

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 Вр35 ("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, стимулирует 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 вызвать 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, мышиное 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, мышиные моноклональные антитела) обычно не обладают функциональностью эффекторов человека, то есть они не способны при этом дополнять зависимый от комплемента лизис или лизировать клетки-мишени человека посредством неточной 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 мышиных часто ссылаются на наличие ответа анти-мышинных 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 васкуляризированных опухолях; 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 опухолевые 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 необхо-

димость обеспечить высокую степень безопасности при работе с радиоактивными веществами).

Следовательно, для улучшения способности мышинных 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 1F5 "помечали йодом -131 ("131 I") 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-CD-37) Antibody" J. Clin. Onc. 7/8:1027-1038 (1989) (указано, что у одного пациента, которого лечили 1F-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 HAMA); 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: 1219-12223 (1993) (анти-CD20 антитело 1F5, маркированное йодом-131 и B1); 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 йодом-131; в дальнейшем - "Kaminski").

Токсины (то есть химиотерапевтические агенты, например доксорубин или митомицин C) также были конъюгированы 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 практичности 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.

Фиг. 1 - схематическое изображение вектора экспрессии tandemных химерных антител, используемого при получении иммунологически активных химерных антител анти-CD20 ("TCAE 8").

Фиг. 2A-2E - последовательность нуклеиновой кислоты вектора на фиг. 1.

Фиг. 3A-3F - последовательность нуклеиновой кислоты вектора на фиг. 1, далее включающие переменные участки легких и тяжелых цепочек у мыши ("анти-CD20 в TCAE 8").

Фиг. 4 - последовательности нуклеиновой кислоты и аминокислот (включая CDR и константные участки) переменного участка легкой цепочки у мыши, полученные из мышинового моноклонального

антитела 2B8 анти-CD20.

Фиг. 5 - последовательности нуклеиновой кислоты и аминокислот (включая CDR и константные участки) варибельного участка тяжелой цепочки у мыши, полученные из мышинового моноклонального антитела 2B8 анти-CD20.

Фиг. 6 - результаты проточной цитометрии, подтверждающие связывание флуоресцентно маркированного C1q человека с химерным антителом анти-CD20, которое включает в качестве контрольного меченный C1q, меченного C1q с мышинным моноклональным антителом 2B8 анти-CD20 и меченного C1q с человеческим IgG1, k.

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

Фиг.8 представляет результаты клеточной цитотоксичности, опосредованной антителами с эффе́кторными клетками человека *in vivo*, сравнивающие химерное антитело анти-CD20 и 2B8.

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

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

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

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

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

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

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 мышинового (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% тестированных пациентов развивался ответ антимышных антител человека (НАМА) на серотерапию. Press et al. предполагают, что эти антитела, конъюгированные к токсинам или радиоизотопам, могут при-нести более продолжительный клинический положительный эффект, чем неконъюгированное ан-титело.

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, крысы, 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 мечение" 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 Srivag-tava, 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-метилдиотилеи триаминпент уксусной кислоты ("MX-DTPA"); предпочтительные радионуклиды для непрямого мечения включают индий [111] и иттрий [90]. Используемые здесь обе фразы "прямое мечение" и "принцип прямого мечения" означают, что радионуклид ковалентно присоединен непосредственно к антителу (обычно через аминокислотный остаток). Предпочтительные радионуклиды описаны у Srivagtava; а наиболее предпочтительным радионуклидом для прямого мечения является йод [131], ковалентно присоединенный через остатки тирозина. Наиболее предпочтительным является принцип непрямого мечения.

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 внутривагинальное введение. Среди 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 милли-Кюри ("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 йодируемого 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 йода [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 меченного 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 5 мКи, поскольку эта дозировка является безопасной и увеличивает эффективность томографии по сравнению с более низкими дозировками, причем оптимальное изображение получают на третьей-шестой день после введения антител. См., например, J.L. Murray, 26 J. Nuc. Med. 3328 (1985) и Carraguiello, 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 дозировки 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 данные, 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 плаزمиды. 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 Immuno-globulin 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 лимфом, 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 (фосфо-трансфераза 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 собственный эукариотический промотор и область полиаденирования (см. фиг. 1 - схематическое изображение вектора ТСАЕ 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 ТСАЕ 8 использовали константные участки каппа 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. No. 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 вариабельные участки легких и тяжелых цепочек иммуноглобулина, которые обеспечивают переход рамки считывания без изменения аминокислот, обычно присутствующих в цепочках иммуноглобулина.

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

6) Блок MEO 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 C1a 1 и ATO, а именно: ccAcc.)

Перечень полной последовательности TCAE 8 (включая специфические компоненты четырех блоков транскрипции) представлен на фиг. 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 тяжелых цепочек у человека позволяет производить иммунологически активные химерные антитела анти-CD20.

Наиболее предпочтительный вариабельный 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 вариабельные участки легких и тяжелых цепочек мыши, что является наиболее предпочтительным путем включения в вектор TCAE вариабельных 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 вариабельных 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 вариабельные участки мыши, полученные от моноклонального антитела к CD20. Это антитело (описываемое подробно ниже), обозначено как "2B8". Полная последовательность вариабельных участков, полученных от 2B8 в векторе TCAE 8 ("анти-CD20 в TCAE 8") приведена на фиг. 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 мартовской кошки), COS (производную CVI с T-антигеном SV40), R1610 (фибробласты китайского хомяка) BALBC/3T3 (фибробласты мыши), HAK (линию почек хомяка), SP2/0 (миелому мыши), P3x63Ag3.653 (миелому мыши), BFA-clBPT (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 SP2/0. 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. Трансфекцию 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.

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 вариабельных участков, полученных из мышиного моноклонального антитела анти-CD20 ("2B8").

1. Меченные радиоактивными изотопами антитела 2B8 анти-CD20

A. Получение моноклонального антитела анти-CD20 (мышинного) ("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 антитела анти-CD20 - Leu 16, Beck-ton Dickinson, San Jose, CA, Cat. No 7670; and B1. Coulter Corp., Hialeah, FL, Cat. No 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 B1 помечали радиоактивным изотопом I^{125} способом, описанным Valentine, M. A. et al., (1989) *J. Biol. Chem.* 264:11282. (I^{125} Sodium Iodide, ICN, Irvine, CA, Cat. No. 28665H). Проводили скрининг гибридом при совместной инкубации 0,05 мл среды в каждой лунке для сливания вместе с 0,05 мл анти-CD20 B1 (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 клет-ки высевали путем переноса в титрационный планшет с 96 лунками (V&P Scientific, San Diego, CA), тщательно промывали. Двойные лунки, содержащие немеченный анти-CD20 B1, 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".

B. Приготовление конъюгата 2B8-MX-DTPA

i. MX-DTPA

1-изотиоцианатобензил-3-метилдиэтилентри-аминпентауксусную 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 2-5 мМ, которые хранили при -70°C. MX-DTPA также получали от Immunology Coulter (Hialeah, Флорида) как динатриевую 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 50 мМ бисина-NaOff, pH 8,6, содержащий 150 мМ 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 бисина. 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 белок, добавляли до 10,0 мг/мл и хранили при 4°C до использования. Аналогично белок помещали в 50 мМ цитрата натрия, pH 5.5, содержащий 150 мМ 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 1.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 мечения 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 1X HBSS (сбалансированный солевой раствор Хенкса). Клетки разводили до $1-2 \times 10^6$ 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 1X PBS (физиологическим раствором с фосфатным буфером), pH 7,2-7,4, содержащим 1% BSA (бычьего сывороточного альбумина (2 часа). Образцы для анализов разбавляли в 1X 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 1X PBS. Вторичное антитело (козлий антимышиный специфический к IgG1 HRP конъюгат объемом 50 мкл) добавляли в лунки (разбавление 1:1500 в 1X PBS/1% BSA) и инкубировали в течение 1 часа при температуре окружающей среды. Микропланшеты промывали четыре раза в 1X 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 нм после 15-30 минут инкубации. Антиген-отрицательные клетки HSB включали в анализ для мониторинга неупорядоченного 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 антитела) в 0,05 M HCl перемещали в полипропиленовую трубку и добавляли приблизительно одну десятую часть объема 2 M HCl, не содержащего металлов. После инкубации в течение 5 минут добавляли раствор 2 M 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 mM натриевого цитрата в 150 mM 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 mM EDTA к окончательной концентрации 1 mM, а pH реакционной смеси доводили приблизительно до 6,0, используя 2 M 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; 7,5x300 мм или сравнительную колонну TosoHaas) и ограничивающую колонну SEC-250 (7,5x100 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 разбавляли в соотношении 1:10 или 1:20 в растворе, содержащем 1X PBS, или в растворе 1X PBS/ 1 mM DTPA, затем 1 мкл наносили на расстоянии 1,5 см от одного конца полоски бумаги SG ITLC размером 1x5 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-PTPA, 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.

C. 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. Брели 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 2B8-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 четырем группам 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 общее значения активности органа.

ii. Локализация опухоли с помощью I2B8

Определяли локализацию меченного радиоактивными изотопами 2B8-MX-DTPA в тимусэктомизированных мышцах, несущих опухоль В-клеток Ra-mos. Тимусэктомизированным мышцам в возрасте шести-восьми недель вводили подкожно (в левый бок) 0,1 мл PPMI-1640, содержащего $1,2 \times 10^7$ клеток опухоли Ramos, которые предварительно адаптировали для роста в тимусэктомизированных 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 помеченного конъюгата (приблизительно 24 Ки) вводили каждой из 12 тимусэктомизированных мышей, имеющих опухоль В-клеток Ramos. Опухоли располагались по весу в диапазоне от 0,1 до 1,0 граммов. 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 111 In-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 гематопозитическое происхождение.

В лимфатическом узле наблюдали иммуно-реактивность в популяции зрелых корковых В-лимфоцитов, а также в пролиферирующих клетках герминальных центров. Положительную реактивность также наблюдали в периферической кро-ви, 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, околушную железу, простату, тонкую кишку и желудок (данные не представлены).

Обнаружено, что все клетки однослойного эпителия, так же 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).
4. Трансплантация PSC или аутогенного BM (в случае необходимости основанная на абсолютном подсчете нейтрофилов менее 500 в мм^3 в течение трех последовательных дней или тромбоцитов менее 20000 в мм^3 , 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 дозирования) для четырех дозировок или общей суммарной дозировки 80 м Ки.
4. Трансплантация PSC или аутогенного BM (основанная на решение практикующего врача).

Уровни дозирования Y2B8 были следующими:

Уровень дозирования	Дозировки (мКи)
1	10
2	15
3	20

Необходимо провести лечение троих пациентов на каждом из уровней дозирования 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 см^3 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 томографию, 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 компартиментализацию в отдельном органе; (3) наилучшее субъективное разрешение изображения патологического изменения (сравнение опухоль/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, 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 thio-cyanate-phenolchloroform 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 VL (SEQ. ID. NO. 4)

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

(подчеркнутая часть является сайтом Wl Bsi.).

См. фиг. 1 и 2 для соответствующих сайтов Bgl II и Wl Bsi в TCAE 8 и фиг. 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 секвенировали. Определяемая последовательность ДНК для вариабельных участков легких цепочек мыши изображена на фиг. 4 (SEQ. ID. NO. 5); см. также фиг. 3, нуклеотиды от 978 до 1362. На фиг. 4 также показаны последовательности аминокислот этого вариабельного участка, а также каркасные участки и участки CDR. Вариабельные участки легких цепочек мыши из 2B8 расположены в семействе каппа VI мыши. См. Kabat, выше.

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

1. Смысловой VH (SEQ. ID. NO. 6)

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

(подчеркнутая часть является сайтом Mlu I).

2. Антисмысловой 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. фиг. 1 и 2 для соответствующих сайтов Mlu I и Nhe I в TCAE 8 и фиг. 3 для соответствующих сайтов в анти-CD20 в TCAE 8.

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

B. 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 No 910456PK); клетки миеломы мыши SP2/0 выращивали в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла ("DMEM") (Irvine Scientific, Santa Ana, Ca, Cat. No 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 микрофарад, 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. No 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 1129 химерного анти-CD20 и сравнивали с меченым радиоактивными изотопами 2B8 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.B показывают, что химерные антитела анти-CD20 были получены из трансферком 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 хомяка 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. No A400, а метку FITC от Sigma, St. Louis MO, Prod. No 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 FACScan™ (флуоресцию 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 нат-рия) 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 FACScan™ и составляли инструкции для их получения. Результаты представлены на фиг. 6.

Результаты на фиг. 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 ^{51}Cr путем смешивания 100 мкКи ^{51}Cr с 1×10^6 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 ^{51}Cr -labeled allogenic target cells in vitro." *Immunology* 14:181-189 (1968). Результаты представлены на фиг. 7.

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

iii. Анализ эффектов 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 ^{51}Cr . Анализ проводили согласно протоколу, описанному в Brunner, K.T. et al., "Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on ^{51}Cr -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 ^{51}Cr) в конце 4 часа инкубации при 37°C. Этот эффект наблюдали для антитела, полученного из яичника китайского хомяка 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 фиг. 8.

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

III. Истощение клеток *in vivo* с помощью химерного анти-CD20

A. 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 *synomolgus* 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-й 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-CD20: CHO

Шесть обезьян *synomolgus* весом от 4 до 6 килограммов (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 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 *synomolgus* (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. McMichael, Ed. (Oxford University Press, Oxford UK 1987), p. 302.

Флуоресцентное мечение антител лимфоидной клеточной популяции

После удаления плазмы лейкоциты дважды промывали сбалансированным солевым раствором Хенкса ("HBSS") и повторно суспендировали 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 козье 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 фиксации (0,15 M NaCl, 1% параформальдегида, pH 7,4) и анализировали на приборе Becton Dickinson FACScanTM. Популяции лимфоцитов первоначально обнаруживали путем прямого перпендикулярного светорассеяния угла в точечно-графическом растре с непомеченными 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 СНО 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 СНО 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 фиг. 9А, В и С представлены результаты, полученные при исследовании химерного анти-CD20: СНО и SP2/0. Фиг. 9А относится к уровню дозы 0,4 мг/кг; фиг. 9В - к уровню дозы 1,6 мг/кг и фиг. 9С - к уровню дозы 6,4 мг/кг.

Как видно из фиг. 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 фиг. 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 табл. 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	Анти-Hu IgG+ Анти-Hu IgM*	Leu-16	% Истощение В-клеток
А	0,4 мг/кг (4 дозы)	предварительное обескровливание	81,5	-	-	9,4	0
		0	86,5	0,2	0,3	0,0	97
		7	85,5	0,0	0,1	1,2	99
		21	93,3	-	-	2,1	78
		28	85,5	-	-	4,1	66
В	0.4 мг/кг (4 дозы)	предварительное обескровливание	81,7	-	-	14,8	0
		0	94,6	0,1	0,2	0,1	99
		7	92,2	0,1	0,1	0,1	99
		21	84,9	-	:	6,9	53
		28	84,1	-	-	8,7	41
С	6.4 мг/кг (1 доза)	предварительное обескровливание	77,7	0,0	0,2	17,0	0
		7	85,7	0,1	0,1	0,0	99
		21	86,7	-	-	14,7	15
		28	76,7	-	-	8,1	62
D	6.4 мг/кг (1 доза)	предварительное обескровливание	85,7	0,1	0,1	14,4	0
		7	94,7	0,1	0,2	0,0	99
		21	85,2	-	-	9,2	46
		28	85,9	-	-	6,7	53

* Двойное окрашивание популяции указывает на степень покрытия В-клетками химерными анти-CD-20

Данные, представленные в табл. 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-й день.

В табл. 2 представлено воздействие иммунологически активных химерных антител анти-CD20 на популяции клеток лимфоузлов при использовании режима лечения, приведенного в табл. 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 2

Популяция клеток лимфоузлов

Обезьяна	Доза	День	CD2	Анти-Hu IaG	Анти-Hu IgG+ Анти-Hu IgM	Leu-16	% подавления В-лимфоцитов
А	0,4 мг/кг	7	66,9		7,4	40,1	1
	(4 дозы)	14	76,9	19,6	0,8	22,6	44
		28	61,6	19,7		26,0	36
В	0.4 мг/кг	75	9,4	-	29,9	52,2	0
	(4 дозы)	14	83,2	9,9	0,7	14,5	64
		28	84,1	15,7	-	14,6	64
С	6.4 мг/кг	77	5,5	-	22,3	35,2	13
	(1 доза)	14	74,1	17,9	1,1	23,9	41
		28	66,9	23,1	-	21,4	47

Продолжение табл. 2

Обезьяна	Доза	День	CD2	Анти-Hu IaG	Анти-Hu IgG+ Анти-Hu IgM	Leu-16	% подавления В-лимфоцитов
D	6.4 мг/кг	7	83,8	-	12,5	19,7	51
	(1 доза)	14	74,1	17,9	0,2	8,7	78
		28	84,1	12,8	-	12,9	68
Здоровые Лимфоузлы							
Контрольный 1							
Подмышечный	-	-	55,4	-	25,0	41,4	нет данных
Паховый	-	-	52,1	-	31,2	39,5	нет данных
Здоровый костный мозг Контрольный 2	-	-	65,3	-	19,0	11,4	нет данных
Контрольный 3	-	-	29,8	-	28,0	16,6	нет данных

Результаты табл. 2 показывают эффективное истощение В-лимфоцитов при обоих режимах лечения. Табл. 2 также показывает, что у приматов кроме че-ловека 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-й 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 табл. 2 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 табл. 3 приведены исследования результатов введения высокой дозы химерного анти-CD20.

Таблица 3

Популяции клеток лимфоузлов и костного мозга
Популяции лимфоцитов (%)

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

27946

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 Leu 16.

^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-й день после прекращения лечения обнаружили менее 5% В-клеток по сравнению с 40% в контрольных лимфоузлах (см. табл. 2 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. табл. 2 выше). Из животных, которых исследовали на 36-й день после прекращения лечения, одно животное (Н) 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 клетки 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 лимфомы, 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 фиг. 14; данные пациента, проявляющего PR, представлены на фиг. 14A: для пациента, проявляющего MR, данные приведены на фиг. 14B. На фиг. 14 указано: ■=лимфоциты; ⊞=D3+клетки (Т-клетки);

▲=CD20+клетки; ●=CD19+клетки; ⊖=каппа; ▲=лямбда и ◆=C2B 8. 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 фазе 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 определений 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 (мышы 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, CPL 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 1,7x10⁶ 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 пассировали 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 10×10^6 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 $2,0 \times 10^6$ 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 область левого бока животного. Опухоли развивались приблизительно через две недели. Опухоли иссекали и обрабатывали, как описано выше. Исследуемые мыши получали инъекции $1,67 \times 10^6$ 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 каждой 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);

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 калвернометр.

Подготовка материалов для введения производилась 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 2M 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 2M ацетата натрия. Концентрацию радиоактивности определяли путем растворения 5,0 мкл реакционной смеси в 2,5 мл 1xPBS, содержащего 75 мг/мл HSA и 1 mM DTPA ("рецептурный буфер"). Подсчет выполняли, добавляя 10,0 мкл к 20 мл коктейля сцинтилляции Ecolume. 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 02B8

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 2,6 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 фиг. 11 (Y2B8 по сравнению с физиологическим раствором), фиг. 12 (C2B8 по сравнению с физиологическим раствором); и фиг. 13 (Y2B8+C2B8 по сравнению с физиологическим раствором). Также определяли стандартную погрешность.

Как указано на фиг. 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 большой 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, доксорубицин, винкристин и преднизон, см. Amitage, 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 TCAE 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 TCAE 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 Reft и William H Rastellei

(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: Burgoon, 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: 8546 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

JACGTGGGGG	CCGCTCTAGG	CCTCCAAAAA	AGCCTCCTCA	CTACTTCTGG	AATAGCTCAG	60
AGGCTTAGGC	GGCCTCGGCC	TCTGCATAAA	TAAAAAAAT	TAGTCAGCCA	TGCATGGGGC	120
GGAGAATGGG	CGGAACGGG	CGGAGTTAGG	GGCGGGATGG	GCGGAGTTAG	GGCGGGGACT	180
ATGGTTGCTG	ACTAATTGAG	ATGCATGCTT	TGCATACTTC	TGCCTGCTGG	GGAGCCTGGG	240
GACTTTCCAC	ACCTGGTTGC	TGACTAATTG	AGATGCATGC	TTTGCATACT	TCTGCCCTGCT	300
GGGGAGCCTG	GGGACTTTCC	ACACCCTAAC	TGACACACAT	TCCACAGAAT	TAATTCCCTT	360
AGTTATTAAT	AGTAATCAAT	TACGGGGTCA	TTAGTTCATA	GCCCATATAT	GGAGTTCCGC	420
GTTACATAAC	TTACGGTAAJ	TGGCCCCGCT	GGCTGACCGC	CCAACGACCC	CGCCCCATTG	4
ACGTCAATAA	TGACGTATGT	TCCCATAGTA	ACGCCAATAG	GGACTTTCCA	TTGACGTCAA	5
TGGGTGGACT	ATTTACGGTA	AACTGCCCCAC	TTGGGAGTAC	ATCAAGTGTA	TCATATGCCA	600
AGTACGCCCC	CTATTGACCT	CAATGACGGT	AAATGGCCCCG	CCTGGCATTG	TGCCAGTAC	660
ATGACCTTAT	GGGACTTTCC	TACTTGGCAG	TACATCTACG	TATTAGTCAT	AGCTATTACC	720
ATGGTGATGC	GGTTTTGGCA	GTACATCAAT	GGGCGTGGAT	AGCGGTTTGA	CTCACGGGGA	780
TTTCCAAGTC	TCCACCCCAT	TGACGTCAAT	GGGAGTTTGT	TTTGGCACCA	AAATCAACGG	840
GACTTTCCAA	AATGTCGTAA	CAACTCCGCC	CCATTGACGC	AAATGGGCGG	TAGGCSTGTA	900
TGGTGGGAGG	TCTATATAAG	CAGAGCTGGG	TACGTGAACC	GTCAGATCSC	CTGGAGACSC	960
CATCACAGAT	CTCTCACCAT	GAGGGTCCCC	GCTCAGCTCC	TGGGGCTCCT	GCTGCTCTGG	1020
CTCCCAGGTG	CACGATGTGA	TGGTACCAAG	GTGGAAATCA	AACGTACGGT	GGCTGCACCA	1080
TCTGTCTTCA	TCTTCCCACC	ATCTGATGAG	CAGTTGAAAT	CTGGAACTGC	CTCTGTGTGT	1140
TGCCTGCTGA	ATAACTTCTA	TCCCAGAGAG	GCCAAAGTAC	AGTGCAAGGT	GGATAAATCC	1200
CTCCAATCCG	GTAACCTCCN	GGAGAGTGTC	ACAGAGCAGG	ACAGCAAGGA	CAGCACTTAC	1260

AGCCTCAGCA	GCACCTTGAC	GCTGAGCAAA	GCAGACTACG	AGAAACACAA	AGTCTACGCC	1320
TGCGAAGTCA	CCCATCAGGG	CCTGAGCTCG	CCCGTCACAA	AGAGCTTCAA	CAGGGGAGAG	1380
TGTTGAATTC	AGATCCGTTA	ACGGTTACCA	ACTACCTAGA	CTGGATTTCG	GACAACATGC	1440
GGCCGTGATA	TCTACGTATG	ATCAGCCTCG	ACTGTGCCTT	CTAGTTGCCA	GCCATCTGTT	1500
GTTTGCCCCC	CCCCCGTGCC	TTCCCTGACC	CTGGAAGGTG	CCACTCCCAC	TGTCCTTTCC	1560
TAATAAAATG	AGGAAATTGC	ATCGCATTTG	CTGAGTAGGT	GTCAATTCTAT	TCTGGGGGGT	1620
GGGGTGGGGC	AGGACAGCAA	GGGGGAGGAT	TGGGAAGACA	ATAGCAGGCA	TGCTGGCGAT	1680
GCGGTGGGCT	CTATGGAACC	AGCTGGGGCT	CGACAGCTAT	GCCAAGTACG	CCCCCTATTG	1740
ACGTCAATGA	CGGTAAATGG	CCCGCCTGGC	ATTATGCCCC	GTACATGACC	TTATGGGACT	1800
TTCTTACTTG	GCAGTACATC	TACGTATTAG	TCATCGGTAT	TACCATGGTG	ATGCGGTTTT	1860
GGCAGTACAT	CAATGGGCGT	GGATAGCGGT	TTGACTCAGC	GGGATTTCCA	AGTCTCCACC	1920
CCATTGACGT	CAATGGGAGT	TTGTTTTGGC	ACCAAAATCA	ACGGGACTTT	CCAAAATGTC	1980
GTAACAACTC	CGCCCCATTG	ACGCAAATGG	GCGGTAGGCG	TGTACGGTGG	GAGGTCTATA	2040
TAAGCAGAGC	TGGGTACGTC	CTCACATTCA	GTGATCAGCA	CTGAACACAG	ACCCGTCGAC	2100
ATGGGTTGGA	GCCTCATCTT	GCTCTTCCTT	GTGGCTGTTG	CTACGCGTGT	CGCTAGCACC	2160
AAGGGCCCAT	CGGTCTTTCC	CCTGGCACCC	TCCTCCAAGA	GCACCTCTGG	GGGCACAGCG	2220
GCCCTGGGCT	GCCTGGTCAA	GGACTACTTC	CCCGAACCGG	TGACGGTGTC	GTGGAACTCA	2280
GGCCCCCTGA	CCAGCGGCGT	GCACACCTTC	CCGGCTGTCC	TACAGTCCTC	AGGACTCTAC	2340
TCCCTCAGCA	GCSTGGTGAC	CGTGCCCTCC	AGCAGCTTGG	GCACCCAGAC	CTACATCTGC	2400
AACGTGAATC	ACAAGCCCAG	CAACACCAAG	GTGGACAAGA	AAGCAGAGCC	CAAATCTTGT	2460
GACAAAACTC	ACACATGCCC	ACCGTGCCCA	GCACCTGAAC	TCCTGGGGGG	ACCGTCAGTC	2520
TTCTCTTTCC	CCCCAAAACC	CAAGGACACC	CTCATGATCT	CCCCGACCCC	TGAGGTCACA	2580
TGCCTGGTGG	TGGACGTGAG	GCACGAAGAC	CCTGAGGTCA	AGTTCAACTG	GTACGTGGAC	2640
GGCGTGAAG	TGCATAATGC	CAAGACAAAG	CCCGGGGAGG	AGCACTACAA	CAGCACGTAC	2700
CGTGTGGTCA	GCGTCCTCAC	CGTCCTGCAC	CAGGACTGGC	TGAATGGCAA	GGAGTACAAG	2760
TGCAAGGTCT	CCAACAAAGC	CCTCCCAGCC	CCCATCGAGA	AAACCATCTC	CAAAGCCAAA	2820
GGGCAGCCCC	GAGAACCACA	GGGTGTACAC	CTGCCCCCAT	CCCGGGATGA	GCTGACCAAG	2880
AACCAGGTCA	GCCTGACCTG	CCTGGTCAAA	GGCTTCTATC	CCAGCGACAT	CGCCGTGGAC	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	GACCCCTGGA	GGTGCCACTC	3300
CCACTGTCTT	TTCTAATAA	AATGAGGAAA	TTGCATCGCA	TTGTCTGAGT	AGGTGTCATT	3360
CTATTCTGGG	GGGTGGGGTG	GGGCAGGACA	GCAAGGGCGA	GGATTGGGAA	GACAATACCA	3420
GGCATGCTGG	GGATGCGGTG	GGCTCTATGG	AACCAGCTGG	GGCTCGACAG	CGCTGGATCT	3480
CCCGATCCCC	AGCTTTGCTT	CTCAATTTCT	TATTTGCATA	ATGAGAAAAA	AAGGAAAAAT	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	GTTCCTCTTC	ACATTTGCTT	3840
CTGACATAGT	TGTGTTGGGA	GCTTGGATAG	CTTGGACAGC	TCAGGGCTGC	GATTTCCGGC	3900
CRAACTTGAC	GGCAATCCTA	GCGTGAAGGC	TGGTAGGATT	TTATCCCCGC	TGCCATCATG	3960
GTTCGACCAT	TGAACTGCAT	CGTCGCCGTG	TCCCCAAAATA	TGGGGATTGG	CAAGAACCGA	4020
GACCTACCCT	GGCCTCCGCT	CAGGAACGAG	TTCAAGTACT	TCCAAAGAAT	GACCACAACC	4080
TCTTCAGTGG	AAGGTAAACA	GAATCTGGTG	ATTATGGGTA	GGAAAACCTG	GTTCTCCATT	4140
CCTGAGAAGA	ATCGACCTTT	AAAGGACAGA	ATTAATATAG	TTCTCAGTAG	AGAACTCAAA	4200
GAACCACCAC	GAGGAGCTCA	TTTTCTTTGCC	AAAAGTTTGG	ATGATGCCTT	AAGACTTATT	4260
GAACAACCGG	AATTGGCAAG	TAAAGTAGAC	ATGGTTTGGG	TAGTCGGAGG	CAGTTCTGTT	4320
TACCAGGAAG	CCATGAATCA	ACCAGGCCAC	CTTAGACTCT	TTGTGACAAG	GATCATGCGG	4380
GAATTTGAAA	GTGACACGTT	TTTCCCAGAA	ATTGATTTGG	GGAAATATAA	ACTTCTCCCA	4440
GAATACCCAG	GCGTCTCTCT	TGAGGTCCAG	GAGGAAAAAG	GCATCAAGTA	TAAGTTTGAA	4500
GTCTACGAGA	AGAAAGACTA	ACAGGAAGAT	GCTTTCAAGT	TCTCTGCTCC	CCTCCTAAAG	4560
CTATGCATTT	TTATAAGACC	ATGGGACTTT	TGCTGGCTTT	AGATCAGCCT	CGACTGTGCC	4620
TTCTAGTTGC	CAGCCATCTG	TTGTTTGCCC	CTCCCCCGTG	CCTTCTTTGA	CCCTGGAAGG	4680
TGCCACTCCC	ACTGTCCTTT	CCTAATAAAA	TGAGGAAATT	GCATCGCATT	GTCTGAGTAG	4740
GTGTCATTCT	ATTCTGGGGG	GTGGGGTGGG	GCAGGACAGC	AAGGGGGAGG	ATTGSGAAGA	4800
CAATAGCAGG	CATGCTTGGG	ATGCGGTGGC	CTCTATGGAA	CCAGCTGGGG	CTCGAGCTAC	4860
TAGCTTTGCT	TCTCAATTTT	TTATTTGCA	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	AGGGCCAAATC	TGCTCACACA	GGATAGAGAG	GGCAGGAGCC	5160
AGGGCAGAGC	ATATAAGGTG	AGGTAGGATC	AGTTGCTCCT	CACATTGCT	TCTGACATAG	5220
TTGTCTGGG	AGCTTGGATC	GATCCTCTAT	GATTGAACAA	GATGGATTGC	ACGCAGGTTT	5280
TGGGGGGCT	TGGGTCCAGA	GGCTATTCCG	CTATGACTGG	GCACAACACA	CAATCGGCTG	5340
CTCTGATGCC	GCCGTGTTCC	GGCTGTCCAG	GCAGGGGGCG	CCGGTTCTTT	TTGTCAAGAC	5400
CGACCTGTCC	GGTGCCCTGA	ATGAACCTCA	GGACGAGGCA	GCGCGGCTAT	CCTGGCTGGC	5460
CACGACGGGC	GTTCCTTGGG	CAGCTGTGCT	CGACCTTCTC	ACTGAAGCGG	GAAGGGACTG	5520
GCTGCTATTG	GGCGAAGTGC	CGGGGCAGGA	TCTCCTGTCA	TCTCACCTTG	CTCCTGCCGA	5580
GAAAGTATCC	ATCATGGCTG	ATGCAATGCG	GCGGCTGCAT	ACGCTTGATC	CGGCTACCTG	5640
CCGATTCCAC	CACCAAGCGA	AACATCCCAT	CGACCGAGCA	CGTACTCGGA	TGGAAGCCCG	5700
TCTTCTCGAT	CAGGATGATC	TGGACGAAGA	GCATCAGGGG	CTC3CGCCAG	CCGAACCTTT	5760
CGCCAGGCTC	AAGGGGGCGA	TGCCCCAGCG	CGAGGATCTC	GTCGTGACCC	ATGGCGATGC	5820
CTGCTTGCCG	AATATCATGG	TGGAAAATGG	CCGCTTTTCT	GGATTGATCG	ACTGTGGCCG	5880
GCTGGGTGTG	CCGACCCGCT	ATCAGGACAT	AGCGTTGGCT	ACCCGTGATA	TTGCTGAAGA	5940
GCTTGGGGCG	GAATGGGCTG	ACCGCTTCCT	CCTGCTTTCAC	GGTATCGCCG	CTCCCGATTC	6000
GCAGCGCATC	GCCTTCTATC	GCCTTCTTGA	CGAGTTCTTC	TGAGCGGGAC	TCTGGGGTTC	6060
GAAATGACCG	ACCAAGCGAC	GCCCAACCTG	GCATCAGGAG	ATTTCGATTC	CACCGCCGCC	6120
TTCTATGAAA	GTTTGGGCTT	CGGAATCCTT	TTCCGGGACG	CCGGCTGGAT	GATCCTCCAG	6180
TCCGGGGATC	TCATGCTGGA	GTCTTCCGCC	CACCCCAACT	TGTTTATTGC	AGCTTATAAT	6240
GTTACAAAAT	AAAGCAATAG	CATCACAAAT	TTACACAAATA	AAGCATTTTT	TTCACTGCAT	6300
TCTAGTTGTG	GTTTGTCCAA	ACTCATCAAT	CTATCTTATC	ATGTCTGGAT	CGCGGGCGCG	6360
ATCCCGTCCA	GAGCTTGGCG	TAATCATGGT	CATAGCTGTT	TCTGTGTGA	AATTGTTATC	6420
CGCTCACAAT	TCCACACAAC	ATACGAGCCG	GAAGCATAAA	GTGTAAAGCC	TGGGGTTCCT	6480
AATGAGTGAG	CTAACTCACA	TTAATTGCTT	TGCGCTCACT	GGCGGCTTTC	CAGTCGGGAA	6540
ACCTGTCTGT	CCAGCTGCAT	TAATGAATCG	GCCAACGCGC	GGGAGAGGC	GTTTTGCCTA	6600
TTGGGGGCTC	TTCCGGCTTC	TGCTCACTG	ACTCGCTGCG	CTCGGTCTTT	CGGCTCGGGC	6660
GAGCGTATC	AGCTCACTCA	AAGGCGGTAA	TACGGTTATC	CACAGAATCA	GGGGATAACG	6720
CAGGAAAGAA	CATGTGAGGA	AAAGGCCAGC	AAAAGGCCAG	GAACCGTAAA	AAGGCCGCGT	6780
TGCTGGGCTT	TTTCCATAGG	CTCCGGCCCC	CTGACGAGCA	TCACAAAAAT	CGACGCTCAA	6840
CTCAGAGGTG	GCGAAACCCG	ACAGGACTAT	AAAGATACCA	GGCGTTTCCC	CCTGGAAGCT	6900
CGCTCGTGCG	CTCTCCTGTT	CGGACCCCTG	CGCTTACCGG	ATACCTGTCC	GCCTTTCTCC	6960

CTTCGGGAAG	CCTGGCGGCTT	TCTCAATGCT	CACGCTGTAG	GATCTCTCAGT	TCGGTGTAGG	7020
TCGTTCCGTC	CAAGCTGGGC	TGTGTGCACG	AACCCCCCGT	TCAGCCCCGAC	CGCTGCCGCT	7080
TATCCGGTAA	GTATCGTCTT	GAGTCCAACC	CGGTAAGACA	CGACTTATCG	CCACTGGCAG	7140
CAGCCACTGG	TAACAGGATT	AGCAGAGCGA	GGTATGTAGG	CGGTGCTACA	GAGTTCTTGA	7200
ASTGGTGGCC	TAACACGGC	TACACTAGAA	GCACAGTATT	TGGTATCTGC	GCTCTGCTGA	7260
AGCCAGTTAC	CTTCGGGAAA	AGAGTTGGTA	GCTCTTGATC	CGGCAAACAA	ACCACCGCTG	7320
GTAGCCGTGG	TTTTTTTGGT	TGCAAGCAGC	AGATTACGGC	CAGAAAAAAA	GGATCTCAAG	7380
AAGATCCTTT	GATCTTTTCT	ACGGGGTCTG	ACGCTCAGTG	GAACGAAAAAC	TCAGCTTAAG	7440
GGATTTTGGT	CATGAGATTA	TCAAAAAGGA	TCTTCACCTA	GATCCTTTTA	AATTAAAAAT	7500
GAAGTTTTAA	ATCAATCTAA	AGTATATATG	AGTAAACTTG	GTCTGACAGT	TACCAATGCT	7560
TAATCAGTGA	GGCACCTATC	TCAGCGATCT	GTCTATTTCC	TTCTTCCATA	GTTGCCGTGAC	7620
TCCCCCTCCT	GTAGATAACT	ACGATACGGG	AGGGCTTACC	ATCTGGCCCC	AGTGCTGCAA	7680
TGATACCGCG	AGACCCACGC	TCACCGGCTC	CAGATTTATC	AGCAATAAAC	CAGCCAGCCG	7740
GAAGGGCCGA	GCGCAGAAGT	GGTCCTGCAA	CTTTATCCGC	CTCCATCCAG	TCTATTAATT	7800
GTTGCCGGGA	AGCTAGAGTA	AGTAGTTCCG	CAGTTAATAG	TTTGCGCAAC	GTTGTTGCCA	7860
TTGCTACAGG	CATCGTGGTG	TCACGCTCCT	CGTTTGGTAT	GGCTTCATTC	AGCTCCGGTT	7920
CCCAACGATC	AAGGCGAGTT	ACATGATCCC	CCATGTTGTG	CAAAAAAGCG	GTTAGCTCCT	7980
TGGTCTCTCC	GATCGTTGTC	AGAAGTAACT	TGGCCGCACT	GTTATCACTC	ATGGTTATGG	8040
CAGCACTGCA	TAATTCTCTT	ACTGTCATGC	CATCCGTAAG	ATGCTTTTCT	GTGACTGGTG	8100
AGTACTCAAC	CAAGTCATTC	TCAGAAATAGT	GTATGCCGGC	ACCGAGTTGC	TCTTGCCCCG	8160
CGTCAATACG	GGATAATACC	GCGCCACATA	GCAGAACCTT	AAAAGTGCTC	ATCATTTGAA	8220
AACSTTCTTC	GGGCGGAAAA	CTCTCAAGGA	TCTTACCGCT	GTTGAGATCC	AGTTCCATGT	8280
AACCCACTCG	TCCACCCAAC	TGATCTTCAG	CATCTTTTAC	TTTCACCAGC	GTTTCTGGGT	8340
GAGCAAAAAC	AGGAAGGCAA	AATGCCGCAA	AAAAGGGAAT	AAGGGCGACA	CGGAAATGTT	8400
GAATACTCAT	ACTCTTCCTT	TTTCAATATT	ATTGAAGCAT	TTATCAGGGT	TATTGTCTCA	8460
TGAGCGGATA	CATATTTGAA	TGTATTTAGA	AAAATAAACA	AATAGGGGTT	CCCGCCACAT	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
(D) Топология: круговая

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: ДНК (геномная)

(iii) ГИПОТЕТИЧЕСКАЯ: да

(iv) АНТИ-СМЫСЛОВАЯ: нет

(ix) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID № 2

GACGTCGCGG	CCGCTCTAGG	CCTCCAAAA	AGCCTCCTCA	CTACTTCTGG	AATAGCTCAG	60
AGGCCGAGGC	GGCCTCGGCC	TCTGCATAAA	TAAAAAAAT	TAGTCAGCCA	TGCATGGGGC	120
GGAGAATGGG	CGGAACCTGG	CGGAGTTAGG	GGCGGGATGG	GCGGAGTTAG	GGGCCGGACT	180
ATGGTTGCTG	ACTAATTGAG	ATGCATGCTT	TGCATACTTC	TGCCTGCTGG	GGAGCCTGGG	240
GACTTTCCAC	ACCTGGTTGC	TGACTAATTG	AGATGCATGC	TTTGCACTACT	TCTGCCTGCT	300
TGGGAGCCTG	GGGACTTTCC	ACACCCTAAC	TGACACACAT	TCCACAGAAT	TAATTCCGCT	360
AGTTATTAAT	AGTAATCAAT	TACGGGGTCA	TTAGTTTCATA	GCCCATATAT	GGAGTTCCGC	420
GTTACATAAC	TTACGGTAAA	TGGCCCCGCT	GGCTGACCCG	CCAACGACCC	CCGCCCCATTG	480
ACGTCAATAA	TGACGTATGT	TCCCATAGTA	ACGCCAATAG	GGACTTTCCA	TTGACGTCAA	540
TGGGTGGACT	ATTTACGGTA	AACTGCCCAC	TTGGCAGTAC	ATCAAGTGTA	TCATATGCCA	600
AGTACGCCCC	CTATTGACGT	CAATGACGGT	AAATGGCCCC	CCTGGCATTA	TGCCCAGTAC	660
ATGACCTTAT	GGGACTTTCC	TACTTGGCAG	TACATCTACG	TATTAGTCAT	CGCTATTACC	720
ATGGTGATGC	GGTTTTGGCA	GTACATCAAT	GGGCGTGGAT	AGCGSTTTGA	CTCACGGGGA	780
TTTCCAAGTC	TCCACCCCAT	TGACGTCAAT	GGGAGTTTGT	TTTGGCAGCA	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	GTCTCTCTCC	AGTCTCCAGC	AATCCTGTCT	1080
GCATCTCCAG	GGGAGAAGGT	CACAAATGACT	TGCAGGGCCA	GCTCAAGTGT	AAGTTACATC	1140
CACTGGTTCC	AGCAGAAGCC	AGGATCCTCC	CCCMAACCCCT	GGATTTATGC	CACATCCAAC	1200
CTGGCTTCTG	GAGTCCCTGT	TGCTTTCACT	GGCAGTGGGT	CTGGGACTTC	TTACTCTCTC	1260
ACAATCAGCA	GAGTGGAGGC	TGAAGATGCT	GCCACTTATT	ACTGCCAGCA	GTGGACTAGT	1320
AACCCACCCA	CGTTCGGAGG	GGGGACCAAG	CTGGAAATCA	AACGTACGGT	GGCTGCACCA	1380
TCTGTCTTCA	TCTTCCCGCC	ATCTGATGAG	CAGTTGAAAT	CTGGAACTGC	CTCTGTTGTG	1440

TGCTTGCTGA	ATAACTTCTA	TCCAGAGAG	GCCAAAGTAC	AGTGGAAAGGT	GGATAACGCC	1500
CTCCAATCGG	GTAACCTCCA	GGAGAGTGTC	ACAGAGCAGG	ACAGCAAGGA	CAGCACCTAC	1560
AGCCTCAGCA	GCACCCTGAC	GCTGAGCAAA	GCAGACTACG	AGAAACACAA	AGTCTACGCC	1620
TGCGAAGTCA	CCCATCAGGG	CCTGAGCTCG	CCCCTCACAA	AGAGCTTCAA	CAGGGGAGAG	1680
TGTTGAAATC	AGATCCGTTA	ACGGTTACCA	ACTACCTAGA	CTGGATTCTT	GACAACATCC	1740
GGCCGTGATA	TCTACGTATG	ATCAGCCTCG	ACTGTGCCCT	CTAGTTGCCA	GCCATCTGTT	1800
GTTTGCCCCC	CCCCCGTGCC	TTCTTGACC	CTGGAAGGTG	CCACTCCCAC	TGTCCTTTCC	1860
TAATAAAATG	AGGAAATTGC	ATCGCATTGT	CTGAGTAGGT	GTCATTCTAT	TCTGGGGGGT	1920
GGGGTGGGGC	AGGACAGCAA	GGGGGAGGAT	TGGGAAGACA	ATAGCAGGCA	TGCTGGGGAT	1980
GCGGTGGGGT	CTATGGAACC	AGCTGGGGCT	CGACAGCTAT	GCCAAGTACG	CCCCCTATTG	2040
ACGTCAATGA	CGGTAAATGG	CCCGCCTGGC	ATTATGCCCA	GTACATGACC	TTATGGGACT	2100
TTCTACTCTG	GCAGTACATC	TACGTATTAG	TCATCGCTAT	TACCATGGTG	ATGCGGTTTT	2160
GGCAGTACAT	CAATGGGCGT	GGATAGCGGT	TTGACTCAGG	GGGATTTCCA	AGTCTCCACC	2220
CCATTGACGT	CAATGGGAGT	TTGTTTTGGC	ACCAAATCA	ACGGGACTTT	CCAAAATGTC	2280
GTAACAACTC	CGCCCCATTG	ACGCAAATGG	GCGGTAGGCG	TGTACGGTGG	GAGGTCTATA	2340
TAAGCAGAGC	TGGGTACGTC	CTCACATTCA	GTGATCAGCA	CTGAACACAG	ACCCGTCGAC	2400
ATGGGTGGGA	GCCTCATCTT	GCTCTTCCTT	GTGCTGTGTG	CTACGCGTGT	CCTGTCCCAG	2460
GTACAACTGC	AGCAGCCTGG	GGCTGAGCTG	GTGAAGCCTG	GGGCCTCAGT	GAAGATGTCC	25
TGCAAGGCTT	CTGGCTACAC	ATTTACCAGT	TACAATATGC	ACTGGGTAAA	ACAGACACCT	25
GGTCGGGGCC	TGGAATGGAT	TGGAGCTATT	TATCCCGGAA	ATGGTGATAC	TTCTTACAAT	2640
TAGAAGTTCA	AAGGCAAGGC	CACATTGACT	GCAGACAAAT	CCTCCAGCAC	AGCCTACATG	2700
TAGCTCAGCA	GCCTGACATC	TGAGGACTCT	GCGGTCTATT	ACTGTGCAAG	ATCGACTTAC	2760
TACGGCGGTG	ACTGGTACTT	CAATGTCTGG	GGCGCAGGGA	CCACGGTCAC	CGTCTCTGCA	2820
GCTAGCACCA	AGGGCCCCATC	GGTCTTCCCC	CTGGCACCCT	CCTCCAAGAG	CACCTCTGGG	2880
GGCACAGCGG	CCCTGGGCTG	CCTGGTCAAG	GACTACTTCC	CCGAACCGGT	GACGGTGTCC	2940
TGGAACTCAG	GCGCCCTGAC	CAGCGGCGTG	CACACCTTCC	CGGCTGTCTT	ACAGTCCTCA	3000
GGACTCTACT	CCCTCAGCAG	CGTGGTGACC	GTGCCCTCCA	GCAGCTTGGG	CACCCAGACC	3060
TACATCTGCA	ACGTGAATCA	CAAGCCCAGC	AACACCAAGG	TGGACAAGAA	AGCAGAGCCC	3120
AAATCTTGTG	ACAAAACCTCA	CACATGCCCA	CCGTGCCCAG	CACCTGAACT	CCTGGGGGGA	3180
CCGTCACTCT	TCCTCTTCCC	CCCCAAAACC	AAGGACACCC	TCATGATCTC	CCCGACCTCT	3240
GAGGTCACAT	GCGTGGTGGT	GGACGTGAGC	CACGAAGACC	CTGAGGTCAA	GTTCAACTGG	3300
TACGTGGACG	GCGTGGAGGT	GCATAATGCC	AAGACAAAGC	CGCGGGAGGA	GCAGTACAAC	3360

AGCACGTACC	GTGTGGTCAG	CGTCTCACC	GTCTGCACC	AGGACTGGCT	GAATGGCAAG	3420
GAGTACAAGT	GCAAGGTCTC	CAACAAAGCC	CTCCCAGCCC	CCATCGAGAA	AACCATCTCC	3480
AAAGCCAAAG	GGCAGCCCCG	AGAACCACAG	GTGTACACCC	TGCCCCCATC	CCGGGATGAG	3540
CTGACCAACA	ACCAGGTCAG	CCTGACCTGC	CTGGTCAAAG	GCTTCTATCC	CAGCGACATC	3600
GCCGTGGAGT	GGCAGAGCAA	TGGGCAGCCC	GAGAACAAC	ACAAGACCAC	GCCTCCCCGT	3660
CTGGACTCCG	ACGGCTCCTT	CTTCTCTAC	AGCAAGCTCA	CCGTGGACAA	GAGCAGGTGG	3720
CAGCAGGGGA	ACGTCTTCTC	ATGCTCCGTG	ATGCATGAGG	CTCTGCACAA	CCACTACACG	3780
CAGAAGAGCC	TCTCCCTGTC	TCCGGCTAAA	TGAGGATCCG	TAAACGGTTA	CCAACTACCT	3840
AGACTGGATT	CCTGACAACA	TGCGCCCGTG	ATATCTACGT	ATGATCAGCC	TGGACTGTGC	3900
CTTCTAGTTG	CCAGCCATCT	GTGTTTGGC	CGTCCCCCGT	GCCTTCCTTG	ACCCGTGGAAG	3960
GTGCCACTCC	CAGTGTCCCT	TCCTAATAAA	ATGAGGAAAT	TGCATCGCAT	TGTCTGAGTA	4020
GGTGTCAATC	TATTCTGGGG	GCTGGCGTGG	GGCAGGACAG	CAAGGGGGAG	GATTGGGAAG	4080
ACAATAGCAG	GCATGCTGGG	GATGCGGTGG	GCTCTATGGA	ACCAGCTGGG	GCTCGACAGC	4140
GCTGGATCTC	CCGATCCCCA	GCTTTGCTTC	TCAATTTCTT	ATTTGCATAA	TGAGAAAAAA	4200
AGGAAAATTA	ATTTTAACAC	CAATTCACTA	GTGATTGAG	CAAAATCCGT	GCCAAAAAGG	4260
ATGCTTTAGA	GACAGTGTTT	TCTGCACAGA	TAAGGACAAA	CATTATTCAG	AGGGAGTACC	4320
CAGAGCTGAG	ACTCCTAAGC	CAGTGAAGTC	CACAGCATTC	TAGGGACAAA	TATGCTTGTC	4380
ATCACCAGAG	CCTGATCCCG	TAGAGCCACA	CGTTGGTAAG	GGCCAAATCT	CTCACACAGG	4440
ATAGAGAGGG	CAGGAGCCAG	GGCAGAGCAT	ATAAGGTGAG	GTAGGATCAG	TTGCTCCTCA	4500
CAATTGCTTC	TGACATAGTT	GTGTTGGGAG	CTTGCATAGC	TTGGACAGCT	CAGGGCTGCC	4560
ATTTCCCGCC	AAACTTGAGC	GCAATCCTAG	CGTGAAGGCT	GGTACCATTT	TATCCCGGCT	4620
CCCATCATGG	TTGGACCATT	GAACTGCATC	GTCCCGCTGT	CCCAAAATAT	GGGGATTGGC	4680
AAGAACGGAG	ACCTACCCGT	GCCTCCGCTC	AGGAACGAGT	TCAAGTACTT	CCAAAGAATG	4740
ACCACAACCT	CTTCAGTGGG	AGGTAAACAG	AATCTGGTGA	TTATGGGTAG	GAAACCTGG	4800
TTCTCCATTC	CTGAGAAGAA	TGACCTTTA	AAGGACAGAA	TTAATATAGT	TCTCAGTAGA	4860
GAACTCAAAG	AACCACCAAG	AGGAGCTCAT	TTTCTTGCCA	AAAGTTTGCA	TGATGCCCTA	4920
AGACTTATTG	AACAACCGGA	ATGGCAAGT	AAAGTAGACA	TGGTTTGGAT	AGTCGGAGGC	4980
AGTTCTGTTT	ACCAGGAAGC	CATGAATCAA	CCAGGCCACC	TTAGACTCTT	TGTGACAAGG	5040
ATCATGCAGG	AATTTGAAG	TGACACGTTT	TTCCCAGAAA	TTGATTTGGG	GAAATATAAA	5100
CTTCTCCCG	AATACCCAGG	CGTCCTCTCT	GAGCTCCAGG	AGCAAAAAGG	CATCAAGTAT	5160
AAGTTTGAAG	TCTACGAGAA	GAAAGACTAA	CAGGAAGATG	CTTTCAGTTT	CTCTGCTCCC	5220

CTCTAAAGC	TATGCATTTT	TATAAGACCA	TGGGACTTTT	GCTGGCTTTA	GATCAGCCTC	5280
GACTGTGCCT	TCTAGTTGCC	AGCCATCTGT	TGTTTGCCCC	TCCCCGTGC	CTTCCTTGAC	5340
CCTGGAAGGT	GCCACTCCCA	CTGTCCCTTC	CTAATAAAAT	GAGGAAATTG	CATCSCATTG	5400
TCTGAGTAGG	TGTCATTCTA	TTCTGGGGGG	TGGGGTGGGG	CAGGACAGCA	AGGGGGAGGA	5460
TTGGGAAGAC	AATAGCAAGC	ATGCTGGGGA	TGCGGTGGGC	TCTATGGAAC	CAGCTGGGGC	5520
TGGAGCTACT	AGCTTTGCTT	CTCAATTTCT	TATTTGCATA	ATGAGAAAAA	AAGGAAAATT	5580
AATTTTAACA	CCAATTCAGT	AGTTGATTGA	GCAAATGCGT	TGCCAAAAAG	GATGCTTTAG	5640
AGACAGTGTT	CTCTGCACAG	ATAAGGACAA	ACATTATTCA	GAGGGAGTAC	CCAGAGCTGA	5700
GACTCCTAAG	CCAGTGAGTG	GCACAGCATT	CTAGGGAGAA	ATATGCTTGT	CATCACCGAA	60
GCCTGATTCC	GTAGAGCCAC	ACCTTGGTAA	GGGCCAATCT	GCTCACACAG	GATAGAGAGG	60
GCAGGAGCCA	GGGCAGAGCA	TATAAGGTGA	GGTAGGATCA	GTTGCTCCTC	ACATTTGCTT	5880
CTGACATAGT	TGTGTTGGGA	GCTTGGATCG	ATCCTCTATG	GTTGAACAAG	ATGGATTGCA	5940
CGCAGGTTCT	CCGGCCGCTT	GGGTGGAGAG	GCTATTCGGC	TATGACTGGG	CACAACAGAC	6000
AATGGGCTGC	TCTGATGCCG	CCGTGTTCCG	GCTGTCAGCG	CAGGGGCGCC	CGGTTCTTTT	6060
TGTCAAGACC	GACCTGTCCG	GTGCCCTGAA	TGAAGTGCAG	GACGAGGCAG	CGCGGCTATC	6120
GTGGCTGGCC	ACGACGGGCG	TTCTTTGGCG	AGCTGTGCTC	GACGTTGTCA	CTGAAGCGGG	6180
AAGGGACTGG	CTGCTATTGG	GCGAAGTGCC	GGGGCAGGAT	CTCCTGTGAT	CTCACCTTGC	6240
TCCTGCCGAG	AAAGTATCCA	TCATGGCTGA	TGCAATGCCG	CGGCTGCATA	CGCTTGATCC	6300
GGCTACCTGC	CCATTCGACC	ACCAAGCGAA	ACATCGCATC	GAGCGAGCAC	GTACTCGGAT	6360
TGAAGCCGGT	CTTGTCGATC	AGCATGATCT	GGACGAAGAG	CATCAGGGGC	TGCGCCGAGC	6420
TGAAGCTTTC	GCCAGGCTCA	AGGCGCGCAT	GCCCCACGGC	GAGGATCTCG	TCGTGACCCA	6480
TGGCGATGCC	TGCTTGCCCA	ATATCATGGT	GGAAAATGGC	CGCTTTCTTG	GATTCATCCA	6540
CTGTGGCCCG	CTGGGTGTGG	CGGACCGCTA	TCAGGACATA	GCGTTGGCTA	CCCGTGATAT	6600
TGCTGAAGAG	CTTGGCGGCG	AATGGGCTGA	CGCTTTCCCTC	GTGCTTTACG	GTATCGCCGC	6660
TCCCGATTCC	CAGCGCATCG	CCTTCTATCG	CCTTCTTGAC	GAGTTCTTCT	GAGCGGGACT	6720
CTGGGGTTCC	AAATGACCGA	CCAAGCGACG	CCCAACCTGC	CATCACGAGA	TTTCGATTCC	6780
ACCGCCCGCT	TCTATGAAAG	GTTGGGCTTC	GGAATCGTTT	TCCGGGACGC	CGGCTGGATG	6840
ATCCTCCAGC	GCGGGGATCT	CATGCTGGAG	TTCTTCGCCC	ACCCCAACTT	GTTTATTGCA	6900
GCTTATAATG	GTTACAAATA	AAGCAATAGC	ATCACAAATT	TCACAAATAA	AGCATTTTTT	6960
TCACTGCATT	CTAGTTGTGG	TTTGTCACAA	CTCATCAATC	TATCTTATCA	TGTCTGGATC	7020
TCGGGCGCGA	TCCCGTCGAG	AGCTTGGCGT	AATCATGGTC	ATAGCTGTTT	CCTGTGTGAA	7080
ATTGTTATCC	GCTCACAAAT	CCACACAACA	TACGAGCCGG	AAGCATAAAG	TGTAAAGCCT	7140

GGGGTGCCCTA	ATGAGTGAGC	TAACTCACAT	TAATTGCCGT	GCGCTCACTG	CCCGCTTTCC	7200
AGTCGGGAAA	CCTGTCGTGC	CAGCTGCATT	AATGAATCGG	CCAACGCGCG	GGGAGAGGCG	7260
GTTCGCGTAT	TGGCGGCTCT	TCCGCTTCCT	CGCTCACTGA	CTCGCTGCGC	TGGGTGCTTC	7320
GGGTGCGGCG	AGCGGTATCA	GCTCACTCAA	AGCGGTAAT	ACGGTTATCC	ACAGAATCAG	7380
GGGATAACGC	AGGAAAGAAC	ATGTGAGCAA	AAGGCCAGCA	AAAGGCCAGG	AACCGTAAAA	7440
AGCGCGCGTT	GCTGGCGTTT	TTCCATAGGC	TCCGCGCGCG	TGACGAGCAT	CACAAAAATC	7500
GACGCTCAAG	TCAGAGGTGG	CGAAACCCGA	CAGGACTATA	AAGATACCAG	GCGTTTCCCC	7560
CTGGAAGCTC	CCTCGTGCGC	TCTCCTGTTT	CGACCGTGCC	GCTTACCGGA	TACCTGTCCG	7620
CGTTTCTCCC	TTGGGGAAGC	GTGGCGGTTT	CTCAATGCTC	ACGCTGTAGG	TATCTCAGTT	7680
CGGTGTAGGT	CGTTCGCTCC	AAGCTGGGCT	GTGTGCACGA	ACCGCGCGTT	CAGCGCGACC	7740
GCTGCGCGTT	ATCGGGTAAC	TATCGTCTTG	AGTCCAACCC	GGTAAGACAC	GACTTATCGC	7800
CAGTGGCAGC	AGCCACTGGT	AACAGGATTA	GCAGAGCGAG	GTATGTAGGC	GGTGCTACAG	7860
AGTTCTTGAA	GTGGTGCCCT	AACTACGGCT	ACACTAGAAG	GACAGTATTT	GGTATCTGCG	7920
CTCTGCTGAA	GCCAGTTACC	TTGGGAAAAA	GAGTTGGTAG	CTCTTGATCC	GGCAAAACAA	7980
CCACCGCTGG	TAGCGGTGGT	TTTTTTGTTT	GCAAGCAGCA	GATTACCGCG	AGAAAAAAG	8040
GATCTCAAGA	AGATCCTTTG	ATCTTTTCTA	CGGGGTCTGA	CGCTCAGTGG	AACGAAAAC	8100
CACGTTAAGG	GATTTTGCTC	ATGAGATTAT	CAAAAAGGAT	CTTCACCTAG	ATCCTTTTAA	8160
ATTAAAAATG	AAGTTTTTAA	TCAATCTAAA	GTATATATGA	GTRAACTTGG	TCTGACAGTT	8220
ACCAATGCTT	AATCAGTGAG	GCACCTATCT	CAGCGATCTG	TCTATTTCTG	TCATCCATAG	8280
TTCCTGACT	CCCCGTCTGT	TAGATAACTA	CGATACGGGA	GGGCTTACCA	TCTGGCCCCA	8340
GTGCTGCAAT	GATACCGCGA	GACCCACGCT	CACCGGCTCC	AGATTTATCA	GCAATAAACC	8400
AGCCAGCCGG	AAGGGCCGAG	CGCAGAAGTG	GTCTTGCAAC	TTTATCCGCG	TCCATCCAGT	8460
GTATTAATTG	TTGCCGGGAA	GCTAGAGTAA	GTAGTTGCGC	AGTTAATAGT	TTGCGCAACC	8520
TGTTTGCCAT	TGCTACAGGC	ATCGTGCTGT	CACGCTCGTC	GTTTGCTATG	GCTTCATTCA	8580
GTCGCGGTTT	CCAACGATCA	AGGCGAGTTA	CATGATCCCC	CATGTTGTGC	AAAAAAGCGG	8640
TTAGCTCCTT	CGGTCTCTCG	ATCGTTGTCA	GAAGTAAGTT	GGCCGCAGTG	TTATCACTCA	8700
TGGTTATGGC	AGCACTGCAT	AATTCTCTTA	CTGTCAATGCC	ATCCGTAAGA	TGCTTTTCTG	8760
TGACTGGTGA	GTACTCAACC	AAGTCATTCT	GAGAATAGTG	TATGCGGCGA	CCGAGTTGCT	8820
CTTGCCCCGG	GTCAATACGG	GATAATACCG	CGCCACATAG	CAGAACTTTA	AAAGTGCTCA	8880
TCATTGGAAA	ACGTTCTTCC	GGGCGAAAAA	TCTCAAGGAT	CTTACCGCTG	TTGAGATCCA	8940
GTTCGATGTA	ACCCACTCGT	GCACCGAACT	GATCTTCAGC	ATCTTTTACT	TTCAACAGCG	9000

TTTCTGGGTG AGCAAAAACA GGAAGGCAAA ATGCCGCAAA AAAGGGAATA AGGGCGACAC 9060
 GGAAATGTTG AATACTCATA CTCTTCTCTT TTCAATATTA TTGAAGCATT TATCAGGTTT 9100
 ATGTCTCTCAT GAGCGGATAC ATATTTGAAT GTATTTAGAA AAATAAACAA ATAGGGGTTT 9180
 EGCGCACATT TCCCCGAAAA GTGCCAECT 9209

(4) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID № 3

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) Длина: 54 основания
 (B) Тип: нуклеиновая кислота
 (C) Цепочка: одиночная
 (D) 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
 (D) 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
 (D) 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
 TCA TCT CCA GGG CAG AAG GTC ACA ATG ACT TGC AGG GCC AGC TCA AGT TTA 153
 AGT TAC ATC CAC TGG TTC CAG CAG AAG CCA GGA TCC TCC CCC AAA CCC TGG 204
 ACT TAT GCC ACA TCC AAC CTG GGT 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 TCT GCC ACT TAT TAC TGC CAG CAG TGG ACT AGT AAC CCA CCC ACC TTC 357
 CGA TGG GGG ACC AAG CTG GAA ATC AAA 384

(7) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID № 6

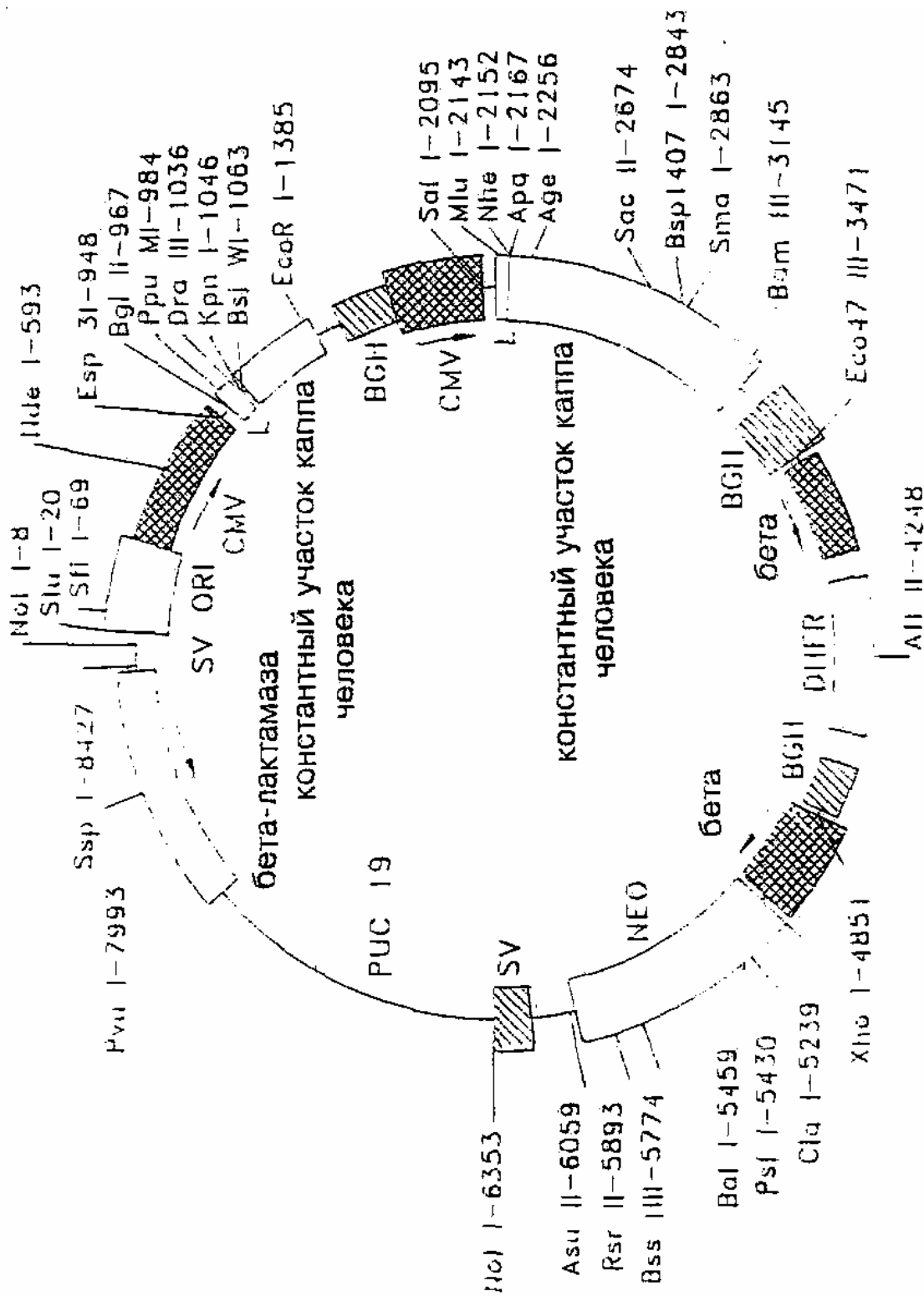
(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) Длина: 27 оснований
 (B) Тип: нуклеиновая кислота
 (C) Цепочка: одиночная
 (D) 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		
(D) 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		
(D) 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 CTG 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	



Фиг. 1

линкер #1 15bp **точка начала SV40 =332bp**
 GACGTCGCGG CCGCTCTAGG CCTCCAAAA AGCCTCTCTCA CTACTCTGG AATAGCTCAG 60
 AGGCCGAGGC GGCCTCGGCC TCTGCATAAA TAAAAAAAT TAGTCAGCLA TGCATGGGCG 120
 GGAGAAATGG CCGAAGTGGG CGGAGTTAGG GCGGGGATG GCGGAGTTAG GGGCGGGACT 180
 ATGGTTGCTG ACTAATTGAG ATGCATGCTT TGCATACTTC TGCTGCTGG GGAGCCTGGG 240
 GACTTTCCAC ACCTGGTTGC TGACTAATTG AGATGCATGC TTTGCATACT TCTGCCTGCT 300
 GGGGAGCCTG GGGACTTTCC ACACCCTAAC TGACACACAT TCCACAGAAAT TAATTCCCCT 360
 AGTTATTAAT AGTAATCAAT TACGGGGTCA TTAGTTCATA GCCCATATAT GGAGTTCCGC 420
 GTTACATAAC TTACGGTAAA TGGCCCGCCT GGCTGACCGC CCAACGACCC CGGCCCATTG 480
 ACGTCAATAA TGACGTATGT TCCCATAGTA ACGCCAATAG GGACTTTCCA TTGACGTCAA 540
 TGGGTGCACT ATTTACGGTA AACTGCCAC TTGGCAGTAC ATCAAGTCTA TCATATGCCA 600
 AGTACGCCCC CTATTGACGT CAATGACGGT AAATGGCCCC CTTGGCATTG TGGCAGTAC 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 TGTATATAAG CAGAGCTGGG TACGTGAACC CTCAGATCCC CTGGAGAGCC 960
 CATCACAGAT CTCTACCAT CAGGGTCCCC GCTCAGCTCC TGGGGCTCCT GCTGCTCTGG 1020
 CTCCCAGGTG CACGATGTGA TGGTACCAAG GTGGAAATCA AACGTACGGT GGCTGCACCA 1080
 TCTGTCTTCA TCTTCCCGCC ATCTGATGAG CAGTTGAAAT CTGGAACTGC CTCGTCTGTG 1140
 TGCCTGCTGA ATAATTCTA TCCAGAGAG GCCAAAGTAC AGTGGAAAGT GDATAACGCT 1200
 CTCCAATCGG GTAACCTCCA GGAGAGTGTC ACAGAGCAGG ACAGCAAGGA CAGCACCTAC 1260
 AGCCTCAGCA GCACCTGAC GCTGAGCAAA GCAGACTACG AGAAACACAA AGTCTACGCC 1320
 TCCGAAGTCA CCCATCAGGG CCTGAGCTCG CCCGTCACAA AGAGCTTCAA CAGGGGAGAG 1380
конечной
легкой
цепочки **Есо RI** **линкер #4=85bp**
 GTTTCGAAAT AGATCCGTTA ACGGTTACCA ACTACCTATA CTGGATTCTG GACAAACATG 1440
 GGCCGTGATA TCTACGTATG ATCAGCCTCG ACTGTGCCCT CTAGTTGCCA GCCATCTCTT 1500

Фиг. 2А

GTTTGCCCTT CCCCCGTGCC TTCCTTGACC CTGGAAGGTG CCACTCCAC TGTCTTTTC 1560
 TAATAAAATG AGGAAATTGC ATCGCATTGT CTGAGTAGGT GTCATTCTAT TCTGGGGGGT 1620
 CGGGTGGGGC AGGACAGCAA GGGGGAGGAT TGGGAAGACA ATAGCAGGCA TGCTGGGGAT 1680
 CGGGTGGGCT STATGGAACC **линкер #5=15bp** CGACAGCTAT GCCAAGTACG CCCCCTATTG 1740
 1702 3 1717 8
 ACGTCAATGA CGGTAAATGG CCGGCCTGGC ATTATGCCCA GTACATGACC TTATGGGACT 1800
 TTCCTACTTG GCAGTACATC TACGTATTAG TCATCGCTAT TACCATGGTG ATGCGGTTTT 1860
 GGCAGTACAT CAATGGGGCT GGATAGCGGT TTGACTCAGG GGGATTTCCA AGTCTCCACC 1920
 CCATTGACGT CAATGGGAGT TTGTTTTGGC ACCAAAATCA ACCGGACTTT CCAAAATGTC 1980
 GTAACAACTC CGCCCCATTG ACGCAAATGG CGCGTAGGCG TGACGGTGG GAGGTCTATA 2040
 TAAGCAGAGC TGGGTACGTC CTCACATTCA GTGATCAGCA CTGAACACAG **Sal I** ACCGTCGAC 2100
 2051 2 2058 9
лидирующая последовательность=51bp **Mlu I 2151 2 Nhe I**
 ATCGGTTGGA GCCTCATCTT GCTCTTCCTT GTCCCTGTTG **CTACCGGTGT CCTAGGACC** 2160
начало тяжелой цепочки -5 -4 -3 114 115
 AAGGGCCCAT CGGTCTTCCC CCTGGCAGCC TCCTCCAAGA GCACCTCTGG GGGCACAGCG 2220
 GCCCTGGGCT GCCTGGTCAA GGACTACTTC CCGGAACCGG TGACGGTGTG GTGGAACTCA 2280
 GGGGCCCTGA CCAGCGGGCT GCACACCTTC CCGGCTGTCC TACAGTCTTC AGGACTCTAC 2340
 TCCTCAACCA GCGTGGTGAC CGTGCCTTCC ACCAGCTTGG GCACCCAGAC CTACATCTGC 2400
 AACGTGAATC ACAAGCCCAAG CAACACCAAG GTGGACAAGA AAGCAGAGCC CAAATCTTGT 2460
 GACAAAACTC ACACATGCCC ACCGTGCCCC GCACCTGAAC TCCTGGGGGG ACCGTCAGTC 2520
 TTCCTCTTCC CCCCCAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT CCGGGACCCC TGAGGTCAAC 2580
 TGGGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCGGAGGTCA AGTTCAACTG GTACCTGGAC 2640
 GGGCTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTACAA CAGCACGTAC 2700
 CGTGTGGTCA GCGTCTCAC CGTCTGCAC CAGGACTGGC TGAATGGCAA GGACTACAA 2760
 TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CCTCCAGCC CCGATCGAGA AAACCATCTC CAAAGCCAAA 2820
 GGGCAGCCCG GAGAAACACA GGTGTACACC CTGCCCCCAT CCGGGGATGA GCTGACCAGG 2880
 AACCAAGTCA GCGTGACCTC CCTGGTCAAA GCGTTCTATC CCAGCGACAT CCGCGTGGAG 2940
 TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAC TACAAGACCA CGCCTCCCTT GCTGGACTCC 3000

Фиг. 2В

CAGGCTCCTT TCTTCCTCTA CAGCAAGCTC ACCGTGGACA AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG 3060
 AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC GCAGAAGAGC 3120
 конец тяжелой цепочки линкер 18am HI линкер #7=81bp
 CTCTCCCTGT CTCGGGGTAA ATGAGGATCC GTTAACGGTT ACCAACTACC TAGACTGGAT 3180
 3144 5 3225 6
 TCGTGACAAC ATCGGGCCGT GATATCTACG TATGATCAGC CTCGACTGTG CTTTCTAGTT 3240
 3225 6
 CCCAGCCATC TGTGTTTTGC CCGTCCCCCG TGCCTTCCTT GACCGTGGAA GGTGCCACTC 3300
 область полиаденирования гормона роста теленка = 231bp
 CCACTGTCTT TTCTAATAA AATGAGGAAA TTGCATCGCA TTGTCTGAGT AGGTGTCAAT 3360
 CATTCTGGG GGGTGGGGTG GGGCAGGACA GCAAGGGGGA GGATTGGGAA GACAATAGCA 3420
 GGCATGCTGG GGATGGGGTG GGCTCTATGG AACCACTGG GGCTCGACAG CGCTGGATCT 3480
 3456 7 линкер #8=34bp
 CCGGATCCCC AGCTTTGCTT CTCATTTCT TATTTGCATA ATGAGAAAAA AAGGAAAAAT 3540
 3490 1
 AATTTTAACA CCAATTCAGT AGTTGATTGA GCAATGCGT TGCCAAAAAG GATGCTTTAG 3600
 главный промотор бета-глобина мыши = 366bp
 AGACAGTGT CTCTGCACAG ATAAGGACAA ACATTATTCA GAGGGAGTAC CCAGAGCTGA 3660
 GACTCCTAAG CCAGTGAGTG GCACAGCAT CTAGGGAGAA ATATGCTTGT CATCACCGAA 3720
 GCGTGATTCC GTAGAGCCAC ACCTTGGTAA GGCCCAATCT GCTCACACAG GATAGAGAGG 3780
 GCAGGAGCCA GGGCAGAGCA TATAAGGTGA GGTAGGATCA GTTGCTCCTC ACATTTGCTT 3840
 CTGACATAGT TGTGTTGGGA GCTTGGATAG CTTGGACAGC TCAGGGCTGC GATTTCCGGC 3900
 3856 7 3875 6 5' нетранслируемый DHFR=82bp
 CAAACTTGAC GGCAATCCTA GCGTGAAGGC TGGTAGGATT TTATCCCCGC TGCCATCAT 3960
 3957 8 начало DHFR
 GTTCGACCAT TGAAC TGAT CGTCGCCGTG TCCCAAAATA TGGGATTGG CAAGAACCGA 4020
 GACCTACCCT GGCCTCCGT CAGGAACGAG TTCAAGTACT TCCAAAGAAT GACCACAACC 4080
 TCTTCAGTGG AAGGTAAACA GAATCTGGTG ATTATGGGTA GGAAAACCTG GTTCTCCATT 4140
 мышиный DHFR=564bp=187 аминокислота & терминирующий кодон
 CCTGAGAAAG ATCGACCTTT AAAGGACAGA ATTAATATAG TTCTCAGTAG AGAACTCAAA 4200
 GAACCACCAC GAGGAGCTCA TTTTCTTGCC AAAAGTTTGG ATGATGCCTT AAGACTTATT 4260
 GAACAACCGG AATTGGCAAG TAAAGTAGAC ATGTTTTGGA TAGTCGGAGG CAGTTCTGTT 4320
 TACCAGGAAG CCATGAATCA ACCAGGCCAC CTTAGACTCT TTGTGACAAG GATCATGCAG 4380
 GAATTTGAAA GTGACACGTT TTTCCAGAA ATTGATTTGG GGAAATATAA ACTTCTCCCA 4440
 GAATACCCAG GCGTCTCTTC TGAGGTCCAG GAGGAAAAAG GCATCAAGTA TAAGTTTGAA 4500

Фиг. 2С

конец DHFR
 GTCTACGAGA AGAAAGAC TA ACAGGAAGAT GCTTTCAAGT TCTCTGCTCC CCTCCTAAAG 4560
 4521 2
 3' UNTRANSLATED DHFR=82bp (линкер #10=10bp)
 TCATGCATTT TTATAAGACC ATGGGACTTT TGCTGGCTTT AGATCAGL TT CGACTGTCTT 4620
 4603 4 4613 4
 TTCTAGTTGC CAGCCATCTG TTGTTTGCCC CTCCTCCGCTG CCTTCCTTGA CCTTGGGAAGG 4680
 область полиаденирования гормона роста теленка J=231bp
 TGCCACTCCC ACTGTCTTT CCTAATAAAA TGAGGAAATT GCATCGCATT GTCTGAGTAG 4740
 GTGTCATTCT ATTCTGGGGG GTGGGGTGGG GCAGGACAGC AAGGGGGAGG ATTGGGAAGA 4800
 CAATAGCAGG CATGCTGGGG ATGCGGTGGG CTCTATGGAA CCACTGGGG CTCGAGCTAC 4860
 4844 5 (линкер #11=17bp)
 TAGCTTTGCT TCTCAATTTT TTATTTGCAT AATGAGAAAA AAAGGAAAAAT TAATTTTAAC 4920
 ACCAATTCAG TAGTTGATTG AGCAAAATGCC TTGCCAAAAA GGATGCTTTA GAGACAGTGT 4980
 TCTCTGCACA GATAAGGACA AACATTATTC AGAGGGAGTA CCCAGAGCTG AGACTCCTAA 5040
 главный промотор бета-глобина мыши !=366bp
 GCCAGTGAGT GGCACAGCAT TCTAGGGAGA AATATGCTTG TCATCAGCGA AGCCTGATTG 5100
 CGTAGAGCCA CACCTTGGTA AGGGCCAATC TGCTCACACA GGATAGAGAG GGCAGGAGCG 5160
 AGGGCAGAGC ATATAAGGTG AGGTAGGATC AGTTGCTCCT CACATTTGCT TCTGACATAG 5220
 TGTGTTGGG AGCTTGGATC GATCCTCTAT GCTTGAACAA GATGGATTGC ACCCAGCTTC 5280
 5227 8 (линкер #12=21bp) начало NEO
 5248 9
 TCCGGCCGCT TGGGTGGAGA CGCTATTCGG CTATGACTGG GCACAACAGA CAATCGGCTG 5340
 CTCTGATGCC GCCGTGTTCC GGCTGTCAGC GCAGGGGGCG CCGGTTCTTT TTGTCAAGAC 5400
 фосфотрансфераза неомицина
 CGACCTGTCC GGTGCCCTGA ATGAACTGCA GGACGAGGCA GCSCGGCTAT CGTGCTGCC 5460
 795bp=264 аминокислоты & терминирующий кодон
 CACGACGGGC GTTCCTTGCG CAGCTGTGCT CGACGTTGTC ACTGAAGCGG GAAGGGACTG 5520
 GCTGCTATTG GGCGAAGTGC CCGGGCAGGA TCTCCTGTCA TCTACCTTG CTCCTGCCGA 5580
 GAAAGTATCC ATCATGGCTG ATGCAATGCG GCGGCTGCAT ACGCTTGATC CGGCTACCTG 5640
 CCCATTGAGC CACCAAGCGA AACATCGCAT CGAGCGAGCA CGTACTCGGA TGGAAAGCCGG 5700
 TCTTGTCGAT CAGGATGATC TGGACGAAGA GCATCAGGGG CTCGCGCCAG CCGAAGCTGT 5760
 CGCCAGGCTC AAGGCCGCCA TGCCCGACGG CGAGGATGTC GTCTGACCC ATGGCGATGC 5820
 CTGCTTGCCG AATATCATCG TGGAAAAATGG CCGCTTTTCT GGATTGATCG ACTGTGCCCG 5880
 GCTGGGTGTG GCGGACCGCT ATCAGGACAT ACCGTTGGCT ACCCGTGATA TTGCTGAAGA 5940
 GCTTGGCGGC GAATGGGCTG ACCGTTCTCT CGTGCTTTAC GGTATCGCCG CTTCCTCGATTG 6000

Фиг. 2D

GCAGCGCATC GCCTTCATC GCCTTCCTGA **конец NEO** TCAGCGGGAC TCTGGGGTTC 6060
 6043 4
 GAAATGACCG ACCAAGCGAC GCGCAACCTG CCATCAGGAG ATTTCGATTC CACCGCCGCC 6120
 3' нетранслируемый NEO=173bp
 TTCTATGAAA GGTTGGGCTT CGGAATCGTT TTCCGGGACG CCGGCTGGAT GATCCTCCAG 6180
 CGCGGGGATC TCATGCTGGA GTTCTTCGCC CACCCCAACT TGTATTATTC AGCTTATAAT 6240
 6216 17
 GGTTACAAAT AAAGCAATAG CATCACAAT TTCAACAATA AAGCATTITT TTCACTGCAT 6300
 SV40 поли А ранняя=133bp линкер #13=19bp
 TCTAGTTGTG GTTTGTCCAA ACTCATCAAT CTATCTTATC ATGTCTGGAT CGCGGCCGCC 6360
 6349 50
 ATCCCGTCCA GAGCTTGGCG TAATCATGGT CATAGCTGTT TCCTGTGTGA AATTGTTATC 6420
 6368 19
 CGCTCACAAT TCCACACAAC ATACGAGCCG GAAGCATAAA GTGTAAAGCC TGGGCTGCC 6480
 AATGAGTGAG CTAACTCACA TTAATTGCGT TCGGCTCACT GCCCGCTTTC CAGTCGGGAA 6540
 ACCTGTCTGT CCAGCTGCAT TAATGAATCG GCCAAGCGCG GGGGAGAGCC CGTTTTCGTA 6600
 PVC 19
 TTGGGCGCTC TTCCGCTTCC TCGCTCACTG ACTCGCTGCG CTCGGTCTGT CCGCTGCCGC 6660
 GAGCGGTATC AGCTCACTCA AAGGCGGTAA TACGGTTATC CACAGAATCA GGGGATAACC 6720
 CAGGAAAGAA CATGTGAGCA AAAGGCCAGC AAAAGGCCAG GAACCGTAAA AAGGCCGCCCT 6780
 6792=точка начала репликации у бактерии
 TCGTGGCGTT TTCCATAGG CTCCGCCCCC CTGACGAGCA TCACAAAAAT CGACGCTCAA 6840
 CTCAGAGGTG GCGAAACCCG ACAGGACTAT AAAGATACCA GCGGTTTCCC CCTGGAAGCT 6900
 CCCTCGTGCG CTCTCCTGTT CCGACCTGCG CGCTTACCGG ATACCTGTCC GCCTTTCTCC 6960
 CTTCCGGGAG CGTGGCGCTT TCTCAATGCT CACGCTGTAG GTATCTCAGT TCGGTGTAGG 7020
 TCGTTCCGTC CAAGCTGGGC TGTGTGCAGG AACCCCCCGT TCAGCCCGAC CGCTGCCTCT 7080
 TATCCGGTAA CTATCGTCTT GAGTCCAACC CGGTAAGACA CGACTTATCG CCACTGGCAG 7140
 CAGCCACTGG TAACAGGATT AGCAGAGCGA GGTATGTAGG CGGTGCTACA GAGTTCTTGA 7200
 AGTGGTGGCC TAACTACGGC TACACTAGAA GGACAGTATT TGGTATCTGC GCTCTGCTGA 7260
 AGCCAGTTAC CTTCCGAAAA AGAGTTGGTA GCTCTTGATC CGGCAAAACA ACCACCGCTG 7320
 GTAGCGGTGG TTTTTTTGTT TGCAAGCAGC AGATTACGGC CAGAAAAAAA GGATCTCAAG 7380
 AAGATCCTTT GATCTTTTCT ACGGGGTCTG ACCCTCAGTG GAACGAAAC TCACGTTAAG 7440
 GGATTTTGGT CATGAGATTA TCAAAAAGGA TCTTCACCTA GATCCTTTTA AATTAAAAAT 7500

Фиг. 2Е

GAAGTTTAA ATCAATCTAA AGTATATATG **конец бета-лактамазы** **7550** TACCAATGCT 7560
 TAAATCAGTGA GGCACCTATC TCAGCGATCT GTCTATTTCC TTCATCCATA GTTGCCCTGAC 7520
 TCCCCGTCGT GTAGATAACT ACGATACGGG AGGGCTTACC ATCTGGCCCC AGTGCTGCAA 7680
 TGATACCGCG AGACCCACGC TCACCGGCTC CAGATTTATC AGCAATAAAC CAGCCAGCCG 7740
 GAAGGGCCGA GCGCAGAAGT GGTCCCTGCA **бета-лактамаза = 861 bp** CTTCATCCGC CTCCATCCAG TCTATTAATT 7800
 GTTGCCGGGA AGCTAGAGTA AGTAGTTCCG CAGTTAATAG TTTGCGCAAC GTTGTTGCCA 7860
 TTGCTACAGG CATCGTGGTG TCACGGTCGT CGTTTGGTAT GGCTTCATTC AGCTCCGGTT 7920
 CCCAACGATC AAGGCGAGTT ACATGATCCC CCATGTTGTG CAAAAAGCG GTTAGCTCCT 7980
 TCGGTCTCC 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 AGTTCGATGT 8280
 AACCCACTCG TGCACCCAAC TGATCTTCAG CATCTTTTAC TTTCACDAGC GTTTCTGGGT 8340
 GAGCAAAAAC AGGAAGGCAA AATGCCGCAA AAAAGGGAAT AAGGGCGACA CGGAATGTT 8400
 GAATACT **начало бета-лактамазы** CAT ACTCTTCCTT TTTCAATATT ATTGAAGCAT TTATCAGGGT TATTGTCTCA 8460
 TGAGCGGATA CATATTTGAA TGTATTTAGA AAAATAAACA AATAGGGGTT CCGCGCACAT 8520
 TTCCCCGAAA AGTGCCACCT

Фиг. 2F

линкер #1=15bp
 GACGTGCGGG CCGCTCTAGG CCTCCAAAA AGCCTCCTCA CTACTTCTGG AATAGCTCAG 60
 15 6
 AGGCGGAGGG GCGCTCGGGC TCTGCATAAA TAAAAAAAAT TAGTCAL TCA TGCATGGGG 120
 SV40 начало =332bp
 GGAGAATGGG CGGAACCTGGG CGGAGTTAGG GCGGGGATGG GCGGAGTTAG GGGCGGGACT 180
 ATGGTTGCTG ACTAATTGAG ATGCATGCTT TGCATACTTC TGCCTGCTGG GGAGCCTGGG 240
 GACTTTCCAC ACCTGGTTGC TGACTAATTG AGATGCATGC TTTGCATACT TCTGCCTGCT 300
 GGGGAGCCTG GGGACTTTCC ACACCCTAAC TGACACACAT TCCACAGAAAT TAAATCCCT 360
 линкер #2=13bp
 347 8
 AGTTAATTAAT AGTAATCAAT TACGGGGTCA TTAGTTCATA GCCCATATAT GGAGTTCCGC 420
 GTTACATAAC TTACGGTAAA TGGCCCGCCT GGCTGACCGC CCAACGACCC CCGCCCATTC 480
 ACGTCAATAA TGACGTATGT TCCCATAGTA ACGCCAATAG GGACTTTCCA TGGACGTCAA 540
 CVM промотор-энхансер=567bp
 TGGGTGGACT ATTTACGGTA AACTGCCAC TTGGCAGTAC ATCAAGTGTA TCATATGCCA 600
 AGTACGCCCC CTATTGACGT CAATGACGGT AAATGGCCCG CCTGGCATTG TGGCCAGTAC 660
 ATGACCTTAT GGGACTTTCC TACTTGGCAG TACATCTACG TATTAGTCAT CGCTATTACC 720
 ATGGTGATGC GGTTTTGGCA GTACATCAAT GGGCGTGGAT AGCGGTTTGA CTCACGGGGA 780
 TTTCCAAGTC TCCACCCCAT TGACGTCAAT GGGAGTTTCT TTTGGCACCA AAATCAACGG 840
 GACTTTCCAA AATGTGCTAA CAACTCCGCC CCATTGACGC AAATGGGCGG TAGGCGCTTA 900
 линкер #3=7bp
 927 8 934 5
 Bgl 2 начало легкой цепочки последовательность 66bp
 CATCACAGAT CTCTCACTAT GGATTTTCAG GTGCAGATTG TCAGCTTCTT GCTAATCAGT 1020
 978 9
 GCTTCAGTCA TAATGTCCAG AGGACAAATT GTTCTCTCCC AGTCTCCAGC AATCCTGTCT 1080
 1044 5+1
 GCATCTCCAG GGGAGAAGGT CACAATGACT TGCAGGGCCA GCTGAAGTGT AAGTTACATC 1140
 CACTGGTTCC AGCAGAAGCC AGGATCCTCC CCAAAACCCG GGATTTATGC CACATCCAAAC 1200
 переменный участок легкой цепочки 318bp 106 аминокислота
 CTGGCTTCTG GAGTCCCTGT TCGCTTCAGT GGCAGTGGGT CTGGGACTTC TTACTCTCTC 1260
 ACCATCAGCA GAGTGGAGGC TGAAGATGCT GCCACTTATT ACTGCCAGCA GTGGACTAGT 1320
 AACCCACCCA CGTTCGGAGG GGGGACCAAG CTGGAAATCA AACGTACGGT GGCTGCACCA 1380
 1362 3 BsiWI
 TCTGTCTTCA TCTTCCCGCC ATCTGATGAG CAGTTGAAAT CTGGAACTGC CTCTGTTGTG 1440
 TGCCTGCTGA ATAACCTCTA TCCAGAGAG GCGAAAAGTAC AGTGGAAAGGT GGATAACGCC 1500

Фиг. 3А

константный участок каппа человека=324bp=107 аминокислота & терминирующий кодон

CTCCAATCGG GTAACGCCA GGAGAGTGTG ACAGAGCAGG ACAGCAAGGA CAGCACCTAC 1560
 AGCCTCAGCA GCACCCTGAC CCTGAGCAAA GCAGACTACG AGAAACACAA AGTCTACGCC 1620
 TGCGAAGTCA CCCATCAGGG CCTGAGCTCG CCCGTACAA AGAGCTTCAA CAGCGGAGAG 1680
 конец легкой цепочки RI линкер #4=81bp
 TGTTCAATTC AGATCCGTTA ACGGTTACCA ACTACCTAGA CTGGATTCTG GACAACATGC 1740
 1646 17
 GGCCGTGATA TCTACGTATG ATCAGCCTCG ACTGTGCCTT CTAGTTGCCA GCCATCTGT 1800
 1771 12
 GTTTGCCCCC CCCCCGTGCC TTCCTTGACC CTGGAAGGTG CCACTCCAC TGCTCTTTCC 1860
 TAATAAAATG AGGAAATTGC ATCGCATTGT CTGAGTAGGT GTCATTCTAT TCTGGGGGGT 1920
 область полиаденирования гормона роста теленка=231bp
 GGGGTGGGGC AGGACAGCAA GGGGAGGAT TGGGAAGACA ATAGCAGGCA TGCTGGCGAT 1980
 CCGGTGGGCT STATGGAACC AGCTGGGGCT CGACAGCTAT GCCAAGTACG CCCCCTATTG 2040
 2002 3 2017 8
 ACCTCAATGA CGGTAAATGG CCGCCCTGGC ATTATGCCCA GTACATGACC TTATGGGACT 2100
 TTCCTACTTG GCAGTACATC TACGTATTAG TCATCGCTAT TACCATGGTG ATGCGGTCTT 2160
 CMV промотор-энхансер=334bp
 GGCAGTACAT CAATGGGGCT GGATAGCGGT TTGACTCAGG GGGATTTCCA AGTCTCCACC 2220
 CCATTGACGT CAATGGGAGT TTGTTTTGGC ACCAAAATCA ACGGGACTTT CCAAAATGTC 2280
 GTAAACAATC CGCCCCATTG ACGCAAATGG GCGGTAGGCG TGTACGCTGG GAGGTCTATA 2340
 линкер #6=7bp Sal I
 TAAGCAGAGC TGGGTACGTC CTCACATTCA GTGATCAGCA CTGAACACAG ACCCGTCGAC 2400
 начало 2351 2 2358 9 искусственная & природная
 тяжелой цепочки лидерная последовательность Mlu I 2457 8
 ATGGGTTGGA GCCTCATCTT GCTCTTCCTT GTCGCTGTTG CTACCGCTGT CCGTCCCGAC 2460
 2401 -5 -4 -3 -2 -1 -1
 CTACAACCTG AGCAGCCTGG GGCTGAGCTG GTGAAGCCTG GGGCCTCAGT GAAGATGTCC 2520
 TGCAAGGCTT CTGGCTACAC ATTTACCACT TACAATATGC ACTGGCTAAA ACAAGACACCT 2580
 вариабельный участок тяжелой цепочки=363bp=121 аминокислота
 GGTGGGGGCC TGGAATGGAT TGGAGCTATT TATCCCGGAA ATGGTGATAC TTCCTACAA 2640
 CAGAAGTTCA AAGGCAAGGC CACATTGACT GCAGACAAAT CCTCCAGCAC AGCCTACATG 2700
 CAGCTCAGCA GCCTGACATC TGAGGACTCT GCGGTCTATT ACTGTGCAAG ATCGACTTAC 2760
 TACGGCGGTG ACTGGTACTT CAATGTCTGG GCGCGACGGG CCACGGTCAC CTTCTCTGCA 2820
 Nhe I
 GTAGCACCA AGGGCCCATC GGTCTTCCCC CTGGCACCCCT CCTCCAAGAG CACCTCTGGG 2880
 GGCACAGGGG CCTGGGCTG CCTGGTCAAG GACTACTTCC CCGAACCGGT GACGGTGTCTG 2940
 константный участок гамма 1 человека=993bp
 TGGAACTCAG GCGCCCTGAC CAGCGGCGTG CACACCTTCC CGGCTGTCTT ACAGTCTCTCA 3000

Фиг. 3В

330 *гИМУНОКИСЛОТА И СТОП-КОДОН*

GGACTCTACT CCTCAGCAG CGTGGTGACC GTCCLTCCA GCAGETTGGG CACCCAGACC 3060
TACATCTGCA ACGTGAATCA CAAGCCCAGC AACACCAAGG TGGACAAGAA AGCAGAGCCC 3120
AAATCTTGTG ACAAAACTCA CACATGCCCA CCGTGCCCAAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA 3180
CCGTGAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT 3240
GAGGTACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC CTGAGGTCAA GTTCAACTGG 3300
TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC 3360
AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG 3420
GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCTCAGCC CCATCGAGAA AACCATCTCC 3480
AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATE CCGGGATGAG 3540
CTGACCAAGA ACCAGGTGAG CCGTACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC 3600
CCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAAC ACAAAGACCAC GCCTCCCGTG 3660
CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTCTCTTAC AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG 3720
CAGCAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG 3780
CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC TCGGGTAA *конец тяжелой цепи Ram HI* TGAAGATCCG TTAACGGTTA CCAACTACCT 3840
3813 4
AGACTGGATT CGTGACAACA TCGGGCCGTG ATATCTACGT ATGATCAGCC TCGACTGTGC 3900
3894 5
CTTCTAGTTG CCAGCCATCT GTTGTTTGCC CCTCCCCCGT GCCTTCTTTG ACCCTGGAAG 3960
GTGCCACTCC CACTGTCCCT TCCTAATAAA ATGAGGAAAT TGCATCGCAT TGTCTGAGTA 4020
GGTGTCAATC TATTCTGGGG GGTGGGGTGG GGCAGGACAG CAAGGGGGAG GATTGGGAAG 4080
ACAATAGCAG GCATGCTGGG GATGCGGTGG GCTCTATGGA ACCAGTGGG GCTCGACAGC 4140
4125 6
GCTGGATCTC CCGATCCCA GCTTTGCTTC TCAATTTCTT ATTGCATAA TGAGAAAAAA 4200
AGGAAAATTA ATTTTAACAC CAATTCAGTA GTTGATTGAG CAAATGCGTT GCCAAAAAGG 4260
ATGCTTTAGA GACAGTGGTC TCTGCACAGA TAAGGACAAA CATTATTGAG AGGGAGTACC 4320
CAGAGCTGAG ACTCCTAAGC CAGTGAGTGG CACAGCATTC TAGGGAGAAA TATGCTTGTG 4380
ATCAGCGAAG CCGATTCCG TAGAGCCACA CTTTGGTAAQ GGCCAATCTG CTCACACAGG 4440
ATAGAGAGGG CAGGAGCCAG GGCAGAGCAT ATAAGGTGAG GTAGGATCAG TCTCTCTCA 4500

Фиг. 3С

CATTGCTTC TGACATAGTT GTGTTGGGAG CTTGGATAGC TGGACAGC CAGGGCTGCC 4560
 4525 6 4544 5
 ATTTGCGGCC AAACCTGACG GCAATCCTAG CGTGAAGGCT GGTAGGATT TATCCCCGT 4620
 начало DHFR
 GGCATCATCG TCGACCAATT GAACTGCATC CTCGCCGTGT CCCAAAATAT GGGGATTGGC 4680
 4626 7
 AAGAACGGAG ACCTACCCTG GCCTCCGCTC AGGAACGAGT TCAAGTACTT CCAAAGAATG 4740
 ACCACAACCT CTTGAGTGGG AGGTAAACAG AATCTGGTGA TTATGGGTAG GAAAACCTGG 4800
 DHFR=564bp=187 аминокислоты & терминирующий кодон
 TTCTCCATTC CTGAGAAGAA TCGACCTTTA AAGGACAGAA TTAATATAGT TCTCAGTAGA 4860
 GAACTCAAAG AACCAACCAG AGGAGCTCAT TTTCTTGCCA AAAGTTTGGA TGATGCCCTTA 4920
 AGACTTATTG AACAAACCGG ATTGGCAAGT AAAGTAGACA TGGTTTGGAT AGTCGGAGGC 4980
 AGTTCTGTTC ACCAGGAAGC CATGAATCAA CCAGGCCACC TTAGACTCTT TGTGACAAGG 5040
 ATCATGCAGG AATTGAAAG TGACACCTTT TTCCGAGAAA TTGATTGGG GAAATATAAA 5100
 CTCTCCGAG AATACCGAGG CGTCCTCTCT GAGGTCCAGG AGGAAAAAG CATCAAGTAT 5160
 AAGTTTGAG TCTACGAGAA GAAAGAC(TAA) CAGGAAGATG CTTTAAAGTT CTCTGCTCCC 5220
 5140 1 3' нетранслируемый DHFR=82bp
 CTCTAAAGC TATGCATTTT TATAAGACCA TGGGACTTTT GCTGCTTTA GATCAGCCTC 5280
 =10bp, линкер #10
 5272 2
 GACTGTGCT TCTAGTTGCC AGCCATCTGT TGTTTGCCCC TCGCCCGTGC CTTCCTTGAC 5340
 полиаденирование гормона роста теленка=231bp,
 CCGGAAGGT GCCACTCCCA CTGTCTTTC CTAATAAAAT GAGGAAATTG CATCGCATTG 5400
 TCTGAGTAGG TGTCATTCTA TTCTGGGGGG TGGGCTGGGG CAGGACAGCA AGGGGGAGGA 5460
 TTGGGAAGAC AATAGCAGGC ATGCTGGGGA TCGGTGGGC TCTATGGAAC CAGCTGGGGC 5520
 =17bp, линкер #11
 5513 4
 TCGAGCTACT AGCTTTGCTT CTCAATTTCT TATTTGCATA ATGAGAAAAA AAGGAAAAAT 5580
 5530 1
 AATTTAACA CCAATTGAGT AGTTGATTGA GCAAATGCST TGCCAAAAAG GATGCTTTAG 5640
 главный промотор бета-лактамазы мыши=366bp
 AGACAGTGTT CTCTGCACAG ATAAGGACAA CTAGGBAGAA ATATGCTTGT CATCACCGAA 5700
 GACTCCTAAG CCAGTGAGTG GCACAGCATT CTAGGGAGAA ATATGCTTGT CATCACCGAA 5760
 GCCTGATTCC GTAGAGCCAC ACCTTGGTAA GGGCCAATCT GCTCACACAG GATAGAGAGC 5820
 GCAGGAGCCA GGGCAGAGCA TATAAGGTGA GGTAGGATCA GTTGCTCCTC ACATTTGCTT 5880
 линкер #12=21bp начало NEO
 CTGACATAGT TGTGTGGG GCTTGGATCG ATCTCTATG GTTGAACAAG ATGGATTGCA 5940
 5896 7 5917 8
 CGCAGGTTCT CCGGCCGCTT GGGTGGAGAG GCTATTGGGC TATGACTGGG CACAACAGAC 6000

Фиг. 3D

AATCGGCTGC TCTGATGCCG CCGTGTTCCG GCTGTCAGCG CAGGGGGCGCC CGGTTCTTTT 5050
 Фосфотрансфераза неомицина=795bp=264 аминокислота &терминирующий кодон
 TGTCAAGACC GACCTGTCCG GTGCCCTGAA TGAAGTGCAG GACGAGGCAG CGCGGCTATC 5120
 GTGGGTGGCC ACGACGGGCG TTCTTTGGCG AGCTGTGCTC GACGTTGTCA CTGAAGCGCG 6180
 AAGGGACTGG CTGCTATTGG GCGAAGTGCC GGGGCAGGAT CTCCTGTGAT CTCACCTTGC 6240
 TCCTGCCGAG AAAGTATCCA TCATGGCTGA TGCAATGCCG 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 GATTCATCGA 6540
 CTGTGCCCGG CTGGGTGTGG CGGACCGCTA TCAGGACATA GCGTTGGCTA CCGGTGATA 6600
 TGCTGAAGAG CTGGGCGGCG AATGGGCTGA CCGCTTCTCT GTGCTTTACG GTATCCCGCC 6660
 TCCCGATTCC CAGCGCATCG CTTTCTATCG CTTTCTTGAC GAGTTCTTCT GAGCGGACCT 6720
 CTGGGGTTCC AAATGACCGA CCAAGCGACG CCAACCTGC CATCAGGAGA TTTCGATTCC 6780
 3' нетранслируемый NEO=173bp
 ACCCGCCGCT TCTATGAAAG GTTGGGCTTC GGAATCGTTT TCCGGACGCG CGGCTGGATC 6840
 ATCCTCCAGC GCGGGGATCT CATGCTGGAG TTCTTCGCCC ACCCCAACTT GTTTATTGCA 6900
 GCTTATAATG GTTACAAATA AAGCAATAGC ATCACAATTT TCACAATAAA AGCATTTTCT 6960
 SV40 область раннего полиаденирования=133bp
 TCACTGCATT CAGTTGTGG TTGTCCAAA CTCATCAATC TATCTTATCA TGTCTGGATC 7020
 линкер #13=19bp
 GCGGCCGCGA TCCGCTCGAG AGCTTGGCGT AATCATGGTC ATAGCTGTTT CCTGTGTGAA 7080
 PUC 19
 ATTGTTATCC GCTCACAATT CCACACAACA TACGAGCCGG AAGCATAAAG TGTAAAGCCT 7140
 GGGGTGCCCA ATGAGTGAGC TAACTCACAT TAATTGCGTT GCGCTCACTG CCGGCTTTCC 7200
 AGTCGGGAAA CCTGTGCTGC CAGCTGCATT AATGAATCGG CCAACGCGCG GGGAGAGCCG 7260
 GTTTGCGTAT TGGGCGCTCT TCGGTTCTCT CGCTCACTGA CTCGCTGCGC TCGGTGCTTC 7320
 GCGTCCGGCG AGCGGTATCA GCTCACTCAA AGGCGGTAAT ACGGTTATCC ACAGAATCAG 7380
 GGGATAACCG AGGAAAGAAC ATGTGAGCAA AAGGCCAGCA AAAGGCCAGG AACCGTAAAA 7440
 7461=точка начала репликации бактерии
 AGCCCGCGTT GCTGGCGTTT TTCCATAGGC TCCGCCCCCG TGACGAGCAT CACAATAATC 7500

Фиг. 3Е

GACGCTCAAG TCAGAGGTGG CGAAACCCGA CAGGACTATA AAGATADLAG GCGTTTCCCC 7560
 CTGGAAGCTC CCTCGTGCGC TCTCCTGTTC CGACCCGTGC GCTTACCGGA TACCTGTCCG 7620
 CCTTCTGCCC TTGGGGAAGC GTGGCGCTTT CTCGAATGTC ACGCTGTAGG TATCTCAGTT 7680
 CGGTGTAGGT CGTTCCGTCC AAGCTGGGCT GTGTGCACGA ACCCCCCGTT CAGCCCGACC 7740
 GCTGCGCCTT ATCCGGTAAC TATCGTCTTG AGTCCAACCC GGTAAACAC GACTTATCGC 7800
 CACTGGCAGC AGCCACTGGT AACAGGATTA GCAGAGCGAG GTATGTAGGC GGTGCTACAG 7860
 AGTTCTTGAA GTGGTGGCCT AACTACGGCT AACTAGAAG GACAGTATTT GGTATCTCCG 7920
 CTCTGCTGAA GCCAGTTACC TTGGGAAAAA GAGTTGGTAG CTCTTGATCC GGC AAAACAAA 7980
 CCACCGCTGG TAGCGGTGGT TTTTTTGTTC GCAAGCAGCA GATTACGGCG AGAAAAAAG 8040
 GATCTCAAGA AGATCCTTTG ATCTTTTCTA CGGGGTCTGA CGCTCAGTGG AACGAAACT 8100
 CACGTTAAGG GATTTTGGTC ATGAGATTAT CAAAAAGGAT CTTCACCTAG ATCCTTTTAA 8160
 ATTA AAAATG AAGTTTTAA TCAATCTAAA GTATATATGA GTAAACTTGG TCTGACAGTT конец 8220
бета-лактамаза
 ACCAATGCTT AATCAGTCAG GCACCTATCT CAGCGATCTG TCTATTTGCT TCATCCATAG 8280
 TTGCTGACT CCCCCTCGTG TAGATAACTA CGATACGGGA GGGCTTAGCA TCTGGCCCCA 8340
 GTGCTGCAAT GATACCGCGA GACCCACGCT CACCGGCTCC AGATTTATCA GCAATAAAC 8400
 AGCCAGCCGG AAGGCGCGAG CCGAGAAAGT GTCTGCAAC TTTATCCGCC TCCATCCAGT 8460
 бета-лактамаза=861bp=286 аминокислота & терминирующий кодон
 CTATTAATTG TTGCCGGGAA GCTAGAGTAA GTAGTTCCGC AGTTAATAGT TTGCGGAALC 8520
 TTGTTGCCAT TGCTACAGGC ATCGTGGTGT CACGCTCGTC GTTTGGTATG GCTTCATTCA 8580
 GCTCCGGTTC CCAACGATCA AGCCGAGTTA CATGATCCCC CATGTTGTGC AAAAAAGCGG 8640
 TTAGCTCCTT CGGTCTCTCG ATCGTTGTCA GAAGTAAGTT GGCCGGCAGTG TTATCACTCA 8700
 TGGTTATGGC AGCACTGCAT AATTCTCTTA CTGTCAATGC ATCCGTAAGA TGCTTTTCTG 8760
 TGA CTGGTGA GTACTCAACC AAGTCATTCT GAGAATAGTG TATGCGGCGA CGGAGTTGCT 8820
 CTTGCCCGGC GTCAATACGG GATAATACCG CGCCACATAG CAGAACTTTA AAAGTGCTCA 8880
 TCATTGGAAA ACGTTCTTCC GGGCGAAAAC TCTCAAGGAT CTTACCGCTG TTGAGATCCA 8940
 GGTGGATGTA ACCCACTCGT GCACCCAACT GATCTTCAGC ATCTTTTACT TTCACCAGCG 9000
 TTTCTGGGTG AGCAAAAACA GGAAGGCAAA ATGCCGCAAA AAAGGGGAATA AGGCGGACAC 9060
 GGAAGGTTC AATACTCAT начало бета-лактамазы CTCTTCTTTT TTCAATATTA TTGAAGCATT TATCAGGCTT 9120
 ATTGTCTCAT GAGCGGATAC ATATTTGAAT GTATTTAGAA AAATAAACAA ATAGGGGCTT 9180
 CGCGCAGATT TCCCGAAAA GTGCCACCT

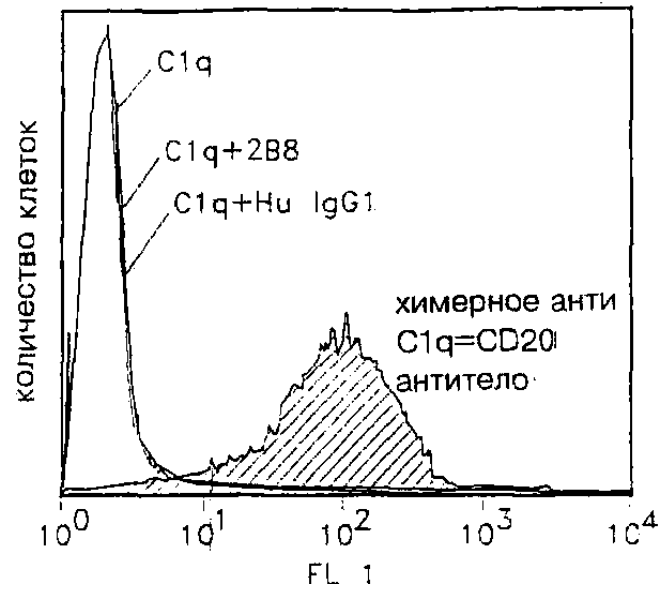
Фиг. 3F

лидирующая последовательность

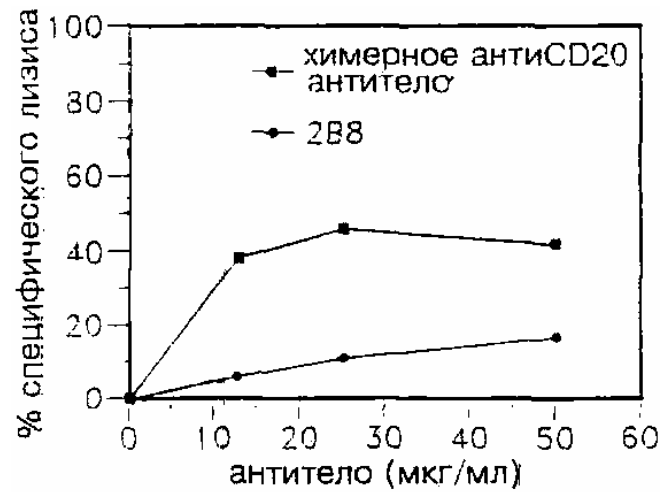
лидирующая последовательность

-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	AGE	CTC	ATC	TTG	CTC	TTC	CTT	GTC	GCT	GTT	GCT	ACG	CGT	GTC														
	2409				2418				2427				2436				2445														
-1					+1					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					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	GCT	GGT	GGG	GGC	CTG	GAA	TGG	ATT	GGA	GCT	ATT	TAT	CCC	GGA	AAT													
2574				2583				2592				2601				2610			2619												
55					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	Asp	Val	Trp	Gly													
TAT	TAC	TGT	GCA	AGA	TCC	ACT	TAC	TAC	GGC	GGT	GAC	TGG	TAC	TTC	AAT	GTC	TGG	GGC													
2745				2754				2763				2772				2781			2790												
105					110					113					FR4																
Ala	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ala																							
GCA	GGG	ACC	ACG	GTC	ACC	GTC	TCT	GCA																							
2802				2811				2820																							

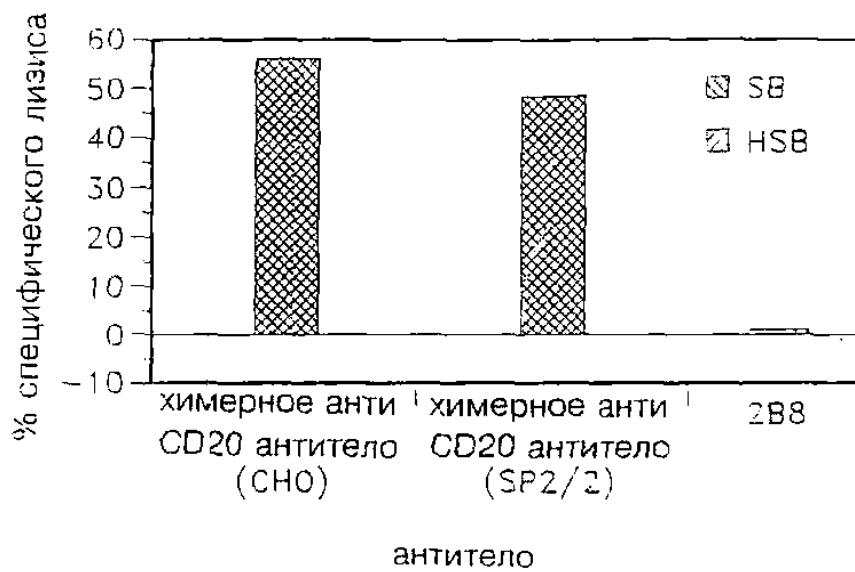
Фиг. 5



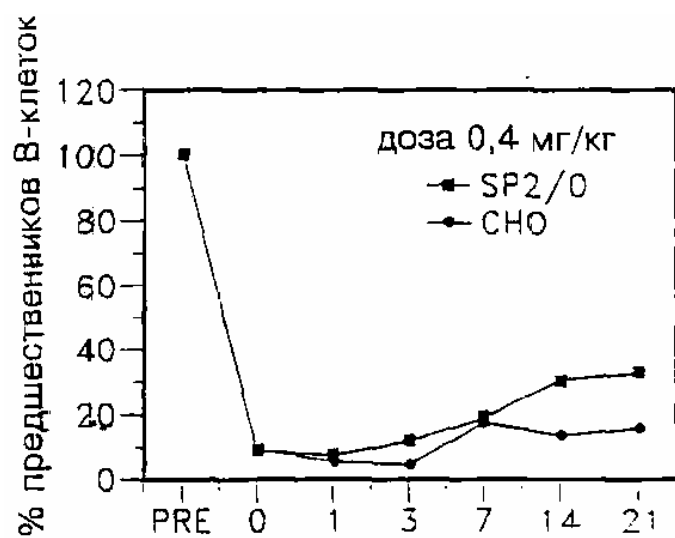
Фиг. 6



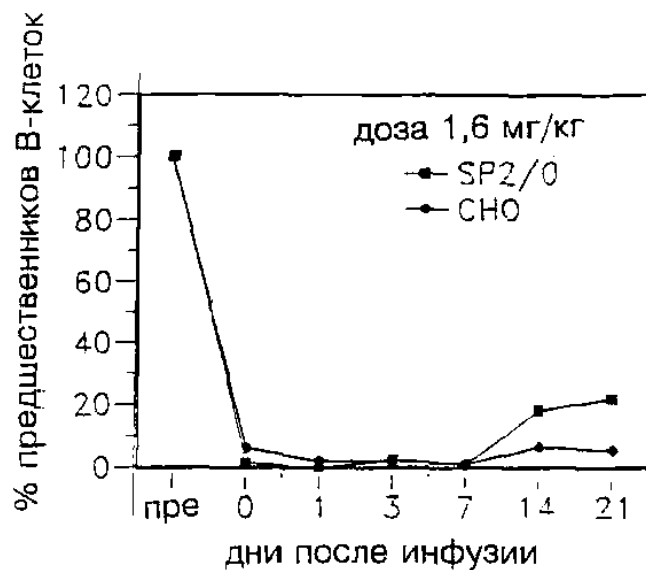
Фиг. 7



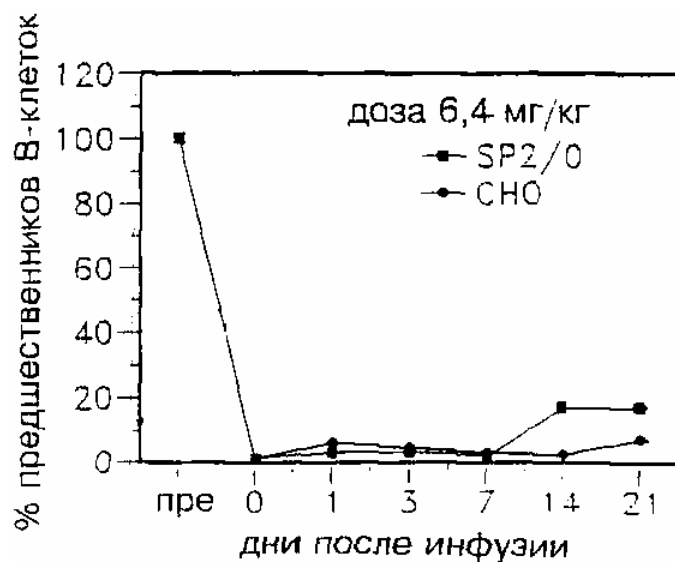
Фиг. 8



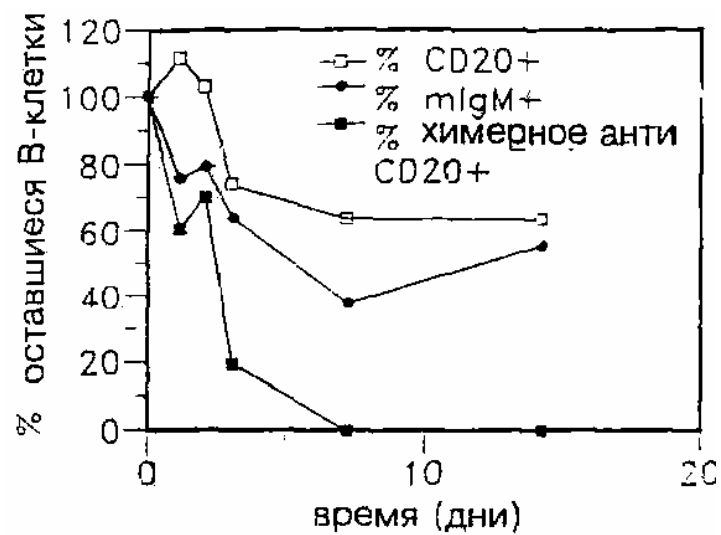
Фиг. 9А



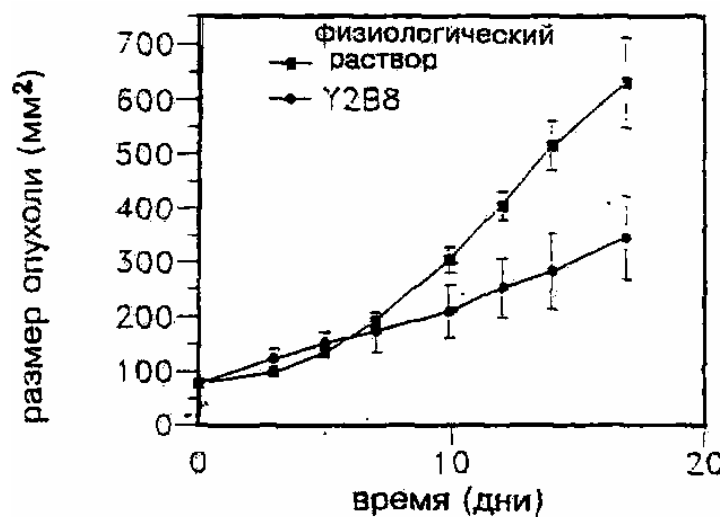
Фиг. 9В



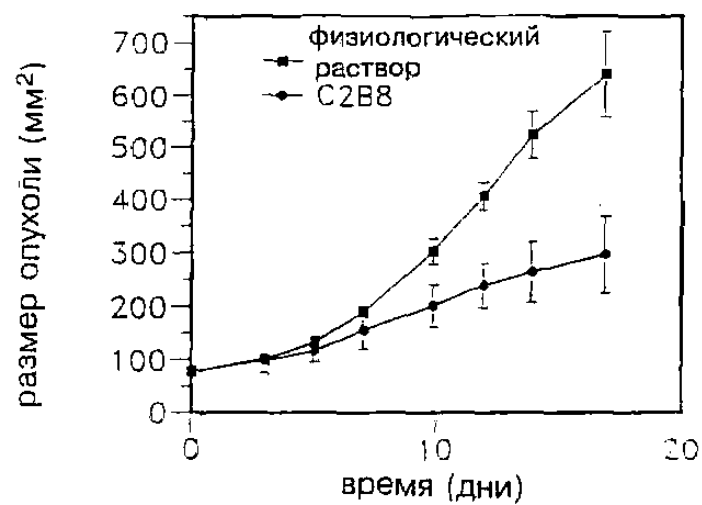
Фиг. 9С



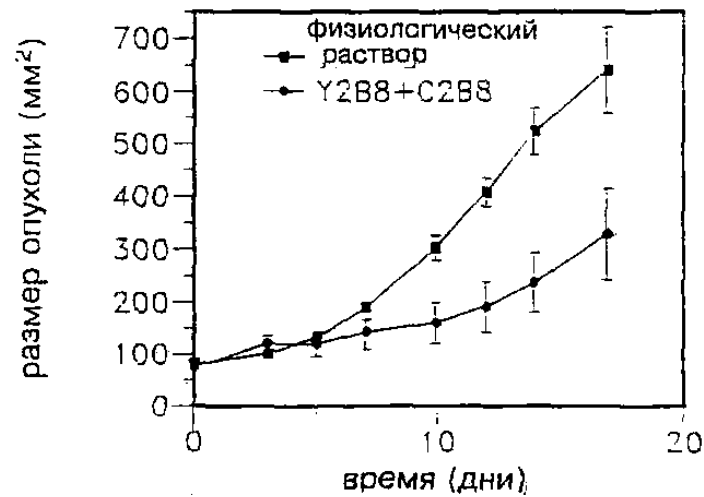
Фиг. 10



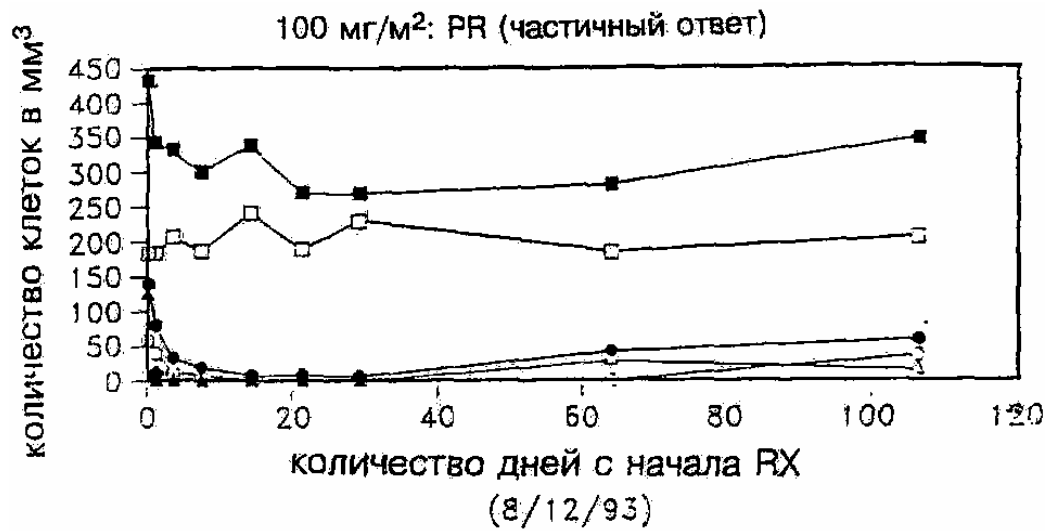
Фиг. 11



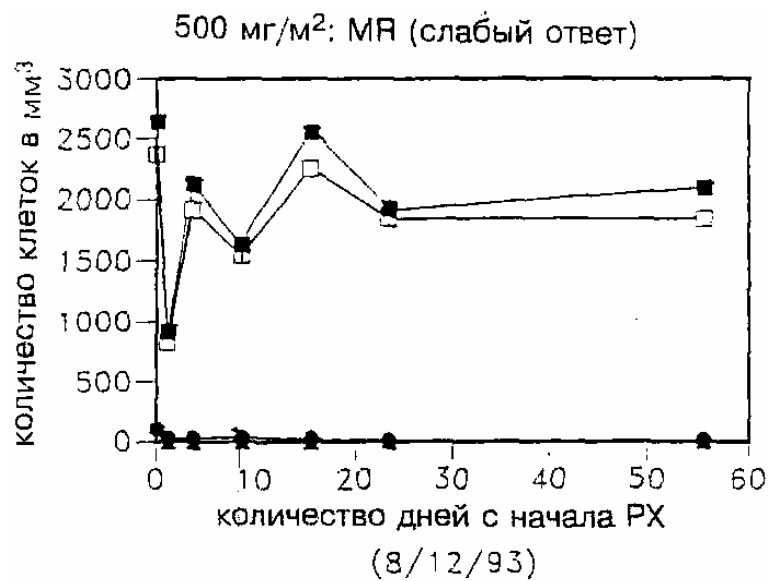
Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14А



Фиг. 14В

ДП "Український інститут промислової власності" (Укрпатент)
Україна, 01133, Київ-133, бульв. Лесі Українки, 26
(044) 295-81-42, 295-61-97

Підписано до друку _____ 2001 р. Формат 60х84 1/8.
Обсяг _____ обл.-вид.

-арк. Тираж 50 прим. Зам. _____

УкрІНТЕІ, 03680, Київ-39 МСП, вул. Горького, 180.
(044) 268-25-22
