



(51) МПК  
*A01K 67/027* (2006.01)  
*C12N 15/13* (2006.01)  
*C12N 15/90* (2006.01)  
*C12N 5/10* (2006.01)  
*C12N 5/0781* (2010.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

*A01K 67/0275* (2020.02); *C12N 15/8509* (2020.02); *C07K 16/00* (2020.02); *A01K 2217/052* (2020.02); *A01K 2227/105* (2020.02); *A01K 2267/01* (2020.02); *C07K 2317/21* (2020.02); *C07K 2317/24* (2020.02)

(21)(22) Заявка: 2015119670, 29.06.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
29.06.2009

Дата регистрации:  
28.08.2020

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
27.07.2008 NL PCT/NL2008/050430

Номер и дата приоритета первоначальной заявки,  
из которой данная заявка выделена:  
2011102962 27.06.2008

(43) Дата публикации заявки: 10.12.2015 Бюл. № 34

(45) Опубликовано: 28.08.2020 Бюл. № 25

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО  
 "Юридическая фирма Городисский и  
 Партнеры"

(72) Автор(ы):

ХАУТЗАГЕР Эрвин (NL),  
 ПИНТО Рюи Даниэль (NL),  
 ЛОГТЕНБЕРГ Тон (NL),  
 ТРОСБИ Марк (NL),  
 КРАМЕР Роберт Арьен (NL),  
 ДЕ КРЭЙФ Корнелис Адриан (NL)

(73) Патентообладатель(и):

Мерюс Н.В. (NL)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: WO 2004/106375 A1, 09.12.2004.  
 INLAY M.A. et al., "Roles of the Ig kappa light  
 chain intronic and 3' enhancers in Igk somatic  
 hypermutation." J Immunol. (2006); 177(2):1146-  
 51. XU Y. et al., "Deletion of the Igk Light Chain  
 Intronic Enhancer/Matrix Attachment Region  
 Impairs but Does Not Abolish VkJk  
 Rearrangement", Immunity (1996), 4: 377-385;  
 (см. прод.)

(54) ПРОДУЦИРУЮЩИЕ АНТИТЕЛА МЛЕКОПИТАЮЩИЕ, НЕ ЯВЛЯЮЩИЕСЯ ЧЕЛОВЕКОМ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Предложено применение трансгенного млекопитающего, относящегося к мышам или крысам, для получения антител, где в геном млекопитающего встроена нуклеиновая кислота, кодирующая перестроенную переменную область легкой цепи иммуноглобулина человека, функционально связанную с константной областью иммуноглобулина и функционально связанную с промотором, обеспечивающим экспрессию

трансгенной легкой цепи в В-клетках млекопитающего, таким образом, что она образует пары с различными эндогенными тяжелыми цепями, обеспечивая получение антител. Данное изобретение позволяет получать антитела, содержащие легкую цепь с переменной областью иммуноглобулина человека в паре с различными тяжелыми цепями иммуноглобулинов млекопитающего. 13 з.п. ф-лы, 27 ил., 11 табл., 22 пр.

(56) (продолжение):

US 2006/205077 A1, 14.09.2006. WO 2007/117410 A2, 18.10.2007. US 5,885,827 A, 23.03.1999. PASQUALUCCI L. et al., "BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci." Proc Natl Acad Sci USA (1998); 95(20):11816-21. NOVOBRANTSEVA T.I. et al., "Rearrangement and Expression of Immunoglobulin Light Chain Genes Can Precede Heavy Chain Expression during Normal B Cell Development

in Mice", J. Exp. Med. (1999), 189(1): 75-87; KAKITANI M. et al., "A novel transgenic chimaeric mouse system for the rapid functional evaluation of genes encoding secreted proteins", Nucleic Acids Research (2005), 33(9):e85. MOSTOSLAVSKY R. et al., "Asynchronous replication and allelic exclusion in the immune system", NATURE (2001), 414: 221-225. SRINIVAS S. et al., "Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus." BMC Dev Biol. (2001); 1:4. STORB U et al., "Immunoglobulin transgenes as targets for somatic hypermutation." Int J Dev Biol. (1998); 42(7):977-82. RU 2236127 C2, 20.09.2004.

R U 2 7 3 1 0 8 4 C 2

R U 2 7 3 1 0 8 4 C 2





FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*A01K 67/027* (2006.01)  
*C12N 15/13* (2006.01)  
*C12N 15/90* (2006.01)  
*C12N 5/10* (2006.01)  
*C12N 5/0781* (2010.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*A01K 67/0275* (2020.02); *C12N 15/8509* (2020.02); *C07K 16/00* (2020.02); *A01K 2217/052* (2020.02); *A01K 2227/105* (2020.02); *A01K 2267/01* (2020.02); *C07K 2317/21* (2020.02); *C07K 2317/24* (2020.02)

(21)(22) Application: **2015119670, 29.06.2009**(24) Effective date for property rights:  
**29.06.2009**Registration date:  
**28.08.2020**

Priority:

(30) Convention priority:  
**27.07.2008 NL PCT/NL2008/050430**Number and date of priority of the initial application,  
from which the given application is allocated:  
**2011102962 27.06.2008**(43) Application published: **10.12.2015 Bull. № 34**(45) Date of publication: **28.08.2020 Bull. № 25**

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO  
"Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

**KHAUTZAGER Ervin (NL),  
PINTO Ryui Daniel (NL),  
LOGTENBERG Ton (NL),  
TROSBI Mark (NL),  
KRAMER Robert Aren (NL),  
DE KREJF Kornelis Adrian (NL)**

(73) Proprietor(s):

**Meryus N.V. (NL)**(54) **PRODUCING NON-HUMAN MAMMALIAN ANTIBODIES**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: use of a transgenic mammal related to mice or rats is proposed to produce antibodies, where a nucleic acid is built into the mammalian genome, coding a rearranged human immunoglobulin light chain variable region, operably linked to an immunoglobulin constant region and operably linked to a promoter, providing expression of a transgenic light chain in B-

cells of a mammal, such that it forms pairs with different endogenous heavy chains, providing the production of antibodies.

EFFECT: present invention enables to obtain antibodies containing a light chain with a variable region of human immunoglobulin in a pair with various heavy chains of mammalian immunoglobulins.

14 cl, 27 dwg, 11 tbl, 22 ex

C 2  
4  
8  
0  
1  
0  
8  
4  
R UR U  
2  
7  
3  
1  
0  
8  
4  
C 2

## ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Изобретение относится к получению и применению не являющихся человеком животных, способных продуцировать антитела и их производные, которые экспрессируются по меньшей мере частично, из экзогенных нуклеиновых кислот (трансгенов). Описаны трансгены для продуцирования и способы получения таких гетерологичных антител; также описаны способы и векторы для получения таких трансгенных животных.

### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Гуморальный иммунитет опосредуется В-клетками путем продуцирования специфических антител. Основной структурной субъединицей антитела (Аб) является молекула иммуноглобулина (Ig). Молекулы Ig состоят из комплекса двух идентичных тяжелых (H) и двух идентичных легких (L) полипептидных цепей. На аминном конце каждой H-цепи и L-цепи находится участок с изменяющейся аминокислотной последовательностью, называемый переменной (V) областью. Остальная часть H- и L-цепей сравнительно постоянна по своей аминокислотной последовательности, и называется константной (C) областью. В молекуле Ig V-области H- и L-цепей ( $V_H$  и  $V_L$ ) накладываются друг на друга с образованием потенциального участка связывания антигена. Гены, которые кодируют V-области H- и L-цепей, собираются соматически из сегментов ДНК зародышевой линии во время дифференциации предшественника В-клетки (pre-B): сегменты гена V, D и J для H цепи и сегменты гена V и J для L-цепи. Среди V-участков Ig имеется три участка с наибольшей изменчивостью аминокислотной последовательности, которые взаимодействуют с образованием участка распознавания антигена, и поэтому называются гиперпеременными участками, отвечающими за комплементарное взаимодействие с антигеном (CDR).

Сегмент гена V кодирует основной объем домена V-участка, включая CDR1 и CDR2. Переменность в CDR1 и CDR2 происходит из гетерогенности последовательности для множества различных закодированных в зародышевой линии сегментов V. CDR3 кодируется последовательностями, которые образуются путем соединения сегментов гена V, D и J H-цепи и сегментов гена V и J L-цепи и посредством механизмов, которые создают гетерогенность нуклеотидной последовательности при соединении данных сегментов. Дополнительная переменность может происходить из соединения различных V-областей H и L-цепей. Вместе данные процессы производят иммунный репертуар антител, кодируемых сегментами генов зародышевой линии, и экспрессируемых вновь образовавшимися В-клетками.

Дополнительный источник переменности антител налагается поверх переменности, сгенерированной рекомбинацией сегментов генов Ig. В-клетки имеют возможность внесения мутаций в V-области антитела, которое они экспрессируют, посредством процесса, называемого соматической сверхмутацией. Соответственно, когда животному впервые встречается антиген, антиген связывается со специфической В-клеткой, которая оказалась носителем антител, имеющих V-область, связывающую антиген. Такой первичный ответ может активировать данную В-клетку для продолжения секретирования родственного антитела. Данные активированные В-клетки также могут направлять процесс соматической мутации для своих перестроенных сегментов генов антитела, что позволяет осуществлять продуцирование дочерних клеток, которые создают варианты антител первичного ответа. В процессе выбора распространяются те варианты потомки В-клетки, которые создают антитело с повышенной аффинностью антигена. В В-клетках соматические сверхмутации нацелены на ограниченный участок генома, содержащий перестроенные гена для  $V_H$  и  $V_L$ . Таким

образом, соматическая мутация позволяет осуществлять созревание аффинности - продуцирование и выбор высокоаффинных антител. Следовательно, соматическая мутация является важной для генерации высокоаффинных антител.

5 Сильная специфичность и высокая аффинность антител и изобретение технологии гибридом, позволяющей генерировать моноклональные антитела (mAb), дало большие надежды на их использование в качестве адресного терапевтического средства для болезней человека. МАb идентичны, поскольку они продуцируются единичной В-клеткой и ее потомством. МАb создаются путем слияния клеток селезенки мыши, которая была иммунизирована необходимым антигеном, с клетками миеломы с целью  
10 создания иммортализованных гибридом. Одним из главных препятствий для разработки *in vivo* приложений для mAb у человека является иммуногенность, свойственная нечеловеческим Ig. Пациенты отвечают на терапевтические дозы mAb мыши посредством создания антител против последовательностей Ig мыши (антимышинные антитела человека; НАМА), вызывающих острую токсичность, изменения их биораспределения  
15 и ускорения выведения, что в результате снижает эффективность последовательных введений (Mirick, et al., (2004) Q. Nucl. Med. Mol. Imaging 48, 251-257).

С той целью, чтобы обойти создание НАМА, были разработаны методы гуманизации антител в попытке продуцирования mAb с пониженной иммуногенностью при  
20 применении у человека. Результатом таких попыток стали различные подходы, основанные на рекомбинантных ДНК и направленные на повышение содержания аминокислотных последовательностей человека в mAb при условии сохранения специфичности и аффинности родительского антитела, не принадлежащего человеку. Гуманизация началась с создания химерных антител мыши-человека (Morrison, S. L., et al., (1984). Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 81, 6851-5), в которых С-области Ig в mAb мыши  
25 были заменены С-областями человека. Химерные mAb содержат 60-70% аминокислотных последовательностей человека и имеют значительно меньшую иммуногенность, чем их аналоги мыши, при инъекции человеку, хотя ответ человека против химерного антитела все еще наблюдался (Hwang, W. Y., et al. (2005). Methods, 36, 3-10).

В попытках дальнейшей гуманизации mAb' мыши была разработана прививка CDR.  
30 При прививке CDR антитела мыши гуманизируются путем прививки их CDR в V<sub>L</sub>- и V<sub>H</sub>-каркасы молекул Ig человека при сохранении остатков каркаса мыши, считающихся важными для специфичности и аффинности (Jones, P.T., et al., (1986). Nature, 321, 522). В целом, антитела с привитыми CDR состоят более чем на 80% из аминокислотных последовательностей человека (Queen, C. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86,  
35 10029; Carter, P. et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89, 4285). Несмотря на эти попытки, было показано, что гуманизированные антитела все еще вызывали образование антител против привитой V-области (Hwang, W. Y., et al. (2005). Methods, 36, 3).

После прививки CDR были разработаны методы гуманизации, основанные на  
40 различных парадигмах, таких как ремоделирование (Padlan, E.A., et al., (1991). Mol. Immunol., 28, 489), сверхгуманизация (Tan, P., D.A., et al., (2002) J. Immunol., 169, 1119), оптимизация содержания последовательностей человека (Lazar, G.A., et al., (2007). Mol. Immunol., 44, 1986) и гуманиринг (humaneering), в попытке дальнейшего снижения содержания последовательностей, не принадлежащих человеку, в терапевтических mAb  
45 (Almagro, J.C, et al., (2008). Frontiers in Bioscience 13, 1619). Так же как и подходы, основанные на прививке CDR, данные методы опираются на анализ структуры антитела и сравнение последовательности нечеловеческих и человеческих mAb с целью оценки влияния процесса гуманизации на иммуногенность конечного продукта. При сравнении иммуногенности химерных и гуманизированных антител оказывается, что гуманизация

вариабельных областей еще больше снижает иммуногенность (Hwang, W.Y., et al. (2005). *Methods*, 36, 3-10).

5 Еще одним подходом, разработанным для снижения иммуногенности химерных антител или антител мыши, является деиммунизация. Она включает идентификацию линейных эпитопов Т-клеток в исследуемом антителе, с применением биоинформатики, и их последующую замену посредством сайт-направленного мутагенеза на последовательности человека или неиммуногенные последовательности (WO 09852976 A1). Несмотря на то, что деиммунизированные антитела продемонстрировали сниженную иммуногенность в приматах, по сравнению с их химерными аналогами, 10 наблюдалась некоторая потеря связывающей способности (Jain, M., et al., (2007). *Trends in Biotechnol.* 25, 307).

Разработка технологии фагового дисплея дополнила и расширила подходы к иммунизации в попытке получения менее иммуногенных mAb для терапии людей. В фаговом дисплее большие наборы («библиотеки») V<sub>H</sub>- и V<sub>L</sub>-областей антител человека 15 экспрессируются на поверхности нитеобразных частиц бактериофага. Из этих библиотек выбираются редкие фаги с помощью связывающего взаимодействия с антигеном; растворимые фрагменты антител экспрессируются зараженными бактериями, и связывающая способность выбранных антител улучшается посредством мутации (Winter, G., et al. (1994). *Annu. Rev. Immunol.* 12, 433). Данный процесс имитирует иммунный 20 отбор, и с использованием данного подхода были выделены антитела со многими различными специфичностями связывания (Hoogenboom, H.R., et al. (2005). *Nat. Biotechnol.*, 23, 1105). Различные источники V-области H- и L-цепей были использованы для построения фагового дисплея, включая выделение из неиммунных или иммунных 25 доноров. Кроме того, библиотеки фагового дисплея были сформированы из V-областей, которые содержали искусственно рандомизированные синтетические CDR-области, с целью создания дополнительного разнообразия. Часто антитела, полученные из библиотек фагового дисплея, подвергаются созреванию аффинности *in vitro* с целью получения высокоаффинных антител (Hoogenboom, H.R., et al. (2005). *Nat. Biotechnol.*, 23, 1105).

30 Создание трансгенных линий мыши, продуцирующих антитела человека при отсутствии антител мыши, обеспечило создание еще одной технологической платформы для создания специфических и высокоаффинных mAb мыши для применения в людях. У таких трансгенных животных эндогенный механизм продуцирования антител 35 инактивирован и заменен локусами Ig человека с целью, по существу, воспроизведения гуморальной иммунной системы человека в мышцах (Jakobovits, A., et al. (2007). *Nat. Biotechnol.* 25, 1134. Lonberg, N. (2005). *Nat. Biotechnol.* 23, 1117). Развитие В-клеток, а также диверсификация Ig посредством рекомбинации сегментов генов корректно воспроизводится в этих мышцах, в результате чего получается широкий репертуар В-клеток мыши, экспрессирующих Ig человека. 40 Посредством иммунизации этих мышей антигенами было дополнительно продемонстрировано, что данные трансгенные животные накопили соматические мутации в V-областях как тяжелой, так и легкой цепей, достаточные для продукции широкого разнообразия высокоаффинных mAb человека (Lonberg, N. (2005). *Nat. Biotechnol.* 23, 1117).

45 На вопрос, являются ли «полностью человеческие» mAb, такие как полученные из библиотек фагового дисплея или трансгенных мышей, менее иммуногенными, чем гуманизированные mAb, пока еще нет ответа, поскольку полные данные по иммуногенности доступны только для двух mAb человека. mAb против фактора некроза опухоли, разработанное на основе библиотек фагового дисплея человека, вызывает

иммунный ответ у 12% пациентов - на верхней границе уровня противоантительных ответов гуманизированных антител (Hwang, W.Y., et al. (2005). *Methods*, 36, 3-10).

Оценка иммуногенности первого зарегистрированного mAb человека, созданного посредством трансгенного подхода, показала, что обработка с помощью mAb привела к образованию антител примерно у 5,5% подвергавшихся обработке раковых пациентов (Jakobovits, A., et al. (2007). *Nat. Biotechnol.* 25, 1134., Lofgren, J. A., et al. (2007). *J. Immunol.* 178, 7467).

Следовательно, по-прежнему остается необходимость в способе и средствах получения антител, являющихся специфичными для своих мишеней, но менее иммуногенных. В соответствии с изобретением, снижение иммуногенности по меньшей мере частично достигается путем получения не являющегося человеком трансгенного млекопитающего, содержащего по меньшей мере в клеточной линии своих В-клеток, нуклеиновую кислоту, кодирующую по меньшей мере легкую цепь и тяжелую цепь иммуноглобулина, при этом кодирующая тяжелую или легкую цепь последовательность предоставлена вместе со средствами, которые делают ее устойчивой к перестройкам ДНК и/или к соматическим гипермутациям, при этом предпочтительное не являющееся человеком млекопитающее является грызуном, конкретнее, мышью. Нуклеиновая кислота предпочтительно кодирует цепь человеческого, подобного человеческому или гуманизированного иммуноглобулина.

Остальное описание относится к примерам, в которых обычно в качестве не являющихся человеком млекопитающих используются мыши. Трансгенные не являющиеся человеком млекопитающие-хозяева способны индуцировать иммунный ответ на антиген, при этом ответ заключается в продукции антител, имеющих переменные области примата, в частности, человека. Могут быть использованы различные трансгенные хозяева, в частности, мыши и крысы, зайцеобразные, овечьи, жвачные, свиноподобные, лошадиные, псовые, кошачьи и т.п. Мыши были использованы для продукции В-лимфоцитов для иммортализации в целях продуцирования антитела. Поскольку с мышами легко работать, они могут быть разведены в большом количестве, и о них известно, что они имеют широкий иммунный репертуар, то мыши будут обычно являться выбираемыми животными. Следовательно, в приведенном ниже обсуждении будут рассматриваться мыши, но следует понимать, что другие животные, в частности, не являющиеся приматами млекопитающие, могут быть с легкостью использованы вместо мышей при следовании тем же процедурам.

Причина предотвращения перестроек и гипермутации состоит в том, что таким образом неиммуногенный полипептид может быть выбран заблаговременно, поскольку будет известно, что его полипептидная цепь останется неиммуногенной. По меньшей мере одна из цепей полученного в результате иммуноглобулина будет, таким образом, менее иммуногенной. Полученное в результате антитело должно (обычно) иметь и легкую, и тяжелую цепь. Следовательно, неиммуногенная цепь должна быть способна к соединению с другой цепью. Другая цепь может являться эндогенной цепью, экзогенной цепью или гибридом обеих. Для терапии человека неиммуногенная цепь должна быть близка к цепи человека насколько это возможно.

Средства получения гена, кодирующего цепь (или цепи) иммуноглобулина, устойчивую(-ые) к перестройке и/или мутации ДНК, состоят, очевидно, в удалении всех генетических элементов, ответственных за вышеупомянутую перестройку и/или мутацию. Их недостаток заключается в том, что устраняется переменность двух цепей, тогда как в изобретении предпочтительно сохранение переменности в одной из цепей (предпочтительно, в тяжелой цепи), и подавляется и/или предотвращается перестройка-

мутация другой цепи (предпочтительно, легкой цепи).

Элементы для перестройки и/или гипермутации, охарактеризованные ранее, размещаются в пределах локусов для иммуноглобулинов. Следовательно, средство получения кодирующей иммуноглобулин последовательности, устойчивой к перестройке и/или мутации ДНК, состоит во вставке гена в локус вне локусов иммуноглобулина.

Таким образом, изобретение относится к трансгенному не являющемуся человеком млекопитающему, у которого

последовательность, кодирующая легкую/тяжелую цепь,

интегрирована в геном не являющегося человеком млекопитающего в локусе вне локусов иммуноглобулина. Предпочтительно, вставка производится в локусе, устойчивом к сайленсингу генов. В соответствии с изобретением, интеграция происходит в локусе *Rosa* или сопоставимом локусе.

Предпочтительным является экспрессионная кассета, которая может быть вставлена в локус *Rosa* со средствами, допускающими экспрессию цепи(-ей) иммуноглобулина, в основном ограниченную клетками линии В-клеток, предпочтительно, со средствами, которые допускают экспрессию легкой цепи, кодирующей нуклеиновую кислоту, в течение определенной стадии развития В-клетки. Термин «по существу ограниченная экспрессия» означает, что экспрессия происходит преимущественно в клетках клеточной линии В-клеток, но при этом допускается возможность более низких уровней экспрессии, по сравнению с экспрессией в В-клетках, в других клетках. В предпочтительном варианте осуществления термин «по существу ограниченная экспрессия» означает, что экспрессия имеет место исключительно в клетках из клеточной линии В-клеток. Такие средства обычно и предпочтительно включают специфические промоторы В-клетки (стадия развития), такие как CD19, CD20, цНС (все V-гены), VpreB1, VpreB2, VpreB3,  $\lambda$ 5, Iga, Ig3, kLC (все гены), KLC (все гены), BSAP (Pax5). Несмотря на то, что имеется хорошая возможность управления экспрессией цепи, устойчивой к перестройкам и/или мутациям ДНК, посредством таких промоторов, они являются относительно слабыми. Сильный промотор обычно будет требоваться для обеспечения адекватной поверхностной экспрессии рецептора В-клетки (сформированного из прикрепленных к мембране Н и L цепей Ig) и для конкурирования с экспрессией и соединением эндогенных цепей (при наличии) посредством исключения аллеля. Однако такой промотор обычно не является тканеспецифичным. Для обеспечения тканеспецифичности предпочтительной является непрямая система, использующая Cre/Lox и т.п. Нужная цепь помещается под управление сильного промотора, ингибируемого элементом, который может быть удален посредством воздействия Cre-белка, что приведет к активации нужного гена, кодирующего иммуноглобулин. Данная система подробно описана в работе Wunderlich F.T. (2004), "Generation of inducible Cre systems for conditional gene inactivation in mice", Inauguraldissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch- Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln; [http://deposit.ddb.de/cgi-bin/dokserv?idn=97557230x&dok\\_var=dl&dok\\_ext=pdf&filename=97557230x.pdf](http://deposit.ddb.de/cgi-bin/dokserv?idn=97557230x&dok_var=dl&dok_ext=pdf&filename=97557230x.pdf).

Предпочтительно, цепь иммуноглобулина, продуцируемая устойчивой к перестройкам и гипермутации, является легкой цепью, способной к соединению с различными тяжелыми цепями, кодируемыми не являющимся человеком млекопитающим. Таким образом, легкая цепь будет одной и той же (и менее иммуногенной) во всех антителах, но разнообразие специфичности сохраняется посредством перестроек и гипермутаций в тяжелых цепях. В этом случае может быть предпочтительным сайленсинг по меньшей мере одного из эндогенных локусов, кодирующего легкую цепь, хотя исключение аллеля может привести к отсутствию такой необходимости.

В соответствии с данным вариантом осуществления, предпочтительным является функциональный сайленсинг эндогенной легкой цепи каппа (κ).

Если сайленсинг выполнен для локуса эндогенной легкой цепи κ, но также и по другим причинам, предпочтительно, чтобы устойчивая легкая цепь представляла собой легкую цепь κ, предпочтительно, легкую цепь, имеющую последовательность, подобную последовательности зародышевой линии. В соответствии с изобретением, такая легкая цепь приводила бы к наличию антитела со сниженной иммуногенностью. Предпочтительная последовательность зародышевой линии, основывающаяся на IGKV1-39 человека (O12) в качестве такой легкой цепи, очень часто наблюдается в репертуаре человека (de Wildt et al. 1999. *J. Mol. Biol.* 285(3):895) и имеет исключительную термодинамическую стабильность, выход и растворимость (Ewert et al. 2003. *J. Mol. Biol.* 325(3): 531).

Ниже приведены более конкретные варианты осуществления экспрессионной кассеты, с помощью которой может быть получено не являющееся человеком животное по изобретению. Несмотря на то, что это обычно является благоприятным для иммуноглобулинов, также предполагаются и другие представляющие интерес гены.

Таким образом, изобретение в конкретном варианте осуществления относится к трансгенному не являющемуся человеком млекопитающему, у которого легкая цепь, кодирующая нуклеиновую кислоту, содержит в направлении 5'-3': специфичный для В-клетки промотор, лидерную последовательность, перестроенный V-ген человека, необязательно, энхансер MoEκ1, константную область (κ) и, необязательно, (сокращенный) энхансер MoEκ3'. Ньюбергером был обнаружен и исследован новый специфичный для В-клеток энхансер, расположенный по ходу транскрипции относительно константной области каппа (EP 004690251). Было показано, что данный энхансер играет ключевую роль в экспрессии каппа-генов, поскольку удаление состоящего из 808 п.н. энхансера сильно снижает экспрессию. Удаление 31-каппа энхансера также сильно снижает уровень соматических гипермутаций (SHM). При изучении трансгенной и клеточной экспрессии было обнаружено, что сокращение, мутирование или удаление 3'-каппа энхансеров не только снижает уровни экспрессии, но также снижает уровень соматических гипермутаций. В настоящее время нельзя определить, вовлечен ли 3'-каппа энхансер в процессы SHM, регуляцию экспрессии, или в оба процесса (обзор Odegard, V.H., et al. (2006). *Nat. Rev. Immunol.* 6, 573; Inlay, M., et al. (2002). *Nat. Immunol.* 3, 463).

Всесторонние исследования экспрессии с использованием вариантов 3'-каппа энхансера, созданных способами генной инженерии показали, что 50-нуклеотидный участок является достаточным для контроля экспрессии. Однако для надлежащей экспрессии предпочтительна сокращенная последовательность из 145 нуклеотидов (EP 04690251; Meyer, K.V., et al. (1990) *Nucleic Acids Res.* 18 (19): 5609-15)

Таким образом, изобретение в одном из аспектов относится к нуклеиновой кислоте для встраивания в геном не являющегося человеком животного, представляющую собой экспрессионную кассету для экспрессии необходимой белковой молекулы в клетках, развивающихся в зрелые В-клетки, в течение определенной стадии развития, при этом вышеупомянутая кассета содержит средства для предотвращения сайленсинга экспрессии необходимой белковой молекулы после введения в клетку хозяина и средства для согласования времени экспрессии необходимой белковой молекулы с необходимой стадией развития клетки-хозяина.

Экспрессионная кассета определена как нуклеиновая кислота, которая была введена средствами внедрения в геном клетки хозяина, такими как последовательности, которые

допускают гомологичную рекомбинацию с определенным участком в геноме. Как правило, нуклеиновой кислотой является ДНК, обычно двухцепочечная. Обычно экспрессионную кассету вводят в клетку с помощью вектора, из которого она переносится в геном клетки. Экспрессионная кассета также содержит все элементы, необходимые для экспрессии гена в клетке-хозяине, хотя в определенных вариантах осуществления некоторые из таких элементов могут присутствовать во второй нуклеиновой кислоте, предназначенной для внесения, посредством чего данные элементы действуют в процессе передачи. Элементы, необходимые для экспрессии в клетке-хозяине, включают промоторы, энхансеры и другие регуляторные элементы.

10 Необходимыми являются только те элементы, которые не предоставляются клеткой-хозяином.

В соответствии с изобретением важно, чтобы экспрессия представляющего интерес гена не подвергалась сайленсингу в геноме клетки-хозяина, особенно на стадии развития, на которой требуется экспрессия. Эта цель может быть достигнута различными средствами, такими как вставка в эндогенный локус, или посредством предоставления кассеты с элементами нуклеиновой кислоты, которые предотвращают сайленсинг (Kwaks et al. (2006) Trends Biotechnol. 24(3), p.137-142; включенная в настоящий документ посредством ссылки). Предпочтительно, чтобы экспрессионная кассета вставлялась в локус, который не подвергался сайленсингу в клетках-хозяевах (EP 01439234; включенная в настоящий документ посредством ссылки).

Вышеупомянутые средства для предотвращения сайленсинга включают стабилизирующие последовательности против репрессии (STAR<sup>®</sup>-последовательности) и участки прикрепления к матриксу (MAR). STAR-последовательность представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая имеет способность влияния на транскрипцию генов в cis-положении. Как правило, хотя и не обязательно, STAR-последовательность сама не кодирует функциональный белковый элемент. В одном из вариантов осуществления используется один STAR-элемент. Однако предпочтительно использовать более одного STAR-элемента. В особенно предпочтительном варианте осуществления экспрессионная кассета по изобретению имеет две STAR-последовательности; одна STAR-последовательность на 5'-стороне кодирующей последовательности гена иммуноглобулина и одна STAR-последовательность на 3'-стороне кодирующей последовательности гена иммуноглобулина. MAR представляют собой последовательности ДНК, которые вовлечены в фиксирование ДНК/хроматина на ядерном матриксе; они были описаны для млекопитающих и растений. MAR обладают рядом характеристик, которые способствуют открытию и поддержке эухроматина. MAR могут повышать экспрессию транскриптов и ограничивать позиционные эффекты.

В соответствии с изобретением важно, чтобы экспрессия из кассеты имела место только в определенный период развития клетки, в частности, развития В-клетки, конкретнее, В-клетки в трансгенном не являющемся человеком животном, в частности, в мышши. В данном конкретном случае период развития выбирается таким образом, чтобы экспрессия гена из кассеты (полипептида, подобного легкой или тяжелой цепи) не являлась значительной помехой для нормальной дифференциации и/или созревания клетки и, при необходимости, допускала соединение продуцированной полипептидной цепи с ее копией.

В соответствии с изобретением, это может быть достигнуто, в одном из вариантов осуществления, путем получения нуклеиновой кислоты по изобретению, при этом вышеупомянутые средства для согласования времени экспрессии представляют собой промотор, активность которого в основном ограничена определенной стадией развития.



В процессе развития В-клетка, которая, например, созревает и/или дифференцируется после иммунизации, экспрессия представляющего интерес гена, когда он представляет собой одну из полипептидных цепей иммуноглобулина, не должна являться (значительной) помехой для вышеупомянутого созревания и/или дифференциации, и она должна быть согласована по времени таким образом, чтобы результирующий полипептид мог соединяться со своими аналогами. Следовательно, изобретение относится к нуклеиновой кислоте по изобретению, при этом вышеупомянутая определенная стадия начинается сразу после, или совпадает с началом, экспрессии молекул легкой цепи вышеупомянутыми клетками на определенной стадии развития в зрелые В-клетки.

Этого можно достигнуть посредством выбора промотора, который является активным только в течение вышеупомянутого подходящего периода. Такой промотор может представлять собой промотор CD19, промотор Ig- $\alpha$ , промотор Ig- $\beta$ , промотор  $\mu$ hc (все гены), промотор Vk или их аналоги и гомологи.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения промотор, как описано выше, не контролирует экспрессию представляющего интерес гена напрямую. Вместо этого он контролирует экспрессию гена, продукт которого активирует в транс-положении экспрессию представляющего интерес гена. Таким активируемым геном может быть ген, кодирующий так называемую Cre-рекомбиназу или Cre-подобный белок. Экспрессионная кассета для представляющего интерес гена может, например, вводиться с последовательностью, которая подавляет экспрессию

представляющего интерес гена. Вышеупомянутая последовательность может быть удалена посредством воздействия Cre-рекомбиназы, находящейся под управлением желаемого промотора (активного во время соответствующей стадии развития). В данном варианте осуществления требуется множество экспрессионных кассет.

Таким образом, изобретение относится к множеству нуклеиновых кислот, представляющих собой экспрессионные кассеты, при этом одна нуклеиновая кислота содержит экспрессионную кассету, кодирующую Cre-подобный белок под управлением промотора, активного во время желаемой стадии развития клетки-хозяина, и вторая нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую желаемую белковую молекулу под управлением конститутивного промотора, который может быть активирован посредством воздействия Cre-подобного белка. Вышеупомянутая активация предпочтительно достигается путем удаления стоп-последовательности, фланкированной сайтами loxP. Система Cre/lox подробно описана в работе Rajewsky et al. (1996) J. Clin. Invest. 98, p.600-603, которая включена в настоящий документ посредством ссылки. Обзор таких систем приведен в работе Wunderlich F.T. (2004), "Generation of inducible Cre systems for conditional gene inactivation in mice", Inauguraldissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln; [http://deposit.ddb.de/cgi-bin/dokserv?idn=97557230x&dok\\_var=dl&dok\\_ext=pdf&filename=97557230x.pdf](http://deposit.ddb.de/cgi-bin/dokserv?idn=97557230x&dok_var=dl&dok_ext=pdf&filename=97557230x.pdf), которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

Изобретение также относится к трансгенному не являющемуся человеком животному, в которое была введена экспрессионная кассета по изобретению, при этом желаемая белковая молекула является полипептидной цепью иммуноглобулина.

Предпочтительной полипептидной цепью является легкая цепь. Более предпочтительным полипептидом является легкая цепь зародышевой линии или подобная ей. Наиболее предпочтительным полипептидом является O12, предпочтительно, перестроенная каппа-легкая цепь зародышевой линии IGKV1-39\*01/IGKJ1\*01 (номенклатура в соответствии с базой данных IMGT, <http://www.imgt.org>).

Также предпочтительно, чтобы полипептидная цепь приводилась в состояние неспособности к перестройке и/или исключения любой модификации последовательности, такой как обычно происходящая с Ig в течение процесса созревания аффинности В-клетки. Таким образом, изобретение относится к трансгенному не являющемуся человеком животному, в которое была введена экспрессионная кассета по изобретению, при этом вышеупомянутая перестройка и/или модификация последовательности предотвращается посредством отсутствия элементов по меньшей мере частично ответственных за соматическую гипермутацию, таких как, например, энхансер МоЕк1.

Предпочтительная экспрессионная кассета по изобретению содержит средства для предотвращения сайленсинга. В одном из вариантов осуществления, вышеупомянутые средства для предотвращения сайленсинга представляют собой средства для вставки в локус генома. клетки-хозяина, который является устойчивым к сайленсингу. Вышеупомянутые средства для вставки предпочтительно представляют собой средства для гомологичной рекомбинации в вышеупомянутом сайте, устойчивом к сайленсингу. Предпочтительным локусом в случае, когда не являющееся человеком животное представляет собой мышь, является rosa-локус.

Еще одна предпочтительная экспрессионная кассета по изобретению содержит в направлении 5'-3': VK-промотор, лидерную последовательность мыши, V-ген человека, необязательно, энхансер МоЕк1, константную область (Ск) крысы и, необязательно, (сокращенный) энхансер МоЕк3'.

Еще одна предпочтительная экспрессионная кассета по изобретению содержит в направлении 5'-3': VK-промотор, лидерную последовательность человека, V-ген человека, необязательно, энхансер МоЕк1, константную область (Ск) крысы и, необязательно, (сокращенный) энхансер МоЕк3'.

Естественно, конечная цель изобретения состоит в получении антител для использования в терапии человека. Таким образом, изобретение относится к способу получения желаемого антитела, включающему воздействие на не являющегося человеком млекопитающего по изобретению антигеном таким образом, что индуцируется выработка антител, и выделение антител, специфичных для антигена.

В альтернативном варианте осуществления, изобретение относится к способу получения желаемого антитела, включающему воздействие на не являющегося человеком млекопитающего по изобретению антигеном таким образом, что индуцируется выработка антител, и выделение клеток, продуцирующих такие антитела, выращивание и, необязательно, иммортализацию вышеупомянутых клеток и сбор вышеупомянутых антител.

В еще одном варианте осуществления, изобретение относится к способу получения желаемого антитела, включающему воздействие на не являющегося человеком млекопитающего по изобретению антигеном таким образом, что индуцируется выработка антител, и выделение нуклеиновой кислоты, кодирующей по меньшей мере часть такого антитела, вставку вышеупомянутой нуклеиновой кислоты, или ее копии или производной, в экспрессионную кассету и экспрессирование вышеупомянутого антитела в клетке-хозяине.

Способы получения антител из трансгенных мышей известны специалистам в данной области техники. Особенно

предпочтительными являются способы получения смеси антител из одной клетки, посредством чего, по изобретению, из мышей выделяются нуклеиновые кислоты, кодирующие данные антитела.

Такое так называемое олигоклонирование изложено в документах WO 04106375 и WO 05068622, которые включены в настоящий документ посредством ссылки.

Настоящее изобретение относится к трансгенным не являющимся человеком млекопитающим, предпочтительно/ мышам, способным к созданию специфичных и высокоаффинных гибридных антител мышши-человека, предпочтительно, с 5  
вариабельными областями (VL) легкой цепи иммуноглобулина человека в конфигурации, близкой к зародышевой линии, и, предпочтительно, с вариабельными областями (VH) тяжелой цепи иммуноглобулина мышши, которые могут иметь накопленные соматические мутации во время процесса, контролируемого антигеном созревания аффинности. 10  
Предусматривается, что V<sub>H</sub>-области гибридных антител мышши могут подвергаться процедурам гуманизации с целью получения mAb, имеющих пониженную иммуногенность при применении в организме человека, на основании V<sub>L</sub>-областей зародышевой линии, или близких к ней, и V<sub>H</sub>-областей мышши, подвергшихся гуманизации.

В частности, в настоящем изобретении было показано, что трансгенные мышши, 15  
которые содержат конструкцию экспрессии ДНК, кодирующую перестроенную V<sub>L</sub>-область человека под контролем действующих в cis-положении генетических элементов, которые обеспечивают своевременную и регулируемую экспрессию трансгена в значительной части В-клеток в процессе развития В-клеток, и не имеют элементов, 20  
управляющих механизмом соматической гипермутации трансгена, способны создавать специфичные и высокоаффинные гибридные антитела мышши-человека в основном, с немутировавшими L-цепями. Было показано, что перестроенный трансген человека может соединяться с множеством эндогенных H-цепей иммуноглобулинов мышши с образованием гибридных иммуноглобулинов мышши-человека, экспрессируемых на 25  
поверхности В-клетки, и может в достаточной степени способствовать развитию В-клеток мышши для получения многочисленных' и разнообразных ячеек периферийных В-клеток.

В предпочтительном варианте осуществления, конструкция для экспрессии трансгена содержит кодирующие последовательности перестроенного V-участка L-цепи человека 30  
под управлением V<sub>L</sub>-промотора человека с целью управления специфичной экспрессией В-клеток. Кроме того, конструкция содержит последовательность 3'Ск-энхансера мышши для специфичной и индуцируемой экспрессии трансгена на высоком уровне в В-клетке. Кроме того, конструкция задумана как не имеющая регуляторных элементов, которые способствуют привлечению механизма соматической гипермутации для трансгена, 35  
таких как энхансер интрона и 3'С-каппа энхансер.

В связанном варианте осуществления, перестроенный V<sub>L</sub>-ген человека вставляется в локус Rosa26 мышши посредством сайт-специфичного встраивания. Локус Rosa26 40  
полезен в контексте подхода «направленного трансгенеза» для эффективного создания трансгенных организмов (таких как мышши) с предсказуемым профилем экспрессии трансгена.

В предпочтительном варианте осуществления перестроенная V<sub>L</sub>-область человека выбирается по ее способности к соединению с множеством различных V<sub>H</sub>-генов мышши с тем, чтобы обеспечить создание популяции В-клеток с разнообразным репертуаром 45  
V<sub>H</sub>-генов. Способ получения таких V<sub>L</sub>-областей включает амплификацию репертуара перестроенных V<sub>H</sub>-генов из В-клеток мышши и репертуара перестроенных V<sub>L</sub>-областей зародышевой линии человека из В-клеток человека, а также их клонирование в векторы фагмидного дисплея для приготовления разнообразных библиотек гибридных

иммуноглобулинов в бактериях. Посредством' анализа нуклеотидных последовательностей не выбранных и выбранных антигеном пар  $V_H/V_L$ , идентифицируются  $V_L$ -гены зародышевой линии человека, которые соединяются с множеством различных  $V_H$ -генов мыши. Описана коллекция  $V_L$ -генов зародышевой линии человека с такой способностью.

В одном из вариантов осуществления, было показано, что после иммунизации антигеном В-клетки способны устанавливать иммунный ответ, приводящий к образованию В-клеток, которые секретируют гибридные антитела с высокой специфичностью и аффинностью. V-области, кодирующие данные антитела, характеризуются трансгенной легкой цепью человека, которая содержит очень мало мутаций, или не содержит их вообще, и тяжелой цепью мыши, которая содержит переменное количество мутаций, внесенных посредством механизма соматической гипермутации.

В связанном варианте осуществления, предусматриваются стратегии получения высокоаффинных гибридных моноклональных антител из трансгенных мышей посредством технологий гибридом и дисплея, а также процедура гуманизации  $V_H$ -областей мыши с целью получения менее иммуногенных антител для применения в организме человека.

В одном из вариантов осуществления, изобретение относится к конструкции из трансгенной L-цепи иммуноглобулина, содержащей последовательности ДНК, которые кодируют  $V_L$ -область иммуноглобулина человека вместе с константной областью (CL) легкой цепи иммуноглобулина животного, при этом данные последовательности функционально соединены с последовательностями регуляции транскрипции таким образом, что при интеграции в не являющееся человеком трансгенное животное продуцируется Ig-полипептид  $V_L$ -CL с  $V_L$ -областью человека, который не подвержен или незначительно подвержен соматической гипермутации.  $V_L$  Ig имеет способность соединения с перестроенными полипептидами  $V_H$ -СН, которые образуются в процессе развития В клетки в не являющемся человеком трансгенном животном, при этом вышеупомянутые полипептиды  $V_H$ -СН сохраняют способность подвергаться соматической гипермутации при стимуляции. CL-область может принадлежать животному произвольного вида, и обычно может соединяться с СН-областями не являющегося человеком трансгенного животного.

Изобретение также относится к применению вышеуказанной трансгенной конструкции для получения трансгенного не являющегося человеком животного, способного продуцировать гибридные антитела, состоящие из  $V_L$ -CL полипептидов и  $V_H$ -СН полипептидов, в которых  $V_L$ -область имеет человеческое происхождение и CL,  $V_H$  и СН могут принадлежать животным произвольного вида, включая человека. После иммунизации данные трансгенные животные могут создавать высокоаффинные антитела, кодируемые подвергавшимися соматической гипермутации  $V_H$ -генами, и в основном немутированные  $V_L$ -гены, кодируемые трансгеном.

В другом аспекте, изобретение относится к способу получения трансгенного не являющегося человеком животного, способного к продукции гибридных антител в ответ на антигенный стимул, включающий функциональное прерывание эндогенного локуса легкой цепи иммуноглобулина и вставку в геном животного трансгенной конструкции изобретения.

Изобретение относится к применению животных, получаемых посредством данного процесса, для получения В-клеток, которые продуцируют иммуноглобулин, имеющий  $V_L$  легкой цепи человека. В другом аспекте изобретение относится к процессу получения В-клеток, которые продуцируют иммуноглобулин, имеющий  $V_L$  человека и

5 связывающийся с выбранным антигеном, включающий стимулирование животного, получаемого посредством вышеописанного процесса, вышеупомянутым антигеном и отбор В-клеток вышеупомянутого животного, которые связывают вышеупомянутый антиген. Изобретение также относится к В-клеткам, получаемым с помощью данного

10 процесса, и гибридомы, получаемые с помощью иммортализации таких В-клеток, например, гибридомы, получаемые путем слияния В-клеток, указанных выше, с клетками миеломы. Изобретение также относится к способу получения моноклонального антитела, включающему культивирование такой гибридомы. В еще одном аспекте изобретение относится к применению указанной выше В-клетки для получения

15 гибридомы или соответствующего моноклонального антитела.

Еще в одном аспекте изобретение относится к способу получения иммуноглобулина, имеющего  $V_L$ -цепь человека и связывающегося с выбранным антигеном, включающему стимулирование животного, полученного в соответствии с описанным выше, вышеупомянутым антигеном, и получение из него иммуноглобулина.

В одной из стратегий, в качестве отдельного этапа, перестроенная  $V_L$ -область, кодируемая сегментами генов V и J зародышевой линии человека, и константная область легкой цепи животного произвольного вида, но, предпочтительно, константная область

20 мыши, вводятся в зародышевую линию мыши. Трансгенная ДНК может быть внесена в пронуклеус оплодотворенных ооцитов или стволовые клетки эмбриона. Интеграция

25 может быть случайной или гомологичной в зависимости от конкретной применяемой стратегии. Например,  $V_L$ -трансген может быть внесен посредством случайной вставки, в результате чего мыши будут нести одну или множество копий трансгена в геноме. В качестве альтернативы,  $V_L$ -трансген человека может быть нацелен на конкретный

30 локус генома с использованием сайт-специфичной рекомбинации, в соответствии с описанным в технике.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления,  $V_L$ -трансген нацелен на локус ROSA26 мыши, который является подходящим местом интеграции, допускающим

35 сильную и предсказуемую экспрессию вставленных трансгенов (EP 1439234). Целевой вектор допускает вставку одной копии экспрессионной кассеты гена, посредством чего предотвращается модуляция экспрессии трансгена путем расположения множества

40 копий. За счет выбор аутосомного локуса Rosa26 в качестве места вставки, профиль экспрессии вставленного трансгена в не являющемся человеком животном является предсказуемым. Кроме того, можно предотвратить эффекты случайной X-инактивации

и/или модуляции по позиции в хромосоме. Это также устраняет потребность в создании и анализе множества трансгенных штаммов для произвольного заданного трансгена. В конечном итоге, целевой вектор Rosa26 для сайт-специфичной интеграции может быть

45 использован для множества экспрессионных кассет генов. Таким образом-, можно предусмотреть, чтобы 2 или более различных перестроенных  $V_L$ -области зародышевой

линии человека вставлялись в локус Rosa26 с целью дальнейшего увеличения разнообразия репертуара гибридных антител или антител человека.

В другом варианте осуществления, перестроенная  $V_L$ -область человека может быть нацелена на локус каппа- или лямбда-легкой цепи Ig мыши, с тем чтобы функционально

инактивировать эндогенный локус, или мыши, содержащие перестроенную  $V_L$ -область человека, могут скрещиваться с мышами, не имеющими функциональных каппа- или лямбда локусов  $Ig$ , или может быть сделано и то, и другое. Таким образом, путем применения трансформации, с использованием повторяющихся шагов или в комбинации со скрещиванием, могут быть получены трансгенные животные, способные к продуцированию антител, содержащих  $V_L$ -трансен человека при отсутствии, в основном, эндогенных легких цепей иммуноглобулина хозяина.

В одном из вариантов осуществления,  $V_L$ -трансен человека выбирают по его способности к соединению со значительной частью  $V_H$ -областей мыши с образованием разнообразного репертуара функциональных гибридных антител мыши-человека, экспрессируемых на поверхности В-клетки. Под значительной частью  $V_H$ -областей мыши понимается, что  $V_L$  человека соединяется по меньшей мере с 0,1%  $V_H$ -областей мыши, созданных в процессе развития В-клетки, более предпочтительно, по меньшей мере с 1%, и, наиболее предпочтительно, по меньшей мере с 10%. Способы идентификации  $V_L$ -генов человека с данной характеристикой включают парное соединение репертуара  $V_L$ -областей человека с репертуаром  $V_H$ -областей мыши, коэкспрессию  $V_H$  и  $V_L$ -областей в соответствующих эукариотических и прокариотических экспрессионных векторах и отбор  $V_L$ -областей человека, которые соединяются со значительной частью  $V_H$ -областей, мыши. В одном из вариантов осуществления, фагмидные вектора могут быть использованы для контроля экспрессии фрагментов антитела мыши-человека в бактериальных клетках или на поверхности нитеобразного фага и анализа связывающей способности фрагментов антител с помощью методов, известных в технике.

В другом варианте осуществления,  $V_L$ -трансен человека отбирается по его способности к соединению со значительной частью  $V_H$ -областей человека с образованием разнообразного репертуара антител человека, экспрессируемых на поверхности В-клетки. Под значительной частью  $V_H$ -областей человека понимается, что  $V_L$  человека соединяется по меньшей мере с 0,1%  $V_H$ -областей человека, созданных в процессе развития В-клетки, более предпочтительно, по меньшей мере с 1%, и, наиболее предпочтительно, по меньшей мере с 10%.

В последнем варианте осуществления, трансгенные мыши с  $V_L$  человека скрещиваются с мышами, содержащими функционально перестроенные или неперестроенные локусы Н-цепи иммуноглобулина человека и функционально инактивированные эндогенные локусы Н-цепи  $Ig$ , в соответствии с описанным в технике. Функциональная инактивация двух копий из каждого трех локусов  $Ig$  хозяина (тяжелая цепь, каппа- и лямбда-легкая цепь), где хозяин содержит  $IgH$  человека и перестроенный  $V_L$ -трансен человека, позволила бы продуцировать чисто молекулы антител человека без продуцирования антител хозяина или химерных антител хозяина-человека. Такой штамм-хозяин, за счет иммунизации специфическими антигенами, отвечал бы продуцированием В-клеток мыши, продуцирующих специфические антитела человека, при этом В-клетки позднее сливаются с клетками миеломы мыши или иммортализируются любым другим способом в целях непрерывного стабильного продуцирования моноклональных антител человека. В качестве альтернативы, вышеупомянутая популяция В-клеток используется в качестве источника  $V_H$ -областей,

которые могут быть получены путем создания библиотек кДНК или ПЦР-амплификации с использованием праймеров для  $V_H$ -областей человека, в соответствии с известным в технике.

Перестроенный  $V_L$ -ген человека реконструируется в подходящем эукариотическом или прокариотическом микроорганизме, и полученные фрагменты ДНК могут быть

внесены в пронуклеус оплодотворенных ооцитов или стволовые клетки эмбриона. Различные конструкции, направляющие специфичную для В-клеток экспрессию  $V_L$ -трансгенов, были описаны в технике и имеют следующий общий формат: лидерная последовательность и соответствующие последовательности, расположенные против

хода транскрипции, для управления специфичной для В-клеток экспрессией трансгена, кодирующая последовательность  $V_L$ -трансгена человека, энхансерная последовательность, которая направляет специфичную для В-клеток и высокоуровневую экспрессию трансгена, и ген константной области мыши. В предпочтительном варианте, энхансер представляет собой энхансер С-каппа 3', поскольку он управляет

высокоуровневой экспрессией в клеточной линии В-клеток, но не мобилизует соматическую гипермутацию при использовании в трансгенных конструкциях. В одном из вариантов осуществления, животные, предпочтительно, мыши, содержащие одну или множество копий трансгена в своем геноме, изолируются и анализируются на предмет устойчивой экспрессии. Выбирают животных, которые демонстрируют устойчивую экспрессию трансгена в течение более длительных периодов времени, предпочтительно, в В-клетках. При необходимости, различные линии животных, содержащие независимые вставки одной копии или множества копий трансгена, предпочтительно, в различных хромосомах, скрещиваются с целью получения животных с различными вставками одной копии или множества копий трансгена с целью повышения уровня экспрессии у животных, предпочтительно, в В-клетках.

Изобретение также относится к потомству трансгенных не являющихся человеком животных по изобретению, при этом потомство содержит по меньшей мере в своей клеточной линии В-клеток, последовательность, кодирующую тяжелую или легкую цепь, вместе со средствами, которые обеспечивают устойчивость последовательности к перестройкам и/или соматическим гипермутациям ДНК.

Изобретение также относится к потомству трансгенных не являющихся человеком животных по изобретению, при этом потомство содержит экспрессионную кассету для экспрессии желаемой белковой молекулы в клетках в течение определенной стадии развития для клеток, развивающихся в зрелые В-клетки.

Кроме того, изобретение относится к клетке, которая выделена из трансгенного не являющегося Человеком животного по изобретению, при этом клетка содержит последовательность, кодирующую тяжелую или легкую цепь, вместе со средствами, которые обеспечивают устойчивость последовательности к перестройкам и/или соматическим гипермутациям ДНК. Кроме того, изобретение относится к клетке, которая выделена из трансгенного не являющегося человеком животного по изобретению, при этом клетка содержит экспрессионную кассету для экспрессии желаемой белковой молекулы в клетках в течение определенной стадии развития для клеток, развивающихся в зрелые В-клетки. Клетка по изобретению, предпочтительно, продуцирующая антитело В-клетка или клетка, способная к дифференциации или созреванию в продуцирующее антитело В-клетку, может быть использована для продукции антител *in vitro*, как известно специалисту, например, из работы Gasean et al. 1991. J. Exp. Med. 173: 747-750. Способы иммортализации клетки по изобретению

известны в технике и включают создание гибридом, например, путем слияния с клеткой миеломы, трансформацию с помощью вируса Эпштейна-Барр; экспрессию транскриптора сигналов активации и транскрипции (STAT), активацию через передачу сигналов по рецепторам CD40 и IL4 и/или экспрессию Bcl6 (Shvarts et al. 2002. Genes Dev 16: 681-686).

5 На отдельном этапе эндогенные локусы каппа- и лямбда-легких цепей мыши делаются, в основном, нефункциональными таким образом, что по меньшей мере большинство В-клеток в трансгенных мышцах имеют Ig-рецепторы, которые содержат трансгенную  $V_L$ -область человека. Инактивация эндогенных локусов иммуноглобулина мыши достигается путем направленной дезорганизации соответствующих локусов  
10 посредством гомологичной рекомбинации в стволовых клетках эмбриона мыши. Вышеупомянутая направленная дезорганизация включает изменение геномной последовательности таким образом, что, в основном, не осуществляется продуцирование функциональных эндогенных каппа- и/или лямбда-легких цепей иммуноглобулина мыши. Термин «в основном, отсутствие функциональных эндогенных иммуноглобулинов мыши» означает, что эндогенные локусы каппа- и/или лямбда-легких цепей подверглись функциональному сайленсингу, в результате чего уровень экспрессии функциональных белков эндогенных локусов каппа- и/или лямбда-легких цепей, предпочтительно, локуса каппа-легкой цепи, снижается до около 20% от уровня экспрессии у мыши-контроля, более предпочтительно, до около 10%, более предпочтительно, до около 5%, более  
20 предпочтительно, до около 2% и, более предпочтительно, до около 1%. В наиболее предпочтительном варианте осуществления, уровень экспрессии функциональных белков локусов каппа- и/или лямбда-легких цепей сокращается до 0%. Уровень экспрессии функциональных белков может быть определен с помощью средств,  
25 известных специалисту, включая вестерн-блоттинг и парное соединение с тяжелой цепью мыши. Вышеупомянутая мышь-контроль представляет собой мышь, в которой эндогенные локусы каппа- и/или лямбда-легких цепей не подвергались дезорганизации. Вышеупомянутое изменение включает мутацию и/или удаление последовательностей генов, которые требуются для функциональной экспрессии генов эндогенных иммуноглобулинов. В качестве альтернативы, вышеупомянутое изменение включает  
30 вставку нуклеиновой кислоты в эндогенные локусы "каппа- и/или лямбда-легких цепей мыши с тем, чтобы снизить функциональную экспрессию генов эндогенных иммуноглобулинов. В одном из вариантов осуществления, вышеупомянутая нуклеиновая кислота содержит элемент сайленсинга, что приводит к транскрипционному сайленсингу гена эндогенного иммуноглобулина. В еще одном варианте осуществления, или в  
35 дополнение, вышеупомянутая нуклеиновая кислота содержит последовательность, которая нарушает сплайсинг и/или трансляцию гена эндогенного иммуноглобулина, например, путем введения экзона, который вызывает сдвиг рамки считывания в кодирующей последовательности, или который содержит преждевременный стоп-кодон. В каждом случае создаются химерные животные, которые частично получены из  
40 модифицированных эмбриональных стволовых клеток, и способны передавать генетические модификации через зародышевую линию. Спаривание штаммов мыши с локусами иммуноглобулинов человека со штаммами с инактивированными локусами мыши дает животных, которые продуцируют антитела, содержащие, в основном, только легкие цепи человека.

45 Конструкцию для гомологичной рекомбинации можно получить средствами, известными из уровня техники, и все нежелательные последовательности, например, прокариотические последовательности, удаляются. Может быть использована любая удобная методика



введения конструкции для гомологичной рекомбинации в клетку-мишень. Данные методики включают слияние сферобластов, липофекцию, электропорацию, опосредованный фосфатом кальция перенос ДНК или прямую микроинъекцию. После трансформации или трансфекции клеток-мишеней, клетки-мишени выбираются с помощью положительных и/или отрицательных маркеров, например, устойчивости к неомицину и/или устойчивости к ацикловиру и/или ганцикловиру. Клетки, демонстрирующие желаемый фенотип, могут затем подвергаться дополнительному анализу посредством рестрикционного анализа, электрофореза, саузерн-анализа, ПЦР и т.п. Путем идентификации фрагментов, которые демонстрируют наличие поражения (-ий) в целевом локусе, идентифицируются клетки, в которых оказалось, что гомологичная рекомбинация инактивировала копию целевого локуса.

Кроме того, показано, что после иммунизации  $V_H$ -области мыши и человека у вышеупомянутых трансгенных мышей, но не  $V_L$ -области, способны подвергаться соматическим гипермутациям для создания высокоаффинных антител. Является благоприятным, что было предсказано, что данные антитела, кодируемые  $V_L$ -областями зародышевой линии, способствуют более низкой иммуногенности при применении для людей, и в результате получают более стабильные антитела, которые меньше подвержены агрегации и, следовательно, являются более безопасными для терапевтического применения на людях.

Все МАb, полученные из вышеупомянутых не являющихся человеком трансгенных животных или клеток, имеют одни и те же идентичные  $V_L$ -области человека. Было описано, что mAb, которые имеют одни и те же идентичные  $V_L$ -области, могут коэкспрессироваться в одной клональной клетке с целью продуцирования смеси рекомбинантных антител с функциональными сайтами связывания (см. WO 04106375 и WO 05068622). Соответственно, изобретение относится к платформе для создания специфичных и высокоаффинных mAb, которые составляют основу для смесей mAb, продуцируемых клональными клетками.

Предпочтительно, чтобы МАb, полученные из вышеупомянутых не являющихся человеком трансгенных животных или клеток, были направлены против клеточных мишеней. Предпочтительными мишенями являются экспрессируемые на поверхности или растворимые белки человека или молекулы углеводов. Более предпочтительными мишенями являются экспрессируемые на поверхности или растворимые белки или молекулы углеводов, которые экспрессируются на поверхности бактерий, вирусов, других патогенных микроорганизмов, особенно человека.

Конкретно, предпочтительные мишени включают цитокины и хемокины, включая, но не ограничиваясь перечисленным, интерлейкин 1бета (IL1бета), IL2, IL4, IL5, IL7, IL8, IL12, IL13, IL15, IL18, IL21, IL23 и хемокины, такие как, например, СХС-хемокины, СС-хемокины, С-хемокины (или  $\gamma$ -хемокины), такие как XCL1 (лимфотактин- $\alpha$ ) и XCL2 (лимфотактин- $\beta$ ) и СХ3С-хемокины. Также включаются в число предпочтительных мишеней молекулы рецепторов цитокинов и хемокинов, включая цитокиновые рецепторы типа I, такие как, например, рецептор IL-2, цитокиновые рецепторы типа II, такие как, например, рецепторы интерферона, рецепторы суперсемейства иммуноглобулинов (Ig), семейство рецепторов фактора некроза опухоли, включая рецепторы для CD40, CD27 и CD30, рецепторы серин/треониновой протеинкиназы, такие как рецепторы TGF-бета, соединенные рецепторы G-белка, такие как CXCR1-CXCR7, и рецепторы тирозинкиназы, такие как члены семейства рецепторов фактора роста фибробластов (FGFR), члены

семейства EGF-рецептора, включая erbB1 (EGF-R; HER1), erbB2, (HER2), erbB3 (HER3) и erbB4 (HER4), члены семейства инсулиновых рецепторов, члены семейства рецепторов фактора роста гепатоцитов, включая c-Met (HGF-R), члены семейства рецепторов Trk, члены семейства рецепторов AXL, члены семейства рецепторов LTK, члены семейства рецепторов TIE, члены семейства рецепторов ROR, члены семейства рецепторов DDR, члены семейства рецепторов KLG, члены семейства рецепторов RYK, члены семейства рецепторов MuSK и члены семейства рецепторов фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR).

Кроме того, предпочтительными мишенями являются мишени, которые сверхэкспрессированы или избирательно экспрессированы в опухолях, такие как, например, VEGF, CD20, CD38, CD33, CEA, EpCAM, PSMA, CD54, Lewis Y, CD52, CD40, CD22, CD51/CD61, CD74, MUC-1, CD38, CD19, CD262 (TRAIL-R2), RANKL, CTLA4, и CD30; мишени, которые вовлечены в хроническое воспаление, такие как, например, CD25, CD11a, TNF, CD4, CD80, CD23, CD3, CD14, IFNгамма, CD40L, CD50, CD 122, TGFбета и TGFальфа.

Предпочтительные экспрессируемые на поверхности белки или молекулы углеводов, которые экспрессируются на поверхности бактерий, вирусов, других патогенных паразитных микроорганизмов, особенно человека, включают маркеры поверхности вирусов гриппа А и В, такие как гемагглютинин (HA) и нейраминидаза (NA), филовирусы, такие как вирусы Эбола, бешенства, кори, краснухи, инфекционного паротита, флавивирусы, такие как вирусы Денге типа 1-4, вирус клещевого энцефалита, вирус Западного Нила, вирус японского энцефалита и вирус желтой лихорадки, парамиксовирусы, включая парамиксовирус, такой как парагрипп 1, 3, рубулавирус, такой как вирус инфекционного паротита и парагриппа 2, 4, вирус кори и пневмовирус, такие как респираторный синцитиальный вирус, коровья оспа, натуральная оспа, коронавирусы, включая вирус тяжелого острого респираторного синдрома (SARS), вирус гепатита А, В и С, вирус иммунодефицита человека, вирусы герпеса, включая цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Барр, вирус простого герпеса и вирус ветряной оспы, парвовирусы, такие как, например, B19; *Legionella pneumophila*; *Listeria monocytogenes*; *Campylobacter jejuni*; *Staphylococcus aureus*; *E.coli O157:H7*; *Borrelia burgdorferi*; *Helicobacter pylori*; *Ehrlichia chaffeensis*; *Clostridium difficile*; *Vibrio cholera*; *Salmonella enterica Serotype Typhimurium*; *Bartonella henselae*; *Streptococcus pyogenes* (стрептококк группы А); *Streptococcus agalactiae* (стрептококк группы В); устойчивый к множеству лекарств *S. aureus* (например, MRSA); *Chlamydia pneumoniae*; *Clostridium botulinum*; *Vibrio vulnificus*; *Parachlamydia pneumoniae*; *Corynebacterium amycolatum*; *Klebsiella pneumoniae*; устойчивые к линезолиду энтерококки (*E. faecalis* и *E. faecium*); и устойчивый к множеству лекарств *Acinetobacter baumannii*.

Наиболее предпочтительными мишенями являются IL-6 и его рецептор, IL-6Ральфа, гликопротеин-определенный gp130, RSV, особенно поверхностные белки F, G и SH и неструктурные белки, такие как N и М, и рецепторы тирозинкиназ, в частности, erbB1 (EGF-R; HER1), erbB2, (HER2), erbB3 (HER3), erbB4 (HER4), IGF-R1 и IGF-R11, c-Met (HGF-R).

Таким образом, изобретение относится к основе создания специфичных и высокоаффинных mAb против вышеупомянутых мишеней, которые составляют основу для смесей mAb, продуцируемых клональными клетками. В предпочтительном варианте осуществления вышеупомянутые специфичные и высокоаффинные mAb включают mAb, которые направлены против различных эпитопов по меньшей мере на одной из мишеней. В еще одном предпочтительном варианте осуществления, вышеупомянутые

специфичные и высокоаффинные mAb включают mAb, которые направлены против различных мишеней, таких как, например, один или более членов семейства EGF-рецепторов, включая erbB1 (EGF-R; HER1), erbB2, (HER2), erbB3 (HER3) и erbB4 (HER4).

5 Если не определено другое, то научные и технические термины, используемые в связи с настоящим изобретением, должны иметь значения, которые хорошо известны и понятны специалистам в данной области техники. Кроме того, если другое не предусматривается контекстом, термины в единственном числе должны включать множественное число, и термины во множественном числе должны включать единственное. Как правило, номенклатуры, а также методики, используемые в связи с  
10 выращиванием клеток и тканей, молекулярной биологией, химией белков и олиго- или полинуклеотидов и гибридизацией, описанные в настоящем документе, представляют собой номенклатуры и методики, хорошо известные и обычно используемые в технике. Стандартные методики используются для рекомбинантных ДНК, синтеза олигонуклеотидов и выращивания и трансформации тканей (например, электропорация,  
15 липофекция). Ферментативные реакции и методики очистки осуществляются в соответствии со спецификациями производителя, в соответствии с общепринятым в технике или в соответствии с описанным в настоящем документе. Вышеупомянутые методики и процедуры обычно выполняются в соответствии с обычными методами, хорошо известными из уровня техники, и в соответствии с описанным в различных  
20 общих и более конкретных ссылках, которые цитируются и обсуждаются в настоящей спецификации. См., например, Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001)), которая включена в настоящий документ посредством ссылки. Номенклатуры, а также лабораторные процедуры и методики, используемые в связи с аналитической химией,  
25 синтетической органической химией и медицинской и фармацевтической химией, описанные в настоящем документе, представляют собой номенклатуры, процедуры и методики, хорошо известные и обычно используемые в технике. Стандартные методики используются для химического синтеза, химических анализов, приготовления фармацевтических препаратов, составления рецептов, доставки препаратов и лечения  
30 пациентов.

Описание чертежей

Фигура 1

35 Схема топологии мест отжига специфичных для мыши  $V_H$ -праймеров и положение требуемых сайтов рестрикции, которые вводятся в виде последовательностей с висящими краями на 3'-конце праймеров.

Фигура 2

Этапы ПЦР-амплификации (амплификация, промежуточный этап и введение сайтов). Положение и название праймеров для амплификации  $V_H$  мыши (и смесей праймеров)  
40 указаны для каждого этапа.

Фигура 3

Топология вектора MV1043. Данный вектор используется для клонирования  $V_H$ -фрагментов мыши и человека. O12 (IGKV1-39) указан как  $V_L$ -ген. Продукты данного вектора, совместно со вспомогательными фагами в клетках *E. coli*, позволяют получать  
45 фаги, которые отображают Fab-фрагменты на поверхности фаговых частиц в форме слитого с белком g3 продукта и наличие вектора в фаге в форме генетического содержания (F1 ORI).

Фигура 4

Топология С-каппа локуса мыши по ходу транскрипции относительно J-сегментов. Указаны оба энхансера и область С-каппа. Стрелка внизу указывает участок, который удаляется с целью выполнения сайленсинга локуса.

#### Фигура 5

5 Топология С-лямбда локуса мыши. Указаны все три активных V-области (Igl-V1, V2 и V3), J-сегменты (Igl-J1, Igl-J2, Igl-J3, Igl-J4 и псевдосегмент Igl-J3p) и константные области (Igl-C1, Igl-C2, Igl-C3 и Igl-C4). Области, которые удаляются с целью выполнения сайленсинга локуса, отмечены маркерами удаления. Данные удаления включают все активные V-гены (1, 2 и 3) и межгенный сегмент между V2 и V3.

#### 10 Фигура 6

Топология конструкции IGKV1-39/J-Ск с интроном, расположенным в лидерной последовательности открытой рамки считывания (ORF).

#### Фигура 7

15 Топология конструкции IGLV2-14/J-Ск с интроном, расположенным в лидерной последовательности открытой рамки считывания (ORF).

#### Фигура 8

20 Топология конструкции VκP-IGKV1-39/J-Ск (VκP-O12). Промотор происходит из гена IGKV1-39-и помещается непосредственно перед необходимыми элементами для эффективной транскрипции и трансляции. Межгенные последовательности (включая энхансеры) извлечены из мышей и получены из ВАС-клонов. Последовательность С-каппа кодирует каппа-константную область крысы.

#### Фигура 9

25 Топология конструкции VκP-IGLV2-14/J-Ск (VκP-2a2). Промотор происходит из гена IGKV1-39 и помещается непосредственно перед необходимыми элементами для эффективной транскрипции и трансляции. Межгенные последовательности (включая энхансеры) извлечены из мышей и получены из ВАС-клонов. Последовательность С-каппа кодирует каппа-константную область крысы.

#### Фигура 10

30 Топология конструкции VκP-IGKV1-39/J-Ск-Δ1 (VκP-O12-dell) идентична VκP-IGKV1-39/J-Ск с Фигуры 9, за исключением того, что энхансерная область интрона удалена.

#### Фигура 11

35 Топология конструкции VκP-IGKV1-39/J-Ск-Δ2 (VκP-O12-del2) идентична VκP-IGKV1-39/J-Ск-Δ1 с Фигуры 10, за исключением того, что удалена большая часть межгенного участка между геном Сκ 3'-энхансером. Кроме того, 3'-энхансер сокращен в размер с 809 п.н. до 125 п.н.

#### Фигура 12

Общие сведения о последовательностях, используемых в настоящей заявке, или на которые имеются ссылки в настоящей заявке.

#### Фигура 13

40 Создание аллеля Rosa2 6-IgVκ1-39 KI. (A) Схематическое изображение целевого вектора pCAGGS-IgVκ1-39. (B) Нуклеотидная последовательность целевого вектора pCAGGS-IgVκ1-39. (C) Стратегия нацеливания.

#### Фигура 14

45 (A) Анализ саузерн-блоттингом геномной ДНК ES-клонов, содержащих вставку целевого вектора pCAGGS-IgVκ1-39. Геномная ДНК из 4 независимых клонов была расщеплена с AseI и зондирована с 5e1, указывающим 5'-границу целевого вектора. Все клоны содержат правильную вставку целевого вектора на 5'-конце.

(B) Анализ саузерн-блоттингом геномной ДНК ES-клонов, содержащих вставку

целевого вектора pCAGGS-IgVK1-39. Геномная ДНК из 4 независимых клонов была расщеплена с MscI и зондирована с 3e1, указывающим 3'-границу целевого вектора. Все клоны содержат правильную вставку целевого вектора на 3'-конце.

(С) Анализ саузерн-блоттингом геномной ДНК ES-клонов, содержащих вставку целевого вектора pCAGGS-IgVK1-39. Геномная ДНК из 4 независимых клонов была расщеплена с BamHI и зондирована с внутренним зондом Neo, указывающим 5'-границу целевого вектора. Все клоны содержат правильную единичную вставку целевого вектора.

#### Фигура 15

Создание аллеля Rosa26-IgV12-14 KI. (А) Схематическое изображение целевого вектора pCAGGS-IgVL2-14. (В) Нуклеотидная последовательность целевого вектора pCAGGS-IgVL2-14, содержащего экспрессионную вставку CAGGS, основанную на перестроенной V-лямбда области IGLV2-14/J зародышевой линии (IGLV2-14/J-Ск). (С) Стратегия нацеливания.

#### Фигура 16

Eribase<sup>®</sup>-профиль остатков 1-107 IGKV1-39. Подфигура А показывает связывающую способность для аллотипов DRB1, тогда как С показывает связывающую способность для аллотипов DRB3/4/5, DQ и DP. Значения на Фигуре представляют собой константы диссоциации (Kd) и изображены на логарифмической шкале в диапазоне 0,01 мкМ-0,1 мкМ (очень сильные связи могли выйти за пределы графика). Для пептидов со средним связыванием показаны только качественные значения, пептиды со слабым связыванием и несвязывающиеся не показаны. Значения показаны на первом остатке пептида в целевой последовательности (сам пептид продолжается другими 9-ю остатками). Важно, что показан только рецептор с наибольшей связывающей способностью для каждого пептида: имеющие перекрестную реакцию аллотипы с более низкой аффинностью не видны на данном графике. Рецептор с наибольшей связывающей способностью указан под своим серотипическим наименованием. Наконец, любые профильтрованные по зародышевой линии пептиды изображены более светлым цветом на карте эпитопов (в данном случае не было обнаружено несобственных эпитопов). Подфигура В показывает разнородность связывания HLA для каждого декамерного пептида (Y-ось: число аллотипов HLA, распознающих критические эпитопы в каждом пептиде, начиная с указанного остатка, показанного на X-оси). Разнородность измерялась как количество аллотипов из суммарных 47, для которых пептид является критическим связывающим агентом. Белые столбцы относятся к аутопептидам, а черные столбцы (здесь отсутствуют) - к несобственным пептидам.

#### Фигура 17

Карта эпитопов IGKV1-39, показывающая наличие связывающих пептидов, предсказанных в последовательности IGKV1-39 по серотипу в формате 15-меров. Каждый 15-мер пронумерован в соответствии с указанным сверху фигуры. Полная последовательности соответствующего 15-мера приведена в Таблице 7. Черные прямоугольники показывают наличие одного или более критических аутоэпитопов в 15-мере для серотипа, показанного слева. Критические эпитопы фV<sub>H</sub>кционально определяются как имеющие сильное или среднее связывание с DRB1 и сильное связывание с DRB3/4/5 или DP или DQ.

#### Фигура 18

Конститутивный нокаут (КО) каппа-локуса Ig. (А) Стратегия нацеливания. (В) Схематическое изображение целевого вектора pIgКаппа.

#### Фигура 19

Конститутивный КО лямбда-локуса Ig. (А) Первый этап стратегии нацеливания. (В)

Второй этап стратегии нацеливания.

Фигура 20

Схематическое изображение целевых векторов. (A) pVkp-O12 (Vkp-IGKV1-39/J-Ck); (B) pVkp-O12-dell (Vkp-IGKV1-39/J-Ck-Δ1); (C) pVkp-O12-dell2 (Vkp-IGKV1-39/J-Ck-Δ2).

5 Фигура 21

Стратегии нацеливания для вставки трансгена в локус Rosa26 с помощью нацеленного трансгенеза с использованием RMCE. (A) Vkp-O12 (Vkp-IGKV1-39/J-Ck); (B) Vkp-O12-dell (Vkp-IGKV1-39/J-Ck-Δ1); (C) Vkp-O12-dell2 (Vkp-IGKV1-39/J-Ck-Δ2).

Фигура 22

10 Топология вектора MV1057. Замена указанного «лишнего» фрагмента на V<sub>H</sub>-фрагмент приводит к тому, что экспрессионный вектор может быть трансфицирован в эукариотические клетки для продукции антител IgG1 с легкими цепями, содержащими V<sub>L</sub>-ген O12 (IGKV1-39).

Фигура 23

15 Недостаточная экспрессия трансгенного Vk1 легкой цепи человека в популяциях клеток селезенки, не являющихся В-клетками.

Фигура 24

Легкая цепь трансгенного Vk21 человека экспрессируется во всех популяциях В-клеток селезенки.

20 Фигура 25

Легкая цепь трансгенного Vk1 человека экспрессируется В1-клетках брюшной полости.

Фигура 26

25 Легкая цепь трансгенного Vk1 человека не экспрессируется в про- и пре-В-клетках, но экспрессируется в незрелых и рециркуляционных популяциях В-клеток костного мозга. (A) Открытие мембранного канала клеток костного мозга. (B) Гистограммы экспрессии трансгена с наложением одного контроля для дикого типа.

Фигура 27

30 Легкая цепь трансгенного Vk1 человека напрямую связана с экспрессией эндогенной легкой цепи и IgM в циркулирующих в крови В-клетках.

**ПРИМЕРЫ**

Пример 1.

Клоны V-гена легкой цепи человека

35 В данном примере описывается логическое обоснование выбора двух V-генов легкой цепи человека, одного гена каппа-типа и одного гена лямбда-типа, которые используются в качестве доказательства концепции для трансгенных мышей, экспрессирующих легкую цепь, de Wildt et al. 1999 (de Wildt et al. (1999) J. Mol. Biol. 285 (3):895) проанализировали экспрессию легких цепей человека в периферийных IgG-положительных В-клетках. На основании этих данных, IGKV1-39 (O12) и IGLV2-14  
40 (2a2) были выбраны в качестве легких цепей, поскольку они очень хорошо представлены в репертуаре В-клеток. Последовательность J-сегмента легких цепей была выбрана на основании последовательностей, представленных под кодом GenBank ABA26122 для IGKV1-39 (Rabquer, B.J., Smithson, S.L., Shriner, A.K. and Westerink, M.A.J.) и кодом GenBank AAF20450 для IGLV2-14 (Ignatovich, O., Tomlinson, I.M., Popov, A.V., Bruggeraann, M. and  
45 Winter, G. J. Mol. Biol. 294 (2), 457-465 (1999)).

Все каркасные сегменты конвертируются в аминокислотные последовательности зародышевой линии с целью обеспечения наименьшей возможной иммуногенности в потенциальных клинических применениях.

## Пример 2.

Получение V-генов тяжелой цепи мыши, которые образуют пары с генным сегментом IGKV1-39 человека с образованием функциональных сайтов связывания антитела

В данном примере описывается идентификация V-генов тяжелой цепи мыши, которые способны образовывать пары с единичной перестроенной областью IGKV1-39/J зародышевой линии человека. V<sub>H</sub>-репертуар селезенки для мышей, которые были иммунизированы столбнячным токсином, был клонирован в Fab-векторе фагового дисплея с единственной каппа-легкой цепью IGKV1-39-C человека и подвергнут пэннингу через столбнячный токсин. Клоны, полученные после первого цикла пэннинга, анализировались на предмет их специфичности связывания. V<sub>H</sub>-гены мыши, кодирующие специфичные для столбнячного токсина Fab-фрагменты, подвергались анализу последовательности с целью идентификации уникальных клонов и назначения использования V<sub>H</sub>, DH и JH.

Многие протоколы, описанные здесь, представляют собой стандартные протоколы для создания библиотек фагового дисплея и пэннинга фагов для связывания с представляющим интерес антигеном, и описаны в работе *Antibody Phage Display: Methods and Protocols* (editor(s): Philippa M. O'Brien, Robert Aitken).

### Иммунизации

BALB/c мыши получали одну иммунизацию столбнячным токсином и подвергались стимуляции столбнячным токсином после 6 недель.

### Выделение спленоцитов

Приготовление взвеси клеток селезенки. После препарирования селезенка промывалась PBS и переносилась на 60 мм чашку Петри с 20 мл PBS. Шприц, заполненный 20 мл PBS и с иглой G20, был использован для многократного промывания селезенки. После промывания промытых клеток PBS, клетки аккуратно помещались в суспензию с использованием 20 мл PBS и оставлялись на рабочей площадке на 5 минут для отделения спленоцитов от дебриса и клеточных кластеров. Суспензия спленоцитов переносилась на заполненную фиколл-пак плюс (Ficoll-Paque™ PLUS) тубу и обрабатывалась в соответствии с процедурами производителя с целью выделения лимфоцитов (Amersham Biosciences).

### Выделение РНК и синтез кДНК

После выделения и осаждения лимфоцитов, клетки суспендировались в реагенте TRIzol LS (Invitrogen) для выделения тотальной РНК в соответствии с прилагаемым производителем протоколом и подвергались реакции обратной транскрипции с использованием 1 микрограмма РНК, Superscript® III RT вместе с dT20, в соответствии с процедурами производителя (Invitrogen).

### ПЦР-амплификация кДНК

кДНК амплифицировалась в ПЦР-реакции с использованием комбинаций праймеров, которые позволяли амплифицировать приблизительно 110 различных V-генов мыши, принадлежащих к 15 V<sub>H</sub>-семействам (таблица 1; идентификатор последовательности NG\_005838; Thiede et al., 1999. *European Journal of Immunology* 29: 2072-2081). В первом цикле были использованы комбинации праймеров, которые связывались с 5'-концом V-генов и 3'-концом J-областей. Во втором цикле ПЦР-продукты, которые были синтезированы с праймером MJH-Rev2, подвергались амплификации с целью внесения модификаций в 3'-область для того, чтобы можно было осуществлять эффективное клонирование продуктов. В последнем цикле амплификации все ПЦР-продукты были амплифицированы с использованием праймеров, которые вводят сайт рестрикции SfiI

на 5'-конце и сайт рестрикции BstEII на 3'-конце (см. фигуры 1 и 2 и таблицу 1).

Условия реакции для первого цикла ПЦР: 4 различных реакции, объединяющие все 25 прямых праймеров (MV<sub>H</sub>1-MV<sub>H</sub>25, таблица 1 и Фигура 2) и 1 обратный праймер в каждой реакции (MJH-Rev1, MJH-Rev2, MJH-Rev3 или MJH-Rev4; см. таблицу 1 и Фигуру 2). 50-микролитровые емкости ПЦР состояли из 2 микролитров кДНК (из RT-реакций), 10 микролитров полимеразного HF-буфера 5\* Phusion, 40 нМ каждого из 25 прямых праймеров (суммарная концентрация - 1 микромоль), 1-микромолярного обратного праймера, 1 микролитра 10 мМ исходного раствора dNTP, 1,25 единиц полимеразы Phusion и стерильной MQ-воды. Программа термоциклера состояла из программы по схеме «touchdown»: 1 цикл при 98°C в течение 30 секунд, 30 циклов при 98°C в течение 10 секунд, снижение до 58°C с шагом 0,2°C на 10-секундный цикл, 72°C в течение 20 секунд и 1 цикл при 72°C в течение 3 минут. Второй цикл программы ПЦР устанавливался только для продуктов первой ПЦР, которые содержали праймер MJH-Rev2: 2 различных реакции, объединяющие праймеры ExtMV<sub>H</sub>-1 или ExtMV<sub>H</sub>-2 (таблица 1 и Фигура 2) вместе с обратным праймером ExtMJH-Rev2int (таблица 1 и Фигура 2). 50-микролитровые емкости ПЦР состояли из 50 нг ПЦР-продукта (из первого цикла ПЦР), 10 микролитров полимеразного HF-буфера 5\* Phusion, 500 нМ каждого прямого праймера, 1-микромолярного обратного праймера, 1 микролитра 10 мМ исходного раствора dNTP, 1,25 единиц полимеразы Phusion и стерильной MQ-воды. Программа термоциклера состояла из программы по схеме «touchdown», после которой проводился этап обычной амплификации: 1 цикл при 98°C в течение 30 секунд, 10 циклов при 98°C в течение 10 секунд, снижение до 65°C с шагом 1,5°C на 10-секундный цикл, 72°C в течение 20 секунд, 10 циклов при 98°C в течение 10 секунд, 55°C в течение 10 секунд, 72°C в течение 20 секунд и 1 цикл при 72°C в течение 3 минут. Третий цикл программы ПЦР устанавливался в соответствии с описанным на Фигуре 2. 50-микролитровые емкости ПЦР состояли из 50 нг ПЦР-продукта (из предыдущих циклов ПЦР, Фигура 2), 10 микролитров полимеразного HF-буфера 5\* Phusion, 1-микромолярного прямого праймера (таблица 1 и Фигура 2), 1-микромолярного обратного праймера, 1 микролитра 10 мМ исходного раствора dNTP, 1,25 единиц полимеразы Phusion и стерильной MQ-воды. Программа термоциклера состояла из программы по схеме «touchdown», после которой проводился этап обычной амплификации: 1 цикл при 98°C в течение 30 секунд, 10 циклов при 98°C в течение 10 секунд, снижение до 65°C с шагом 1,5°C на 10-секундный цикл, 72°C в течение 20 секунд, 10 циклов при 98°C в течение 10 секунд, 55°C в течение 10 секунд, 72°C в течение 20 секунд и 1 цикл при 72°C в течение 3 минут. После ПЦР-амплификаций все ПЦР-продукты очищались в геле с использованием Qiaex II в соответствии с протоколами производителя.

#### Расщепление рестрикционными ферментами

Очищенные продукты были расщеплены BstEII и SfiI в два этапа. Сначала 1 микрограмм ДНК расщеплялся в 100 микролитровых реакциях, состоящих из 10 микролитров 10\* NEB буфера 3 (New England Biolabs), 1 микролитра 100\* BSA, 12,5 единиц BstEII и стерильной воды в течение 6 часов при 60°C в сушильной камере. Продукт были очищены с использованием набора для ПЦР-очистки Qiaquick ПЦР от Qiagen в соответствии с инструкциями пользователя, элюированы в 40 микролитрах воды. Затем все продукты подвергались дальнейшему расщеплению с SfiI в 100 микролитровых реакциях, состоящих из 10 микролитров 10\* NEB буфера 2 (New England Biolabs), 1 микролитра 100\* BSA, 12,5 единиц SfiI и стерильной воды в течение 12 часов при 50°C в сушильной камере. Расщепленные фрагменты были очищены с помощью набора для извлечения из геля Qiaquick, после разделения геля на 20 см 1,5% агарозной



ТВЕ плюс гель бромида этидия на 80 В. 100 микрограмм вектора-акцептора (MV1043, фигуры 3 и 12) были расщеплены с помощью 50 единиц Eco91I в 600 микролитрах при стандартных условиях (буфер Tango) и затем очищены на 0,9% агарозном геле. После второго этапа расщепления при заданных условиях с 400 единицами SfiI в 500 микролитрах в течение 12 часов, было добавлено 100 единиц BsrGI на 3 часа при 50°C.

#### Сшивание

Каждый ПЦР-продукт подвергался отдельному сшиванию в соответствии со следующей схемой: 70 нг расщепленных ПЦР-продуктов, 300 нг расщепленного вектора-акцептора, 100 единиц лигазы T4 (NEB), 1\* лиганзный буфер в 30 микролитрах в течение 16 часов при 12°C. Реакции сшивания подвергались очистке с помощью экстракций фенола/хлороформа/изоамилового спирта, после чего следовало осаждение гликогеном (Sigma-Aldrich #G1767) в соответствии с протоколом производителя, и в конце выполнялось растворение в 25 микролитрах стерильной воды.

#### Трансформации и хранение в библиотеке

Очищенные продукты сшивания были трансформированы посредством электропорации с использованием 1200 микролитров электрокомпетентной бактерии TGI (Stratagene #200123) на партию сшитого продукта и высеваны на LB-карбенициллиновые чашки, содержащие 4% глюкозу. Библиотеки были собраны посредством соскабливания бактерий в 50 мл LB-карбенициллине. После центрифугирования на 2000g в течение 20 минут при 4°C, бактериальный осадок был аккуратно ресуспендирован в 2 мл ледяного 2\*TY/30% глицерола в ледяной воде и заморожен на сухом льде/этаноле до хранения при -80°C.

#### Аmplификация библиотеки

Библиотеки были выращены и собраны в соответствии с процедурами, описанными Kramer et al. 2003 (Kramer et al. 2003. Nucleic Acids Res. 31(11): e59) с использованием VCSM13 (Stratagene) в качестве вспомогательного штамма фага. Выбор фагов на покрытых иммунотубах (immunotubes) Столбнячный токсин был растворен в PBS в концентрации 2 мкг/мл и нанесен слоем на Nunc-иммунотубы MaxiSorp (Nunc 444474) и оставлен в течение ночи при 4°C. После исключения покрывающего раствора, тубы были заблокированы 2% обезжиренным молоком (ELK) в PBS (блокирующий буфер) в течение 1 часа при комнатной температуре. Параллельно, 0,5 мл фаговой библиотеки было смешано с 1 мл блокирующего буфера и инкубировалось в течение 20 минут при комнатной температуре. После блокирования фагов фаговый раствор был добавлен к покрытым столбнячным токсин тубам и инкубировался в течение 2 часов при комнатной температуре на медленно вращающейся платформе с тем, чтобы допустить связывание. Затем тубы промывались 10 раз PBS/0,05% Tween-20, после чего проводилось элюирование фагов посредством инкубации с 1 мл 50 мМ глицина-HCl pH 2,2 в течение 10 минут при комнатной температуре на вращающемся колесе, после чего сразу проводилась нейтрализация собранного элюента с помощью 0,5 мл 1 М трис-HCl pH 7,5.

#### Сбор фаговых клонов

5 мл культуры XL1-Blue MRF (Stratagene) при O.D. 0,4 было добавлено к собранному раствору фагов, и была проведена инкубация в течение 30 минут при 37°C без перемешивания с целью допущения инфицирования фагов. Бактерии высевались на чашки с карбенициллином/тетрациклином и 4% глюкозой 2\*TY и выращивались в течение ночи при 37°C.

#### Продуцирование фагов

Фаги были выращены и обработаны в соответствии с описанным Kramer et al. 2003

(Kramer et al. 2003. Nucleic Acids Res. 31(11): e59) с использованием VCSM13 в качестве вспомогательного штамма фага.

#### Иммуноферментный анализ фагов (ELISA)

Чашки для иммуноферментного анализа (ELISA) были покрыты 100 микролитрами столбнячного токсина на 1 лунку при концентрации 2 микрограмма/мл в PBS, и оставлены на ночь при 4°C. Чашки, покрытые 100 микролитрами тироглобулина при концентрации 2 микрограмма/мл в PBS были использованы в качестве отрицательного контроля. Лунки были опустошены, высушены посредством выпуска жидкости на бумажном полотенце, заполнены полностью PBS-4% обезжиренным молоком (ELK) и инкубировались в течение 1 часа при комнатной температуре для блокирования лунок. После исключения блокирующего раствора, фаговые миникомпозиции, предварительно смешанные с 50 мкл блокирующего раствора, были добавлены и инкубировались в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем посредством проведения 5 этапов промывания PBS-0,05% Tween-20 были удалены несвязанные фаги. Связанные фаги были обнаружены путем инкубирования лунок в 100 микролитрах анти-M13-HRP конъюгата антитела (разведенного 1/5000 в блокирующем буфере) в течение 1 часа при комнатной температуре. Свободные антитела были удалены посредством повторения этапов промывания, описанных выше, после чего проводилось инкубирование с помощью субстрата ТМВ до момента, когда формирование цвета стало заметным. Реакция была остановлена путем добавления 100 микролитров 2М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> на лунку, после чего был проведен анализ на аппарате для чтения ELISA при длине волны излучения 450 нм (Таблица 2). Большие числа указывают более сильные сигналы, и, следовательно, более высокую частоту специфичного связывания комплекса фаг-Fab.

#### Секвенирование

Клоны, которые давали сигналы по меньшей мере в 3 раза превышающие фоновый сигнал (Таблица 2) были размножены, использованы для miniprep-процедур ДНК- (см. процедуры из руководства Qiagen miniPrep) и подвергнуты анализу нуклеотидной последовательности. Секвенирование выполнялось в соответствии с инструкцией, прилагаемой к набору Big Dye 1.1 (Applied Biosystems) с использованием обратного праймера (CH1\_Rev1, таблица 1), распознающего 5'-последовательность CH1-области тяжелой цепи IgG1 человека (присутствует в векторе дисплея Fab MV1043, фигуры 3 и 12). Последовательности V<sub>H</sub> мыши для 28 связывающих столбнячный токсин клонов приведены в Таблице 3. Результаты показывают, что выбранные V<sub>H</sub>-гены мыши принадлежат к различным семействам генов, и различные отдельные представители этих семейств генов могут попарно соединяться с перестроенной V<sub>H</sub>-областью IGKV1-39/J человека с образованием функциональных сайтов связывания антитела, специфичных для столбнячного токсина. На основании анализа последовательностей был сделан вывод о том, что V<sub>H</sub>-области мыши используют разнообразие сегментов генов DH и JH.

#### Пример 3

##### Сайленсинг локуса каппа-легкой цепи мыши

В данном примере описывается сайленсинг эндогенного локуса каппа-легкой цепи мыши. Эндогенный локус каппа-легкой цепи модифицируется посредством гомологичной рекомбинации в ES-клетках, после чего в эмбрионы мыши вводятся генетически модифицированные ES-клетки с целью получения генетически приспособленного потомства.

Вектор, который содержит собранную нуклеотидную последовательность, состоящую

из части, содержащей J-область до 338 п.н. по ходу транскрипции от сегмента гена J5, слитой с последовательностью, заканчивающейся на 3'-конце энхансером 3'-СК, используется для гомологичной рекомбинации в ES-клетках. Собранная последовательность используется для удаления фрагмента геномной ДНК, проходящей от 3'-конца JK-области точно до 3'-конца 3'-СК энхансера. В результате этой процедуры удаляются постоянный ген СК, 3'-энхансер и некоторые межгенные участки (см. фигуры 4 и 18).

#### Конструирование целевого вектора

Вектор, получивший 4,5-8 т.п.н. фланкирующие «плечи» на 3'- и 5'-конце, слитый с сегментом удаления, был использован для нацеленной гомологичной рекомбинации в клеточной линии ES. Оба «плеча» были получены средствами ПЦР, обеспечивающими максимальную гомологию. Стратегия нацеливания допускает создание конститутивного КО-аллеля. Геномная последовательность мыши, охватывающая интронный энхансер Igk, константную область Igk 3'-энхансер Igk, была заменена кассетой PufoR, которая была фланкирована E3-сайтами и вставлена по ходу транскрипции от Jk-элементов. Флр-опосредованное удаление маркера выбора привело к образованию конститутивного КО-аллеля. Замена Igk области генома MiEk-Igk C-Igk 3'E (приблизительно, 10 т.п.н.) на кассету F3-Pufo (приблизительно 3 т.п.н.), по-видимому, понизила эффективность гомологичной рекомбинации. Следовательно, «плечи» гомологии были соответствующим образом расширены и было проанализировано большее количество клеточных колоний ES после трансфекции с целью идентификации гомологичных рекомбинантных клонов.

#### Получение ES-клеток, несущих удаленный каппа-фрагмент

Получение генетически модифицированных ES-клеток было выполнено в основном в соответствии с описанным (Seibler et al. *Nucleic Acids Res.* 2003 Feb 15; 31 (4):e12). См. также подробное описание в примере 14.

#### Получение ES-мышей посредством комплементации тетраплоидного зародыша.

Получение мышей посредством комплементации тетраплоидного зародыша с использованием модифицированных ES-клеток было выполнено в основном в соответствии с описанным (Eggen et al., *PNAS* 98, 6209-6214; Seibler J, et al. *Nucleic Acids Res.* 2003 Feb 15; 31 (4):e12; Hogan et al., (Summary of mouse development. *Manipulating the Mouse Embryo*, (1994) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY.), pp.253-289.)).

#### Пример 4

##### Сайленсинг локуса лямбда-легкой цепи мыши

В данном примере описывается сайленсинг эндогенного локуса лямбда-легкой цепи мыши. Эндогенный локус лямбда-легкой цепи мыши модифицируется посредством гомологичной рекомбинации в ES-клетках, после чего в эмбрионы мыши вводятся генетически модифицированные ES-клетки с целью получения генетически приспособленного потомства.

Удалению подвергаются две области лямбда-локуса мыши, которые вместе содержат все функциональные лямбда-V-области.

Первая область, намеченная для основанного на гомологичной рекомбинации удаления, представляет собой область, находящуюся на 408 п.н. против хода транскрипции от точки начала сегмента гена IGLV2 и заканчивающуюся на 215 п.н. по ходу транскрипции от сегмента гена IGLV3, включая межгенную последовательность, находящуюся между сегментами генов IGLV. Вторая область, подвергающаяся удалению, включает сегмент IGLVL-гена, состоящий из фрагмента, охватывающего

область от 3 92 п.н. против хода транскрипции до 171 п.н. по ходу транскрипции относительно сегмента IGLVL-гена. В результате двух этапов удаления, удаляются все функциональные сегменты генов V-лямбда, что делает локус функционально неактивным (фигуры 5 и 19).

#### 5 Конструирование целевых векторов

Вектор, получивший 3-9,6 т.п.н. фланкирующие «плечи» на 3'- и 5'-конце, слитый с сегментом удаления, был использован для нацеленной гомологичной рекомбинации в клеточной линии ES. Оба «плеча» были получены средствами ПЦР, обеспечивающими максимальную гомологию. На первом этапе геномная последовательность мыши, охватывающая области Igl V2-V3, была заменена кассетой PuroR, которая была фланкирована F3-сайтами, что приводит к образованию конститутивного КО-аллеля после Flp-опосредованного удаления маркера выбора (см. Фигуру 19A). На втором этапе геномная последовательность мыши, охватывающая V<sub>L</sub>-область Igl, была заменена кассетой Neo в клонах ES-клеток, в которых уже было проведено удаление областей Igl V2-V3 (см. Фигуру 19 B). Маркер выбора (NeoR) был фланкирован FRT-сайтами. Конститутивный КО-аллель был получен после Flp-опосредованного удаления маркеров выбора.

#### Получение ES-клеток, несущих удаленный лямбда-фрагмент

Получение генетически модифицированных ES-клеток было выполнено в основном в соответствии с описанным (Seibler J, Zevnik B, Kuter-Luks B, Andreas S, Kern H, Hennek T, Rode A, Heimann C, Faust N, Kauselmann G, Schoor M, Jaenisch R, Rajewsky K, Kiihn R, Schwenk F. *Nucleic Acids Res.* 2003 Feb 15; 31(4):e12). См. также подробное описание в примере 14. С целью демонстрации того, что оба нацеливания имели место на одной и той же хромосоме, клоны с двойным нацеливанием были выбраны для удаления *in vitro* с помощью рCMV C31дельтаСрG. Клоны были размножены под давлением антибиотиков на митотически инактивированном фидерном "питающем" слое, содержащем фибробласты эмбрионов мыши в DMEM-среде с высоким содержанием глюкозы, содержащей 20% FCS (PAN) и 1200 единиц/мл фактора подавления лейкемии (Millipore ESG 1107). 1×10<sup>7</sup> клеток из каждого клона были подвергнуты электропорации с 20 мкг циркулярного рCMV C31дельтаСрG при 240 В и 500 мкФ, и нанесены на четыре 10 см чашки для каждого клона. Через 2-3 дня после электропорации клетки были собраны и проанализированы посредством ПЦР. Использовались следующие праймеры:

2005\_5: CCCTTTCCAATCTTTATGGG

2005\_7: AGGTGGATTGGTGTCTTTTCTC

2005\_9: GTCATGTCGGCGACCCTACGCC

Реакции ПЦР выполнялись в смесях, содержащих 5 мкл ПЦР-буфера 10x (Invitrogen), 2 мкл MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1 мкл dNTP (10 mM), 1 мкл первого праймера (5 мкМ), 1 мкл второго праймера (5 мкМ), 0,4 мкл Taq (5 единиц/мкл, Invitrogen), 37,6 мкл H<sub>2</sub>O и 2 мкл ДНК. Использовалась программа: 95°C, 5 минут; после чего проводилось 35 циклов при 95°C в течение 30 секунд; 60°C в течение 30 секунд; 72°C в течение 2 минуты; затем 72°C в течение 10 секунд.

Получение ES-мышей посредством комплементации тетраплоидного зародыша.

Получение мышей посредством комплементации тетраплоидного зародыша с использованием модифицированных ES-клеток было выполнено в основном в

соответствии с описанным (Eggan et al., PNAS 98, 6209-6214; Seibler J, Zevnik B, Kuter-Luks B, Andreas S, Kern H, Hennek T, Rode A, Heiraann C, Faust N, Kauselmann G, Schoor M, Jaenisch R, Rajewsky K, Kiihn R, Schwenk F. Nucleic Acids Res. 2003 Feb 15;31 (4):e12; Hogan et al., (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY.), pp.253-289).

#### 5 Пример 5

Конструирование экспрессионной вставки CAGGS на основании перестроенного гена IGKV1-39/J-Ск человека (IGKV1-39/J-Ск) зародышевой линии

В данном примере описывается конструирование экспрессионной кассеты CAGGS, содержащей перестроенную область IGKV1-39/J зародышевой линии человека. Данная  
10 вставляемая экспрессионная кассета охватывает сайты клонирования, последовательность Козака, лидерную последовательность, содержащую интрон, открытую рамку считывания перестроенной области IGKV1-39, константную СК-область крысы из аллеля «а» и последовательность завершения трансляции (IGKV1-39/J-Ск; Фигура 6). Первичная конструкция состоит из встречающихся в природе  
15 последовательностей, и была проанализирована и оптимизирована путем удаления нежелательных действующих в cis-положении элементов, таких как внутренние ТАТА-боксы, сигналы полиаденилирования; chi-сайты, сайты исходного положения рибосомы, АТ-богатые или GC-богатые фрагменты последовательности, элементы последовательности ARE-, INS- и CRS, последовательности повторов, вторичные  
20 структуры РНК, (латентные) сайты донора и акцептора сплайсированного фрагмента и точки разветвления сплайсинга (GeneArt GmbH). Кроме того, частота использования кодонов в участках открытой рамки считывания оптимизируется для экспрессии в мышцах. Последовательность интрона не изменяется и, следовательно, представляет собой последовательность, идентичную кодирующей части лидерного интрона IGKV1-  
25 39 человека.

На 5'-конце экспрессионной кассеты был внесен сайт NotI, и на 3'-конце - сайт NheI. Оба сайта используются для клонирования в модуле экспрессии CAGGS. После сборки гена в соответствии с методами, используемыми GeneArt, вырезается вставка с NotI-NheI и клонируется в экспрессионный модуль, содержащий CAGGS-промотор,  
30 стопперную последовательность, фланкированную сайтами LoxP ('флосированную'), последовательность сигнала полиаденилирования и, на 5'- и 3'-концах, последовательности, способствующие гомологичной рекомбинации в локус Rosa26 клеточных линий ES мыши. Промотор и/или фрагменты кДНК были амплифицированы посредством ПЦР, подтверждены секвенированием и/или клонированием напрямую  
35 из доставленных плазмид в вектор обмена RMCE, обладающий указанными характеристиками. Схематическое изображение и подтвержденная последовательность конечного целевого вектора pCAGGS-IgVK1-39 показаны на Фигурах 13А и 13В. Стратегия нацеливания изображена на Фигуре 13С.

#### Пример 6

40 Экспрессионная вставка CAGGS, основанная на перестроенной V-лямбда-области зародышевой линии IGLV2-14/J (IGLV2-14/J-Ск)

В данном примере описывается последовательность и вставка экспрессионной кассеты, содержащей перестроенную V-лямбда-область зародышевой линии IGLV2-14/J. Данная вставка охватывает сайты клонирования, последовательность Козака,  
45 лидерную последовательность, содержащую интрон, открытую рамку считывания перестроенной области IGLV2-14/J, константную СК-область крысы из аллеля «а» и последовательность завершения трансляции (IGLV2-14/J-Ск; Фигура 7). Первичная конструкция состоит из встречающихся в природе последовательностей, и была

проанализирована и оптимизирована путем удаления нежелательных действующих в cis-положении элементов, таких как внутренние ТАТА-боксы, сигналы полиаденилирования, chi-сайты, сайты исходного положения рибосомы, АТ-богатые или GC-богатые фрагменты последовательности, элементы последовательности ARE-, INS- и CRS, последовательности повторов, вторичные структуры РНК, (латентные) сайты донора и акцептора сплайсированного фрагмента и точки разветвления сплайсинга (GeneArt GmbH). Кроме того, частота использования кодонов в участках открытой рамки считывания оптимизируется для экспрессии в мышцах. Последовательность интрона не изменяется. и, следовательно, представляет собой последовательность, идентичную кодирующей части лидерного интрона IGKV1-39 человека.

На 5'-конце экспрессионной кассеты был внесен сайт NotI, и на 3'-конце - сайт NheI. Оба сайта используются для клонирования в модуле экспрессии CAGGS, как описано Taconic Artemis. После сборки гена в соответствии с методами, используемыми GeneArt, вырезается вставка с NotI-NheI и клонируется в экспрессионный модуль, содержащий CAGGS-промотор, стопперную последовательность, фланкированную сайтами LoxP ('флуксированную'), последовательность сигнала полиаденилирования и, на 5'- и 3'-концах, последовательности, способствующие гомологичной- рекомбинации в локус Rosa26 клеточных линий ES мыши. Для создания конечного нацеленного на ROSA26 RMCE вектора, промотор и/или фрагменты кДНК были амплифицированы посредством ПЦР. Амплифицированные продукты были подтверждены секвенированием и/или клонированием напрямую из доставленных плазмид в вектор обмена RMCE, обладающий указанными характеристиками. Схематическое изображение и подтвержденная последовательность конечного целевого вектора pCAGGS-IgVL2-14 показана на Фигурах 15А и 15В. Стратегия нацеливания изображена на Фигуре 15С.

#### Пример 7

Экспрессия IGKV1-3 9/J-Ск в клеточных линиях HEK2 93 (pSELECT-IGKV1-39/J-Ск)

В данном примере описывается способ проверки того, что конструкции IGKV1-39/J-Ск, описанные в примере 5, дают возможность экспрессии и обнаружения L-цепи IGKV1-39/J-Ск в клетках HEK293. Вставка IGKV1-39/J (Фигура 6) была модифицирована на 5'-конце путем замены сайта NotI на сайт SalI. Данная замена требуется для клонирования продукта в плазмиду экспрессионной кассеты pSELECT-hygro (InvivoGen). CAGGS-экспрессионная вставка IGKV1-39/J-Ск и pSELECT-hygro были расщеплены с SalI и NheI, сшиты и использованы для трансформации компетентных XL1-Blue клеток с использованием стандартных методик. Колонии были собраны и подвергнуты очистке ДНК с использованием колонок Qiagen Midi-prep в соответствии с процедурами производителя. Результирующий экспрессионный вектор, легкой цепи (LC), названный 0817676\_pSELECT\_0815426, был использован для трансфекции- клеток HEK293 препаратом Fugene6 (Roche) в соответствии с протоколами производителя. Был проведен скрининг супернатантов на предмет наличия легких цепей IGKV1-39/J-Ск посредством ELISA и вестерн-блоттинга с использованием антитела против Ск крысы (Beckton Dickinson #550336 и 553871) и протоколов, используемых в технике.

$V_H$  IgG MG14 94 против столбнячного токсина (ТТ) была клонирована в экспрессионный вектор IgG MV1056 с использованием сайтов рестрикции SfiI и BstEII. У полученного в результате клона была проверена последовательность. Клетки HEK2 93Т были трансфицированы пятью различными комбинациями векторов, как показано в Таблице 4 (см. пример 8 для подробностей о векторе 0817678\_pSELECT\_0815427). Супернатанты были собраны и были определены концентрации IgG (см. Таблицу 4).

IgG не были обнаружены для супернатантов А и В, содержащих только легкую цепь, как и ожидалось (детекторное антитело распознавало Fc-часть IgG). Концентрация IgG в супернатантах С и D была сравнимой с концентрацией для супернатанта положительного контроля Е, что указывает на правильную экспрессию конструкций легкой цепи.

Связывание с ТТ было проанализировано' посредством ELISA для проверки функциональности продуцированных антител, с использованием гемоглобина в качестве антигена отрицательного контроля. ТТ-специфическое связывание не могло быть обнаружено для супернатантов А и В, содержащих только легкую цепь, как и ожидалось. ТТ-специфическое связывание для супернатантов С и D было по меньшей мере настолько же хорошим, как и для супернатанта положительного- контроля Е, что подтверждает правильность экспрессии конструкций легкой цепи и функциональность их сборки с тяжелой цепью. Антитела были обнаружены не только с использованием вторичного антитела против IgG человека, но также и с использованием вторичного антитела против легкой цепи Скаппа крысы. Результаты подтверждают, что антитело против Скаппа крысы (BD Pharmingen #553871, клон MRK-I) распознает легкую цепь, экспрессируемую векторами pSELECT.

Супернатанты были проанализированы с помощью нередуцирующего SDS-PAGE и вестерн-блоттинга (не показано). Детектирование с использованием антитела против тяжелой цепи IgG человека не показало полосы для супернатантов А и В, содержащих только легкую цепь, как и ожидалось. Результаты для супернатантов С и D были сравнимы с супернатантом положительного контроля Е, при этом имелась полоса вблизи 170 кДа-маркера, как и ожидалось для интактного IgG. Дополнительные полосы для низких молекулярных масс также наблюдались для супернатантов С, D и Е, которые могут соответствовать продуктам распада, фрагментам IgG, получающимся из-за (частичного) редуцирования и/или полосам для не относящихся к делу белков из-за неспецифического связывания детекторного антитела.

Детектирование с использованием антитела против легкой цепи Скаппа крысы показало полосу, близкую к 26 кДа-маркеру для супернатантов А и В, как и ожидалось только для легкой цепи. Данная полоса была намного более выраженной для А по сравнению с В, что указывает на то, что свободная легкая цепь IGKV1-39 может быть лучше экспрессирована и/или более стабильна, чем свободная легкая цепь IGLV2-14. Как и ожидалось, для супернатанта положительного контроля Е не было обнаружено полос, поскольку экспрессированный IgG содержит Скаппа-легкую цепь человека. Для супернатантов С и D наблюдались ожидаемые полосы вблизи 170 кДа-маркера; полосы для низких молекулярных масс также наблюдались, но в меньшей степени, чем описывалось выше для антитела против IgG человека.

В заключение необходимо отметить, что трансфекция экспрессионных конструкций легкой цепи, объединенных с тяжелой цепью противостолбнячного токсина (ТТ) IgG MG 1494, привела к продуцированию IgG, сравнимому с конструкцией положительного контроля, для конструкций pSELECT для обеих легких цепей каппа- и лямбда. Продуцирование IgG в обоих случаях дало сигналы ELISA в ТТ ELISA, которые были лучше чем, или сравнимы с контрольным IgG. SDS-PAGE и вестерн-блоттинг анализ подтвердили наличие интактного IgG. Протестированное антитело против крысиной Скаппа работало эффективно и в ELISA, и на вестерн-блоте. Культура супернатантов из клеток, трансфицированных конструкциями только с легкой цепью, не привело ни к детектируемому продуцированию IgG, ни к детектируемому ТТ-специфическому связыванию, тогда как свободная легкая цепь детектировалась на вестерн-блоте.

## Пример 8

Экспрессия IGLV2-14/J-Ск в клеточных линиях НЕК293 (pSELECT-IGLV2-14/J-Ск)

В данном примере описывается способ проверки того, что конструкции IGLV2-14/J, описанные в примере 6, дают возможность экспрессии и обнаружения L-цепи IGLV2-14/J-Ск в клетках НЕК293. Вставка IGLV2-14/J-Ск (Фигура 7) была модифицирована на 5'-конце путем замены сайта NotI на сайт SalI. Данная замена требуется для клонирования продукта в плазмиду экспрессионной кассеты pSELECT-hygro (InvivoGen). CAGGS-экспрессионная вставка IGLV2-14/J-Ск и были расщеплены с SalI и NheI, сшиты и использованы для трансформации компетентных XLI-Blue клеток с использованием стандартных методик. Колонии были собраны и подвергнуты очистке ДНК с использованием колонок Qiagen Midi-prep в соответствии с процедурами производителя. Результирующий экспрессионный вектор легкой цепи (LC), названный 0817678\_pSELECT\_0815427, был использован для трансфекции клеток НЕК2 93 препаратом Fugene6 (Roche) в соответствии с протоколами производителя. Был проведен скрининг супернатантов на предмет наличия легких цепей IGLV2-14/J-Ск посредством ELISA и вестерн-блоттинга с использованием антитела против Ск крысы (Becton Dickinson #550336 и 553871) и протоколов, используемых в технике. Подробности и результаты см. в примере 7.

## Пример 9

Конструирование управляемой промотором экспрессионной конструкции VK, содержащей вставку IGKV1-39/J и множество энхансерных элементов, полученных из СК-локуса мыши (VkP-IGKV1-39/J-Ск; VkP-012)

В данном примере описывается конструкция экспрессионной кассеты, которая содержит необходимые элементы для обеспечения специфичной для В-клеток и фазы развития/дифференциации экспрессии перестроенной VK-области IGKV1-39 человека, основанная на области VK-промотора IGKV1-39, лидерной последовательности, содержащей интрон, V-гене зародышевой линии, CDR3, сегменте IGKJ, межгенной области мыши, расположенной между Jk и СК, открытой рамке считывания Ск-аллеля «а» крысы и межгенном фрагменте мыши от 3'-конца СК-гена мыши, заканчивающемся точно перед 3'-концом 3'СК-энхансера.

Оптимизированные открытые рамки считывания лидерной последовательности, перестроенный ген IGKV1-39, и ген крысиного СК-аллеля «а», в соответствии с описанным в примере 5, были использованы для конструирования экспрессионной кассеты. Область VK-промотора была получена с помощью процедур синтеза генов (GeneArt, GmbH), и является практически идентичной последовательности области IGKV1-39 человека между -500 п.н. и ATG (точка начала) гена. Единственное отклонение от природной последовательности состоит во внесении последовательности Козака GCCACCATGG в точку сайта AT G (стартовую) с целью способствования трансляции. Фрагмент генома из ВАС-клона мыши (TaconicArtemis) использовался в качестве основы для внесения отдельных элементов. Данный фрагмент является идентичным последовательности VK-локуса мыши, начиная с донорного сайта интрона, расположенного точно у 3'-конца области JK5, и заканчивая точно перед 3'-концом 3'СК-энхансера, и покрывает приблизительно 12,5 т.п.н.

Конечная конструкция содержит от 5'- до 3'-конца следующие элементы: геномный промотор IGKV1-39 человека (500 п.н.), последовательность Козака, лидерная последовательность IGKV1-39 человека, часть 1 (оптимизированная), лидерный интрон IGKV1-39 человека, лидерная последовательность IGKV1-39 человека, часть 2 (оптимизированная), ген зародышевой линии IGKV1-39 человека (оптимизированный),



5 J-область человека (оптимизирована), межгенная область мыши, содержащая интронный энхансерный элемент, константная каппа-область крысы (*Rattus norvegicus*) (оптимизирована) и межгенная область мыши, содержащая 3'каппа-энхансер. Элементы данной экспрессионной кассеты показаны на Фигуре 8 и названы VκP-IGKV1-39/J-Ск (VκP-O12). Схема вектора pVκP-O12 и стратегия нацеливания изображены на Фигурах 20А и 21А. Вектор был внесен в ES-клетки с использованием стандартных процедур (см. пример 14).

#### Пример 10

10 Конструирование управляемой промотором экспрессионной конструкции Vκ, содержащей клон IGLV2-14/J и множество энхансерных элементов, полученных из СК-локуса мыши (VκP-IGLV2-14/J-Ск; VκP-2a2).

В данном примере описывается та же конструкция, что была описана в примере 9, за исключением того, что ген IGKV1-39 и J-область заменены оптимизированным геном IGLV2-14 зародышевой линии человека, содержащим область V-J (VκP-IGLV2-14/J-Ск; 15 VκP-2a2; Фигура 9).

#### Пример 11

Конструирование управляемой промотором экспрессионной конструкции Vκ, содержащей клон IGKV1-39, не имеющий СК-интронного энхансерного элемента (VκP-IGKV1-39/J-Ск-Δ1; VκP-O12-dell)

20 Конструкция, описанная в примере 9, была модифицирована путем удаления СК-интронного энхансерного элемента, расположенного в межгенной области между J-областью человека и СК-областью крысы, посредством стандартных методологий ПЦР-модификации и клонирования ДНК (GeneArt, GmBH). Результирующая экспрессионная кассета показана на Фигуре 10 и названа VκP-IGKV1-39/J-Ск-Δ1 (VκP- 25 O12-dell).

Схема вектора pVκP-O12-dell и стратегия нацеливания изображены на Фигурах 20В и 21 В. Вектор был внесен в ES-клетки с использованием стандартных процедур (см. пример 14).

#### Пример 12

30 Конструирование управляемой промотором экспрессионной конструкции Vκ, содержащей клон IGKV1-39, не имеющий СК-интронного энхансерного элемента и имеющий укороченный 3' СК-энхансерный элемент (VκP-IGKV1-39/J-Ск-Δ2; VκP-O12-del2)

Конструкция, описанная в примере 11, была модифицирована путем укорачивания 35 3'СК-энхансерного элемента и удаления части межгенной 3'-области для Сκ-гена крысы, с целью удаления потенциальных ингибирующих элементов. Это было достигнуто путем удаления межгенной последовательности между сайтом EcoRV (расположенном на 3'-конце Сκ-гена крысы) и сайтом NcoI, присутствующем в 3'-энхансере (5993 п.н.) и дальнейшим удалением последовательности между сайтом BstXI 3"-энхансера и сайтом 40 BstXI-3' 3'-энхансера (474 н.п.) с использованием стандартных методов. Результирующая экспрессионная кассета показана на Фигуре 11 и названа VκP-IGKV1-39/J-Ск-Δ2 (VκP-O12-del2).

Схема вектора pVκP-O12-del2 и стратегия нацеливания изображены на Фигурах 20С и 21С. Вектор был внесен в ES-клетки с использованием стандартных процедур (см. 45 пример 14).

#### Пример 13

Экспрессия Vκ-конструкций в клеточных линиях

Конструкции, описанные в примерах 9-12, проверяются на предмет их способности

к продуцированию белков легкой цепи в клеточных линиях миеломы MPC11 (ATCC CCL167), В-клетках лимфомы WEN1231 (ATCC CRL-1702), Т-клетках лимфомы EL4 (ATCC TIB-39) и в HEK293 (ATCC CRL1573). Эхансерный и промоторный элементы в конструкции позволяют осуществлять экспрессию в линиях В-клеток, но не в клеточных линиях, полученных из других тканей. После трансфекции клеточных линий с использованием очищенной линейаризованной ДНК и Fugene6 (Roche), клетки культивируются для транзientной экспрессии. Клетки и супернатант собираются и подвергаются анализу SDS-PAGE, после чего проводится вестерн-блоттинг с использованием специфического антитела против С-каппа крысы. Супернатанты анализируются с помощью ELISA на предмет секретирования L-цепей с использованием антитела против СК крысы (Beckton Dickinson #550336).

#### Пример 14

##### Получение трансгенных ES-линий

Все конструкции, описанные в примерах 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11 и 12, были использованы для создания отдельных стабильных трансгенных ES-линий посредством гомологичной рекомбинации. Методы получения трансгенных ES-линий через гомологичную рекомбинацию известны в данной области техники (например, Eggen et al., PNAS 98, 6209-6214; Seibler J, Zevnik B, Kuter-Luks B, Andreas S, Kern H, Hennek T, Rode A, Heimann C, Faust N, Kauselmann G, Schoor M, Jaenisch R, Rajewsky K, Kiihn R, Schwenk F. Nucleic Acids Res. 2003 Feb 15; 31 (4): e12; Hogan et al. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY.), pp.253-289.).

Для всех конструкций, описанных в примерах 5-6 и примерах 9-12, клеточная линия RMCE ES (полученная из штамма мыши 129S6B6F1-Gt(ROSA)26Sortm10Arte) была выращена на митотически инактивированном фидерном "питающем" слое, содержащем фибробласты эмбриона мыши (MEF) в DMEM-среде с высоким содержанием глюкозы, содержащей 15% FBS (PAN 1302-P220821). Фактор ингибирования лейкемии (Chemicon ESG 1107) был добавлен в среду в концентрации 900 единиц/мл. Для проведения манипуляций,  $2 \times 10^5$  ES-клеток были высеваны на 3,5 см чашки в 2 мл среды. Непосредственно перед трансфекцией к клеткам было добавлено 2 мл свежей среды. 3 мкл реагента Fugene6 (Roche; каталожный номер 1814443) было смешано со 100 мкл бессывороточной среды (OptiMEM I с Glutamax I; Invitrogen; каталожный номер 51985-035) и инкубировалось в течение 5 минут. 100 мкл раствора Fugene/OptiMEM было добавлено к 2 мкг циркулярного вектора и 2 мкг CAGGS-Flp, после чего проводилась инкубация в течение 20 минут. Данный трансфекционный комплекс добавлялся к клеткам по каплям и перемешивался. Свежая среда была добавлена к клеткам на следующий день. Начиная с дня 2, среда заменялась ежедневно на среду, содержащую 250 мкг/мл G418 (Geneticin; Invitrogen; каталожный номер 10131-019). Через семь дней после трансфекции единичные клоны были выделены, было проведено их наращивание и проведен молекулярный анализ посредством саузерн-блоттинга в соответствии со стандартными процедурами.

Для каждой конструкции был проведен анализ множества клонов путем расщепления рестрикционными ферментами геномной ДНК единичных клонов, после чего проводилась гибридизация с 5'-зондами, 3'-зондами и внутренними зондами, в результате чего были получены клоны, которые содержали правильную единичную вставку в правильной позиции локуса Rosa2 6. Пример представлен на Фигуре 14.

#### Пример 15

##### Получение трансгенных штаммов мыши

Все линии ES-клеток, которые были получены и проверены на предмет их

модификации в соответствии с описанным в примере 14, были использованы для получения стабильных трансгенных мышей посредством тетраплоидной рекомбинации. Методы известны в данной области техники. Как правило, после введения гормонов сверховулированные Balb/c самки скрещивались с Balb/c самцами. Бластоцисты были выделены из матки при дрс 3,5. Для микроинъекции бластоцисты были помещены в каплю DMEM с 15% FCS под минеральным маслом. Пьезоактивируемая пипетка для микроинъекций с плоским наконечником с внутренним диаметром 12-15 микрометров была использована для инъектирования 10-15 целевых ES-клеток C57BL/6 N.tac в каждую бластоцисту. После выделения, инъектированные бластоцисты были перенесены в каждый рог матки через 2,5 дня после спаривания самкам NMRI с ложной беременностью. Химеризм измерялся в химерах (GO) посредством вклада ES-клеток в цвет меха Balb/c-хозяина (черный/белый). Мыши с высоким химеризмом скрещивались с самками штамма C57BL/6. В зависимости от требований проекта, партнерши для спаривания C57BL/6 являются немутантными (W) или мутантными относительно наличия гена рекомбиназы (Flp-удалитель, или Cre-удалитель, или индуцируемый CreER удалитель, или комбинация Flp-удалитель /CreER). Передача зародышевой линии идентифицировалась по наличию потомства штамма C57BL/6 с черным мехом (G1).

Например, клон ESC IgVK1-3926838 (см. примеры 5 и 14) был суммарно инъектирован в 62 бластоцисты в 3 независимых экспериментах. Было получено 3 помета, суммарно содержащих 6 детенышей. Все детеныши были химерными. Было получено 3 гетерозиготных потомка, которые были использованы для дальнейшего скрещивания.

ESC-клон каппа 2692 A-C10 (см. примеры 3 и 14) был инъектирован суммарно в 54 бластоцисты в 3 независимых экспериментах. Было получено 3 помета, суммарно содержащих 11 детенышей, 10 из которых были химерными. Было получено 8 гетерозиготных потомков, которые были использованы для дальнейшего скрещивания.

ESC-клон каппа 2692 B-C1 (см. примеры 3 и 14) был инъектирован суммарно в 51 бластоцисту в 3 независимых экспериментах. Было получено 2 помета, суммарно содержащих 6 детенышей, 4 из которых были химерными. Было получено 3 гетерозиготных потомка, которые были использованы для дальнейшего скрещивания.

#### 30 Пример 16

##### Селекция

В данном примере описывается селекция с целью получения мышей, которые содержат трансгенные экспрессионные кассеты, в соответствии с описанным в примере 14, и нокаутные мыши, в которых был выполнен сайленсинг лямбда- и каппа-локусов. Локализация V-лямбда на хромосоме 16 и CD19 на хромосоме 7 позволяет применять стандартные процедуры селекции. Селекция совместно локализованных Vκ-локуса и Rosa26-локуса на хромосоме 6 с расстоянием около 24 сМ требует специального внимания в процессе скрининга, поскольку только часть потомства демонстрирует такой кроссинговер, что обе модификации сводятся вместе на одной хромосоме.

40 Все четыре локуса должны быть объединены в одном штамме мыши, который является гомо- или гетерозиготным по CD19-cre (не описан) и модифицированному трансгену Rosa26 и гомозиготным по другим локусам. Селекция выполняется соответствующим образом посредством стандартных методик селекции и скрининга в соответствии с предлагаемым компаниями коммерческой селекции (например, TaconicArtemis).

#### 45 Пример 17

##### Иммунизация мыши

Первичная и вторичная иммунизация мышцей выполняется с использованием

стандартных протоколов.

В целях подтверждения трансгенной экспрессии перестроенного V<sub>κ</sub> O12 человека (IGKV1-39) - С<sub>κ</sub>-легких цепей крысы (см. примеры 5, 14-16) в В-клетки из мышей CD19-HuV<sub>κ</sub>1 и для оценки ее влияния на размер V<sub>H</sub>-репертуара, разнообразие использования V<sub>H</sub>-семейства и рекомбинацию V(D)J после иммунизации, трансгенные мыши CD19-HuV<sub>κ</sub>1 были иммунизированы вакциной столбнячного токсина (ТТ-вакциной), и разнообразие последовательностей V<sub>H</sub> из случайно выбранных клонов мышей CD19-HuV<sub>κ</sub>1 сравнивалось с ТТ-иммунизированными мышами дикого типа и CD19-Cre HuV<sub>κ</sub>1 отрицательными детенышами одного помета. Были получены данные по частоте SHM для трансгена V<sub>κ</sub> O12 человека в иммунизированных мышах. Разнообразная коллекция по меньшей мере из 40 ТТ-специфических, не связанных клонально mAb, содержащих V<sub>κ</sub> O12 человека, была получена из мышей CD19-HuV<sub>κ</sub>1 посредством фагового дисплея.

Для этого три взрослых мыши CD19-HuV<sub>κ</sub>1 вакцинировались ТТ-вакциной ТТ с применением стандартных процедур иммунизации. После иммунизации проводилось измерение титров сыворотки с использованием ТТ-специфической ELISA (ТТ: Statens Serum Institute, номер артикула 2674), и суспензии селезенки подвергались клеточному сортированию посредством FACS-процедуры после окрашивания с С<sub>κ</sub>-специфическим моноклональным антителом крысы с целью выделения трансгенных В-клеток (клон RG7/9.1; BD Pharmingen# 553901, Lot# 06548). Были извлечены РНК из С<sub>κ</sub>-положительной В-клетки крысы, и полученный в результате кДНК-материал был использован для построения библиотек и SHM-анализа.

Стандартное моноклональное антитело мыши против С<sub>κ</sub> крысы (клон RG 7/9.1; BD Pharmingen# 553901, Lot# 06548) использовалось в FACS-анализе экспрессирующих трансген В-клеток (Meyer et al., 1996, Int. Immunol., 8: 1561). Антитело клона RG7/9.1 реагирует с монотипичной (общей) детерминантой каппа-цепи. Данное антитело против С<sub>κ</sub> крысы (клон RG7/9.1 (BD Pharmingen# 553901, Lot# 06548) помечено R-фикоэритрином (PE) с использованием набора для быстрой конъюгации LYNX в соответствии с инструкциями производителя для FACS-анализа и сортирования. Помеченное антитело сначала тестируется проточной цитометрией на предмет связывания с функциональными С<sub>κ</sub>-содержащими белками легкой цепи крысы, продуцированными в транзистентно трансфицированных клетках НЕК-293Т; неконъюгированное антитело служит в качестве положительного контроля. Два других антитела, связывание которых с С<sub>κ</sub> крысы было показано посредством ELISA и вестерн-блоттинга (см. пример 7), были также протестированы с помощью проточной цитометрии.

Построение Fab-библиотеки фагового дисплея проводилось со множеством оптимизированных вырожденных ПЦР-праймеров, разработанных для амплификации V<sub>H</sub>-генов C57BL/6; минимальный размер библиотеки составил 10<sup>6</sup> клонов, и минимальная частота вставки составляет 80%. Используемый вектор MV1043 (фигуры 3 и 12) содержит V<sub>κ</sub> O12 человека, слитый с С<sub>κ</sub>-областью человека. Таким образом, С<sub>κ</sub> крысы заменяется на аналог человека в процессе создания библиотеки.

До отбора выполняется V<sub>H</sub>-секвенирование 96 случайно выбранных клонов с целью проверки разнообразия V<sub>H</sub>-репертуара, которое сравнивается с разнообразием из невыбранной библиотеки, ранее созданной с использованием тех же процедур из мышей BALB/c, иммунизированных ТТ. Библиотека из мышей дикого типа C57 B1/6, которые иммунизировались таким же образом, позволяет провести сравнение разнообразия между двумя предварительно отобранными библиотеками, имеющими одну и ту же вакцину и один и тот же генетический фон.

Выполняется несколько независимых отборов на ТТ-покрытых иммунотубах. Изменения, которые могут иметь место, включают выбор с использованием биотинилированных антигенов в растворе или выбор на захваченных ТТ. На основании количества и разнообразия положительных клонов, согласно анализу ELISA, в первых  
 5 выборках, принимаются решения о дополнительных этапах выборки. Клоны считаются положительными, когда они более чем в три раза превосходят клоны отрицательного контроля. Положительные клоны анализируются посредством ELISA относительно панели антигенов отрицательного контроля с целью проверки антигенной специфичности. Цель состоит в идентификации по меньшей мере 40 уникальных  
 10 V<sub>H</sub>-областей как основанных на уникальных CDR3-последовательностях и V<sub>H</sub>DJ<sub>H</sub>-перестройках.

Аmplификация кДНК-материала крысиных С<sub>κ</sub>-положительных отсортированных В-клеток выполняется с прямым ПЦР-праймером, специфическим для лидерной последовательности человека и обратным ПЦР-праймером, специфическим для С<sub>κ</sub>-  
 15 последовательности крысы, в области, не избыточной по С<sub>κ</sub>-последовательности мыши, как сообщалось в недавнем исследовании (Brady et al., 2006, JIM, 315: 61). Комбинации праймеров и температуры отжига вначале тестируются на кДНК из клеток НЕК-2 93Т, трансфицированных вектором 0817676\_pSELECT\_0815426=pSELECT с ДНК-кассетой IGKV1-39 (см. пример 7).

20 Продукты амплификации клонируются в вектор pJET-1 и, после трансформации XLI-blue, 96 колоний секвенируется для оценки частоты SHM для V<sub>L</sub> путем прямого сравнения с зародышевой последовательностью VK O12 (IGKV1-39). Метод R/S, в соответствии с описанным в нашем исследовании на ТТ-специфических антителах человека (de Kruif et al., 2009, J. Mol. Biol., 387: 548), позволяет разделять случайные мутации и  
 25 направляемые антигеном мутации, которые появляются в V<sub>L</sub>-последовательностях.

#### Пример 18

Иммунофлуоресцентный анализ популяций В-клеток в трансгенных линиях мыши.

В данном примере описывается использование антител и проточной цитометрии для  
 30 анализа популяций В-клеток в первичных (костный мозг) и вторичных (селезенка, брюшина) лимфоидных органах и крови. Методы и реагенты описаны в работах Middendorp et al. (2002) J. Immunol. 168:2695 и Middendorp et al. (2004) J. Immunol. 172:1371. В целях анализа раннего развития В-клеток в костном мозге, клетки подвергались  
 35 поверхностному окрашиванию комбинациями антител (Becton Dickinson), специфичными для B220, CD19, CD25, IgM, IgD, Скаппа мыши, Слямбда мыши и Скаппа крысы для обнаружения популяций про-В-клеток, пре-В-клеток, больших пре-В-клеток, ранних и поздних незрелых В-клеток и рециркулирующих В-клеток, экспрессирующих трансген на своей поверхности. DAPI-окрашивание (Invitrogen) было применено для исключения мертвых клеток из анализа, и FC-блок (Becton Dickinson) применялся для подавления  
 40 взаимодействия антитела с Fe-рецепторами на миелоидных клетках. В целях анализа экспрессии трансгена на поверхности популяций В-клеток в периферийных лимфоидных органах и крови, клетки были окрашены комбинациями антител (Becton Dickinson), специфичными для B220, CD5, CD19, CD21, CD23, IgM, IgD, Скаппа мыши, Слямбда мыши и Скаппа крысы. DAPI-окрашивание было применено для исключения мертвых  
 45 клеток из анализа, и FC-блок применялся для подавления взаимодействия антитела с Fc-рецепторами на миелоидных клетках. Кроме того, были включены комбинации антител (Becton Dickinson), специфичные для CD3, CD4, CD11b, CD11c и NK1.1, с целью определения, имеет ли место экспрессия трансгена в клеточных типах вне ячейки В-

клеток.

Были проанализированы три мыши, гетерозиготные по трансгену IGKV1-39 человека/Скаппа крысы и гетерозиготные по трансгену CD19-Cre на фоне C57BL6 (HuVkl/CD19-Cre). В качестве контроля для FACS-анализа были включены три детеныша того же помета дикого типа для трансгена IGKV1-39 человека/Скаппа крысы и гетерозиготные по трансгену CD19-Cre на фоне C57BL6 (CD19-Cre) и две мыши C57BL6/NTac (дикий тип). Все животные акклиматизировались в виварии в течение 1 недели до начала анализа, и все мыши были самцами в возрасте 6 недель. Лимфоциты были выделены из бедра, селезенки, брюшинной полости и крови мышей с использованием обычных методик, в соответствии с описанным ранее (Middendorp et al. (2002) *J. Immunol.* 168:2695 и Middendorp et al. (2004) *J. Immunol.* 172:1371). Антитела были предварительно объединены в соответствии с показанным в Таблице 10, и было проведено окрашивание в 96-луночных планшетах. Инкубация с PE-конъюгированным противокрысиным Скаппа (описано выше) была проведена до окрашивания анти-мышинными антителами крысы с целью предотвращения неспецифического связывания. После завершения клеточного окрашивания, помеченные клетки были проанализированы на FACS-машине Becton Dickinson LSR II, и полученные данные были проанализированы с помощью программного обеспечения FlowJo (v6.4.7).

Трансгенные мыши были сходны с мышами дикого типа по весу, внешнему виду и активности. Во время сбора тканей не наблюдалось сильных анатомических изменений. Между трансгенными мышами и мышами дикого типа не наблюдалось разницы в количестве В-клеток в костном мозге (ВМ) и селезенке (Таблица 11) или в количестве В-клеток, Т-клеток и миелоидных клеток в периферических органах. Кроме того, частота или доля клеток в различных каналах развития лимфоцитов не изменялась в трансгенных мышцах по сравнению с мышами дикого типа. Таким образом, у двойных трансгенных (HuVkl I/CD19-Cre) и трансгенных (CD19-Cre) мышей развитие лимфоидных, и, самое важное, В-клеток было неотличимым от мышей дикого типа.

В периферических лимфоидных органах окрашивание специфичным для трансгена антителом (анти-крысиное Скаппа-PE) наблюдалось только в популяциях В-клеток. Популяции Т-клеток, миелоидных клеток и НК-клеток были отрицательными по поверхностной экспрессии трансгена в селезенке (Фигура 23). В отличие от этого, в клетках, окрашенных рап-маркерами В-клеток B220 и CD19, все клетки были сдвинуты направо на FACS-плоте, что указывает на экспрессию трансгена на поверхности клетки (Фигура 24). Аналогичное трансген-специфическое окрашивание измерялось в клетках CD5<sup>+</sup> В1 брюшной полости (отличающейся по развитию клеточной популяции В-клеток) (Фигура 25).

Дифференциация В-клеток из мультилинейных предшественников в зрелые В-клетки происходит в костном мозге. В проанализированных лимфоцитах из костного мозга, внеклеточная экспрессия и экспрессия трансгена были недетектируемыми, в самых ранних предках В-клеток, про- и пре-В-клетках, экспрессия была согласована с профилем нормальной экспрессии легкой цепи (Фигура 26). Экспрессия трансгена впервые становится детектируемой в незрелых В-клетках на стадии развития, в которых легкая цепь зародышевой линии мыши претерпевает перестройку и экспрессируются на клеточной поверхности в контексте предварительно выбранной тяжелой цепи (Фигура 26). Экспрессия трансгенной легкой цепи также обнаружена в зрелых рециркулирующих В-клетках (Фигура 26), что, согласуется с окрашиванием в селезенке. Таким образом, управляемая CD19-Cre экспрессия трансгена согласуется с нормальным профилем экспрессии легкой цепи. Окрашивание специфичным для эндогенной легкой цепи

антителом более интенсивно, чем для антитела, специфического для легкой цепи трансгена. Это может указывать на более высокий уровень экспрессии эндогенной легкой цепи, большую чувствительность окрашивания специфичным для эндогенной легкой цепи антителом, или на комбинацию и того, и другого. Важно, что интенсивность

5 поверхностной экспрессии трансгенной легкой цепи коррелирует с поверхностной экспрессией как эндогенной легкой цепи, так и IgM, что наблюдалось при окрашивании циркулирующих В-клеток в крови (Фигура 27).

Таким образом, в общем данный анализ демонстрирует, что экспрессия трансгена IGKV1-39/Скаппа человека ограничена ячейкой В-клеток и временная регуляция его

10 экспрессии аналогична эндогенным каппа- и лямбда-легким цепям, в результате чего происходит нормальное развитие популяций В-клеток. Явно более низкий уровень экспрессии трансгена может объясняться силой промотора по сравнению - с промотором и энхансерами, присутствующими для генов эндогенной легкой цепи, или задержкой в экспрессии трансгена, которая дает эндогенным легким цепям конкурентное

15 преимущество при спаривании с перестроенной тяжелой цепью. Это согласуется с наблюдением, что при созревании В-клеток относительная интенсивность окрашивания трансгена возрастает по сравнению с эндогенными легкими цепями. Кроме того, наблюдение, что количество В-клеток является нормальным, и что каждая

20 поверхностная Ig+ В-клетка коэкспрессирует эндогенную и трансгенную легкую цепь, подтверждает вывод о том, что варибельная область IGKV1-39 может соединяться с нормальным репертуаром различных варибельных областей тяжелой цепи мыши. Из этого анализа заявители сделали вывод, что вставка трансгена IGKV1-39/Скаппа крысы, управляемая активируемым CD19-Cre CAGGS-промотором в локусе Rosa, способствует

25 своевременной и специфичной для В-клеток экспрессии трансгена, и что трансген может соединяться с нормальным репертуаром тяжелых цепей мыши.

#### Пример 19

Epibase<sup>®</sup>-профиль Т-клеток для IGKV1-39.

Белковая последовательность IGKV1-39 (Фигура 12, зародышевая линия человека, белок IGKV1-39/J) сканировалась на предмет наличия предполагаемых ограниченных

30 эпитопов HLA класса II, также известных как T<sub>H</sub>-эпитопы. Для этого, платформа Algonomics I Epibase<sup>®</sup> применялась для IGKV1-39. Коротко, эта платформа анализирует специфичности связывания HLA для всех возможных 10-мерных пептидов из целевой последовательности (Desmet et al. Nature 1992, 356:539-542; Desmet et al. FASEB J. 1997, 11:164-172; Desmet et al. Proteins 2002, 48:31-43; Desmet et al. Proteins 2005, 58:53-69). Анализ

35 профиля выполняется на уровне аллотипа для 20 DRB1, 7 DRB3/4/5, 13 DQ и 7 DP, то есть, суммарно для 47 HLA-рецепторов класса II (см. Таблицу 5). Epibase<sup>®</sup> рассчитывает количественную оценку свободной энергии связывания  $\Delta G_{\text{bind}}$  пептида для каждого из 47 HLA-рецепторов класса II. Эти данные подвергались дальнейшей обработке

40 следующим образом:

- Свободные энергии преобразовывались в Kd-значения по формуле  $\Delta G_{\text{bind}} = RT \ln(Kd)$ .

- Пептиды классифицировались как имеющие сильное (S), среднее (M), слабое связывание или как несвязывающие (N). Использовались следующие граничные

45 значения:

S: сильное связывание:  $Kd < 0,1 \text{ мкМ}$ .

M: среднее связывание:  $0,1 \text{ мкМ} \leq Kd < 0,8 \text{ мкМ}$ .

N: слабое связывание и отсутствие связывания:  $0,8 \text{ мкМ} \leq Kd$ .

- Пептиды, соответствующие собственным пептидам, обрабатывались отдельно. Список собственных пептидов был получен из 2 93 последовательностей антител зародышевой линии. Они обозначаются как пептиды, фильтрованные по зародышевой линии.

5 S- и M-пептиды отображаются на целевую последовательность в так называемых картах эпитопов; S-аффинности изображаются количественно; M-значения показываются качественно. В качестве общего обзора результатов, в Таблице 6 представлено количество белков с сильной и средней связывающей способностью среди анализируемых белков, для групп HLA-рецепторов класса II, соответствующих генам  
10 DRB1, DQ, DP и DRB3/4/5. Расчет выполнялся отдельно для связей с сильной и средней аффинностью. Пептиды, связывающиеся с множеством аллотипов одной и той же группы, считались как один. Значения в скобках относятся к пептидам, фильтрованным по зародышевой линии. В Таблице 7 показана последовательность в формате, подходящем для экспериментальной работы. Последовательность разделена на  
15 последовательные 15-меры, перекрывающиеся на 12 остатков. Для каждого 15-мера приведена разнородность (количество аллотипов из суммарных 47, для которых 15-мер содержит критический связыватель), а также предполагаемые серотипы. EpiBase®-профиль и карты эпитопов показаны на Фигурах 16 и 17.

Был сделан вывод о том, что IGKV1-39 не содержит сильных несобственных  
20 связывателей DRB1. Обычно для генов DRB1 находилось значительно больше связывателей, чем для других HLA-генов. Это согласуется с экспериментальными свидетельствами того, что аллотипы, принадлежащие к группе DRB1, являются более сильными связывателями пептидов. Ожидается, что эпитопы средней силы для аллотипов DRB1 вносят вклад в ответ популяции, и не могут не рассматриваться. Снова,  
25 несобственных связывателей DRB1 не было обнаружено в IGKV1-3 9.

В гуморальном ответе, возникающем против антигена, наблюдаемая активация/пролиферация T<sub>H</sub>-клеток обычно интерпретируется в отношении DRB1-специфичности. Однако нельзя игнорировать возможный вклад генов DRB3/4/5, DQ и DP. Учитывая,  
30 что данные гены имеют более низкие уровни экспрессии по сравнению с DRB1, большее внимание уделялось классу сильных эпитопов для DRB3/4/5, DQ и DP. 'Критичные эпитопы' - это эпитопы, имеющие сильную связывающую способность для любого аллотипа DRB1, DRB3/4/5, DQ или DP, или имеющие среднюю связывающую способность для DRB1. IGKV1-39 не содержит сильных или средних несобственных связывателей для DRB3/4/5, DQ или DP.

35 Ряд пептидов также присутствует в последовательностях зародышевой линии (значения в скобках в Таблице 6). Такие пептиды могут очень хорошо связываться с HLA, но предполагается, что они являются собственными и, следовательно, неиммуногенными. Суммарно в IGKV1-39 было обнаружено 6 сильных и 16 средних фильтрованных по зародышевой линии связывателей. Участок от каркасной области  
40 1 до каркасной области 3 имеет точное соответствие с V-сегментом зародышевой линии VKI 2-1-(1) O12 (VBase), также известным как IGKV1-39\*O1 (IMGT). Каркасная область 4 имеет точное соответствие с J-сегментом зародышевой линии JK1 (V-base) также известным как IGKJ1\*O1 (IMGT). Не является неожиданным, что данные сегменты не содержат ни одного несобственного эпитопа.

45 Пример 20

Характеристики продуцирования IGKV1-39

Существует большая потребность в платформах обнаружения антител, которые выдавали бы терапевтические антитела, являющиеся термодинамически стабильными



и обеспечивали бы хорошую экспрессию. Эти характеристики являются важными для обеспечения стабильности лекарственного вещества во время продуцирования и после инъектирования фармацевтического продукта пациенту. Кроме того, хороший выход продуктов экспрессии напрямую влияет на стоимость производства лекарства и, следовательно, на его цену, доступность для пациентов и прибыльность. Практически все терапевтические антитела, находящиеся в данный момент в клиническом использовании, состоят из IgG1 человека и каппа-константных областей человека, но используют различные переменные области тяжелой и легкой цепи, что обеспечивает специфичность. Переменные домены тяжелой и легкой цепи человека могут быть разделены на семейства, имеющие расхождение в последовательностях более 80%. Когда перестроенные примеры данных семейств в конфигурации зародышевой линии объединяются и сравниваются по стабильности и выходу, становится ясным, что семейства генов не являются равнозначными по своим биофизическим свойствам. В частности,  $V_H3$ ,  $V_H1$  и  $V_H5$  обладают хорошей стабильностью для тяжелых цепей, и  $Vk1$  и  $Vk3$  имеют наилучшую стабильность и выход для легких цепей. Кроме того, при внесении мутаций в рамках процесса соматической гипермутации, они могут вызывать помехи для спаривания  $V_H/V_L$ . Для оценки влияния, которое различные гены легкой цепи с различными уровнями мутаций имеют на характеристики продуцирования фиксированной  $V_H$ -цепи, была построена библиотека Fab-фагового дисплея для легких цепей (каппа- и лямбда) шести ранее не подвергавшихся экспериментам доноров, объединенная с панелью из 44 ТТ-связывающих тяжелых цепей из иммунизированных доноров. После одного цикла селективного ТТ-связывания Fab-клоны были изолированы. Некоторые из них имели такой же  $V_H$ -ген, что и ТТ-клон PG1433, в комбинации с различными легкими цепями. Fab-фрагменты легкой цепи были повторно клонированы в каппа-экспрессионном векторе и трансфицированы вместе с ДНК, кодирующей тяжелую цепь PG1433, в 293 клетки, и специфическое продуцирование IgG измерялось посредством ELISA. Как показано в таблице 8, выбранные клоны, содержащие PG1433  $V_H$ , объединялись с различными легкими цепями, имеющими от 5 до 10 раз более низкую экспрессию белка PG1433  $V_H$ , объединенного с IGKV1-39. Стоит отметить, что все легкие цепи содержали в своих кодирующих областях аминокислотные мутации, которые могли помешать спариванию с  $V_H$  и могли понизить стабильность продуцирования. Таким образом, ожидается, что помимо снижения вероятности нежелательной иммуногенности, использование легкой цепи IGKV1-39 без мутации также вносит вклад в улучшение стабильности-продуцирования и повышение выхода для различных вносящих вклад в специфичность  $V_H$ -генов. Действительно, все стабильные клоны, созданные посредством трансфекции различных  $V_H$ -генов, спаренных с IGKV1-39, могли подвергаться активному пассированию и при этом сохранять устойчивые характеристики продуцирования, как показано в таблице 9.

#### Пример 21

Получение мышей, экспрессирующих  $V_H$  и  $V_L$ -области полностью человека.

Трансгенные мыши по изобретению скрещиваются с мышами, уже содержащими локус  $V_H$  человека. Примеры подходящих мышей, содержащих локус  $V_H$  человека, описаны в работах (Taylor et al. (1992). *Nucleic Acids Res* 20: 6287-95; Lonberg et al. (1994). *Nature* 368: 856-9; Green et al. (1994). *Nat Genet* 7: 13-21; Dechiara et al. (2009). *Methods Mol Biol* 530: 311-24.).

После скрещивания и отбора мышей, которые были по меньшей мере

гетерозиготными по трансгену IGKV1-39 и локусу V<sub>H</sub> человека, выбранные мыши иммунизировались целевым веществом. V<sub>H</sub>-гены собирались в соответствии с описанным выше в настоящем документе. Данный способ имеет преимущество в том, что V<sub>H</sub>-гены уже являются полностью человеческими и, следовательно, не требуют гуманизации.

#### Пример 22

Выделение, характеристика и олигоклональное форматирование и продуцирование антител, нацеленных на IL6 человека, для лечения заболеваний хронического воспаления, таких как ревматоидный артрит

Репертуар V<sub>H</sub> селезенки из трансгенных мышей, иммунизированных рекомбинантным IL6 человека, клонировался в Fab-векторе фагового дисплея с одной IGKV1-39-С каппа легкой цепью человека (идентичной трансгену мыши) и подвергался пэннингу с иммуногенным IL6 человека. Клоны, которые были получены после от двух до четырех циклов пэннинга, анализировались на предмет их специфичности связывания. V<sub>H</sub>-гены, кодирующие IL6-специфические Fab-фрагменты, подвергались анализу последовательности с целью идентификации V<sub>H</sub>никальных клонов и назначения использования V<sub>H</sub>, DH и JH. Fab-фрагменты реформатировались как молекулы IgG1 и транзитивно экспрессировались. V<sub>H</sub>никальные клоны затем группировались на основании отсутствия конкурентности при анализе связывания, и подвергались анализу аффинности и функциональности. Наиболее сильные анти-IL6 IgG1 mAb последовательно экспрессировались как комбинации двух, трех, четырех или пяти тяжелых цепей, содержащих различные V<sub>H</sub>-области в формате олигоклонирования, вместе с одной основанной на IGKV1-39-С каппа-легкой цепью, и тестировались *in vitro* на предмет образования комплекса с IL-6. Олигоклонирование также тестировалось *in vivo* на предмет выведения IL-6 человека из мышей. Было выбрано олигоклонирование с наиболее сильной выводящей активностью, и V<sub>H</sub>-гены мыши гуманизировались в соответствии с обычными методами. Гуманизированный IgG1 трансфицировался в клеточную линию млекопитающего для создания стабильного клона. Выбирался оптимальный субклон для создания банка базовых клеток и получения материала для клинических исследований.

Многие протоколы, описанные здесь, являются стандартными протоколами для конструирования библиотек фагового дисплея и пэннинга фагов для связывания с представляющим интерес антигеном, и описаны, например, в *Antibody Phage Display: Methods and Protocols*. 2002. Editor(s): Philippa M. O'Brien, Robert Aitken. Humana Press, Totowa, New Jersey, USA.

#### Иммунизации

Трансгенные мыши получали три иммунизации IL6 человека каждые две недели с использованием адьюванта Sigma titerMax в соответствии с инструкциями производителя.

#### Выделение РНК и синтез кДНК

Через три дня после последней иммунизации, у мышей удалялись селезенки и лимфоузлы и проводились через 70-микронный фильтр в тубу, содержащую PBS, pH 7,4, для получения одноклеточной суспензии. После промывания и осаждения лимфоцитов, клетки суспендировались в реагенте TRIzol LS (Invitrogen) для выделения-тотальной РНК, в соответствии с протоколом производителя, и подвергались реакции обратной транскрипции с использованием 1 микрограмма РНК Superscript<sup>®</sup> III RT, в комбинации с dT20, в соответствии с процедурами производителя (Invitrogen).

Создание Fab-библиотек фагового дисплея проводилось в соответствии с описанным

в Примере 2.

#### Отбор фагов на покрытых иммуноチューбах

Рекомбинантный IL6 человека был растворен в PBS в концентрации 5 мкг/мл и нанесен слоем на Nunc-иммунотубы MaxiSorp (Nunc 444474) и оставлен в течение ночи при 4°C.

5 После исключения покрывающего раствора, тубы были заблокированы 2% обезжиренным молоком (ELK) в PBS (блокирующий буфер) в течение 1 часа при комнатной температуре (RT). Параллельно, 0,5 мл фаговой библиотеки было смешано с 1 мл блокирующего буфера и инкубировалось в течение 20 минут при комнатной температуре. После блокирования фагов фаговый раствор был добавлен к покрытым IL6 тубам и  
10 инкубировался в течение 2 часов при комнатной температуре на медленно вращающейся платформе с тем, чтобы допустить связывание. Затем тубы промывались 10 раз PBS/0,05% Tween-20, после чего проводилось элюирование фагов посредством инкубации с 1 мл 50 мМ глицина-HCl pH 2,2 в течение 10 минут при комнатной температуре на вращающемся колесе, после чего сразу проводилась нейтрализация собранного элюента  
15 с помощью 0,5 мл 1 М трис-HCl pH 7,5.

#### Сбор фаговых клонов

5 мл культуры XL1-Blue MRF (Stratagene) при O.D. 0,4 было добавлено к собранному раствору фагов, и была проведена инкубация в течение 30 минут при 37°C без перемешивания с целью допущения инфицирования фагов. Бактерии высевались на  
20 чашки с карбенициллином/тетрациклином и 4% глюкозой 2\*TY и выращивались в течение ночи при 37°C.

#### Получение фагов

Фаги были выращены и обработаны в соответствии с описанным Крамером и соавт. 2003 (Kramer et al. 2003. Nucleic Acids Res. 31(11): e59) с использованием VCSM13 в  
25 качестве вспомогательного штамма фага.

#### Иммуноферментный анализ фагов (ELISA)

Чашки для иммуноферментного анализа (ELISA) были покрыты 100 микролитрами рекомбинантного IL6 человека на 1 лунку при концентрации 2,5 микрограмма/мл в PBS, и оставлены на ночь при 4°C. Чашки, покрытые 100 микролитрами тироглобулина  
30 при концентрации 2 микрограмма/мл в PBS были использованы в качестве отрицательного контроля. Лунки были опустошены, высушены посредством выпуска жидкости на бумажном полотенце, заполнены полностью PBS-4% обезжиренным молоком (ELK) и инкубировались в течение 1 часа при комнатной температуре для блокирования лунок. После исключения блокирующего раствора, фаговые  
35 миникомпозиции (mini-prep), предварительно смешанные с 50 мкл блокирующего раствора, были добавлены и инкубировались в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем посредством проведения 5 этапов промывания PBS-0,05% Tween-20 были удалены несвязанные фаги. Связанные фаги были обнаружены путем инкубирования лунок в 100 микролитрах анти-M13-HRP конъюгата антитела  
40 (разведенного 1/5000 в блокирующем буфере) в течение 1 часа при комнатной температуре. Свободные антитела были удалены посредством повторения этапов промывания, описанных выше, после чего проводилось инкубирование с помощью субстрата TMB до момента, когда формирование цвета стало заметным. Реакция была остановлена путем добавления 100 микролитров 2М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> на лунку, после чего был  
45 проведен анализ на аппарате для чтения ELISA при длине волны излучения 450 нм.

#### Секвенирование

Клоны, которые давали сигналы по меньшей мере в 3 раза превышающие фоновый сигнал (Таблица 2) были размножены, использованы для mini-prep-процедур ДНК (см.

процедуры из руководства Qiagen miniPrep) и подвергнуты анализу нуклеотидной последовательности. Секвенирование выполнялось в соответствии с инструкцией, прилагаемой к набору Big Dye 1.1 (Applied Biosystems) с использованием обратного праймера (CH1\_Rev1, таблица 1), распознающего 5'-последовательность CH1-области тяжелой цепи IgG1 человека (присутствует в векторе дисплея Fab MV1043, фигуры 3 и 12). Последовательности V<sub>H</sub>-областей мыши анализировались на предмет разнообразия сегментов генов DH и JH.

#### Конструирование и экспрессия химерного IgG1

Вектор MV1057 (фигуры 12 и 22) был получен путем клонирования фрагмента L-цепи трансгена (IGKV1-39) в производную вектора pcDNA3000Neo (Crucell, Leiden, Нидерланды), которая содержала константные области IgG1 человека и каппа-константные области человека. V<sub>H</sub>-области клонировались в MV1057, и нуклеотидные последовательности для всех конструкций проверялись в соответствии со стандартными методиками. Полученные в результате конструкции транзientно экспрессировались в клетках HEK2 93T, и супернатанты, содержащие химерный IgG1, были получены и очищены с использованием стандартных процедур, как было описано ранее (Throsby, M. 2006. J Virol 80: 6982-92).

#### Анализ связывания и конкуренции IgG1

Антитела IgG1 титровались в ELISA с использованием покрытых IL6 планшетов, в соответствии с описанным выше, и конъюгата пероксидазы против IgG человека. Конкурентные иммуноферментные анализы для группировки антител на основании распознавания эпитопов были выполнены посредством инкубирования Fab-фагов вместе с IgG1 или с коммерческими антителами против IL6 (например Abeam, каталожный номер ab9324) на покрытых IL6 планшетах, после чего проводилось детектирование связанных Fab-фагов с использованием конъюгата анти-M13 пероксидазы.

#### Измерения аффинности IgG1

Аффинности антител против IL6 определялись в соответствии с протоколом количественной кинетики с использованием Octet (ForteBio). Антитела захватывались захватывающим биосенсором против Fc IgG человека и подвергались воздействию свободного IL6, после чего анализировались с помощью специализированного программного обеспечения для вычисления K<sub>d</sub> для каждого антитела.

#### Функциональная активность антител IL6

Для тестирования способности отобранных антител к ингибированию связывания между IL6 и рецептором IL6 (IL6R) было использовано исследование на основе ELISA. Различные концентрации антитела смешивались с фиксированной концентрацией (10 нг/мл) биотинилированного IL6, как описано в работе Naoko et al. 2007, Can. Res. 67: 817-875. Иммуновый комплекс IL6-антитела добавлялся для иммобилизации IL6R. Связывание биотинилированного IL6 с IL6R определялось с помощью стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена. Снижение сигнала ELISA являлось мерой ингибирования. В качестве положительного контроля для ингибирования связывания между IL6 и IL6R использовалось анти-IL6R антитело (Abeam, каталожный номер ab34351; клон В-Р6) или анти-IL6 антитело (Abeam, каталожный номер ab9324).

Блокирующая активность *in vitro* отобранных антител против IL6 измерялась в пролиферационном анализе с использованием антитела IL6-зависимой клеточной линии 7TD1. Кратко, клетки инкубировались с различными концентрациями IL6 человека при наличии или в отсутствие анти-IL6 антитела. Доступное количество IL6 определяет степень пролиферации. Таким образом, если добавленное антитело блокирует IL6, то

регистрируемая пролиферация снижается по сравнению с контролем для несвязывающего антитела. Пролиферация измерялась путем включения 5-бромо-2'-дезоксидеокси-уридина (BrdU) в ДНК с использованием набора для пролиферации с BrdU (Roche, каталожный номер 11444611001) в соответствии с инструкциями производителя.

#### 5 Получение олигоклонов анти-IL6

Наиболее сильные анти-IL6 антитела выбирались для каждой группы эпителиоцитов. Экспрессионные конструкции, экспрессирующие данные антитела, трансфицировались в клетки HEK2 93T в неконкурирующих группах по три в различных соотношениях (1:1:1; 3:1:1; 1:3:1; 1:1:3; 3:3:1; 1:3:3; 3:1:3; 10:1:1; 1:10:1; 1:1:10; 10:10:1; 1:10:10; 10:1:10; 10  
10 3:10:1; 10:3:1; 1:10:3; 3:1:10; 10:1:3; 1:3:10). Антитела, содержащие супернатанты, собирались, очищались и характеризовались в соответствии с описанным выше.

#### Образование комплекса и *in vivo* выведение олигоклонов анти-IL6

Для измерения способности олигоклонов анти-IL6 образовывать иммунные комплексы и для анализа этих комплексов использовалась эксклюзионная  
15 хроматография (SEC) в соответствии с подходом, изложенным в работе Min-Soo Kim et al. (2007) JMB 374: 1374-1388, в целях характеристики иммунных комплексов, образованных с различными антителами к TNF $\alpha$ . Различные молярные концентрации олигоклонов анти-IL6 смешивались с IL6 человека и инкубировались в течение 20 часов при 4°C или 25°C. Смесь анализировалась на HPLC-системе, оборудованной  
20 колонкой для эксклюзии по размерам; различные временные интервалы элюции были связаны с молекулярным весом с использованием стандартов молекулярных весов.

Способность антител образовывать комплексы с IL6 коррелирует с их способностью к быстрому выведению цитокина из циркуляции *in vivo*. Это подтверждается измерением выведения помеченного радиоактивной меткой IL6 из мышей. Коротко, были получены  
25 самки мышей Balb/c в возрасте от 6 до 8 недель, и за 18 часов до эксперимента животные подвергались внутривенной (IV) инъекции через латеральную хвостовую вену различных доз очищенных олигоклонов анти-IL6. В день 0 мышам внутривенно инъецировалось 50 микролитров помеченного радиоактивной меткой IL-6 ( $1 \times 10^7$  cpm/мл) при тех же условиях. Образцы крови (приблизительно, 50 микролитров) собирались в различные  
30 временные интервалы и хранились при 4°C. Образцы подвергались центрифугированию в течение 5 минут на 4000 xg, и измерялась радиоактивность сыворотки. Все фармакокинетические эксперименты выполнялись одновременно для трех животных для каждой обработки.

#### Получение стабильных олигоклонов анти-IL6 и доклиническое развитие

35 Доминирующий олигоклон анти-IL6 выбирался на основании способности *in vitro* и *in vivo*, в соответствии с определенным выше. Гены V<sub>H</sub> мыши гуманизировались в соответствии со стандартными методами и объединялись с полностью легкой цепью IGKV1-39 человека в экспрессионном векторе, в соответствии с описанным выше. Примеры методов гуманизации включают методы, основанные на таких парадигмах,  
40 как ремоделирование (Padlan, E. A., et al., (1991). Mol. Immunol., 28, 489), сверхгуманизация (Tan, P. D. A., et al., (2002) J. Immunol., 169, 1119) и оптимизация содержания последовательностей человека (Lazar, G. A., et al., (2007). Mol. Immunol., 44, 1986). Три конструкции трансфицировались в клетки PER.C6 в заранее определенном оптимальном соотношении (описано выше) под селективным давлением G418 в соответствии со  
45 стандартными методами. Отбирался имеющий стабильно высокое продуцирование клон олигоклонов анти-IL6, и создавался банк квалифицированных базовых клеток.

## Список праймеров

Таблица 1.

DO-	праймер	последовательность
0012	CH1_Rev1	TGCCAGGGGGGAAGACCGATG
0656	MVH-1	GCCGGCCATGGCCGAGGTRMAGCTTCAGGAGTCAGGAC
0657	MVH-2	GCCGGCCATGGCCGAGGTSACAGCTKCAGCAGTCAGGAC
0658	MVH-3	GCCGGCCATGGCCGAGGTGCAGCTGAAGSASTCAGG
0659	MVH-4	GCCGGCCATGGCCGAGGTGCAGCTTCAGGAGTCSGGAC
0660	MVH-5	GCCGGCCATGGCCGARGTCCAGCTGCAACAGTCYGGAC
0661	MVH-6	GCCGGCCATGGCCGAGGTCCAGCTKCAGCAATCTGG
0662	MVH-7	GCCGGCCATGGCCGAGSTBCAGCTGCAGCAGTCTGG
0663	MVH-8	GCCGGCCATGGCCGAGGTYCAGCTGCAGCAGTCTGGRC
0664	MVH-9	GCCGGCCATGGCCGAGGTYCAGCTYCAGCAGTCTGG
0665	MVH-10	GCCGGCCATGGCCGAGGTCCARCTGCAACAATCTGGACC
0666	MVH-11	GCCGGCCATGGCCGAGGTCCACGTGAAGCAGTCTGGG
0667	MVH-12	GCCGGCCATGGCCGAGGTGAASSTGGTGAATCTG
0668	MVH-13	GCCGGCCATGGCCGAVGTGAAGYTGGTGGAGTCTG
0669	MVH-14	GCCGGCCATGGCCGAGGTGCAGSKGGTGGAGTCTGGGG
0670	MVH-15	GCCGGCCATGGCCGAKGTGCAMCTGGTGGAGTCTGGG
0671	MVH-16	GCCGGCCATGGCCGAGGTGAAGCTGATGGARTCTGG
0672	MVH-17	GCCGGCCATGGCCGAGGTGCARCTTGTTGAGTCTGGTG
0673	MVH-18	GCCGGCCATGGCCGARGTRAAGCTTCTCGAGTCTGGA
0674	MVH-19	GCCGGCCATGGCCGAGTGAARSTTGAGGAGTCTGG
0675	MVH-20	GCCGGCCATGGCCGAGTGATGCTGGTGGAGTCTGGG
0676	MVH-21	GCCGGCCATGGCCGAGGTACTCTRAAAGWGTSTGGCC
0677	MVH-22	GCCGGCCATGGCCGAGGTCCAACIVCAGCARCCTGG
0678	MVH-23	GCCGGCCATGGCCGAGGTYCARCTGCAGCAGTCTG
0679	MVH-24	GCCGGCCATGGCCGATGTGAACITGGAAGTGTCTGG

0680	MVH-25	GCCGGCCATGGCCGAGGTGAAGTCAICGAGTCTGG
0681	ExtMVH-1	CAGTCACAGATCCTCGCGAATTGGCCAGCCGGCCATGGCCSANG
0682	ExtMVH-2	CAGTCACAGATCCTCGCGAATTGGCCAGCCGGCCATGGCCSANC
0683	MJH-Rev1	GGGGGTGTCGTTTTGGCTGAGGAGAC GGTGACC GTGG
0684	MJH-Rev2	GGGGGTGTCGTTTTGGCTGAGGAGAC TGTGAGA GTGG
0685	MJH-Rev3	GGGGGTGTCGTTTTGGCTGCAGAGAC AGTGACC AGAG
0686	MJH-Rev4	GGGGGTGTCGTTTTGGCTGAGGAGAC GGTGACT GAGG
0687	ExtMJH-	GGGGGTGTCGTTTTGGCTGAGGAGAC GGTGACC GTGG
0688	ExtMJH-	GGGGGTGTCGTTTTGGCTGAGGAGAC GGTGACA GTGG
0690	ExtMJH-	GGGGGTGTCGTTTTGGCTGAGGAGAC GGTGACC AGAG
0691	ExtMJH-	GGGGGTGTCGTTTTGGCTGAGGAGAC GGTGACC GAGG

Таблица 2.

Уровни сигналов ELISA для фагов, измеренные для 450 нм. ТТ-покрытые планшеты представляют собой планшеты, которые были покрыты столбнячным токсином. В качестве отрицательного контроля использовались планшеты, покрытые тироглобулином. 10/10 и 15/15 указывают количество этапов промывания PBS-Твеем во время процедур пэннинга. Планшеты с 10/10 столбнячным токсином и 10/10 тироглобулином, а также с 15/15 столбнячным токсином и 15/15 тироглобулином, являются копиями друг друга, за исключением покрывающего агента. OD-значения, в 3 раза превышающие фоновые, считаются специфичными.

ТТ-покрытый планшет, промывания 10/10

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.139	0.093	0.089	0.121	0.117	0.598	0.146	0.115	0.18	0.155	0.543	0.601
B	0.136	0.404	0.159	0.187	0.489	0.134	0.216	0.092	0.222	0.108	0.181	0.484
C	0.197	0.526	0.09	0.213	0.395	0.155	0.108	0.12	0.183	0.136	0.092	0.866
D	0.143	0.258	0.101	0.422	0.088	0.243	0.485	0.251	0.304	0.198	0.478	0.091
E	0.445	0.169	0.528	0.481	0.206	0.285	0.111	0.119	0.128	0.2	0.118	0.098
F	0.237	0.291	0.594	0.139	0.206	0.585	0.543	0.091	0.136	0.227	0.228	0.099
G	0.459	0.102	0.152	0.859	0.203	0.452	0.152	0.133	0.094	0.102	0.375	0.098
H	0.341	0.623	0.745	0.415	0.682	0.527	0.655	0.114	0.258	0.284	0.685	0.113

ТТ-покрытый планшет, промывания 15/15

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.247	0.582	0.421	0.428	0.133	0.082	0.282	0.079	0.343	0.414	0.095	0.292
B	0.065	0.364	0.073	0.042	0.049	0.071	0.046	0.103	0.078	0.057	0.048	0.153
C	0.081	0.044	0.066	0.082	0.225	0.444	0.203	0.382	0.122	0.047	0.052	0.309
D	0.082	0.11	0.59	0.22	0.33	0.544	0.058	0.159	0.047	0.174	0.088	0.05
E	0.489	0.577	0.206	0.304	0.13	0.749	0.431	0.062	0.167	0.049	0.056	0.049
F	0.846	0.07	0.561	0.656	0.882	0.094	0.383	0.13	0.152	0.098	0.134	0.048
G	0.537	0.052	0.49	0.105	0.337	0.193	0.514	0.294	0.068	0.35	0.525	0.05
H	0.061	0.306	0.157	0.853	0.054	0.534	0.102	0.235	0.441	0.412	0.565	0.061

Покрытый тироглобулином планшет, промывания 10/10

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.047	0.051	0.045	0.043	0.051	0.044	0.046	0.042	0.047	0.048	0.049	0.05
B	0.042	0.042	0.042	0.042	0.043	0.041	0.041	0.042	0.043	0.045	0.042	0.046
C	0.044	0.043	0.043	0.044	0.043	0.044	0.043	0.042	0.043	0.041	0.044	0.046
D	0.045	0.044	0.044	0.044	0.045	0.046	0.045	0.056	0.045	0.049	0.048	0.73
E	0.046	0.045	0.048	0.044	0.045	0.044	0.044	0.044	0.047	0.046	0.047	0.926
F	0.048	0.045	0.044	0.046	0.044	0.043	0.044	0.046	0.048	0.046	0.046	0.792
G	0.051	0.048	0.045	0.045	0.044	0.043	0.048	0.045	0.048	0.051	0.045	0.053
H	0.064	0.05	0.049	0.047	0.05	0.051	0.047	0.046	0.047	0.047	0.047	0.056

Покрытый тироглобулином планшет, промывания 15/15

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.038	0.049	0.045	0.044	0.046	0.047	0.046	0.042	0.042	0.043	0.042	0.041
B	0.045	0.042	0.041	0.043	0.043	0.043	0.045	0.045	0.047	0.048	0.044	0.045
C	0.049	0.047	0.047	0.046	0.046	0.046	0.045	0.047	0.046	0.045	0.045	0.052
D	0.047	0.049	0.048	0.048	0.048	0.048	0.047	0.052	0.048	0.046	0.048	0.456
E	0.049	0.047	0.047	0.047	0.047	0.049	0.047	0.048	0.047	0.046	0.048	0.412
F	0.05	0.047	0.046	0.046	0.046	0.046	0.046	0.046	0.046	0.047	0.048	0.528
G	0.05	0.048	0.045	0.045	0.046	0.049	0.048	0.046	0.053	0.049	0.05	0.057
H	0.057	0.05	0.046	0.045	0.047	0.049	0.047	0.047	0.046	0.047	0.053	0.048

Таблица 3.

Анализ белковых последовательностей положительных, согласно ELISA, связывателей столбнячного токсина. Указаны последовательность CDR3, длина CDR3, члены VH-семейства и конкретные названия, JH-происхождение и DH-происхождение клонов.

CDR3	длина CDR3	VH	DH	JH	семейство V-генов
HGAYTYDEKAWFAY	15	musIGHV192	DSP2.11	JH3 мыши	VH7183
HGAYTYDEKAWFAY	15	musIGHV192	DSP2.11	JH3 мыши	VH7183
HGAYTYDEKAWFAY	15	musIGHV192	DSP2.11	JH3 мыши	VH7183
HGAYTYDEKAWFAY	15	musIGHV192	DSP2.11	JH3 мыши	VH7183
HGAYTYDEKAWFAY	15	musIGHV192	DSP2.11	JH3 мыши	VH7183
HGAYTYDEKAWFAY	15	musIGHV192	DSP2.11	JH3 мыши	VH7183
HGAYTYDEKAWFAY	15	musIGHV192	DSP2.11	JH3 мыши	VH7183
HGAYTYDEKAWFAY	15	musIGHV192	DSP2.11	JH3 мыши	VH7183
HGAFYTYDEKPFAY	15	musIGHV192	IGHD2-14*01	JH3 мыши	VH7183
HISYYRYDEEVSFAY	15	musIGHV192	IGHD2-14*01	JH3 мыши	VH7183
HISYYRYDEEVSFAY	15	musIGHV192	IGHD2-14*01	JH3 мыши	VH7183
GWRAFAY	7	musIGHV131	DSP2.9	JH3 мыши	VH7183
GWRAFAY	7	musIGHV131	DSP2.9	JH3 мыши	VH7183
GWRAFAY	7	musIGHV131	DSP2.9	JH3 мыши	VH7183
DRGNYYGMDY	10	musIGHV178	DSP2.1	JH4 мыши	VH7183
LGDIYYDWFAY	12	musIGHV165	DFL16.1	JH1 мыши	VH7183

NFPAWFAP	8	musIGHV547	DST4.3inv	JH3 МЫШИ	VJH558
NFPAWFAY	8	musIGHV547	DSP2.1	JH3 МЫШИ	VJH558
NFPAWFVY	8	musIGHV547	DSP2.1	JH3 МЫШИ	VJH558
SFTPVPFYGYDWYFDV	17	musIGHV532	DSP2.3	JH1 МЫШИ	VJH558
SFTPVPFYGYDWYFDV	17	musIGHV532	DSP2.3	JH1 МЫШИ	VJH558
SDYDWYFDV	9	musIGHV286	DSP2.2	JH1 МЫШИ	VJH558
SDYDWYFDV	9	musIGHV286	DSP2.2	JH1 МЫШИ	VJH558
DSKWAYYFDY	10	musIGHV532	DST4.3	JH2 МЫШИ	VJH558
GDYTGYGMDY	10	musIGHV125	DSP2.13	JH4 МЫШИ	VHSM7
GDYTGYGMDY	10	musIGHV125	DSP2.13	JH4 МЫШИ	VHSM7
GGYDGYWFPY	10	musIGHV125	DSP2.9	JH3 МЫШИ	VHSM7

Таблица 4.

Комбинации векторов, которые трансфицировались в клетки HEK293T.

код	HC-вектор	LC-вектор	комбинированный вектор	название препарата	концентрация (мкг/мл)
A	x	0817676_pSELECT_ 0815426 (IGKV1-39)	x	PIGKV1-39/P1	-
B	x	0817678_pSELECT_ 0815427 (IGLV2-14)	x	PIGKV2-14/P1	-
C	MV1110	0817676_pSELECT_ 0815426 (IGKV1-39)	x	PMV1110/ IGKV1-39/P1	11,0
D	MV1110	0817678_pSELECT_ 0815427 (IGLV2-14)	x	PMV1110/ IGLV2-14/P1	15,4
E	x	x	MG1494	MG1494/P2	16,1

Таблица 5

Аллотипы HLA, рассмотренные в профилировании ТН-эпитопа. Показаны соответствующие серотипы, а также частоты аллотипов в популяции белой расы (Klitz et al. Tissue Antigens 2003, 62:296-307; Gjertson and Terasake (eds) in: HLA 1997; Gjertson and Terasake (eds) in: HLA 1998; Castelli et al. J. Immunol. 2002, 169:6928-6934). Сумма частот может составлять более 100%, поскольку каждый индивидуум имеет 2 аллеля для каждого гена. Если бы были известны все частоты аллелей для одного гена, то их сумма составила бы немного менее 200% из-за гомозиготных индивидуумов.

тип HLA	серотип	популяция, %	тип HLA	серотип	популяция, %
DRB1*0101	DR1	17.4	DRB4*0103	DR53	21
DRB1*0102	DR1	4.9	DRB5*0101	DR51	15.8
DRB1*0301	DR17(3)	21.2	DRB5*0202	DR51	5.7
DRB1*0401	DR4	11.5	DQA1*0101/DQB1*0501	DQ5(1)	20.5
DRB1*0402	DR4	3.1	DQA1*0102/DQB1*0502	DQ5(1)	2.6
DRB1*0404	DR4	5.5	DQA1*0102/DQB1*0602	DQ6(1)	26.5
DRB1*0405	DR4	2.2	DQA1*0102/DQB1*0604	DQ6(1)	6.7
DRB1*0407	DR4	<2	DQA1*0103/DQB1*0603	DQ6(1)	11
DRB1*0701	DR7	23.4	DQA1*0104/DQB1*0503	DQ5(1)	4
DRB1*0801	DR8	3.3	DQA1*0201/DQB1*0202	DQ2	20.9
DRB1*0802	DR8	<2	DQA1*0201/DQB1*0303	DQ9(3)	7.2
DRB1*0901	DR9	<2	DQA1*0301/DQB1*0301	DQ7(3)	12.5
DRB1*1101	DR11(5)	17	DQA1*0301/DQB1*0302	DQ8(3)	18.3
DRB1*1104	DR11(5)	5.7	DQA1*0401/DQB1*0402	DQ4	4.5
DRB1*1201	DR12(5)	3.1	DQA1*0501/DQB1*0201	DQ2	24.6
DRB1*1301	DR13(6)	15.4	DQA1*0501/DQB1*0301	DQ7(3)	20.9
DRB1*1302	DR13(6)	10.8	DPA1*0103/DPB1*0201	DPw2	19.9
DRB1*1401	DR14(6)	4.2	DPA1*0103/DPB1*0401	DPw4	65.1
DRB1*1501	DR15(2)	13.2	DPA1*0103/DPB1*0402	DPw4	24.3
DRB1*1601	DR16(2)	5.5	DPA1*0201/DPB1*0101	DPw1	6.3
DRB3*0101	DR52	24.6	DPA1*0201/DPB1*0301	DPw3	<2
DRB3*0202	DR52	43	DPA1*0201/DPB1*0501	DPw5	<2
DRB3*0301	DR52	10	DPA1*0201/DPB1*0901	-	2.4
DRB4*0101	DR53	25.5			



Таблица 6.

Количество T<sub>H</sub>-эпитопов для IGKV1-39. Пептиды, связывающиеся с множеством HLA из одной и той же группы (DRB1, DRB3/4/5, DP, DQ), считались как один. Значения в скобках относятся к пептидам, фильтрованным по зародышевой линии.

	DRB1		DRB3/4/5		DQ		DP	
	сильное связывание	среднее связывание	сильное связывание	среднее связывание	сильное связывание	среднее связывание	сильное связывание	среднее связывание
Merus IGKV1-39	0 (+6)	0 (+16)	0 (+0)	0 (+5)	0 (+3)	0 (+9)	0 (+0)	0 (+9)

Таблица 7

Картирование EpiBase®-предсказаний для Merus IGKV1-39 в классическом пептидном формате 15-меров. В данной таблице показано количество аллотипов для критических эпитопов и вовлеченных серотипов для каждого из 15-меров, охватывающих последовательность Merus IGKV1-39.

15-мер	начальная позиция	последовательность 15-мера	количество аллотипов	предполагаемые серотипы
1	1	DIQMTQSPSSLSASV	6	DR1, DR4, DR7, DR9
2	4	MTQSPSSLSASVGD	5	DR1, DR4, DR9
3	7	SPSSLSASVGDRTI	0	
4	10	SLSASVGDRTITCR	0	
5	13	ASVGDRTITCRASQ	0	
6	16	GDRVTITCRASQSI	2	DR11(5), DR7
7	19	VTITCRASQSISSYL	4	DQ2, DR11(5), DR4, DR7
8	22	TCRASQSISSYLNWY	2	DQ2, DR4
9	25	ASQSISSYLNWYQOK	5	DR13(6), DR15(2), DR4
10	28	SISSYLNWYQOKPK	8	DR12(5), DR13(6), DR15(2), DR16(2), DR4, DR8
11	31	SYLNWYQOKPKAPK	10	DR1, DR12(5), DR16(2), DR4, DR51, DR8
12	34	NWYQOKPKAPKLLI	9	DR1, DR15(2), DR4, DR51, DR8
13	37	QOKPKAPKLLIYAA	7	DQ4, DR1, DR11(5), DR15(2), DR51, DR8
14	40	PKAPKLLIYAASSL	7	DQ4, DR1, DR11(5), DR4, DR8
15	43	APKLLIYAASSLQSG	15	DR1, DR11(5), DR12(5), DR13(6), DR14(6), DR15(2), DR4, DR51, DR8, DR9
16	46	LLIYAASSLQSGVPS	15	DR1, DR11(5), DR12(5), DR13(6), DR14(6), DR15(2), DR4, DR51, DR8, DR9
17	49	YAASSLQSGVPSRFS	1	DR15(2)
18	52	SSLQSGVPSRFSGSG	1	DR15(2)
19	55	QSGVPSRFSGSGSGT	0	
20	58	VPSRFSGSGSGTDF	0	
21	61	RFSGSGSGTDFTLTI	0	
22	64	GSGSGTDFTLTISSL	1	DR52
23	67	SGTDFTLTISSLOPE	4	DR4, DR52, DR7, DR9
24	70	DFTLTISSLQPEDFA	4	DQ2, DR4, DR7, DR9
25	73	LTISSLQPEDFATYY	1	DQ2
26	76	SSLQPEDFATYYCQQ	0	
27	79	QPEDFATYYCQSYS	1	DR4
28	82	DFATYYCQSYSSTPP	5	DR4, DR51, DR7
29	85	TYCQSYSSTPPTFG	4	DR4, DR51, DR7
30	88	CQSYSSTPPTFGQGT	0	
31	91	SYSTPPTFGQGTKVE	0	
32	94	TPPTFGQGTKVELR	0	

Таблица 8:

V<sub>H</sub>-ген из PG1433, спаренный с генами легкой цепи с различными  
 5 степенями аминокислотных мутаций, сравнивался по уровням  
 продукции с исходным клоном, содержащим ген IGKV1-39.

название IgG	ген легкой цепи	количество аминокислотных мутаций	концентрация (мкг/мл)
PG1433	1-39	0	63, 45,5, 38,6 (среднее=49)
PG1631	1-12	4	10,5
PG1632	1-27	7	9,3
PG1634	1D-12	10	10,8
PG1635	1D-33	6	10,2
PG1642	1-5	8	7,1
PG1644	1-9	3	7,8
PG1650	1D-39	3	9,1
PG1652	2D-28	3	7,1
PG1653	3-15	14	7
PG1654	3-20	2	5,2
PG1674	1-40	7	8,2
PG1678	2-11	2	8,1
PG1680	2-14	15	10,8
PG1682	3-1	13	9,9
PG1683	6-57	6	13,9

Таблица 9.

Параметры стабильности для стабильных клонов, содержащих ген IGKV1-39 зародышевой линии.

5

субКЛОН	дней культивирования до начала пробы-та партии	сред. pdt за предшествующие 14 дней			партия, взятая после дублирования популяции	Максимальная плотность живых клеток (x10 <sup>6</sup> клеток/мл)		IVC при максимальной концентрации LgG (10 <sup>6</sup> клеток/чл)		qAb (пг/клетки/день)		максимальная концентрация LgG (мг/л)		корреляция TF	корреляция FH	корреляция TH
		± SD	% сред.	% сред.		% сред.	% сред.	% сред.	% сред.	% сред.	% сред.					
B38,1	21	35	5,1	99	15	3	91	530	92	9,5	97	122	79	0,99	0,95	0,92
	40	41	1,3	115	31	3,7	112	568	99	10,5	107	188	122	1	0,99	0,99
	79	36	0,2	101	62	3,2	97	627	109	9,4	96	154	100	0,97	0,99	0,96
сред.		36				3,3		575		9,8		155				
B38,4	21	35	1	101	15	2,2	114	424	134	14,2	116	141	127	1	0,96	0,97
	40	35	0,3	97	29	1,9	98	247	78	12,5	102	96	86	1	1	1
	79	34	0,2	99	59	1,7	88	278	88	9,9	81	97	87	0,99	1	0,99
сред.		35				1,9		316		12,2		111				
B38,15	21	35	1,6	106	16	2,5	90	497	101	7,9	89	97	93	0,99	0,95	0,93
	40	32	0,3	97	30	3,7	134	557	114	7,3	91	114	109	1	0,97	0,97
	79	31	0,2	94	63	2,1	76	415	85	8,8	110	102	98	0,96	0,96	0,99
сред.		33				2,8		490		8		104				
B38,30	21	38	9,2	97	15	1,6	81	335	89	14,5	112	100	71	0,99	1	0,99
	40	51	2,7	131	30	2,7	137	472	125	13,9	107	206	147	1	0,99	0,99
	79	40	0,7	103	64	1,6	81	325	86	10,6	82	114	81	0,98	0,98	0,99
сред.		39				2,0		377		13		140				
B224,18	23	34	2,6	100	17	3,1	103	507	103	15,8	98	208	81	1	0,99	0,99
	42	37	0,7	109	33	3,6	120	575	117	18,1	112	318	124	1	0,94	0,95
	81	34	0,2	100	63	2,3	77	393	80	14,6	90	244	95	1	1	0,99
сред.		34				3,0		492		16,2		257				
B224,47	23	32	0,4	102	17	3,5	98	695	109	22,5	114	387	122	0,99	0,93	0,89
	42	33	0,3	105	31	3,6	101	578	91	20	101	357	112	0,99	0,92	0,95
	81	31	0,2	98	64	3,6	101	634	100	16,8	85	209	66	1	0,99	0,99
сред.		32				3,6		636		19,8		318				
B224,53	23	33	0,5	100	17	3,9	110	553	99	20,6	102	372	114	0,98	0,82	0,85
	42	32	0,4	97	33	3,7	105	605	108	24,3	121	379	116	0,98	0,88	0,94
	81	33	0,1	100	63	3	85	525	94	15,4	77	231	71	0,99	0,89	0,94
сред.		33				3,5		561		20,1		327				
B224,59	23	36	0,6	104	16	4,3	115	750	107	16,4	106	301	104	0,99	0,78	0,84
	42	34	0,2	99	30	4,4	118	779	111	14,6	95	344	119	0,98	0,92	0,96
	81	33	0,3	96	61	2,5	67	583	83	15,2	99	224	77	0,97	0,99	0,96
сред.		35				3,7		704		15,4		290				

20

Таблица 9. (продол.)

Параметры стабильности для стабильных клонов, содержащих ген IGKV1-39 зародышевой линии.

25

B280,3	23	34	0,8	105	17	4,3	105	840	108	13	109	293	117	0,99	0,98	0,95
	42	32	0,4	98	33	4	98	841	108	12,3	103	292	116	0,99	0,98	0,98
	81	31	0,1	95	67	4	98	660	85	10,5	88	169	67	0,99	0,98	1
сред.		33				4,1		780		11,9		251				
B280,12	23	36	1,7	104	15	2	72	426	77	5,8	95	64	81	0,98	0,98	0,98
	42	37	0,7	107	30	3,2	116	673	122	6,2	101	96	121	1	0,97	0,97
	81	33	0,2	96	64	3,1	112	552	100	6,4	104	78	98	0,98	0,98	0,98
сред.		35				2,8		550		6,1		79				
B280,21	23	32	0,6	102	18	3,1	103	550	97	9,1	128	112	93	0,97	0,92	0,93
	42	31	0,4	98	34	3,4	113	589	104	3,6	51	137	113	1	0,98	0,99
	81	31	0,4	98	66	2,5	83	566	100	8,6	121	114	94	0,97	0,99	1
сред.		32				3,0		568		7,1		121				
B280,36	23	33	1	99	17	3	81	596	75	10	186	143	156	1	0,99	0,98
	42	36	0,5	107	30	4,6	124	1168	146	5,6	104	124	135	1	0,98	0,97
	81	34	0,3	101	62	3,5	95	635	79	0,56	10	8	9	0,97	0,98	1
сред.		34				3,7		800		5,4		92				

35

40

45

Таблица 10.

Смеси антител, используемые для окрашивания популяций лимфоцитов.  
 BM = костный мозг, PC = брюшная полость, PP = пейеровы бляшки.

	Окрашивания			Рабочее разведение	Смеси				итоговое разведение
	#	Фас - трубы #	Моноклональные		объем	первый этап	второй этап	третий этап	
<b>А</b>									
Селезенка	<b>1</b>	1-8	CD21 <sup>FITC</sup>	640	320		0.50		
			Скаппа крысы <sup>PE</sup>	160		2.00			
			CD19 <sup>PerCP-Cy5.5</sup>	640			0.50		
			CD23 <sup>PE-Cy7</sup>	50	<b>1:20</b>		<b>6.40</b>		1000
			DAPI						
			Скаппа мыши <sup>BIO-APC</sup>	100	<b>1:50</b>		<b>3.20 APC</b>		5000
			Слямбда мыши <sup>BIO-APC</sup>	100	<b>1:30</b>		<b>3.20 APC</b>		3000
			B220 <sup>Alex-700</sup>	160			2.00		
			FC-блок	400			0.80		
Селезенка	<b>2</b>	9-16	IgD <sup>FITC</sup>	640	640		1.00		
BM		17-24	Скаппа крысы <sup>PE</sup>	160		4.00			
			CD19 <sup>PerCP-Cy5.5</sup>	500			1.28		
			IgM <sup>PE-Cy7</sup>	640			1.00		
			DAPI						
			Скаппа мыши <sup>BIO-APC</sup>	100	<b>1:50</b>		<b>6.40 APC</b>		5000
			Слямбда мыши <sup>BIO-APC</sup>	100	<b>1:30</b>		<b>6.40 APC</b>		3000
			B220 <sup>Alex-700</sup>	160			4.00		
			FC-болк	400			1.60		
Селезенка	<b>3</b>	25-32	Скаппа мыши <sup>FITC</sup>	400	320		0.80		
			Скаппа крысы <sup>PE</sup>	160		2.00			
			CD19 <sup>PerCP-Cy5.5</sup>	500			0.64		
			IgM <sup>PE-Cy7</sup>	640			0.50		
			DAPI						
			Слямбда мыши <sup>BIO-APC</sup>	100	<b>1:30</b>		<b>3.20 APC</b>		3000
			B220 <sup>Alex-700</sup>	160			2.00		
			FC-болк	400			0.80		
Селезенка	<b>4</b>	33-40	Скаппа мыши <sup>FITC</sup>	400	640		1.60		
		41-48	лямбда <sup>FITC</sup>	600			1.07		
PP			Скаппа крысы <sup>PE</sup>	160		4.00			
			CD19 <sup>PerCP-Cy5.5</sup>	500			1.28		

Таблица 10 (продол.)

Смеси антител, используемые для окрашивания популяций лимфоцитов.  
 BM = костный мозг, PC = брюшная полость, PP = пейеровы бляшки.

			IgM <sup>PE-Cy7</sup>	640			1.00	
			DAPI					
			IgD <sup>A647</sup>	1280			0.50	
			B220 <sup>Alex-700</sup>	160			4.00	
			PNA <sup>BIO-SAV-APC-Cy7</sup>	300			2.13	APC-Cy7
			FC-блок	400			1.60	
PC	5	49-56	IgM <sup>FITC</sup>	160		320	2.00	
			Скаппа крысы <sup>PE</sup>	160			2.00	
			CD19 <sup>PerCP-Cy5.5</sup>	500			0.64	
			Скаппа мыши <sup>BIO-PE-Cy7</sup>	100	1:50		3.20	PE-Cy7 5000
			Слямбда мыши <sup>BIO-PE-Cy7</sup>	100	1:30		3.20	PE-Cy7 3000
			DAPI					
			CD5 <sup>APC</sup>	320			1.00	
			B220 <sup>Alex-700</sup>	160			2.00	
			FC-блок	400			0.80	
BM	6	57-64	IgM <sup>FITC</sup>	160		640	4.00	
			Скаппа крысы <sup>PE</sup>	160			4.00	
			CD19 <sup>PerCP-Cy5.5</sup>	500			1.28	
			Скаппа мыши <sup>BIO-PE-Cy7</sup>	100	1:50		6.40	PE-Cy7 5000
			Слямбда мыши <sup>BIO-PE-Cy7</sup>	100	1:30		6.40	PE-Cy7 3000
			DAPI					
			CD25 <sup>APC</sup>	80			8.00	
			B220 <sup>Alex-700</sup>	160			4.00	
			FC-блок	400			1.60	
<hr/>								
			Селезенка крысы					
	7	144	Скаппа крысы <sup>PE</sup>	160		80	0.5	
			rat B220 <sup>FITC</sup>	160			0.5	
Селезенка	8	97-104	cyt CD3 <sup>FITC</sup>	320		320	1	
			cyt Скаппа крысы <sup>PE</sup>	80			4.00	
			cyt CD11c <sup>PE-TexasRED</sup>	75			4.27	
			cyt NK1.1 <sup>BIO-PE-Cy7</sup>	200			1.6	PE-Cy7
			cyt CD19 <sup>PerCP-Cy5.5</sup>	320			1	
			cyt CD4 <sup>APC</sup>	500			0.64	
			cyt CD11b <sup>Alex-700</sup>	50			6.40	

Количество лимфоцитов, собранных из костного мозга и селезенки  
мышей дикого типа и трансгенных мышей.

КОСТНЫЙ МОЗГ			
	*10 <sup>6</sup> клеток/мл	общий объем (мл)	общее количество клеток *10 <sup>6</sup>
Wt	18,82	5,05	95,0
wt	19,24	4,96	95,4
CD19-Cre	23,42	5,08	119,0
CD19-Cre	20,58	4,82	99,2
CD19-Cre	25,77	5,15	132,7
CD19-Cre/HuVkl	17,71	5,06	89,6
CD19-Cre/HuVkl	12,60	5,33	67,2
CD19-Cre/HuVkl	18,13	5,27	95,5
селезенка			
	*10 <sup>6</sup> клеток/мл	общий объем (мл)	общее количество клеток *10 <sup>6</sup>
Wt	41,70	5,36	223,5
wt	37,85	4,71	178,3
CD19-Cre	60,19	3,77	226,9
CD19-Cre	35,06	3,66	128,3
CD19-Cre	80,69	4,60	371,2
CD19-Cre/HuVkl	51,67	4,48	231,5
CD19-Cre/HuVkl	58,80	6,24	366,9
CD19-Cre/HuVkl	24,37	6,25	152,3

(57) Формула изобретения

1. Применение трансгенного млекопитающего, относящегося к мышам или крысам, для получения антител,

где млекопитающее содержит интегрированную в геном молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую перестроенную вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина человека, функционально связанную с промотором, который обеспечивает экспрессию легкой цепи, содержащей указанную трансгенную

5 вариабельную область легкой цепи в В-клетках,

где указанная легкая цепь способна образовывать пары по крайней мере с двумя различными тяжелыми цепями, кодируемыми млекопитающим, относящимся к мышам или крысам, при этом сохраняя разнообразие специфичности антител посредством перестроек и гипермутаций в тяжелых цепях, и

10 где указанная легкая цепь дополнительно содержит константную область легкой цепи животного.

2. Применение по п.1, где указанные антитела направлены против клеточных мишеней.

3. Применение по п.2, где указанные клеточные мишени представляют собой белки, экспрессированные на клеточной поверхности, или растворимые белки или молекулы

15 углеводов человека.

4. Применение по п.2, где указанными клеточными мишенями являются белки, экспрессированные на поверхности, или молекулы углеводов, которые экспрессируются на поверхности бактерий, вирусов и других патогенов, в частности человека.

20 5. Применение по п.2 или 3, где указанные мишени включают цитокины и хемокины, рецепторные молекулы цитокинов и хемокинов, рецепторы суперсемейства иммуноглобулинов (Ig), семейство рецепторов фактора некроза опухоли, рецепторы серин/треониновой протеинкиназы, рецепторы тирозинкиназы, членов семейства рецепторов EGF, членов семейства инсулиновых рецепторов, членов семейства

25 рецепторов PDGF, членов семейства рецептора фактора роста гепатоцитов, членов семейства рецепторов Trk, членов семейства рецепторов AXL, членов семейства рецепторов LTK, членов семейства рецепторов TIE, членов семейства рецепторов ROR, членов семейства рецепторов DDR, членов семейства рецепторов KLG, членов семейства

30 рецепторов RYK, членов семейства рецепторов MuSK и членов семейства рецепторов фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR).

6. Применение по п.5, где антитела нацелены на мишени, которые сверхэкспрессированы или селективно экспрессированы в опухолях.

7. Применение по п.6, где мишенями являются VEGF, CD20, CD38, CD33, CEA, EpCAM, PSMA, CD54, Lewis Y, CD52, CD40, CD22, CD51/CD61, CD74, MUC-1, CD38, CD19, CD262

35 (TRAIL-R2), RANKL, CTLA4 и CD30.

8. Применение по п.5, где антитела нацелены на мишени, которые вовлечены в хроническое воспаление.

9. Применение по п.8, где мишенями являются CD25, CD11a, TNF, CD4, CD80, CD23, CD3, CD14, IFNгамма, CD40L, CD50, CD122, TGFбета и TGFальфа.

40 10. Применение по п.2 или 4, где указанные мишени включают поверхностные маркеры вирусов гриппа А и В, такие как гемагглютинин (HA) и нейраминидаза (NA), филовирусы, такие как вирусы Эбола, бешенства, кори, краснухи, инфекционного паротита, флавивирусы, такие как вирусы Денге типов 1-4, вирус клещевого энцефалита, вирус Западного Нила, вирус японского энцефалита и вирус желтой лихорадки,

45 парамиксовирусы, включая парамиксовирус, такой как парагрипп 1, 3, рубулавирис, такой как вирус инфекционного паротита и парагриппа 2, 4, вирус кори и пневмовирус, такие как респираторный синцитальный вирус, коровья оспа, натуральная оспа, коронавирусы, включая вирус тяжелого острого респираторного синдрома (SARS),

вирус гепатита А, В и С, вирус иммунодефицита человека, вирусы герпеса, включая цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Барра, вирус простого герпеса и вирус ветряной оспы, парвовирусы, такие как, например, B19; *Legionella pneumophila*; *Listeria monocytogenes*; *Campylobacter jejuni*; *Staphylococcus aureus*; *E. coli* O157:H7; *Borrelia burgdorferi*; *Helicobacter pylori*; *Ehrlichia chaffeensis*; *Clostridium difficile*; *Vibrio cholera*; *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium; *Bartonella henselae*; *Streptococcus pyogenes* (стрептококк группы А); *Streptococcus agalactiae* (стрептококк группы В); *S. aureus* с множественной лекарственной резистентностью (например, MRSA); *Chlamydia pneumoniae*; *Clostridium botulinum*; *Vibrio vulnificus*; *Parachlamydia pneumoniae*; *Corynebacterium amycolatum*; *Klebsiella pneumoniae*; устойчивые к линезолиду энтерококки (*E. faecalis* и *E. faecium*); и *Acinetobacter baumannii* с множественной лекарственной резистентностью.

11. Применение по любому из пп.1-10, где молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие по меньшей мере часть указанных полученных антител, являются выделенными, и где указанные молекулы нуклеиновых кислот, или их копии, или их производные находятся в экспрессионных кассетах и экспрессируют указанные антитела в клетках-хозяевах.

12. Применение по любому из пп.1-10, где полученные антитела составляют основу смесей антител, полученных клональными клетками.

13. Применение по п.12, где антитела содержат антитела, направленные против различных эпитопов по крайней мере на одной мишени.

14. Применение по п.12, где антитела содержат антитела, направленные против различных мишеней.

25

30

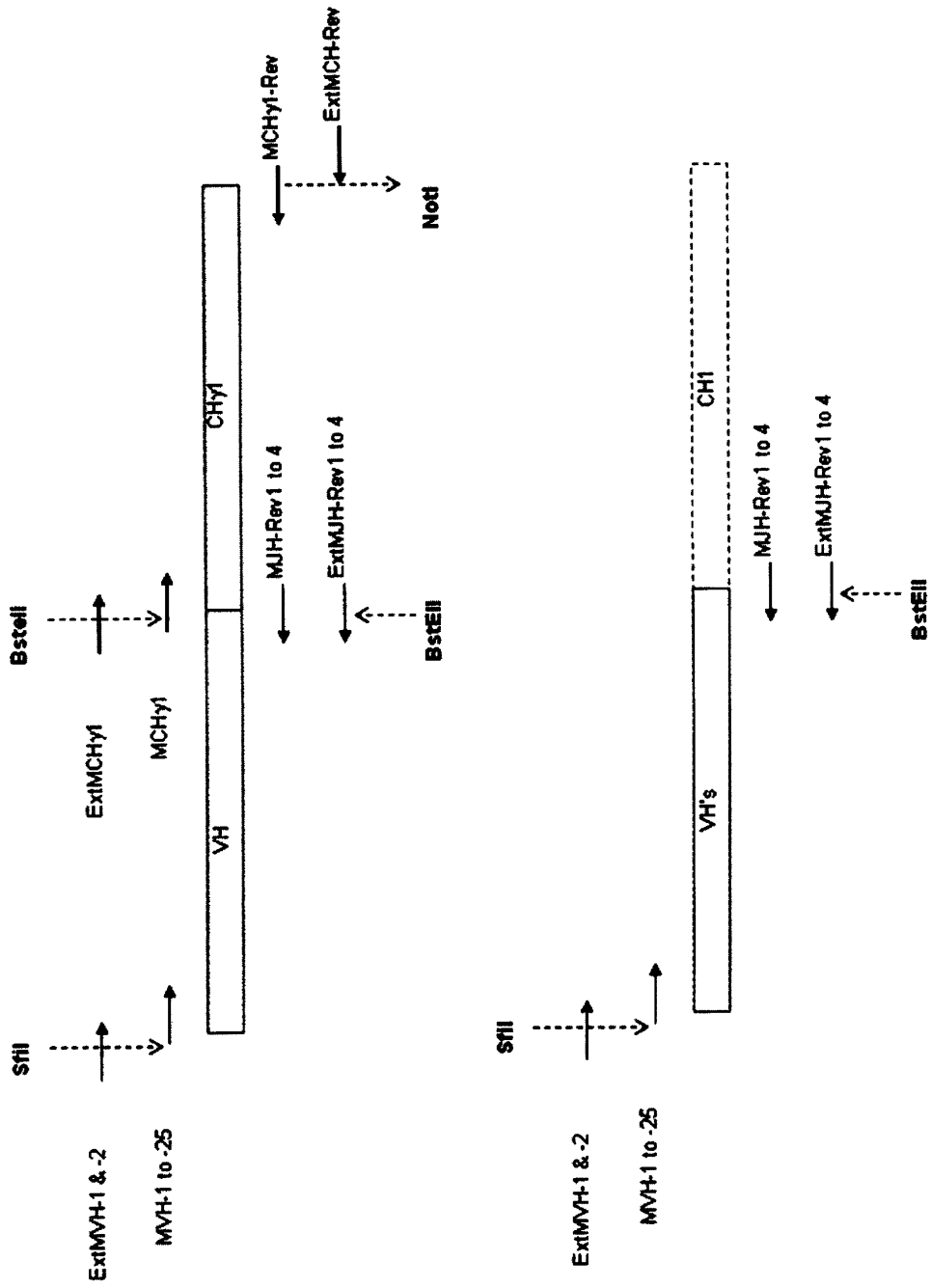
35

40

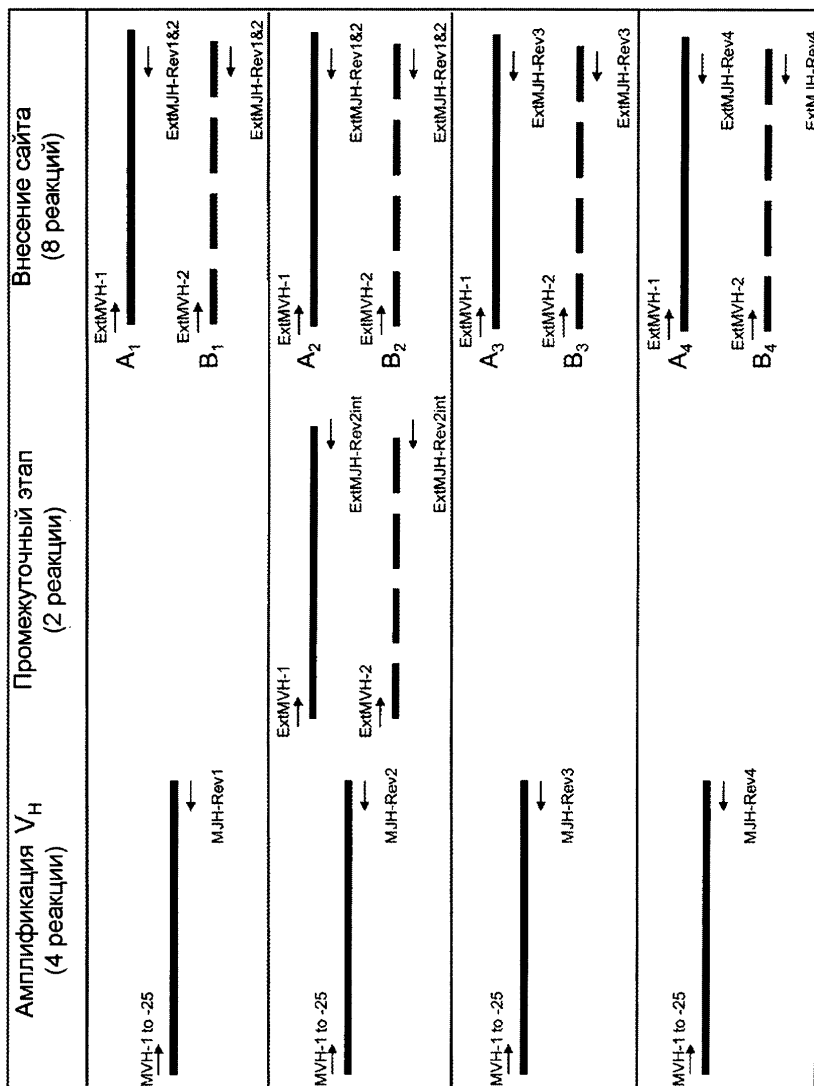
45



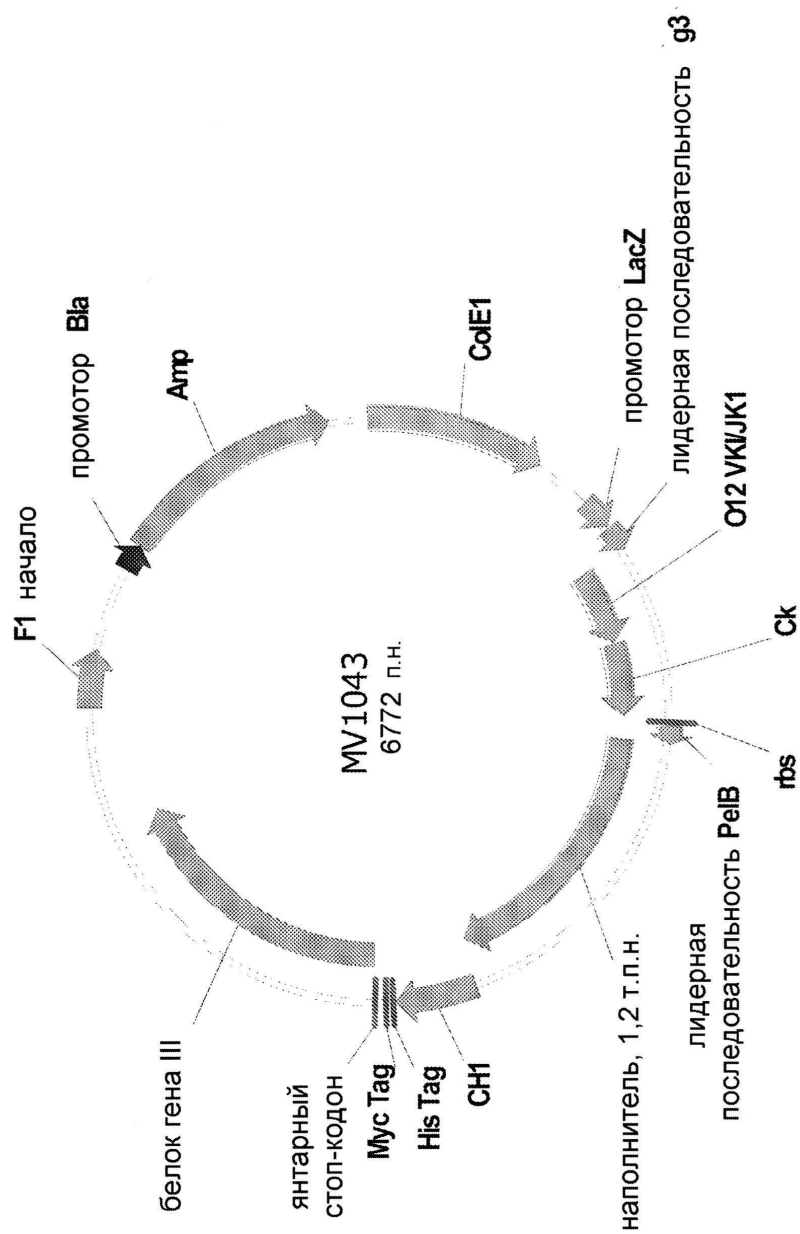
ΦΙΓ.1



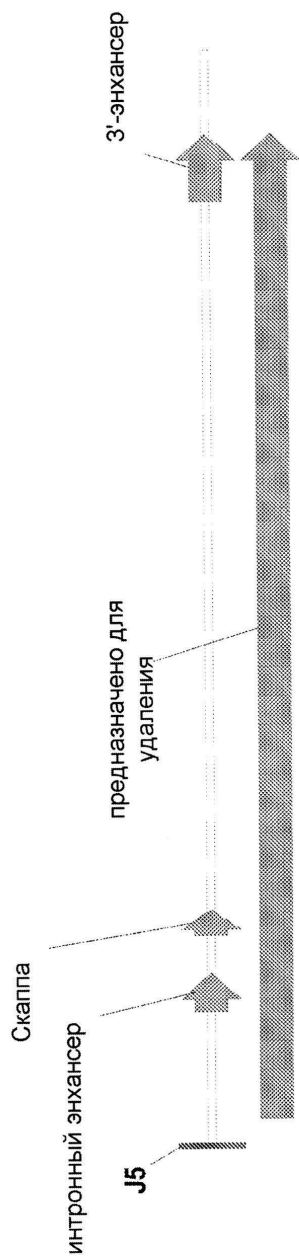
ФИГ.2



ФИГ.3



ФИГ.4

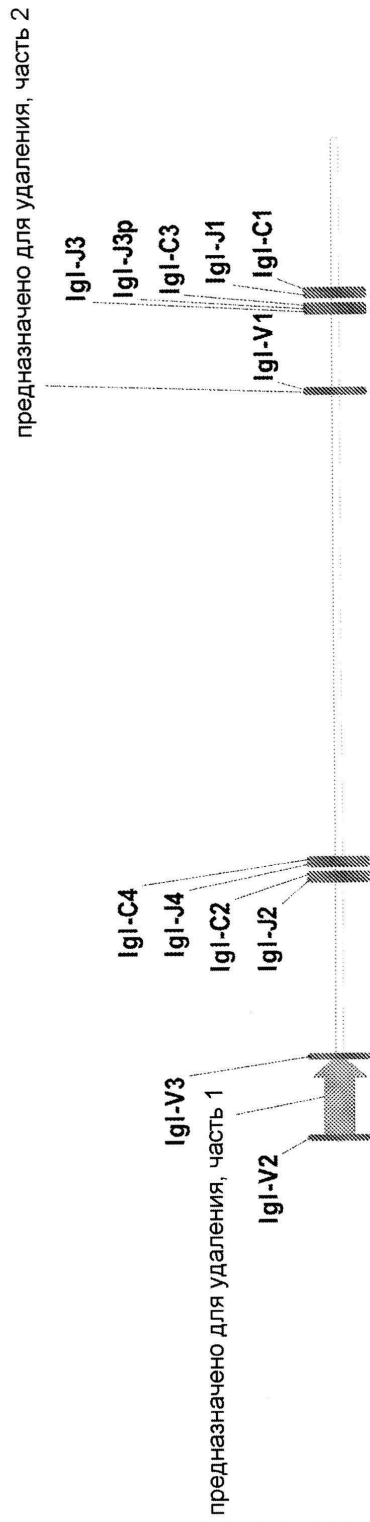


стратегия Megus сайленсинга каппа-цепи мышцы

13181 п.н.

5/79

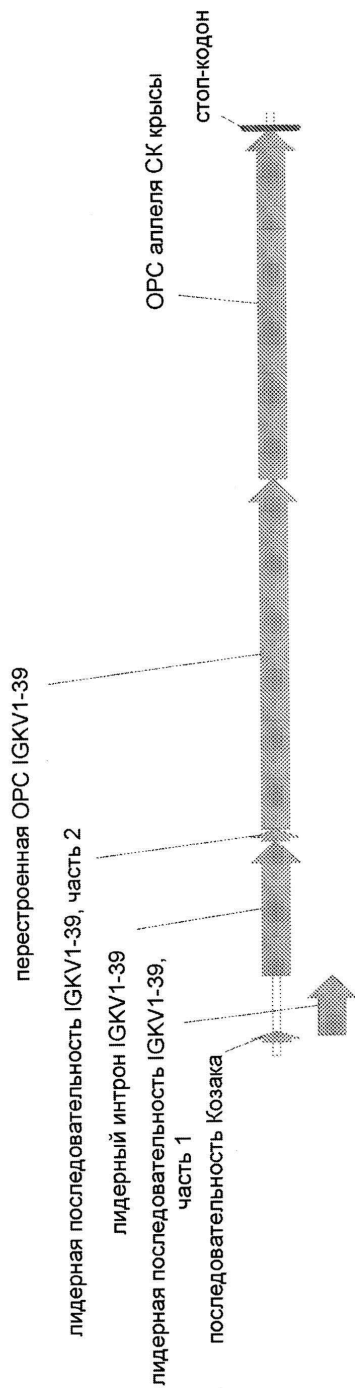
ФИГ.5



Стратегия Mebus сайленсинга лямбда-цепи мыши

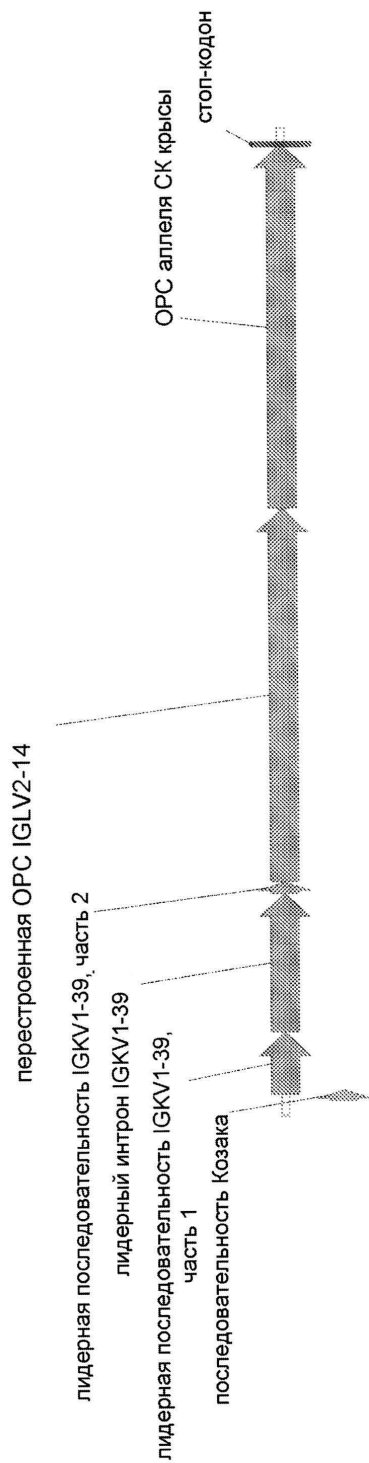
234987 П.Н.

ФИГ.6



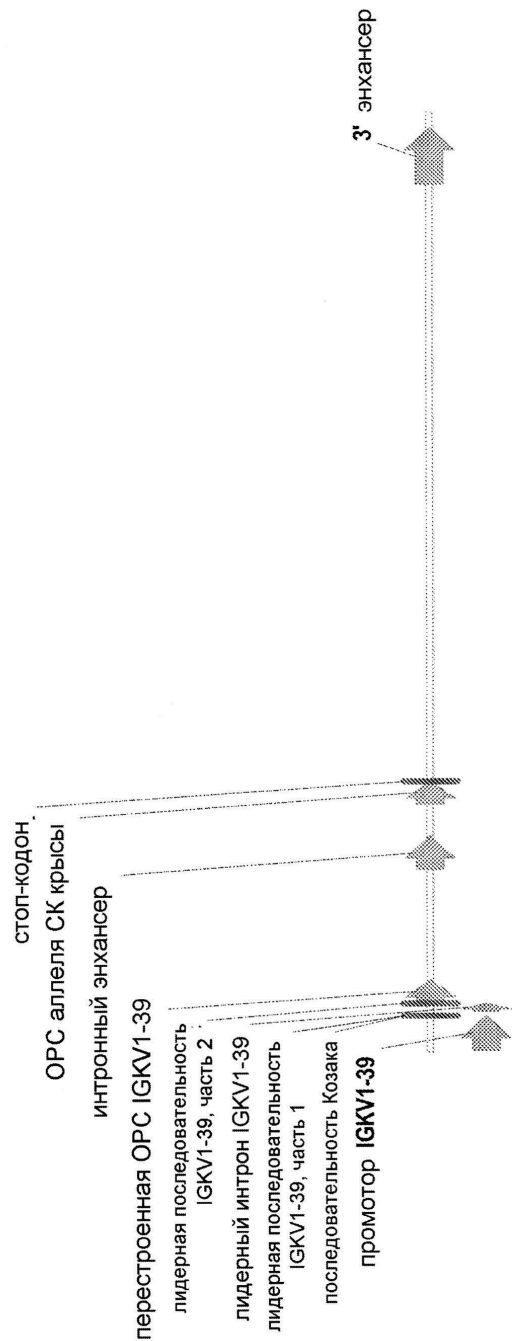
7/79

ФИГ.7



8/79

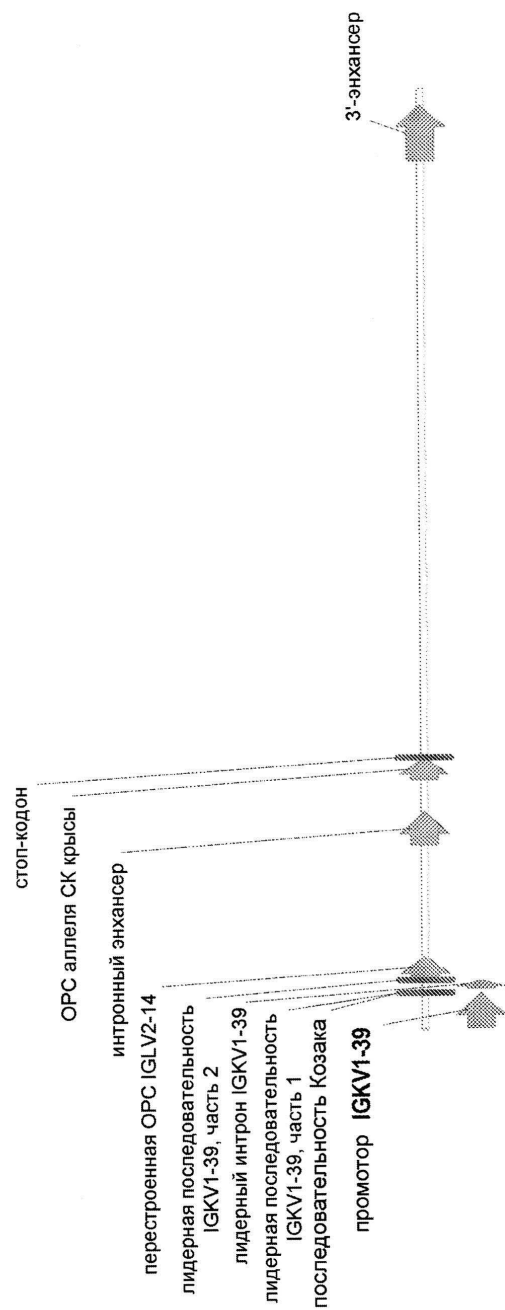
ФИГ. 8





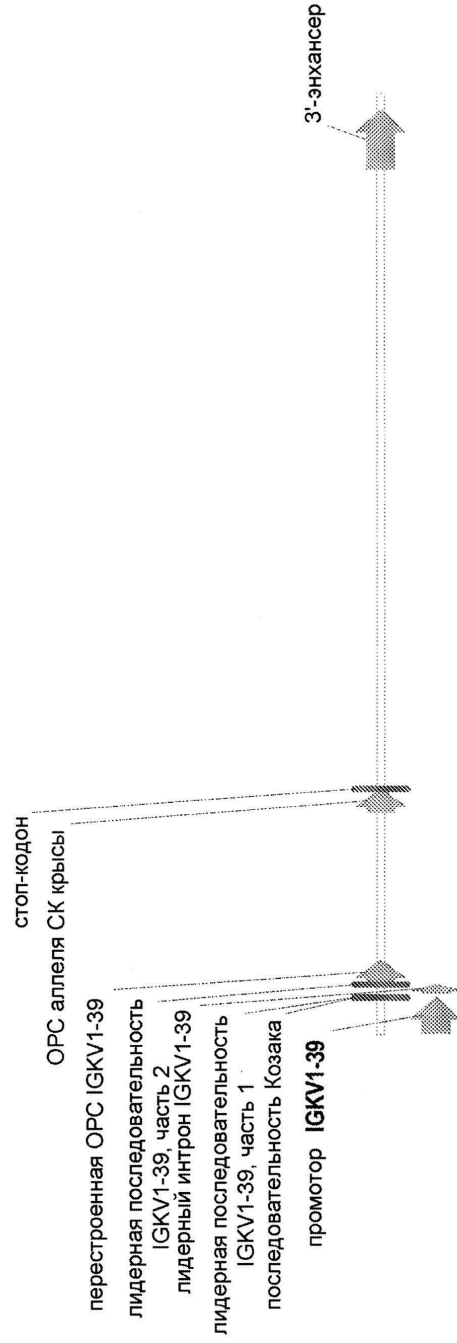
9/79

ФИГ.9



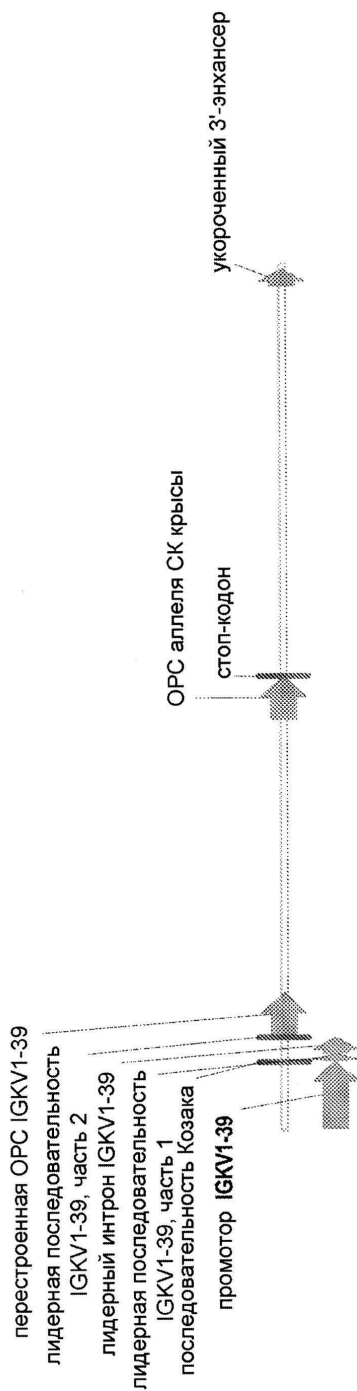
10/79

ФИГ. 10



11/79

ФИГ.11



ФИГ.12

ДНК IGKV1-39/J зародышевой линии человека

1 GAC ATC CAG ATG ACC CAG AGC CCC AGC AGC CTTG AGC GGC GAC ABA GTG ACC ATC ACC TGC AGA GCC AGC  
 79 CAG AGC ATC AGC AGC ATC CAG TAC TCG TAT CAG CAG AGC CCC GGC AAG GCC CCC AAG CTTG ATC TAC GCC GCC AGC  
 157 TCC CTG CAG AGC GGC GTG CCC AGC AGA TTC AGC GGC AGC GGC TCC GGC ACC GAC TTC ACC CTTG ACC ATC AGC AGC GTG  
 235 CAG CCC GAG GAC TTC GCC ACC TAC TGC CAG CAG AGC TAC AGC ACC CCC ACC TTC GGC CAG GGC ACC AAG GTG  
 313 GAG ATC AAG

белок IGKV1-39/J зародышевой линии человека

1 DLSMTQSPSS LSASVDEBVT ITCSASQSLIS SLLNRYQQKE GKARQLLIYA  
 57 ASLQSGEVEFV KFSGSGSETD FFLTSSMQF EDRATYCCQ SYTRPTTQQ  
 101 GKVEIF

ДНК IGLV2-14/J зародышевой линии человека

1 CAG TCT GCC CTG ACC CAG CCC GGC TCT GTG TCT GGC AGC CCT GGC CAG AGC ATC ACC ATC AGC TGC ACC GGC ACC AGC  
 79 AGC GAC GTG GGC GGC TAC AAC TAC CAG TAC GTG TCC TGG TAT CAG CAG CAC CCC GGC AAG GCC CTTG ATG ATC TAC GAG  
 157 GTG TCC AAC AGA CCC AGC GGC GTG AGC AAC AGA TTC AGC GGC AAG GCC AGC AAC ACC GGC CTTG ATC ACC ATC AGC  
 235 GGC CTC CAG GCT GAG GAC GAG GCC GAC TAC TGC TGC AGC AGC TAC ACC AAC AGC TTC ACC CTTG GTG TTT GGC GGC GGA  
 313 ACA AAG CTG ACC GTG CTG

белок IGLV2-14/J зародышевой линии человека

1 QSALTQPAVY SCSFGQSITI SCTGTSSDVG GYNYVSWYQQ HNGKAFKLI  
 57 YEVANRPSGV SNRFSGAKSG NFAASLTISGL QAEDEADYVC SSYTSSSTLV  
 101 FGGSTKLTVL

ДНК IGCK аппеля «а» крысы

1 AGA GCC GAC GCC GCT CCC ACC GTG TCC ATC TTC CCC ACC ATG GAA CAG CTG ACC TCT GGC GGA GCC ACC GTG GTG  
 79 TGC TTC GTG AAC AAC TTC TAC CCC AGA GAC ATC AGC GTG AAG TGG AAG ATC GAC GGC AGC GAG CAG AGG GAC GCC GTG  
 157 CTG GAC AGC GTG ACC GAC CAG GAC ACC TAC TCC ACC TAC AGC ATG AGC ACC CTTG ACC CTTG ACC AAG GTG GAG  
 235 TAC GAG AGG CAC AAC CTG TAC ACC TCC CAG CTG GTG CAG AAG ACC AGC TCC AGC CCC GTG GTC AAG TTC TCC AAC CGG  
 313 AAC GAG TGT

белок IGCK аппеля «а» крысы

1 RADAAFTVSI PFFSMELQTS GGAIVCVFN NFPYRDIQVK WKIDGSEQRD  
 57 GVLDSVIDQD SKDSTYSMSL TLSLTKVEYE RHMLYTCSEV HKTSSSPVVK  
 101 SPNRKEC

ФИГ.12 (продол.)

IGKV1-39/J-Ck  
 1 GGT ACC GCG GCC ACC ATG GAC ATG AGA GTG CCC GGC CAG CTC CTG GGG CTC CTA CTC TGG CTC CGA GGT AAG  
 75 GAT GGA GAA CAC TAG GAA TTT ACT CAG CCA GTG TGC TCA GTA CTG ACT GGA ACT TCA GGG AAG TTC TCT GAT AAC ATG  
 157 ATT AAT AGT AAG AAT ATT TGT TTT TAT GGT TCC AAT CTG AGG TGC CAG ATG TGA CAT GGA GAT TCA GAT CCC CAG  
 235 CAG CTT GAG CCG CAG CGT GGG GAA GAG AGT CAC CAT CAC CCG CAG CCA GAT CCA GAT CAG CAG CTA CTT GAA CTG  
 313 GTA TCA CGG GAA GCC CCG CAA GGC CCG CAA GCT GGT CAT CTA CCG CCG CAG CTC CTT GCA GGA GTT GGC CAG CTA  
 391 ATT CAG CGG GAG CCG CTC CGG CAG CCA CTT CAC CTT CGG CCA GGG CAA GAT CAA GAG AGC CCA GCG CCG TCC  
 469 CTG CGA GCA GAG CTA CAG CAC CCC CCG CAG CAT GGA ACA GAT GAC TGG CCG AGC CAC GGT GCT GAA CAA CTT  
 547 CAC GGT GTC CAT CTT CCG CCG CAG CAT GGA ACA GAT GAC TGG CCG AGC CAC GGT GCT GAA CAA CTT  
 625 CTA CCC CAG AGA CAT CAG CTT GAA GTG GAA GAT GGA CCA GGG CCG CTT GGA GAG CCA CAA CCA  
 703 CCA GGA CAG CAA GGA CTC CTA CAG CAT GAG CAG CAC CTT GAG CCA GGA GTA CGA GAG GCA CAA CCA  
 781 GTA CAC CTG CGA GGT GGT GCA CAA GAC CTC CAG CCC CTT GAT GGT CTT CAA CCG GAA CGA GTG TAG  
 859 CGA GCT C

IGLV2-14/J-Ck  
 1 GGT ACC GGG GCC GGC ACC ATG GAC ATG AGA GTG CCC GGC CAG CTC CTG GGG CTC CTA CTC TGG CTC CGA GGT AAG  
 75 GAT GGA GAA CAC TAG GAA TTT ACT CAG CCA GTG TGC TCA GTA CTG ACT GGA ACT TCA GGG AAG TTC TCT GAT AAC ATG  
 157 ATT AAT AGT AAG AAT ATT TGT TTT TAT GGT TCC AAT CTC AGG TGC CAG ATG TGA CAT GGA GAT TCA GAT CCC CAG  
 235 CAG CTT GAG CCG CAG CGT GGG GAA GAG AGT CAC CAT CAC CCG CAG CCA GAT CCA GAT CAG CAG CTA CTT GAA CTG  
 313 GTA TCA CGG GAA GCC CCG CAA GGC CCG CAA GCT GGT CAT CTA CCG CCG CAG CTC CTT GCA GGA GTT GGC CAG CTA  
 391 ATT CAG CGG GAG CCG CTC CGG CAG CCA CTT CAC CTT CGG CCA GGG CAA GAT CAA GAG AGC CCA GCG CCG TCC  
 469 CTG CGA GCA GAG CTA CAG CAC CCC CCG CAG CAT GGA ACA GAT GAC TGG CCG AGC CAC GGT GCT GAA CAA CTT  
 547 CAC GGT GTC CAT CTT CCG CCG CAG CAT GGA ACA GAT GAC TGG CCG AGC CAC GGT GCT GAA CAA CTT  
 625 CTA CCC CAG AGA CAT CAG CTT GAA GTG GAA GAT GGA CCA GGG CCG CTT GGA GAG CCA CAA CCA  
 703 CCA GGA CAG CAA GGA CTC CTA CAG CAT GAG CAG CAC CTT GAG CCA GGA GTA CGA GAG GCA CAA CCA  
 781 GTA CAC CTG CGA GGT GGT GCA CAA GAC CTC CAG CCC CTT GAT GGT CTT CAA CCG GAA CGA GTG TAG  
 859 TTG AGC TAG CGA GCT C

VKP-IGKV1-39/J-Ck  
 1 GGC GGG CCC ACA TGA AAC AAT GGG AAC CAT CTG ACA ATC ACA GAG GTG TTG TTA CTA TAG CAA AAG GGA TTG TTA CTC  
 75 TCC ACA TCC CTT TAA GTA ACT TGA AGS CTT GAT AGA CCC ACC CTC TBA AAC TTC ATT AGA CAT TCC CTA GGA ATG GTT  
 157 ATA CTC TCC TGT ATA CTA ATA CTA CTC TBA AAT ATA TTA TTC CAT ATA GTC CTT AGS TTT GTA TTA AAG TTT GAC  
 235 TTT TTT CTT TCA AAA TAT CTC TTG TCA CAA CAG GGG CTC TAG AGA GAA ATA CAT TCC CTC CAG GCA AAT CTA TGC TGC  
 313 GCT GGT CTG ACC TGG GAC CTT GAG GAC ATT GCC CTT CTG AGT TAC TAA GAT GAG CCA GCC CAG CTT GAT TGA TGC TCA  
 391 GCC TGC CCC ATG CCC TGC TGA TTG ATT TGC ATG TTC CAG AGC ACA GCC CCG TGC CTT GAA GAC TTT TTT ATG GGC TGG  
 469 TCG CAC CTT GTG CAG GAG TCA GTC TCA GTC AGG AGC CAC CAT GGA CAT GAG AGT GCC CCA GCT CTT GGG GCT CTT  
 547 GCT ACT CTG GCT CCG AGG TBA GGA TGG AGA CTA GGA ATT TAC TCA GCC AGT GTS CTC AGT ACT GAC TGG AAC TTC  
 625 AGG GAA GTT CTC TGA TBA CAT GAT TBA TAG TAA GBA TAT TTT TTA TGT TTC CAA TCT CAG GTG CCA GAT GTG ACA  
 703 TCC AGA TGA CCC AGA GCC CCA GCA CCG TGA GGG CCA GCG TGG ACA GAG TCA CCA TCA CCT GCA GAG CCA GCC AGA  
 781 GCA TCA GCA GCT ACC TGA ACT GGT ATC ACC AGA AGC CCG GCA GCG CCG ACT TCA CCG TGA CCA TCA GCA GCC TGC AGC  
 859 TGC AGA GCG GCG TGC CCA GCA GAT TCA GCG GCA GCT CCG GCA CCG CCA CTT TCG GCG AGG GCA CCA AGG TGG AGA  
 937 CCG AGG ACT TGG CCA CCT ACT ACT GCC AGA GGT ACA CCG CCA CTT TCG GCG AGG GCA CCA AGG TGG AGA  
 1015 TCA AAC GTA AGT ACA CTT TTT TCA TCA TCT TTT ATG TGT AAG ACA CAG GAT TTT ATG TTA GGA GAT AAA GTC AGT TCA  
 1093 GAA AAT CTT GAG AAA ATG GAG AGG GCT CAT TAT CAG TTG ACG TGG CAA ACA GTG TCA GAT TTT CTG TTT ATC AAG CTA

ФИГ. 12 (продол.)

1171 GTG AGA TTA GGG GCA AAA AGA GGC TTT AGT TGA GAG GAA AGT AAT TAA TAC TAT GGT CAC CAT CCA AGA GAT TGG ATC  
1172 GGA GAA TAA GCA TGA GTA GTT ATT GAG ATC TGG GTG TGA TCG GAG TCA GAT GGC TGT TTA GGT TTA AGT GGG AGA  
1173 TTT GGA GGG GAT GAG GAA TCA AGG AAC TTC AGE ATA GAG TCC CAT GAT CCA AAA TGG ATG TGG TGA TGG  
1405 GAG CAA ACT TTG AAG ATA AAC TGA ATG AAC CAG AAG ATG AAA TCA AAG AGG GGC CTG GAG CTC TGA GAA  
1483 GAG AAG GAG ACT CAT CCG TGT CTC TTT TGT CTC ATG AGT TTT TAT GAC TAC AAA AAT CAG TAG TAT GTC CAG AGT TGA  
1561 GTG AGC CGT AGG CTG AGT TCT CTC TTT TGT GTC ATG TGG ATG CCA TGG CTT GCT GAA TAA TAA GAA GAG GTG TGA CTC  
1717 TCA TTA AGC TGT TTG AAA GTT TCG CTA CAA AAT GTC AAA ATG AGA GAC TGT GTA GGA AGC AGT CCT TGA CAG GAT CAA GGG GTT  
1795 TTT TTC TTT TGT CTC ATT TCT ACA TGA AAG TAA ATT TGA AAT GAT CTT TTT TAT AAG AGT AGA AAT ACA GTT GGG  
1873 TTT GAA CTA TAT GTT TTA AAG GGC GGT TTG TAA GAC ACT TCT TTA CAA GTT GTC GGC GCT GTC CCA GGC  
1891 TTT TAT ATC CCC AGC AAT GGA CTG ABA CGG TCC GCA ACC TCT TCT TTA CAA GTT GTC GAC CTC GCG GTC CAC TTT CCT  
2029 ATT TGG CGT TCA CCC TGC CUC TAA GGG CCA TGT GAA CCC CGG TGG CAG CAT CCC TTG CTC CGT AAT GTG ABA ACA  
2107 GAG GCA CAG TGA TAG GAA CAG AGC CAG TAA TCT GAA GAG AAC AGA GAT GTG ADA GAC TAC ACT AAT GTG ABA ACA  
2185 AGG AAA GGG TGA CTT ATT GGA GAT TTC AGA AAT AAA AAG CAT TTA TTA TAT TCC CTT ATT TTA ATT TTC TAT TAG AGG TAA AAT  
2243 GGA ATT AGA AAG GGC ATC CTG CCA GTT CCT CCC AGG CAG GTG TGA TGA ATT GCT CAC TAA ACT CCT CTA AAT TAT ATG TCA TAT TAA  
2341 CTA CAG CCA GCA AAA GTG ATG AAT ATT CTT TGA CTG AAC TCT CAC TGA TAT TTT TCT TCA TGC AAA AAT ATG ATC  
2419 CTG GAT AAA TTA ATA TAA ATT TGT GAC ATG ACC TTA ACT GGT TAG GTA CGA TAT TTT TCT TCA GCT ACT ATG ATC  
2497 AAT AAT AAT TTA GCA CBA AAA TAT TGT CCA ATA CTT TAA CCC TTC GCT AGC CAA AAG CAA CTA TTT AAG GAC CCT TTA  
2575 CCR TBA TTT TGA ABA CDA TTT ATT AGC TTT TGT TGA CCC TTC TTA AAA TGA TGT CBA TTT AAG GAC CCT TTT  
2653 AAA CTC TTG AAA CTA CTT TGA AGT CAT TAA GTT ATT TTA CCA CTT TTA ATT ACT TTA AAA TGA TGT CBA TTT AAG GAC CCT TTT  
2731 AAC TAT TAA TTT ATT TTA AGG GGG GAA AGG CTG CTC ATG ATG ATG ATG TAT ATA ATC TTT TAG AGG TAA AAT  
2809 TTT TTA CTA CCT CTG TCA CCC AAG AGT TGG CAT CTC AAC AGA GGG GAC TTT CCG AGA GGC CAT CTG GCA GTT GCT TTA  
2887 GAT CAG AAG TGA AGT CTG CCA GTT CCT CCC AGG CAG GTG TGA TGA ATT GCT CAG AAT ATT TET GSA CAC CCA AAT ACA GAC  
2955 TTG TCC CAT GTG GTT ACA AAC CAT TAG ACC AGG GTC TGA TGA ATT GCT CCA MAG GAA GCC ATR CAG AGG CTA ATA TCA GAG  
3033 CCT GGC TTA AGG CCC TGT CCA TAC AAG TTT AGC TTG GCT ACA CCA MAG GAA GCC ATR CAG AGG CTA ATA TCA GAG  
3121 TAT TCT TGG AAG AGA GAG AAA ATG ABA GCG AGT TTC TGC TCT TAC CTT AVG TGC TTG TGT TCA GAC TCC CAA ACA  
3199 TCA GGA GTG TCA GAT ADA CIG GTC TGA ATC TCT TCA AAG GGT CAG ACT CAA TTT ACT TTC TBA ABA AAG ATG AGC TAG GAA CTA GGG  
3277 GCA ATA GAA GGA AGC CTG AGA ATA TCT TCA AAG GGT CAG ACT CAA TTT ACT TTC TBA ABA AAG ATG AGC TAG GAA CTA GGG  
3355 AAT AAC TTA GAA ACA ACA AGA TTG TAT ATA TGT GCA TCC TGG CCC CAT TGT TCC TTA TCT GTA GGG ATA ACC GTG CTT  
3433 TTT TGT GTG TCT GTA TAT AAC ATA ACT GTT TAC ACA TAA TAC ACT GAA ATG GAG CCT TTC CTT GAT TCA TAC CAT  
3511 CCT CTG TGC TTC CTT CCT CAG GGG CCG ACC CCG CTC CCA CGG TGT CCA TET TCC CCA TGA TGG AAC AGC TGA CCT  
3589 GCG GAG CCA CCG TGG TCT GGT TCG TGA ACA ACT TCT ACC CCA GAC ACA TGA GGT TGA AGT GGA AGA TGG AGC GCA  
3667 GCG AGC AGA GGG ACG TGC TGG ACA GCG TGA CCG ACC AGC ACT CCA CCT ACA TGA GCA GCA CCA  
3745 TGA GCC TGA CCA AAG TGG AGT AGC ABA GGC ACA CCC TGT AGC CCG AGG TGG TGC ACA GGA CCA GCT CCA GCG CCG  
3823 TGG TCA AGT CCT TCA ACC GSA ACG AGT GTT GAA CAC AAA GGT CCT GAG ACG CCA CCA CCA GCT CCC CAG CTC CAT CCT  
3901 ATC TTC CCT TCT AAG GTC TTG GAG GCT TCC CCA GAA GGG ACC TAC CAG TGT TGC GAT GAT CCA AAC CTC CTC CUC ACC  
3979 TCC TTG TCC TCC TCC CTT TCC TTG GCT TTT ATC ATG CTA ADA TTT GCA GAA AAT ATT CAA TAA AGT GAG TCT TTG  
4057 CAC TTG AGA TCT CTG TCT TTC TTA CTA AAT GGT AGT AAT CAG TTG TTT TTC CAG TTA CCT GGG TTT CTC TTC TAA AGA  
4135 AGT TAA ATG TTT AGT TGC CDT GAA ATC CAC CAC ACT TAA AAG ATA AAT AAA ACC CTC CAC TTG CCG TGG TTG GCT GTC  
4213 CAC TAG ATG GCA GTG CTT TCT AAG GTT CAC GBE TAC TAT TCA TGG CTT ATT TGT TGT GGC CAT GGT AGG TTT GAG GAG  
4291 GCA TAC TTC CTA GTT TTC TCC TBA GTC GTC AAA GTC CYS MAG GGG GAC AGT CTT TAC AAG CAG ATG TTC TGT AAT  
4369 CTS ATT CMA CCT ACC CAG TMA ACT TGG CBA AAG ACC AAT GTC GAA TTA TTA CCA GAA CCA BAG GCA ACC TBA ATG TGC  
4447 AAG CAA TEG GAA AAT GTG GAA GCC CAT CAT AGT ACT TGG ACT TCA TCT GCT TTT TTG CCT TCA CTA GAT TTT TBA ACA  
4525 TGA GCT GGC TCC TAT CTG CCA TTG CCA AGG CTG GGC ACT CAC AAC CCA CTA CTA CCA CCT CTA TAC GGT GAG ATT  
4603 ACA CAG ATA CAT CBA AAT TTG GAA AAG GTT CTA CAG ACT TGA GAG CTS ATC CCA CTC TTA GGT GCT TAT CTC TGT  
4681 ACA CCA GAA ACC TTA AGA AGC AAC CAG TAT TGA GAG ACT TTA TGA AAG TCT AAA ACT SGA TAC AAC CAA AAT GTC  
4759 CAC CBA CAG TTA AAT TAT GAC ATG TTC ACA ATT GAG CTA TTA CTT AAT AAG GAG AAT TAA TAA AAT AAA ACT TAA GAG  
4837 CAT AGT TTA ATC TCA TAA ACA ABA TAA TBA TAA TTT TTT TCA TCC ATG TGA GAT TAA AAG CAG GAT GTA AAA

ФИГ.12 (продол.)

4915 TTT AAA ATT AAG AGA GAC ATA AGT TTT GAG GTA GCA AGA TGG AAA CTC TGG GGC TTG GGG AAT GTT CTG TCT CTC TGT  
4923 ATC GGA TGT GAA AGT TAC TAT TGT GGA ATT GGG ATC TAT GTT CTT CCT GTA TAT ATT GTA TAC TTC TAT ATA ATA ACT TCA  
5071 CTT AAA GAA ATA TCT AAT ACC CAG CAG TGC AVA CMT AAA NSA GSA TAC AAA TGA ATC ATA CST GAA GGC CAG AAA GAC  
5149 AAT AAA GTA GGG GAT CCA GGA TCA AAH TCT CTC CCA CAA CCY TGA TAC TAT TCT GCC TTC CAG AGC TCA AAG TAC  
5227 AAA ACA GAT AAT TCA AAC ACA TGA TCC CTC CCA GAA CMT GSA ATT AGA AAT AGC CMT GTA TAA  
5305 AAT GAG ATA GAA GAG ACC TTC ATC AAC AGG TCA AGG AAT ATG GAT AAT TTT GTC TGG GTA TGA AGA GCC CAC GTA TCA  
5383 AAG GTT AGA TTA GGG AAG GAA GAC ACT AAC CMT CTT CTC AGC CTA CAC TCT GAA GGC AGT GCA GAA TAA  
5461 TCC CTC GTG GGC TCA TCC ACT CAG CAC ACA TTT ACT AAG CMT CTT CCT CTT CTC APT CCA CMT AAG GAT GAT  
5539 TPT TAG TGT CCC TTC CAG TTA ATA TGC AGT CCC TTT GOC TTA CTA CCT CTT GAG AAT GTA CMT TAT TAT CCA CTT  
5617 GGG AAA GSA CAG TCA CCA AAT AGG AGA GGG CAA CCC TTT GOC TTC CTA CCT CTT GAG AAT GTA CMT TAT TAT CTA GAA ACC  
5695 TTT GAA ACT TCT TTT AAT TGC TTT TTT TTA ATT TGT CTT TTC AAA AAT GGC TCC TCA AAA TAT ATA TGT TCG AGT CTT  
5773 AAA TTT ATC AAT CAA CAG TGC CTC TTA TCT GGC TAT TAA TAC AAA AAT GAT GGC TCC TCA AAA TAT ATA TGT TCG AGT CTT  
5851 ATC TAA AAC AGA ACC CAC AAT AAA AAA GAA ATA CMT ATG AGC ATT TAT ATA ATT CTG AGC AAC CTT GTC AGA GAA  
5929 TGT GAA AAA AAT ATA ATC TAA TGT CAC ATG CTG TAT TCT TTT TTA ACA CTG GTG ABA TTA TAC CMT TRG AGA GAA  
6007 AGA GSA CAG ATC ACT GAT CCT AGG ATC TAG GSA TGT TAC AGA TAA GAA AAC AAA TGT GAC AAA GAG CTG TCA CAA GSA  
6085 GGA TCT TCA AGG TCA CAG AAT CAC TGT CTT GAT TGT AGT GGT TAC ATA CAT TTA AAT ATG TGA TAA AAT GTT GTT  
6163 GAA CTA TAT TCA TAT ATT GTA CCA ATG TCA AAT GCT TAA TTT TGG CTC TAT AGT ATA CTT AAA AAC CAT TTT GSA TAA  
6241 TGG ACR AAG ABA ATG ATG TTT AGA TCA TCA AAG CTG AAG CCA TAT TGG CAC AGA TAA ACC TGT CAC AGA TTA AGA CCT AAG CCT  
6319 CTA ATG ABA AGC CMT TTT GTG TGC CTT GGC ATR TCA TGC CTA AGC TGT CAC CAG AAT ACC CAG GAC AGS CCA TGA TAT GCT AAT GBA  
6397 CAG AAG CAA GCC CTT GCC CMG CAA GCA GGC AGC ACA GAT AAG AGC TAA ACC CAG GAC AGS CCA TGA TAT GCT ACT GCC CBA  
6475 CTA CTT TCA AGG TGG TGT TGC TGA CTT AGT GAA CCA CCC ACA AGC TGT GAG CCC CAA TNG CAC AAA GCT ACT GCC CBA  
6553 AGA AAT TAT ACA AAA ATT GGA ACT TTG GGA ATG GTG TGC AGG ATC GCT CTG TAT GCT TGG AAC ACA GCT TCT CTA  
6631 TGT TTT GTA TTA ATA CCA GTC TAG AAG CTT CCA AAA CTT TCT CAC TGA AGA TTA CCC ATG TGG GAC CCC TAC AGA  
6709 CTC TTT TGC CCA AAC AAC CCA AAC ADA TTT TAA AAG CAA ATG TTA TTT GCA CMT CCT AAT TGC TAA AAA GTT TAC AGC TAA  
6787 GTT TGT GTG AAT AAA CCA AAC ADA TTT TAA AAG CAA ATG TTA TTT GCA CMT CCT AAT TGC TAA AAA GTT TAC AGC TAA  
6865 TAG TCC CAT GCT CTC CAC AAT ACT GSA TCC ABA TGA GCT CBT GSA GAC AGA CTG GAG TGA TGA CAC AAC TGT TAG TCA AAG  
6943 TTA AAA ATG AAG ABA CMT GCA GAG AGT GCA CCA TGC CAT CST GSA GAC AGA CTG GAG TGA TGA CAC AAC TGT TAG TCA AAG  
7021 AAG APT AAG GAC TTC CAG AAG CCA CCA AAG GAA GGA GGT ATG AAG TGG TTT CTC CCT CAG AGT AIC CAG AGS GSA CTA  
7099 AAC CBA CCA CCT TTT TGC TTA AGA CTT CTT GCC TTC AGS ACT GTG AGA AGG TNG CTT CCT AIT GTT CTA AGC CCC  
7177 AGT ATG TGG CMT TTT GTT AAG GTA GAG TCA AGA AAC CAA TAA AAT GCA GAC AGA CAA AAG GAT AGC TGA GTT TTC CAG  
7255 GCC CTT CTT TCT TAT TTT TGG TTT TGT TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG  
7333 TGG GGA GTT TTT TGG GGT TTT TTT GGG TTT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT  
7411 TTT TGT TTT  
7489 TAA TGT CTA CMT CTC AGA GGG GAT CCT CTA ATT TCA AAT GAG CAG TNG CTC TCC TTT AAT GAG AGG GTT CMT GAG CCC CCA GCA ACT AAT  
7567 TAT TTA CTT ACT TAC TTA TTG TCT GTA GAT GAA AGA ATT TTG GAG TGG GAA AGG GTT CMT AIT GTT CTA AGC CCC  
7645 GAG GAG CTA CAG ACA ATT GTT TCT GGG GAA AGG AGA CTT AGT TTC TTT GAG AAT ATA GCT TGT GAT GGG TCA ACC  
7723 ATG TTC CTG TGG CTG ATG TCA CAC CCA GSA GTA TGC AGA CAA CAG ATA CTG GSA TGA ATG AGT TGT TTT AAA AAA AAA  
7801 AAA GGG CAT GAA GCT TGG GAT AGA AAT TAA GGA TAA ATA CAA TTA AAT ACA GGA AAT TCT GAA AGA ATT AAT AAA AAC  
7879 AAT TCT TTT TTT AAA AAA TCC AGA ATT AGC TAT GCT TCT TCA AAA TTG CTT CTG GAG AAC TTT ACA AGT TAA ATA  
7957 AGT TAT ATY GTA GAA BAG GTA GAG AGG AGA ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG  
8035 AGA GGA GGA GAA AGC AGA AGC AAT GGC TGA TNG ACA CAG GAT BAG AGG GBA CAG ABA GSA GBA GSA GSA GSA GAT  
8113 GGG TAT TTC TTT GCT TAT CTG TAT CTG TAT CTG TAT CTG TAT CTG TAT CTG TAT CTG TAT CTG TAT CTG TAT CTG TAT CTG TAT  
8191 TGC CAA CTC AAC AGA GTT CTT TCT TAT AAC CAG GCC CCC AGT AAG TGC ACA CTG AGA TGT GGT ACA ACT AIT TTC  
8269 TTA TAG CAA TCC TGT TTA TAA CTG GGT AAC TTT GTG GAG GGA AGG AAG TGC ACA CTG AGA TGT GGT ACA ACT AIT TTC  
8347 CAA AAT ATT TNG AAG AGT TTG TAC AAT GTA TGT ATA ATT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT  
8425 CAA AAT ACT AAT  
8503 TTT GSA GAC AGG GTT TCT CTC TAT AGC CCT GBC TGT CCT GSA ACC CAC TTT GFA GAC CAG GCT GGC CTC AAA CTC AGA  
8581 AAC CTA CCT GCC TCT GCC TCT GCC TCT GCC TCT GCC TCT GCC TCT GCC TCT GCC TCT GCC TCT GCC TCT GCC TCT GCC





17/79

ФИГ. 12 (продол.)

12463 TBA CTA CTT AAT AGG AGA ATG GAT GTT AAG ATC TGG TCA CTA AGA GGC AGA ATT GAG ATT CGA AGC CAG TAG TAT TTT CTA  
12481 CCF GGT RFG TTT TAA ATG GCA GTA AGG ATC TAA GTG TAG TAG ATA TAT AAT AAT AAG ATT CTA TTT ATC TCT GCA ACA ACA  
12559 GAG AET GTT AGA TTT GTT TGG BAA BAA AVA TTA TCA GCC AAT TTC TAC CAT TTC CAT TTA AGG TTT GTA TTA AAG TTT GAC  
12637 CCA TAT CAC CCC ACC CAT CCC CCA TAC TGG ACC GAT TAT TGA TTT TCA TGG TGA CTG GCC TGA GAA GAT TAA AAA AAG  
12715 TAA TGC TAC CTT ATT GGG AGT GTC CCA TGG ACC TAG GCA CCA ACT GAT ATA GCA ACT GTC ATA GCT ACC GTC TCC TCC TGA TCA AGA  
12793 AGA CCC TTT GAG GAA CTG AAA AGA GAA CTT TAG GCA CCA CTT TAG CCA CAC CTT CTA CAC CTT CTA CAC CTT CTA CAC CTT CTA CAC  
12871 GGT GCA CTC CAC ACC CTT TCA ACC CTA CCA CTT TGT TTT ATA TTA CTC TAT CTT GAA GAG TTC TGA TAT GGT CAC TGG GCC  
12949 CAG CAC TGG GAT GAA AAT GAT ACC CCA CCA CTT TGT TTT ATA TTA CTC TAT CTT GAA GAG TTC TGA TAT GGT CAC TGG GCC  
13027 TCC CAA TGC TTT TGC ACA GTC AAA ACT CMA CTT CTA TGG GGC CCA GAC AGC TTC TAG MAG TAC CTG AGA GTG GCA ABA  
13105 CAT ATA CCA TGT AAG ACA TGT GGA AAA GAT GTT TCA TGG GGC CCA GAC AGC TTC TAG MAG TAC CTG AGA GTG GCA ABA  
13183 AAT AET TGT GCT AAA TAG TTT GGC CAT CTT TAG GCT GAA GAT GAT GCA GAA ATA ACA GCG ATG GAC TAT ATC AGC ATT GCA  
13251 GGA TAG TTT TCA GTA AAC ACC CCA CCA CTT ATA ACA GAA GTA TTC TCT TCT TAT ATC CCT TTT CCA TCC ATG TAG  
13339 ATE GCT GTC TTC ATA TTA GTT CTA GAC GGC GGG CC

VKР-IGKV1-39/J-Сk-Δ1

1 GGC GGG CCC CCA TGA MAC AAT GGG MAC CAT GTG ACA ATC ACA GAG GTG TTG CTA TAG CAA AAG GGA TTG TTA CTC  
79 TCC AGR TCC CTT TBA GTA ACT TGA AGG CCT GAT TGA AGC CCA CTT TAA GAC TTC ATT AGA CAT TCC CTA CGA ATG GTT  
157 ATA CTC TCC TGT ATA CTC CCA ATB CBA CTC TBA AAT AFA TTA TTT CAT AFA GTC TTT AGG TTT GTA TTA AAG TTT GAC  
235 TTT TTT CTT TCA AAA TAT CTC TTG TGA CAA CAG GGG CTC TFG ABA GAA BTA BTA GBT TCC CAC GAG CCA MAI TTA TGC TCA  
313 GCT GGT CTG ACC TGG GAC CTT GGG GAC ATT GCT CTT GTG CTG AGT TAC TBA GAT GAG CCA GGC TTT TTT ATG GGT CCT  
469 TCG CAC CTT GTG CAG TAG TCA GTC AGG AGC CAC CAT GGA CTT GCA GCC AGT GTG CTC AGT GAC TGG AAC TTC  
547 GCT ACT CTG GCT CCG AGG TAA GGA TGG AGA ACA CTA GAA ATT TAC TCA GCC AGT GTG CTC AGT GAC TGG AAC TTC  
525 AGG BAA GTT CTC TGA TBA CAT GAT TBA TAG TAA GAA TAT TTG TTT TTA TGT TTC CAA TCT CAG GTG CCA GAT GTG ACA  
793 TCC ABA TGA CCC ABA GCC CCA GCA GCC TGA GGG CCA AGC CCG ACT TCA CCG TGA TCA TCA GCA GCA GCC TGC AGC  
781 GCA TCA GCA GCT ACC TGA ACT GGT ATC AEC ABA AGC CCG GCA CCG ACT TCA CCG TGA TCA TCA GCA GCA GCC TGC AGC  
859 TGC AGA GGG TGC CCA GCA GAT TCA GCG GCA GGG GCT CCG GCA CCG ACT TCA CCG TGA TCA TCA GCA GCA GCC TGC AGC  
937 CCG AGG ACT TCG CCA CTT ACT ACT GCG AGC AGA GCT AGA CCA CCC CCA CTT TGG GCC AGG GCA CCA AGG TGG AGA  
1015 TCA AAC GTA AGT ACA CTT TTC TCA TCT TTT ATG TGT AGC ACA CAG GTT TTC ATG TTA GGA GTT AHA GTC ATG AAG CTA  
1093 GAA AAT CTT GAG AAA ATG GAG AGG GCT CAT TAT CAG TTG AGC TGG CAT ACA GTG TCA GAT TTT CTG TTT ATC AAG CTA  
1171 GVS AGA TTA GGG GCA ABA AGA GGC TTT AGT TGA GAG GAA AGT AAT TAA TAC TAT GGT CAC CAT CCA AGA GAT TGG ATC  
1249 GBA BBA TBA GCA TGA GTA GTT AAT GAG ATC TGG GTC TGA CTG CAG GTC TGG TCT TCT AGA COT TTA AGT GGG AGA  
1327 TTT GGA GGG GAT GAG BBA TGA AGG AAC TTC AGG ATA GAA MAG GGC TGA AGT CAA GTT CAG CTC CTA AAA TGG ATG TGG  
1405 GNG CAA ACT TTG AAG ATA AAC TGA ATG ACC CAG AGG ATG AAA CAG CCG ABA TCA MAG TCA TAG GGA TAG CAG AGT TGA  
1483 GAG AAG GAG ACT CAT CCG TGT TGA GTT TCC ACA AGT TTT TAT GAC TAC AAA AAT CAG TAG TAT GTC CTG AAA TBA  
1561 GTS AGC CGT AGG TTG AGT TCT CTC TTT TGT CTC CTA AGT TTT TAT GAC TAC AAA AAT CAG TAG TAT GTC CTG AAA TBA  
1639 TCA TTA AGC TGT TTG AAA GTA TGA CTG CTT GCC ATG TAG ATA CCA TGG CTT GCT GAA TBA TCA GAA GAG GTG TGA CTC  
1717 TTA TTC TAA AAT TTG TCA CAA AAT GTC AAA ATG AGA GAC TCT GTA AGG AGT COT TGA CAG ACA GCT CAA GGT GGG  
1795 TTT TTC CTT TGT CTC AAT TCT ACA TGA BAA ATT TGA AAT GAT CTT TTT TAT TAG AGT AGA AAT ACA GTT GGG  
1873 TTT GAA CTA TAT GTT TTA ATG GCC ACG GTT TTG TBA GAC ATT TGG TCC TTT GTT TTT CCA GTT ATT ACT GSA TTS TAA  
1951 TTT TAT ATC GCC AGC AAT GSA CTG TCC TCG AAA GGG TCC GCG GGG TAG CAT CCC TTG CTC GCG GTG GAC CAC TTT CCT  
2029 AAT TGG CGT TCA CCC TCG TAA GGG CCA TGT GAA CCG CCG GGG TAG CAT CCC TTG CTC GCG GTG GAC CAC TTT CCT  
2107 GAG GCA CAG TGA TAG GAA CAG AGC CAC TAA TCT TGA GAG AAC GAT GTG ACA GAC TAC AAT GTG AGA ABA ACA  
2195 AGG AAA GGG TGA CTT AAT GGA GAT TTT AGA AAT AAA ATG TTA TTA TAT TCC CTT TTA TAT TTT TAG AGG TTA AAT  
2263 GGA ATT AGA AAG GGC ATA AAC TGC TTT ATC CAG TTT TAT ATT AAA AGT TTA ATG TAT ATA ATC TTT TAG AGG TTA AAT  
2341 CTA CAG CCA GCA AAA GTC ATG GGA AAT AAT CTT TGA TCT CAC TAA ACT CCT CTA AAT TAT ATG TCA TAT TAA  
2419 CTG GTT AAA TTA ATA TBA AAT TGT GAC ATG ACC TTA ACT GGT TAG GTA GGA TAT TTT TCT TCA TGC AAA AAT ATG ACT

ФИГ. 12 (продол.)

2497 AAT AAT AAT TTA GCA CAA ABA TAT TAT TTC CCA ATA CTT TAA TTC TGT GAT AGA ABA ATG TTT AAC TCA GCT ACT ACT ATA ATC  
 2498 CCA TAA TTT TGA AAA CTA TAT TTT TGG CTA CAC CAA AGG AAG CCA TAC TAC AGC TAA TAT CAG AAT ATT CTT GGA AGA  
 2499 GAC AAG AGA AAA TGA AAG CCA GTT TCT GCT CTT ACC TTA TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT  
 2731 ATA AAC TGG TCT GAA TCT CTG TCT GAA GCA TGA TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT  
 2809 GCC TAA GAA TAT CTT CAA AGG GTC AGA CTC AAT TTA CTT AAT AAA TGA TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT  
 2987 CAA CAA GAT TGT ATA TAT GTG CAT CCT GGC CCA CTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT  
 2985 TAT ATA ACA TGA TTT ACA CTT AAT ACA TGG AGC CTT TCC TTG TTA CTT CAT ACC ATC CTC TGG GGG AGC CAC  
 3043 TTC CTT AGG GGC GGA CCG CAC TCC CAG GGT CAT CTT CCA CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG  
 3121 CBT GBT CTT CBT GBA CAA CTT CTA CCC CAG ABA CAA CTT CTA CCC CAG ABA CAA CTT CTA CCC CAG ABA CAA CTT CTA  
 3199 CCG CBT GBT GBA CAG CBT GAC CCA GBA CAG CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA  
 3277 GGT GGA GTA CBA GAG GCA CAA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA  
 3355 CAA CCG GAA CBA GAG GTC TTS AAG ACA AAG GTC CCG CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA  
 3433 AGG TCT TGG AGG CTT CCC CAC AAG CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA  
 3511 CCT CCC TTT CCA TAC TAA ATG GTA ATG AGT TGT TTT TCC ACT TAC TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT  
 3589 TGT CTT TCT TAC TAA TGA ATG GTA ATG AGT TGT TTT TCC ACT TAC TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT  
 3667 GTT GCC CTS ABA TCC ACC ACA CTT ABA GBA TAA ABA ABA CCA TCC ACT TGC CTT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT  
 3745 TCC TTT CTA AGG TTC AGG AGT ACT AAT CAA GBA TAA ABA ABA CCA TCC ACT TGC CTT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT  
 3823 TTT TCT TCC CCA AAG TCG TCA AAG TCC TGA AAG GGA ACA GTC TTT ACA AAG TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT  
 3901 CCC AGT AAA CTT GGC GAA GCA AAG TAG AAT CAT TAT CAC AAG AAG CAA AGC CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA  
 3979 ATG TGG AAG CCC ATC ATA GTA CTT GGA CTT CAT CTG CTT TTT TGG CTT TAT AAG GAC CTC TAT ACC GTG AGA TTA CAC ACA TAC ATC  
 4057 ATC TGC CAT TGG CAA GGC TGG GCA CTA CCC ACA ACC TAC TTC AAG GAC CTC TAT ACC GTG AGA TTA CAC ACA TAC ATC  
 4135 AAA ATT TGG GAA TAG TTC TAC CAA GCT GAG AGC TGA TCA CCC CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA  
 4213 TAA GBA GCA ACC AGT ATT GAG AGA CTC ATT TAT GAA CTT AAT TAA ABA ABA CCA TCC ACT TGC CTT TGT TGT TGT TGT  
 4291 ATT ATG ACA TGT TCA CBA TTG AGC TAT TAC TTA TGA TGA AGA ATT AAT TAA ABA ABA CCA TCC ACT TGC CTT TGT TGT TGT  
 3369 CAT AAA CAA GAT AAT AAG CAA AAC AAA ACA TTT TTT CAT CCA TGT AAG ATT ABA ABA ABA CCA TCC ACT TGC CTT TGT  
 4447 GAG ACA TAA GTT TTT AGG TAG CAA GAT GBA AAC TCT GGG GCT TGG GBA ATG TTC TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT  
 4525 GTT ACT ATT GTG GAA TTG GGA TCT ATG TTC TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT  
 4601 ATC CAG CAT CAA ATC TTC CCA CAC AAC CTT GAG CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA  
 4769 CAA ACA CAT GAT CCC TCC TTG GGG TCT CTT CTT TCA TGC ATC GAA TTA GAA ATG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT  
 4837 AGA CCT TCA TCA ACA GAT GBA ABA TAA TAA TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT  
 4915 GGA AGG AAG AGG ACA CTA  
 5093 CAT CCA CTC AGC ACA CAT TTA CCA AGC ATC TTC TCA GCC TAC ACT CTG AAG GCA GAT AAT GTT AGT GTC GTC GTC GTC  
 5171 TCC CCC AGT TAA TAT GCA GTC CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA  
 5247 TTA ATT GCT TTT TTT TAA TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT  
 5305 AAC AGT GCC TCT AAT CTG GCT ATT AAT ACA ABA ATG CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA  
 5383 CCC ACA ATA ABA AAG AAG ABA GBA TAC TAA TAA TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT  
 5461 TAA TCT AAT GTC ACA TGC TGT ATT CTT TTT ATT TAA CAC TGG TGA AAT TAG ACC TTT ABA GAG ABA GAG CAC ACA TCA  
 5539 CTG ATC CTA GBA TCT AGG GAT GAT ACA AAG ABA ACA AAT GTS ACA AAG AGC TGT CAC AAG GAG GAT CTT CBA GGT  
 5617 CAC AGA ATC ACT GTC TTT ATT TCA GTG GTS GTT ACA TAC ATT TAA TGT GAT AAA ATG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT  
 5695 ATA TTG TAC CAA TGT CAA ATG CTT AAT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT  
 5773 TGA TGT TTA CAT CAA AAG TGA GGC CAT ATT TGT TAG GAA CAA AAT AAC ATA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA  
 5851 AAT TTG TCT GCC TTG GCA TAT CAT CCA TAA GCT ACC ACA TAG ATT TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA  
 5929 CTG CCC AGC AAG CAG GCA CBA GAT ABA ABA GCT ABA CCA ABA CCA ABA CCA ABA CCA ABA CCA ABA CCA ABA CCA ABA  
 6007 GBT GTT GCT GAC CTA GTS AAG CAG CCC CBA GCT CTA GCT GTS AGC CCA AAG CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA  
 6085 AAA TTG GAA CTT TGG GAA TGG TGT GCA TGG TGT GCA TGG TGT GCA TGG TGT GCA TGG TGT GCA TGG TGT GCA TGG TGT  
 6163 TAC CAG TCT ABA AGC TTC CAA AAC TTT CTC ACT GAA GAA GAT TCC CCA TGT TGT GGG ACC CCA GAC TCT TTT GCC CBA

ФИГ.12 (продол.)

6241 ACA ACT GCT TCC CTG TAT TAT CTG TTT TGC TTT TAT GTT AGC ATA ATA TTA TAA GGA ATG TTT GTG TGA ATA  
6319 AAC CAA ACA TAT TTT AAA AGC AAA TAT TGT ATG CAC ATC CTA ATT GCT AAA MAG TTT ACA GCT BAI AGT CCC ATG CTC  
6397 TCC AGA AFA CTG GAT CCA ANT BAG TCC TAA TTT CAA TGT TGG GCA TCT TTA CAG AGA AAG CAA TAA AAA TGA AGA  
6475 GAC ATG CAG CAC AGA GTG CAC CAT GCC ATC GTG GAG AGA GAC TGA ACT GAT CRA AGA GGA TTA AGG ACT  
6553 TCC AGA AGC CAA AGS AAG GAG GTA TGA AGT GAT TTC TCC CTC AGA GTA TCC AGA GBA TBA ACC AAC CAA CAC  
6631 CTT TTT GCT TBA GAC TTC COT TCA GBA CTT TGA GAA GAT AGC TTA GCT GAG TTT TCC GAG CCC TTC CTT CTT  
6709 TTT TTA AGS TAG APT CAA GAA ACC PAT AAA ATG CAG ACA AAA AGS ATA GCT GAT TTT TTT TTT GGG GAG TTT TTT  
6787 ATT TTT GAT TTT GTT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT  
6865 GGG GTT TTT TTT GTT TTT GTT TTT GTT TTT GTT TTT GTT TTT GTT TTT GTT TTT GTT TTT GTT TTT GTT  
6943 TTT TTG TTT TTA GAC AGT GTT TCT CTG TAI AGC CCT GGC TGI CCI GGA GTT CCI TCT AIC TCT AAT GTG TAC AIC  
7021 TCA GAG GGG ATC CTC TBA TTT CAA ATG AGC AGT GCT CCA TTT TTA GCT CTT ATT TAT TCA TTT ATT TAC TTA CTT  
7099 ACT TAT TCT CTG TAG ATG ABA GAA TTT TGG ACT GGG AAA GGG TTC ATG AGC CCA CTA ATG AGS AGC TAC AGA  
7177 CAA TTG ATG TTT CTG GGG AAA GGA GAC TCA GTT TCT TTG ABA GTA TAG CTT CTG ATG GGT CAA CCA TGT TCC TGT GGC  
7255 TGA TGT CAC ACC CAG GAG TAT GCA GAC AAC AGA AGC TGG AGT TAA TGA GTT TTA AAA ATA AAA ACA TTI CTT TTT TTA  
7333 CTT GGG ATA GAA ATT AAG GAT AAA TAC AAT TAA ATA CAG GAA ATT CTG AAA GAA TTA ATA AAA ACA TTI CTT TTT TTA  
7411 AAA AAA MAT CCA GAA TTA GCT ATG CTT CTT CAA MAT TGC TTT TGS AGA ACT TTA CAA GTT AAA TAA GTT ATA TTT TGS  
7489 AAA AGG TAG AGA GGA TAG TGG AAG AGA GAG ATA GAG AGA GTT CAA MAG CAG TGG AGG AGA GAG AGG ATG GGT ATT TCT TTG  
7567 GCA GAA GCA ATG GCT GAT AGA CAC AGS ATA AGA GGG AAC GAG AGA GAG CCA AGG AGG ATG GGT ATT TCT TTG  
7645 CCT ATC TGT GAC TTG CAG ATG GTC TTG GCA ATT AYT GAT GAG TTC TAG TGT TCA TGT ATG CAC TTA TCT GCT TAT AGC ANT CCT  
7723 GAG TCT TTC TTT CTT ATA ACC AGS CCC CCA GAT TGC TCA TGT ATG TAT CAG CTC TTA TCT GCT TAT AGC ANT CCT  
7801 GTT TAT AAC TGG GTA ACT TTG TGA AGS GAA GGA APT GCA CAC TGA GAT GTG CTA CAA CTT TTT MAT ACA AAA TTT TGA  
7879 AGA GHT TGT ACA ATG TAT GTA TAA TTA ATA ATT AAT ATT ATG CAC TTT AGA TTT TGA TTT CAA CTC AGA ATA CTA ATT  
7957 CTA TAT ATA TGG GTT AAA TCA TAA TAT TAA TTT CAC ATG CTT ATT TTT ATG GTG GTT TTC GAG ACA GGG  
8035 TTT CTC TGT ATA GCT GTC CTG GAA CCC ACT TTG TAG ACC AGS CTG GCT TCA AAC TCA GAA ACC TAC CTG CCT  
8113 CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT  
8191 CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT  
8269 CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT CTG CCT  
8347 TCT CAT TCT ATC ATC ABA TAG GAC TGT GTA GAC TGT TGC TTT GCT TTG TTT GCT TTG TTT GCT TTG TTT GCT TTG  
8425 TGT APT GPT  
8503 CTT TGC TTT GCT TTG CTT TGC TTT GCT TTG TTT GCT TTG TTT GCT TTG TTT GCT TTG TTT GCT TTG TTT GCT TTG  
8581 GGA GAA AGA ATC CTA TGA AGC TCT GAC TGT COT GGG AAC TCA TAT AGA TCA GGC TTT ATT CAA CTC ATA GAG  
8659 ATC TGC CTT CTT CTG CCT CCC AAG TGC TGG GAA TAA AGG CAT ACA CCA TCC CCA AGT GAT CCC MAG TTT TAG  
8737 CAA MAG TTT CTA CAC TTG ACA TTA ATC GAT GGA CAT GAA TTA CAC ABA GAA CTA ATG TGG AGT TTA CCT GAA  
8815 TCA TAC TCT ATA CTT TBT CAG ABA TTA CAT TTA ATG ATC CAG TGC CAG GCT AGA GGC ACC ATT CAA TGG CAG  
8893 TGT TTG CCA TCA TCC ATA GSC TTA GTC TTC AGT GCT GAA AGG CAT TGG GGG CAA TAT TAG TCA TTA TAG ABA TGA SBA  
8971 ACT GGG AAA GAC TTG CCT CAG ATT CTC TAC TGA ANG GCT GAG TTT GTG GCT TCT AGA ABA TCT TTT ACT TTC MAT ATT  
9049 TTT AAT GTA TAA TTT  
9127 MAT ACA TGG ACA AAA AAA TAC MAG MAT CAT ATG AIC ACC TCA ATG GAA GGA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA  
9205 AAG ATT CAA CAT TCA TTC TTT TTT TAT TAG ATA TTT TCT TCA TTT ACA TTT CAA ATG CTA TCC CCA AAG CCC CCT ATA  
9283 CCT TCC GCT GGC CTG CTC GCG AAC CCA CCT ACT GCT CTG TGG CCC TGG CAT TCC TCT GTA CTG AGG CAT ATG ATC  
9361 TFC ABA ABA CCA ABG GCG TGT CCT CTC APT GAT GGC CAA CTA TTA GGC CAT CTT TTG CTA CAT ATG CAA CTA GAG ACA  
9439 CAG CTC TGG GGG TTA CTG GHT AGT TCA TAT TGT TAG TCC TCC TAT ABA GHT GEA GAC CCC TTT AGC TCC TTG GAT ACT  
9517 TTC TGT AGT TCC TTC ATT AGG GSC CCT GTG TCC CCA ATA GAT GAC TGT GAG CAT CCA CTT CTG TAT TTG CCA GGC  
9595 ACT GGC ATA GCC TCA CBA GNA AGA GAG AGC TAT CTC TCA AAA TCT TTC TGG CAT ATG CAA TAG TAT  
9673 CTG GAT TTG GTG GTT GTA TAT GGG ATG GAT CCA CAA GTT GGG TAG MAT GGT CCT TCC TTC CAT ATC AGC TCC  
9751 AAA CTT TGT CTC TAT AAC TCC TTC CAT GGG TAT TTT TTT CCA TCT AAG TAG TAT CCA GGT ATC AGT GAG TGC  
9829 TFC CTT CTT GAG TTT CAT ATG TTG TTS CAT CTT GGA TAT TCT AAG TTT CTG GAT TAA TAT CCA GGT ATC AGT GAG TGC  
9907 AFA TCA TGC GTG TTA TTT TGT GAT TAG TTT ACU TCA CTC AGS ATG AFA TCC TCC AGA TGC ATC CAT TTG CCT MAG MAT

20/79

ФИГ.12 (продол.)

9385 TTC ATT AAT TCA CTG TTT TTA ATT GCT GAA TAG TAG TAC TCC AIT GTG TAA ATG TAC CAC AIT TTC TGT ATC CAT TCC TCT  
10643 GTT CAG GGG CAT CTG GGT TCT TTC CAG CTT CTG GCT AAT AAG AGC ATA GCG GAG CAT GTG TCC  
11141 TTA TCA AGT TGG AAC ATC TAC TAG GTA TAT GGC CAG GAG AAT TGC TGG TAG CAT CAA CAT GAA GCA  
12219 TTC TTA ATA AAA GCC CTA GAA CAA GAA GAA CTG TAG GAA AGA TAT TCC AGC ATA ATA AAG GTT AVG TAT GAC AAA CTC  
12257 ATG ACC AAT ATC CTA AAT GAG ATT GAA TGA GAA CAA GAA CAA GAA CAA TTA AAA TGA GAG GAC TGC CCA CTA TCC CTA CTT  
13375 CTC ATC CTT AAT GAT ATT GAA TTA TTA TCT TAT ACC CAA TGA CCT CAA ATT TTG ACT AGA AAA AAT GTA GAA AIT ATC  
14453 AAT TGT TTT CAA TTG AAG ATT ATA TTA TCT TAT ACC CAA TGA CCT CAA ATT TGG ACT AGA AAA AAT GTA GAA AIT ATC  
14531 AAT AAT TTC AGC AAA GTG TTA TGA TGC ACC ACA TCT TTA TTC TCC CCA GCT GAG TGC AGC GTG TAA CTC TGT GAC TGA  
14639 CTT CAT CCT TTC TGT CCT TCC ATC TGC CTG CAC TCT TGT TTT CTG AAG CTA TGA GGC TCT CTA CAT AGA  
16687 GTA TCT CAC AAA AGC TTC TAC CTG CGA AAC CTG GAT GAG CCC TTT GTC AAG CAT TGC CAT TGC TGT GCT CCT  
10785 CTC AAG AAG CAA AAG ATG ACA GGG AGG AGG TAA TAA TGA AGT GGG GAA GGC TGA CAT TAG CAT TGC TGT GTC GCT CCT  
10843 TAA TTT CTC ATA CTT CAC ACT GAG ATG TTA TTA ACT CTG ACT CAT AGG TGA AGA AGC TAA GGT TCT CAT ATT  
10921 TGA GTG TTA TAG AAT GAG TAG AGC AAT TCT TCT CAA ACT ATG GAT CAT GAC TCC TTT ATG GGT GAA ACT ACC CTT TCA  
10939 CAC AGG TTG CAT ATC AGA TAT CCT AAT TTT ATR TAG ATA TAT ATR TGC ATA TGT TTA ATA TAT TAT TTC ACA ACA GTA  
11077 GGA AAA TTA TTT AGT AAT CAT TTT ATA GTT GTG GGT CAT GGC AAC ATG AGG AAC TGT AIT AAA GGG TTG CAG CAT TAG  
11155 GAA TGT TGA GAC CCA CTG TAA TAG AGA ATG AGG CTT AAG GAA CAT TGG TTT GTA ATT TTA AAT GGA TAA GGG TCT TCA  
11233 ACA TTT GCC ACA TGG TAA GCT CTG TAT AGA CTT TTT AAA GAA CAT TGG TTT GTA ATT TTA AAT GGA TAA GGG TCT TCA  
11233 ACA TTT GCC ACA TGG TAA GCT CTG TAT AGA CTT TTT AAA GAA CAT TGG TTT GTA ATT TTA AAT GGA TAA GGG TCT TCA  
11239 AGR CAT AGC AGT GAA ACA TGG ATG ATG ACC AAA TAG GAA ATC CAT TCC ACC ATG GAT TCA AAT GCA AAA ATC CTC AAC CTA  
11489 CCA TCT TGC AAC AGA GTT CTA CTT TGC TAC CAG TAA TGA ATA CAG TGT CTC AAC TCC CAG CAT TGA ATC TTC AGG AAG  
11545 CCC CTG AAA TGA CTT GTA CTA CAC CAT TTC TTA AAG ACA GAA AAG CTA AGR CTT AGR GGG AAT AAA TGT CAT GCC TGA  
11623 GAT CAT GCA ACC AAT TAA GTG CAA CTT GGC CTG ATC AAG AGG CAC AAT TCA AAA GCA ATG TTG TTC CTT CAC TAG CTC  
11701 TTG TGT ATG GTT GCT GAT TCC GGA AGC AAA GTA TCA GTG AAT ATC CCT AGT GGG AAA AGA CTT GGA AAT CAA ATG TTT  
11779 CAT TTA ACA GAT TAG GAG ATG AAA CGS TAG ACT CTG TGT AAT AAT CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA  
11857 GGC AGG AAG TCC TCG AGC TCA AAC CAG CTT AGS CTA CAC AGA GAA ACT ATC TAA AAA ATA AIT TTC TAC CTG GTA TGT TTT  
11835 GGA GAT TGG AVG TTA AGA TCT GGT CAC TAA GAG GCA GAA TTG AGA TTC GAA GAA ACT ATC TAA AAA ATA AIT TTC TAC CTG GTA TGT TTT  
12013 AAA TTG CAG TAA GGA TCT BAG TGT AGA TAT ATA ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR ATR  
12091 TTG TTT GGA AAA AAA TAT TAT CAG CCA ACA TCT TCT ACC AIT TCA TAG CAC AGA GTA CCC ACC CAT ATC TCC CCA  
12159 CCC AIT CCC CAT ACC AGA CTG GTT AIT GAT TTT CAT GAT GAG TGG CCT GAG AAG AIT AAA AAA AHA AGT AAT GCT ACC TTA  
12217 TTG GGA GTG TCC CAT GGA CCA AGA TAG CAA CTG TCA TAG CTA CCG TCA CAC TGC TTT GAT CAA GAA GAC CCT TTG AGG  
12225 AAC TGA AAA CAG AAC CTT AGC CAC ATC TGT TGC TTT GGC TTT GGC TCC CAT CCT CCA ACA GCC TCG GTG CAC TCC ACA  
12403 CCC TTT CAA GTT TCC AAA GCC TCA TAC ACC TGC TCC CTA CCC CAG CAC CTG GCC AAG GCT GTA TCC AGC ACT GGG ATG  
12481 AAA ATG ATA CCC CAC CTC CAT CTT GTT TGA TAT TAC TCT ATC TCA ACC CCC AGG TTA GTC CCC ACC AAT GCT TTT  
12559 GCA CAG TCA AAA CTC AAC TTG GAA TAA TCA GTA TCC TTG AAG AAT TCT GAT ATG GTC ACT GGG CCC ATA TAC CAT GTA  
12715 AAT AGT TTG GCC ATC TTT AGG CTG AGA GAC TAG GAA ATA CAG TGG ACT ATA TCA GTA TTG CAG GAT AGT TGT CAG  
12753 TAA ACA CCC CAC AAC CCA TAA CAG AAG TAT TCT CTT TCT ATA TCC CTT TTC CAT CCA TGT AGA TGG CTG TCT TCA  
12871 TAT TTG TTC TAG ACG GCC GGC C

ФИГ.12 (продол.)

VKP-16KV1-39/J-CK-A2

1 66C 68G CCC ACA TGA AAC AAT 66G AAC CAT 6TG ACA ATC ACA 6AG 6TG TTG TTA CTA TAG CAA 6AG 68A TTG TTA CTC  
79 TCC ACA TCC CTT TAA 6TA ACT TGA 6GG CCT 6AT 6GA CCC ACC CTC TAA 6AG 6TC TTT 6TA 6TA 6TA 6AG 6TT 6AC  
157 ATA 6TC TCC TGT ATA CTC CCA CAT 6TA 6AT 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA  
155 TTT  
313 GCT 6GT 6TG ACC TGG 6AC CCT 6GG 6AC AAT 6CC CTT 6TG 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA  
391 6CT T6C CCC ATG CCC T6C T6A TTG AAT T6C ATG TTG T6C T6C T6C T6C T6C T6C T6C T6C T6C T6C T6C T6C T6C T6C  
489 T6C 6AC CCT 6TG 6AG 6AG T6A 6TC 6TC 6AG 6AC CAT 6AT 6GA 6AT 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA  
547 6CT ACT 6TG 6CT 6CG 6GG T6A 6GA T6G 6GG ACA 6TA 6GA 6AT 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA  
625 6GG 6AA 6TT 6TC T6A T6A 6AT 6AT 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA  
703 TCC 6GA T6A CCC 6GA 6CC CCA 6CA 6CC T6A 6GG 6GG 6GG 6GA 6GA 6GA 6GA 6GA 6GA 6GA 6GA 6GA 6GA 6GA 6GA  
731 6CA TCA 6CA 6CT ACC T6A 6AT 6AT 6TC 6AG 6AG 6AG 6AG 6AG 6AG 6AG 6AG 6AG 6AG 6AG 6AG 6AG 6AG 6AG 6AG  
859 T6C 6GA 6GG 6CG T6C CCA 6CA 6AT TCA 6GG 6CG 6CT CCA 6CC 6CA 6CC 6CA 6CC 6CA 6CC 6CA 6CC 6CA 6CC 6CA  
937 CCG 6GG ACT TCG CCA CCT ACT ACT 6CC 6AG 6GA 6GT ACA 6CA CCT 6CG 6CC 6CA CCT 6CG 6CC 6CA 6CC 6CA  
1015 TCA 6AC 6TA 6AT 6CA 6TT TTT 6TG T6C T6C T6C T6C T6C T6C T6C T6C T6C T6C T6C T6C T6C T6C T6C T6C T6C  
1093 6AA 6AT CTT 6AG 6AA ATG 6RG 6GG 6CT CAT TAT 6AG TTG 6GG T6C 6AT 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA  
1171 6TG 6GA TTA 6GG 6CA AAA 6GA 6GC TTT 6GT T6A 6AG 6AT 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA  
1249 6GA 6AA TAA 6CA T6A 6TA 6TT 6AT 6AG 6TC 6GG 6TC TGA 6TG 6AG 6TA 6GG 6TG T6C T6C 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA  
1327 TTT 6GA 6GG 6AT 6AG 6AA TGA 6GG AAC TTC 6GG 6TA 6AG 6AT 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA  
1405 6AG 6AA ACT TTG 6AG 6TA 6AG 6TA 6AG 6TA 6AG 6TA 6AG 6TA 6AG 6TA 6AG 6TA 6AG 6TA 6AG 6TA 6AG 6TA  
1483 6AG 6AG 6AG ACT CAT 6CG T6T TGA 6TT TCC 6CA 6GT ACT 6TC TTG 6GT TTA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA  
1551 6TG 6GC 6GT 6GG 6TG 6GT TCT CTC TTT T6T 6TC 6TA 6GT TTT 6AT 6AG 6TA 6AA 6AT 6AG 6TA 6TA 6TA  
1639 TCA 6TA 6GG T6T 6TA 6GA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA  
1717 TTA TTG TAA 6AT TTG TCA 6AA 6AT 6TC 6AA 6AT 6TC 6AA 6AT 6TC 6AA 6AT 6TC 6AA 6AT 6TC 6AA 6AT 6TC 6AA  
1795 TTT TTC CTT T6T 6TC AAT TCT ACA T6A 6AG TAA 6AT TGA 6AC 6AT T6C T6C T6T 6TT 6TT 6TT 6TT 6TT 6TT 6TT  
1873 TTT 6AA 6TA 6AT 6TT TTA 6TG 6CC 6CG 6TT TTG TAA 6AC 6AT T6C T6C T6C T6C T6C T6C T6C T6C T6C T6C T6C  
1951 TTT TAT 6TC 6CC 6GC 6AT 6GA 6TG 6AA 6GG 6TC 6CA 6CC TCT TCT TTA 6AA 6TG 6GT 6AT 6TA 6TA 6TA 6TA  
2029 6AT TGG 6BT TCA 6CC T6C 6AG 6AA 6GG 6CA 6GG 6CA 6GG 6CA 6GG 6CA 6GG 6CA 6GG 6CA 6GG 6CA 6GG 6CA  
2107 6AG 6CA 6AG TGA 6AG 6CA 6AG 6GC 6AC TAA TCT 6AA 6AG 6AA 6AG 6AA 6AG 6AA 6AG 6AA 6AG 6AA 6AG 6AA  
2185 6GG 6AA 6GG TGA CTT 6AT 6GA 6AT TTT 6CA 6AT 6AA 6AG 6AT 6AA 6AG 6AT 6AA 6AG 6AT 6AA 6AG 6AT 6AA  
2263 6GA 6TT 6GA 6GG 6TA 6AC T6T 6TC 6AG T6T 6AT 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA  
2341 6TA 6AG 6CA 6CA 6AA 6TC 6TG 6TA 6AT 6AT 6TT 6TA 6AG 6TC 6CA 6TA 6AT 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA  
2419 6TG 6TT 6AA 6TA 6TA 6AT 6GT 6AC 6TG 6AT 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA 6TA  
2497 6AT 6AT 6AT 6TA 6CA 6AA 6AT 6TT 6CA 6TA 6TT 6GT 6AT 6AA 6AA 6AT 6TT 6AC 6CA 6GT 6AT 6TA 6TA  
2575 6CA TAA 6TT TGA 6AA 6TA 6TT 6TT 6TG 6TA 6AC 6AA 6GG 6CA 6TA 6AG 6GC TAA 6AT 6AG 6AT 6TT 6TT 6GA 6GA  
2653 6AC 6GG 6GA 6AA TGA 6AG 6CA 6TT 6CT 6CT 6CT 6CT 6CT 6CT 6CT 6CT 6CT 6CT 6CT 6CT 6CT 6CT 6CT 6CT  
2731 6TA 6AC TGG TCT 6AA TCT 6TG TCT 6AA 6CA 6GG 6AC TGA 6AA 6GG 6AC TGA 6AA 6GG 6AC TGA 6AA 6GG 6AC  
2809 6CC T6A 6BA TAT CTT 6BA 6GG 6TC 6GA 6TC 6AT TTA 6TT TCT 6AA 6BA 6TA 6GT 6TC 6GG 6AC TGA 6AA 6GG 6AC  
2887 6AA 6AA 6AT T6T 6TA 6AT 6TG 6AT 6CT 6GC 6CC 6AT 6TT 6CT TAT 6TG 6GA 6TA 6GG 6TC T6T 6TT 6TG 6GT 6TG  
2965 6AT 6TA 6CA 6TA 6TG 6TT 6CA 6AT 6AT 6CA 6TG 6AC 6CT 6CT 6CT 6CT 6CT 6CT 6CT 6CT 6CT 6CT 6CT 6CT  
3043 6TT 6TC 6GG 6GC 6GA 6CC 6CC 6CT 6CT 6AT 6TT 6CC 6CC 6AG 6AT 6GA 6CA 6GT 6GA 6AT 6GA 6CA 6GA 6CA  
3121 6GT 6GT 6TG 6TT 6GT 6GA 6AA 6TT 6TA 6CC 6AG 6AA 6AT 6GA 6AT 6GA 6AT 6GA 6AT 6GA 6AT 6GA 6AT  
3199 6GG 6GT 6GT 6GA 6AG 6GT 6AC 6GA 6CA 6GG 6CA 6CA 6GG 6CA 6CA 6GG 6CA 6CA 6GG 6CA 6CA 6GG 6CA  
3277 6GT 6GA 6TA 6GA 6AG 6CA 6AA 6CT 6TA 6AC 6TC 6AG 6AT 6CA 6GG 6CA 6CA 6GG 6CA 6CA 6GG 6CA  
3355 6AA 6CG 6BA 6GA 6TG 6TG 6AG 6CA 6AG 6TC 6TG 6GA 6GC 6AT 6CC 6CT 6CT 6CT 6CT 6CT 6CT 6CT  
3433 6AG TCT T6G 6GG 6TT 6CC 6AC 6AG 6GA 6AT 6CT 6CT 6CT 6CT 6CT 6CT 6CT 6CT 6CT 6CT 6CT 6CT 6CT  
3511 6CT 6CC 6TT 6CT 6GG 6TT 6TA 6TA 6TG 6CC 6AA 6TA 6TT 6AA 6GG 6AT 6TT 6GC 6CT 6CT 6CT 6CT

22/79

ФИГ. 12 (продол.)

3589 TGT CTT TCT TAC TAA ATG GTA ATC AGT TGT TTT TCC AGT TAC CTG GGT TTC TCT TCT AAA GAA GAT AAA TGT TTA  
3657 GTT GCC CTG AAA TCC ACC ACA CTT AAA GGA TAA ATG AAA TTT TCC ACT TGC CCT GGT TGC TCC ACC ACA TGG CAG  
3745 TTY TCT TCC CCT BAI TCG TCA BAI TCG TCG AGG GGG ACA GTC TTT ACA AGC ACA TGT TCT ATC TGA TTC AAC CTA  
3823 CCC AGT AAA CTT GGC GAA GCA BAI TAG BAI CMT TAT CAC BGE ABG CAA AGG CAA TGT BAA TGT GCA AGC AAT AGG AAA  
3901 ATG TGG ABG CCC AIC ATA GTA CTT GGA CTT CAT CTG CTT TTG TGC CTT CAC TAA GHT TTT AAA CAT GAG CTG GCT CCT  
4057 ATC TGC CAT TGG CAA GGC TGG GCA CTA CCC ACA ACC TAC TCC GAC CAC TGT TAG GTG CTT AIC TCT GHA CAC CHG ABA CCT  
4135 AAA AIT TGG GAA AAG TTC TAC CAA GCT GAG AGC TGA CCC CTA AAT CTA AAA CTG GAT ACA ACC AAA ATG TCC ACC AAC AGT TAA  
4213 TAA GAA GCA ACC AGT AIT GAG AGA CTC AIT TAT TAA AGA ATT AAA AVA AAA CTT AAG AGC ATA GHT TTA TCA TCT  
4291 AVT AIG ACA TGT TCA CAA TTG AGC TAT TAC TTA ATA AGG AGA AIT AAT AAA AGC AGG TAA AAT TTA AAA TTA AGA  
4359 CAT BAA CAA GAT BAI ABG CAA BAC AAT ACA TTT TTT CMT CCA TGT AAG TTT AAA AGC AGG TAA AAT TTA AAA TTA AGA  
4447 GAG ACA TAA GTT TTG AGG TAG CAA GAT GGA BAI TCG TCG GGT TCG GGA ATG TTC TCT TCT GAT TGA TGG GAT GTG AAA  
4525 GTT ACT AIT GNG GAA TTG GBA TCT AIT TTC CTG TAT AIA TTG TAT ACT TCG AAG GCC ABG ACA ATA BAG TAG GGG  
4603 CTA ATA CCC AGT GCA TBC AFA BAA GAG BAI ACA ABG AAT GBA TCA TAC GTC AAG GCC ABG ACA ATA BAG TAG GGG  
4681 ATC CAG GAT CAA AIC TCC CAC AAC CTT GAG CTT TCT ACT AIT CTG CCT TCC AGA GCT CRA AGT ACA AAA CAC ATA AIT  
4759 CAA ACA CAT GAT CCG TCC TTG GGG TCT CTT CCT TCA TGC AAT TTA GAA GAG CCC AGC TAT CAA AGG TTA CMT TAG  
4837 AGA CCT TCA TCA ACA GGT CAA AGA ATA TAG GTA AIT TTG TCT GGG TAT GAA GAG CCC AGC TAT CAA AGG TTA CMT TAG  
4815 GGA AGS ABG AGG ACA CTA ACA GTG ACT TTC AIT CTC CCC TAC ACT CTG ABG GCA GTG CAG AAT AAT GTT AGT GTC CCT  
4893 CAT CCA CTC BGC ACA CAT TTA CTA AGC ATC TTG TCA GTC CMC ATA AGS ATG AAG ATA AAT GAT GTC CTT CTT  
5071 TCC CCC AGT TBA TAT GCA GTG CAG TTT CCG TCG TCC CTT TCG AGA ATG TAG AIT AIT AIC CAC TTT TTG BAA CTT CTT  
5149 CAC CAA ATA GGA GAG GGC AAT CCT TTG TCA BAI TCG TCG TCG AGA ATG TAG AIT AIT AIC CAC TTT TTG BAA CTT CTT  
5227 TTA AIT GCT TTT TTT TAA TTT GTC TTT TCA BAI TCG TCG TCG AGA ATG TAG AIT AIT AIC CAC TTT TTG BAA CTT CTT  
5305 AAC AGT GCC TCT AAT CTG GCT AIT AIT ACA AAA ATG CCT CTA AAT ATA TAT GHT CGA GTC TTA TCT BAA ACA GHA  
5383 CCC ACA ATA BAA ABG AAG AAA GAA TAC AFA TAA GCA TTT AFA TAA TTC TGA GCA ACC TTG TCG TTT GTG AAA AAA ATA  
5461 TAA TCT AAT GTC ACA TGC TGT AIT CTT TTT AIT TAA CAC TGG TGA AAT TAT ACC AIT AGA GAG AAA GAG GAC AGA TCA  
5539 CTG ATC CTA GGA TCT AGS GAT GAT ACA GAV ABG AAA ACA AAT GTG ACA ABG AGC TGT CAC ABG ABG GAT CTT CAA GGT  
5617 CAC BGA NTC ACT GTC TTG AIT TCA GTG GHT ACA TAC TAT TAA TGT GAT AAA ATG TTG TTG AAT TTT CAA GAT TAT CAT  
5695 AFA TTG TAC CAA TGT CMA ATG CMT AIT TTT GGC TCT AFA GTA TTA TTA TGT ACT BAA TBA CTA TTT GGA CAA AGA AAA  
5773 TGA TGT TTA CAT CAA AGG TGA GGC CAT AIT TGT TAG GAA CAT BAC TTA AAA ACC AIT TTG GAT BAC TBA TGA BAA GCC  
5951 AIT TTG TGT GXC TIS GCA TAT CAT GCC TAA GCT GTC ACC AGA TFG AIT TAA TAA GAT TTA GCA ACC TTG TCG TTT GTG AAA AAA ATA  
5929 CTG CCC AGC ABG GCA GCA CAG ATA AGA GCT AAA CCC AGS ACA GGC CAT GAT AIT CTG AFA ATG AAC TAC CTT CAA GGT  
6007 GGT GTT GCT GAC CTA GTG AAC CAG CCC CAA GCT GTG AGC CCG AAT AGC ACA CTA CTG CCC AAA GAA AIT ATA CAA  
6085 AAA TTG GMA CTT TGG GMA TGG TGT GCA GGA TGG TGT AIG CCG ACA CAC CTT CTC TAT TTG TTG TAT TGA  
6183 PAC CAG TCT AGA AGC TTC CAA BAC TTT CAC ACT CAA GAA GAT TCC CCA TST GGG ACC CTT ACA GAC TCT TTT GCC CAA  
6241 ACA ACT GCT TCC CTG GTG TGA TGA TGG ACC ABG AFA GCA ACT GTC AFA GGT ACC GTC ACA CTG CTT TGA TCA AGA  
6319 AGA CCC TTT GAG GAA CTG BAA ACA CAA GAA CCT TAG GCA CAT CTG TTG CTT TCG CTG TCC TCC BAC AGC ATG GCT  
6397 GTC TTT ATA TTT GAT CTA GAC GGC GGG CC

VKP-IGLV2-14/J-CK

1. GGC CGG CCC ACA TGA AAC BAI GGG AAC CAT GTG ACA ATC ACA GAG GTG TTG TTA CTA TAG CAA AAG GGA TTG TTA CTC  
73 TCC ACA TCC CTT TAA GTA ACT TGA AGS CTT GAT AGA CCC ACC CTC TAA GAC TTC ATT AGA CAT TCC CTA CGA ATG GTT  
157 TTA CTC TCC TGT ATG CTC CCA AVA CAA CTC TAA AAT ATG ATG AFA ATA ATG TTT ATG TTT GHA TTA ABG TTT GAC  
235 TTT TTT CCT TCA ABA TAT CTC TTG TCA CAA CAG GGG CTT TAG CCA GAA ATA CAT TCC CTC CAG GCA AAT CTA TGC TGC  
313 GCT GGT CTG ACC TGG BAC CCT GCG CTG AGT TAG TAA GAT GAG CCA GGC CTG CAG CAT CTG TGC TCA  
391 GCT TGC CCC AIG CCC TGC TGA AIT TGC ATG TTC CAG AGC ACA GGC CCC TGC CCT GBA GAC TTT TTT ABG GGG TGG  
469 TGG CAG CCT GNS CAG TCA GTC ABG AGC CAT GBA CAT GBA CAG GAT GCA GGT ACC GTC CCG CCA GCT CCT GGG GCT CCT  
547 GCT ACT CTG GCT CCG AGG TAA GGA TGG AGA ACA CTA GGA AIT TAC TCA GCG AIT GTC CTC AGT ACT GAC TGG AAC TTC

ФИГ.12 (продол.)

625 AGS GAA GTT CTC TGA TAA CAT GAT TAA TAG TAA TAT TTG TTT TTA TGT TTC CAA TCT CAG GTG CCA GAT GTC AGT  
781 AG3 TGG GCG GCT ACA ACT AGG TGT ATC AGC AGC ACC AGA GCA TCA GCA GCT GCA CCG GCA CCA TGA TGT AG3 AGG TGT  
859 CCA ACA GAC CCA GCG TGA ACA GAT TCA GCG GCA AGA GCA ACA GCA GCG ACC CCA AGC TGG TGT TTG GCG GGA GAA CAA  
937 TCC AGG CTG AGG AGC CGG ACT ACT ACT GCA GCA GCA GCA GCA GCA GCA GCA GCA GCA GCA GCA GCA GCA GCA GCA GCA  
1015 AGC TGA CCG TGC TGC GTA AGT ACA CTT TTC TCA TCT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT  
1103 GTC AGT TCA GAA AAT CTT BAG AAA ATG BAG GCG GCT CAT TAT CAG TTG AGC TGG CAT ACA GTG TCA GAT TTT CTG TTT  
1171 ATC BAG CTA GTG AGA TTA GGG GCA BAA GSA GGC TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT  
1249 GAT TGG ATC GGA GAA TBA GCA TGA GTA GTT ATT BAG ATC TGG GTT TGA GAA AGT CAA GTT CAG CTC CTA BAA  
1327 AGT GGG AGA TTT GGA GGG GAT GAG GAA TGA AGG AAC TTC AGG ATA GAA BAG GSC TGA AGT CAA GTT CAG CTC CTA BAA  
1405 TGG ATG TGG GAG CAA ACT TTG AAG ATA AAC TGA ATG ACC CAG AGG ATG AAA CAG CGC AGA TCA AAG AGG GGC CTG TGA  
1483 CTC TGA GAA GAG AAG GAG ACT CAT CCG TGT TGA GTT TCC ACA AGT ACT GTC TTG AGT TTT GCA ATA AAA GTG GGA TAG  
1561 CAG AGT TGA GTG AGC CGT AGG CTG AGT TCT CTC TTT TGT CTC CTA AGT TTT TAT GAC TAC AAA AAT CAG TAG TAT GTC  
1639 CTG AAA TAA TCA TTA AGC TGT TTG AAA GTA TGA CTG CTT GCG ATG TAG ATG CCA TGG CTT GCT GAA TAA TCA GAA GAG  
1717 GCG TGA CTC TTA TTC TAA AAT TTG TCA CAA AAT GTC AAA ATG AGA GAC TCT GTA GGA AGC AGT CCT TGA CAG ACA GCT  
1795 CAA GGG GTT TTT TTC CTT TGT TGT TCT TCA TGA TAA TAT TGA AAT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT  
1873 ACA GTT GGG TTT GAA CTA TAT GAT GTC ACC GAT GGA CTG AAA CCG TCC GCA CCC CGS CGS TGA CAT CCC TTG CTC GCG GTG GAC  
1951 CBA TTG TBA TTT TAT ATC GCC AGC AAT GGA CTG TAA GGG CCA TGT GAA CCC CGS CGS TGA CAT CCC TTG CTC GCG GTG GAC  
2029 GTG CCA GCT AIT TGG CBT TCA CCC TGC CCG TAA GGG CCA TGT GAA CCC CGS CGS TGA CAT CCC TTG CTC GCG GTG GAC  
2107 CAC TTT CCT GAG GCA CAG TGA TNG GAA CAG AGC CAC TAA TCT GAA GAG AAC AGA GAT GTG ACA GAC TAC ACT AAT ATG  
2185 AGA AAA ACA AGG AAA GGG TGA CTT AIT GGA GAT TTC AGA TAT AAA ATG CAT TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA  
2263 TTC TAT TAG GGA ATT AGA AAG GGC ATA AAC TGC TTT ATC CAG TGT TAT AAA AGC TTA ATG TTA ATG TAT ATA ATC TTT TAG  
2341 AGS TAA AAT CTA CAG CCA GCA BAA GTG ATG GTA AAT ATT CTT TGA CTG TCT CAC TAA ACT CCA TAT TAT TAT TAT TAT  
2419 TCA TAT TAA CTG GTT ABA TTA ATR TBA AIT TGT GAG ATG ACC TTA ACT GGT TAG GTA SGA TAT TTT TCT TCA TGC ABA  
2497 AAT ATG ACT AAT AAT AAT TTA GCA CAA ABA TAT TTC CCA ATA CTT TAA TTC TGT GAT SGA TAT TTT TTT AAC TCA TGT AAG  
2575 ACT ATA ATC CCA TAA TTT TGA AAA CTA TTT AIT AGC TTT TGT GTT TGA CCC TTC CCA TTA ACT TTA AAA TGA TGT CAA  
2653 GAC CCT TTA AAA CTC TTG TTS AAA CTA CTT TNG AGT CAT TBA GTT AIT TTA CCA CTT CTA ATA AIT CTA TTT TTC TTG GTA AAG AAC TCT  
2731 TTC CCT TTT AAC TAT TAA TTT TTA TTT TTA AGG GGG GAA AGG CTG CTC ATA AIT CTA TTA TTT TTC TTG GTA AAG AAC TCT  
2809 CAG TTT TCG TTT TTA CTA CCT CTG TCA CCC AAG AGT TGG CAT CTC AAC AGA GGG GAC TTT CCG AGA GGC CAT CTG GCA  
2887 GTT GCT TAA GAT CAG AAG TGA AGT CCA GTT CCT CCG AGG GTG TGA TGA AIT GCT CAG AAT AIT TCT GSA CAC CCA  
2965 GGC TAA ABA TTG TCC CAT GTG GTT ACA BAC CAT TAG ACC AGS GTG TGA TGA AIT GCT CAG AAT AIT TCT GSA CAC CCA  
3043 AAT ACA GAC CCT GGC TTA AGG CCC TGT CCA TAC TAC AGT AGG TTT AGC TTG GCT ACA TAA TTT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT  
3121 ATA TCA GAG TAT TCT TGG AAG AGA CAG GAG AAA ATG AAA GCC AGT TTC TGC TCT TAC CTT ATG TGC TTG TGT TGT TGT TGT  
3199 TCC CAA ACA TCA GGA GTG TCA GAT AAA CTG GTC TGA ATC TCT TGA AGC ATG GAA CTG AAA AGA ATG TAG TTT CAG  
3277 GGA AGA AAG GCA ATA GAA GGA AGC CTG AGA ATA TCT TCA AAG GGT CAG ACT CAA TTT ACT TTC TTA AGA AGT AGC TAG  
3355 GAA CTA GGG AAT AAC TTA GAA ACA ACA ATG TAT TAT TAC ACA TAA TAA TCC CCA CAT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT  
3433 AGC GTG CTT TTT TGT TGT TCT GTA TAT AAC ATA ACT GTT TAC ACA TAA TAA TCC CCA CAT TGT TGT TGT TGT TGT TGT  
3511 TCA TAC CAT CCT CTG TGC TCT CTT CCA GGG CCG AGG CCG TCA TCT ACC CCA GAG ACA TCA GCG TGA AGT GGA AGA  
3589 AGC TGA CTT CTG GCG GAG CCA CCG TGG TCT GCT TCG TGA ACA ACT TCT ACC CCA GAG ACA TCA GCG TGA AGT GGA AGA  
3667 TGG KCG GCA GCG AGC AGA GGG GCG TGG ACA GCG TGA CCG ACC AGG ACA GCA AGC ACT CCA CCA GCG TGA  
3745 GCA GCA TCA GGA GCG TGA CCA AGG TGG AGT AGC AGA ACC ACT AGA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA  
3823 CCA GCC CCG TGG TCA AGT CCT TCA ACC GGA ACG AGT GTT GAA AGC AAA GAT CCT GAG AGC CCA CCA CCA CCA CCA CCA  
3901 CTC CAT CCT ATC TTC CCT TCT BAG GTG TTG GAG GCT CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA  
3979 CTC CCG ACC TTC TTC CCG TCC TCC CTT TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC  
4057 GAG TCT TTG CAC TTG AGA TCT CTG TCT TTC TTA CTA BAT GGT AAT BAT CAG TTG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT  
4135 TTC TBA AGA AGT TBA ATG TTT AGT TGC CCT GAA ATC CAC CAC ACT TBA AGS ATA BAT ABA ACC CTC CAG TTG CCG TGG  
4213 TTG GCT GAC CAC TAC ATG GCA GTC CTT TCT AAG TAC TAT TCA TGG CTT AIT TTT TCT CTG GCG CAT GGT AGA  
4291 TTT GAG GAG GCA TAC TTC CTA GTT TTC CCC TAA GTC CTC GAG AAG GAG GAC AGT CTT TAC AAG CAC ATG

ФИГ.12 (продол.)

4369 TTC TGT AAT CTG AAT CAA CCT ACC CAG TAA ACT TGG CGA AGC ABA GTA GAA TCA TTA TCA CAG GAA GCA AAG GCA ACC  
4447 TAA ATG TGC AAG CAA TAG GAA AAT CTG GAA GCC CAT AGT ACT TGG ACC TGA TCT TCT GTG GGT TTT CTA CTA ACT  
4525 TTT TAA ACA TGA GCT GGC TCC TAT CTG CCA TTG GCA AGG GTC GGC ACC CAC AAC CTA CTT CAA GGA CCI CTA TAC  
4603 CGT GAG ATT ACA CAC ATA CAT CAA AAT TTG GCA AGC TGA GAG CTG ATC ACC CAC AAC CTA CTT CAA GGA CCI CTA TAC  
4681 TAT CTC TGT ATC ACA CCA AAC TTA AGA AGC AAC GAT TGA AGC TCT TTA TGA AGC TCT AAA ACT GGA TAC AAC  
4759 CAA AAT GTC CAC CAA CAG TTA AAT TAT GAC ATG TTC ACA AAT GAG CTA TTA CTT AAT AAG GAG AAT TAA TAA AAT AAA  
4837 ACT TAA GAG CAT AGT TTA TCA TAA ACA AAG TTA TAA GCA AAC CAA AAC NTI TTT TCA TCC ATG TAA GTT TAA AAG  
4915 CAG GTA AAA TTT AAA ATT AAG AGA GAC ATA AGT TTT GAG GTA GCA AGA TGG AAA CTC TGG GGC TTG GGG AAT GTT CTG  
4993 TCT CTC TGT ATG GGA TGT GAA AGT TAC TAT TGT GSA ATT GGG ATC TAT GTT CTT CCT GTA TAT AAT GTA TAC TTC ATA  
5071 ATA ACT TCA CCT AAA GAA ATA TCT AAT ACC CAG TGC ATA CAT AAA AGA GGA TAG AAC GAA TGA ATC ATA CCI CAA GGC  
5149 CAG AAA GAC AAT AAA GTA GGG GAT CCA GGA TGA AAT CTC CCA CAA CCT TGA GGC TTC TAC TAT TCT GGC TTC CAG AGC  
5227 TCA AAG TAC AAA ACA CAT APT TCA AAC ACA TGA TCC CTC CTT GGG ATC TCT TCC ATG ATG CAT CGA ATG AAT AGC  
5305 CAT GTA TCA AAG GTT ACA TTA GGG AAG GAA GAG GAC ACT AAC AGT GAT TTT CAT TCT CCC CTT GGA GGC CCC  
5383 CAC ATT TGA TCC CTC GTG GGC TCA TCC ACT CAG CAC ACA TTT ACT AAG CAT CTT CTC GAC CTA GAC TCT GAA GGC AGT  
5461 GCA GAA TAA TGT TAG TGT CCC TTC CCG CAG TTR ATA TGC AGT CCA GTT TCC CTC CTT GAG AAT GTA CAT TAT  
5539 AAG GAT GAT GGG AAA GGA CAG TCA CCA AAT AAG AGA GGG CAA CCC TTT GCC TTC CTA CCT CTT GAG AAT GTA CAT TAT  
5617 TMT CCA CTT TTT GAA ACT TCT TAT AAT TGC TTT TTT TTA TTT TGT CTT TTT AAA TAG CAA CAA CTT GAT CTT CAT CCA TTT  
5695 CTV GGA ACT AAA ATT ATC AAT CAA CAG TGC CTC TAA TCT GGC TAT TAA TAC AAA AAT GGC TCC TCA AAA TAT ATA TGT  
5773 TCG AGT CTT ATC TAA AAC AGA ACC CAC AAT AAA GAA AGA ATA CAT ATA AGC ATT TAT ATA ATT CTG AGC AAC  
5851 CTT GTG CTT TGT GAA AAA AAT ATA ATC TAA TGT CFC ATG CTG TAT TCT TTT TAT TTA ACA CTG GTG AAA TTA TAC CAT  
5929 TNG AGR GAA GGA GAG AIC ACT GAT CCT AGG ATC TAG GGA TGT TAC AGA TGT TAC GAA AAC AAA TGT GAC AAA GAG CTG  
6007 TCA CAA GBA TCT TCA NGS TCA CAG AAT CAG TGT CTT GAT TTC AGT GGT TAC ATA CAT TTA PAT ATG TGA TTA  
6085 AAT GGT GTT GAA CTA TAT TCA TAT ATT GTA CCA AIG TCA AAT GCI TBA TTT TGG CTC TAT AGT ATA ATT ATG CAC TBA  
6163 ATA ACT ATT TGG ACA AAG AAA ATG ATG TTT ACA TCA AAG GTG AGS CCA TAT TTG TTA GGA ACA TAA CTT AAA AAC CAT  
6241 TTT GGA TBA CTA ATG AAA AGC CAT TTT GTG TGC CTT GGC ATG TCA TGC CTA AGC TGT CAC CAG AFA GAT CTA ATA AGA  
6319 CCT AAG CCT CAG AAG CAA GCC CCT GCC CAA GCA GGC AGC ACA ACC AAG AAG TAA ACC CAG GAC AAG CCA TGA TAT  
6397 GCT AAT GAA CTA CCT TCA AAG TGG TGT TGC TGA CCT AGT GAA CCA SCC CCA AGC TGT CAG CCC CAA TAG CAC AAA GCT  
6475 ACT SCC CAA AGA AAT TAT ACA AAA ATT GGA ACT TTG GGA ATG GTG TGC AGG AIC GCT CTG CTG TAT CCC TGG AAC ACA  
6553 GCT TCT CTA TGT TTT GTA TTG NPA CCA GTC TAG AAG GTT CCA AAA CTT TCT CAC TGA AGA AEA TTC CCC ATG TGG GAC  
6631 CCC TAC AGA CTC TTT TGC CCA MAC AAG TGC CCI CCT GGT GTG AFA TCT GTT TTG CTT TTA TCT TAG CAT AAT AIT  
6709 ATA AGS AAT GTT TGT GTG AAT AAA CCA AAC ATA TTT TAA AAG CAA AFA TGA TAT GCA CAT CCT AAT TGC TBA AAA GTT  
6787 TAC AGC TBA TAG TCC CAT GCT CTC CAC AAT ACT GGA TCC AAA TBA GTC CTA ATT TCA ATG TTG GGC ATG TTI ACA GAG  
6865 TAG ACA AAG ACA TTA AAA ATG AAG AGA CAT GCA GAG AGT GCA CCA TGC CAT CCT GGA GAC CTG TAG TGA CAC AAC TGT  
6943 TAG TCA AAG AOC ATT AAG GAC TTC CAG AAG CCA CCA ASA CTT CTT GCC TTC AGG ACT GTG AGA AGS TAG CTT CCT AIT GIT  
7021 ACT SCC CAA AGA AAT TAT ACA AAA ATT GGA ACT TTG GGA ATG GTG TGC AGG AIC GCT CTG CTG TAT CCC TGG AAC ACA  
7099 GCA ACT AAT GAG GAG CTA CAG ACA CCA CCA CCT TTT TGT TTA ASA CTT CTT GCC TTC AGG ACT GTG AGA AGS TAG CTT CCT AIT GIT  
7177 CTA AGC CCC AGT AAG TGG CAT TTT GTT AAG GTA GAS TCA AGA CAA TAA AAT GCA GAC CAA CAA AAG GAT AGC TGA  
7255 GTI TTC CAG GCC CTT CCI TCT TAT TTT TGG TTT TGT TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG  
7333 TGT TTT GPT TGG GGA GPT TTT TGG GPT TTT TTT GGG TTT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT  
7411 TGT TTG CTT TTT TGT TTT TTG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT  
7489 TTA TTC ATT TAT TTA CTT ACT TCA TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT  
7567 GCA ACT AAT GAG GAG CTA CAG ACA ATT GAT GTT TCT GGG AAG ACA GTC AGT TCT TCT GGG AAG ACA GTC AGT TGT TTT  
7645 GGG TCA ACC ATG TTC CTG TGG CAT AAG TCA CAC CCA CCA TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA  
7723 AAA AAT AAA AAA GGG CAT GBA GCT TGG GAT ABA AAT TAA GBA TBA ATB TBA TBA TBA TBA TBA TBA TBA TBA TBA TBA  
7801 AAT AAA AAC APT TCT TTT  
7879 AGT TAA ATA AGT TAT AIT GTA GAA AAG GTA GAG AAG AFA GTA GTS GAA GAG AAG AAT AAG GAG ACT TCA AAA GGA GTG  
8035 GAG GGA GAT ABA GGA GGA GAA AGC AGA AGC AAT GGC TGA TAG ACA CAG GAT AAG AGG GAA CAG AAA GGA AAG AAG GGA



ФИГ.12 (продол.)

8113 ACC CAG GAT GGG TAT TTC TTT GGC TAT CTG TGA CTT GCA CAG GGT CTT GGC AAT TAT TGA TGA GGT CAA GGC TTA AAT  
8191 CTT CAC TTG TGC CAA CTC BAC ASG ATC TTC CTT TAT TAT AAC CAG GCC CCC AGT ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG  
8269 CTT ATC TCC TTA TAG CAA CAA TCC TCG TCG TTA TAA CTC GGT TCG TAG TAC TCG TAG TAC TCG TAG TAC TCG TAG TAC TCG TAG  
8347 ACT TTT TAA TAC AAA ATT TTG AAG AGT TTG TAC BAI GTA TCG TTA TCG TTA TCG TTA TCG TTA TCG TTA TCG TTA TCG TTA  
8429 RTT TCA ACT CMA GAT ACT AAT TAT ATG GGT TAA ATC BAI TCG TTA TCG TTA TCG TTA TCG TTA TCG TTA TCG TTA TCG TTA  
8503 TAT TGT GGT TTT CGA GAC AGG GGT TCT GCT GCT GCT GCT GCT GCT GCT GCT GCT GCT GCT GCT GCT GCT GCT GCT GCT  
8581 AAA CTC AGA AAC CTA CCT GCT GCT GCT GCT GCT GCT GCT GCT GCT GCT GCT GCT GCT GCT GCT GCT GCT GCT GCT  
8659 GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT  
8737 GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT  
8815 AAA TTT TTA AAG TTT ATA TAT GTC TCA TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT GGC TCT  
8893 GCC CTC AAA AGT AAT CCC AAG TTG TAT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT  
8971 TGC TTT GCT TTG CTT TGC TTT GCT TTG CTT TGC TTT GCT TTG CTT TGC TTT GCT TTG CTT TGC TTT GCT TTG CTT TGC TTT  
9049 TTT TTT CCG GGG GAG GGA GGG TGG AGA AAG AAT CTT ACT ATG AAG CTT TGA CTA CTA CTA CTA CTA CTA CTA CTA CTA CTA  
9127 AGG CTT GAT TCA ACT CAT AGA GAT CTG CTT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT  
9205 AGA TAG TGA TCC CAA GTT TTA GCA AAA GHT TCT AGA CTT GAC ATT AAT CGA TGG AGA TAG ACA TGA ATT ACA CAA ABA  
9283 ACT AAT GTG GAG TTT ACC TGA ATC ATA CTC TAT ACT TTA TCA GAG ATT AAA TTA ACT TTA AAT CCA CTG CCA GGC  
9361 TAG AGG CAC CAT TCA ATG GCA GTG TTT GCC ATC ATG CAT AGG CTT AGT CTT CAG TGC TGA AAG GCA TTG GGG GCA ATA  
9439 ATA CTC ATT ATA CAG ATG AGA AAC TGG GEA AGA CTT GTC TCA GAT TCT CTA CTG AAA GGC TGA GTT TGT GGC TTC TAG  
9517 AAA ATC TTT TAC TTT CMA TAT TTA TGT ATA ATT TTT TTA TTT CCA CTG AAT TTA TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT  
9595 AAG AAA TAA ATG CAA TAA ACC AAA TAC ATG GAC AAN AAA ATA CBA TCA TAT GAT CAC CAC CTC AAT SGA AGG AAA AAA  
9673 AAA GMA AGA AAA AGT CTT TGA TAA GAT TCA AGA TTC ATT CTT TTT TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA  
9751 GCT ATC CCC AAA GCC TAT ACC TTC CCC TCC CCT GCT CCC ACC CAC CAC CAC CAC CAC CAC CAC CAC CAC CAC CAC CAC  
9829 CTC TGT ACT GAG GCA TAF GAT CTT CBA AAA ACC AAG GCT CTC TCC TCT CAT TGG TGG CCG ACT AAT AGG CCA TCT TTT  
9907 GCT ACA TAT GCA ACT AGA GAC ACA GGT CTT CAC TAG TTC CTT CAT TAG GGG CCG TGT CTC CCA TCC AAT AGA TGA CTG TGA GCA  
9985 CCG CTT TAG CTC CTT GGA TAC TTT CUC TAG TTC CTT CAT TAG GGG CCG TGT GTC CCA TCC AAT AGA TGA CTG TGA GCA  
10663 TCC ACT TGT GTA TTT GCC AGS CAC TGG CBT BGN CTC ACG AGA MAG ASA GAG CTA TGT CAG GAT CCT GTC AGT AAA AAT  
11141 TTT CTG GCA TAT GCA ATG GTA TCT GGG TTT GGT TGT ATA TGG GAT GGT CCA TCC CCA AGT GGA GAT TTT TGT TCC CCA TTC GAA SGA  
11219 TCC TTC CTT CCA TCT CAG CTC CMA ACT TTG TCT CTA TAA CTC CTT CCA TTT TGA TTT TGA TTT TGA TTT TGA TTT TGA TTT  
11297 GTG AAG AAT CCA CAC TTT GGT CTT CTT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT  
11375 ATA TCC ACG TAT CAG TGA GTG CAT ATC ATG CBT GTT ATT TTG TGA TTA GTT TAC CTC ACT CAG GAT GAT ATC CTC CAG  
11453 ATG CAT CCA TTT GGC TAA GAA TTT CMT TAA TTG ACT GTT TTT TCG TGA ATA GTA CTC CAT TGT TGA TTA TTA TTA TTA TTA  
11531 CAT TTT CTG TAT CCA TTC CTC TGT TGA GGG GCA TCT GGT TTC TTT CCA GCT TCT GGC TAT TAT AAA TAA GGC TGC TAT  
11609 CAG CAT AGC GGA GCA TGT GTC CTT ATC AAG TTG GAA CMT CTT CTA GGT ATA TGC CCA GGA GAG GAA TTG CTG GAT CTT  
11687 CCG GTA ATA CCA TCA ACG TGT ATC AAG CCT AGA ACA AGG AGG ACT GTA AGA ACC TTA ATG ACC TCC AIT AAA ATC ABA  
11765 AAA GGT TAT GTA TGA CAA ACT CAT GAC CAA TAT CAT CCT AAA TGA ABA CCA TTA ATG ACC TCC AIT AAA ATC ABA  
11843 GGA CTG CCC ACT CTT CTT CCA TAA TGA GAT TGA AGC ATT AGC TGG AGC AAT AAG GCA ABA GCA ACC TCA AAT TTT GAC  
11921 CAA ATG GGA AAA TAT TAA GTC AAA TTG TTT TCA AVT GAA GAT TAT ATT ATC TTA TAC CCA ATG ACC TCA AAT TTT GAC  
11999 TAG AAA AAT TGT AGA AAT TAT CAA TAA TTT CAG CAA AGT GTT ATG ATG CAC CAC ATC CTT ATT CTT CTC CCC AGC TTC  
11077 TGC TTG CTT CTC TCT TCT TCA TCC TTT CTG TCC CAT CTG CCA CTC TTG TCT CNA GAC TGA ATG CTG GAT CTT  
11155 GGT GTA ACT CTC CTG TGA CTG AGT ATC TCA CBA BAC GYT CTA CCT GCG AAA CCT GBA TGA GGC CTT TCT TCT TCT GAA  
11233 GCT ATG AGG CTC TCT ACG DAG ACT CBA GAA AAT GCA AGG GAG GAG GTA ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG  
11311 GCA TTG CTC TCT TGT GGC TCC TTA ATT TCT CMT ACT TCA TGA GAT TAT AAC TAC TCA AAC TAT GAG TCA TGA CTC CTT  
11399 CCA GAG CTA AGG TTC TCA TAT TGT AGT GTT ATG GAA TGA GTA GAG CAG TNG TTC CCA AAC TAT GAG TCA TGA CTC CTT  
11467 TAT GGG TCA AAC TAC CCT TTC ACA CAG GTT GCA CAG TTT GCA TAT CAG ATG TCC TCA TGG TCG CAA CAT GAG GAA CTG  
11545 ATA TAT ATA TTT CAC AAC AGT AAG AAA ATTT ATT TAG TAA TCA TTT TAT AGT TGT GGG TCA TGG CAA CAT GAG GAA CTG  
11623 TAT TAA AGG GTT GCA GCA TTA GGA ATG TTG AGA CCG ACT ATA ATA GAG AAT GAG GCT TAA GGC AAG GCT ATA AAG CCC  
11701 AAT GGA CCA TGT GCT TTT TCC BAC AAT TGG CAC ATG GTA AGC TCT GTA TAG ACT TTT TAA AGA ACA TTG GTT TGT AAT  
11779 TTT AAA TGG ATA AGG GTC TTC ACT GTC TAT TAA TAA TCA TCT CAC CCA TCT ABA TAA ATA AAT BAG TTT TGA TTC CAC CAT GGA TTC

ФИГ.12 (продол.)

11857 ABA TGG AAA AAT CCT CBA CCA CTT AAG ACA TAG CAG CAG TCA AAC ATT GAT GAC CAA ATA GGA AAT CCA TGT AGA GAC CTT CTA  
11955 TCT TCT GAT GGC TCC ACA GGC ACC ACC ATC TCG CAA TAG CAA AGT TCT ACT TTG CTA ATG AAT ACA GTC TCT CAA CTA CTC  
12013 CTS CCA TTG AAT CTT CAG GAA GCC CCT GBA ATG ACT TGT ACT ACA CCA TTT CTT AAA GAC AGA AAA GCT AAG ACT TA3  
12091 AGG GAA TAA AVG TCA TGC CTA CTA CTT CTT CTA TGA TGC TGT TGC TCA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA  
12159 AAT GTT GTT CTT TCA TCA AAT GTC CTA TTT AAC AGA TTA GGA GAT GAA ACG GTA GAC TCT GTG TAG TTG TAC ACC CTT G7A  
12247 AAG ACT TGG AAA TCA AAT GTC CTA TTT AAC AGA TTA GGA GAT GAA ACG GTA GAC TCT GTG TAG TTG TAC ACC CTT G7A  
12325 ATC CCA TCG CTA GBA AGA CTG ASG CAG GAA GTC GAG CTA AAA CCA GCT TAG CTT ACA CAG AAC TAT CTA AAA  
12405 AAT AAT TAC TAA CTA CTT AAT AGG AGA TTG GAT GTT AAG ATC TGG TCA CTA AGA GGC AGA ATT GAG ATT CGA ASG CAG  
12481 TAT TTT CTA CCT GGT ATG TTT TAA ATT GCA GTA AGG ATC TAA GTG TAG ATA TAT AAT AAT AAG ATT CTA TTG ATC TCT  
12559 GCA ACA ACA GAG AGT GTT AGA TTT GAT TGG AAA ABA ATA TTA TCA TCG TCA CTG GCT TGA GAA GAT  
12637 AGT ACC CAC CCA TAT CTC CCC ACC CAT CCC CBA TAG CAG AGT GGT TAT TCA TCG TCA CTG GCT TGA GAA GAT  
12715 TAA AAA AAG TAA TGC TAC CTT ATT GGG AGT GTC CCA TGG ACC AAG ATA GCA ACT GTC ATA GCT ACC ACA CTG CTT  
12795 TGA TCA AGA AGA CCC TTT GAG GAA CTG AAA ACA GAA CCT TAG GCA CAT CTG TTG CTT TCG CTC CCA TCC TCC TCC AAC  
12871 AGC CTG GGT GGT GCA CTC CAC ACC CTT TCA AGT TTC CAA AGC CTC ATA CAC CTG CTT ACC CCA GCA CTT GGC CAA  
12949 GGC TGT ATC CAG TCC CAA TGC GTT TGC GAT GAA AAT GAT ACC CCA CTT TGT TTG ATA TTA CTC TAT CTC AAG CCC CAG GTT  
13027 AGT CCC CAG TCC CAA TGC GTT TGC GAT GAA AAT GAT ACC CCA CTT TGT TTG ATA TTA CTC TAT CTC AAG CCC CAG GTT  
13105 CAC TGG GCC CMT ATA CCA TGT BAG ACA TGT GCA AAT GAT GTT TCA TGG GGC CCA GAC ACC TTC TAG AAG TAC CTG AGA  
13183 GTG GCA AAA AAT AGT TGT CTT AAA TAG TTT GGC CAT CTT TAG GCT GAG AGA CTA GBA AAT ACA GCG ATG GAC TAT ATC  
13261 AGC ATT GCA GAA TAG TTG TCA GTA AAG ACC CCA CAA CCC ATA ACA GAA GTA TTC TCT TCT TCT TAT ATC CCT TTT CCA  
13339 TCC ATG TAG ATG GCT GTC TTC ATA TTT GTT CTA GAC GGC CAG CC

pSELECT-IGKV1-39/J-Ck  
1 GCG GCC GCA ATA AAA TAT CTT TAT TAT CAT TAC ATC TGT GTG GTT TTT TGT GTG AAT CGT AAC TAA CAT ACG CTC  
79 TCC ATC ABA ACA BAA CBA CCA AAC TAG CAA AAT AGG CTG TCC CCA GTG CAA GTG CAG GTG CCA GAA CAT TTC  
157 TCT ATC GBA GGA TCT GCG ATC GCT CCG GTS CCC GTC AGT GGG CAG AGC CCA CAT CCG CCA CAG TCC CCG AGA AGT TGG  
235 GGG GAG GGG TCG GCA ATT GAA CCG GTS CCT ABA GBA GGT GCG GCG BGG TAA ACT GGG ABA GTG ATG TCG TGT ACT GGC  
313 TTG CCG CCA GAA CAC AGC TGA AGC TTG GAG GGG CTC CCG CTT GTC GCG TCC CTT GBA GCC TTA CCA AGT CCA AGC TGT GAC CGE  
469 ATC CAC GCC CCA GGT TGA GTC CCG TTT GTC CCG GCG TCC CTT GBA GCC TTA CCA AGT CCA AGT CTT GMA GAG TTC TGA TAT GGT  
547 TAA AGC TCA GGT CCA GAC CCG GCG TTT GTC CCG GCG TCC CTT GBA GCC TTA CCA AGT CCA AGT CTT GMA GAG TTC TGA TAT GGT  
626 GCC TGA CCG TGC TTT CAC TCT ACG TCT TTG TTT CTT CTT TTG TGC TCA TCG GGC CCA GAC ACC TTC TAG AAG TAC CTG AGA  
763 CCG CTA CCT GAG ATC ACC GGC GTG TGG ACG CCA TGG ACA TGA GAG TGC CCG ACC AGC TCC TGG GGC TCC TCG TAC  
781 TCT GGC TCC GAG GTA AGG ATG GAG AAC ACT AGG AAT TTA CTC AGC CAG TCT CCA ATC TCA GAT GCC AGA TGT CAG GGA  
859 AGT TCT CTG ATA ACA TGA TTA ATA GTA AGA ATA TTT GTT TTG ATG TTT CCA ATC TCA GAT GCC AGA GCC AGC CAG ACC ATC  
937 ATG ACC CAG AGC CCC AGC CCG CTG AGC ACC GCG GTG GGC GAC AGA GTA AGT ACC ATC TCG AGA GCC AGC CAG ACC ATC  
1015 AGC AGC TAC CTG AAC TGG TAT CAG CAG AAG CCC GGT AAG GAT CCC AAG CTG ATC TAG TAC GGC ACC GGC TCC CTG CAG  
1093 AGC GGC GTG CCG AGC AGA TTG AGC GGC TCC GGC ACC GAC TTC ATC CTG AGC ACC CTG AGC CAG CTG GAG ATC AAG  
1171 GAC TTG GCC ACC TAC TAC TGC CAG CAG AGC TAC AGC ACC CCG ACC ATG GAA CAG CTG ACC TCT GGC GGA GCC ACC GTC GTC  
1249 ABA GGC GAC GCC GCT CCC ACC CTG TCC ATC CCC CCG AGC ATG GAA CAG CTG ACC TCT GGC GGA GCC ACC GTC GTC  
1327 CTG TTC GTG AAC AAC TTC TAC CCC AGA GAC ATC AGC GTG TAG TGG AATG CAG AGC ACC CTG AGC CTG ACC BAG GTG GAG  
1385 CTG GAC AGC GTG ACC GAC CAC ACC TAG TAC ACC TGC GAG GTG GTC CAC ACC ACC TCC AGC CCG GTG GTC ATG CAG TGA  
1483 TAC GAG AGG CAC AAC CTG TAC ACC TGC GAG GTG GTC CAG ACC ACC ABE TCC AGC CCG GTG GTC ATG CAG TGA  
1561 AAC GAG TGT TGA GCT AGC TGG CCA GAC ATG ATA AGA TAC ATG GAT GAG TTT GGA CAA ACC ACA ACC AGA ATG CAG TGA  
1639 AAA AAA TGC TTT ATT TGT GAA ATT TGT GAT GCT ATT CAG GTT CAG GTT CAG GTT CAG GTT CAG GTT CAG GTT CAG GTT CAG  
1717 AAC AAC TGC ATT CAT TTT ATG TAT CAG GTT CAG GGG GAG GTG TGG GAG GTT TTT TAA AGC TGC AAT AAA CAA GTT AAC  
1795 ABA TGT GGT ATG GAA TTC TCA AAT ACA TCA TAG CAA AAC TTT AAC CTC CAA TAT AAG TGC ATT AGC TGT TCA TCG  
1873 GAG GBA TGA ATA AAG CAT AGG CAT CAG GGG CTG TTG CCA ATG TGC ATT AGC TGT TTG CAG CCT CAC CTT CTT TCA TCG

27/79

ФИГ.12 (продол.)

1951 AGT TTA AGA TAT AGT GTA YTT TTC CAA GGT TTT BAC TAG CTC TTC AAT TCT TTA TGT TTT AAA TGC ACT GAC CTC CCA  
2029 CNT TCC CTT TTT AGT AAA ATA TTC AGA BAA BAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA  
2107 AAT CCA GAT GCT CAA GGC CTT TCA TAA TAT CCA GAT TTT TAG TAG TTT GAC TTA GAA GAA GAA GAA GAA GAA GAA GAA GAA  
2185 AAT TGG ACA GCA AGA AAG CBA GCT TCT AGC GAA TTC TGC ACT CAT TCC TTT GCT CTC GGA GGA GTT TGT GTA CSC CGG  
2263 TTT CCA CTA TCG CGC AAT ACT TCT ACA CAG TCG AGC AGC GGC GGT CTG CGG GGG ATT TGT GTA CSC CGG  
2341 ACA GTC CGC GCT CGG GAT CGG AAT CGG TCG ACT GCA CAC TCC GCG CAA GCT TCA TCA AAA TTG CCA TCG TCA ACC  
2419 AAG CTC TGA TAG AGT TGG TCA AGA CCA ATG CCG AGC ATA TAC CAG GGC CTC CAG AAG AAG ATG TTG GGG ACC TTG TAT  
2497 CTC GGC TCG AAG TAG CAG GTC TGC TGC CCA ATA CAA GCC CAC CAC GGC CTC CAG AAG AAG ATG TTG GGG ACC TTG TAT  
2575 TGG BAA TCC CCG AAG ATC GGC TCG CTG CAG TCA ATG ACC GCT TTT ATG GGC CCA TTG TCC GTC AGG ACA TTG TTG GAG  
2653 CCG BAA TCC CCG TGC AAG AGG TGC CCG ACT TCG GGG CAG TCC TCG GCC CBA AGC ATC AGC TCA TCG AGA GCC TGC GCG  
2731 ACG GAC GCA CTG ACG GTG TCG TCC ATC ACA GAT TGC CAG TCA TAC TAC ACA TGG GBA TCA GCA ATC GCG CAT ATG BAA TCA  
2809 CGC CAT GTA GTG TAT TGA CCG ATT CCT TGC GGT CCG AAT GGG CCG AAC CCG CTC TGG CTA AGA TCG GCC GCA GCG  
2887 TAT GCA TCC ATG AGC TCC GCG ATG GGT TGC AGA ACA GCG AGC AGT TCG GTT TGA GGC TCT TGC AAC GTG ACA CCC  
2965 TGT GCA CCG GGG GAG ATG CAA TAG GTC AGG CTC TCG TAT TCG AAT TCC CCA ATG TCA AGC ACT TCC GBA TTC GGG AGC GCG  
3043 GCC GAT GCA AAG TGC CGA TAA ACA TAA TCT TTG TAG AAA CCA TCG GCG CAG CTA TTT ACC GCG ACA TAT CTA  
3121 GGC CTT CTT ACA TCG AAG CTG AAA GCA GBA GAT TCT TCG CCG TCC GAG AGC TGC ATG AGC CTC CTA TAG TGA GTC GTA  
3199 TTT TCG ATC AGA AAC TTG TCG ACA GAC GTC GGG GTG AGT TCA GGC TTT TTG ATG ATG GGC CTC CTA TAG TGA GTC GTA  
3277 TTA TAC TAT GGC GAT ATA CTA TGC CGA TGA ATT GTC ABA ACA GCG TGG ATG GCG TCT CCA GGT TAT CTA GGT TAT CTA GGT  
3355 CAC TAA ACG AGC TCT GCT TAT ATA GAC CTC CCA CCG TAC AGC CCT ACC GCC CAT TTG CBT CAA TGG GGC GGA GTT GTT  
3433 ACG ACA TTT TGG AAA GTC CCG TTG ATT TAC TAG TCA BAA CAA ACT CCC ATT GAC GTC AAT GGG GTG GAG ACT TGG AAA  
3511 TCC CCG TGA GTC AAA CCG CTA TCC ACG CCG AAT GAT GTA CTA GAA CCG CAT CAT GGT AAT GGT AAT GAG CAT TGG AAA  
3589 TAC GTA GAT GTA CTA CTA AGT AGG AAA GTC CCA TAA GGT GTA ATG TAC TCG CAA GTG GCG AGT TTA CCG TAA ATA CTC  
3667 ATT GAC GTC AAT AGG GGG GGT ACT TGG CAT ATG ATA CAC TTG ATG TAC TCG CAA GTG GCG AGT TTA CCG TAA ATA CTC  
3745 CAC CCA TTB AGC TCA ATG BAA AGT CCG TAT TGG CBT TAC TAC TAC TAC TAC TAC TAC TAC TAC TAC TAC TAC TAC TAC TAC  
3823 GTC GTT GGG CCG TCA GCC AAG CCG GCT AAT YAC GGT AAG TTA TBT BAC GGC TGC AGG TTA NTT AAG AAC ATG TGA GCA  
3901 AAA GGC CAG CAA AAG GGC AAG AIC GGT AAM AAG GCG TTG CTG GCG TTT TTC CAT AAG CTC GGC CCG CCG CCG CCG CCG  
3979 CAT CAC AAA BAA CBA CCG TCA AGT CAG AGG TGG GAA AAC CCG ACA GBA CTA TAA AGA TAC CAG GCG TTT CCC CCG GBA  
4057 AGC TCC CTC GTG CCG TCT CCT GGT CCG ACC CTC CCG GTT ACC GGA TAC CTG TCC GCG TTT CCG TCG GBA AGC GTG  
4135 GCG CTT TCT CAT AGC TCA GCG TGT AGG TAT CTC AGT TGG GTG TAG GTT GGT TCC AAG CTC GCG TGT GTS CAC GAA  
4213 CCG CCG GTT CAG CCG GAC CCG TCC GCT TTA TCC GGT AAC CCG GTT CAG TCC AAC CCG GTA AGA CAC GAC TTA TCG  
4291 CCA CTG GCA GCA GGC ACT GBT AAG GCG GGT AGC AGA GCG GGT TAT GBA GGC GGT GCT ACA GAG TTC TTG AAG TGG TGG  
4369 CCT AAC TAC GGC TAC ACT AGA ACA GTA TTT GGT ATC TGC GCT TTT TTT GGT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT  
4447 GGT AGC TCT TGA TCC GGC AAA CAA ACC ACC CCG TTT TCT TGT AGC TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT  
4525 AAA AAA GGA TCT CAA GAA GAT CCT TTG ATC TTT TCT AGG GGG TCT GAC GCT CAG TGG AAC GAA AAC TCA CBT TAA GCG  
4603 ATT TTG GTC ATG 9CT AGT TAA TTA ACA TTT AAA TCA

pSelect-IGLV2-14/J-CK

1 GCG GCC GCA ATA AAA TAT CTT TAT TTT CAT TAC ATC TGT GTG TTG GGT TTT TGT GTS AAT CBT AAC TAA CAT ACG CTC  
2 TCC ATC AAA ACA AAA GBA AAG ACA AAC TAG CAA AAT AAG CTG TCC CCA GTG CAA GTG CAG GTG CCA BAA CAT TTC  
3 TCT ATC GAA GGA TCT GCG ATC CCG GTG CCG GTG CCG GGC CAG AGC GAA CAT CAG CCG CCA CAG TCC CCG AGA AGT TGG  
4 GGG GAG GGG TGG GCA ATT GAA CCG GTG CCT AGA GAA GGT GGC GCG GGG TAA GAT GGG GAA CAT CAG CCG AGA AGT TGG  
5 TCC GGC TTT TTT CCG AAG GTG GAG AAC CBT ATA TAA GTG CAG TAG TGG CCG TGA AAG TTT TTT TTC CCA ACG GGT  
6 TTG CCG CCA GAA CAC AGC TGA AGC TTT CAG GGG CTC CTT CAC GCG CCG GCT CTA CTT CAG GAG GCG GCT  
7 ATC CAC GCG GGT TGA GTC CCG TTG TCG CCG CTC CCG CTT GAA CTG CBT CCA CTG CCG TCT AGG TAA GTT  
8 TAA AGC TCA GGT CGA GAC CCG GTT GTC GGG TCT GTC GAG CAC TAC CTA GCG GCG TCT CCA CCG TTT  
9 GCG TGA CCC TGC TTG CTC AAC TCT ACG TCT TTT CTT CTS TGC GCG GCT ACA GAT CCA AGC TGT GAC CCG  
10 CCG CTA CCT GAG ATC ACC GAG TCG ACG CCA TGG ACA TBA GAG TGC CCG CCC AGC TCC TGG GGC TCC TGC TAC

ФИГ.12 (продол.)

731	TCT GSC TCC GAG GTA AGG ATG GAG AAC ACT AGS AAT TTA CTC ABC CAG TGT GCT CAG TAC TGA CTG GAA CTT CAG GGA
859	AGT TCT CTS ATA ACA TGA TTA ATA GTA AGA ATA TTT GTT TTT CTA ATC TCA GGT GCC AGA TGT TGT CAG TCT CAG GCA
937	CTG ACC CAG CCC GCG TCT GTG TCT GGC AGC CCT GGC ACC ATC AGC TGC ACC GGC ACC AGC AGC GAC GAC GAT
1035	GCC GSC TAC AAC TAC TAC GTG TCC TGG TAT CAG CAG CAG CUC GGC MAG GCC COC AAG CTG ATG ATC TAC GAG GTG TCC AAC
1093	AGA CCC AGC GGC GTG AGC AAG TTA ACC GGC AGC AGC AGC AGC AGC AGC AGC AGC AGC AGC AGC AGC AGC AGC AGC AGC
1171	GCT GAG GAC GAG GGC GAC TAC TAC TGC AGC TAC ACC TCC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC
1243	ACC GTG CTS AGA CCC GAC CCC TCT ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC
1327	ACC GTG CTS AGA CCC GAC CCC TCT ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC
1405	GAC GSC GTG CTS GAC AGC GAC ACC TGC GAG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG
1483	AGG GTG GAG TAC GAG AGS CAC CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG
1561	TTG AAC CCG AAC GAG TGT TGA GCT AGC TGG CCA GAC ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG
937	CTG ACT CAG CCT GCC TCC GTG TCT GGG TCT CTT GGA CAG TGG ATC ACC TCC TCC ACT GGA ACC ACC ACC ACC ACC ACC
1615	GGT GCT TAT AAC TAT GTG TCC TGG TAC CAA CAG CAC CCA GAC ABA GCE CCG ABA CTC ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG
1693	CAG CCT TCA GGG GTT TCT AAT CCG TTC TCT GGC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC
1771	GCT GAG GAC GAG GCT GAT TAT TAC TGC AGC TCA TAT ACA AGC AGC AGC ACT CTC GTA TTC GSC GSA GGG ACC AAG CTG
1849	ACC CTC TTA CCG GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA TCC ATC CCA TCC ACC AGT GTC TAG TGG AAT GAT GGC AGT GAA CAA CGA
1927	ACT GTC GTG TGC TAC GAG CAC CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG
1995	GAT GGT GTG CTS GAC AGT GTP ACT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT
2073	AGG GGT GAA TAT GAA AGS GAT AAC CTC TAT ACC TGT GAG GTT GTT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT
2151	TTG AAC ASG AAT GAG TGT TAG GCT AGC TGG CCA GAC ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG
2229	ATG CAG TGA AAA AAA TGC TTT ATT TGT GAA ATT TGT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT
2307	CAA GPT AAC AAC AAC AAT TGC ATT CAT TTT ATG TTT CAG GTT CAG GGG GAG GTG TGG GAG GTT TTT TTA AGC AAG TAA
2385	AAC CTC TAC AAA TGT GGT ATG GAA TTT TAA TTA ACA GCA TAG CAA AAC TTT AAC CTC CBA ATC AAC TTT AAC CTT
2463	TCC TTT TCT TGG AGT TTA AGA TAT AGT GTA TTT TCC CAA GAT TTA AAT TTA AAT ACA TCA TTG CAA TGA MAA TAA ATG TTT
2541	CTT TCA TGG AGT TTA AGA TAT AGT GTA TTT TCC CAA GAT TTA AAT TTA AAT ACA TCA TTG CAA TGA MAA TAA ATG TTT
2619	GAC CTC CCA CAT TCC CTT TTT AGT ABA ATA TTT CCA TDA TAT CCG CCA GAT TAG TGG ATG GAC TTA GGG AAC AAA GGA ACC
2697	ATT ASG CAG TAT CCA GAT GCT CAA GGC CTT TCA TDA TAT CCG CCA GAT TAG TGG ATG GAC TTA GGG AAC AAA GGA ACC
2775	TTT AAT AGA AAT TGG ACA GCA AGA AAG GSA GCT TCT AGC GAA TTC TGS ACT GAT TCC TTT GCC CTC GSA GSA GTG CTG
2853	GGG CBT CCG TTT CCA CTA TCG GCG AGT ACT TCT ACA CCG CCA TCG GTC CAG ACB GCG CTT CTG CCG GCG ATT TGT
2931	GTA CCG CCG ACA GTG CCG GCT CCG GAT CCG AGG AAT SCG TGG CAT CCG CCC TGC GCU CAA TCG GCA TCA TCG AAA TTG
3009	CCG TCA ACC AAG CTC TGA TAG TGG TCA AGA CCA ATG CCG AGC ATA TAC GCG CAG AGC GCG GGT CCG GAT CCG GCA AGC
3087	TCC GGA TGC CTC CCG TCG AAG TAG CCG GTG TCG TCC AUA CAA GCC AAC CAC GGC CTC CAG AAG AAG ATG TTG GCG
3165	ACC TCG TAT TGG GAA TCC CCG AGC ATC GGC CTC CCA TCA ATG ACC GGT GTT ATG CCG CCA TTG TCC GTC ACC AGC ACA
3243	TTG TTG GAG CCG AAA TCC CCG TGC ACG TGG CCG AGT TCG GGG CAG TCC TCG SCC CBA AGC ATC AGC TCA TCG AGA
3321	GCC TSC GCG AGC GAC GCA CTG ACB GTT TCG TTC ACT ACA GAT TCG CAG TGA TAC ACA TGG GSA TCA GCA ATC GCG CAT
3399	ATG AAA TCA CCG CAT GTA GTG TAT TGA CCG ATT CTT TCG GEF CCG AAT GGG CCG AAC CCG CTC GTC TGG CTA ABA TCG
3477	GCC GCA GCG ATC GCA TCC ATG AGC TCC CCG AGG AAG GGT TGC AGA ACA GCG GGC AGT TCG GTT TCA GSC AGG TCT TSC AAC
3555	GTG ACA CCC TGT GCA CCG GAG ATG CAA TAG GTC AGG CTC TCG AAT TCC CCA ATG TCA AGC ACT TCC GGA ATC
3633	GCG AGC GCG GCT CCA TAA TCG CCA TAA ACA TAA TCG TCT TCG TAG AAA CCA TCG CCG CAG CTA TTT ACC GCG AGG
3711	ACA TAT CCA GCG CCT CCA TAA TCG CCA TAA ACA TAA TCG TCT TCG TAG AAA CCA TCG CCG CAG CTA TTT ACC GCG AGG
3789	CTG TEG AAC TTT TCG ATC AGA AAC TTC TGS ACA GAC GTC GCG GTG AGT TCA GGC TTT TTC ATG ATG GCG CTC CTA TAG
3867	TGA GTG GTA TTA TAC TAT GCC GAT ATA CTA TGC GGA TGA TTA ATT GTC AAA ACA GGS TGS ATG GCG TCT CCA GGT TAT
3945	CTG ACG GTT CAC TAA ACG AGC TCT TAT AAT GAC CTC CCA TAG TAC TAA CAA ACT CCC ATT GAC CTG AAT GGG GTG GAG
4023	GGA GTT GTT ACG ACA TTT TGG AAA CCG TTT TAC TCG AAA CCG ATT GAT GTA CTG CCA AAA CCG CAT CAT GGT AAT AGC
4101	ACT TGG AAA TCC CCG TGA GTC AAA CCG CTA TCC ACG CCC ATT GAT GTA CTG CCA TAA GGT GAT GTA CTG GGC ATA ATG CCA GGC GCG CCA
4179	GAT GAC TAA TAC GTA GAT GTA CTG CCA TAA GGT GAT GTA CTG GGC ATA ATG CCA GGC GCG CCA
4257	TTT ACC GTC ATT GAC GTC AAT AGS GGS CBT ACT TGG CAT ATG ATA CAC TTG ATG TAC TGC CAA GTG GCG AGT TTA CCG
4335	TAA ATA CTC CAC CCA TTG ACG TCA ATG GBA AGT CCC TAT TGG CBT TAC TAT SGG AAC ATA CBT CAT TAT TGA CBT CAA

ФИГ.12 (продол.)

3823 TCG GCG GCG GTC GTT GGG CAG TCA GCG AGG CAG GGC AAT TAC CTT AAG TTA TGT AAC GCC TGC AGG TTA AIT AAG AAC  
 3861 ATG TGA GCA AAA GGC CAG CAA BAG GCC AGG AAC CCF AAA BAG GCC GCG TAT TTC CAT AGG CTC GCG CCC  
 3975 CCT GAC GAG CAT CAC AAA AAT CGA CGC TCA AGT CAG AGG TGG CCA AAC CCG ACA GGA CTA TAA AGA TAC CAG GCG TTT  
 4057 GGA AGC GTG GCG CTT TCT CAT AGC TCA CCG TGT ACG TAT CTC AGT TGC TAG GTC CTT ACC GGA TAC CTA TCC GCT TTT CTC CCT TCG  
 4135 GAG CAC GAA CCC CCG GTT CAG CCC GAC CCG TCC AGC TTA TCC GGT AAC TAT CBT TTT GAG TCC AAC CCG GTA AGA CAC  
 4231 GAC TTA TCG CCA CTG GCA GCA GCC ACT GGT AAC AGT ATT AGC AGA GCG AGG TAT GTA GGC GCT ACT ACA GAG TTC TTG  
 4369 AAG TGG TGG CCT AAC TAC GGC TAC ACT AGA ACA GTA TTT GGT ATC TGC GCT CTG CTG AAG CCA GTT ACC TTC GGA  
 4447 AAA AGA GTT GGT AGC TCT TGA TCC GGC AAA CAA ACC ACC GCT AGC GGT GGT TTT TTT GTT TGC AAG CAG CAG AIT  
 4525 ACG CCG AGA AAA GGA TCT CAA GAA GAT CCT TCG ATC TTT TCT ACG GGG TCT GAC GCT CAG TGG AAC GAA AAC TCA  
 4603 CGT TAA GGG AIT TTG GTC ATG GCT AGT TAA TTA ACA TTT AAA TCA

MV1043

1 CTT GAT TTG GGT GAT GAT TCA CGT AGT GGG CCA TCG CCC TGA TAG AGG GTT TTT CCG CCT TTG AGG TTG GAG TCC ACG  
 79 TTC TTT AAT AGT GGA CTC TTG TTC CAA ACT GGA ACA ACA CTC AAC TCT ATC TCG GGC TAT TCT TTT GAT TTA TAA GGG  
 157 ATT TTG CCG ATT TCG GTC TAT TGG TTA AAT AAV GAG CTG ATT TAA CAA AAA TTT AAC GGG AAT TTT AAC AAA ATA TTA  
 235 ACG TTT ACA AIT TTA TGG TGC AGT CTC AGT ACA ATC TGC TCT GAT GCG GCA TAG TTA AGC CAG CCG CCA CAG CAC CCG CCA  
 313 ACA CCC GCT GAC GCG CCC TGA CCG GCT TGT CTG CTC CCG GCA TCC GCT TAC AGA CAA GCT GTG ACC GTC TCC GGG AGC  
 391 TGC ATG TGT CAG AGG TTT TCA CCG TCA CCG AAA CCG GCG AGA CCA AAG GGC CTC GTG ATA GCG CTA TTT TTA TAG  
 439 GTT AAT GTC ATG ATA ATG GTT TCT TAG ACG TCA GGT GGC ACT TTT CCG GGA RAT GTG CCG GGA ACC CTT AIT TGT  
 517 TTA TTT TTC TAA ATA CAT TCA AAT ATG TAT CCG CTC ATG AGA CAA TAA CCC TGA TAA ATG CTT CAA TAA TAT TGA AAA  
 625 AAG AAG AGT ATG AGT AIT CAA CAT TTC GGT GTC GCC CTT TTT CCG GCA TTT TGC CTT CTT CTT TTT GCT  
 703 CAC CCA GAA ACG CTG GTG AAA GTA AAA GAT GCT CAG TTG GGT CCA GTG GGT TAC ATC GAA CTG GAT CTC  
 781 AAC AGC GGT BAG ATC CTT GAG AGT TTT GGC CCG GAA GAA CCF TTT CCA ATG AGC ACT TTT AAA GTT CTG CTA TGT  
 859 GGC GCG GTA TTA TCC GGT AIT GAC GCC GGG CAA GAG CAA CTC GGT GGC CCG ATA CAC TAT TCT CAG AAT GAC TTG GTT  
 917 GAG TAC TCA CCA GTC ACA GAA AAG CAT CTT ACG GAT GGC ATG ACA GTA AGA GAA TTA TGC AGT GCT GCC ATA ACC ATG  
 1015 AGT GAT AAC ACT GCG GCC AAC TTA CTT CTG ACA CCG ATC GGA GGA CCG AAG GAG CTA ACC GCT TTT TTG CAC AAC ATG  
 1093 GGG GAT CAT GTA ACT CCG CTT GAT CCG TGG GAA CCG GAG CTG AAT GAA GCC ATA CCA AAC GAC GAG CBT GAC ACC ACG  
 1171 ATG CTT GTA GCA ATG GCA ACA AGG TCG GCG AAA CTA TTA ACT GGC GAA CTA CTT ACT CTA GCT TCC CCG CAA CAA TTA  
 1249 ATA GAC TGG ATG GAG GCG GAT AAA GTT GCA GGA CCA CTA CTG CCG TCG GCG CTT CCG GCT TGG TTT ATT GCT GAT  
 1347 AAA TCT GGA GCG GGT GAG GGT GGG TCT CCG GGT ATC AAT GCA GCA CTG GCG CCA GAT GGT AAG CCC TCC GGT ATC GTA  
 1405 GTT ATC TAC ACG AGG GGT CAG GCA ACT ATG GAT GAA CAA BMT AGA CAG ATC GCT GAG ATA GGT GCC TCA CTG AIT  
 1483 AAG CAT TGG TAA CTG TCA GAC CAA GTT TAC TCA TAT ATA CTT TAG AIT GTA AAA CTT GAT TTT TAA TTT AAA AAG  
 1561 ATC TAG GTG AAG ATC CTT TTT GAT AAT CTC ATG ACC AAA CTT CCA CBT GAG TTT TCG TTC CAA TGA CCG TCA GAC  
 1639 CCC GTA GAA AAG ATC AAA GCA TCT TCT TGA GAT CCT TTT TTT CCG GTA ATC TGC TCG CAA ACA AAA CCA CCA  
 1717 CCG CTA CCA GCG GTG GTT TGT TTG CCG GAT CAA GAG CTA CCA ACT CTT TTT CCG AAG GTA ACT GGC TTC AGC AGA GCG  
 1795 CAG ATA CCA AAT ACT GTT CTT CTA GTG TAG CCG TAG TTA GGC CAC CAC TTC AAG AAC TCT GTA GCA CCG CCT ACA TAC  
 1873 CTC GCT CTG CTA ATC CTG TTA CCA GTG GCT GCT GCC GGT GMI BAG TCG TBT CTT ACC GGG TTG GAC TCA AGA CGA  
 1851 TAG TTA CCG GAT AAG GCG CAG CCG TCG GGC TGA ACG GGG GGT TCG TGC ATA CAG CCC AGC TTG GAG CCA ACC TAC  
 2029 ACC GAA CTG AGA TAC CTA CAG CBT GAG CTA TGA GAA AGC GCC ACG CTT CCC GAA GGG AGA AAG CCG GAC AGG TAT CCG  
 2107 GTA AGC GGC AGG GTC GGA ACA GGA GAG CCG AGG GAG CTT CCA GGG GAA GCC TGG TAT TCG TAT AGT CCT GTC  
 2185 GGG TTT CCG CAC CTC TGA CTT GAG CBT TTA TTT TGA TGC TCG TCA GGG GGG AGC CTA TGG AAA AAC GCC AGC  
 2263 AAC GCG GCG TTT TTA CCG TTC CTG GCG CTT TGC TGG CTT TGC TTT CTT CCG TTA TCC CCT GAT TCT  
 2341 GTG GAT AAC CBT AIT ACC CCG TTT GAG TGA GCT GAT ACC GCG CCG AGC CCA ACC GAG CCG GAG TCA GTG  
 2419 ACG GAG GAA CCG GAA GAG CCG CCA ATA CCG CCG CTT CCG CCG AIT CAT TAA TGC AGC TGG CAC  
 2497 GAC AGG TTT CCG GAG TGG AAA GCG GGC AGT GAG CCG AAC GCA AAT AAT GTG AGT TAG CTC ACT CAT TAG GCA CCG CAG  
 2575 GCT TTA CRC TTT ATG CTT CCG GCT GGT ATG TTT GGA AIT GTG AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA AAC AGC TAT



ФИГ.12 (продол.)

6397 TTG CAG CAC ATC CCC CTT TCG CCA GCT GGC GTA ATA GCG AAG AGS CCC GCA CGS ATC GCG CTT CCC AAC AGT TGC GCA  
6475 GCC TGA ATG GGC AAT GGC GCC TGA TGC GGT ATT TTC TCC TTA GCG ATC TGT GCG GTA TTT CAC ACC GCA TAC GTC BAA  
6553 GCA ACC ATA GTA TGC GGC CCG TCG TCG GCG GCG ATT AAS GCG GCG TGT GGT TAC GCG GGT GAC GGT GAC CCG TAC ACT  
6731 TGC CAG GCG CTT AGC GCG TCC TTT CCG TTT CTT CCG TTT CCG TTT CCG ATT TAG TGC TTT AGC GCA CCT GSA CCC BAA AA A  
6739 TCT AAA TCG GGG GCT CCC TTT AGG GTT CCG ATT TAG TGC TTT AGC GCA CCT GSA CCC BAA AA A

MV1057

1 TAC TCT TCC TTT TTC AAT ATT GBA GCA TTT ATC AGG GTT ATT GTC TCA TGA GCG GAT ACA TAT TTG AAT GTA TTT  
73 AGA BAA ATA AAC BAA TAG GAG TTC GCG GCA CAT TTC CCC GAA AAG TGC CAC CTG AOS TGS ACG GAT CCG GAG ATC TCC  
137 GBA TCC CTT ATG GTC CAG TCT CAG TAG TAC CAT CTG TGA TGC CCG ATA GTT AAG CCA GTA TCT GCT CCC TGC TTG TGT  
235 GTT GSA GFT GCG TGA GTA GTG GCG CAG CMA AAT TTA AGC TAC AAG AAG CTT GAC CSA GAA TGC CMT GAA GAA BAA  
313 TCT GCT TAG GGT TAG GCG TTT TGC TAT TGG CCA TTT ACT AGT TAT TAA TAG TAA TCA ATT ACG GGG TCA TTA GTT CAT  
391 ATA GCA TAA ATC AAT ATT GGC CAT TGA TTA TTS ACT AGT TAT TAA TAG TAA TCA ATT ACG GGG TCA TTA GTT CAT  
469 TGT CCA AGA TTA CCG CCA TGT TGA CAT TGA TTA TTS ACT AGT TAT TAA TAG TAA TCA ATT ACG GGG TCA TTA GTT CAT  
547 AGC CCA TAT AVG GAG TTC GGC GTT ACA TAA CTT ACG GTA AAT GGC CCG CTT CAT TGA GGT CAA TGS GTG GAG TAT TTA  
703 GGG TAA ACT GGC CAC TTG GCA GTA CAT CAA GNG TAT CAT ATG CCA AGT TAG TAC ATC GAT TCA TTA GTT CAT  
781 TGG CCC GCG TGG CAT TAT GCC CAG TAG ATG ACC TTA TGG GAG TTT CCT ACT TGG GAG TAC TCA CGE GGA TTT CCA AGT  
859 GCT ATT ACC ATG GTS ATG CCG TTT TGG CAG TAC AUC AAG CMT GBA GAG TTT CCA AAA TGT CFT AAC BAC TCC  
937 CTC CAC CCC ATT GAC GTC AAT GAG AGT TTG TTT TGG CAC CAA AAT CAA CCG GAC TTT CCA AAA TGT CFT AAC BAC TCC  
1015 GCC CCA TTG ACG CAA ATG GGC GGT AGG CGT GTA CCG TGG GAG GTC TAT ATA AGC AGA GCT GGT TTA GTG AAC CBT CAG  
1093 ATC GCC TGG AGA CCG CAT CCA CCG TGT TTT GAC CTC CAT AGA AGA CAC CCG GAC TCC AGC CTC CCG GGC CCG BAA  
1171 CCG TGC AAT GCA AGC TTG GTA CCG GTG AAT TGS CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG  
1249 ABA GGC CCG AAT TCC CTA GCC ACC ATG GBA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG GTA CTS CTG CCG CAG CCG GCG  
1227 ATG GGG CCG ABA ATG GGC GBA ACT GGG CCG AGT TAG GCG GAT GCG CCG AGT TAG GCG CCG GCG GCG GCG GCG GCG  
1405 CTA ATT CAG ATG CCG ATC GCG TGG CAG TGG CAG AAG TTT GCG GAC TGG BAA GCG GCG AGT TAG GCG CCG GCG GCG GCG  
1493 APT TAG CTC ACT CAT TAG GCA CCC CAG GCT TTA CAC TTT ATG CCG GCT CFT AVG TTG TGG GGA ATT GNG AGC GGA  
1561 TAA CAA TTT CAC ACA GBA AAC AGC TAT GAC CAT GAT TAC GCG AAG CTT GAG CTG CAG GTT CTT TCC GCG TCA BAA GCC  
1629 ATA GAG CCC ACC GCA TCC CCA GCA TGC CTA TTT TTT TAT TAG BAA AGA BAA GCG ACA GTT CAG GGT GAT  
1717 CCC AGA ATA GAA TGA CAC CTA CTC AGA CAA GAT GAT GCG ACA ACA GAT GAT TGG CAA TTA BAA GCG ACA GTT CAG GGT GAT  
1795 CCT TCG ACG GTC AAG GAA GCG ACG GCG GAG GCG CAA ACA GAT GAT GCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG  
1873 CAG CCA GCT CTA GAT CAT CGA TGC ATG GCG TCG TCG GCT CTT TCC GCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG  
1851 GGC ACC GGG CTT GCG GGT CAT GCA CCA GGT GCG GCG TCC CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG  
2029 CCG CTC GTA BAA GGG GAG GTT CCG GCG CCG GBA GGT CTC CAG GAA GCG GCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG  
2197 TCC GGG GAG CAC GAC GCG GCT CCG GCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG  
2185 GCG CTC CTT GGG CCG GTC CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG  
2253 CAT GCG CCG GCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG  
2341 GTC GTC CCG  
2419 CAG TGC TAG CAC BAA GGG CCG ATC GGT CTT CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG  
2437 GGG CTG CCT GGT CAA GBA CTA CTT CCC GBA ACC GGT GTC GTC GBA CTC AGG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG  
2575 CAC CTT CCC GCG TGT CCT ACA GTC CTC ABE ACT CTA CTC CTT CAG CAG CBT GBT GAC CCG CCG CCG CCG CCG CCG  
2433 CAC CCA GAC CTA CAT CTG CMA CBT GAA TCA CCA GGT GBA CAG CAT CAG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG  
2721 ACA GGG AGG GAG GGT GTC TGC TGG AAG CCA GGC TCA CCA GCG ATC CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG  
2839 AGG GCA GCA AGG CAG CCG CCG TCT TCA CCC GGA GCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG  
2887 TCT GGC TTT TTC CCG ACG CTT TGG CCA GGC TAG GTC CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG  
2865 CTE GCG TCA GAC CTS CCA AGA GGC ATA TCC GGG AGG ACC CTG ACC TAA GCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG  
3043 CAC TCC CTC BGC TCG GAC ACC TTC CCG TCT CCG CCG TCA TCT CTT CTS CAG AGC CCA AAT CTT

32/79

ФИГ.12 (продол.)

3121 GTG ACA AAA CTC ACA CAT GCC CAC CGT GGC CAG CAC CTG AGG AAC TCC TGG GGG GAC CGT CAG TCT TCC TCT TCC CCC CAA  
3129 AAC CCA AGG ACA CCC TCA TGA TCT CCC GGA CCG CTG AGG TCG GAG TCC TGA GCC ACC AGG ACC CTG  
3277 AGS TCA AGT TCA ACT GGT ACG TGG AGG TGG TGC ATA ATG CCA AGA AAA GCG ACC AGT ACA AGC ACT  
3355 GCA GGT ACC GTG TGG TCA CGG TCC TCA CCG TCC ACC AGG ACT AGG TGA AAA GCA AGG AGT ACA AGT GCA AGG TCT  
3433 CCA ACA AAG CCC TCC CAG CCC CCA TCG AGA AAA CCA TCT CCA AAG CCA AAG GCG AGC CAC AGS TGT ACA  
3511 CCC TGC CCC CAT CCC GGG AGG AGA TGA CCA AGA ACC AGG TCA GGC TGA CCT CCA CCG CTC CGS TGG ACT CCG AGC  
3589 ACA TCG CCG TGG AGT AGG ACA ATG GGC AGC AGA GCA GGT GGC AGC AGG GGA AGC TCT CAT GCT CCG TGA  
3667 GCT CTT TCT TCC TCT ATA GCA AGC TCA CCG TGG AGA GCA GGT GGC AGC AGG GGA AGC TCT CAT GCT CCG TGA  
3745 TGC ATG AGS CTC TGC ACA ACC ACT ACA CCG AGA GCA GGT GGC AGC AGG GGA AGC TCT CAT GCT CCG TGA  
3823 TTA ATC CGA GCT GGG TAC CAA GCT TAA GTT TAA ACC GCT GAT CCA CTC CCA CTG TCC TTT CCT AAT AAA ATG AGG AAA  
3901 TTG TTT GCC CTT CCC CGG TGC CTT CTT TGA CCG TGG AGG GTG GGG TGG GGC AGG ACA GCA AGS GGG AGG ATT GGG  
4057 TTG CAT CCG ATT GTC TGA GTA GGT GTC ATT CTA TGC TGG GGG GTG GGG TGG GCT CTA TGG CTT CTG AGG GGG AAA GAA CCA GCT GGG GCT CTA GGG  
4135 AAG ACA ATA GCA GGC ATG CTG GGG ATG CCG TGG GCT CTA TGG CTT CTG AGG GGG AAA GAA CCA GCT GGG GCT CTA GGG  
4213 GGT ATC CCC ACG CCG CTT GTA GCG GCG CAT TAA GCG CCG CGG GTG TGG TTA CCG GCA GCG TGA CCG CTA CAC TTG  
4291 AAA TCG GGG GCT CCC TTT AGG GTT CCG ATT TAG TGC TTT AGC GCA CCT GCA CCC CAA AAA ACT TGA TTA GGG TGA TGG  
4369 TTC AGG TAG TGG GCG ATC GCC CTG ATA GAC GGT TTT TCG CCC TTT GAC GTT GGA GTG CAC GAT TTT GCC GAT TTC GGC  
4447 CTA TTT CCA AAC TGG AAC ACT CAA GCT TTA ACA AAA ATT TAA CCG GAA TTA ATT CTG TGG AAT GTG TGT CAG TTA GGG TGT  
4525 TGA AAG TCC CCA GGC TCC CCA GCA GGG AGA AGT ATG CAA AGC ATG CAT CTC AAT TAG TGA CCA ACC ATA GTC CCG CCC CTA ACT  
4691 TCC CCA GGC TCC CCA GCA GGC AGA AGT ATG CAA AGC ATG CAT CTC AAT TAG TGA CCA ACC ATA GTC CCG CCC CTA ACT  
4759 CCG CCC ATC CCG CCC CTA ACT CCG CCC CAT TCT CCG CAC GAT TCC CCG CCG CTT TCC CCG TCA AGC TCT  
4837 GAG GCC GAG GCC TCT GCT TCT GAG CTA TTC CAG AAG TAG TGA GGA GGC TTT TTT GGA GGC CTA GGC TTT TCC AAA  
4915 AAG CTC CCG GSA GCT TGG ATA TCC ATT TTC GGA TCT GAT CAA GAG ACA GGA TGA GSA TGG TTT GGC ATG ATT GAA CTA  
5053 GAT GSA TTG CAC GCA GGT TCT CCG GCT CCG GCG CCG GGT CTT TTT GTC AAG ACC CAC CAA CAG ACA ATC GGC  
5071 TGC TCT GAT GCC GCC GDS TTC CCG CTG TCA GCG CAG GGG CCG GGT CTT TTT GTC AAG ACC CAC CAA CAG ACA ATC GGC  
5139 CTG AAT GAA CTG CAG GAC GCA GCG CTA TCG TGG CTA TTG GCG GAA GTG CAG GTG CAT AGC CTT GAT CCG GCT ACC TGG CCA TTC GAC  
5227 GTT GTC ACT GAA GGG GGA AGG GAC TGG CTG CTA TTG GCG GAA GTG CAG GTG CAT AGC CTT GAT CCG GCT ACC TGG CCA TTC GAC  
5305 CCT GCC GAG AAA GTA TCC ATC ATG GCT GAT GCA ATG CCG CCG CTG CAT AGC CTT GAT CCG GCT ACC TGG CCA TTC GAC  
5383 CAC CAA GCG AAA CAT CCG ATC GAG CCA GCA CCA GCT ACT CCG ATG GAA CCG GCT CTT GAT CCG GCT ACC TGG CCA TTC GAC  
5451 GAG CAT CAG GGG CTC GCG CCA GCG GAA CTG TTC GCG AGG CTC AAG CCG AVG CCG GAC GCG GAG GAT CTC GTT GTG  
5539 ACC CAT GGC GAT GCG TGC TTG CCG AAT ATC ATG GTG GAA AAT GGC CCG TTT TCT GGA TTC ATC GAC TGT GCG CCG CTG  
5617 GGT GTG GCG GAC CCG TAT CAG GAC ATA GCG TTG GCT ACC CCG GAT ATT GCT GAA GAG CTT GGC GCG GAA TGG GCT GAC  
5675 CCG TTC CTC GTG CTT TAC GGT ATC CCG GCT CCG GAT TCG CAG GCG ATC GCG CCG TTT CAT CCG CTT GAC GAG TTC TTC  
5773 TGA GGG GGA CTC TGG GGT TCG GTG CTA CCA GAT TTC GAT TCC ACC GCG TTC TAT GBA AGG TTS GCG TTC GGA ATC  
5851 GTT TTC CCG GAC GCG GGC TGG ATG ATC CTC CAG GCG GAT CTC ATG CTC GAG TTC TTC GAG TTC TTC GCG CCC AAC TTG TTT  
5929 ATT GCA GCT TAT AAT GGT TAC AAA TAA AGC AAT AGC ATC ACA AAT TTC ACA AAT TTC ACA AAT TTC TCA CTG CAT TCT  
6007 TCA TGG TCA TAG TTT CTT GTS TGA AAT TGT TAT CCG CTC ACA ATT CCA CAC ATA CCA GCG GGA AGC ATA AAG  
6085 TGT BAA OCC TGG GGT GCC TBA TGA GTG AGC TBA CTC AGA TTA ATT GCG TCA CTC TCG GCT TTC GCG TAG GTG GTC AAT ATT  
6163 AAC CTG TCG TGC CAG AAT TGC ATG AAG AAT CTG CTT AGG GTT AGG GGT TTT GCG CAT TGC ATA GGT TGT ATC AAT  
6241 GGC CAT TAG CCA TAT TUA TTG GTT ATA TAG CAT AAA TUA ATG TTS GCT ATT GAC ATT GAT TAT TGA CTA GTT ATT AAT  
6319 ATT ATA ATA TGT ACA TTT ATA TTG GCT CAT GTC CAA CAT TAC CCG CAT TCC GGT TTA CAT AAC TTA CCG TAA ATG GCC CCG  
6375 AGT TGT GGT TTG TCC AAA CTC ATC AAT GTA TCT TAT CCG CTC ACA ATT CCA CAC ATA CCA GCG GGA AGC ATA AAG  
6453 TCC GCT GAC CCG CCA ACC CCG CAT TGA CCG ATT TGA CCG TAT TGA TGA TGC CCA TAG CCG CAA TAG GGA CTT  
6531 TCC ATT GAC GTC AAT GGG TGG AGT ATT TAC GGT AAA CTC CCG ACT TGG CAG TAC ATC AAG TGT ATC ATA TGC CAA GTA  
6709 CCG CCC CTA TTG ACG TCA ATG ACG GTA AAT GGC CCG CCG GAT ATG CCG AGT ACA TGA CCG TAT GGG ACT TTC CTA  
6787 CTT GGC AGT ACA TCT ACG TAT TAG TCA TCG CTA TCG TGG TGG GGT TTT GGC AGT ACA TCA ATG GGC GTG GAT



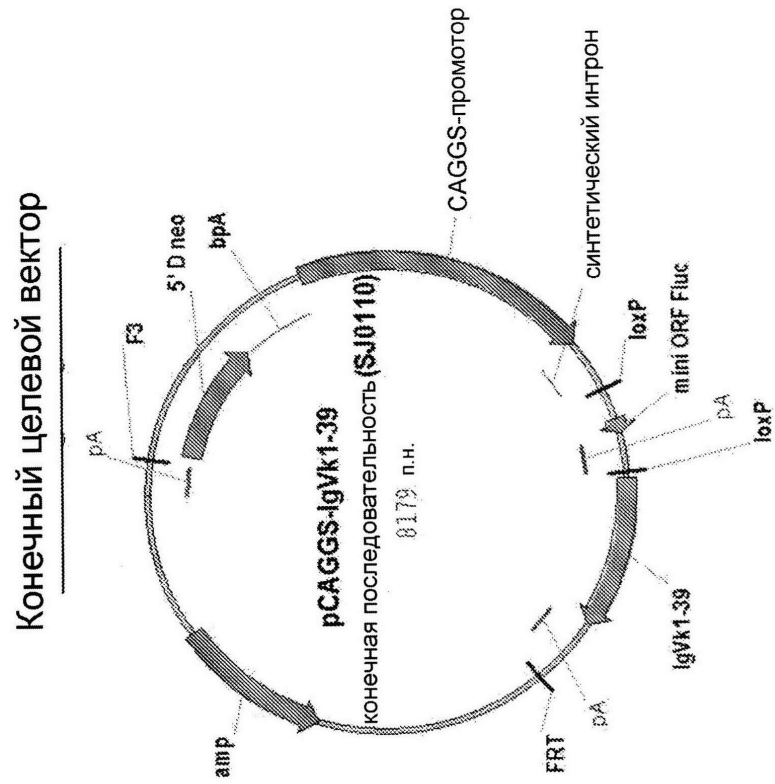
ФИГ.12 (продол.)

6865 AGC GGT TTG ACT CAG GGG GAT TTC CAA GTG TCC ACC CCA TTG ACG TCA ATG GGA GTT TGT TTT GGC ACC AAA ATC AAC  
6866 GGG ACT TTC CAA AAT GAT GGC GAT ACA ACT CCG GTC GTC GGC GGC TAC TAC GGT GGG AGG TCT ATA  
7021 TAA GCA TAC CTC GTT TAG TGA TGA GGC GTC GTC GGC GTC GTC GGC GTC GTC GGC GTC GTC GGC GTC GTC GGC GTC GTC  
7099 GGG ACC GAT CCA GCC TCC GCG GGG AAC GGT GCA TCG GAA GCT TGG TAC ATT AGG CGC GGC GTC GAG GTT  
7177 ATC GAT CCG ACC GAC GGG TTC GCG AGA GGC GAT TCC CTA GCC ACC ATG GCA TGC CCT GGC TTC CTG TGG GCA CTT  
7255 GTG ATC TCC ACC TGT CTT GAA TTC TCC ATG GCT GAC ATG ACC AGC TAC TTA AAT TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGG  
7333 GGA GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG AGC ATT AGC AGC TAC TCA TCA AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCT  
7411 AAA GCT CXT AAG CTC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTG CCA ACT TAC TAC TGT CAA CAG AGT TAC AGT  
7489 GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT CTG CAA CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAC TAC TGT CAA CAG AGT TAC AGT  
7567 ACC CCT CCA ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA CXT AAG TGC ACT TTG CCG CCG CTA GGA AGA AAC TCA  
7645 AAA CMT CAA GAT TTT AAA TAC GCT TCT TGG TCT CCT TCC TAT AAT TAT TAT CTG GGA TAA GCA TCC TGT TTT CTG TCT GTC  
7723 CCT AAC ATG CCC TGT GAT TAT CCG CAA ACA ACA CAC CCA AGG GCA GAA CTT TGT TAC TTA AAC ACC CTG TTT GCT  
7801 TCT TTC CTC AGS AAC TGT GGC TGC ACC ATC TGT CMT CTT CCG GCT ATC TGA TGA GCA GTT GAA ATC TGG AAC TGC  
7879 CTC TGT TGT GTG CCT GGT GAA TAA CTT CTA TCC CAG AGA GGC CAA AGT ACA GTG GAA GGT GGA TAA CCG CCT CCA ATC  
7957 GGG TAA CTC CCA GGA GAG TGT CAC AGA GCA GAA GAG CAC TCA CCA GGG CCT GAG CTC GCT CAC AAA GAG  
8035 CAA AGC AGA CTA GGA GAA ACA CAA AGT CTA CCG CTG CCA AGT CAG TCA CCA GGC TCA CCA GGC TGA TCA GGC TCG  
8113 CTT CAA CAG GGG AGA GTG TTA GGT TTA ACG GAT CCG AGC TCG GTA CCA AGT TTA AAC GCT TCC TCC TTG AAG GGT GGC ACT CCG  
8191 ACT GTG CTT TCT AGT TGC CAG CCA TCT GTT GTT TGC CCG CCG GTG AGT TGT GAT TCT ATT CTG GGG GGT GGG GTG  
8269 CCG TTA CCG GAT ACC TGI CCG CTT TTC TCC CTT GGG GAA GGG TGG AGC ACC TGC TCG GAT TGT GAT GCG GTG GCT CCG CTT  
8337 GGG CAG GAC AGC AAG GGG GAG GAT TGG GAA GAC AAT AGC AGG CAT GCT GAG GAT GCG GTG GGT TCC GTA TTG GGC GAT CCG CTT  
8425 GCG GAA AGA ACC AGC TGC AIT AAT GAA TCG GCC AAC GCG GGG GGA GAG GCG GTT TCC GTA TTG GGC TAA TAC GGT  
8503 CCT CCG TCA CTG ACT CCG TGC CCG TCG TCG TCC GCG GAG CAG CAA AGC ACA TGT GAG CAA AGC AGC AAA AGC CCA ACC GTA AAA AGG  
8581 TAT CCA CAG AAT CAG GGG ATA ACG CAG GAA AGA ACA TGT GAG CAA AGC AGC ATC ACA AAA ATC GAC GCT CAA AGC AGA GGT GGC  
8659 CCG CCT TGC TGG CGT TTT TCC ATA GGC TCC GGC CCG CTC AGS AGC ATC ACA AAA ATC GAC GCT CAA AGC AGA GGT GGC  
8727 GAA AGC CBA CAG GAC TAT BAA GAT ACC AGG CFT TTC CCG CTC GAA SGG TGG CSC TTT CTC AVA GCT CAC GCT GTA GGT ATC TCA  
8815 CCG TTA CCG GAT ACC TGI CCG CTT TTC TCC CTT GGG GAA GGG TGG AGC ACC CCG TGC CAG CAG CCA CTG GTA ACA GGA TTA GCA  
8893 GTT CCG TGT AGG TGG TTT GCT CCA AGC TGG GCT GTG TGC ACG AAC CCG CCG CAG CAG CCA CTG GTA TTG GGC GAT CCG CTT  
8971 GTA ACT ATC GTC TTG AGT CCA ACC CCG TAA GAC ACT TAT CCG CAC TCG CAG CAG CCA CTG GTA TTG GGC GAT CCG CTT  
9049 CAG CBA GGT NTG TGG GCG GTG CTA CAG AGT TCT TGA AGT GGT GGC CTA ACT ACG GCT ACA CTA GAA GAA CAG TAT TTG  
9127 GTA TCT CCG CTC TGE TGA AGC CAG TTA CCT TTG BAA BAA GGT TTG BTA GGT CTT GAT CCG GCA AAC CCA CCA CCG CTG  
9205 GTA CCG GTG GTT TTT TTG TTT GCA AGC AGC AGA TTA CCG GCA GAA AAG GAT CTC AAG AAG ATC CTT TGA TCT TTT  
9283 CTA GGG GGT CTG ACG CTC AGT GGA ACC AAA ACT CAC GTT AAG GGA TTT TGG TCA TGA GAT TAT CAA AAA GGA TCT TCA  
9361 CCT AGA TCC TTT TAA ATY BAA AAT GAA GTT TTA AAT CAA TCT AAG CTA TGT ATG ACT AGT BAA GGT GCT CTG ACA GTT ACC  
9439 AAT GGT TAA TCA GTC AGG CAC CTA TCT CAG CCA TCT GTC TAT TTC CMT CCA TGA TAC CCG GAG ACC CAC GCT CAC CCG CTC  
9517 AGA TAA CTA CCA TAC GGG AGG GGT TAC CAT CTG GCC CCA GTC CAA TGA TAC CCA TCA TCA TCA TCA TCA TCA TCA TCA TCA  
9595 CAG AAT TAT CAG CAA TAA ACC AGC CAG GGG GCG AGC GCA GAA GTG TAC CTA CTT TGT GCA CCG TTG TTS CCA TTG CTA  
9673 AGT CTA TTA ATT GTT GCT GCG GGG AAG CTA GAG TAA GTC CAG TTA ATY TTT CCG CAG TTA ATY TTT TGT GCA CCG TTG CTA  
9751 CAG GCA TCG TGG TGT CAC GCT CXT GTG GTA TGG GTT CAT TCA GCT CCG GTT CCG GTT CCA GAA GTA AGT TGG CCG CAG TGT  
9829 GAT CCG CCA TGT TGT GCA BAA AAG CCG TTA GCT CCT TCG GTC CTC GGA TCG TTG TCA GAA GTA AGT TGG CCG CAG TGT  
9907 TAT CAC TCA TGG TTA TGG CAG CAC TGC ATR AIT CTC TTA CTG TCA TGG CXT CCG TAA GAT GAT GCT TTT CTG TGA CTG GTG  
9985 AGT ACT CAA CCA AGT CAT TCT GAG AAT AGT GTA TGC GAG CAG GTT GCT CTT GCG GGG GAA TCT CAA GGA TTT TAC  
10063 CCG CCG CAC ATA GCA GAA CTT TAA AAG TGC TCA TTG BAA AAC CTT CTT CCG GGG GAA TCT CAA GGA TTT TAC  
10141 CCG TGT TGA GAT CCA GTT CCA TGT AAC CCA CTG GTG CCA CCA ACT GAT CTT TTA CTT TCA CCA GCG TTT  
10219 C TG GGT GAG CAA AAA CAG GAA GGC AAA ATG CCG CAA AAG GGA TAA TAA GCG CCA GAG AAT GTT GAA TAC TCA

34/79

ФИГ. 13

A



## ФИГ.13 (продол.)

B

1 atccaggc g gatcaataa agatcatta ttttcaatag atctgtgtgt tggttttttg  
 61 tgtgctttg gggaggggga ggcagaatg aggcgcggcc aagggggagg gggaggccag  
 121 aatgacctg ggggagggg aggcagaat gaccttggg gagggggagg ccagaatgag  
 181 ggcggatcc ggaagaattc ctattccgaa gtccctattc ttcaaatagt ataggaactt  
 241 cgtcgaagg atcggccaatt gaacaagatg gattgcaagg aggttctccg gccgcttggg  
 301 tggagaggc attcggctat gactggcac aacagacaat cggctgctct gatgccgcg  
 361 tgttccggc gtcagcgag gggcgccgg tctttttgt caagaccgac ctgtccggtg  
 421 cccgtaatg actgcaggac gggcagcgc ggtatcgtg gctggccaag acggcgctt  
 481 cttgcgcagc tgtgctcgac gttgtcactg aagcgggaa ggaactggctg ctattgggcg  
 541 aagtgcggg gcaggatctc ctgtcatctc acctgtctc tgcgagaaa gtatccatca  
 601 tggctgatgc aatgcggcgg ctgcatacgc ttgatccggc tacttgcca ttgcaccac  
 661 aagcgaaca tcgcacgag cgaagagcat caggggctcg cgcacgcga actgttcgac aggtcaagg  
 721 atgatctgga cgaagagcat caggggctcg gatctcgtcg tgaccatgg cgatgctgc ttgcogaata  
 781 cgcgatgcc cgaagcagc gatctcgtcg tgaccatgg cgatgctgc ttgcogaata  
 841 tcattgggga aatggcgc tttctggat tcaatcactg tggcggctg ggtgtggcgg  
 901 accgctatca ggcatacgg ttggctacc cgtatctcgc tgaagagctt ggcggcgaat  
 961 gggctgacc cttcctcgtg ctttacggta tcgcgctcc cgttcgcaag cgcacgcct  
 1021 tctatgcct tcttgacgag ttcttctgag gggatcgtac cgtgtaagt ctgcagaaat  
 1081 tgatgacta ttaacaata aagatgtcca ctaaatgga agttttctct gtcatacttt  
 1141 gtaagaagg gtgagaacag agtaacctca ttttgaatgg aaggattgga gctacggggg  
 1201 tgggggtgg ggggattag ataaatgct gctctttact gaaggctctt tactattgct  
 1261 ttatgataat gtttcatagt tggatataat aatttaaaaa agcaaaaaa aattaaggcc  
 1321 cagctcattc ctcccactca tgatctatag atctatagat ctctcgtggg atcaattgtt  
 1381 ttctcttgat tcccactttg tggttctaag tactgtgggt tccaaaatgtg tcagtttcat

## ФИГ.13 (продол.)

1441 agccctgaaga acgagatcag cagcctctgt tccacataca cttcattctc agtattgttt  
 1501 tgcacaagttc taattccatc agaagctgac tctagatggc gcgtatgcag gtttttcgaca  
 1561 ttgattatttg actagttatt aatagtaalc aatcacgggg tcaattgttc atagcccata  
 1621 taTggagttc cgcgttacat aacttaoagt aaatggcccg cctggctgac cgcacaacga  
 1681 cccccccca ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgccaa tagggacttt  
 1741 ccattgactt caatgggtgg agtatttacg gtaaacgcc cacttggcag tacatcaagt  
 1801 gTatcaatg ccaagtaoag cccctattga cgtcaatgac ggtaaaaggc ccgcctggca  
 1861 ttatgcccaag tacatgacct tatgggactt tccacttgg cagtacatct acgtattagt  
 1921 catcgtatt accatggctg aggtgagccc cacttcttcg ttcactctcc ccactctccc  
 1981 cccctcccca ccccaattt tgtatttatt tatttttaa ttattttgtg cagcgaatggg  
 2041 ggcgggggggg gggggggcgc gcgccagcgc gggcggggcg gggcgggggg cggggggggg  
 2101 cgaagcggag aggtgcggcg gcagccaalc agagcggcgc gctccgaaaag ttctctttaa  
 2161. tggcgaagcg gcggcggcgg cggccctata aaaagcgaag cgcgcggcgg gcggggagtgcg  
 2221 ctgcgttgc ttgcacctt gccccgctcc gcgcgcctc gcgcgcctc ccccggctct  
 2281 gactgaccgc gttactcca caggtgagcg ggcgggacgg ccttctctct cggggctgta  
 2341 attagcgtt ggtttaatga cggctcgttt cttttctgtg gctgcgtgaa agccttaaaag  
 2401 ggcctccggga gggccctttg tgcggggggg agcggctcgg ggggtgcgtg cgtgtgtgtg  
 2461 tgcctgggga gcgccgcgtg cggccgcgc tgcgccggcg ctagagcgc tgcggggcgcg  
 2521 gcgcggggct ttgtgcgtc cgcgtgtgcg caaggggagc gcggccgggg gcggtgcccc  
 2581 gcggtgcggg ggggtgcga ggggaacaaa ggctgcgtgc ggggtgtgtg cgtgggggggg  
 2641 tgagcagggg gttgtggcgc ggcggctcgg ctagaacccc cccctgcacc cccctccccg  
 2701 agttgctgag cacgccccgg cttcgggtgc ggggctcctg gggggcgtg gcgcggggct  
 2761 cgcctgcgg ggcggggggg ggcggcaggf ggggggtgcg gggggggggg ggcgcctcgc  
 2821 ggcgggggag ggcctcggggg aggggcgcgg cggccccgga gcgccggcgg ctagcagggc  
 2881 gcggcagacc gcagccattg ccttttatgg taatcgtgcg agagggcgca gggacttctt  
 2941 ttgtcccaaa tctgtgcgga gccgaaatct gggagggcgc gccgacccc cttctagcggg

37/79

## ФИГ. 13 (продол.)

3001 cgcggggcga agcgggtgcg cgcggccagg aaggaaatgg gcggggaggg ccttcgtagc  
 3061 tcgcccggcc gcggtccct tcctcctc cagcctcggg gctgtccggc gggggacggc  
 3121 tgccttcggg ggggacgggg cagggcgggg tcggcttct ggcgtgtgac cggcgctct  
 3181 aagaagcgtt gggtgagtac tcctctca aagcgggcat gacttctgcg ctaagattgt  
 3241 cagtttccaa aaacgaggag gatttgatat tcaactggcc cgcggtgatg ccttgagggg  
 3301 tggccggctc catctgggtca gaaaagacaa tccttttgtt gtcaagcttg aggtgtggca  
 3361 ggccttgat ctggccatc acttgagtga catgacatc cacttlgect ttctcccac  
 3421 aggtgtccac tcccagggcg gccctccggag cgatcccgga tccgctagg caatgttta  
 3481 aatcggccgg ccataacttc gtataatgta tgcatacga agttatggat cctcacagta  
 3541 ggtggcatcg ttctttctg actgcccgc ccccgatgc cgtcccggga tattgagctc  
 3601 cgaacctctc gccctgcgc cgcgggtgct ccgtcggcgc cgcgcgcca tggaaatcga  
 3661 gccaccatgg atcttacgg aaaactcag ccaagaaaaa tcagagagat cctcataaag  
 3721 gtcaagaagg gcggaagat cgcggtgtaa ttctagaccg gttcagatc caggcgcgga  
 3781 tcaataaag atcattattt tcaatagatc tgtgtgttgg tttttgtgt gccctggggg  
 3841 agggggaggc cagaatgag cgcggccaag ggggaggggg aggcagaat gacctgggg  
 3901 gagggggagg ccagaatgac cttgggggag ggggagggca gaatgaggcg cgcctccgt  
 3961 cgaactataa ctctgataa tgtatgctat acgaagtat ggcggccgc accaatggaca  
 4021 tgagagtgcc cggccagctc ctggggctcc tgctactctg gctccgaggt aaggatggag  
 4081 aacctagga atttactcag ccagtggtct cagtgactgac tggaaactca gggaaqtctc  
 4141 ctgataacat gattaatagt aagaatattt gttttatgt ttccaatctc aggtgccaga  
 4201 tgtgacatcc agatgaccca gagcccagc agcctgagcg ccagcgtggg ccacagagtg  
 4261 accatcact gcagagccag ccagagcacc agcagatc tgaactggta tcagcagaag  
 4321 cccggcaagg ccccaagct gctgatctac gccgccagct ccttgagag cggcgtgccc  
 4381 agcagattca gcggcagcgg ctccggcacc gacttcacc tgaccatcag cagcctgca  
 4441 cccgaggact tcggcaccta ctactgccag cagagctaca gcaccccc caccctcggc  
 4501 cagggcaccca aggtggagat caagagagcc gacgcgctc ccacctgtc catctcccc

## ФИГ. 13 (продол.)

4561 cccagcatgg aacagctgac ctctgcccga gcccacgtgg tctgcttctg gaacaaattc  
 4621 taccocagag acatcagcgt gaagtggaaag atcgacgcca gcccagcagag ggcagggcgtg  
 4681 ctggacagcg tgaccgacca ggcacgcaag gactccacct acagcatgag cagcaccctg  
 4741 agcctgacca aggtggagta cggagggcac aacctgtaca cctgagaggt ggtgcacaag  
 4801 accagctcca gcccctgggt caagtccttc aaccggaacg agtgttgagg tagcttaaga  
 4861 tttaaatagg cggcccgct cgaacctgag atccaggcgc ggtatcaataa aagatcatta  
 4921 ttttcaatag atctgtgtgt tggttttttt tggccttgg gggagggggga gggcagaatg  
 4981 aggcgcggcc aagggggagg gggagggccag aatgaccttg ggggagggggg agggcagaat  
 5041 gaccttgggg gaggggagg ccagaatgag ggcgcccccc gggtaaccgag ctgcaattag  
 5101 tggatcctca cagtaggtag catcgttctt tctgactgc cggccccccg catgcccgtcc  
 5161 cgcgatabtg agctccgaac ctctgcccct gccgcggccg gtgcttcgct gccgcggcgc  
 5221 cgccatgpaa tcgcccgggt aaccgaaagt cctatacttt ctagagaata ggaacttcgg  
 5281 aataggaaact tcaagccggg acccagcttt tgttcccttt agtgagggtt aatttcgagc  
 5341 ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct cacaattcca  
 5401 cacaacatac ggcgggggag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaatg agtgagctaa  
 5461 ctcaatttaa ttgggttgg ctcactgccc gctttccagt cgggaaacct gtcgtgcccag  
 5521 ctgeattaat gaatcgcca acgcccgggg agaggcgggt tgcgtattgg ggcctcttcc  
 5581 gcttctctgc tcactgactc gtcgctcctg gtcgttcggc tgcggcggag ggtatcagct  
 5641 cactcaaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataaccaggg aaagaacatg  
 5701 tgagcaaaaag gccagcaaaa gggccaggaac cgtaaaaagg ccgcttctgt ggcgtttttc  
 5761 cataggctcc gccccttga cyagratcac aaaaatcgac gctcaagtea gagg tggcga  
 5821 aaccggacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcctct  
 5881 cctgttccga cctgcccgt taccggatac ctgtccgctt tctcccttc gggaaagcgtg  
 5941 gcgctttctc atagctcag ctgtaggat ctcaagttcgg tgtaggctgt tgcctccaaag  
 6001 ctgggctgtg tgacgaaac cccgcttcag cccgaccgct gggccttate cggtaactat  
 6061 cgtcttgagt ccaaccctgt aagacacgac ttatccacc tggcagcagc cactggtaac

## ФИГ. 13 (продол.)

6121 agdattagca gdcgaggtg tftagcgggt gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac  
 6181 tacggctaca ctagaaggac agtatttggg atctgcyctc tgcrgaagcc agttaccttc  
 6241 ggaataaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctgftag cggtagtttt  
 6301 ttgtttgca agcagcagat tacgpcaga aaaaaagat ctaagaaga tcctttgac  
 6361 ttttctacgg ggtctgacgc tcagtgaac gaaaactcac gttaaagggat ttgggtcatg  
 6421 agattatcaa aaaggatctt cacctagatc ctittaaatt aaaaatgaag ttttaaatca  
 6481 atctaaagta tatatgagta aacttggctt gacagttacc aatgcliaat cagtgaagca  
 6541 cctatctcag cgtctgtctt atttcgttca tccatagttg cctgactccc cgtcgtgtag  
 6601 ataactacga tacgggaggg cttaccatct gcccacgtg ctgcaatgat accgagagac  
 6661 ccacgctcac cggctccaga ttatcacga ataaaceagc cagccggaag ggcgagcgc  
 6721 agaagtggtc ctgcaacttt atccgctcc atccagtcta ttaattgtg cgggaaagct  
 6781 agagtaagta gttcgcagtt taatagtttg cgaacgctg ttgccaatgac tacagggcatc  
 6841 gtggtgtcac gctcgtcgtt tggtaggct tcaatcagct ccggttccca acgatacaagg  
 6901 cgagttacat gatccccc atgtgtgcaaa aaagcgggta gctcctcgg tccctccgato  
 6961 gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtggtta tcaactatgg ttaaggcagc actgcataat  
 7021 tctcttactg tcatgcccac cgtaaagatgc ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag  
 7081 tcattctgag aatagtgat ggcggaccg agtctgctctt gccggcgtc aatacggggat  
 7141 aataccggc cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaaacg ttcttcggggg  
 7201 cgaactctt caagatctt accgctgttg agatccagtt cgtatcaacc caactcgtgca  
 7261 cccaactgat ctccagcat tttactttc accagcgttt ctgggtgagc aaaaacagga  
 7321 aggcataatg ccgcaaaaaa yggataaayg gcgacacgga aatgttgaat actcactc  
 7381 ttctttttc aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag cggatacata  
 7441 ttgaaatgta tttagaaaaa taaacaaata ggggttcgc gcacatttcc cggaaaagtg  
 7501 ccacctaaat tgtaagcgtt aatattttgt taaaattcgc gttaaatttt tgttaaatca  
 7561 gctcattttt taaccaatag gccgaaatcg gcaaaatccc ttataaatca aagaataga  
 7621 ccgagatagg gttgagtgctt gttccagttt ggaacaagag tccactatta aagaacgtggy

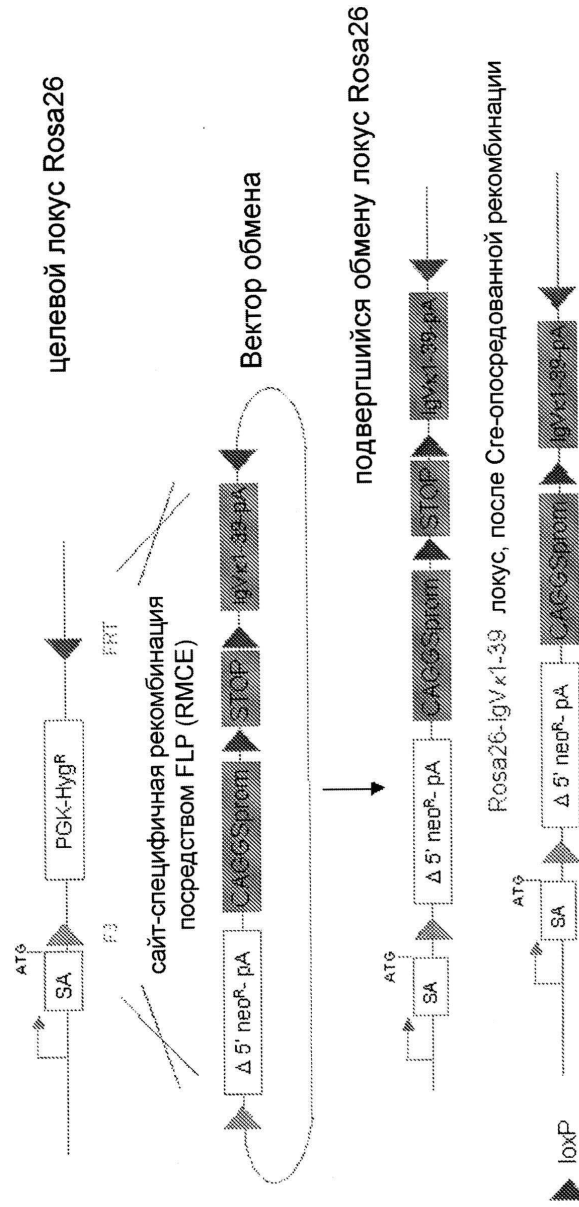
## ФИГ.13 (продол.)

7681 actccaactg caaaggcga aaaaactgt atcaggcga tggccacta cgtgaacct  
7741 caccctaact aagtttttg ggttcaggt gccgtaaac actaaatcgg acccctaaag  
7801 ggagcccccg abttagact tgcggggaa agccggcga cgtggcgaga aggaaagga  
7861 agaaagcga agagcggc gctaggcgc tggcaagtgt agcggtcacg ctgcgcgtaa  
7921 ccaccaccc cgcgcgctt atgcgccg tacaggcgc gccccattcg ccattcaggg  
7981 tgcgcaactg ttgggaaggg cgtccggtgc gggcctcttc gctattacgc cagctggcga  
8041 aaggggatg tctgcaagg cgttaaagt ggtaacgcc agggltttcc cagtcacgac  
8101 gttgtaaac gacggccaagt gaggcgcgt aatcacgctc actatagggc gaattggggg  
8161 taactaagta aggatcgag



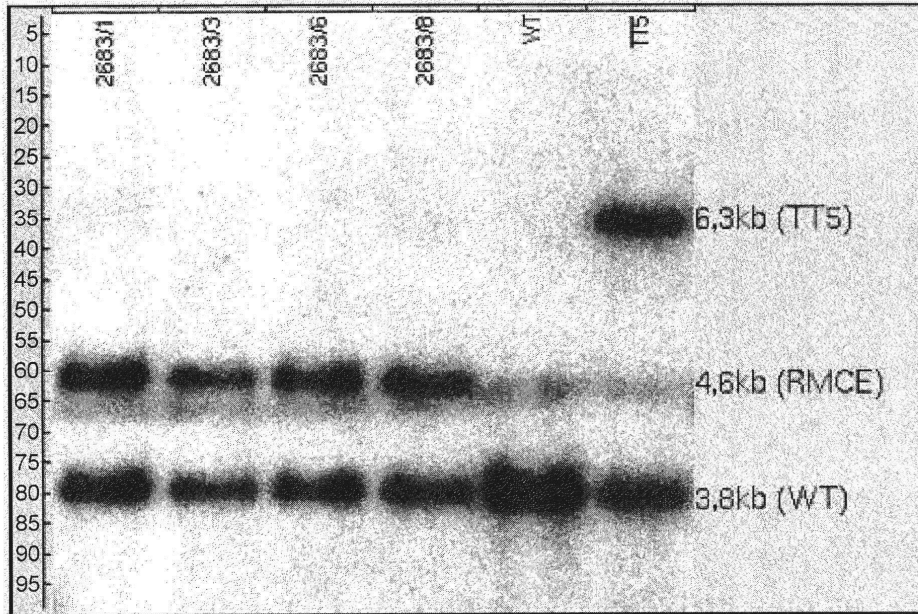
ФИГ.13 (продол.)

C

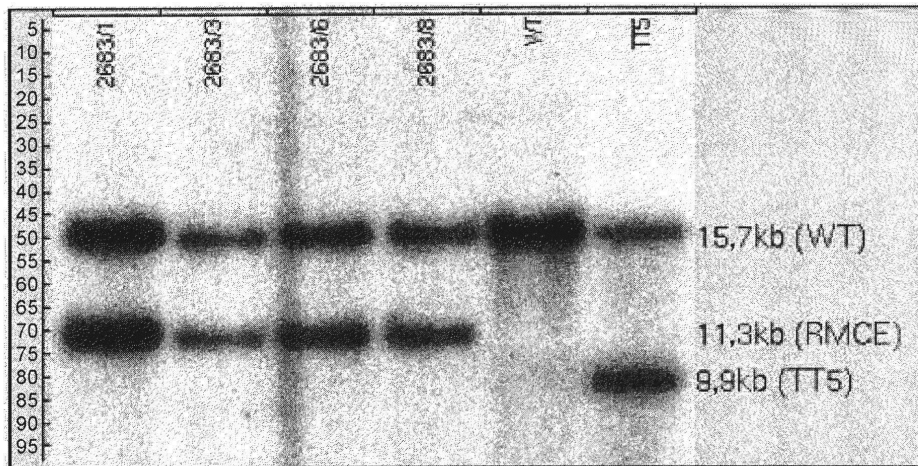


42/79

ФИГ.14А

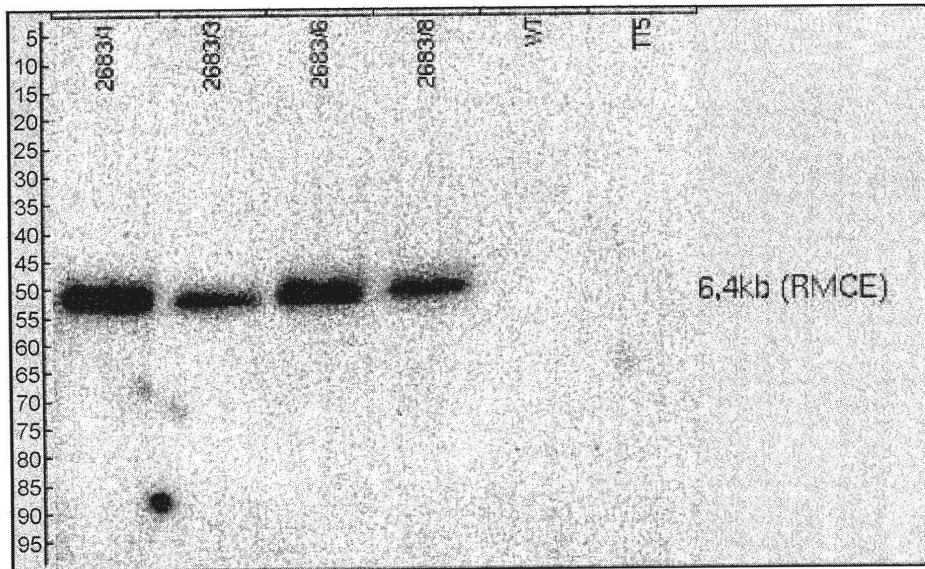


ФИГ.14В



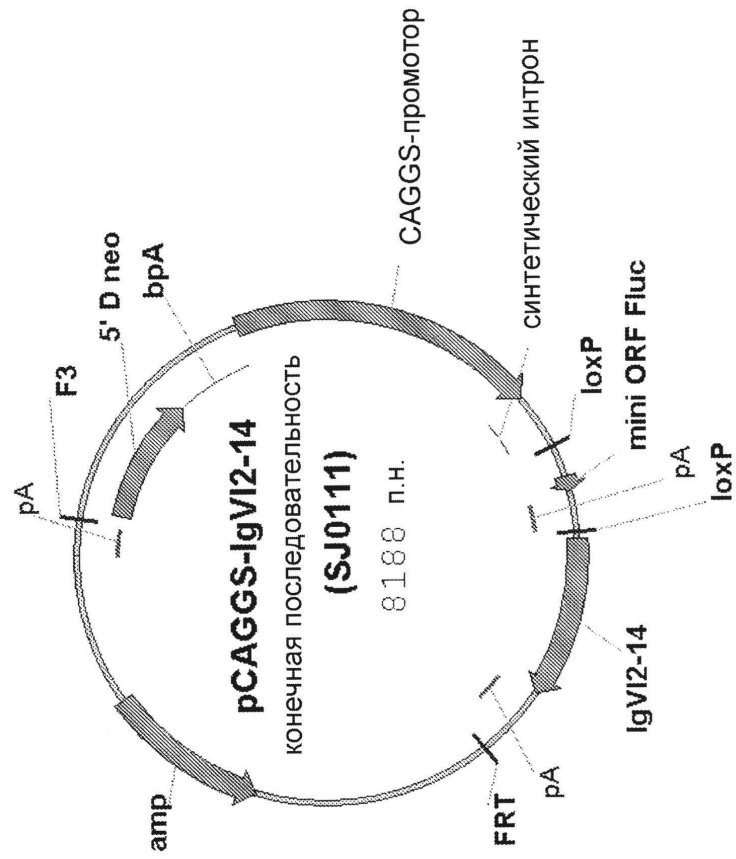
43/79

ФИГ.14С



ФИГ.15

A



45/79

## ФИГ. 15 (продол.)

B

1 atccaggc ggatcaataa aagatcatta ttttcaatag atctgtgtgt tggttttttg  
 61 tgtcccttgg gggaggggga gggcagaatg aggcgggccc aagggggagg gggaggccag  
 121 aatgaccttg gggagggggg aggcagaat gaccttgggg gagggggagg ccagaatgag  
 181 gcgaggatcc ggagaagttc ctattccgaa gtccctatlc tcaaatagt ataggaaactt  
 241 cgtcgggg atcgccatt gaacaagatg gattgcaagc aggttctccg gccgcttggg  
 301 tggaggagct attcggctat gactggggac aacagacaat cggctgtctt gatgccgog  
 361 tgttcggct gtcagcgcag gggcgccgg tctttttgt caagaccgac ctgtccggtg  
 421 ccctgaatga actgcaggac gaggcagcg ggtatctgtg gctggccaag acgggggttc  
 481 cttgcgagc tgtgctgac gttgtcactg aagcgggaaag ggcctggctg ctattgggog  
 541 aagtgcgggg gcaggatctc ctgtcatctc acctgtctcc tgcgagaaa gtatccatca  
 601 tggctgatgc aatgcggcgg ctgcatacgc ttgatccggc taactgccc ttcgaccacc  
 661 aagcgaataa tgcatacagc cagacacgta ctccgatgga agccggctctt gtcgatacag  
 721 atgatcttga cgaagagcat caggggtctcg cggcagccga actgttcgcc aggtcaagg  
 781 cgcgatgccc cagcggcag gatctctcg tgaccatgg cgatgctgc tggccaata  
 841 tcatgttga aatggcgc ttttctggat tcatcagctg tggcggctg ggtgtggcgg  
 901 accgctatca ggacatagcg ttggctacc gfgatattgc tgaagagctt ggcggggaat  
 961 gggctgaccg cttctctgtg ctttaaggta tggcgcctcc cgattcgcag cgcctggct  
 1021 tctatcgctt ccttgacgag tcttctttag gggatcgatc cgcctgaagt ctgcagaaat  
 1081 tgatgatcta ttaacaata aggatgcca ctaaaaatgga agttttctct gtcatacttt  
 1141 gttaaagaag gtgagaacag agtacctaca ttttgaatgg aaggattgga gctacggggg  
 1201 tgggggttgg gttggattag ataaagcct gttctttact gaaggctctt tactattgct  
 1261 ttatgataat gtttcatagt tggatatcat aatttaaca agcaaaaacca aattaaggc  
 1321 cagctcattc ctcccactca tgatcitatag atctatagat ctctcgtggg atcattgtt

ФИГ. 15 (продол.)

1381 ttctcttgat tcccaacttg tggtttaag tactgtggtt tccaaatgag tcagtttcat  
 1441 agcctgaaga acgagatcag cagcctotgt tccacataca ctccalictc agtattggtt  
 1501 tgcgaagttc taattccatc agaagctgac tctagatggc gcgtatgcaag gttttcgaca  
 1561 ttgattattg actagttatt aatagtaac aattacgggg tcattagttc atagcccata  
 1621 taaggagttc cgcggtacat aacttaaggt aaatggcccg cctggctgac cgcccaacga  
 1681 ccccccga ttgacgtcaa taatgagta tgttcccata gtaacgcaa tagggacttt  
 1741 ccattgacgt caatgggttg agtatttacg gtaaacgtcc cacttggcag tacatcaagt  
 1801 gtatcatalg ccaagtaacg cccctattga cgtcaatgac ggtaaatggc ccgcctggca  
 1861 ttatgcccag tacatgacct tatgggactt tccctacttg cagtacatct acgtattagt  
 1921 catgctatt acctggtcg aggtgagccc caegtctgc ttcactctcc ccactcccc  
 1981 cccctcccc ccccaaltt tgtatttatt tattttttaa ttattttgtg cagcgatggg  
 2041 ggcggggggg gggggggcgc gcgcagggcg gggcggggcg gggcgaagggg cggggcgggg  
 2101 cgaggcggag aggtgcggcg gcagccaatc agagcggcgc gctccgaaag ttccctttta  
 2161 tggcggggcg gcggcggcgg cggccctata aaaagcgaag cgcgcggcgg gcgggagtcg  
 2221 ctgctgtgcc ttgcgccgt gccccgctcc gcgcgcctc gcgcgcgcc ccccggctct  
 2281 gactgaaccg gttactcca caggtgagcg ggcgggagcg cccctctctt cggggctgta  
 2341 attagcgtt ggtttaatga cggctcgttt ctttctgtg gctcgtgtaa agccttaaag  
 2401 ggcctccgga gggccctttg tgcggggggg agcgcctcgg ggggtgcgtg cgtgctgtg  
 2461 tgcctgggga gcgccgcgtg cggcccgccg tgcgccggcg cctgagagcg tgcgggagcg  
 2521 gcgcggggct ttgtgcctc cgcgtgtgcy cgaaggggagc gcggccgggg gcgggtgccc  
 2581 gcgggtgcgg ggggctgcga ggggaacaaa ggtgcgtgc ggggtgtgtg cgtggggggg  
 2641 tgaacagggg gttgtggggc gcggtcggg ctgtaacccc cccctgcaac cccctccccg  
 2701 agttgctgag cacggcccgg cttcgggtgc ggggctccgt gcggggggcgtg gcgcggggct  
 2761 cgcctgccc ggcggggggg ggcgcaggt ggggtgtgccc ggcggggggcg ggcgcctcgc  
 2821 ggcgggggag ggtcggggg agggcggcg cggccccgga gcgcggggcg cgtgcgaggg  
 2881 gcggcagacc gcagccattg ccttttatgg taatcgtgcy agagggcgca gggacttcc

47/79

## ФИГ. 15 (продол.)

2941 ttgtcccaaa tctgtcggg gccgaaatct gggaggccgc gccgacccc ctctagcggg  
 3001 cgcggggcga agcggtcgg gcgcgacag aeggaatgg gcggggaggg ccttcgtgcg  
 3061 tgcgccgcgc gcgctccct tctccctctc cagcctcggg gctgtccgcg gggggacggc  
 3121 tgccttcggg ggggacggg cagggcggg tccggctctt ggcgtgtgac cggcggctct  
 3181 agaaagcgtt ggggtgagtc tccctctcaa agcgggcat gaectctgcg ctaagattgt  
 3241 cagtttccaa aaacgaggag gatttgatat tcacctgcc cgcgggtgat cctttgaggg  
 3301 tggccgcgtc catctggtca gaaaagacaa tcttttctt gtaagcttg aggtgtggca  
 3361 gctttgagat ctggccatc acttgagtga cattgacac cactttgctt tctctccac  
 3421 aggtgtccac tcccaggcgg gcctccggag cgtccgcga tccgctcagg caattgttta  
 3481 aatcggcccg ccataacttc gtataatgta tctatacga agttatggat cctcacagta  
 3541 ggtggcatcg tcccttctg actgcccgc cccgcgatgc cgtcccgcga tattgagctc  
 3601 cgaacctctc gccctgcgc cgcgggtgct ccgtccgcgc cgcgccgcca tggaaatcga  
 3661 gccaccatgg atcttaccgg aaactcgac gaaagaaaa tcagagagat cctcataaag  
 3721 gtaagaagg gcggaaagat cgcggtgtaa tcttagaccg gttcggagac caggcgcgga  
 3781 tcaataaagg atcattatct tcaatagatc tgtgtgttgg ttttttctgt gccttggggg  
 3841 agggggaggc cagaatgagg cgcggccaag ggggaggggg aggccagaaat gaccttgggg  
 3901 gggggggagg ccagaatgac ctctgggggag ggggaggcca gaatgaggcg cgcctccgt  
 3961 cgaacctataa cttcgtataa tgtatgctat acgaagttat ggcggccgcc accatggaca  
 4021 tgagagtgcc cgcaccgctc ctggggctcc tgcactctg gctccgaggt aaggatggag  
 4081 aacctagga attactcag ccagtgtgct cagttactgac tggaaactca gggaaagtctt  
 4141 ctgataacat gattaatagt aagaatattt gtttttctgt tccaatctc aggtgccaga  
 4201 tgtcagctcg cctgaccca gccgcctct gtgtctggca gccctggcca gagcatcacc  
 4261 atcagctga cggcaccag cagcagctg ggcggctaca actacgtgtc ctggtatcag  
 4321 cagcaccctg gcaaggcccc caagctgatg atctacagg tgtccaaacag acccagcggc  
 4381 gtgaggcaaca gattcagcgg cagcaagagc ggcaacaccg ccagcctgac catcagcggc  
 4441 ctccaggtcg aggaagaggc cgactactac tgcagcagct acaccagcag ctccaccctg

## ФИГ. 15 (продол.)

4501 gtgtttggcg gcggaacaaa gctgaccgtg ctgagaccg acgccgctcc caccgtgtcc  
 4561 atcttcccc ccagcatgga acagctgacc tctggcggag ccaacctggt ctgcttcgtg  
 4621 aacaaactct accccagaga catcagcgtg aagt'ggaaga tcgacggcag c'gagcagagg  
 4681 gacggcgtgc tggacagcgt gaccgaccag gacagcaagg actccacctc cagcatgagc  
 4741 agcaccctga gcctgaccaa ggtggagtac gagaggcaca acctgtacac ctg'caggtg  
 4801 gtgcacaaga ccagctccag ccccggtgtc aagtccttca accggaacga gtgttgagct  
 4861 agcttaagat ttaaataggc cggccgcgtc gacctcgaga tccagggcgc gatcaataa  
 4921 agatcattat ttcaataga tctgtgtgtt ggtttttgt gtgcttggg g'gaggggggag  
 4981 gccagaatga ggcgcggcca agggggaggg g'gagggcaga atgaccttgg g'gaggggggga  
 5041 gcccagaatg accttggggg agggggaggc cagaatgagg cgcgccccg ggtaccgagc  
 5101 tcgaattagt ggatcctcac agtaggtggc atcgttccctt tctgactgcc cgcgccccgc  
 5161 atgccgtccc gcgatatbga gctccgaacc tctcgccctg ccgcgcggg t'gctccgctc  
 5221 ccgcccgcgc gccatgggat cgcgccggtc accgaagttc ctatacttc tagagaatag  
 5281 gaacttcgga ataggaaact caagccggtc ccaagctttt gttcccttca gtgaggg'tta  
 5341 atttcgagct tggcgtaatc atggtcatag ctgtttcctg t'gtgaaattg ttatccgctc  
 5401 acaattccac acaacatacg agccggggagc ataaagtgtc aagcctgggg tgcctaaatga  
 5461 gt'gagctaac tcaattaat tgcgttggc tcactgcccg ctttccagtc g'ggaaacctg  
 5521 tcgtgccagc tgcattaatg aatcggccaa cgcgcgggga gaggcgg'ttt gcgtatt'ggg  
 5581 cgccttcccg ctctctgct cactgactcg ctgcctcggg t'cgttcggct gcggcgaggc  
 5641 gtatcagtc actcaaggc ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga taaccgagga  
 5701 aagaacatgt gagcaaaaagg ccagcaaaaag gccaggaacc gtaaaaaagc cgcgtt'gctg  
 5761 gcgtttttcc ataggctccg cccccctgac gagcatcaca aaaatcgagc ctcaagt'cag  
 5821 agt'ggcgaaa acccgacagg actataaaga taccaggcgt tccccctgg aagctccctc  
 5881 gt'gcgctctc ctgttccgac cctgcccctt accggatacc t'gtccgctt tctccctt'cg  
 5941 ggaagcgt'gg cgc'ttttca tagctcaecg t'gtaggtatc tcagttcgg't gtaggtcgtt  
 6001 cgtcccaagc t'ggc'tgt'gt g'cacgaaacc cccgtt'cagc ccgaccgctg cgcctt'atcc



## ФИГ. 15 (продол.)

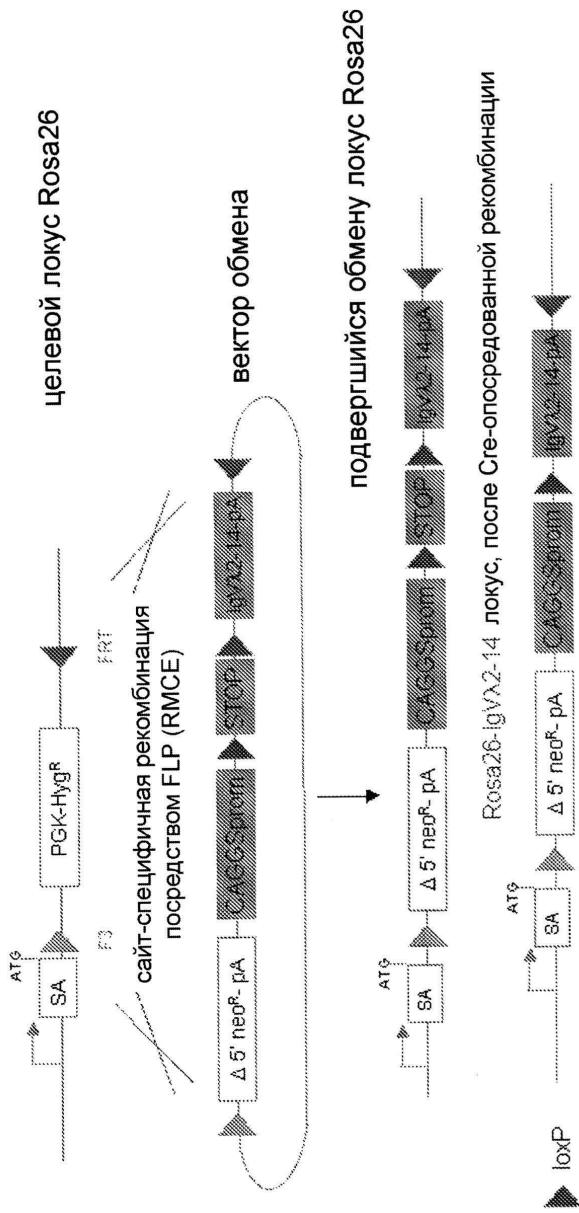
6061 ggtaaactatc gtcttgagtc caaccggta agaacgact tatcgccact ggcagcagcc  
 6121 actggtaaca ggtatagcag agcgaggtat gtaggcygtg ctacagagt cttagaagtgg  
 6181 tggcctaact acgggtacac tagaagaca gtatltggta tctgcyctct gctgaagcca  
 6241 gttaccitcg gaaaaagat tggtagctct tgatccggca acaaacacc cgtcggtagc  
 6301 ggtggttttt ttgttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat  
 6361 cctttgatct ttctacggg gctgaogct cagtggaaacg aaaactcacg ttaagggatt  
 6421 ttggtcatga gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc tttaaaatta aaaatgaagt  
 6481 tttaaatcaa tctaaagtat atatgagtaa acttgggtctg acagttacca atgcttaatic  
 6541 agtgaggcac ctatctcagc gatctgcta ttctgttcat ccatagttgc ctgactcccc  
 6601 gtcgttaga taactacgat acgggagggc ttaccatctg gccccagtcg tgcaatgata  
 6661 ccgcgagacc cacgctcacc ggtcccagat ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg  
 6721 gccgagcgca gaagtggctc tgcaacttta tccgctcca tccagctctat taattgctgc  
 6781 cgggaagcta gagtaagtag ttcgccagtt aatagtttgc gcaacgttctg tgcatttgc  
 6841 acagggcatcg tgggtgcacg ctcgctgctt ggtatggett cactcagctc cggttcccaa  
 6901 ogatcaagcc gagttacatg atccccatg ttgtgcaaaa aagcggtttag etccttcggt  
 6961 cctccgatcg ttgtcagaag taagttggcc gcagtgctat cactcagctc tatggcagca  
 7021 ctgcataatt ctcttactgt catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac tggtgagtac  
 7081 tcaaccgaat cactctgaga atagtgatg cggcgaccga gttgctcttg cccgggtca  
 7141 atacgggata ataccgccc acatagcaga actttaaaaag tgcctcatcat tggaaaacgt  
 7201 tcttcggggc gaaaaacttc aaggatctta ccgctgttga gatccagttc gatgtaaccc  
 7261 actcgtgcac ccaactgac ttcagcatct tttactttca ccagcgtttc tgggtgagca  
 7321 aaacagggaa ggcaaaatgc cgcaaaaaag ggaataaggg cgacacggaa atgttgaata  
 7381 ctcatactct tcccttttca atattatga agcatttato agggttattg tctcatgagc  
 7441 ggatacatal ttgaatgtat ttgaaaaat aaacaaaatag ggttcccg cacaattccc  
 7501 cgaaaagtcg cacctaaatt gtaagcgtta atatttgtt aaaattcggc ttaaaatttt  
 7561 gttaaaatcag ctcaattttt aaccaatagg ccgaaatcgg caaaatccct tataaatcaa

## ФИГ. 15 (продол.)

7621 aagaataagac cgaataaggg ttgagtgttg tccagtttg gaacaagagt ccaactatbaa  
7681 agaactgga ctccaactc aaaggcga aaacctcta tcaggcggat ggcactactac  
7741 gtgaaccatc accataatca agtttttttg ggtcgaggtg ccgtaagca ctaaatcggg  
7801 accctaaagg gagccccga ttragaactt gaaggggaaaa gccggcgaac gtggcgaaga  
7861 aggaaggga gaaagcga gtagcggcg ctaggcggct ggcaagtgtg gcggtcacgc  
7921 tgcgcgtaac caccacacc gccgcgctta atgcgcgct acagggcgcg tccatcggc  
7981 cattcaggct gcgcaactgt tgggaaggc gatcgggtcg gccctcttcg ctattacgcc  
8041 agctggcga agggggatgt gctgcaaggc gattaagtg ggtaacgcca gggttttccc  
8101 agtcacgacg tgtaaaaag acggccagtg agcggcgcta atacgactca ctataggcgg  
8161 aattgggggt aactaagtaa ggatcag

ФИГ. 15 (продол.)

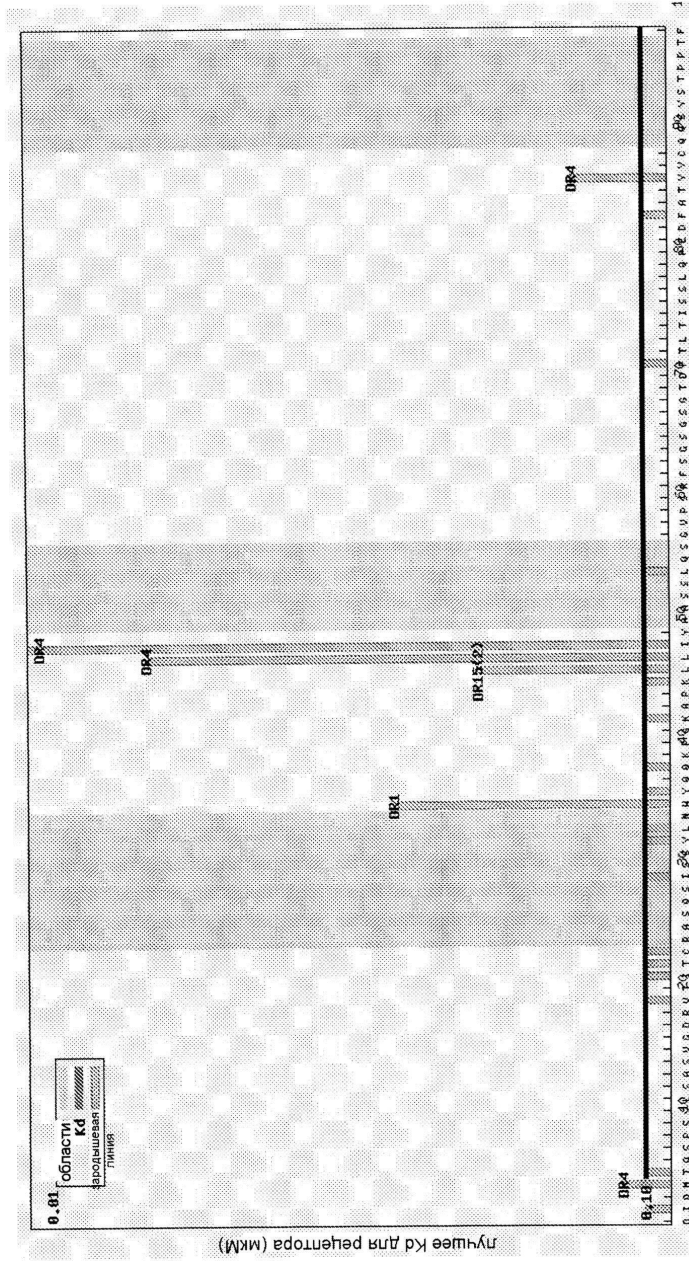
С



52/79

ФИГ.16

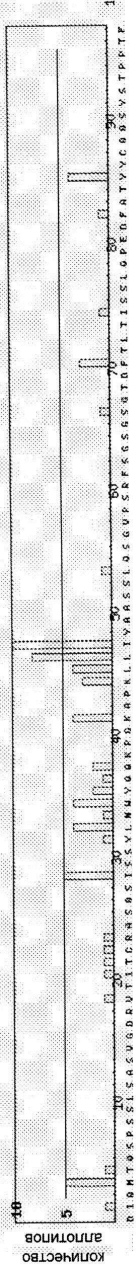
A



53/79

ФИГ. 16 (продол.)

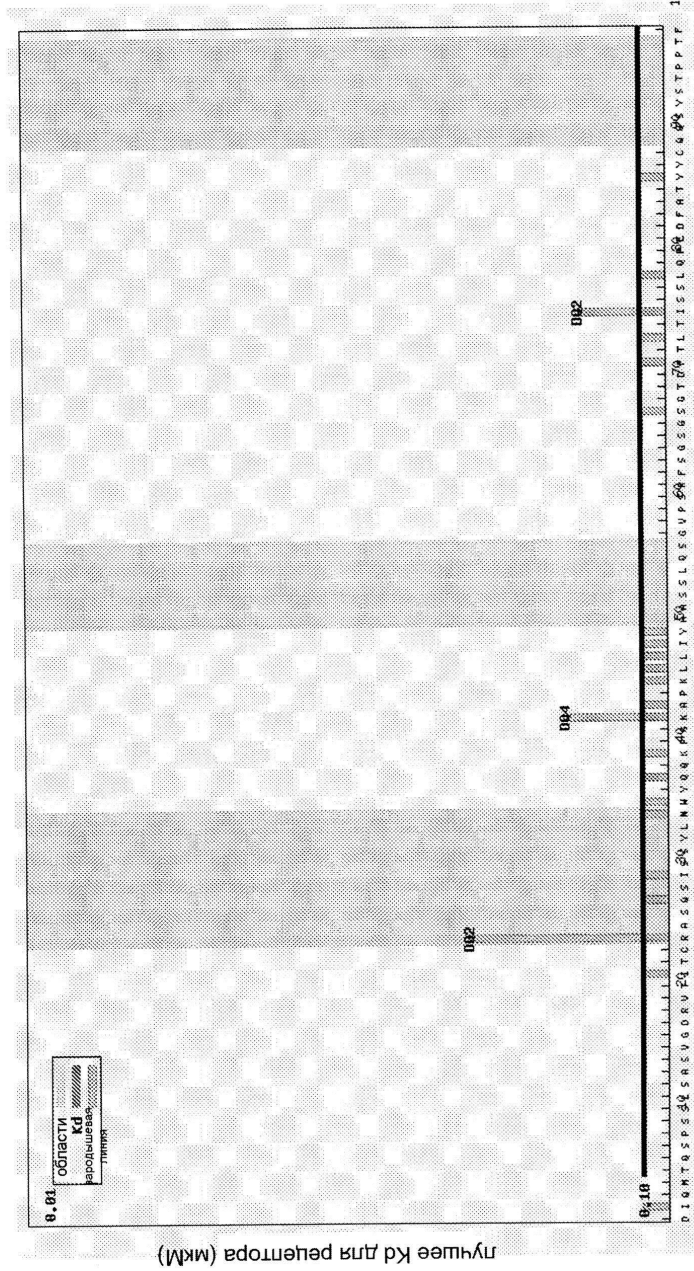
В



54/79

ФИГ. 16 (продол.)

С

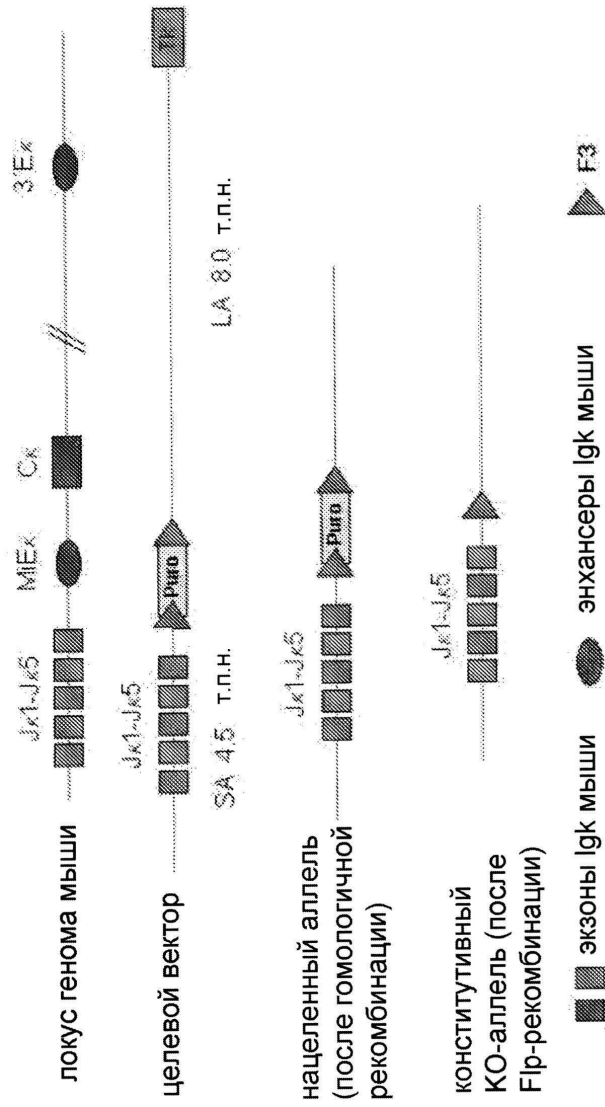


лучшее Kd для реченора (MKM)



ФИГ.18

A

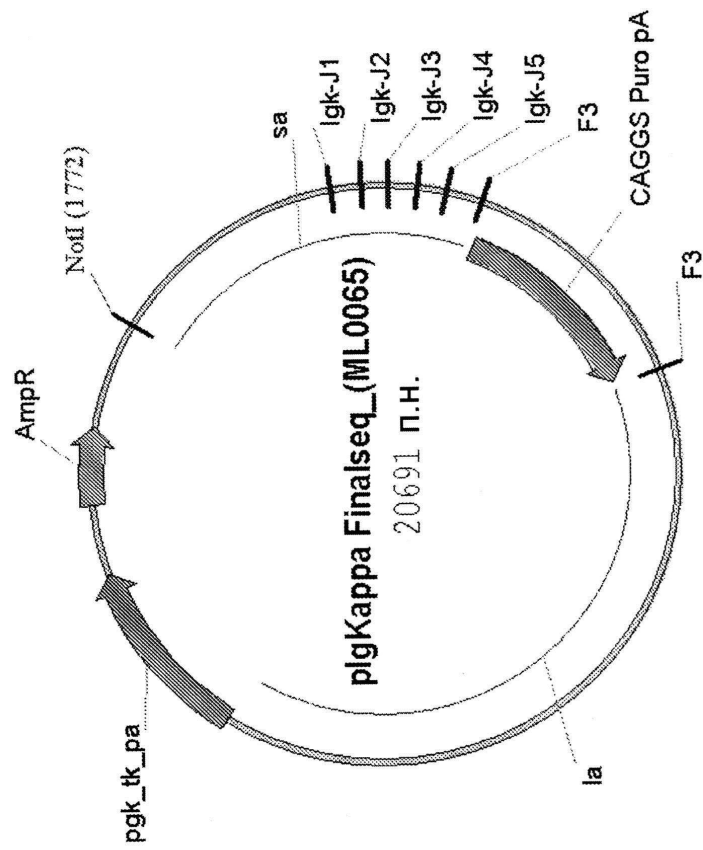




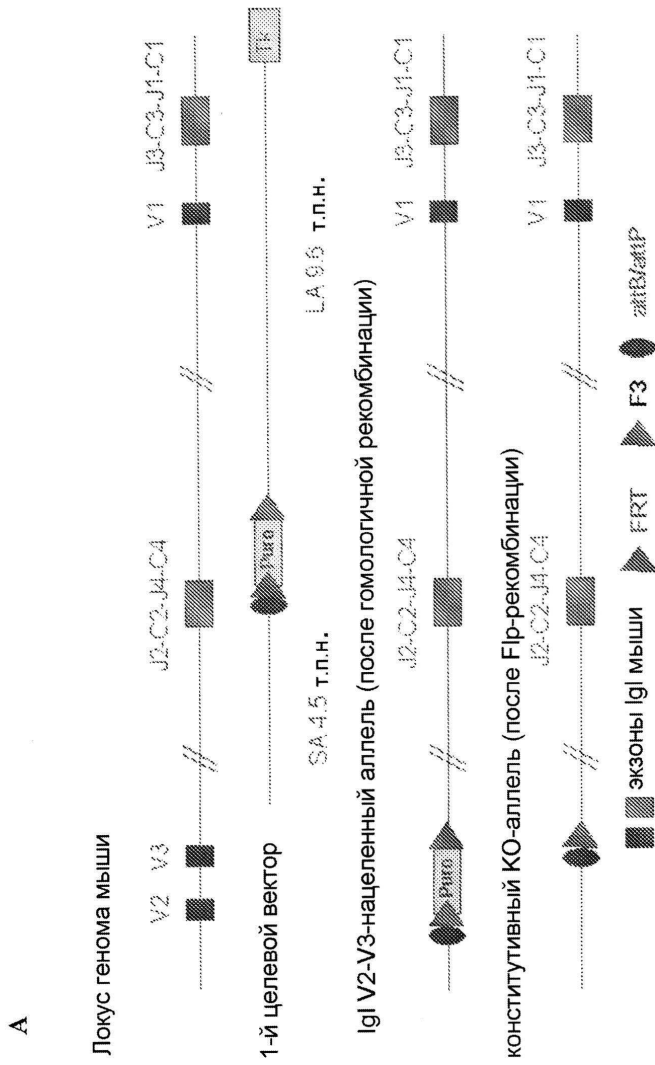
57/79

ФИГ.18 (продол.)

B

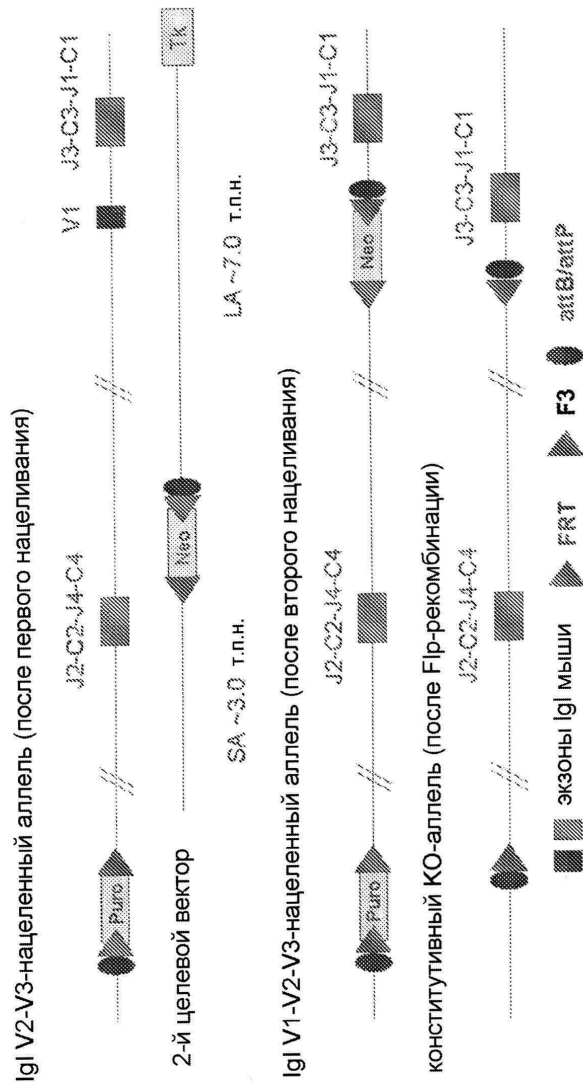


ФИГ. 19



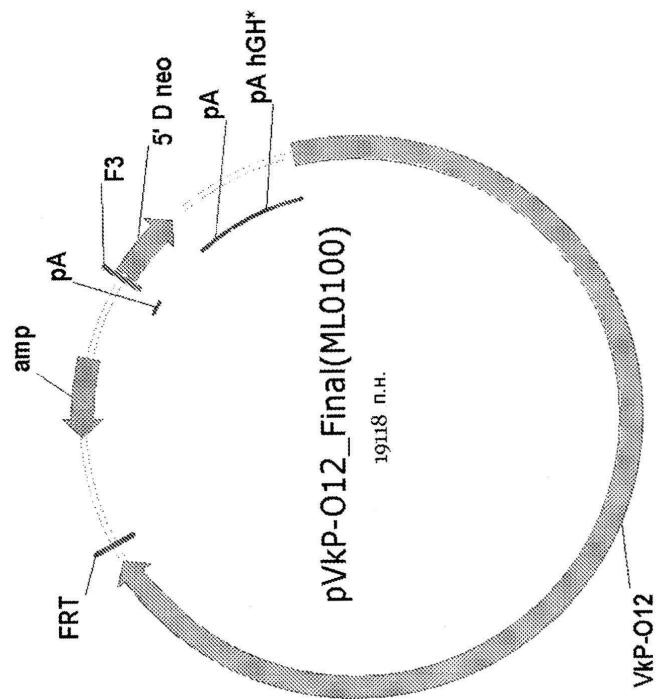
ФИГ. 19 (продол.)

В



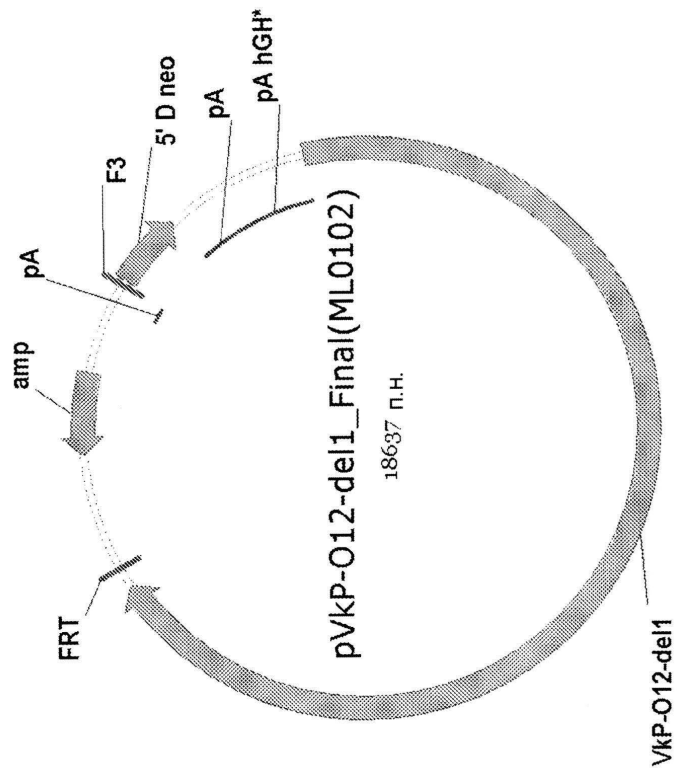
ΦΙΓ.20

A



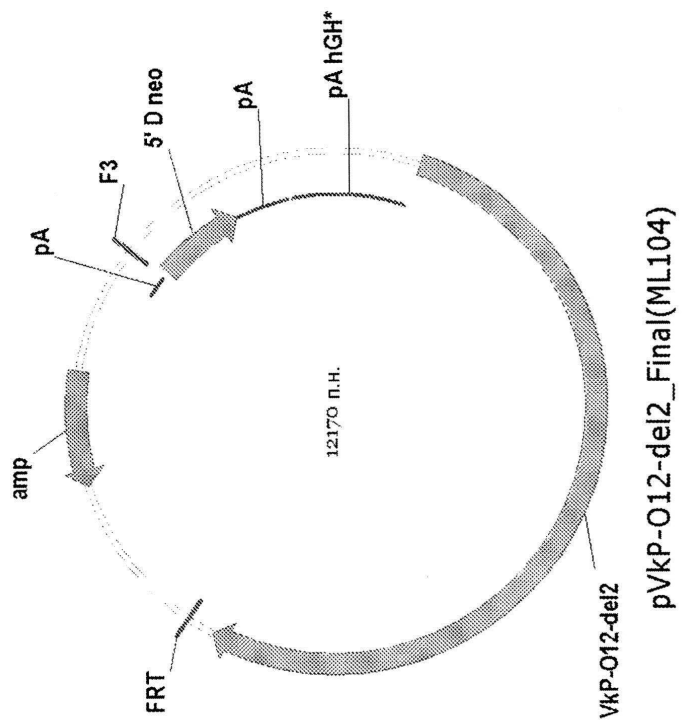
ФИГ.20 (продол.)

B



ФИГ.20 (продол.)

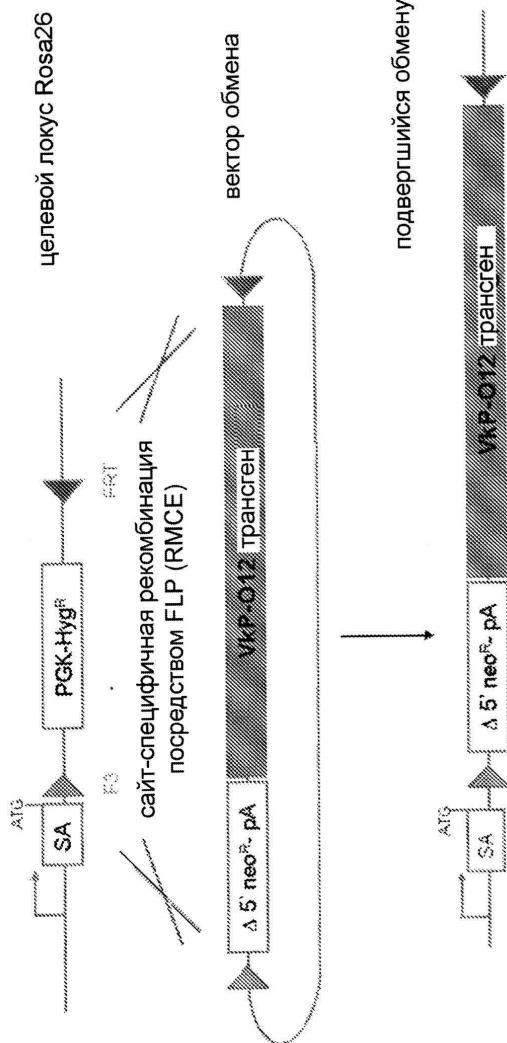
С



63/79

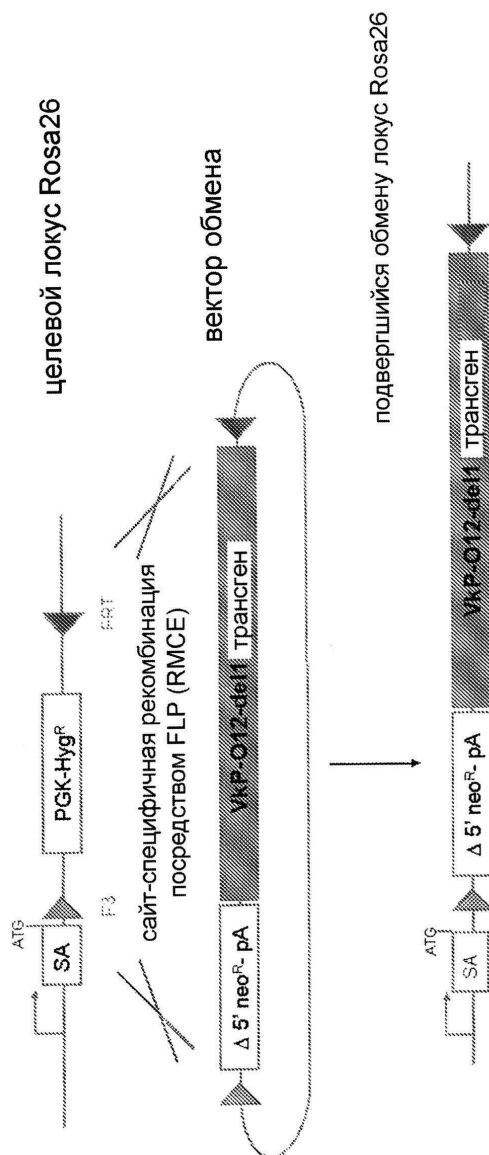
ФИГ.21

A



ФИГ.21 (продол.)

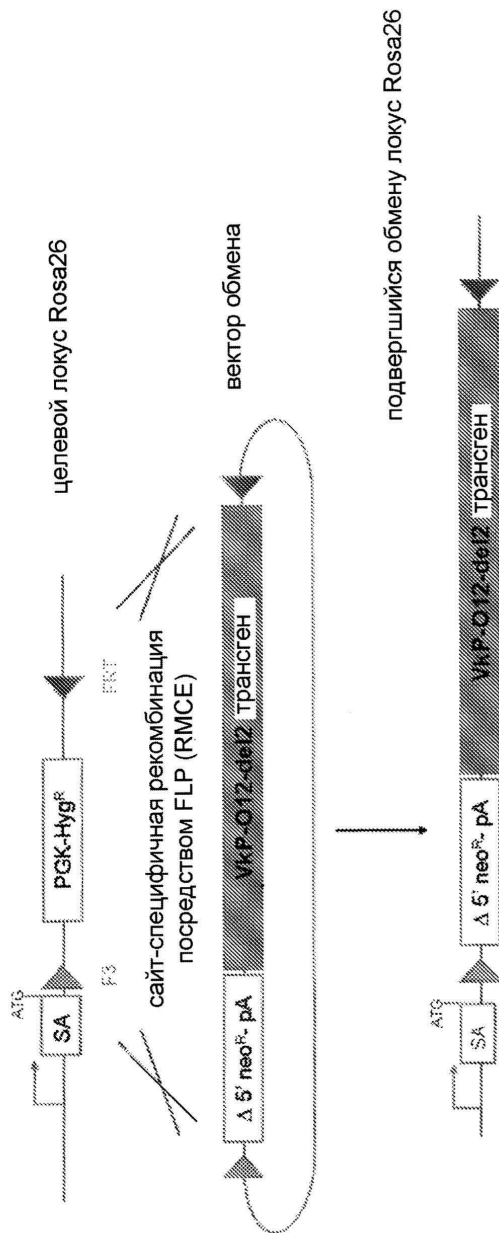
B



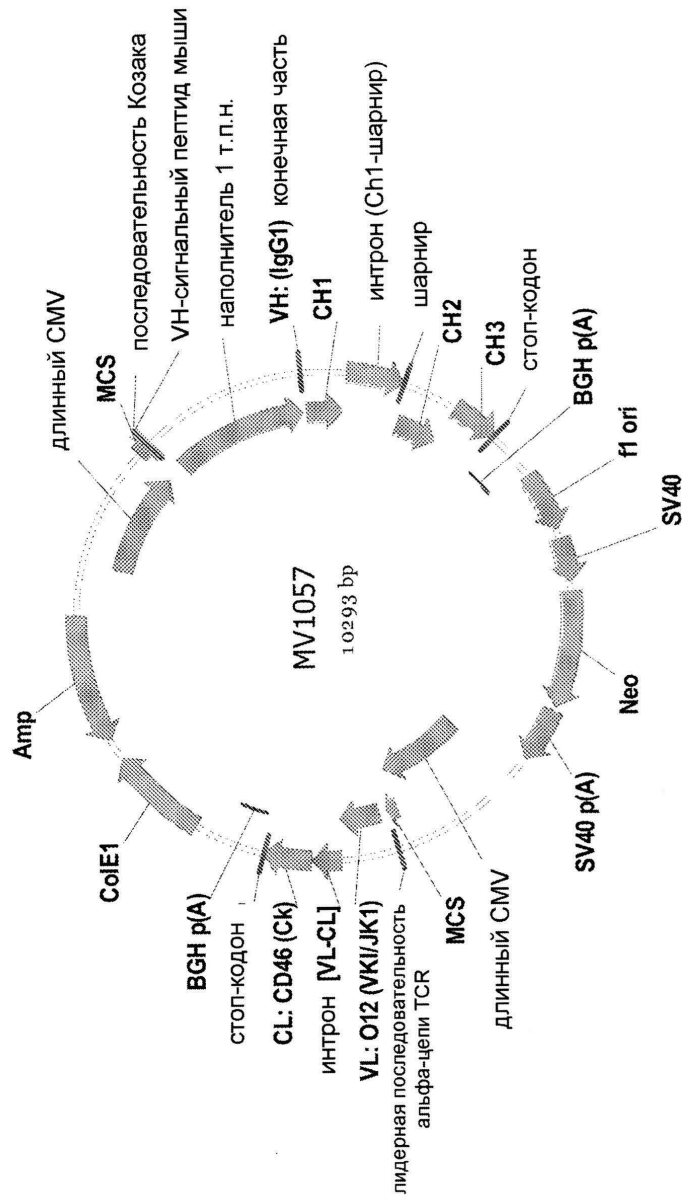


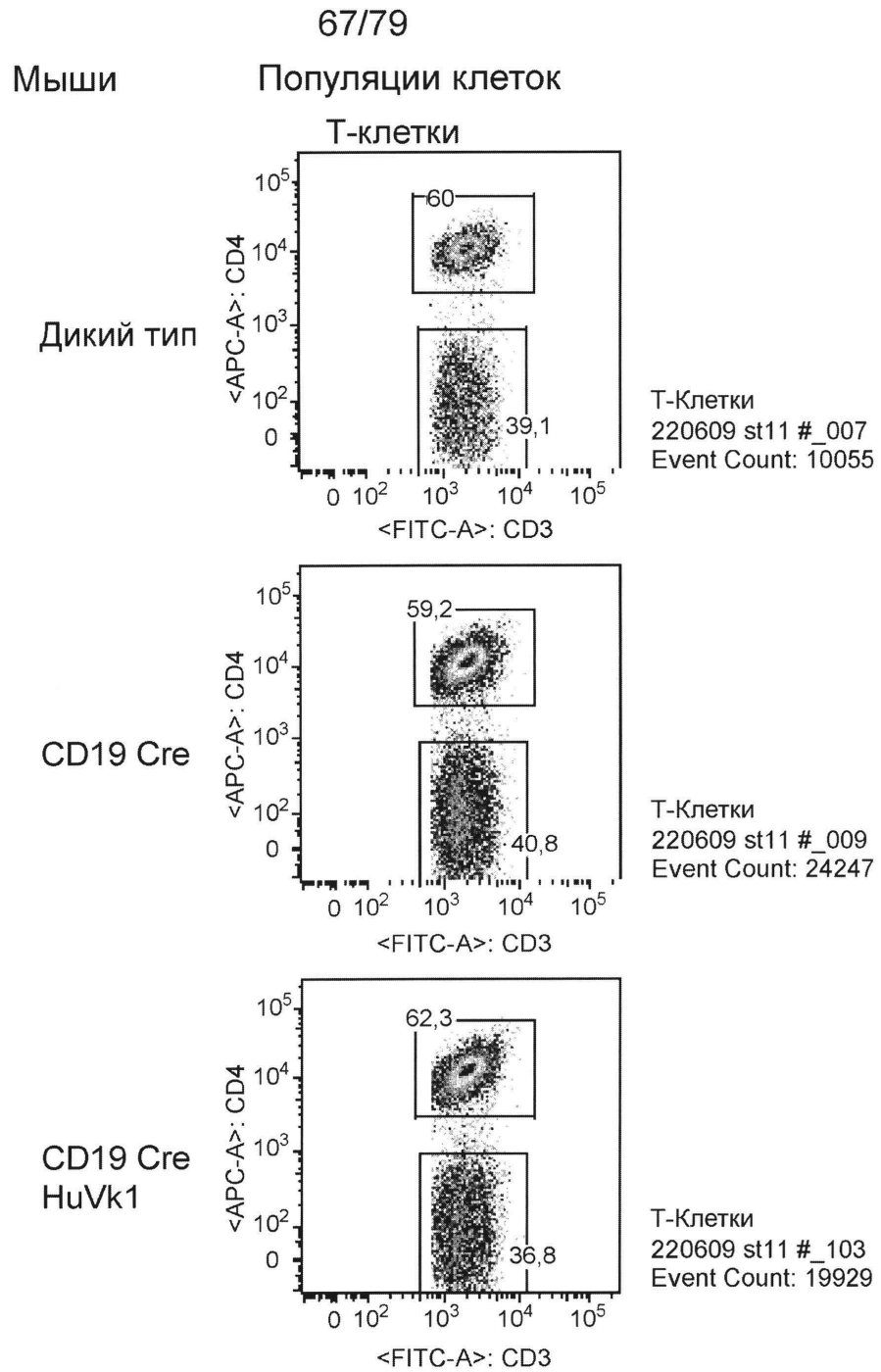
ФИГ.21 (продол.)

С



ФИГ. 22



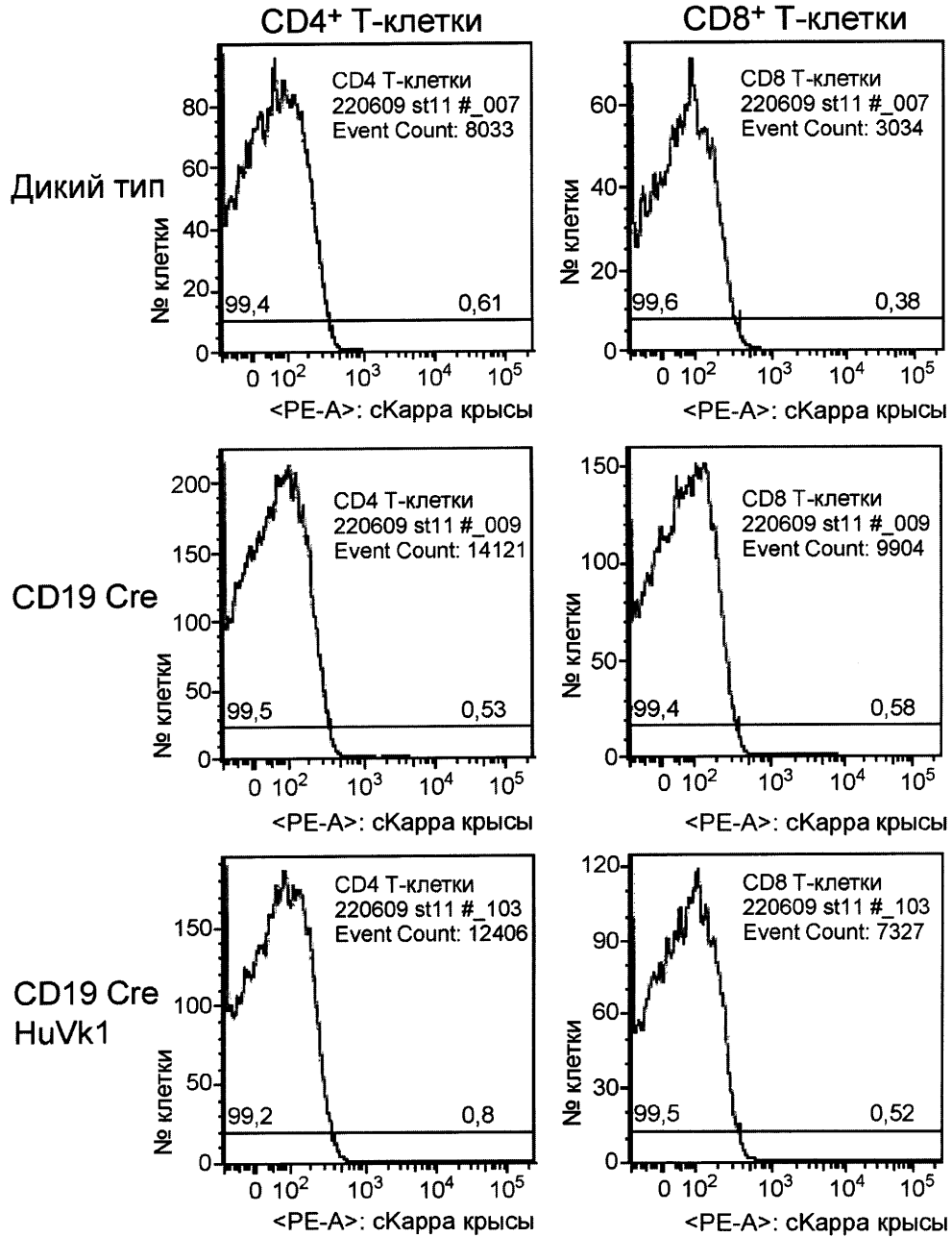


ФИГ.23

68/79

Мыши

Популяции клеток



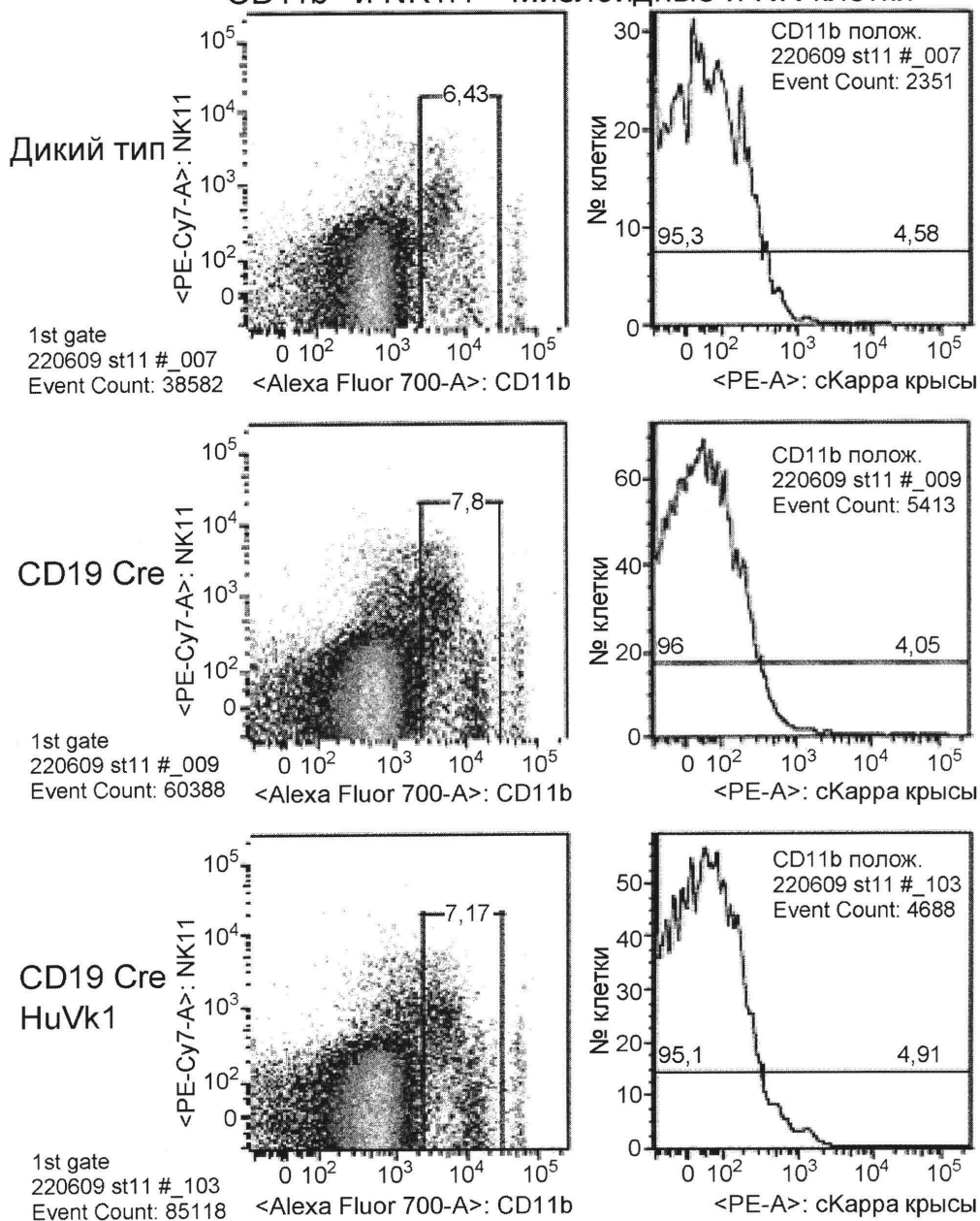
ФИГ.23 (продол.)

69/79

Мыши

Популяции клеток

CD11b<sup>+</sup> и NK1.1<sup>+</sup> Миелоидные и NK-клетки

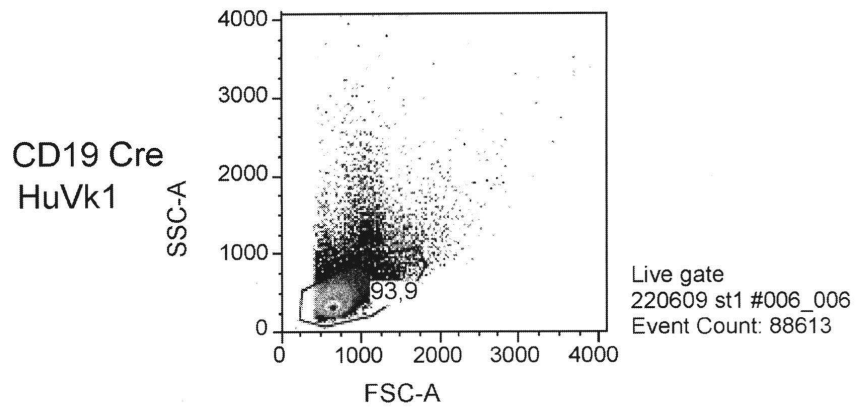
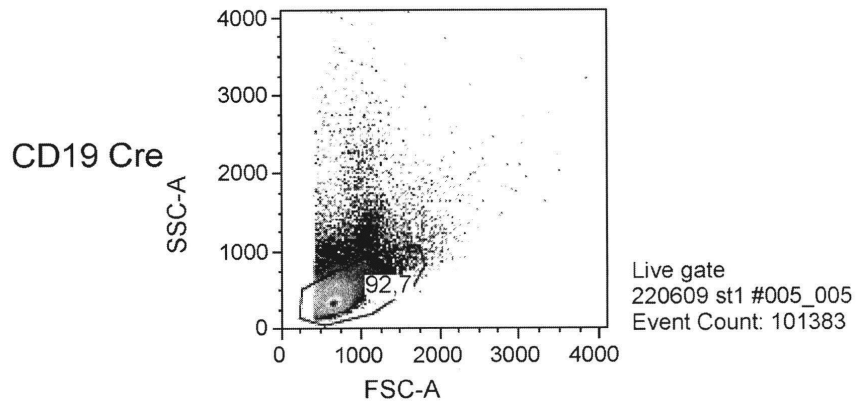
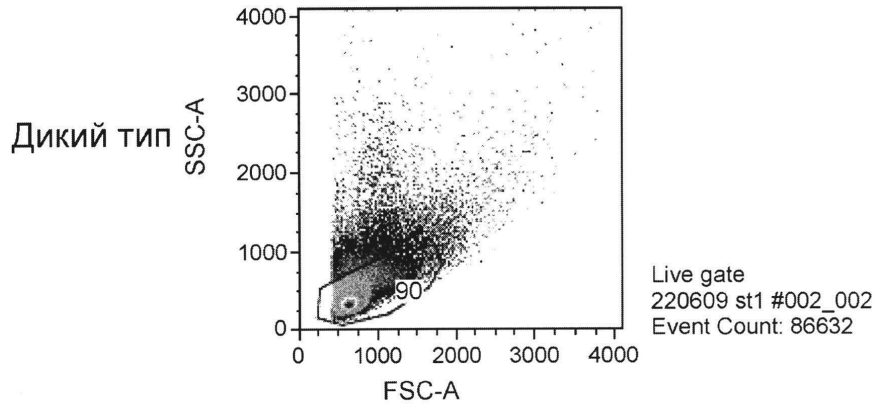


ФИГ.23 (продол.)

70/79

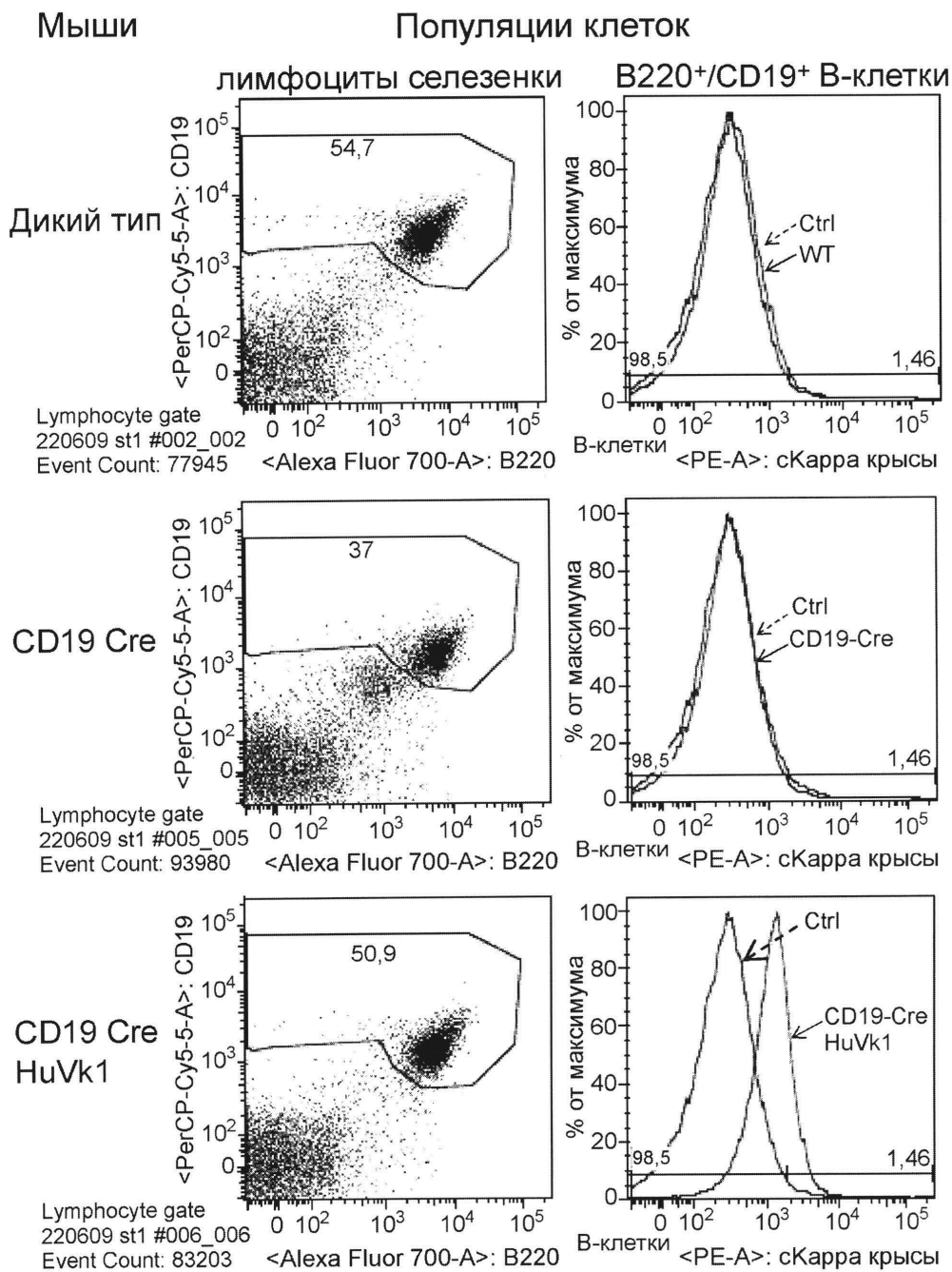
Мыши

Популяции клеток  
лимфоциты селезенки



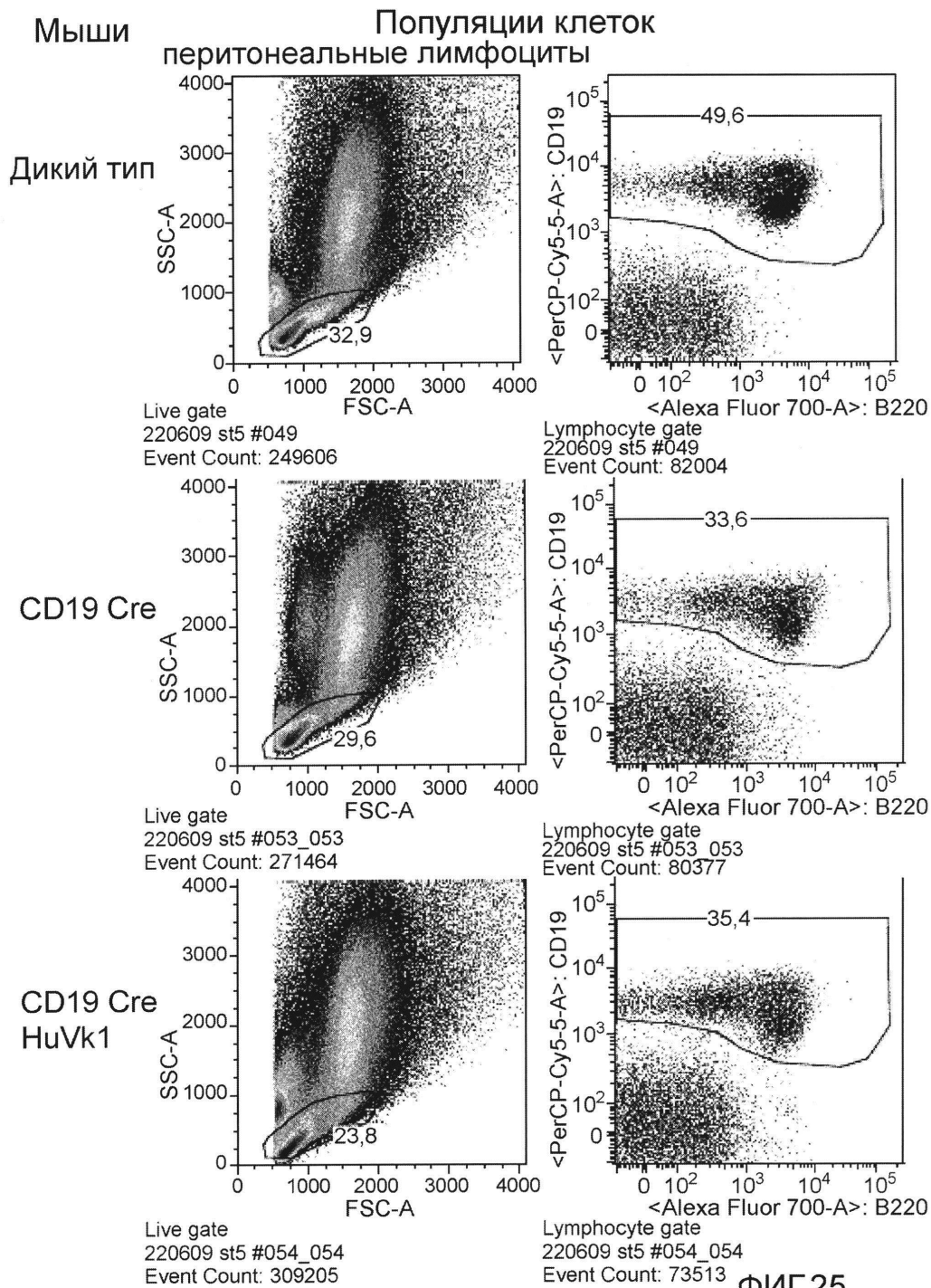
ФИГ.24

71/79



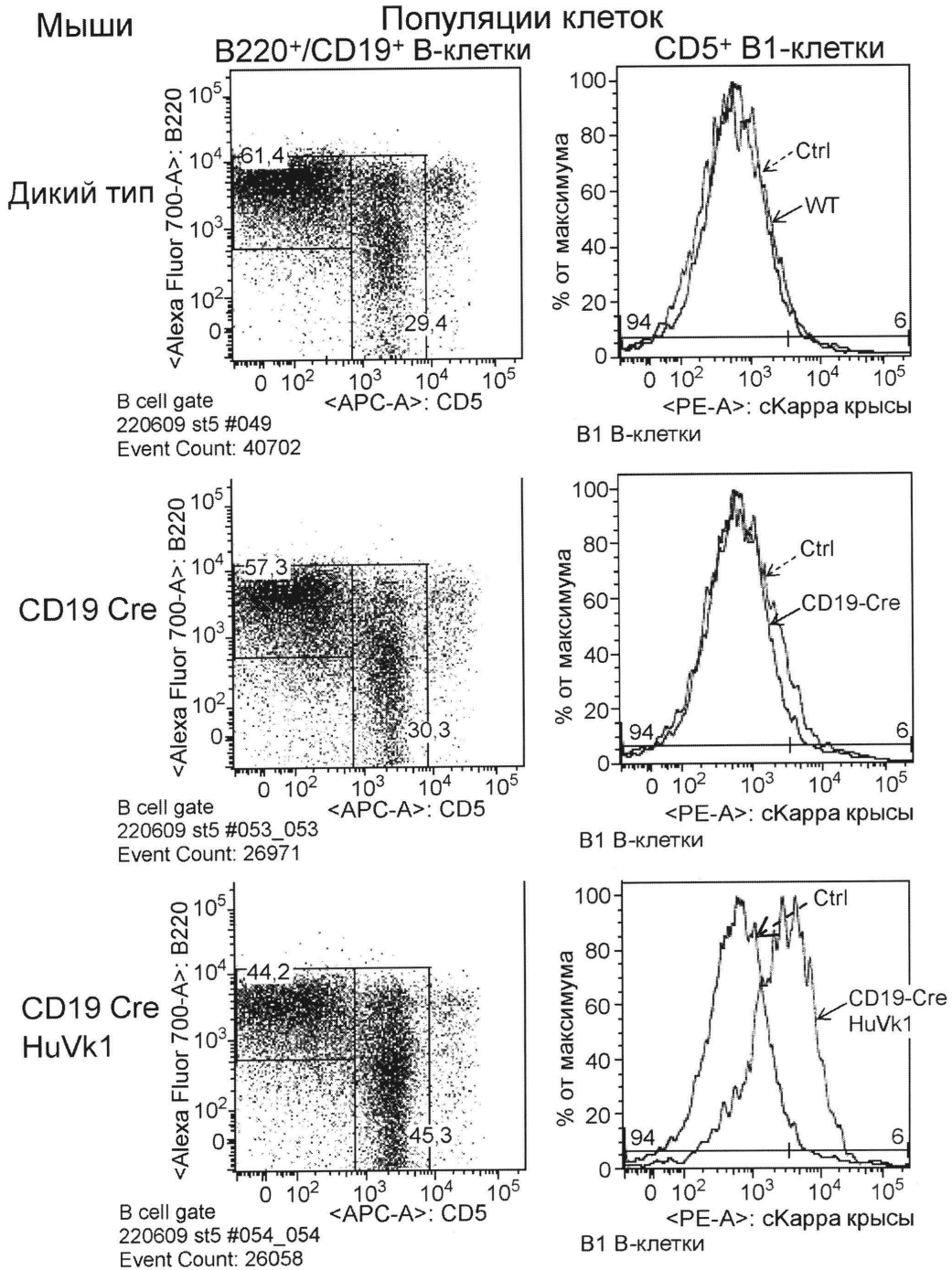
ФИГ.24 (продол.)

72/79



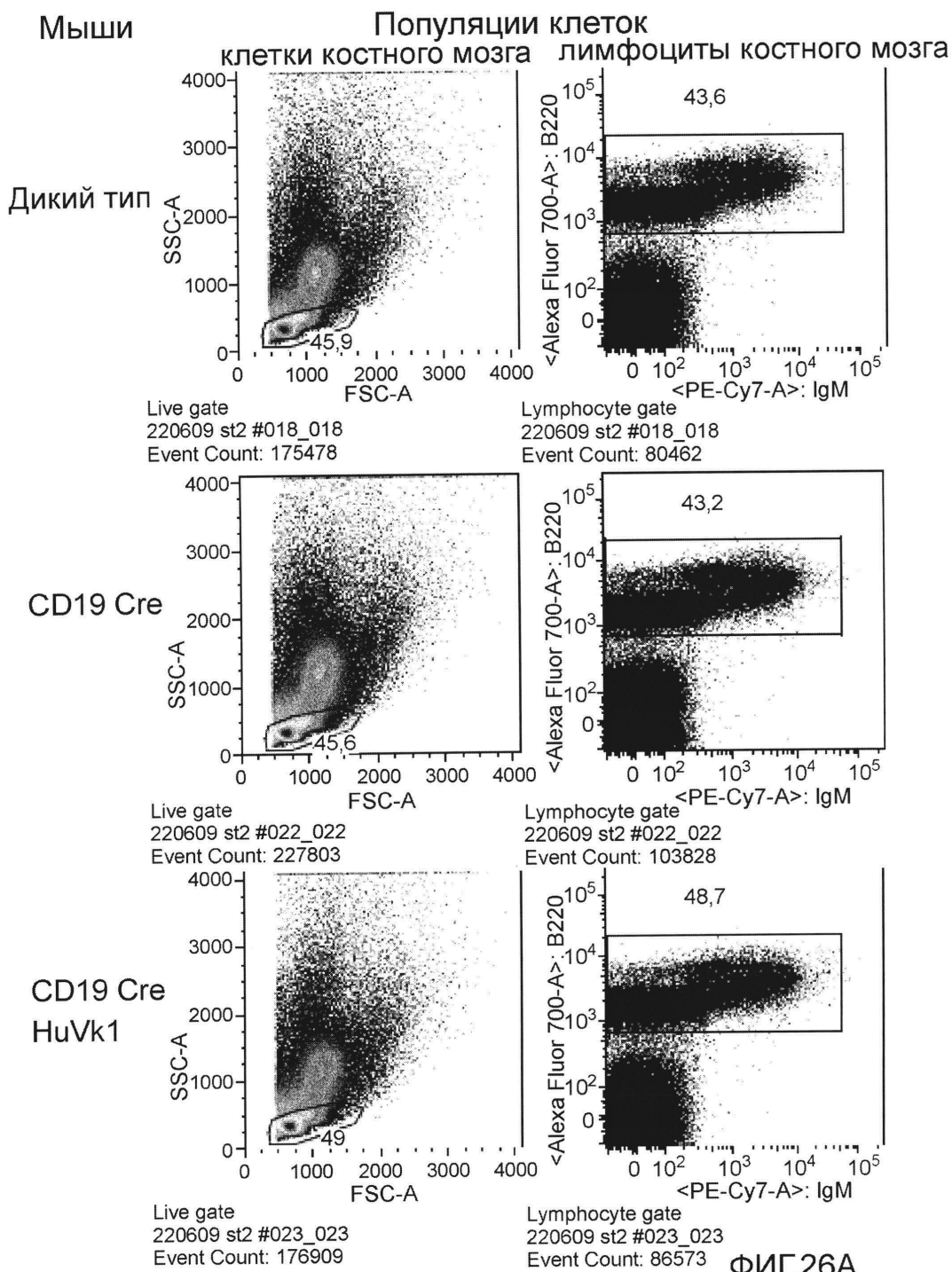


73/79



ФИГ.25 (продол.)

74/79



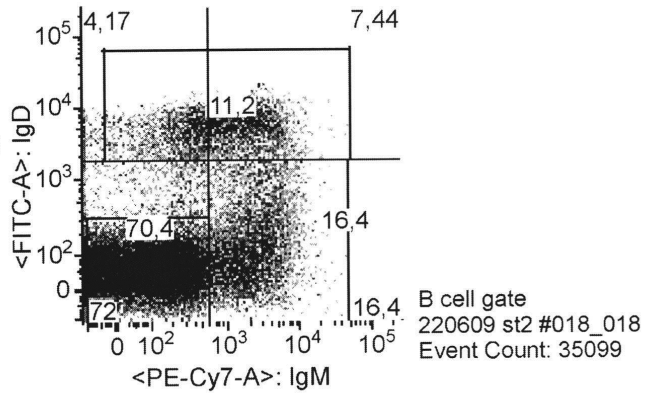
75/79

Мыши

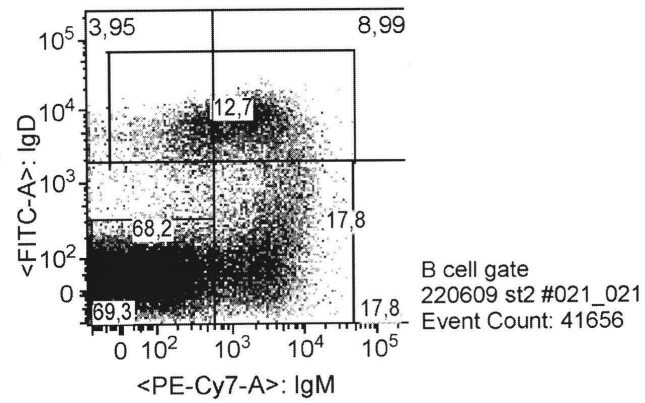
Популяции клеток

B220<sup>+</sup> В-клетки

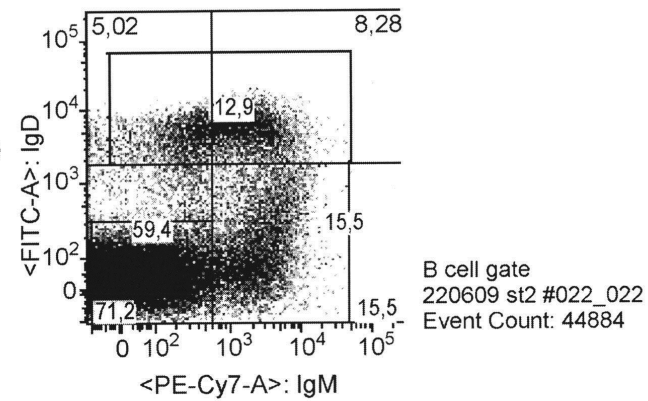
Дикий тип



CD19 Cre

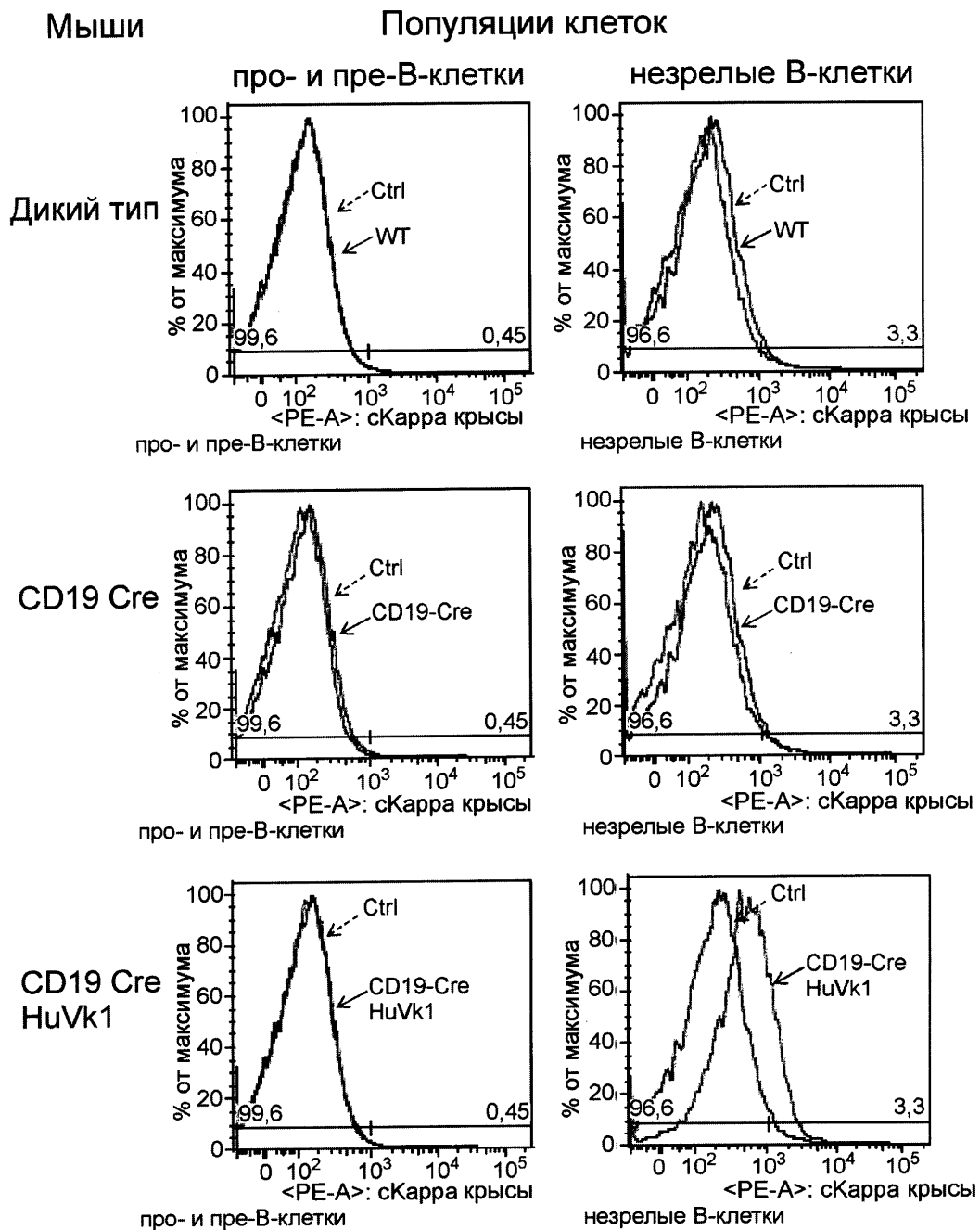


CD19 Cre  
HuVκ1



ФИГ.26А (продол.)

76/79

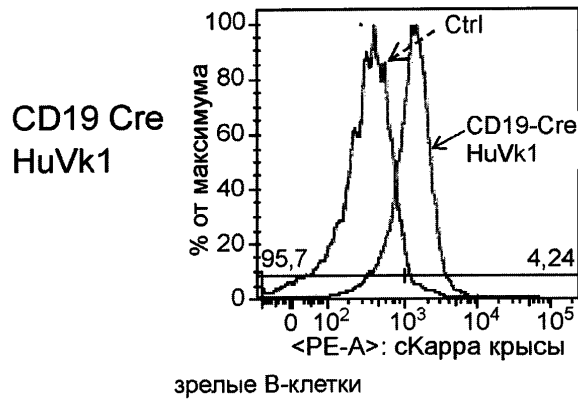
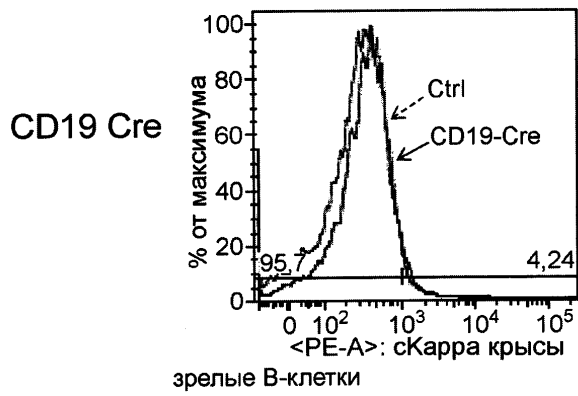
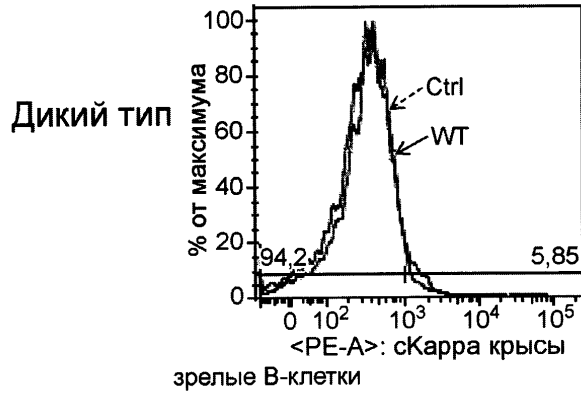


ФИГ.26В

77/79

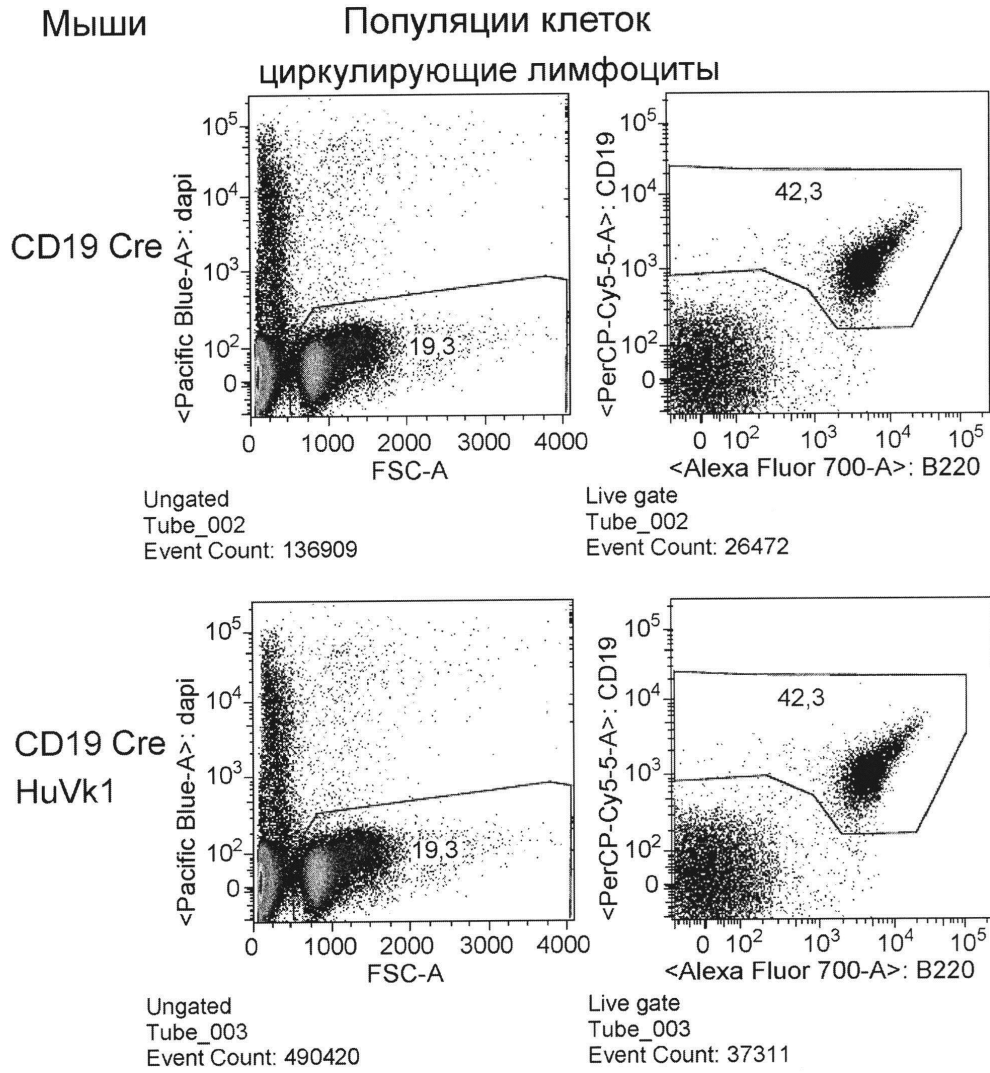
Мыши

Популяции клеток  
рециркулирующие В-клетки



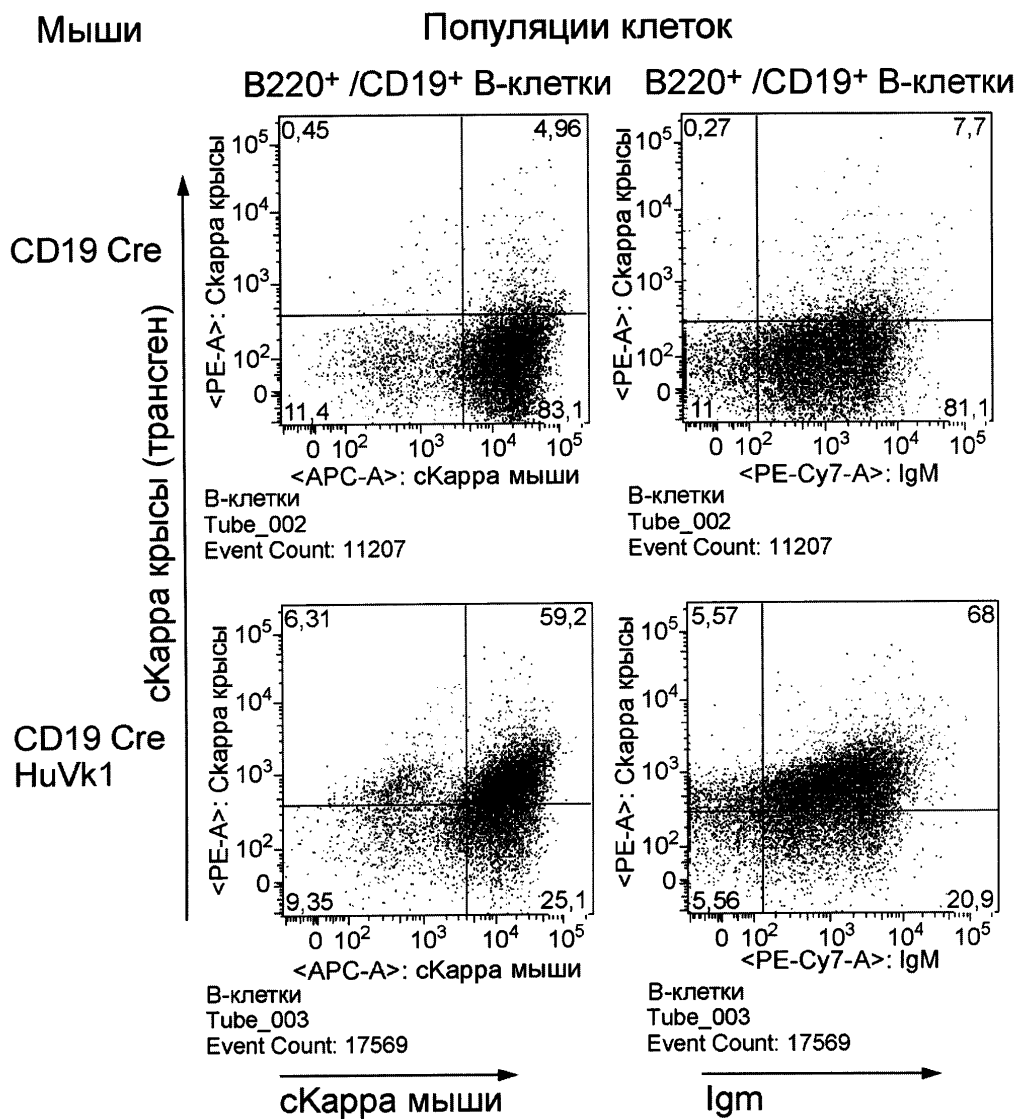
ФИГ.26В (продол.)

78/79



ФИГ.27

79/79



ФИГ.27 (продол.)