100 мм). Система была оборудована коллектором фракций (Pharmacia Frac200) и монитором UV с фильтром диаметром 280 нм (Pharmacia model UV-1). Образцы наносили и равномерно элюировали с помощью 1X PBS, pH 7,4, при скорости потока 1,0 мл/мин. Половину миллилитровых фракций собирали в стеклянные трубки и их аликвотные пробы подсчитывали в гамма-счетчике. Нижние и верхние окна устанавливали от 100 до 500 КэВ соответственно.

Включение радиоизотопов вычисляли, суммируя радиоактивность, связанную с пиковыми значениями белка при элюации и делили это число на общую радиоактивность, элюированную из колонны; затем это значение представляли в процентном соотношении. В некоторых случаях включение радиоизотопов определяли с помощью моментальной тонкослойной хроматографии ("ITLC"). Меченный радиоактивными изотопами конъюгат добавляли в соотношении 1:10 или 1:20 в растворе, содержащем 1X PBS или в растворе 1X PBS/ 1 мМ

DTPA, затем 1 мкл наносили на расстояние 1, 5 см от одного конца полоски бумаги SG ITLC размером 1 x 5 см. Бумагу обрабатывали с помощью восходящей хроматографии, используя раствор 10 % ацетата аммония в метаноле и воды в объемном соотношении 1:1. Полоску высушивали, разрезали поперек на две половины, и радиоактивность каждой части определяли подсчетом гамма-излучения. Радиоактивность нижней части полоски (радиоактивность, связанную с белком) представляли в виде процента от суммарной радиоактивности, определенной путем сложения значений для верхней и нижней половин (данные не приведены).

Определяли удельные активности путем измерения радиоактивности соответствующих аликвотных проб конъюгата, меченного радиоактивными изотопами. Это значение корректировали для эффективности счетчика (обычно 75%) и соотносили с концентрацией белка в конъюгате, предварительно определив оптическую плотность при 280 нм. В результате получили значение, выраженное в мКи/мг протеина.

В некоторых экспериментах 2B8-MX-DTPA помечали индием [111] согласно протоколу, описанному выше, за исключением очистки жидкостной хроматографией высокого давления. Этот протокол обозначают как "mix-and- shoot".

vii. Приготовление 2B8-MX-DTPA, меченного иттрием ("Y2B8")

Для приготовления конъюгата 2B8-MX-DTPA, меченного иттрием ("Y2B8"), следовали тому же самому протоколу, описанному для приготовления I2B8, меченного иттрием, за исключением использования 2 нг HCl. Все препараты конъюгатов, меченных иттрием, очищали эксклюзионной хроматографией как описано выше.

С. Исследования животных кроме человека

i. Биораспределение 2B8-MX-DTPA, меченного радиоактивными изотопами

I2B8 оценивали для биораспределения в ткани у мыши линии BALB/c в возрасте шести -восьми недель. Конъюгат, меченный радиоактивными изотопами, приготавливали, используя клиническую стадию препарата 2B8-MX-DTPA, затем следовали протоколу "mix-and-shoot", описанному выше. Удельная активность конъюгата составляла 2,3 мКи/мг, и из конъюгата получали препарат в PBS с pH 7,4, содержащим 50 мг/мл HSA (сывороточного альбумина человека). Мышам вводили внутривенно 100 мкл I2B8 (приблизительно 21 мКи). Трех мышей умерщвляли путем цервикальной дислокации через 0, 24, 48, и 72 часа. После умерщвления хвост, сердце, легкие, печень, почки, селезенку, мышцы и бедренную кость удаляли, промывали и взвешивали. Брали образцы крови для анализа. Определяли радиоактивность каждого образца путем подсчета гамма-излучения, а также соответственно процент введенной дозы на грамм ткани паритета. Также учитывали влияние активности крови отдельных органов.

Согласно отдельному протоколу, аликвотные пробы 268-MX-DTPA, которые инкубировали при 4°C и 30°C в течение 10 недель, помечали радиоактивными изотопами индия [111] до удельной активности 2,1 мКи/мг для обоих препаратов. Затем эти конъюгаты использовали при исследованиях биораспределения в мышцах как описано выше.

Для дозиметрических измерений 2B8-MX-DTPA помечали радиоактивным индием [111] до удельной активности 2,3 мКи/мг и вводили приблизительно 1,1 Ки каждой из 20 мышей линии BALB/c. Впоследствии пять мышей умерщвляли через 1, 24, 48 и 72 часа, а их органы удаляли и подготавливали для анализа. Кроме того, участки кожи, мышцы и кости удаляли и обрабатывали для анализа; также собирали мочу и фекалии и анализировали в течение того же самого времени 24-72 часа.

С помощью аналогичного способа 2B8-MX-DTPA помечали радиоактивным изотопом иттрия [90] и оценивали его биологическое распределение в мышцах линии BALB/c с интервалом времени 72 часа. После очищения жидкостной эксклюзионной хроматографией высокого давления четырьмя группами по пять мышей вводили внутривенно приблизительно 1 мКи подготовленного для клинических испытаний конъюгата с удельной активностью 12,2 мКи/мг. Группы впоследствии умерщвляли через 1, 24, 48 и 72 часа, а их органы и ткани анализировали как описано выше. Радиоактивность каждого образца ткани определяли, измеряя энергию тормозного излучения счетчиком сцинтилляций гамма-излучения. Значения активности впоследствии выражали как процент вводимой дозировки на грамм ткани или как процент вводимой дозировки на орган. Хотя органы и ткани промывали неоднократно для удаления избыточной крови, перфузию органов не проводили. Таким образом учитывали влияние активности внутренней крови на общие значения активности органа.

ii. Локализация опухоли с помощью I2B8

Определяли локализацию меченного радиоактивными изотопами 2B8-MX-DTPA в тимусэктомированных мышцах, несущих опухоль В-клеток Ramos. Тимусэктомированным мышам в возрасте шести-восьми недель вводили подкожно (в левый бок) 0,1 мл RPMI-1640, содержащего $1,2 \times 10^7$ клеток опухоли Ramos, которые предварительно адаптировали для роста в тимусэктомированных мышцах. Опухоли возникали в течение двух недель и располагались по весу в диапазоне от 0,07 до 1,1 граммов. Мышам вводили внутривенно 100 мкл 2B8-MX-DTPA (16,7 мКи), помеченного индием [111] и умерщвляли группы из трех мышей путем цервикальной дислокации через 0, 24, 48, и 72 часа. После умерщвления хвост, сердце, легкие, печень, почки, селезенки, мышцы, бедренную кость и опухоль удаляли, вымывали, взвешивали; брали образцы крови для анализа. Определяли радиоактивность каждого образца путем подсчета гамма-излучения и процент вводимой дозы на грамм ткани.

iii. Биораспределение и изучение локализации опухоли с помощью 2B8-MX-DTPA, меченного радиоактивными изотопами.

После предварительного эксперимента по биораспределению, описанного выше (Пример I.B.viii.a), конъюгированное 2B8 помечали радиоактивным изотопом индия [111] с удельной активностью 2,3 мКи/мг, и непосредственно вводили каждой из двадцати мышей линии BALB/c 1,1 Ки для определения биораспределения меченного радиоактивными изотопами вещества. Впоследствии группы из пяти мышей в каждой умерщвляли через 1, 24, 48 и 72 часа, а их органы и часть кожи, мышцы и кости удаляли и обрабатывали для анализа. Кроме того, мочу и фекалии собирали и анализировали в течение интервалов времени 24-72 часа. Уровень радиоактивности крови снижался от 40,3% при инъекции дозы на грамм через 1 час до 18,9 % через 72 часа. (данные не приведены). Значения для сердца, почек, мышц и селезенки оставались в диапазоне от 0,7-9,8 % в течение эксперимента. Уровни радиоактивности, обнаруженной в легких, снижались от 14,2 % через 1 час до 7,6 % через 72 часа. Аналогично значения на грамм вводимой дозы для печени составили соответственно 10,3 % и 9,9%. Эти данные использовали для определения поглощенных доз радиации I2B8, описанных ниже.

Биораспределение конъюгата, меченного иттрием [90], с удельной активностью антитела 12,2 мКи/мг определяли в мышцах линии BALB/c. Получали включения радионуклидов (90 %), и очищали меченное радиоактивными изотопами антитело HPLC (жидкостной хроматографией высокого давления). Распределение радиоактивности в ткани определяли в главных органах, и коже, мышцах, костях, моче и фекалиях через 72 часа и выражали в процентах вводимой дозы на грамм ткани. Результаты (не приведены) подтверждали, что хотя уровни радиоактивности крови снижались от приблизительно 39,2 % вводимой дозы на грамм через 1 час до 15,4 % через 72 часа уровни радиоактивности в хвосте, сердце, почках, мышцах и селезенке оставались постоянными, равными 10,2 % или ниже на протяжении эксперимента. Важно то, что радиоактивность кости располагалась в диапазоне от 4,4 % вводимой дозы на грамм кости через 1 час до 3,2 % через 72 часа. В совокупности эти результаты показывают, что малые дозы свободного иттрия были в конъюгате и что малые дозы свободных радиоактивных металлов высвобождались в ходе эксперимента. Эти данные использовали для определения доз поглощенной радиации для Y2B8, описанного ниже.

Для исследований локализации опухоли приготавливали 2B8-MX-DTPA и помечали радиоактивными изотопами индия [111] до удельной активности 2,7 мКи/мг. Затем сто микролитров меченного конъюгата (приблизительно 24 Ки) вводили каждой из 12 тимусэктомированных мышей, имеющих опухоль В-клеток Ramos. Опухоли располагались по весу в диапазоне от 0,1 до 1,0 грам-

мов. После инъекции через 0, 24, 48, и 72 часов брали образцы крови объемом 50 мл путем пункции глазного дна, затем мышей умерщвляли посредством цервикальной дислокации и удаляли хвост, сердце, легкие, печень, почки, селезенку, мышцы, бедренную кость и опухоль. После обработки и взвешивания тканей определяли радиоактивность каждого образца ткани, используя счетчик гамма-излучения, а значения выражали как процент вводимой дозы на грамм.

Результаты (не представлены) показали, что концентрации ¹¹¹In-2B8-MX-DTPA в опухоли устойчиво возрастали на протяжении хода эксперимента. Тринадцать процентов вводимой дозы накапливалось в опухоли через 72 часа. Уровни крови, напротив, снижались в течение эксперимента от свыше 30% через 0 часов до 13% через 72 часа. Все другие ткани (за исключением мышц) содержали от 1,3 до 6,0 % вводимой дозы на грамм ткани к концу эксперимента; мышечная ткань содержала приблизительно 13% вводимой дозы на грамм.

D. Исследования человека.

i. 2B8 и 2B8-MX-DTPA: Иммуногистологические исследования в тканях человека

Определяли реактивность мышиноного моноклонального антитела 2B8 в ткани, используя набор 32 различных тканей человека, фиксированных ацетоном. Антитело 2B8 реагировало с антигеном анти-CD20, которое имело ограниченную структуру распределения ткани, наблюдаемую только в субпопуляции клеток в лимфоидных тканях, имеющих только гематопоетическое происхождение.

В лимфатическом узле наблюдали иммунореактивность в популяции зрелых корковых В-лимфоцитов, а также в пролиферирующих клетках герминальных центров. Положительную реактивность также наблюдали в периферической крови, областях В-клеток миндалин, белой пульпе селезенки, и у 40-70 % медуллярных лимфоцитов, обнаруженных в тимусе. Положительная реактивность также наблюдалась в фолликулах собственно тонких слоев (пейровых бляшках) толстого кишечника. И наконец, положительные результаты получали при применении антитела 2B8 в популяции или рассеянных лимфоидных клетках стромы различных органов, включая мочевой пузырь, молочные железы, шею, пищевод, легкие, окологрудинную железу, простату, тонкую кишку и желудок (данные не представлены).

Обнаружено, что все клетки однослойного эпителия, также как и многослойного эпителия и эпителия различных органов, являются нереактивными. Аналогично, отсутствие реактивности установлено в нейроэктодермальных ячейках, включая клетки головного, спинного мозга и периферических нервов. Было обнаружено, что мезенхимальные элементы, например клетки скелетных и гладких мышц, фибробластов, клетки эндотелия, и полиморфоядерные клетки опухоли также являются отрицательными (данные не представлены).

Оценивали реактивность конъюгата 2B8-MX-DTPA в ткани, используя набор из шестнадцати тканей человека, фиксированных в ацетоне. Как было показано ранее в отношении природного антитела (данные не приведены), конъюгат 2B8-MX-DTPA распознавал антиген CD20, который проявил сильно ограниченную структуру распределения, поскольку его обнаруживали только в субпопуляции клеток лимфатического происхождения. В лимфатическом узле иммунореактивность наблюдали в популяции В-клеток. Высокую реактивность наблюдали в белой пульпе селезенки и в медуллярных лимфоцитах тимуса. Иммунореактивность также наблюдали в рассеянных лимфоцитах в мочевом пузыре, сердце, толстом кишечнике, печени, легком и матке, которую объясняли наличием опухолевых клеток в этих тканях. Как и у природного антитела, никакой реактивности не наблюдали в нейроэктодермальных клетках или в мезенхимальных элементах (данные не представлены).

ii. Клинический анализ I2B8 (томография) и Y2B8 (терапия).

a. Исследование терапии однократной дозой при клиническом испытании в фазе I/II

В настоящее время проводится клинический анализ I2B8 в фазе I/II (томография) сопровождаемый введением однократной терапевтической дозы Y2B8. При исследовании однократной дозы следуют следующей схеме:

1. Сбор периферических стволовых клеток (PSC) или клеток костного мозга (BM) с очисткой;
2. Томография I2B8;
3. Терапия Y2B8 (три уровня дозирования); и
4. Трансплантация PSC или аутогенного BM (в случае необходимости основанная на абсолютном подсчете нейтрофилов менее 500 в мм³ в течение трех последовательных дней или тромбоцитов менее 20000 в мм³, если исследование не обнаруживает восстановления костного мозга.)

Уровни дозирования Y2B8 были следующими:

Уровень дозирования	Дозировка (мКи)
1.	20
2.	30
3.	40

Необходимо провести лечение троих пациентов на каждом из уровней дозирования для определения максимально переносимой дозы ("максимально переносимая доза").

Томографические исследования (дозиметрию) проводят следующим образом: каждого пациента включают в два исследования биораспределения *in vivo* при использовании I2B8. В первом исследовании вводят внутривенно 2 мг I2B8 (5мКи) через один час; спустя одну неделю 2B8 (то есть неконъюгирующее антитело) вводят внутривенно со скоростью, не превышающей 250 мг/ч, затем немедленно вводят внутривенно 2 мг I2B8 (5 мКи) через один час. При обоих исследованиях немедленно после инфузии I2B8 каждого пациента подвергают томографии, которую повторяют при времени $t = 14-18$ часов (если указано), $t = 24$ часа; $t = 72$ часа; и

$t = 96$ часа (если указано). Для метки индия [111] определяют среднее время сохранения во всем организме; такие определения также делают для распознаваемых органов или органов, поврежденных опухолями (“области, представляющие интерес”).

Области, представляющие интерес, сравнивают с концентрациями метки во всем организме. На основании этого сравнения, используя стандартные протоколы, можно определить локализацию и концентрацию $Y2B8$. Если определяемая суммарная доза $Y2B8$ в более чем в восемь (8) раз превышает расчетную дозу для всего организма, или если расчетная суммарная доза для печени превышает 1500 сГр, то лечение $Y2B5$ не проводят.

Если результаты томографических исследований приемлемы, то на 0,0 или 1,0 мг/кг веса пациента вводят внутривенно 2B8 со скоростью не более 250 мг/ч. Затем внутривенно вводят $Y2B5$ (10, 20 или 40 мКи) со скоростью 20 мКи/ч.

в. Клиническое испытание в фазе I/II: исследование терапии многократной дозой

В настоящее время проводят клинический анализ $Y2B5$ в фазе I/II: исследование терапии многократной дозой. Для исследования многократной дозы используют следующую схему:

1. Сбор PSC или BM;
2. Томография I2B8;
3. Терапия $Y2B8$ (три уровня дозировки) для четырех дозировок или общей суммарной дозировки 80 мКи и;
4. Трансплантация PSC или аутогенного BM (основанная на решении практикующего врача).

Уровни дозировки $Y2B8$ были следующими:

Уровень дозировки	Дозировки (мКи)
1.	10
2.	15
3.	20

Необходимо провести лечение троих пациентов на каждом из уровней дозировки для определения максимально переносимой дозы (MTD)

Томографические исследования (дозиметрию) проводят следующим образом: предпочтительную дозу при томографии для немеченного антитела (то есть 2B8) определяют для первых двух пациентов. Эти первые два пациента получают 100 мг немеченного 2B8 в 250 см³ обычного физиологического раствора, а через 4 часа им вводят 0,5 мКи I2B8, берут анализ крови для получения данных биораспределения по времени $t=0$, $t=10$ минут, $t=120$ минут, $t=24$ часа, и $t=48$ часов. Пациентов сканируют с получением множества местных изображений с помощью гамма-камеры во время $t=2$ часа, $t=24$ часа и $t=48$ часов. После сканирования при $t=48$ часов пациенты получают 250 мг 2B8 как описано, затем им вводят в кровь 4,5 мКи I2B8 - и сканируют как описано. Если 100 мг 2B8 дают хорошую томографию, то следующие два пациента получают 50 мг 2B8 как описано, затем вводят 0,5 мКи I2B8, далее через 48 часов вводят 100 мг 2B8 и затем 4,5 мКи I2B8. Если 250 мг 2B8 дают хорошую томо-

графию, то следующие два пациента получают 250 мг 2B8 как описано, затем им вводят 0,5 мКи I2B8, через 48 часов 500 мг 2B8 и затем 4,5 мКи I2B8. Следующим пациентам вводят самое низкое количество 2B8, что обеспечивает оптимальное отображение. Оптимальное отображение определяют как: (1) наилучшее эффективное отображение при самом медленном исчезновении антитела, (2) наилучшее распределение, минимизирующее компартментализацию в отдельном органе; и (3) наилучшее субъективное разрешение изображения патологического изменения (сравнение опухоли/фон).

Для первых четырех пациентов первая терапевтическая дозировка $Y2B8$ будет начинаться через 14 дней после введения последней дозировки I2B8; для следующих пациентов первая терапевтическая дозировка $Y2B8$ будет начинаться от двух до семи дней после введения I2B8.

До введения $Y2B8$ пациентам, кроме первых четырех, вводят 2B8 как описано, затем внутривенно вводят $Y2B8$ через 5-10 минут. Берут анализ крови для биораспределения по времени $t=0$, $t=10$ минут, $t=120$ минут, $t=24$ часа и $t=48$ часов. Пациенты получают повторные дозировки $Y2B8$ (вводят ту же самую дозировку, как и первую) приблизительно каждую неделю с шестой по восьмую при максимуме четыре дозировки или общую суммарную дозировку 80 мКи. Наиболее предпочтительно, чтобы пациенты не получали последующую дозировку $Y2B8$, пока показатель WBC (формулы крови) у пациентов больше либо равен 3000, и AGC больше либо равен 100000.

После завершения исследования уровня с тремя дозировками определяют максимально переносимую дозу. В исследования вводят дополнительных пациентов будут, которые будут получать максимально переносимую дозу.

II. Получение химерных антител анти-CD20 продукция (“C2B8”)

A. Конструирование вектора экспрессии ДНК химерного иммуноглобулина анти-CD20

РНК изолировали из клетки гибридомы мыши 2B8 (как описано Chomczynski, P. et al., “Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.” Anal. Biochem. 162:156-159 (1987) и получали из нее кДНК. вариабельные участки ДНК легких цепочек иммуноглобулина мыши изолировали из кДНК цепной реакцией полимеразы с помощью набора праймеров ДНК с гомологией к сигнальным последовательностям легких цепочек мыши на 5' конце и J-участками легких цепочек мыши на 3' конце. Последовательности праймеров были следующими:

1. Смысловой VL (SEQ. ID. NO. 3)

5' ATC AC AGATCT CTC ACC ATG GAT TTT CAG GTG CAG ATT ATC AGC TTC 3'

(подчеркнутая часть является сайтом Bgl II; весь участок является кодоном начала).

2. Антисмысловой V_L (SEQ. ID. NO. 4)

5' TGC AGC ATC CGTACG TTT GAT TTC
CAG CTT 3'

(подчеркнутая часть является сайтом WI Bsi.)

См. рисунки 1 и 2 для соответствующих сайтов Bgl II и WI Bsi в TCAE 8, и рисунок 3 для соответствующих сайтов в анти-CD20 в TCAE 8.

Эти получаемые в результате фрагменты ДНК клонировали непосредственно в векторе TCAE 8 перед константным доменом легких цепочек каппа человека и секвой и секвенировали. Определяемая последовательность ДНК для переменных участков легких цепочек мыши изображена на рисунке 4 (SEQ. ID. NO. 5); см. также рисунок 3, нуклеотиды от 978 до 1362. На рисунке 4 также показаны последовательности аминокислот этого переменного участка, а также каркасные участки и участки CDR. Переменные участки легких цепочек мыши из 2B8 расположены в семействе каппа VI мыши. См., Kabat, выше.

Переменные участки тяжелых цепочек мыши аналогично изолировали и клонировали перед константными доменами IgG1 человека. Праймеры были следующими:

1. Смысловый VH (SEQ. ID. NO. 6)

5' GCG GCT CCC ACGCGT GTC CTG TCC
CAG 3'

(подчеркнутая часть является сайтом Mlu I)

2. Антисмысловый VH (SEQ. ID. NO. 7)

5' GG (G/C) TGT TGT GCTAGC TG (A/C)
(A/G) GA GAC (G/A) GT GA 3'

(подчеркнутая часть является сайтом Nhe I)

См. рисунки 1 и 2 для соответствующих сайтов Mlu I и Nhe I в TCAE 8, и рисунок 3 для соответствующих сайтов в анти-CD20 в TCAE 8.

Последовательность для этих тяжелых цепочек мыши представлена на рисунке 5 (SEQ. ID. NO. 8); см. также рисунок 3, нуклеотиды от 2401 до 2820. На рисунке 5 также показана последовательность аминокислот из этих переменных участков мыши, а также каркасных участков и участков CDR. Переменные участки тяжелых цепочек мыши из 2B8 находятся в семействе VH2B мыши. См., Kabat, выше.

В. Приготовление химерного анти-CD20, выработанного трансфектормой яичника китайского хомяка и SP2/0

Клетки DG44 яичника китайского хомяка ("CHO") выращивали в среде SSFM II минус гипоксантина и тимидина (Gibco, Grand Island, NY, Form № 910456PK); клетки миеломы мыши SP2/0 выращивали в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла ("DMEM") (Irvine Scientific, Santa Ana, Ca, Cat. № 9024) при добавлении 5 % эмбриональной бычьей сывороткой и 20 мл/л глутамина. Четыре миллиона клеток электропорировали с плазмидой ДНК либо из 25 мг яичника китайского хомяка или из 50 мг SP2/0, которую разрезали с помощью Not I, используя систему электропорации BTX 600 (BTX, San Diego, CA) в 0,4 мл одноразовой кюветы. Применяли 210 вольт для яичника китайского хомяка или 180 вольт для SP2/0,

400 микрофард, 13 Ом. Каждую электропорацию размещали на шесть планшетов с 96-ячейками (приблизительно 7000 клеток в ячейке). На планшеты наносили среду, содержащую G418 (GENETICIN, Gibco, Cat. № 860-1811) в 400 мг/мл активного соединения для яичника китайского хомяка (среда далее включала 50 мкМ гипоксантина и 8 мкМ тимидина) или 800 мг/мл для SP2/0. Электропорации проводили в последующие два дня и затем 2 или 3 дня до образования колоний. Супернатант из колоний исследовали на наличие химерного иммуноглобулина с помощью ELISA, специфического для антитела человека. Колонии, производящие наибольшее количество иммуноглобулина, размножали и помещали в 96-ячеечные планшеты, содержащие среду плюс метотрексат (25 нМ для SP2/0 и 5 нМ для яичника китайского хомяка) и подавали среду каждые два или три дня. Исследовали супернатанты, как описано выше, а также колонии, производящие наибольшее количество иммуноглобулина. Химерное анти-CD20 антитело очищали от супернатанта, используя аффинную хроматографию белка А.

Очищенное химерное анти-CD20 анализировали при помощи электрофореза в полиакриламидном геле и доводили очистку до более, чем приблизительно 95%. Родство и специфичность химерного антитела определяли на основе 2B8. Химерное антитело анти-CD20 тестировали на связывание при прямых и конкурирующих испытаниях, и при сравнении с мышинным анти-CD20 моноклональным антителом 2B8 оно показало сравнимое родство и специфичность для ряда случаев CD20 положительных линий В-клеток (данные не представлены). Константу кажущегося сродства ("Кар") химерного антитела определяли путем прямого связывания меченного радиоактивными изотопами I125 химерного анти-CD20 и сравнивали с меченым радиоактивными изотопами 268 по графику Scatchard; установленная константа Кар для химерного анти-CD20, полученного из яичника китайского хомяка, составила $5,2 \times 10^{-9}$ М, а для антитела, полученного из SP2/0 $7,4 \times 10^{-9}$ М. Расчетная константа Кар для 2B8 составила $3,5 \times 10^{-9}$ М. Использовали прямую конкуренцию при радиоиммунном анализе для подтверждения специфичности и сохранения иммунореактивности химерного антитела путем сравнения его способности эффективно конкурировать с 2B8. Потребовались достаточные эквивалентные количества химерных антител анти-CD20 и 2B8 для 50%-ного ингибирования связывания с антигенами CD20 на В-клетках (данные не представлены), то есть наблюдали минимальную потерю ингибирования активности антител анти-CD20, возможно благодаря химеризации.

Результаты Примера II. В показывают, что химерные антитела анти-CD20 были получены из трансфектом яичника китайского хомяка и SP2/0 с использованием векторов TCAE 8. Эти химерные антитела имели в основном ту же самую специфичность и способность к связыванию как мышинное моноклональное антитело 2B8 анти-CD20.

С. Определение иммунологической активности химерных антител анти-CD20

i. Анализ C1q человека

Химерные антитела анти-CD20, полученные из клеточных линий яичника китайского хомячка и SP2/0, оценивали на связывание C1q человека при анализе в проточной цитометрии с использованием флуоресцентного меченного C1q (C1q, получали от Quidel, Mira Mesa, CA, Prod. № A400, а метку FITC от Sigma, St. Louis MO, Prod. № F-7250; FITC). Мечение C1q производили согласно протоколу, описанному в Selected Methods In Cellular Immunology, Michell & Shiigi, Ed. (W.H. Freeman & Co., San Francisco, CA, 1980, p. 292). Аналитические результаты получали с использованием проточного цитометра Becton Dickinson FACScanTM (флуоресценцию измеряли в диапазоне 515-545 нм). Эквивалентные количества химерного антитела анти-CD20, IgG1 человека, К-белка миеломы (Binding Site, San Diego, Ca, Prod. No. BP078), и 2B8 инкубировали с эквивалентным количеством клеток SB, положительных к CD20, затем промывали буфером FACS (0,2 % BSA в PBS, pH 7,4, 0,02 % азида натрия) для удаления неприсоединившегося антитела и инкубировали с C1q, меченным FITC. После 30 - 60 минут инкубации клетки опять промывали. Три условия, включая C1q, меченный FITC в качестве контрольного, анализировали на FACScanTM и составляли инструкции для их получения. Результаты представлены на рисунке 6.

Результаты на рисунке 6 показывают, что значительное увеличение флуоресценции наблюдали только при условии химерного антитела анти-CD20; то есть только клетки SB с прилегающим к ним химерным антителом анти-CD20 были положительны на C1q, в то время как при других условиях, такую же структуру получали как контрольную.

ii. Зависимый от комплемента лизис клетки

Химерные антитела анти-CD20 анализировали на их способность лизировать клеточные линии лимфомы в присутствии сыворотки человека (источник комплемента). SB клетки, положительные к CD20, помечали ⁵¹Cr путем смешивания 100 мкКи ⁵¹Cr с 1 x 10⁶ SB клеток в течение 1 часа при 37°C. Меченные SB клетки инкубировали в присутствии эквивалентных количеств комплемента человека и эквивалентных количеств (0-50 г/мл) химерных антител анти-CD20 или 2B8 в течение 4 часов при 37°C (см., Brunner, K.T. et al., "Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on ⁵¹Cr-labeled allogenic target cells in vitro." Immunology 14:181-189 (1968). Результаты представлены на рисунке 7.

Результаты рисунка 7 показывают, что при этих условиях химерные антитела анти-CD20 произвели значительный лизис (49 %).

iii. Анализ эффектор клеточной цитотоксичности в зависимости от антитела

Для этого исследования использовали CD20-положительные клетки (SB) и CD20 - отрицательные клетки (линия HSB лейкемии Т-клеток; см., Adams, Richard, "Formal Discussion," Can. Res. 27:2479-2482 (1967); ATCC deposit No. ATCC CCL 120.1); и помечали их ⁵¹Cr. Анализ проводили согласно протоколу, описанному в Brunner, K.T. et al., "Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on ⁵¹Cr-labeled allogenic target cells in vitro." Immunology 14:181-189 (1968). Наблюдали значительный лизис CD20-положительных целевых SB клеток, зависимый от химерных антител анти-CD20 (меченных ⁵¹Cr) в конце 4 часа инкубации при 37°C. Этот эффект наблюдали для антитела, полученного из яичника китайского хомячка и SP2/0 (клетками эффектора были периферические лимфоциты человека; соотношение клеток эффектора к мишени составляло 100:1. Эффективный лизис целевых клеток получали при 3,9 г/мл. Напротив, при тех же условиях мышинное моноклональное антитело 2B8 анти-CD20 давало статистически незначительный эффект, и отсутствовал лизис CD20-отрицательных клеток HSB. Результаты представлены на рисунке 8.

Результаты примера II показывают, что химерные антитела анти-CD20 из примера 1 были иммунологически активны.

III. Истощение клеток in vivo с помощью химерного АНТИ-CD20

А. Исследование приматов кроме человека

Проводили три отдельных исследования приматов кроме человека. Для удобства они обозначены здесь как "Химерное анти-CD20: "CHO и SP2/0;" "Химерное анти-CD20: "CHO" и "Высокая дозировка химерного анти-CD20". Условия были следующими:

Химерное анти-CD20: CHO и SP2/0

Шесть обезьян cynomolgus весом от 4,5 до 7 кг (White Sands Research Center, Alamogordo, NM) разделили на три группы по две обезьяны в каждой. Оба животного каждой группы получали ту же самую дозу иммунологически активного химерного антитела анти-CD20. Одно животное в каждой группе получало очищенное антитело, выработанное трансфектомой CHO; другое получало антитело, выработанное трансфектомой SP2/0. Три группы получали дозировки антитела, соответствующие 0,1 мг/кг, 0,4 мг/кг, и 1,6 мг/кг ежедневно в течение четырех (4) последовательных дней. Химерное иммунологически активное антитело анти-CD20 смешивали со стерильным физиологическим раствором и вводили внутривенно. Образцы крови брали перед каждой инфузией. Дополнительные образцы крови брали, начиная с 24 часов после последней инъекции (T=0) и после этого на 1, 3, 7, 14 и 28 дни. Затем брали образцы крови с интервалом в две недели до завершения исследования на 90-ый день.

Приблизительно 5 мл цельной крови от каждого животного центрифугировали со скоростью 2000 об/мин в течение 5 минут. Плазму брали для

анализа уровней растворимых химерных антител анти-CD20. Осадок (содержащий лейкоциты периферической крови и эритроциты крови) повторно суспендировали в сыворотке эмбриона жеребенка для анализа флуоресцентно меченного антитела (см., "Fluorescent Antibody Labeling of Lymphoid Cell Population," выше).

Химерное анти-GD20: CHO

Шесть обезьян *cynomolgus* весом от 4 до 6 килограмм (White Sands) разделяли на три группы по две обезьяны в каждой. Всем животным вводили иммунологически активные химерные антитела анти-CD20, выработанные трансфектомой CHO (в стерильном физиологическом растворе). Три группы разделяли следующим образом: подгруппа 1 получала ежедневно внутривенные инъекции 0,01 мг/кг антитела с промежутком через четыре (4) дня; подгруппа 2 ежедневно получала внутривенные инъекции 0,4 мг/кг антитела с промежутком через четыре (4) дня; подгруппа 3 получала однократную внутривенную инъекцию 6,4 мг/кг антитела. У всех трех подгрупп образцы крови получали до начала лечения; дополнительные образцы крови были также брали при T=0, 1, 3, 7, 14 и 28 дней после последней инъекции. Эти образцы обрабатывали для анализа флуоресцентно меченного антитела (см., "Fluorescent Antibody Labeling of Lymphoid Cell Population," выше). Кроме определения количества В-клеток периферической крови брали биопсии лимфоузлов на 7, 14 и 28 дни после последней инъекции, а также окрашивали препарат одной клетки для количественного определения популяций лимфоцитов при проточной цитометрии.

Высокая дозировка химерного анти-CD20

Двум обезьянам *cynomolgus* (White Sands) вводили 16,8 мг/кг иммунологически активных химерных антител анти-CD20 из трансфектомой CHO (в стерильном физиологическом растворе) еженедельно в течение четырех последовательных недель. После завершения лечения обоих животных анестезировали для удаления костного мозга; а также брали биопсию лимфоузлов. Оба набора тканей окрашивали для определения наличия В-лимфоцитов, используя Leu 16 для проточной цитометрии по протоколу, описанному в Ling, N.R. et al., "B-cell and plasm-cell antigens." Leucocyte Typing III White Cell Differentiations Antigens, A.J. Michael, Ed. (Oxford University Press, Oxford UK 1987), p. 302.

Флуоресцентное мочение антител лимфоидной клеточной популяции.

После удаления плазмы лейкоциты дважды промывали сбалансированным солевым раствором Хенкса ("HBSS") и повторно суспензировали в эквивалентном объеме плазмы эмбриональной бычьей сыворотки (инактивация при нагревании до 56°C в течение 30 минут). Препарат клетки в объеме 0,1 мл распределяли в каждую из шести (6) конических трубок для центрифугирования объемом

15 мл. Флуоресцентные меченные моноклональные антитела со специфичностью для маркеров CD2 на поверхности лимфоцитов человека (AMAC, Westbrook, Я), CD20 (Becton Dickinson) и IgM человека (Binding Site, San Diego, CA) добавляли в 3 трубки для определения популяций Т- и В-лимфоцитов. Все реагенты предварительно тестировали на положительную реакцию соответствующих антигенов лимфоцитов обезьян. Химерное антитело анти-CD20, связанное с поверхностью В-клетки CD20 обезьяны обнаружили в четвертой трубке, используя поликлональное козлиное антитело IgG человека, связанное с фикоэритрином (AMAC). Этот реагент предварительно адсорбировали на Ig-сефарозной колонне для обезьяны, чтобы предотвратить взаимную реактивность к Ig обезьяны. Таким образом, осуществили специфическое обнаружение и количественное определение химерного анти-CD20 антитела, связанного с клетками. Пятая трубка содержала реагенты анти - IgM и анти-IgG человека для двойного окрашивания популяции В-клеток. Шестой образец, включали без реагентов для определения аутофлуоресценции. Клетки инкубировали с флуоресцентными антителами в течение 30 минут, промывали и фиксировали в 0,5 мл буферного раствора для фиксаций (0,15 М NaCl, 1 % параформальдегида, pH 7,4) и анализировали на приборе Becton Dickinson FACScan™. Популяции лимфоцитов первоначально обнаруживали путем прямого перпендикулярного светорассеяния угла в точечно графическом растре с немеченными лейкоцитами. Изолировали суммарную популяцию лимфоцитов, исключая все остальные популяции. Последующие измерения флуоресценции отражали только селективные, специфические для лимфоцитов явления.

Истощение В-лимфоцитов периферической крови

Не установлено никаких заметных для наблюдения отличий между эффективностью антител, производимых CHO и SP2/0, при истощении В-клеток *in vivo*, хотя наблюдали небольшое увеличение восстановления В-клеток после 7-го дня у обезьян, которым вводили химерные антитела анти-CD20, вырабатываемые трансфектомой CHO при уровне дозы, равной 1,6 мг/кг и 6,4 Мг/кг, а у обезьян, которым вводили антитело, вырабатываемое SP2/0 при уровне дозы 0,4 мг/кг. На рисунках 9А, В и С представлены результаты, полученные при исследовании химерного анти-CD20: CHO и SP2/0. Рисунок 9А относится к уровню дозы 0,4 мг/кг; рисунок 9В к уровню дозы 1,6 мг/кг; и рисунок 9С - к уровню дозы 6,4 мг/кг. Как видно из рисунка 9, катастрофическое сокращение (> 95 %) уровней В-клеток в периферической крови

наблюдали после терапевтического лечения на всех тестируемых диапазонах дозы. Эти уровни сохранялись вплоть до семи (7) дней после инфузии. После этого периода времени начиналось восстановление В-клеток, причем время инициации восстановления не зависело от уровней доз.

При исследовании химерного анти-CD20: СНО использовали в 10 раз меньшую дозу концентрации антитела (0,01 мг/г) для инъекций (общая 0,04 мг/кг) с интервалом четыре инъекции ежедневно. На рисунке 10 представлены результаты этого исследования. Такие дозы истощали популяцию В-клеток периферической крови до приблизительно 50 % нормального уровня, определяемого с помощью либо анти-поверхностного IgM или антитела Leu 16. Результаты также показывают, что насыщенности антигена CD20 в популяции В-лимфоцита не достигали при использовании иммунологически активного химерного антитела анти-CD20 при такой концентрации дозы и за такой времени для приматов кроме человека. В-лимфоциты, покрытые антителами, были обнаружены в образцах крови в течение первых трех дней после начала терапевтического лечения. Однако, уже на седьмой день клетки, покрытые антителами, не были обнаружены.

В таблице 1 обобщены результаты воздействия однократных и многократных доз иммунологически активного химерного антитела анти-CD20 на популяции клеток периферической крови. Однократная доза составляла 6,4 мг/кг многократная доза - 0,4 мг/кг через четыре (4) последовательных дня (эти результаты получены от обезьян, описанных выше).

Таблица 1

Популяция клеток периферической крови при исследовании введения приматам C2B8

Обезьяна	Доза	День	CD2	Анти-Hu IgG
A	0,4 мг/кг (4 дозы)	предварительное обескровливание	81,5	-
		0	86,5	0,2
		7	85,5	0,0
		21	93,3	-
		28	85,5	-
B	0,4 мг/кг (4 дозы)	предварительное обескровливание	81,7	-
		0	94,6	0,1
		7	922	0,1
		21	84,9	-
		28	84,1	-
C	6,4 мг/кг (1 доза)	предварительное обескровливание	77,7	0,0
		7	85,7	0,1
		21	86,7	-
		28	76,7	-
D	6,4 мг/кг (1 доза)	предварительное обескровливание	85,7	0,1
		7	94,7	0,1
		21	85,2	-
		28	85,9	-
Обезьяна	Анти-Hu IgG+	Leu-16	% Истощение В-клеток	
A	-	9,4	0	
	0,3	0,0	97	
	0,1	1,2	99	

B	-	2,1	78
	-	4,1	66
	-	14,8	0
	0,2	0,1	99
	0,1	0,1	99
C	-	6,9	53
	-	8,7	41
	0,2	17,0	0
	0,1	0,0	99
	-	14,7	15
D	-	8,1	62
	0,1	14,4	0
	0,2	0,0	99
	-	9,2	46
	-	6,7	53

* Двойное окрашивание популяции указывает на степень покрытия В-клетками химерными анти-CD20.

Данные, представленные в Таблице 1, показывают, что истощение В-клеток периферической крови при условиях доступа антитела произошло быстро и эффективно, независимо от уровней однократной или многократной дозы. Кроме того, истощение наблюдалось в течение по крайней мере семи (7) дней после последней инъекции, а частичное восстановление В-клеток наблюдали на 21-ый день.

В таблице II представлено воздействие иммунологически активных химерных антител анти-CD20 на популяции клеток лимфоузлов при использовании режима лечения, приведенного в таблице 1 (4 ежедневных дозы по 0,4 мг/кг; 1 доза 6,4 мг/кг). Приводятся также сравнительные значения для здоровых лимфоузлов (контрольная обезьяна, подмышечный и паховый) и здорового костного мозга (две обезьяны).

Таблица II

Популяция клеток лимфоузлов

Обезьяна	Доза	День	CD2	Анти-Hu IgG
A	0,4 мг/кг (4 дозы)	7	66,9	-
		14	76,9	19,6
		28	61,6	19,7
B	0,4 мг/кг (4 дозы)	75	9,4	-
		14	83,2	9,9
		28	84,1	15,7
C	6,4 мг/кг (1 доза)	77	5,5	-
		14	74,1	17,9
		28	66,9	23,1
D	6,4 мг/кг (1 доза)	7	83,9	-
		14	74,1	17,9
		28	84,1	12,8
Обезьяна	Анти-Hu IgG+	Leu-16	% подавления В-лимфоцитов	
A	7,4	40,1	1	
	0,8	22,6	44	
	-	26,0	36	
B	29,9	52,2	0	
	0,7	14,5	64	
	-	14,6	64	

C	22,3	35,2	13		
	1,1	23,9	41		
	-	21,4	47		
D	12,5	19,7	51		
	0,2	8,7	78		
	-	12,9	68		
Таблица II (продолжение)					
CD2	Анти- Hu IgG+	Анти- Hu-IgM	Leu- 16	% подав- ления В- лимфо- цитов	
Здоровые Лимфо- узлы Кон- трольный 1					
Подмышечный	55,4	25,0	-	41,4	нет дан- ных
Паховый	52,1	31,2	-	39,5	нет дан- ных
Здоровый костный мозг Кон- трольный 2					
Кон- трольный 3	65,3	19,0	-	11,4	нет дан- ных
	29,8	28,0	-	16,6	нет дан- ных

Результаты таблицы II показывают эффективное истощение В-лимфоцитов при обоих режимах лечения. Таблица II также показывает, что у приматов кроме человека не получают полной насыщенности В-клеток в лимфатических тканях при применении иммунологически активного химерного антитела анти-CD20. Кроме того, на седьмой (7) день после лечения, наблюдая клетки, покрытые антителами, визуализировали заметное истощение В-клеток лимфоузлов на 14-ый день.

На основе этих данных проводили исследование введения однократной высокой дозы химерного анти-CD20, причем основное внимание уделяли фармакологии и токсикологии. То есть это исследование проводили для оценки любой токсичности, связанной с введением химерного антитела, а также эффективности истощения В-клеток периферической крови лимфатических узлов и костного мозга. Кроме того, поскольку данные Таблицы II показывают, что при этом исследовании большая часть В-клеток лимфоузлов истощалась между 7 и 14 днями после начала лечения, то режим еженедельной дозировки может дать более эффективные результаты. В таблице II приведены исследования результатов введения высокой дозы химерного анти-CD20.

Таблица III
Популяции клеток лимфоузлов и костного мозга

Обезьяны	CD2	CD20 ^a	mIgM+анти- C2B8 ^b	C2B8 ^c	К-во дней ^d
----------	-----	-------------------	---------------------------------	-------------------	---------------------------

Паховый лимфоузел					
E	90,0	5,3	4,8	6,5	22
F	91,0	6,3	5,6	6,3	22
G	89,9	5,0	3,7	5,8	36
H	85,4	12,3	1,7	1,8	36
Костный мозг					
E	46,7	4,3	2,6	2,8	22
F	41,8	3,0	2,1	2,2	22
G	35,3	0,8	1,4	1,4	36
H	25,6	4,4	4,3	4,4	36

^aОбозначает популяцию, окрашенную с Leu16.

^bОбозначает популяцию, окрашенную дважды, положительную для поверхностных IgM клеток и клеток, покрытых химерными антителами.

^cОбозначает полное окрашивание популяции для химерного антитела, включая двойное окрашивание поверхностного IgM положительных клеток и одиночное окрашивание (поверхностный IgM отрицательных клеток).

^dКоличество дней после инъекции окончательной дозы 16,8 мг/кг.

При исследовании обоих животных на 22-ой день после прекращения лечения обнаружили менее 5% В-клеток по сравнению с 40% в контрольных лимфоузлах (см. таблицу II, выше). Аналогично, в костном мозге животных, которым вводили химерное антитело анти-CD20, уровни CD20 положительных клеток составляли менее 3% по сравнению с 11-15% у здоровых животных (см. таблицу II, выше). Из животных, которых исследовали на 36-ой день после прекращения лечения, одно животное (H) имело приблизительно 12% В-клеток в лимфоузле и 4,4% В-клеток в костном мозге, в то время как другое животное (G) - приблизительно 5% В-клеток в лимфоузле и 0,8% в костном мозге. Эти данные подтверждают значительное истощение В-клеток.

Результаты примера III.A подтверждают то, что введение низких доз иммунологически активного химерного анти-CD20 приводит к длительному истощению В-клеток периферической крови у приматов. Эти данные также указывают, что значительное истощение популяций В-клеток было достигнуто в периферических лимфоузлах и костном мозге при повторном введении высоких доз антитела. Продолжительный контроль тестируемых животных показал, что даже при таком серьезном истощении В-лимфоцитов периферической крови в течение первой недели лечения не наблюдали никаких неблагоприятных для здоровья эффектов. Кроме того, обнаруженное восстановление популяции В-клеток позволяет сделать вывод, что лечение не оказывало неблагоприятного воздействия на плюрипотентные стволовые клоки этих приматов.

В. Клинический анализ. C2B8

i. Клинические испытания C2B8 в фазе I/II исследование терапии однократной дозой

Пятнадцать пациентов, имеющие гистологически зарегистрированные рецидивы В-клеток лим-

фомы, получали C2B8 в фазе I/II при клиническом испытании.

Каждый пациент получал однократную дозу C2B8 при исследовании с увеличением дозы. Три пациента получили дозы: 10 мг/м²; 50 мг/м²; 100 мг/м²; 250 мг/м² и 500 мг/м². Лечение проводили путем внутривенной инфузии через проходной фильтр размером 0,22 микрон C2B8, разбавленного до окончательного объема 250 см³ или при максимальной концентрации 1 мг/мл стандартного физиологического раствора. Начальная скорость составляла 50 см³/час в течение первого часа. Если не наблюдали никакой токсичности, то скорость введения дозы увеличивали до максимальной 200 см³/час.

Токсичность (как указывал специалист) располагалась в диапазоне от "нет", до "лихорадки" и до "замедленной" (два пациента), до "серьезной" (один пациент); все пациенты завершили терапевтическое лечение. Лимфоциты периферической крови анализировали для определения воздействия C2B8 на Т-клетки и В-клетки. Последовательно у всех пациентов наблюдали истощение В-лимфоцитов периферической крови, причем после инфузии C2B8 это истощение поддерживалось в течение более двух недель.

Один пациент (получавший 100 мг/м² C2B8) проявил частичный ответ на лечение C2B8 (снижение более, чем на 50% суммы произведений перпендикулярных диаметров всех измеряемых индикатором поражений), продолжающийся более чем четыре недели, во время которых никакие новые поражения не появлялись, а ни одно из имеющихся поражений не увеличивалось. По крайней мере один пациент (получавший 500 мг/м²) обнаружил незначительный ответ на лечение C2B8 (снижение менее чем на 50%, но не менее 25% суммы произведений двух самых длинных перпендикулярных диаметров всех измеряемых индикатором поражений). Для демонстрации эффективности результаты PBLs представлены на рисунке 14; данные пациента, проявляющего PR, представлены на рисунке 14А; для пациента, проявляющего MR, данные приведены на рисунке 14В. На рисунке 14 указано:  = лимфоциты;  = CD3+ клетки (Т-клетки);  = CD20+ клетки;  = CD19+ клетки;  = каппа;  = лямбда; и  = C2B8. Очевидно, что маркеры В-клеток CD20 и CD19, каппа и лямбда, истощались в течение более чем двух недель. Причем имелось небольшое первоначальное снижение количества Т-клеток, которое вернулось к приблизительно исходному уровню за относительно короткий промежуток времени.

ii. Клиническое испытание C2B8 в фаз I/II; исследование терапии многократной дозой

Для этого исследования пригодны пациенты, имеющие гистологическое подтверждение лимфомы В-клеток с регистрацией прогрессирующей болезни. Исследование состоит из двух частей: в фазе I, включающей увеличение дозы для определения значения токсичности, ограничивающей дозу

и для определения биологически активного допустимого уровня дозы, три пациента будут получать еженедельно внутривенно инфузии C2B8 в общем количестве из четырех (4 отдельных инфузий). Суммарная доза на каждом из трех уровней будет следующей: 500 мг/м² (125 мг/м²/инфузии); 1000 мг/м² (250 мг/м²/инфузии); 1500 мг/м² (375 мг/м²/инфузии). Определяют биологически активную допустимую дозу и самую низкую дозу допустимой токсичности и адекватной активности). В фазе II дополнительные пациенты получают биологически активную допустимую дозу с акцентом на определение активности четырех доз C2B8.

iv. Комбинированная терапия: C2B8 и Y2B8

Способ комбинированной терапии с применением C2B8 и Y2B8 исследовали на ксенографической модели мыши (мыши nu/nu, самки, в возрасте приблизительно 10 недель) с использованием лимфобластической опухоли В-клеток (клетки опухоли Ramos). Для сравнения дополнительным мышам также вводили C2B8 и Y2B8.

Клетки опухоли Ramos (ATCC, CRL 1596) содержали в культуре, используя RPMI1640, дополненный 10% эмбриональной сывороткой жеребенка и глутамином при 37°C и в 5% CO₂. Опухоли инициировали в девяти самках голых мышей в возрасте около 7-10 недель путем подкожной инъекции 1,7 x 10⁶ клеток Ramos в объеме 0,10 мл (HBSS), используя шприц объемом 1 см³ с иглой массой 25 г. Животных содержали под колпаком в ламинарном потоке и во всех клетках изымали продукты жизнедеятельности и подавали пищу и воду. Клетки опухоли пассивировали после эксцизии опухоли и пропускания их через фильтр с 40 ячейками. Клетки промывали дважды с 1X HBSS (50 мл) центрифугированием (1300 об/мин), повторно суспендировали в 1X HBSS до 10 x 10⁶ клеток/мл, и замораживали до 70°C до использования.

Для эксперимента размораживали клетки от нескольких замороженных серий, осаждали центрифугированием (1300 об/мин) и промывали дважды 1X HBSS. Клетки затем повторно суспендировали до приблизительно 2,0 x 10⁶ клеток/мл. Приблизительно 9 - 12 мышей получали инъекцию 0,10 мл суспензии клеток с использованием шприца объемом 1 см³ с иглой весом 25 г. Инъекции производили приблизительно в среднюю области левого бока животного. Опухоли развивались приблизительно через две недели. Опухоли иссекали и обрабатывали как описано выше. Исследуемые мыши получали инъекции 1,67 x 10⁶ клеток в 0,10 мл HBSS как описано выше.

На основе предварительных экспериментов по дозированию определено, что 200 мг C2B8 и 100 мКи Y2B8 будут использовать для исследования. Девяносто самок мышей nu/nu (приблизительно 10-недельного возраста) получали инъекции клеток опухоли. Приблизительно десять дней спустя брали для исследования четыре группы из 24 мышей по шесть мышей в группе, причем поддерживали сравнимое распределение размера опухоли в каж-

дой группе (средний размер опухоли, выраженный как произведение длины на ширину опухоли, составлял приблизительно 80 мм²). Следующие группы получали инъекции как указано через хвостовую вену, используя шприц Гамильтона объемом 100 мкл с иглой весом 25 г:

- A. стандартный физиологический раствор
- B. Y2B8 (100 мКи)
- C. C2B8 (200 мкг); и
- D. Y2B8 (100 мКи) + C2B8 (200 мкг)

Группы, тестируемые на C2B8, получали вторую инъекцию C2B8 (200 мкг/мышь) спустя семь дней после начальной инъекции. Измерения опухоли проводили через каждые два или три дня, используя кавернометр.

Подготовка материалов для введения производили согласно следующим протоколам:

A. Подготовка Y2B8

Хлорид иттрия-[90] (6 мКи) помещали в полипропиленовую трубку и доводили pH до 4,1-4,4 с помощью не содержащего металла 2М ацетата натрия. Добавляли и осторожно перемешивали при встряхивании 2B8-MX-DTPA (0,3 мг в стандартном физиологическом растворе; см. выше для приготовления 2B8-MX-DTPA). После 15 минут инкубации реакцию гасили путем добавления 0,05 на объем 20 mM EDTA и 0,05 на объем 2М ацетата натрия. Концентрацию радиоактивности определяли путем растворения 5,0 мкл реакционной смеси в 2,5 мл 1 x PBS, содержащего 75 мг/мл HSA и 1 mM DTPA ("рецептурный буфер"). Подсчет выполняли, добавляя 10,0 мкл к 20 мл коктейля сцинтилляции Ecoluette. Остаток реакционной смеси добавляли к рецептурному буферу объемом 3,0 мл, стерильно фильтровали и сохраняли при 2-8°C до использования. Определяли удельную активность (14 мКи/мг на время инъекции) с использованием концентрации радиоактивности и рассчитанной концентрации белка, основанной на количестве антитела, добавляемого в реакционную смесь. Связанную с белком радиоактивность определяли, используя моментальную тонкослойную хроматографию. Включение радионуклидов составило 95%. Y2B8 разбавляли в рецепторном буфере непосредственно перед применением и стерильно фильтровали (окончательная концентрация радиоактивности составила 1,0 мКи/мл).

B. Приготовление C2B8

C2B8 приготавливали как описано выше. C2B8 получали в виде стерильного реагента в стандартном физиологическом растворе при 5,0 мг/мл. Перед инъекцией C2B8 разбавляли в стандартном физиологическом растворе до 2,0 мг/мл и стерильно фильтровали.

C. Результаты

После лечения размер опухоли представляли в виде произведения длины на ширину, а измерения проводили по дням, указанным на рисунке 11 (Y2B8 по сравнению с физиологическим раство-

ром) и рисунке 12 (C2B8 по сравнению с физиологическим раствором); и рисунке 13 (Y2B8 + C2B8 по сравнению с физиологическим раствором). Также определяли стандартную погрешность.

Как указано на рисунке 13, комбинация Y2B8 и C2B8 проявила эффекты уничтожения опухолевых клеток, сравнимые с эффектами, проявляемыми как Y2B8, так и C2B8.

V. Стратегии альтернативной терапии

С точки зрения предшествующих примеров очевидны стратегии альтернативной терапии. Одна из таких стратегий заключается в использовании терапевтической дозы C2B8, после чего в пределах приблизительно одной недели вводят комбинацию либо 2B8 и меченного радиоактивными изотопами 2B8 (например, Y2B8); или 2B8, C2B8 и, например Y2B8; или C2B8 и, например Y2B8. Дополнительная стратегия заключается в использовании меченных радиоактивными изотопами C2B8. Такая стратегия позволяет использовать преимущества иммунологически активного участка C2B8 и преимущества, связанные с радиоактивной меткой. Предпочтительные радиоактивные метки включают иттрий-90, имеющий больший период полураспада при циркуляции C2B8 по сравнению с мышинным антителом 2B8. Благодаря способности C2B8 истощать В-клетки, а также благодаря преимуществам использования радиоактивной метки, предпочтительная альтернативная стратегия заключается в введении пациенту однократных доз или многократных доз C2B8 для истощения большей части или всех, периферических В-клеток. Это потребовало бы применения меченного радиоактивными изотопами 2B8. В результате истощения В-клеток периферической крови меченное радиоактивными изотопами 2B8 обладает повышенной возможностью поражать клетки опухоли. Предпочтительно используют 2B8, меченное йодом [131]. В литературе имеются сообщения о результатах применения этой метки (см. Kaminski). Меченное радиоактивными изотопами 2B8 (или C2B8) также применяют вначале для увеличения проницаемости опухоли с последующим однократным или многократным введением C2B8. Цель этой стратегии заключается в увеличении возможности попадания C2B8 как в наружную, так и во внутреннюю массу опухоли. Дальнейшая стратегия включает применение химиотерапевтических агентов в комбинации с C2B8. Эти стратегии включают так называемое "поражающее" лечение химиотерапевтическим агентом с последующим введением C2B8, сопровождаемым повторением этого протокола. В качестве альтернативы возможно проведение начального лечения однократными или многократными дозами C2B8 и последующего химиотерапевтического лечения. Предпочтительные химиотерапевтические агенты включают (но не ограничены): циклофосфамид; доксорубин; винкристин; и преднизон, см. Armitage, J.O. et al., Cancer 50:1695 (1982), приведенные здесь в качестве ссылки.

Вышеописанные альтернативные стратегии терапии не ограничивают изобретение, а иллюстрируют его.

VI. Информация о депозитах

АНТИ-CD20 в ТСАЕ 8 (трансформированный в E. coli для депозита) был внесен в Американскую Коллекцию Культур Тканей (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, 20852, согласно Будапештскому договору о международном признании депонирования штаммов микроорганизмов для патентной процедуры ("Будапештский Договор"). Микроорганизм тестировали в ATCC 9 ноября 1992 года и определили его жизнеспособность на эту дату. ATCC присвоил этому микроорганизму следующий номер штамма ATCC: ATCC 69119 (анти-CD20 в ТСАЕ 8). Гибридом 2B8 регистрировали в ATCC 22 июня 1993 года согласно Будапештскому договору. Жизнеспособность культуры определили на 25 июня 1993 года, и зарегистрировали в ATCC эту гибридому под следующим номером ATCC: HB 11388.

G. ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

(1) ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

(i) Авторы: Anderman Darrell, Henna Nabil, Leonard John, Newman Roland и Mitchell Reff и William H. Rastetter

(ii) НАЗВАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ: СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ЛИМФОМЫ В-КЛЕТОК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ХИМЕРНЫХ И МЕЧЕННЫХ РАДИОАКТИВНЫХ АНТИТЕЛ В В-ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА С ОГРАНИЧЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЕЙ АНТИГЕНА

(iii) КОЛИЧЕСТВО ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ: 8

(iv) АДРЕС:

(A) АДРЕСАТ: Фармацевтическая Корпорация АЙДЕК

(B) УЛИЦА: 11011 Торреяна Роуд

(C) ГОРОД: Сан Диего

(D) ШТАТ: Калифорния

(E) СТРАНА: США

(F) ПОЧТОВЫЙ ИНДЕКС: 92121

(v) КОМПЬЮТЕРНАЯ ЧИТАЕМАЯ ФОРМА:

(A) ТИП НОСИТЕЛЯ: Дискета, 3.5 дюйм, 1.44

МБ

(B) КОМПЬЮТЕР: Макинтош

(C) ОПЕРАЦИОННАЯ СИСТЕМА: MS DOS

(D) ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ: Microsoft Word 5.0

(vi) ДАННЫЕ О НАСТОЯЩЕЙ ЗАЯВКЕ:

(A) НОМЕР ЗАЯВКИ:

(B) ДАТА ПОДАЧИ:

(C) КЛАССИФИКАЦИЯ:

(viii) ИНФОРМАЦИЯ О ПАТЕНТНОМ ПОВЕРЕННОМ/АГЕНТЕ:

(A) ИМЯ: Burgeon, Richard P. Jr.

(B) НОМЕР РЕГИСТРАЦИИ: 34,787

(C) НОМЕР ДЕЛА:

(ix) ТЕЛЕКОММУНИКАЦИОННАЯ ИНФОРМАЦИЯ:

(A) ТЕЛЕФОН: (619) 550-8500

(B) ТЕЛЕФАКС: (619) 550-8750

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID №1:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 8540 оснований

(B) ТИП: нуклеиновая кислота

(C) ЦЕПОЧКА: одиночная

(D) ТОПОЛОГИЯ: круговая

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: ДНК (геномная)

(iii) ГИПОТЕТИЧЕСКАЯ: да

(iv) АНТИ-СМЫСЛОВАЯ: нет

(ix) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID №1

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения лимфомы В-клеток, включающий этап введения человеку терапевтически эффективного количества по крайней мере одного иммунологически активного количества химерного антитела анти-CD20.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что количество указанного антитела вводимого указанному человеку, составляет приблизительно от 0,001 до 30 миллиграммов антитела на килограмм массы тела указанного человека (мг/кг).

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанное антитело получают из трансфектомы, включающей анти-CD20 в ТСАЕ 8, депонированную в Американской Коллекции Культур Тканей (ATCC) как часть номера 69119 депозита ATCC.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, включает этап введения второго терапевтически эффек-

тивного количества по крайней мере одного иммунологически активного химерного антитела анти-CD20.

5. Способ по п.4, отличающийся тем, что дополнительное введение указанного антитела человеку производят в пределах приблизительно семи дней после первого введения указанного антитела человеку.

6. Способ по п.1 отличающийся тем, что включает следующие этапы: введение человеку на первом периоде лечения первого терапевтически эффективного количества иммунологически активного химерного антитела анти-CD20,

введение на втором последующем периоде лечения второго терапевтически эффективного количества указанного антитела,

введение на третьем последующем периоде лечения третьего терапевтически эффективного количества указанного антителя.

7. Способ по п. 6, *отличающийся* тем, что указанное первое, второе и третье терапевтически эффективное количество указанного антителя составляет приблизительно от 0,001 до 30 мг/кг.

8. Способ по п.6, *отличающийся* тем, что второй период лечения находится в пределах приблизительно семи дней от первого периода лечения.

9. Способ по п.6, *отличающийся* тем, что третий период лечения находится в пределах приблизительно четырнадцати дней от первого периода лечения.

10. Способ по п.6, *отличающийся* тем, что антители получают из трансфектомы, включающей анти-CD20 в ТСАЕ 8 (в пределах номера 69119 депозита ATCC).

11. Иммунологически активное химерное антители анти-CD20, полученное из трансфектомы, включающей анти-CD20 в ТСАЕ 8 (в пределах номера 69119 депозита ATCC).

12. Гибридома, которая секретирует антители анти-CD20, идентифицирована в Американской Коллекции Культур Тканей (ATCC) под номером депозита HB 11388.

13. Антители по п.11, *отличающиеся* тем, что оно является моноклональным антителим, секретируемым гибридомой п.12.

14. Антители по п.13, *отличающиеся* тем, что является меченными радиоактивными изотопами.

15. Меченное радиоактивными изотопами антители по п.14, *отличающееся* тем, что радиоактивную метку выбирают из группы, включающей иттрий [90]; индий [111] и йод [131].

16. Способ по п.1, отличающийся тем, что включает этап введения человеку терапевтически эффективного количества антителя по п.14.

17. Способ по п.16, *отличающийся* тем, что радиоактивной меткой для указанного антителя является иттрий [90].

18. Способ по п.1, *отличающийся* тем, что включает следующие этапы:

введение человеку на первом периоде лечения иммунологически активного химерного антителя анти-CD20;

введение человеку на втором периоде лечения меченного радиоактивными изотопами антителя анти-CD20.

19. Способ по п.18, *отличающийся* тем, что указанное химерное анти-CD20 получают из трансфектомы, включающей анти-CD20 в ТСАЕ 8, депонированной в Американской Коллекции Культур Тканей (ATCC) как часть номера 69119 депозита ATCC.

20. Способ по п.8, *отличающийся* тем, что указанное меченное радиоактивными изотопами антители включает моноклональное антители, секретируемое гибридомой, идентифицированной в Американской Коллекции Культур Тканей (ATCC) под номером HB 11388.

GACGTGCGCG	CCGCTCTAGG	CCTCCAAAAA	AGCCTCCTCA	CTACTTCTGG	AATAGCTCAG	60
AGGCCGAGGC	GGCCTCGGCC	TCTGCATAAA	TAAAAAAAAT	TAGTCAGCCA	TGCATGGGGC	120
GGAGAATGGG	CGGAAC TGGG	CGGAGTTAGG	GGCGGGATGG	GCGGAGTTAG	GGGCGGGACT	180
ATGGTTGCTG	ACTAATTGAG	ATGCATGCTT	TGCATACTTC	TGCCTGCTGG	GGAGCCTGGG	240
GACTTTCCAC	ACCTGGTTGC	TGACTAATTG	AGATGCATGC	TTTGCATACT	TCTGCCTGCT	300
GGGGAGCCTG	GGGACTTTCC	ACACCCTAAC	TGACACACAT	TCCACAGAAT	TAATTCCGCT	360
AGTTATTAAT	AGTAATCAAT	TACGGGGTCA	TTAGTTCATA	GCCCATATAT	GGAGTTCCGC	420
GTTACATAAC	TTACGGTAAA	TGGCCCGCCT	GGCTGACCGC	CCAACGACCC	CCGCCCATTG	4
ACGTCAATAA	TGACGTATGT	TCCCATAGTA	ACGCCAATAG	GGACTTTCCA	TTGACGTCAA	5
TGGGTGGACT	ATTTACGGTA	AACTGCCCCAC	TTGGCAGTAC	ATCAAGTGTA	TCATATGCCA	600
ACTACGCCCC	CTATTGACGT	CAATGACGGT	AAATGGCCCCG	CCTGGCATTG	TGCCCAGTAC	660
ATGACCTTAT	GGGACTTTCC	TACTTGGCAG	TACATCTACG	TATTAGTCAT	CGCTATTACC	720
ATGGTGATGC	GGTTTTTGGCA	GTACATCAAT	GGGCGTGGAT	AGCGGTTTGA	CTCACGGGGA	780
TTTCCAAGTC	TCCACCCCAT	TGACGTCAAT	GGGAGTTTGT	TTTGGCACCA	AAATCAACGG	840
GACTTTCCAA	AATGTCGTAA	CAACTCCGCC	CCATTGACGC	AAATGGGCGG	TAGGCGTGTA	900
CGGTGGGAGG	TCTATATAAG	CAGAGCTGGG	TACGTGAACC	GTCAGATCGC	CTGGAGACGC	960
CATCACAGAT	CTCTCACCAT	GAGGGTCCCC	GCTCAGCTCC	TGGGGCTCCT	GCTGCTCTGG	1020
CTCCCAGGTG	CACGATGTGA	TGGTACCAAG	GTGGAAATCA	AACGTACGGT	GGCTGCACCA	1080
TCTGTCTTCA	TCTTCCCTCC	ATCTGATGAG	CAGTTGAAAT	CTGGAACTGC	CTCTGTTGTG	1140
TGCCTGCTGA	ATAACTTCTA	TCCCAGAGAG	GCCAAAGTAC	AGTGAAGGT	GGATAACGCC	1200
CTCCAATCGG	GTAAC TCCCA	GGAGAGTGTC	ACAGAGCAGG	ACAGCAAGGA	CAGCACCTAC	1260

AGCCTCAGCA	GCACCCTGAC	GCTGAGCAAA	GCAGACTACG	AGAAACACAA	AGTCTACGCC	1320
TGCGAAGTCA	CCCATCAGGG	CCTGAGCTCG	CCCGTCACAA	AGAGCTTCAA	CAGGGGAGAG	1380
TGTTGAATTC	AGATCCGTTA	ACGTTTACCA	ACTACCTAGA	CTGGATTTCGT	GACAACATGC	1440
GGCCGTGATA	TCTACGTATG	ATCAGCCTCG	ACTGTGCCTT	CTAGTTGCCA	GCCATCTGTT	1500
GTTTGCCCCCT	CCCCCGTGCC	TTCCTTGACC	CTGGAAGGTG	CCACTCCCAC	TGTCCTTTCC	1560
TAATAAAATG	AGGAAATTGC	ATCGCATTGT	CTGAGTAGGT	GTCAATCTAT	TCTGGGGGGT	1620
GGGGTGGGGC	AGGACAGCAA	GGGGGAGGAT	TGGGAAGACA	ATAGCAGGCA	TGCTGGGGAT	1680
GCGGTGGGCT	CTATGGAACC	AGCTGGGGCT	CGACAGCTAT	GCCAAGTACG	CCCCCTATTG	1740
ACGTCAATGA	CGGTAAATGG	CCCGCCTGGC	ATTATGCCCA	GTACATGACC	TTATGGGACT	1800
TTCCTACTTG	GCAGTACATC	TACGTATTAG	TCATCGCTAT	TACCATGGTG	ATGCGGTTTT	1860
GGCAGTACAT	CAATGGGCGT	GGATAGCGGT	TTGACTCACG	GGGATTTCCA	AGTCTCCACC	1920
CCATTGACGT	CAATGGGAGT	TTGTTTTGGC	ACCAAAATCA	ACGGGACTTT	CCAAAATGTC	1980
GTAACAACTC	CGCCCCATTG	ACGCAAAATG	GCGGTAGGCG	TGTACGGTGG	GAGGTCTATA	2040
TAAGCAGAGC	TGGGTACGTC	CTCACATTCA	GTGATCAGCA	CTGAACACAG	ACCCGTCCGAC	2100
ATGGGTTGGA	GCCTCATCTT	GCTCTTCCTT	GTGCTGTGTG	CTACGCGTGT	CGCTAGCACC	2160
AAGGGCCCAT	CGGTCTTCCC	CCTGGCACCC	TCCTCCAAGA	GCACCTCTGG	GGGCACAGCG	2220
GCCCTGGGCT	GCCTGGTCAA	GGACTACTTC	CCCGAACCGG	TGACGGTGTC	GTGGAAC TCA	2280
GGCGCCCTGA	CCAGCGGCGT	GCACACCTTC	CCGGCTGTCC	TACAGTCCTC	AGGACTCTAC	2340
TCCCTCAGCA	GCGTGGTGAC	CGTGCCCTCC	AGCAGCTTGG	GCACCCAGAC	CTACATCTGC	2400
AACGTGAATC	ACAAGCCCAG	CAACACCAAG	GTGGACAAGA	AAGCAGAGCC	CAAATCTTGT	2460
GACAAAACTC	ACACATGCCC	ACCGTGCCCA	GCACCTGAAC	TCCTGGGGGG	ACCGTCAGTC	2520
TTCCTCTTCC	CCCCAAAACC	CAAGGACACC	CTCATGATCT	CCCGGACCCC	TGAGGTCACA	2580
TGCGTGGTGG	TGGACGTGAG	CCACGAAGAC	CCTGAGGTCA	AGTTCAACTG	GTACGTGGAC	2640
GGCGTGGAGG	TGCATAATGC	CAAGACAAAG	CCGCGGGAGG	AGCAGTACAA	CAGCACGTAC	2700
CGTGTGGTCA	GCGTCCTCAC	CGTCCTGCAC	CAGGACTGGC	TGAATGGCAA	GGAGTACAAG	2760
TGCAAGGTCT	CCAACAAAGC	CCTCCCAGCC	CCCATCGAGA	AAACCATCTC	CAAAGCCAAA	2820
GGGCAGCCCC	GAGAACCACA	GGTGTACACC	CTGCCCCCAT	CCCGGGATGA	GCTGACCAAG	2880
AACCAGGTCA	GCCTGACCTG	CCTGGTCAAA	GGCTTCTATC	CCAGCGACAT	CGCCGTGGAG	2940
TGGGAGAGCA	ATGGGCAGCC	GGAGAACAAC	TACAAGACCA	CGCCTCCCGT	GCTGGACTCC	3000
GACGGCTCCT	TCTTCCTCTA	CAGCAAGCTC	ACCGTGGACA	AGAGCAGGTG	GCAGCAGGGG	3060
AACGTCTTCT	CATGCTCCGT	GATGCATGAG	GCTCTGCACA	ACCACTACAC	GCAGAAGAGC	3120
CTCTCCCTGT	CTCCGGGTAA	ATGAGGATCC	GTTAACGGTT	ACCAACTACC	TAGACTGGAT	3180

TCGTGACAAC	ATGCGGCCGT	GATATCTACG	TATGATCAGC	CTCGACTGTG	CCTTCTAGTT	3240
GCCAGCCATC	TGTTGTTTGC	CCCTCCCCCG	TGCCTTCCTT	GACCCTGGAA	GGTGCCACTC	3300
CCACTGTCCT	TTCCTAATAA	AATGAGGAAA	TTGCATCGCA	TTGTCTGAGT	AGGTGTCATT	3360
CTATTCTGGG	GGGTGGGGTG	GGGCAGGACA	GCAAGGGGGA	GGATTGGGAA	GACAATACCA	3420
GGCATGCTGG	GGATGCGGTG	GGCTCTATGG	AACCAGCTGG	GGCTCGACAG	CGCTGGATCT	3480
CCCGATCCCC	AGCTTTGCTT	CTCAATTTCT	TATTTGCATA	ATGAGAAAAA	AAGGAAAATT	3540
AATTTTAACA	CCAATTCAGT	AGTTGATTGA	GCAAATGCGT	TGCCAAAAAG	GATGCTTTAG	3600
AGACAGTGTT	CTCTGCACAG	ATAAGGACAA	ACATTATTCA	GAGGGAGTAC	CCAGAGCTGA	3660
GACTCCTAAG	CCAGTGAGTG	GCACAGCATT	CTAGGGAGAA	ATATGCTTGT	CATCACCAGG	3720
GCCTGATTCC	GTAGAGCCAC	ACCTTGGTAA	GGGCCAATCT	GCTCACACAG	GATAGAGAGG	3780
GCAGGAGCCA	GGGCAGAGCA	TATAAGGTGA	GGTAGGATCA	GTTGCTCCTC	ACATTTGCTT	3840
CTGACATAGT	TGTGTTGGGA	GCTTGGATAG	CTTGGACAGC	TCAGGGCTGC	GATTTTCGGC	3900
CAAACCTGAC	GGCAATCCTA	GCGTGAAGGC	TGGTAGGATT	TTATCCCCGC	TGCCATCATG	3960
GTTTCGACCAT	TGAACTGCAT	CGTCGCCGTG	TCCCCAAAATA	TGGGGATTGG	CAAGAACGGA	4020
GACCTACCCT	GGCCTCCGCT	CAGGAACGAG	TTCAAGTACT	TCCAAAGAAT	GACCACAACC	4080
TCTTCAGTGG	AAGGTAAACA	GAATCTGGTG	ATTATGGGTA	GGAAAACCTG	GTTCTCCATT	4140
CCTGAGAAGA	ATCGACCTTT	AAAGGACAGA	ATTAATATAG	TTCTCAGTAG	AGAACTCAAA	4200
GAACCACCAC	GAGGAGCTCA	TTTTCTTGCC	AAAAGTTTGG	ATGATGCCTT	AAGACTTATT	4260
GAACAACCGG	AATTGGCAAG	TAAAGTAGAC	ATGGTTTGGG	TAGTCGGAGG	CAGTTCTGTT	4320
TACCAGGAAG	CCATGAATCA	ACCAGGCCAC	CTTAGACTCT	TTGTGACAAG	GATCATGCAG	4380
GAATTTGAAA	GTGACACGTT	TTTCCAGAAA	ATTGATTTGG	GGAAATATAA	ACTTCTCCCA	4440
GAATACCCAG	GCGTCCTCTC	TGAGGTCCAG	GAGGAAAAAG	GCATCAAGTA	TAAGTTTGAA	4500
GTCTACGAGA	AGAAAGACTA	ACAGGAAGAT	GCTTTCAAGT	TCTCTGCTCC	CCTCCTAAAG	4560
CTATGCATTT	TTATAAGACC	ATGGGACTTT	TGCTGGCTTT	AGATCAGCCT	CGACTGTGCC	4620
TTCTAGTTGC	CAGCCATCTG	TTGTTTGCCC	CTCCCCCGTG	CCTTCCTTGA	CCCTGGAAGG	4680
TGCCACTCCC	ACTGTCCTTT	CCTAATAAAA	TGAGGAAATT	GCATCGCATT	GTCTGAGTAG	4740
GTGTCATTCT	ATTCTGGGGG	GTGGGGTGGG	GCAGGACAGC	AAGGGGGAGG	ATTGGGAAGA	4800
CAATAGCAGG	CATGCTGGGG	ATGCGGTGGC	CTCTATGGAA	CCAGCTGGGG	CTCGAGCTAC	4860
TAGCTTTGCT	TCTCAATTTT	TTATTTGCCA	AATGAGAAAA	AAAGGAAAAT	TAATTTTAAC	4920
ACCAATTCAG	TAGTTGATTG	AGCAAATGCG	TTGCCAAAAA	GGATGCTTTA	GAGACAGTGT	4980
TCTCTGCACA	GATAAGGACA	AACATTATTC	AGAGGGAGTA	CCCAGAGCTG	AGACTCCTAA	5040

GCCAGTGAGT	GGCACAGCAT	TCTAGGGAGA	AATATGCTTG	TCATCACCGA	AGCCTGATTC	5100
CCTAGAGCCA	CACCTTGGTA	AGGGCCAATC	TGCTCACACA	GGATAGAGAG	GGCAGGAGCC	5160
AGGGCAGAGC	ATATAAGGTG	AGGTAGGATC	AGTTGCTCCT	CACATTGCT	TCTGACATAG	5220
TTGTGTTGGG	AGCTTGGATC	GATCCTCTAT	GTTTGAACAA	GATGGATTGC	ACGCAGGTTT	5280
TCGGGCGGCT	TGGCTGCAGA	GGCTATTCGG	CTATGACTGG	GCACAACACA	CAATCGGCTG	5340
CTCTGATGCC	GCCGTGTTCC	GGCTGTCAGC	GCAGGGGCGC	CCGGTTCTTT	TTGTCAAGAC	5400
CGACCTGTCC	GGTGCCCTGA	ATGAACTGCA	GGACGAGGCA	GCSCGGCTAT	CGTGCGTGGC	5460
CACCACGGGC	GTTCCCTTGC	CAGCTGTGCT	CGACCTTGTC	ACTGAAGCGG	GAAGGGACTG	5520
GCTGCTATTG	GGCGAAGTGC	CGGGGCAGGA	TCTCTGTGCA	TCTCACCTTG	CTCCTGCCGA	5580
GAAAGTATCC	ATCATGGCTG	ATGCAATGCG	GCGGCTGCAT	ACGCTTGATC	CGGCTACCTG	5640
CCCATTGAC	CACCAAGCGA	AACATCGCAT	CGAGCGAGCA	CGTACTCGGA	TGGAAGCCCG	5700
TCTTGTGGAT	CAGGATGATC	TGGACGAAGA	GCATCAGGGG	CTCGCGCCAG	CCGAACCTTT	5760
CGCCAGGCTC	AAGGGCGCGA	TGCCCGACCG	CGAGGATCTC	GTCGTGACCC	ATGGCGATGC	5820
CTGCTTGCCG	AATATCATGG	TGGAAAATGG	CCGCTTTTCT	GGATTGATCG	ACTGTGGCCG	5880
GCTGGGTGTG	CGCGACCCCT	ATCAGGACAT	AGCCTTGCTT	ACCCGTGATA	TTGCTGAAGA	5940
GCTTGGCGGC	GAATGGGCTG	ACCGCTTCCT	CGTGCTTTAC	GGTATCGCCG	CTCCCGATTC	6000
GCAGCGCATC	GCCTTCTATC	GCCTTCTTGA	CGAGTTCTTC	TGAGCGGGAC	TCTGGGGTTC	6060
GAAATGACCG	ACCAAGCGAC	GCCCAACCTG	CCATCAGGAG	ATTTGATTC	CACCGCCGCC	6120
TTCTATGAAA	GTTTGGGCTT	CGGAATCGTT	TTCCGGGACG	CCGGCTGGAT	GATCCTCCAG	6180
CGCGGGGATC	TCATGCTGGA	GTCTCTCCCG	CACCCCAACT	TGTTTATTGC	AGCTTATAAT	6240
GTTTACAAAT	AAAGCAATAG	CATCACAAT	TTCAACAATA	AAGCATTTTT	TTCACTGCAT	6300
TCTAGTTGTG	GTTTGTCCAA	ACTCATCAAT	CTATCTTATC	ATGCTCTGGAT	CGCGGCCGCG	6360
ATCCCGTCCA	GAGCTTGGCG	TAATCATGGT	CATAGCTGTT	TCCTGTGTGA	AATTGTTATC	6420
CGCTCACAAAT	TCCACACAAC	ATACGAGCCG	GAAGCATAAA	GTGTAAAGCC	TGGGGTGCCT	6480
AATGAGTGAG	CTAACTCACA	TTAATTGCGT	TGCGCTCACT	GCCCGCTTTC	CAGTCGGGAA	6540
ACCTGTCTGT	CCAGCTGCAT	TAATGAATCG	GCCCAACCGC	GGGAGAGGCC	GGTTTGCGTA	6600
TTGGCGGCTC	TTCCGCTTCC	TCGCTCACTG	ACTCGCTGCG	CTCGGTCTTT	CGGCTGCGGC	6660
GAGCCCTATC	AGCTCACTCA	AAGGCGGTAA	TACGGTTATC	CACAGAATCA	GGGGATAACG	6720
CAGGAAAGAA	CATGTGAGGA	AAAGGCCAGC	AAAAGGCCAG	GAACCGTAAA	AAGGCCCGCT	6780
TGCTGGCGTT	TTTCCATAGG	CTCCGCCCCC	CTGACGAGCA	TCACAAAAAT	CGACGCTCAA	6840
CTCAGAGCTG	GCGAAACCCG	ACAGGACTAT	AAAGATACCA	GGCGTTTCCC	CCTGGAAGCT	6900
CCCTCGTGCG	CTCTCTGTGT	CCGACCCTGC	CGCTTACCGG	ATACCTGTCC	GCCTTTCTCC	6960

CTTCGGGAAG CTTGCCGCTT TCTCAATGCT CACGCTGTAG GTATCTCAGT TCGGTGTAGG	7020
TCGTTGCGTC CAAGCTGGGC TGTGTGCACG AACCCCCCGT TCAGCCCGAC CGCTGCGCCT	7080
TATCCCGTAA CTATCGTCTT GAGTCCAACC CGGTAAGACA CGACTTATCG CCACTGGCAG	7140
CAGCCACTGG TAACAGGATT AGCAGAGCGA GGTATGTAGG CGGTGCTACA GAGTTCTTGA	7200
AGTGGTGGCC TAACTACGCC TACACTAGAA GCACAGTATT TGGTATCTGC GCTCTGCTGA	7260
AGCCAGTTAC CTTCGGAAAA AGAGTTGGTA GCTCTTGATC CGGCAACAA ACCACCGCTG	7320
GTAGCGGTGG TTTTTTTGTT TGCAAGCAGC AGATTACGCG CAGAAAAAA GGATCTCAAG	7380
AAGATCCTTT GATCTTTTCT ACGGGGTCTG ACGCTCAGTG GAACGAAAAC TCACGTTAAG	7440
GGATTTTGGT CATGAGATTA TCAAAAAGGA TCTTCACCTA GATCCTTTTA AATTAAAAAT	7500
GAAGTTTTAA ATCAATCTAA AGTATATATG AGTAAACTTG GTCTGACAGT TACCAATGCT	7560
TAATCAGTGA GGCACCTATC TCAGCGATCT GTCTATTTTCG TTCATCCATA GTTGCCCTGAC	7620
TCCCGCTCGT GTAGATAACT ACGATACGGG AGGGCTTACC ATCTGGCCCC AGTGCTGCAA	7680
TGATACCGCG AGACCCACGC TCACCGGCTC CAGATTTATC AGCAATAAAC CAGCCAGCCG	7740
GAAGGCCCCA GCGCAGAAGT GGTCCCTGCA CTTTATCCGC CTCCATCCAG TCTATTAAAT	7800
GTGCGCGGGA AGCTAGAGTA AGTAGTTCCG CAGTTAATAG TTTGCGCAAC GTTGTGCCA	7860
TTGCTACAGG CATCGTGGTG TCACGCTCGT CGTTTGGTAT GGCTTCATTC AGCTCCGGTT	7920
CCCAACGATC AAGGCGAGTT ACATGATCCC CCATGTTGTG CAAAAAAGCG GTTAGCTCCT	7980
TCGCTCCTCC GATCGTTGTC AGAAGTAACT TGGCGCGAGT GTTATCACTC ATGGTTATCG	8040
CAGCACTGCA TAATTCTCTT ACTGTCATGC CATCCGTAAG ATGCTTTTCT GTGACTGGTG	8100
AGTACTCAAC CAAGTCATTC TGAGAATAGT GTATGCGGCG ACCGAGTTGC TCTTGCCCCG	8160
CGTCAATACG GATTAATACC GCCCCACATA GCAGAACTTT AAAAGTGCTC ATCATTCGAA	8220
AACGTTCTTC GCGCGGAAAA CTCTCAAGGA TCTTACCGCT GTTGAGATCC AGTTCCGATG	8280
AACCCACTCG TCCACCCAAC TGATCTTCAG CATCTTTTAC TTTCACGAGC GTTTCTGGGT	8340
GAGCAAAAAC AGGAAGGCAA AATGCCGCAA AAAAGGGAAT AAGGGCGACA CGGAAATGTT	8400
GAATACTCAT ACTCTTCCTT TTTCAAATAT ATTGAAGCAT TTATCAGGGT TATTGTCTCA	8460
TGAGCGGATA CATATTTGAA TGTATTTAGA AAAATAAACA AATAGGGGTT CCGCGCACAT	8520
TTCCCCGAAA AGTGCCACCT	8540

(3) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID № 2:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 9209 оснований

(B) ТИП: нуклеиновая кислота

(C) ЦЕПОЧКА: одиночная

(C) ТОПОЛОГИЯ: круговая

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: ДНК (геномная)

(iii) ГИПОТЕТИЧЕСКАЯ: да

(iv) АНТИ-СМЫСЛОВАЯ: нет

(ix) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID №2

GACGTCGCGG	CCGCTCTAGG	CCTCCAAAAA	AGCCTCCTCA	CTACTTCTGG	AATAGCTCAG	60
AGGCCGAGGC	GGCCTCGGCC	TCTGCATAAA	TAAAAAAAAT	TAGTCAGCCA	TGCATGGGGC	120
GGAGAATGGG	CGGAAC TGGG	CGGAGTTAGG	GGCGGGATGG	GCGGAGTTAG	GGGCGGGACT	180
ATGGTTGCTG	ACTAATTGAG	ATGCATGCTT	TGCATACTTC	TGCCTGCTGG	GGAGCCTGGG	240
GACTTTCCAC	ACCTGGTTGC	TGACTAATTG	AGATGCATGC	TTTGCATACT	TCTGCCTGCT	300
GGGGAGCCTG	GGGACTTTCC	ACACCCTAAC	TGACACACAT	TCCACAGAAT	TAATTCCCCT	360
AGTTATTAAT	AGTAATCAAT	TACGGGGTCA	TTAGTTCATA	GCCCATATAT	GGAGTTCCGC	420
GTTACATAAC	TTACGGTAAA	TGGCCCGCCT	GGCTGACCGC	CCAACGACCC	CCGCCCATTG	480
ACGTCAATAA	TGACGTATGT	TCCCATAGTA	ACGCCAATAG	GGACTTTCCA	TTGACGTCAA	540
TGGGTGGACT	ATTTACGGTA	AACTGCCCAC	TTGGCAGTAC	ATCAAGTGTA	TCATATGCCA	600
AGTACGCCCC	CTATTGACGT	CAATGACGGT	AAATGGCCCG	CCTGGCATTG	TGCCCAGTAC	660
ATGACCTTAT	GGGACTTTCC	TACTTGGCAG	TACATCTACG	TATTAGTCAT	CGCTATTACC	720
ATGGTGATGC	GGTTTTGGCA	GTACATCAAT	GGGCGTGGAT	AGCGGTTTGA	CTCACGGGGA	780
TTTCCAAGTC	TCCACCCCAT	TGACGTCAAT	GGGAGTTTGT	TTTGGCACCA	AAATCAACGG	840
GACTTTCCAA	AATGTCGTAA	CAACTCCGCC	CCATTGACGC	AAATGGGCGG	TAGGCGTGTA	900
CGGTGGGAGG	TCTATATAAG	CAGAGCTGGG	TACGTGAACC	GTCAGATCGC	CTGGAGACGC	960
CATCACAGAT	CTCTCACTAT	GGATTTTCAG	GTGCAGATTA	TCAGCTTCCT	GCTAATCAGT	1020
GCTTCAGTCA	TAATGTCCAG	AGGACAAATT	GTTCTCTCCC	AGTCTCCAGC	AATCCTGTCT	1080
GCATCTCCAG	GGGAGAAGGT	CACAATGACT	TGCAGGGCCA	GCTCAAGTGT	AAGTTACATC	1140
CACTGGTTCC	AGCAGAAGCC	AGGATCCTCC	CCCAAACCCT	GGATTTATGC	CACATCCAAC	1200
CTGGCTTCTG	GAGTCCCTGT	TCGCTTCAGT	GGCAGTGGGT	CTGGGACTTC	TTACTCTCTC	1260
ACAATCAGCA	GAGTGGAGGC	TGAAGATGCT	GCCACTTATT	ACTGCCAGCA	GTGGACTAGT	1320
AACCCACCCA	CGTTCGGAGG	GGGGACCAAG	CTGGAAATCA	AACGTACGGT	GGCTGCACCA	1380
TCTGTCTTCA	TCTTCCCGCC	ATCTGATGAG	CAGTTGAAAT	CTGGAAGTGC	CTCTGTTGTG	1440

TGCCTGCTGA ATAACTTCTA TCCCAGAGAG GCCAAAGTAC AGTGGAAGGT GGATAACGCC	1500
CTCCAATCGG GTAACCTCCA GGAGAGTGTC ACAGAGCAGG ACAGCAAGGA CAGCACCTAC	1560
AGCCTCAGCA GCACCCTGAC GCTGAGCAAA GCAGACTACG AGAAACACAA AGTCTACGCC	1620
TGCGAAGTCA CCCATCAGGG CCTGAGCTCG CCCGTCACAA AGAGCTTCAA CAGGGGAGAG	1680
TGTTGAAATC AGATCCCTTA ACGGTTACCA ACTACCTAGA CTGGATTCTG GACAACATCC	1740
GGCCGTGATA TCTACGTATG ATCAGCCTCG ACTGTGCCTT CTAGTTGCCA GCCATCTGTT	1800
GTTTGCCCCC CCCCCGTGCC TTCCTTGACC CTGGAAGGTG CCACTCCAC TGTCTTTCC	1860
TAATAAAATG AGGAAATTGC ATCGCATTGT CTGAGTAGGT GTCATTCTAT TCTGGGGGGT	1920
GGGGTGGGGC AGGACAGCAA GGGGAGGAT TGGGAAGACA ATAGCAGGCA TGCTGGGGAT	1980
GCGGTGGGCT CTATGGAACC AGCTGGGGCT CGACAGCTAT GCCAAGTACG CCCCCTATTG	2040
ACGTCAATGA CGGTAAATGG CCCGCCTGGC ATTATGCCCA GTACATGACC TTATGGGACT	2100
TTCTACTTGG GCAGTACATC TACGTATTAG TCATCGCTAT TACCATGGTG ATGCGGTTTT	2160
GGCAGTACAT CAATGGGCGT GGATAGCGGT TTGACTCAGG GGGATTTCOA AGTCTCCACC	2220
CCATTGACGT CAATGGGAGT TTGTTTTGGC ACCAAAATCA ACGGGACTTT CCAAAATGTC	2280
GTAACAACTC CGCCCCATTG ACGCAAATGG GCGGTAGGCG TGTACGGTGG GAGGTCTATA	2340
TAAGCAGAGC TGGGTACGTC CTCACATTCA GTGATCAGCA CTGAACACAG ACCCGTCGAC	2400
ATGGGTTGGA GCCTCATCTT GCTCTTCCTT GTCGCTGTTG CTACGCGTGT CCTGTCCCAG	2460
GTACAACCTG AGCAGCCTGG GGCTGAGCTG GTGAAGCCTG GGGCCTCAGT GAAGATGTCC	2520
TGCAAGGCTT CTGGCTACAC ATTTACCAGT TACAATATGC ACTGGGTAAA ACAGACACCT	2580
GGTCGGGGCC TGGAATGGAT TGGAGCTATT TATCCCGGAA ATGGTGATAC TTCCTACAAT	2640
CAGAAGTTCA AAGGCAAGGC CACATTGACT GCAGACAAAT CCTCCAGCAC AGCCTACATG	2700
CAGCTCAGCA GCCTGACATC TGAGGACTCT GCGGTCTATT ACTGTGCAAG ATCGACTTAC	2760
TACGGCGGTG ACTGGTACTT CAATGTCTGG GCGCAGGGA CCACGGTCAC CGTCTCTGCA	2820
GCTAGCACCA AGGGCCCATC GGTCTTCCCC CTGGCACCTT CCTCCAAGAG CACCTCTGGG	2880
GGCACAGCGG CCTTGGGCTG CCTGGTCAAG GACTACTTCC CCGAACCGGT GACGGTGTCC	2940
TGGAACCTCAG GCGCCCTGAC CAGCGGCGTG CACACCTTCC CGGCTGTCTT ACAGTCTCTA	3000
GGACTCTACT CCCTCAGCAG CGTGGTGACC GTGCCCTCCA GCAGCTTGGG CACCCAGACC	3060
TACATCTGCA ACGTGAATCA CAAGCCCAGC AACACCAAGG TGGACAAGAA AGCAGAGCCC	3120
AAATCTTGTT AAAAACTCA CACATGCCCA CCGTGCCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA	3180
CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT	3240
GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC CTGAGGTCAA GTTCAACTGG	3300
TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC	3360

AGCACGTACC	GTGTGGTCAG	CGTCCTCACC	GTCCCTGCACC	AGGACTGGCT	GAATGGCAAG	3420
GAGTACAACT	GCAAGGTCTC	CAACAAAGCC	CTCCGAGCCC	CCATCGAGAA	AACCATCTCC	3480
AAAGCCAAAG	GGCAGCCCCG	AGAACCACAG	GTGTACACCC	TGCCCCCATC	CCGGGATGAG	3540
CTGACCAAGA	ACCAGGTTCAG	CCTGACCTGC	CTGGTCAAAG	GCTTCTATCC	CAGCGACATC	3600
GGCGTGGAGT	GGCAGAGCAA	TGGGCAGCCG	GAGAACAAC	ACAAGACCAC	GCCTCCCGTG	3660
CTGGACTCCG	ACGGCTCCTT	CTTCCTCTAC	AGCAAGCTCA	CCGTGGACAA	GAGCAGGTGG	3720
CAGCAGGGGA	ACGTCTTCTC	ATGCTCCGTG	ATGCATGAGG	CTCTGCACAA	CCACTACACG	3780
CAGAAGAGCC	TCTCCCTGTC	TCCGGCTAAA	TGAGGATCCG	TTAACGGTTA	CCAACCTACCT	3840
AGACTGGATT	CGTGACAACA	TGGGGCCGTG	ATATCTACGT	ATGATCAGCC	TGGACTGTGC	3900
CTTCTAGTTG	CCAGCCATCT	GTTGTTTGCC	CCCTCCCCGT	GCCTTCCTTG	ACCCTGGAAG	3960
GTGCCACTCC	CACGTCTCCT	TCCTAATAAA	ATGAGGAAAT	TGCATCGCAT	TGTCTGAGTA	4020
GGTGTCAATC	TATTCTGGCG	GCTGGGGTGG	GGCAGGACAG	CAAGGGGGAG	GATTGGGAAG	4080
ACAAATAGCAG	GCATGCTGGG	GATGCGGTGG	GCTCTATGCA	ACCAGCTGGG	GCTCGACAGC	4140
GCTGGATCTC	CCGATCCCCA	GCTTTTGCTC	TCAATTTCTT	ATTTGCATAA	TGAGAAAAAA	4200
AGGAAAATTA	ATTTTAACAC	CAATTCAGTA	GTTGATTGAG	CAAATGCGTT	GCCAAAAAGG	4260
ATGCTTTAGA	GACAGTGTTC	TCTGCACAGA	TAAGGACAAA	CATTATTCAG	AGGGAGTACC	4320
CAGAGCTGAG	ACTCCTAAGC	CAGTGAGTGG	CACAGCATTC	TAGGGAGAAA	TATGCTTGTC	4380
ATCACCGAAG	CCTGATTCCC	TAGAGCCACA	CCTTGGTAAAG	GGCCAACTCT	CTCAGACAGG	4440
ATAGAGAGGG	CAGGAGCCAG	GGCAGAGCAT	ATAAGGTGAG	GTAGGATCAG	TTGCTCCTCA	4500
CATTTGCTTC	TGACATAGTT	GTGTTGGGAG	CTTGCATAGC	TTGGACAGCT	CAGGGCTGCC	4560
ATTTCTCGCC	AACTTGACG	GCAATCCTAG	CSTGAAGCCT	GGTAGGATTT	TATCCCCGCT	4620
GCCATCATGG	TTGGACCATT	GAACTGCATC	GTGGCCGTGT	CCCCAAATAT	GGGGATTGGC	4680
AAGAACGGAG	ACCTACCCTG	GCCTCCGCTC	AGGAACGAGT	TCAAGTACTT	CCAAAGAATG	4740
ACCACAACCT	CTTCAGTGGG	AGGTAAACAG	AATCTGGTGA	TTATGGGTAG	GAAAACCTGG	4800
TTCTCCATTC	CTGAGAAGAA	TCGACCTTTA	AAGGACAGAA	TTAATATAGT	TCTCAGTAGA	4860
GAACTCAAAG	AACCACCACG	AGGAGCTCAT	TTTCTTGCCA	AAAGTTTGGG	TGATGCCTTA	4920
AGACTTATTG	AACAACCGGA	ATTGGCAAGT	AAAGTAGACA	TGGTTTGGAT	AGTCGGAGGC	4980
AGTTCTGTTT	ACCAGGAAGC	CATGAATCAA	CCAGGCCACC	TTAGACTCTT	TGTGACAAGG	5040
ATCATGCAGG	AATTTGAAAG	TGACACGTTT	TTCCGAGAAA	TTGATTTGGG	GAAATATAAA	5100
CTTCTCCCAG	AATACCCAGG	CGTCCTCTCT	GAGGTCCAGG	ACGAAAAAGG	CATCAAGTAT	5160
AAGTTTGAAG	TCTACGAGAA	GAAAGACTAA	CAGGAAGATG	CTTTCAGTTT	CTCTGCTCCC	5220

CTCCTAAAGC	TATGCATTTT	TATAAGACCA	TGGGACTTTT	GCTGGCTTTA	GATCAGCCTC	5280
GACTGTGCCT	TCTAGTTGCC	AGCCATCTGT	TGTTTGCCCC	TCCCCCGTGC	CTTCCTTGAC	5340
CCTGGAAGGT	GCCACTCCCA	CTGTCCCTTC	CTAATAAAAT	GAGGAAATTG	CATCGCATTG	5400
TCTGAGTAGG	TGTCATTCTA	TTCTGGGGGG	TGGGGTGGGG	CAGGACAGCA	AGGGGGAGGA	5460
TTGGGAAGAC	AATAGCAAGC	ATGCTGGGJA	TGCGGTGGGC	TCTATGGAAC	CAGCTGGGGC	5520
TCGAGCTACT	AGCTTTGCTT	CTCAATTTCT	TATTTGCATA	ATGAGAAAAA	AAGGAAAAAT	5580
AATTTTAACA	CCAATTCAGT	AGTTGATTGA	GCAAATGCGT	TGCCAAAAAG	GATGCTTTAG	5640
AGACAGTGT	CTCTGCACAG	ATAAGGACAA	ACATTATTCA	GAGGGAGTAC	CCAGAGCTGA	5700
GACTCCTAAG	CCAGTGAGTG	GCACAGCATT	CTAGGGAGAA	ATATGCTTGT	CATCACCGAA	5760
GCCTGATTCC	GTAGAGCCAC	ACCTTGGTAA	GGGCCAATCT	GCTCACACAG	GATAGAGAGG	5820
GCAGGAGCCA	GGGCAGAGCA	TATAAGGTGA	GGTAGGATCA	GTTGCTCCTC	ACATTTGCTT	5880
CTGACATAGT	TGTGTTGGGA	GCTTGGATCG	ATCCTCTATG	GTTGAACAAG	ATGGATTGCA	5940
CGCAGGTTCT	CCGGCCGCTT	GGGTGGAGAG	GCTATTCGGC	TATGACTGGG	CACAACAGAC	6000
AATCGGCTGC	TCTGATGCCG	CCGTGTTCCG	GCTGTCAGCG	CAGGGGCGCC	CGGTTCTTTT	6060
TGTCAAGACC	GACCTGTCCG	GTGCCCTGAA	TGAACTGCAG	GACGAGGCAG	CGCGGCTATC	6120
GTGGCTGGCC	ACGACGGGCG	TTCCTTGCGC	AGCTGTGCTC	GACGTTGTCA	CTGAAGCGGG	6180
AAGGGACTGG	CTGCTATTGG	GCGAAGTGCC	GGGGCAGGAT	CTCCTGTCAT	CTCACCTTGC	6240
TCCTGCCGAG	AAAGTATCCA	TCATGGCTGA	TGCAATGCGG	CGGCTGCATA	CGCTTGATCC	6300
GGCTACCTGC	CCATTCGACC	ACCAAGCGAA	ACATCGCATC	GAGCGAGCAC	GTACTCGGAT	6360
GGAAGCCGGT	CTTGTCGATC	AGGATGATCT	GGACGAAGAG	CATCAGGGGC	TCGCGCCAGC	6420
CGAACTGTTT	GCCAGGCTCA	AGGCGCGCAT	GCCCCACGGC	GAGGATCTCG	TCGTGACCCA	6480
TGGCGATGCC	TGCTTGCCGA	ATATCATGGT	GGAAATGGC	CGCTTTTCTG	GATTCATCGA	6540
CTGTGGCCGG	CTGGGTGTGG	CGGACCGCTA	TCAGGACATA	GCGTTGGCTA	CCCSTGATAT	6600
TGCTGAAGAG	CTTGGCGGGC	AATGGGCTGA	CCGCTTCCTC	GTGCTTTACG	GTATCGCCGC	6660
TCCCGATTCT	CAGCGCATCG	CCTTCTATCG	CCTTCTTGAC	GAGTTCTTCT	GAGCGGGACT	6720
CTGGGGTTCT	AAATGACCGA	CCAAGCGACG	CCCAACCTGC	CATCACGAGA	TTTCGATTCC	6780
ACCGCCGCCCT	TCTATGAAAG	GTTGGGCTTC	GGAATCGTTT	TCCGGGACGC	CGGCTGGATG	6840
ATCCTCCAGC	GCGGGGATCT	CATGCTGGAG	TTCTTCGCCC	ACCCCAACTT	GTTTATTGCA	6900
GCTTATAATG	GTTACAAATA	AAGCAATAGC	ATCACAAATT	TCACAAATAA	AGCATTTTTT	6960
TCACTGCATT	CTAGTTGTGG	TTTGTCCAAA	CTCATCAATC	TATCTTATCA	TGTCTGGATC	7020
GCGGCGCGCA	TCCCGTCGAG	AGCTTGGCGT	AATCATGGTC	ATAGCTGTTT	CCTGTGTGAA	7080
ATTGTTATCC	GCTCACAATT	CCACACAACA	TACGAGCCGG	AAGCATAAAG	TGTAAAGCCT	7140

GGGGTGCCCTA ATGAGTGAGC TAACTCACAT TAATTGCCGT	GCGCTCACTG CCGGCTTTCC	7200
AGTCGGGAAA CCTGTCGTGC CAGCTGCATT AATGAATCGG	CCAACGCGCG GGGAGAGGCG	7260
GTTTCGGTAT TCGCGGCTCT TCGGCTTCTT CGCTCACTGA	CTCGCTGCGC TCGGTCGTTC	7320
GGCTGCGGCG AGCGGTATCA GCTCACTCAA AGGCGGTAAT	ACGGTTATCC ACAGAATCAG	7380
GGGATACCGC AGGAAAGAAC ATGTGAGCAA AAGGCCAGCA	AAAGGCCAGG AACCGTAAAA	7440
AGGCGCGGTT GCTGGCGTTT TTCCATAGGC TCGCGCGCGC	TCACCGAGCAT CACAAAAATC	7500
GACGCTCAAG TCAGAGGTGG CGAAACCCGA CAGGACTATA	AAGATACCAG CGGTTTCCCC	7560
CTGGAAGCTC CCTCGTGCGC TCTCCTGTTT CGACCGTGCC	GCTTACCGGA TACCTGTCCG	7620
CCTTTCTCCC TTCGGGAAGC GTGGCGGTTT CTCAATGCTC	ACGCTGTAGG TATCTCAGTT	7680
CGGTGTAGGT CGTTCGCTCC AAGCTGGGCT GTGTGCACGA	ACCGCGCGTT CAGCCCCGAC	7740
GCTGCGCCTT ATCCGGTAAC TATCGTCTTG AGTCCAACCC	GGTAAGACAC GACTTATCGC	7800
CACGCGCAGC AGCCACTGGT AACAGGATTA GCAGAGCGAG	GTATGTAGGC GGTGCTACAG	7860
AGTTCTTGAA GTGGTGGCCT AACTACGGCT AACTAGAAG	GACAGTATTT GGTATCTGCG	7920
CTCTGCTGAA GCCAGTTACC TTCGGAAAAA GAGTTCGTAG	CTCTTGATCC GCCAAACAAA	7980
CCACCGCTGG TAGCGGTGGT TTTTTCGTTT GCAAGCAGCA	GATTACGCGC AGAAAAAAG	8040
GATCTCAAGA AGATCCTTTG ATCTTTTCTA CCGGCTCTGA	CGCTCAGTGG AACGAAAACT	8100
CACGTTAAGG GATTTTGGTC ATGAGATTAT CAAAAGGAT	CTTCACCTAG ATCCTTTTAA	8160
ATTAAAAATG AAGTTTAAA TCAATCTAAA GTATATATGA	GTAACCTGG TCTGACAGTT	8220
ACCAATGCTT AATCAGTGAG GCACCTATCT CAGCGATCTG	TCTATTTCTG TCATCCATAG	8280
TTGCGTGACT CCGCGTCCTG TAGATAACTA CGATACCGGA	GGGCTTACCA TCTGCCCCCA	8340
GTGCTGCAAT GATACCGCGA GACCCACGCT CACCGGCTCC	AGATTTATCA GCAATAAACG	8400
AGCCAGCCGG AAGGGCCGAG CGCAGAAGTG GTCCTGCAAC	TTTATCGGCG TCCATCCAGT	8460
CTATTAAATG TTGCGGGGAA GCTAGAGTAA GTAGTTGCGC	AGTTAATAGT TTGCGCAACG	8520
TGGTTGCCAT TGCTACAGGC ATCGTGGTGT CACGCTCGTC	GTTTGGTATG GCTTCATTCA	8580
GCTCGGTTT CCAACGATCA AGGCGAGTTA CATGATCCCC	CATGTTGTGC AAAAAAGCGG	8640
TTAGCTCCTT CGGTCCTCCG ATCGTTGTCA GAAGTAAGTT	GGCCGCAGTG TTATCACTCA	8700
TGGTTATGGC AGCACTGCAT AATTCTCTTA CTGTCAATGCC	ATCCGTAAGA TGCTTTTCTG	8760
TGACTGGTGA GTACTCAACC AAGTCATTCT GAGAATAGTG	TATGCGGCGA CCGAGTTGCT	8820
CTTGCCCGCG GTCAATACCG GATAATACCG CGCCACATAG	CAGAACTTTA AAAGTGCTCA	8880
TCATTGGAAA ACGTTCTTCC GGGCGAAAAA TCTCAAGGAT	CTTACCGCTG TTGAGATCCA	8940
GTTCGATGTA ACCCACTCGT GCACCCAACT GATCTTCAGC	ATCTTTTACT TTCACCGCGC	9000

TTTCTGGGTG AGCAAAAAACA GGAAGGCAAA ATGCCGCAAA AAAGGGAATA AGGGCGACAC	9060
GGAAATGTTG AATACTCATA CTCTTCCTTT TTCAATATTA TTGAAGCATT TATCAGGGTT	9120
ATTGTCTCAT GAGCGGATAC ATATTTGAAT GTATTTAGAA AAATAAACAA ATAGGGGTTC	9180
CGCGCACATT TCCCCGAAAA GTGCCACCT	9209

(4) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID № 3:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 54 оснований

(B) ТИП: нуклеиновая кислота

(C) ЦЕПОЧКА: одиночная

(C) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: ДНК (геномная)

(iii) ГИПОТЕТИЧЕСКАЯ: да

(iv) АНТИ-СМЫСЛОВАЯ: нет

(ix) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID №3

5' ATC ACA GAT CTC TCA CCA TGG ATT TTC AGG TBC AGA TTA TCA GCT 52 TC 3' 2

(5) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID № 4:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 30 оснований

(B) ТИП: нуклеиновая кислота

(C) ЦЕПОЧКА: одиночная

(C) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: ДНК (геномная)

(iii) ГИПОТЕТИЧЕСКАЯ: да

(iv) АНТИ-СМЫСЛОВАЯ: да

(ix) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID №4

5'' TGC AGC ATC CGT ACG TTT GAT TTC CAG CTT 3' 30

(6) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID № 5:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 384 оснований

(B) ТИП: нуклеиновая кислота

(C) ЦЕПОЧКА: одиночная

(C) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: ДНК (геномная)

(iii) ГИПОТЕТИЧЕСКАЯ: да

(iv) АНТИ-СМЫСЛОВАЯ: нет

(ix) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID №5

ATG GAT TTT CAG GTG CAG ATT ATC AGC TTC CTG CTA ATC AGT GCT TCA GTC	51
ATA ATG TCC AGA GGG CAA ATT GTT CTC TCC CAG TCT CCA GCA ATC CTG TCT	102
GCA TCT CCA GGG GAG AAG GTC ACA ATG ACT TGC AGG GCC AGC TCA AGT GTA	153
AGT TAC ATC CAC TGG TTC CAG CAG AAG CCA GGA TCC TCC CCC AAA CCC TGG	204
ATT TAT GCC ACA TCC AAC CTG GCT TCT GGA GTC CCT GTT CGC TTC AGT GGC	255
AGT GGG TCT GGG ACT TCT TAC TCT CTC ACA ATC AGC AGA GTG GAG GCT GAA	306
GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAG CAG TGG ACT AGT AAC CCA CCC ACG TTC	357
GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA ATC AAA	384

(7) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID № 6:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 27 оснований

(B) ТИП: нуклеиновая кислота

(C) ЦЕПОЧКА: одиночная

(C) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: ДНК (геномная)

(iii) ГИПОТЕТИЧЕСКАЯ: да

(iv) АНТИ-СМЫСЛОВАЯ: нет

(ix) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID №6

5' GCG GCT CCC ACG CGT GTC CTG TCC CAG 3' 27

(8) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID № 7:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 29 оснований

(B) ТИП: нуклеиновая кислота

(C) ЦЕПОЧКА: одиночная

(C) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: ДНК (геномная)

(iii) ГИПОТЕТИЧЕСКАЯ: да

(iv) АНТИ-СМЫСЛОВАЯ: да

(ix) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID №7

5' GGS TGT TGT GCT AGC TGM RGA GAC RGT GA 3' 29

(9) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID № 8:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 420 оснований

(B) ТИП: нуклеиновая кислота

(C) ЦЕПОЧКА: одиночная

(C) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: ДНК (геномная)

(iii) ГИПОТЕТИЧЕСКАЯ: да

(iv) АНТИ-СМЫСЛОВАЯ: нет

(ix) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID №8

ATG GGT TGG AGC CTC ATC TTG CTC TTC CTT GTC GCT GTT GCT ACG CGT GTC	51
CTG TCC CAG GTA CAA CTG CAG CAG CCT GGG GCT GAG CTG GTG AAG CCT GGG	102
GCC TCA GTG AAG ATG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACA TTT ACC AGT TAC	153
AAT ATG CAC TGG GTA AAA CAG ACA CCT GGT CGG GGC CTG GAA TGG ATT GGA	204
GCT ATT TAT CCC GGA AAT GGT GAT ACT TCC TAC AAT CAG AAG TTC AAA GGC	255
AAG GCC ACA TTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAG CTC	306
AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TAC TGT GCA AGA TCG ACT	357
TAC TAC GGC GGT GAC TGG TAC TTC AAT GTC TGG GGC GCA GGG ACC ACG GTC	408
ACC GTC TCT GCA	420

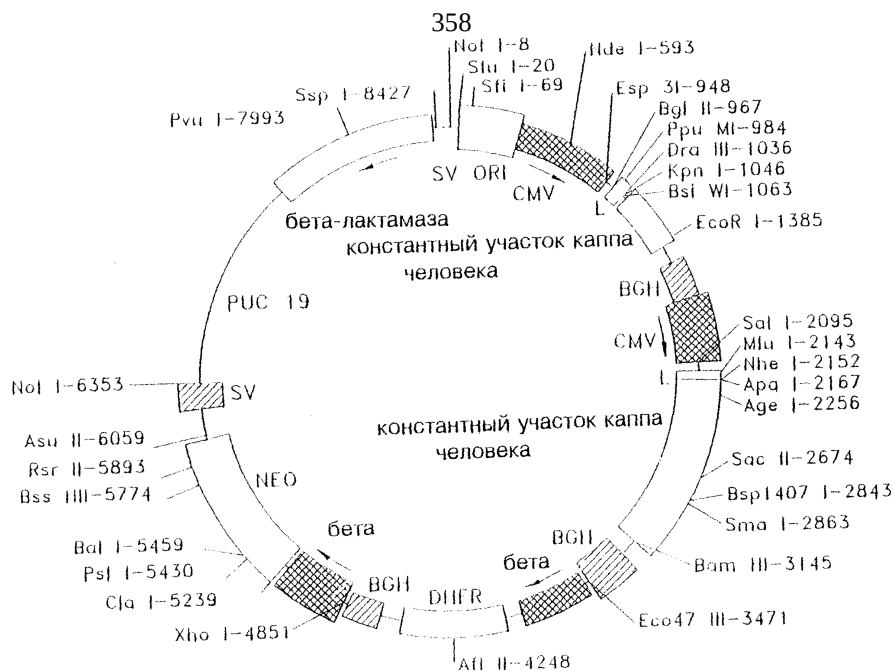


Рис. 1

линкер #1 15bp | точка начала SV40 = 332bp

GACGTCGCGG CCGCTCTAGG CCTCCAAAA AGCCTCCTCA CTACTTCTGG AATAGCTCAG 60

AGGCCGAGGC GGCCTCGGCC TCTGCATAAA TAAAAAAAT TAGTCAGCLA TGCATGGGGC 120

GGAGAATGGC CGGAACCTGG CGGAGTTAGG GCGGGGATGG GCGGAGTTAG GGGCGGGACT 180

ATGGTTGCTG ACTAATTGAG ATGCATGCTT TGCATACCTC TGCCTGCTGG GGAGCCTGGG 240

GACTTTCCAC ACCTGGTTGC TGAATAATTG AGATGCATGC TTTGCATACT TCTGCCTGCT 300

GGGGAGCCTG GGGACTTTCC ACACCTAAC TGACACACAT TCCACACAAAT TAATTCCCTT 360

AGTTATTAAT AGTAATCAAT TACGGGGTCA TTAGTTCATA GCCCATATAT GGAGTTCCGC 420

GTTACATAAC TTACGGTAAA TGGCCCGCCT GGCTGACCGC CCAACGACCC CCGCCATTG 480

ACGTCATAAA TGACGTATGT TCCCATAGTA ACGCCAATAG GGACTTTCCA TTGACGTCAA 540

TGGGTGGACT ATTTACGGTA AACTGCCAC TTGGCAGTAC ATCAAGTGTA TCATATGCCA 600

AGTACGCCCC CTATTGACGT CAATGACGGT AAATGGCCCC CCTGGCATTG TGCCAGTAC 660

ATGACCTTAT GGGACTTTCC TACTTGGCAG TACATCTACG TATTAGTCAT CGCTATTACC 720

ATGGTGATGC GGTTTTGCCA GTACATCAAT GGGCGTGGAT AGCGGTTTGA CTCACGGGGA 780

TTTCCAAGTC TCCACCCCAT TGACGTCAAT GGGAGTTTGT TTTGGACCA AAATCAACGG 840

GACTTTCCAA AATGTCGTAA CAACTCCGCC CCATTGACGC AAATGGGGGG TAGCGGTGTA 900

CGGTGGGAGG TCTATATAAG CAGAGCTGGG TACGTGAACC GTCAGATCGC CTGGAGACGC 960

CATCACAGAT CTCTCACCAT GAGGGTCCCC GCTCAGCTCC TGGGGCTCCT GCTGCTCTGG 1020

CTCCCAGGTG CACGATGTGA TGGTACCAAG CTGGAAATCA AACCTACGGT GGCTGCACCA 1080

TCTGTCTTCA TCTTCCGGCC ATCTGATGAG CAGTTGAAAT CTGGAAGTGC CTCTGTTGTG 1140

TGCCTGCTGA ATAATTCTA TCCAGAGAG GCCAAAGTAC AGTGGAAAGT GGATAACGCC 1200

онстантный участок каппа человека 324bp 107аминокислота & терминирующий кодон

CTCCAATCGG GTAACGCCA GGAGAGTGTG ACAGAGCAGG ACAGCAAGGA CAGCACCTAC 1260

AGCCTCAGCA GCACCTGAC GCTGAGCAAA GCAGACTACG AGAAACACAA AGTCTACGCC 1320

TGCGAAGTCA CCCATCAGGC CCTGAGCTCG CCCGTACAA AGACCTTCAA CAGGGGAGAG 1380

конец легкой цепочки Eco RI

линкер #4=86bp

TGTTCGAAATTC AGATCCGTTA ACGGTTACCA ACTACCTAGA CTGGATTTCG GACAACATGC 1440

GGCCGTGATA TCTACGTATG ATCAGCCTCG ACTGTGCTTT CTAGTTGCCA GCCATCTGTT 1500

Рис. 2а

GTTTGCCCT CCCCCGTGCC TTCCTTGACC CTGGAAGGTG CCACTCCCAC TGTCCTTTCC 1560
 TAATAAAATG AGGAAATTCG ATCGCATTTG CTGAGTAGGT GTCATTCTAT TCTGGGGGGT 1620
 GGGGTGGGGC AGGACAGCAA GGGGGAGGAT TGGGAAGACA ATAGCAGGCA TGCTGGGGAT 1680
 GCGGTGGGCT STATGGAACC ACCTGGGGCT CGACAGCTAT GCCAAGTACG CCCCCTATTG 1740
 ACGTCAATGA CGGTAAATGG CCCGCCGTGGC ATTATGCCCA GTACATGACC TTATGGGACT 1800
 TTCCTACTTG GCAGTACATC TACGTATTAG TCATCGCTAT TACCATGGTG ATGGGGTTTT 1860
 GGCAGTACAT CAATGGGGCT GGATAGCGGT TTGACTCAGG GGGATTTCCA AGTCTCCACC 1920
 CCATTGACGT CAATGGGAGT TTGTTTTGGC ACCAAAATCA ACGGGACTTT CCAAAATGTC 1980
 GTAACAATC CGCCCCATTC ACGCAAATGG GCGGTAGCCG TGTACGGTGG GAGGTCTATA 2040
 TAAGCAGAGC TGGGTACGTC CTCACATTCA GTGATCAGCA CTGAACACAG ACCCGTCGAC 2100
 ATCGGTTGGA GCCTCATCTT GCTCTTCCTT GTGGTGTG CTACGGCTGT CGCTAGCACC 2160
 начало тяжелой цепочки
 AAGGGCCCAT CGGTCTTCCC CCTGGCACCC TCCTCCAAGA GCACCTCTGG GGGCAGAGCG 2220
 GCCCTGGGCT GCCTGGTCAA GGACTACTTC CCCGAACCGG TGACGGTGTG GTGGAAGTCA 2280
 GGGGCCCTGA CCAGCGGCGT GCACACCTTC CCGGCTGTCC TACAGTCCTC AGGACTCGAC 2340
 TCCTCAGCA GCGTGGTGAC CGTGCCCTCC AGCAGCTTGG GCACCCAGAC CTACATCTGC 2400
 AACGTGAATC ACAAGCCGAG CAACACCAAG GTGGACAAGA AAGCAGAGCC CAAATCTTGT 2460
 GACAAAATC ACACATGCCC ACCGTGCCCA GCACCTGAAC TCCTGGGGGG ACCGTCACTC 2520
 TTCCTCTTCC CCCCAAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT CCGGACCCC TGAGGTGACA 2580
 TGCGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCTGAGGTCA AGTTCAACTG GTACGTGGAC 2640
 GGCCTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTACAA CAGCAGGTAC 2700
 CGTGTGGTCA GCGTCCTCAC CGTCCTGCAC CAGGACTGGC TGAATGGCAA GGAATACAAG 2760
 TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CCTCCCAGCC CCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAGCCAAA 2820
 GGGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTACACC CTGCCCCCAT CCGGGATGA GCTGACCAGG 2880
 AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTATC CCAGCGACAT CGCGTGGAG 2940
 TGGGAGAGCA ATGGGAGGCC GGAGAACAAC TACAAGACCA CGCTCCCTGT GGTGGACTCC 3000

Рис. 2b

GACGGCTCCT TCTTCCTCTA CAGCAAGCTC ACCGTGGACA AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG 3060
 AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC GCAGAAGAGC 3120
 конец тяжелой цепочки линкер Bam HI линкер #7=81bp
 CTCTCCCTGT CTCGGGTAA ATCAGGATCC GTTAACGGTT ACCAACTACC TAGACTGGAT 3180
 3144 15
 TCCTGACAAC ATGCGGCCGT GATATCTACG TATGATCAGC CTCGACTGTG CTTTCTAGTT 3240
 3225 16
 GCCAGCCATC TGTGTTTTGC CCTCCCCCG TGCCTTCCTT GACCTGGAA GGTGCCACTC 3300
 область полиаденирования гормона роста теленка =231bp
 CCACTGTCTT TTCTAATAA AATGAGGAAA TTGCATCGCA TTGTCTGAGT AGGTGTCATT 3360
 CATTCTGGG GGTGGGGTG GGGCAGGACA GCAAGGGGA GGATTGGAA GACAATAGCA 3420
 линкер #8=34bp
 GGCATGCTGG GGATGCGTG GGCTCTATGG AACCACTGG GGCTCGACAG CGCTGATCT 3480
 3456 7
 CCGCATCCCC AGCTTTGCTT CTCATTTCT TATTTGCATA ATGAGAAAAA AAGGAAAAAT 3540
 3490 1
 AATTTTAAAC CCAATTCAGT AGTTGATTGA GCAATGCGT TGCCAAAAAG GATGCTTTAG 3600
 главный промотор бета-глобина мыши =366bp
 AGACAGTGT CTCTGCACAG ATAAGGACAA ACATTATTCA GAGGGAGTAC CCAGAGCTGA 3660
 GACTCCTAAG CCACTGAGTG GCACAGCATT CTAGGGAGAA ATATGCTTGT CATCACCGAA 3720
 GCCTGATTCC GTAGAGCCAC ACCTTGGTAA GGGCCAATCT GCTCACACAG GATAGAGAGG 3780
 GCAGGAGCCA GGGCAGAGCA TATAAGGTGA GGTAGGATCA GTTGCTCCTC ACATTTGCTT 3840
 линкер #9=19bp 5' нетранслируемый DHFR=82bp
 CTGACATAGT TGTGTTGGGA GCTTGGATAG CTTGGACAGC TCAGGGCTGC GATTTGCGGC 3900
 3856 7 3875 6
 CAAACTTGAC GGCAATCCTA GCGTGAAGGC TGGTAGGATT TTATCCCCGC TGCCATCATC 3960
 3957 8
 GTTCGACCAT TGAAGTCAT CGTCGCCGTG TCCAAAAATA TGGGGAATTG SAAGAACGGA 4020
 GACCTACCTT GGCTCCGCT CAGGAACGAG TTCAAGTACT TCCAAAGAAT GACCACAACC 4080
 TCTTCAGTGG AAGGTAAACA GAATCTGGTG ATTATGGGTA GGAAACCTG GTTCTCCATT 4140
 мышинный DHFR=564bp=187 аминокислота & терминирующий кодон
 CCTGACAAGA ATCGACCTT AAAGGACAGA ATTAATATAG TTCTCAGTAG AGAACTCAAA 4200
 GAACCACCAC GAGGAGCTCA TTTTCTTGCC AAAAGTTTGG ATGATGCCTT AACACTTATT 4260
 GAACAACCGG AATTGGCAAG TAAAGTAGAC ATGGTTTGG TAGTCGGAGG CAGTTCTGTT 4320
 TACCAGGAAG CCATGAATCA ACCAGGCCAC CTTAGACTCT TTGTGACAAG GATCATGCAG 4380
 GAATTTGAAA GTGACACGTT TTTCCAGAA ATTGATTTGG GGAAATATAA ACTTCTCCCA 4440
 GAATACCCAG CGTCTCTCTC TGAGGTCCAG GAGGAAAAAG GCATCAAGTA TAAGTTTGAA 4500

Рис. 2с

конец DHFR
 GTCTACGAGA AGAAAGAC⁴⁵²¹TA ACAGGAAGAT GCTTTCAAGT TCTCTGCTCC CCTCCTAAAG 4560
 3' UNTRANSLATED DHFR=82bp | линкер #10=10bp |
 TCATGCATTT TTATAAGACC ATGGGACTTT TGCTGGCTTT AGATCAGCCT CGACTGTGCT 4620
 4603 4 4613 4
 TTCTAGTTGC CAGCCATCTG TTGTTTGGCC CTCCTCCGTG CCTTCCTTGA CCTGGGAAGG 4680
 область полиаденирования гормона роста теленка V=231bp
 TGCCACTCCC ACTGTCCTTT CCTAATAAAA TGAGGAAATT GCATCGCATT GTCTGAGTAG 4740
 GTGTCAATTCT ATTCTGGGGG GTGGGGTGGG GCAGGACAGC AAGGGGGAGG ATTGGGAAGA 4800
 CAATAGCAGG CATGCTGGGG ATGCGGTGGG CTCTATGGAA CCACCTGGGG CTCGAGCTAC 4860
 4844 5 | линкер #11=17bp |
 TAGCTTTGCT TCTCAATTTT TTATTTGCAT AATGAGAAAA AAAGGAAAAAT TAATTTTAAC 4920
 ACCAATTTCAG TAGTTGATTG AGCAAAATGCG TTGCCAAAAA GGATGCTTTA GAGACAGTGT 4980
 TCTCTGCACA GATAAGGACA AACATTATTC AGAGGGAGTA CCCAGAGCTG AGACTCCTAA 5040
 главный промотор бета-глобина мыши V=366bp
 GCCAGTGAGT GGCACAGCAT TCTAGGGAGA AATATGCTTG TCATCACCAG AGCCTGATTC 5100
 CGTAGAGCCA CACCTTGCTA AGGGCCAATC TGCTCACACA GGATAGAGAG GGCAGGAGCC 5160
 AGGGCAGAGC ATATAAGGTG AGGTAGGATC AGTTGCTCCT CACATTTGCT TCTGACATAG 5220
 линкер #12=21bp начало NEO
 TTGTGTTGGG AGCTTGGATC GATCCTCTAT GTTGAACAA GATGGATTGC ACGCAGGTTG 5280
 5227 8 5248 9
 TCCGGCCCGCT TGGGTGGAGA GGCATTCCGG CTATGACTGG GCACAACAGA CAATCGGCTG 5340
 CTCTGATGCC GCGGTGTTCC GGCTGTGAGC GCAGGGGGCG CCGGTTCTTT TTGTCAAGAC 5400
 фосфотрансфераза неомицина
 CBACCTGTCC GGTGCCCTGA ATGAACCTGA GBACGAGGCA GCGGGCTAT CGTGGCTGGC 5460
 795bp=264 аминокислоты & терминирующий кодон
 CACGACGGGC GTTCCTTGGC CAGCTGTGCT CBACGTTGTC ACTGAAGCGG GAAAGGACTG 5520
 GCTGCTATTG GCGGAAGTGC CCGGGCAGGA TCTCCTGTCA TCTCACCTTG CTCCTGCCGA 5580
 GAAAGTATCC ATCATGGCTG ATGCAATGCG GCGGCTGCAT ACGCTTGATC CCGCTACCTG 5640
 CCCATTGGAC CACCAAGCGA AACATCGCAT CGAGCGAGCA CGTACTCGGA TGGAGCCCG 5700
 TCTTTGCGAT CAGGATGATC TGGACGAAGA GCATCAGGGG CTCGCGCCAG CCGAACTGTT 5760
 CGCCAGGCTC AAGGCGCGCA TGCCCGACGG CGAGGATCTC GTCTGACCC ATGGCGATGC 5820
 CTGCTTGCCG AATATCATGG TGGAAAATGG CCGCTTTTCT GGATTGATCG ACTGTGGCCG 5880
 GCTGGGTGTC GCGGACCGCT ATCAGGACAT AGCGTTGGCT ACCCGTGATA TTGCTGAAGA 5940
 GCTTGGCGGC GAATGGGCTG ACCGTTCTCT CGTCTTTTAC GGTATCGCCG CTTCCCGATTG 6000

Рис. 2d

GCAGCGCATC GCCTTCTATC GCCTTCTTGA CGAGTTCTTC ^{конец NE0} TCGAGCGGGAC TCTGGGGTTC 6060
 6043 14
 GAAATGACCG ACCAAGCGAC GCCCAACCTG CCATCAGCAG ATTTCCGATTC CACCGCGCGC 6120
 3' нетранслируемый NE0=173bp
 TTCTATGAAA GGTGGGCTT CGGAATCGTT TTCCGGGACG CCGGCTGGAT GATCCTCCAG 6180
 CGCGGGGATC TCATGCTGGA GTTCTTCGCC CACCCCAACT TGTATTATTC AGCTTATAAT 6240
 6216 17
 GGTACAAAT AAAGCAATAG CATCACAAT TTCACAAATA AAGCATTTTT TCACTGCAT 6300
 SV40 поли A ранняя=133bp линкер #13=19bp
 TCTAGTTGTG GTTGTCCAA ACTCATCAAT STATCTTATC ATGTCTGCAT CGCGGCGCGC 6360
 6349 50
 ATCCCGTCCA GAGCTTGGCG TAATCATGGT CATAGCTGTT TCCTGTGTGA AATTGTTATC 6420
 6368 19
 CGCTCACAAT TCCACACAAC ATACGAGCGG GAAGCATAAA GTGTAAAGCC TGGGGTGCCT 6480
 AATGAGTGAG CTAACTCACA TTAATTGCGT TCGGCTCACT GCCCGCTTTC CAGTCGGGAA 6540
 ACCTGTCTGT CCACTGCGAT TAATGAATCG GCCAACGCGC GGGGAGAGCG GGTTTGCGTA 6600
 PVC 19
 TTGGGCGCTC TTCCGCTTCC TCGCTCACTG ACTCGCTGCG CTCGGTCGTT CGGCTGCGGC 6660
 GAGCGGTATC AGCTCACTCA AAGGCGGTAA TACGGTTATC CACAGAATCA GGGGATAACG 6720
 CAGGAAAGAA CATGTGAGCA AAAGGCCAGC AAAAGGCCAG GAACCGTAAA AAGGCGCGCT 6780
 6792= точка начала репликации у бактерии
 TCGTGGCGTT TTCCATAGG CTCGGCCCCC CTGACGAGCA TCACAAAAAT CGACGCTCAA 6840
 GTCAGAGGTG GCGAAACCGC ACAGGACTAT AAAGATACCA GCGTTTTCCC CCTGGAAGCT 6900
 CCTCGTGCG CTCTCTGTT CCGACCCCTG CGCTTACCGG ATACCTGTCC GCCTTTCTCC 6960
 CTTGGGAAG CGTGGCGCTT TCTCAATGCT CACGCTGTAG GATCTCAGT TCGGTGTAGG 7020
 TCGTTCGCTC CAAGCTGGGC TGTGTGCACG AACCCCCCGT TCAGCCCGAC CGCTGCGCCT 7080
 TATCCGGTAA STATCSTCTT GAGTCCAACC CCGTAACACA CGACTTATCG CCACTGGCAG 7140
 CAGCCACTGG TAACAGGATT AGCAGAGCGA GGTATGTAGG CCGTGCTACA GAGTTCTTGA 7200
 AGTGGTGGCC TAACTACGGC TACACTAGAA GGACAGTATT TGGTATCTGC GCTCTGCTGA 7260
 AGCCAGTTAC CTTCCGAAAA AGAGTTGGTA GCTCTTGATC CGGCAAAACA ACCACCGCTG 7320
 GTAGCGGTGG TTTTTTTGTT TGCAAGCAGC AGATTACCGC CAGAAAAAAA GGATCTCAAG 7380
 AAGATCCTTT GATCTTTTCT ACGGGGTCTG ACGCTCACTG GAACGAAAAAC TCACGTTAAG 7440
 GGATTTTGGT CATGAGATTA TCAAAAAGCA TCTTCACCTA GATCCTTTTA AATTAAAAAT 7500

Рис. 2е

GAAGTTTTAA ATCAATCTAA AGTATATATG ^{конец бета-лактамазы} AGTAAACTTG GTCTGACAGT TACCAATGCT 7560
 TAATCAGTGA GGCACCTATC TCAGCGATCT GTCTATTTCC TTCAATCCATA GTTGCCCTGAC 7620
 TCCCGGTCGT GTAGATAACT ACGATACGGG AGGGCTTACC ATCTGGCCCC AGTGCTGCAA 7680
 TGATACCGCG AGACCCACGC TCACCGGCTC CAGATTTATC AGCAATAAAC CAGCCAGCCG 7740
 GAAGGGCCGA GGCAGAAAGT GGTCCCTGCAA ^{бета-лактамаза = 861bp} CTTCATCCGC CTCATCCAG TCTATTAATT 7800
 GTTGCCGGGA AGCTAGAGTA AGTAGTTCCG CAGTTAATAG TTTCGCCAAC GTTGTGGCA 7860
 TTGCTACAGG CATCGTGGTG TCACGCTCGT CGTTTGGTAT GGCTTCATTC AGCTCCGGTT 7920
 CCCAACGATC AAGGCGAGTT ACATGATCCC CCATGTTGTG CAAAAAGCG GTTAGCTCCT 7980
 TCGGTCCTCC GATCGTTGTC AGAAGTAAGT TGGCCGCAGT GTTATCACTC ATGGTTATGG 8040
 CAGCACTGCA TAATTCTCTT ACTGTCATGC CATCCGTAAG ATGCTTTTCT GTGACTGGTG 8100
 AGTACTCAAC CAAGTCATTC TGAGAATAGT GTATGCGGCG ACCGAGTTGC TCTTGCCCGG 8160
 CGTCAATACG GGATAATACC GCGCCACATA GCAGAACTTT AAAAGTGCTC ATCATTGGAA 8220
 AACGTTCTTC GGGGCGAAAA CTCTCAAGGA TCTTACCGCT GTTGAGATCC AGTTCCGATGT 8280
 AACCCACTCG TGCACCCAAC TGATCTTCAG CATCTTTTAC TTTCACCAGC GTTTCTGGGT 8340
 GAGCAAAAAC AGGAAGGCAA AATGCCGCAA AAAAGGGAAT AAGGGCGACA CGGAAATGTT 8400
 GAATACTCAT ^{начало бета-лактамазы} ACTCTTCCTT TTTCAATATT ATTGAAGCAT TTATCAGGGT TATTGTCTCA 8460
 TGAGCGGATA CATATTTGAA TGTATTTAGA AAAATAACA AATAGGGGTT CCGCGCACAT 8520
 TTCCCCGAAA AGTGCCACCT

Рис. 2f

линкер #1=15bp
 GACGTCGCGG CCGCTCTAGG CCTCCAAAA AGCCTCCTCA CTACTTCTGG AATAGCTCAG 60
 15 6
 AGGCCGAGGC GGCTCGGCC TCTGCATAAA TAAAAAAAT TAGTCACCCA TGCATGGGGC 120
 SV40 начало =332bp
 GGAGAATGGG CGGAAC TGG CCGAGTTAGG GCGGGATGG GCGGAGTTAG GGGCGGGACG 180
 ATGGTTGCTG ACTAATTGAG ATGCATGCTT TGCATACTTC TGCCTGCTGG GGAGCCTGGG 240
 GACTTTCCAC ACCTGGTTGC TGAATAATTG AGATGCATGC TTTGCATACT TCTGCCTGCT 300
 линкер #2=13bp
 GGGGAGCCTG GGGACTTTCC ACACCCTAAC TGACACACAT TCCACACAAAT TAATTCCCT 360
 347 8
 AGTTATTAAT AGTAATCAAT TACGGGGTCA TTAGTTCATA GCCCATATAT GGAGTTCCGC 420
 GTTACATAAC TTACGGTAAA TGGCCCCGCT GGCTGACCGC CCAACGACCC CCGCCCATTTG 480
 ACGTCAATAA TGACGTATGT TCCCATAGTA ACGCCAATAG GGAATTTCCA TTGACGTCAA 540
 CVM промотор-энхансер=567bp
 TGGGTGGACT ATTTACGGTA AACTGCCAC TTGGCAGTAC ATCAAGTGTA TCATATGCCA 600
 AGTACGCCCC STATTGACGT CAATGACGGT AAATGGCCCG CCTGGCATTG TGCCAGTAC 660
 ATGACCTTAT GGGACTTTCC TACTTGGCAG TACATCTACG TATTAGTCAT CGCTATTACC 720
 ATGGTGATGC GGTTTTGGCA GTACATCAAT GGGCGTGGAT AGCGGTTTGA CTCACGGGGA 780
 TTTCCAAGTC TCCACCCCAT TGACGTCAAT GGGAGTTTCT TTTGGACCA AAATCAACGG 840
 GACTTTCCAA AATGTCGTAA CAACTCCGCC CCATTGACGC AAATGGGCGG TAGGCGTGTA 900
 линкер #3=7bp
 CGGTGGGAGG TCTATATAAG CAGAGCTGGG TACGTTGAACC GTCAGATCGC CTGGAGACGC 960
 927 8 934 5
 Bgl 2 начало легкой цепочки природная лидирующая последовательность 66bp
 CATCACACAT CTCTCACTAT GCATTTTCAG GTGCAGATTA TCAGCTTCCT GCTAATCAGT 1020
 978 9
 GCTTCAGTCA TAATGTCCAG AGGACAAATT GTTCTCTCCC AGTCTCCAGC AATCCTGTCT 1080
 1044 5+1
 GCATCTCCAG GGGAGAAGGT CACAATGACT TGCAGGGCCA GCTGAAGTGT AAGTTACATC 1140
 CACTGGTTCC AGCAGAAGCC AGGATCCTCC CCCAAACCTT GGATTTATGC CACATCCAAC 1200
 вариабельный участок легкой цепочки 318bp 106 аминокислота
 CTGGCTTCTG GAGTCCCTGT TCGCTTCAGT GGCAGTGGGT CTGGGACTTC TTAATCTCTG 1260
 ACCATCAGCA GAGTGGAGGC TGAAGATGCT GCCACTTATT ACTGCCAGCA GTGGACTAGT 1320
 BsiWI
 AACCCACCCA CGTTCCGAGG GGGGACCAAG CTGGAATCA AACGTACCGT GGCTGCACCA 1380
 1362 3
 TCTGTCTTCA TCTTCCCGCC ATCTGATGAG CAGTTGAAAT CTGGAACAGC CTCTGTCTGT 1440
 TGCCTGCTGA ATAATTCTA TCCAGAGAG GCCAAAGTAC AGTGGGAAGGT GGATAACGCC 1500

Рис. 3а

конец DHFR
 GTCTACGAGA AGAAAGAC TA ACAGGAAGAT GCTTTCAAGT TCTCTGCTCC CCTCCTAAAG 4560
 4521 2
 3' UNTRANSLATED DHFR=82bp линкер #10=10bp
 TCATGCATTT TTATAAGACC ATGGGACTTT TGCTGGCTTT AGATCAGCT CGACTGTGCC 4620
 4603 4 4613 4
 TTCTAGTTGC CAGCCATCTG TTGTTTGCCC CTCCTCCGTG CCTTCCTTGA CCTCGGAAGG 4680
 область полиаденирования гормона роста теленка 1=231bp
 TGCCACTCCC ACTGTCTTT CTAATAAAAA TGAGGAAATT GCATCGCATT GTCTGAGTAG 4740
 GTGTCAATTCT ATTCTGGGGG GTGGGGTGGG GCAGGACAGC AAGGGGGAGG ATTGGGAAGA 4800
 CAATAGCAGG CATGCTGGGG ATGCGGTGGG CTCTATGGAA CCAGCTGGGG CTCGAGCTAC 4860
 4844 5 линкер #11=17bp
 TAGCTTTGCT TCTCAATTC TTATTTGCAT AATGAGAAAA AAAGGAAAAT TAATTTTAAC 4920
 ACCAATTCAG TAGTTGATTG AGCAATGCG TTGCCAAAAA GGATGCTTTA GAGACAGTGT 4980
 TCTCTGCACA GATAAGGACA AACATTATTC AGAGGGAGTA CCCAGAGCTG AGACTCCTAA 5040
 главный промотор бета-глобина мыши 2=366bp
 GCCAGTGAGT GGCACAGCAT TCTAGGGAGA AATATGCTTG TCATCACCAG AGCCTGATTC 5100
 CGTAGAGCCA CACCTTGCTA AGGGCCAATC TGCTCAGACA GGATAGAGAG GGCAGGAGCC 5160
 AGGGCAGAGC ATATAAGGTG AGGTAGGATC AGTTGCTCCT CACATTTGCT TCTGACATAG 5220
 линкер #12=21bp начало NEO
 TTGTGTTGGG AGCTTGGATC GATCCTCTAT GTTGAACAA GATGGATTGC ACGCAGGTTG 5280
 5227 8 5248 9
 TCCGGCCGCT TGGGTGGAGA GGCTATTCGG CTATGACTGG GCACAACAGA CAATCGGCTG 5340
 CTCTGATGCC GCCGTGTTCC GGCTGTACGC GCAGGGGGCG CCGGTTCTTT TTGTCAAGAC 5400
 фосфотрансфераза неомицина
 CGACCTGTCC GGTGCCCTGA ATGAACTGCA GGACGAGGCA GCGCGGCTAT CGTGGCTGCC 5460
 795bp=264 аминокислоты & терминирующий кодон
 CACGACGGGC GTTCCTTGGC CAGCTGTGCT CCACGTTGTC ACTGAAGCGG GAAAGGACTG 5520
 GCTGCTATTG GGCGAAGTGC CCGGGCAGGA TCTCCTGTCA TCTACCTTG CTCCTGCCGA 5580
 GAAAGTATCC ATCATGGCTG ATGCAATGCG GCGGCTGCAT ACCGTTGATC CCGCTACCTG 5640
 CCCATTCCAC CACCAAGCGA AACATCGCAT CGAGCGAGCA CGTACTCGGA TGGAAAGCCG 5700
 TCTTGTGGAT CAGGATGATC TGGACGAAGA GCATCAGGGG CTCGCGCCAG CCGAACTGTT 5760
 CGCCAGGCTC AAGGCGCGCA TGCCCGACGG CGAGGATCTC GTCGTGACCC ATGGCGATGC 5820
 CTGCTTGCCG AATATCATGG TGGAAAATGG CCGCTTTTCT GGATTCATCG ACTGTGGCCG 5880
 GCTGGGTGTG GCGGACCGCT ATCAGGACAT AGCGTTGGCT ACCCGTGATA TTGCTGAAGA 5940
 GCTTGGCGGC GAATGGGCTG ACCGCTTCCT CGTGCTTTAC GGTATCGCCG CTTCCTGATTC 6000

Рис. 3b

330 АМИНОКИСЛОТА & ТЕРМИНИРУЮЩИЙ КОДОН

GGACTCTACT CCCTCAGCAG CGTGGTGACC GTGCCCTCCA GCAGCTTGGG CACCCAGACC 3060

TACATCTGCA ACGTGAATCA CAAGCCCAGC AACACCAAGG TGGACAAGAA AGCAGAGCCC 3120

AAATCTTGTG ACAAAACTCA CACATGCCCA CCGTGCCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA 3180

CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCAAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT 3240

GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC CTGAGGTCAA GTTCAACTGG 3300

TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC 3360

AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG 3420

GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC 3480

AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC CCGGGATGAG 3540

CTGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC 3600

GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAAC ACAGACCAC GCCTCCCGTG 3660

CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCTCTAC AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG 3720

CAGCAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG 3780

КОНЕЦ ТЯЖЕЛОЙ ЦЕПОЧКИ Barn HI ЛИНКЕР # 7=81bp
CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC TCCGGGTAAA TGAGGATCCG TTAACGGTTA CCAACTACCT 3840
3813 4

AGACTGGATT CGTGACAACA TGCGGCCGTG ATATCTACGT ATGATCAGCC TCGACTGTGC 3900
3894 5

CTTCTAGTTG CCAGCCATCT GTTGTGTCCT CCTCCCCCGT GCCTTCCTTG ACCCTGGAAG 3960

GTGCCACTCC CACTGTCCTT TCCTAATAAA ATGAGGAAAT TGCATCGCAT TGTCTGAGTA 4020

ОБЛАСТЬ ПОЛИАДЕНИРОВАНИЯ ГОРМОНА РОСТА ТЕЛЕНКА = 231bp
GCGCCACTTC TATTCTGGGG GGTGGGGTGG GGCAGGACAG CAAGGGGGAG GATTGGGAAG 4080

ACAATAGCAG GCATGCTGGG GATGCGGTGG GCTCTATGGA ACCACCTGGG GCTCGACAGC 4140
ЛИНКЕР # 8=34bp
4125 6

GCTGGATCTC CCGATCCCCA GCTTTGCTTC TCAATTTCTT ATTTGCATAA TGAGAAAAAA 4200

AGGAAAATTA ATTTTAACAC CAATTAGTA GTTGATTGAG CAAATGCGTT GCCAAAAAGG 4260

ГЛАВНЫЙ ПРОСМОТР БЕТА-ГЛОБИНА МЫШИ = 366bp
ATGCTTTAGA GACAGTGGTC TCTGCASAAA TAAGGASAAA CATTATTAG AGGGAGTACC 4320

CAGAGCTGAG ACTCCTAAGC CAGTGAGTGG CACAGCATTC TAGGGAGAAA TATGCTTGTC 4380

ATCACCGAAG CCTGATTCCG TAGAGCCACA CCTTGGAAG GGCCAATCTG CTCACACAGG 4440

ATAGAGAGGG CAGGAGCCAG GGCAGAGCAT ATAAGGTGAG GTAGGATCAG TTGCTCCTCA 4500

Рис. 3с

конец DHFR
 GTCTACGAGA AGAAAGAC TA ACAGGAAGAT GCTTTCAAGT TCTCTGCTCC CCTCCTAAAG 4560
 4521 2
 3' UNTRANSLATED DHFR=82bp
 TCATGCATTT TTATAAGACC ATGGGACTTT TGCTGGCTTT AGATCAGCCT CGACTGTGCT 4620
 4603 4 4613 4
 TTCTAGTTGC CAGCCATCTG TTGTTTGCCC CTCCTCCGTG CCTCCTTGA CCTGGAAGG 4680
 область полиаденирования гормона роста теленка N=231bp
 TGCCACTCCC ACTGTCTTT CСТААТАААА TGAGGAAATT GCATCGCATT GTCTGAGTAG 4740
 GTGTCAATTCT ATTCTGGGGG GTGGGGTGGG GCAGGACAGC AAGGGGGAGG ATTGGGAAGA 4800
 CAATAGCAGG CATGCTGGGG ATGCGGTGGG CTCTATGGAA CCAGCTGGGG CTGAGCTAC 4860
 4844 5
 TAGCTTTGCT TCTCAATTTT TTATTTGCAT AATGAGAAAA AAAGGAAAAAT TAATTTTAAC 4920
 ACCAATTCAG TAGTTGATTG AGCAAAATGCG TTGCCAAAAA GGATGCTTTA GAGACAGTGT 4980
 главный промотор бета-глобина мыши N=366bp
 TCTCTGCACA GATAAGGACA AACATTATTC AGAGGGAGTA CCCAGAGCTG AGACTCCTAA 5040
 GCCAGTGAGT GGCACAGCAT TCTAGGGAGA AATATGCTTG TCATCACCGA AGCCTGATTC 5100
 CGTAGAGCCA CACCTTGGTA AGGGCCAATC TGCTCACACA GGATAGAGAG GGCAGGAGCC 5160
 AGGGCAGAGC ATATAAGGTG AGGTAGGATC AGTTGCTCCT CACATTTGCT TCTGACATAG 5220
 линкер #12=21bp начало NEO
 TTGTGTTGGG AGCTTGGATC GATCCTCTAT GTTGAACAA GATGGATTGC ACGCAGGTTG 5280
 5227 8 5248 9
 TCCGGCCGCT TGGGTGGAGA GGCTATTCGG CTATGACTGG GCACAACAGA CAATCGGCTG 5340
 CTCTGATGCC GCGTGTTC GGCTGTGAGC GCAGGGGGCG CCGTTCTTT TTGTCAAGAC 5400
 фосфотрансфераза неомицина
 CGACCTGTCC GGTGCCCTGA ATGAACTGCA GGACGAGGCA GCGCGGCTAT CGTGGCTGGC 5460
 795bp=264 аминокислоты & терминирующий кодон
 CACGACGGGC GTTCCTTGGC CAGCTGTGCT CCACGTTGTC ACTGAAGCGG GAAAGGACTG 5520
 GCTGCTATTG GGCGAAGTGC CGGGGCAGGA TCTCCTGTCA TCTCACCTTG CTCTGCGGA 5580
 GAAAGTATCC ATCATGGCTG ATGCAATGCG GCGGCTGCAT ACGCTTGATC CGGCTACCTG 5640
 CCCATTCGAC CACCAAGCGA AACATCGCAT CGAGCGAGCA CGTACTCGGA TGGAAAGCGG 5700
 TCTTGTGGAT CAGGATGATC TGGACGAAGA GCATCAGGGG CTCGCGCCAG CCGAACTGTT 5760
 CGCCAGGCTC AAGGCGCGCA TGCCCGACGG CGAGGATCTC GTCGTGACCC ATGGCGATGC 5820
 CTGCTTGCCG AATATCATGG TGGAAATGG CCGCTTTTCT GGATTCATCG ACTGTGGCCG 5880
 GCTGGGTGTG GCGGACCGCT ATCAGGACAT AGCGTTGGCT ACCCGTGATA TTGCTGAAGA 5940
 GCTTGGCGGC GAATGGGCTG ACCGCTTCCT CGTGCTTTAC GGTATCGCCG CTCCCGATTC 6000

Рис. 3d

AATCGGCTGC TCTGATGCCG CCGTGTTCGG GCTGTCAGCG CAGGGGCGCC CGGTTCTTTT 6060
 Фосфотрансфераза неомицина=795bP=264 аминокислота &терминирующий кодон
 TGTCAAGACC GACCTGTCCG GTGCCCTGAA TGAAC TGCAG GACGAGGCAG CGCGGCTATC 6120
 GTGGGTGGCC ACGACGGGCG TTCTTTGGCG AGCTGTGCTC GACGTTGTCA CTGAAGCGCG 6180
 AAGGGACTGG CTGCTATTGG GCGAAGTGCC GGGGCAGGAT CTCCTGTCAT CTCACCTTGC 6240
 TCCTGCCGAG AAAGTATCCA TCATGGCTGA TGCAATGCGG CGGCTGCATA CGCTTGATCC 6300
 GGCTACCTGC CCATTGACCC ACCAAGCGAA ACATCGCATC GAGCGAGCAC GTACTCGGAT 6360
 GGAAGCCGGT CTGTGCGATC AGGATGATCT GGACGAAGAG CATCAGGGGC TCGCGCCAGC 6420
 CGAACTGTTT GCCAGGCTCA AGGCGCGCAT GCCCGACGGC GAGGATCTCG TCGTGACCCA 6480
 TGGCGATGCC TGCTTGCCGA ATATCATGGT GGAAAATGGC CGCTTTTCTG GATTTCATCGA 6540
 CTGTGGCCGG CTGGGTGTGG CGGACCGCTA TCAGGACATA GCGTTGGCTA CCCGTGATAT 6600
 TGCTGAAGAG CTGGCGGCG AATGGGCTGA CCGCTTCCTC GTGCTTTACG GTATCGCCGC 6660
 TCCCGATTCC CAGCGCATCG CCTTCTATCG CCTTCTTGAC GAGTTCTTCT GAGCGGGACT 6720
 CTGGGGTTCC AAATGACCGA CCAAGCGACG CCCAACCTGC CATCAGGAGA TTTGATTCC 6780
 3' нетранслируемый NEO=173bp
 ACCGCGCGCT TCTATGAAAG GTTGGGCTTC GGAATCGTTT TCGGGACGC CGGCTGGATG 6840
 ATCCTCCAGC GCGGGGATCT CATGCTGGAG TTCTTCGCCC ACCCCAACTT GTTTATTGCA 6900
 GCTTATAATG GTTACAAATA AAGCAATAGC ATCACAATTT TCACAAATAA AGCATTTTTT 6960
 SV40 область раннего полиаденирования=133bp
 TCACTGCATT CTAGTTGTGG TTTGTCCAAA CTCATCAATC TATCTTATCA TGTCTGGATC 7020
 линкер #13=19bp
 GCGGCGCGCA TCCGCTCGAG AGCTTGGCGT AATCATGGTC ATAGCTGTTT CCTGTGTGAA 7080
 7037 8 PUC 19
 ATTGTTATCC GCTCACAATT CCACACAACA TACGAGCCGG AAGCATAAAG TGTAAGCCT 7140
 GGGGTGCCTA ATGAGTGAGC TAACTCAGAT TAATTGCGTT GCGCTCACTG CCCGCTTTCC 7200
 AGTCGGGAAA CCTGTCTGTC CAGCTGCATT AATGAATCGG CCAACGCGCG GGGAGAGGCG 7260
 GTTTGCGTAT TGGGCGCTCT TCCGCTTCCT CGCTCACTGA CTCGCTGCGC TCGGTGTTT 7320
 GGCTGCGGCG AGCGGTATCA GCTCACTCAA AGCGGTAAT ACGGTTATCC ACAGAATCAG 7380
 GGGATAACGC AGGAAAGAACT ATGTGAGCAA AAGGCCAGCA AAAGGCCAGG AACCGTAAAA 7440
 7461=точка начала репликации бактерии
 AGGCCGCGTT GCTGGCGTTT TCCATAGGC TCCGCCCCC TGACGAGCAT CACAAAAATC 7500

Рис. 3е

GACGCTCAAG TCAGAGGTGG CGAAACCCGA CAGGACTATA AAGATACCAG GCGTTTCCCC 7560
 CTGGAAGCTC CCTCGTGCGC TCTCCTGTTG CGACCCGTGC GCTTACCGGA TACCTGTCCG 7620
 CCTTCTCCCC TTCGGGAAGC GTGGCGCTTT CTCAATGCTC ACGCTGTAGG TATCTCACTT 7680
 CGGTGTAGGT CGTTCCGTCC AAGCTGGGCT GTGTGCACGA ACCCCCCGTT CAGCCCCGAC 7740
 GCTGCGCCTT ATCCGGTAAC TATCGTCTTG AGTCCAACCC GGTAAGACAC GACTTATCGC 7800
 CACTGGCAGC AGCCACTGGT AACAGGATTA GCAGAGCGAG GTATGTAGGC GGTGCTACAG 7860
 AGTTCTTGAA GTGGTGGCCT AACTACGGCT AACTAGAAAG GACAGTATTT GGTATCTCCG 7920
 CTCTGCTGAA GCCAGTTACC TTCGGAAAAA GAGTTGGTAG CTCTTGATCC GGCAAAACAA 7980
 CCACCGCTGG TAGCGGTGGT TTTTTTGTTC GCAAGCAGCA GATTACGGCG AGAAAAAAG 8040
 GATCTCAAGA AGATCCTTTG ATCTTTTCTA CGGGGTCTGA CGCTCAGTGG AACGAAAACT 8100
 CACGTTAAGG GATTTTGGTC ATGAGATTAT CAAAAAGGAT CTTACCTAG ATCCTTTTAA 8160
 ATTA AAAATG AAGTTTTAAA TCAATCTAAA GTATATATGA GTAAACTTGG TCTGACAGTT ^{конец} 8220
бета-лактамаза
 TCCAATGCTT AATCAGTCAG GCACCTATCT CAGCGATCTG TCTATTTCTG TCATCCATAG 8280
 TTGCCTGACT CCCCCTCGTG TAGATAACTA CGATACGGGA GGGCTTACCA TCTGGCCCCA 8340
 GTGCTGCAAT GATACCGCGA GACCCACGCT CACCGGCTCC AGATTTATCA GCAATAAAC 8400
 бета-лактамаза=861bp=286 аминокислота & терминирующий кодон
 AGCCAGCCGG AAGGGCCGAG CCGAGAAGTG GTCTGCAAC TTTATCCGCC TCCATCCAGT 8460
 CTATTAATTG TTCCCGGAA GCTAGAGTAA GTAGTTCCGC AGTTAATAGT TTGCGCAACG 8520
 TTGTTGCCAT TGCTACAGGC ATCGTGGTGT CACGCTCGTC GTTTGGTATG GCTTCATTCA 8580
 GCTCCGGTTC CCAACGATCA AGGCGAGTTA CATGATCCCC CATGTTGTGC AAAAAAGCGG 8640
 TTAGCTCCTT CGGTCCTCCG ATCGTTGTCA GAAGTAAGTT GGGCGCAGTG TTATCACTCA 8700
 TGGTTATGGC AGCACTGCAT AATTCTCTTA CTGTATGCC ATCCGTAAGA TGCTTTTCTG 8760
 TGA CTGGTGA G TACTCAACC AAGTCATTCT GAGAATAGTG TATGCGGCGA CCGAGTTGCT 8820
 CTTGCCCGGC GTCAATACGG GATAATACCG CGCCACATAG CAGAACTTTA AAAGTGCTCA 8880
 TCATTGGAAA ACGTTCTTCG GGGCGAAAAC TCTCAAGGAT CTTACCGCTG TTGAGATCCA 8940
 GGTGATGTA ACCCACTCGT GCACCCAACT GATCTTCAGC ATCTTTTACT TTCACCAGCG 9000
 TTTCTGGGTG AGCAAAAACA GGAAGGCAAA ATGCCGCAAA AAAGGGAATA AGGGCGACAC 9060
 GGAAATGTTG AATACTCATA ^{начало бета-лактамазы} CTCTTCCTTT TTCAATATTA TTGAAGCATT TATCAGGGTT 9120
 ATTCTCTCAT GAGCGGATAC ATATTTGAAT GTATTTAGAA AAATAAACAA ATAGGGGCTC 9180
 CGCGCACATT TCCCCGAAAA GTGCCACCT

Рис. 3f


```

-20          -15          -10
FR 1 Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Ile Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser Val
   ATG GAT TTT CAG GTG CAG ATT ATC AGC TTC CTG CTA ATC AGT GCT TCA GTC
   987          996          1005          1014          1023

-5          -1 +1      FR1          10
Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser
ATA ATG TCC AGA GGA CAA ATT GTT CTC TCC CAG TCT CCA GCA ATC CTG TCT GCA TCT
   1038          1047          1056          1065          1074          1083

Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His
CCA GGG GAG AAG GTC ACA ATG ACT TGC AGG GCC AGC TCA AGT GTA AGT TAC ATC CAC
   1095          1104          1113          1122          1131          1140

35      FR2          40          45          49 50      CDR2
Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn
TGG TTC CAG CAG AAG CCA GGA TCC TCC CCC AAA CCC TGG ATT TAT GCC ACA TCC AAC
   1152          1161          1170          1179          1188          1197

55 56 57          60      FR3          65          70
Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser
CTG GCT TCT GGA GTC CCT GTT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACT TCT TAC TCT
   1209          1218          1227          1236          1245          1254

75          80          85          88 89 90
Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
CTC ACC ATC AGC AGA GTG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAG CAG TGG
   1266          1275          1284          1293          1302          1311

CDR3 95          97 98      100 FR4          105          107
Thr Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
ACT AGT AAC CCA CCC ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA ATC AAA
   1323          1332          1341          1350          1359

```

Рис. 4

```

-19          -15          -10          -5
FRAME 1 Met Gly Trp Ser Leu Ile Leu Leu Phe Leu Val Ala Val Ala Thr Arg Val
   ATG GGT TGG AGC CTC ATC TTG CTC TTC CTT GTC GCT GTT GCT ACG CGT GTC
   2409          2418          2427          2436          2445

-1 +1      FR1          10          15
Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Ala Gly Ala Ser
CTG TCC CAG GTA CAA CTG CAG CAG CCT GGG GCT GAG CTG GTG AAG CCT GGG GCC TCA
   2460          2469          2478          2487          2496          2505

20          25          30 31      CDR1          35 36
Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp
GTG AAG ATG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACA TTT ACC AGT TAC AAT ATG CAC TGG
   2517          2526          2536          2544          2553          2562

40      FR2          45          49 50          52 52A 53 54
Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn
GTA AAA CAG ACA CCT GGT CGG GGC CTG GAA TGG ATT GGA GCT ATT TAT CCC GGA AAT
   2574          2583          2592          2601          2610          2619

55          CDR2          60          65 66      FR3          70
Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys
GGT GAT ACT TCC TAC AAT CAG AAG TTC AAA GGC AAG GCC ACA TTG ACT GCA GAC AAA
   2631          2640          2649          2658          2667          2676

75          80          82 82A 82B 82C 83          85
Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAG CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCG GTC
   2688          2697          2706          2715          2724          2733

90          94 95      CDR3          100 100A 100B 100C 100D 101 102 103
Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly
TAT TAC TGT GCA AGA TCG ACT TAC TAC GGC GGT GAC TGG TAC TTC AAT GTC TGG GGC
   2745          2754          2763          2772          2781          2790

105 FR4          110          113
Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala
GCA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCT GCA
   2802          2811          2820

```

Рис. 5

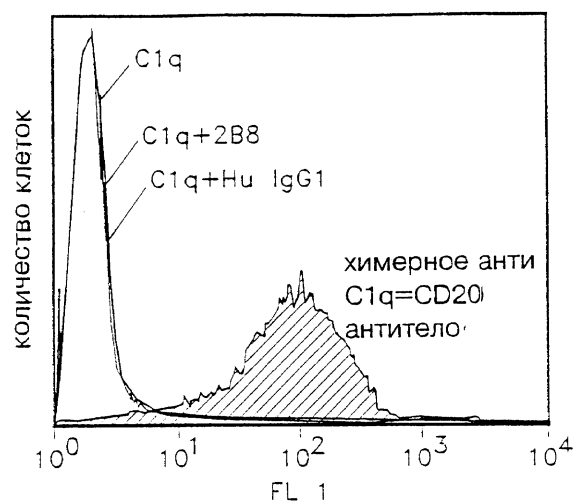


Рис. 6

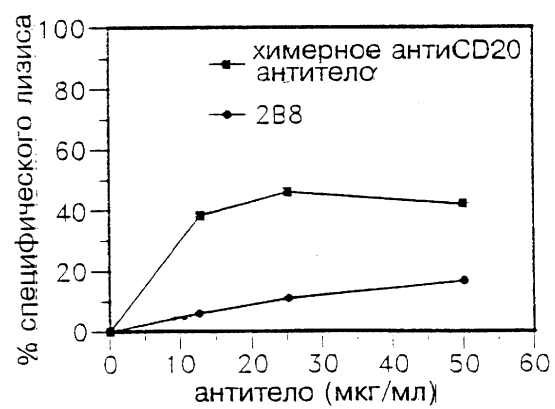


Рис. 7

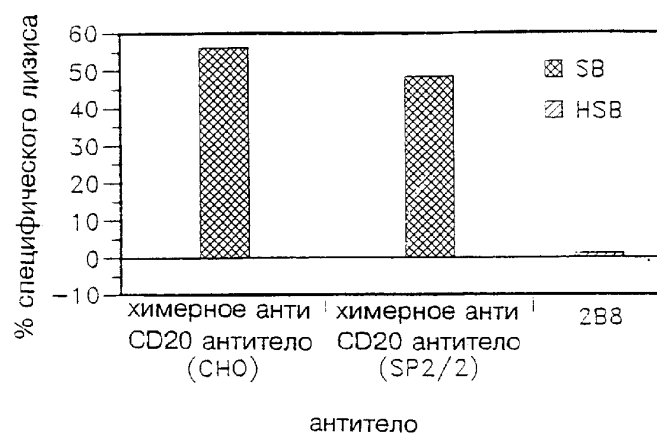


Рис. 8

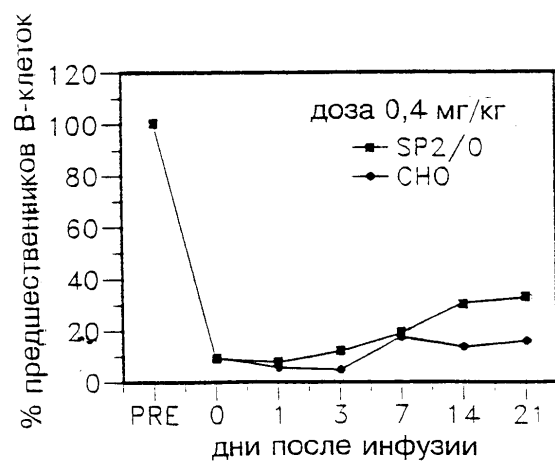


Рис. 9а

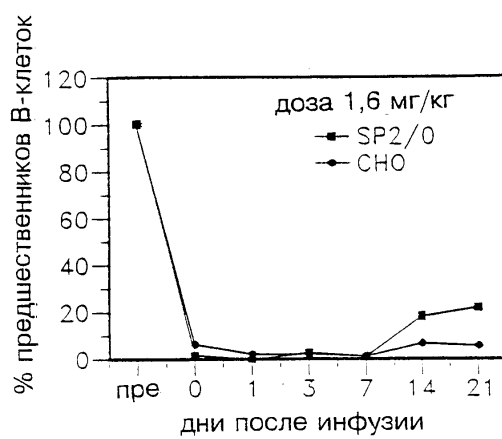


Рис. 9б

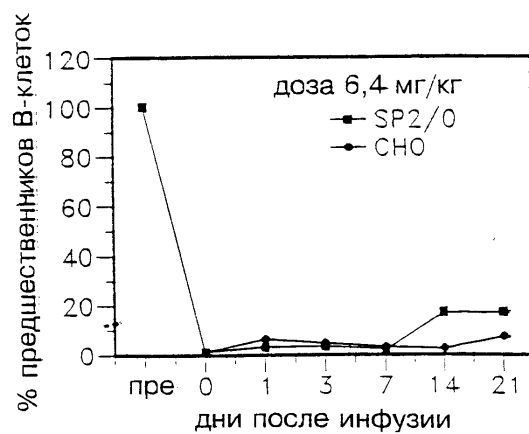


Рис. 9с

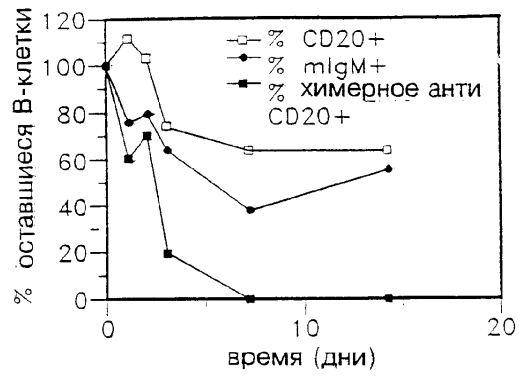


Рис. 10

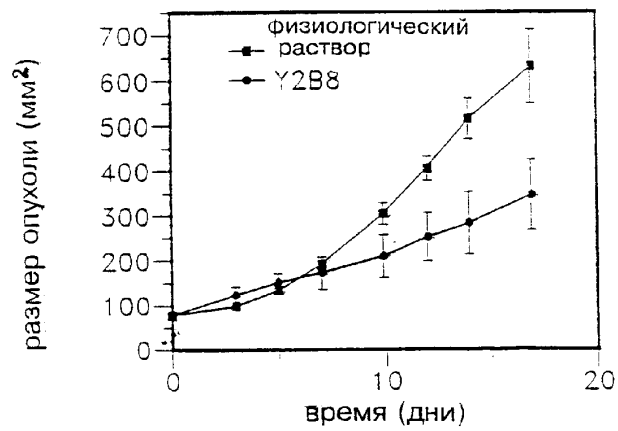


Рис. 11

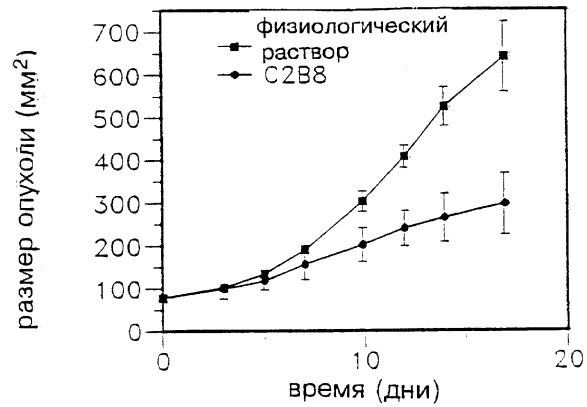


Рис. 12

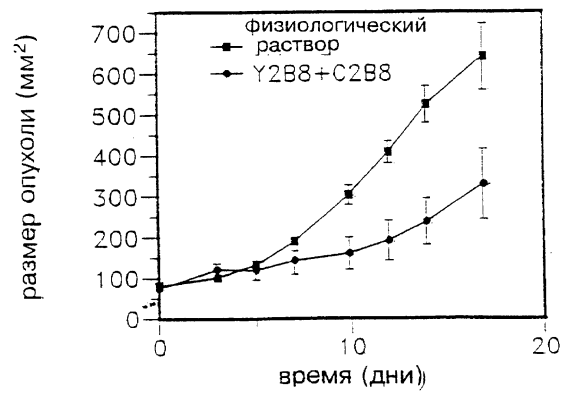


Рис. 13

358

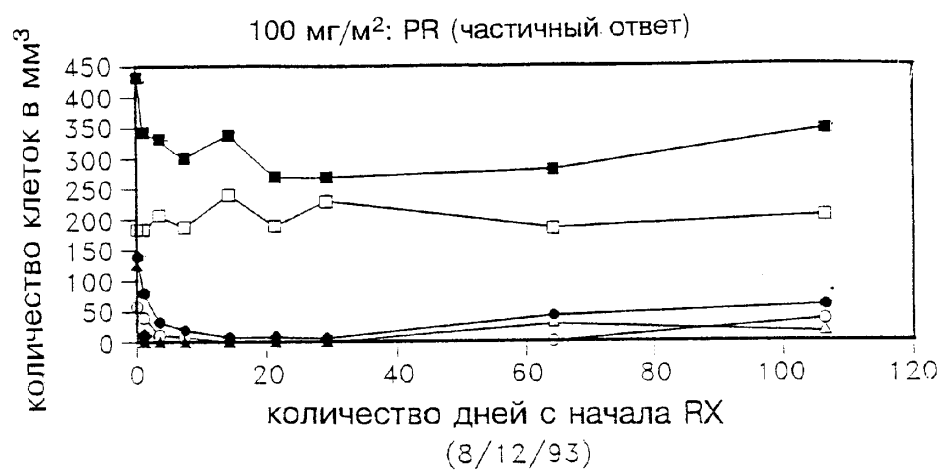


Рис. 14а

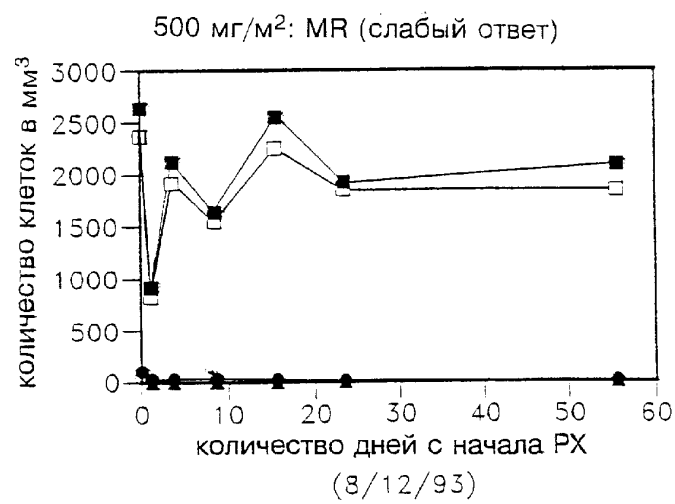


Рис. 14б

