

(19)



(10) **LT 4837 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

- (11) Patento numeris: **4837** (51) Int. Cl. ⁷: **A61K 39/395**
C07K 16/28
C12N 15/13
- (21) Paraiškos numeris: **2000 080**
- (22) Paraiškos padavimo data: **2000 08 17**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **2001 04 25**
- (45) Patento paskelbimo data: **2001 08 27**
- (62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/US99/02949**
- (86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **1999 02 10**
- (85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: **2000 08 17**
- (30) Prioritetas: **026291, 1998 02 19, US**
- (72) Išradėjas:
Alejandro A. ARUFFO, US
Diane HOLLENBAUGH, US
Anthony W. SIADAK, US
Karen K. BERRY, US
Linda J. HARRIS, US
Barbara A. THORNE, US
Jurgen BAJORATH, US
Herren WU, US
William D. HUSE, US
Jeffrey D. WATKINS, US
- (73) Patento savininkas:
BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, Lawrenceville-Princeton Road,
Princeton, New Jersey 08543-4000, US
- (74) Patentinis patikėtinis:
Rita LAURINAVIČIŪTĖ, UAB "Metida", Pilies g. 8/1-2, 2600 MTP Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Antikūnai prieš žmogaus CD40

(57) Referatas:

Pareiškėjai atrado naujus chimerinius ir humanizuotus anti-žmogaus CD40 antikūnus, kurie blokuoja

sąveiką tarp gp39 ir CD40. Šio išradimo anti-CD40 antikūnai veiksmingai moduliuoja humoralinius imuninius atsakus prieš T ląstelėms priklausančius antigenus, kolageno sukeltą artritą ir odos transplantaciją ir taip pat yra naudingi dėl jų priešūždegiminių savybių.

Išradimo kilmė

Imuniniuose/uždegiminiuose atsakuose tarpininkauja sudėtinga sąveikų eilė. Viena iš receptorių/ligandų porų, kuri buvo parodyta kaip esanti svarbi šiuose procesuose, yra CD40/gp39. Ši gp39/CD40 sąveika tarpininkauja eilėje svarbių signalinių procesų tarp aktyvuotų T ląstelių ir kitų imuninės sistemos ląstelių-efektorių ir sustiprina imuninį/uždegiminį atsaką. Atsakai į signalo perdavimą per CD40 apima T ląstelių pagalbą B ląstelėms humoralinio imuninio atsako atveju, monocitų sukeltą citokinų indukciją ir endotelininių ląstelių sukeltą adhezinių molekulių ekspresiją.

CD40 yra I tipo ląstelių paviršiaus receptorius ir auglio nekrozės faktoriaus receptoriaus (TNFR) supergeninės šeimos narys. Nors iš pradžių jis buvo identifikuotas kaip B ląstelių antigenas, dabar yra laikoma, kad CD40 ekspresuoja visos antigeną pateikiančios ląstelės (APC), įskaitant dendritines ląsteles, keratinocitus ir monocitus. CD40 taip pat ekspresuoja tipai ląstelių, kurios gali veikti kaip APC tam tikromis sąlygomis, kaip antai vaskuliarinės endotelinės ląstelės, arba ląstelės, dalyvaujančios tiesioginėse sąveikose su T ląstelėmis arba T ląstelių prekursoriais, tokiais kaip timinės epitelinės ląstelės. Neseniai taip pat buvo paskelbta, kad CD40 gali ekspresuoti fibroblastai, eozinofilai ir aktyvuotos T ląstelės. CD40 ekspresija taip pat buvo pastebėta ir vėžinėse ląstelėse. Šio fakto įrodymas pirmiausia gautas identifikavus kai kurias iš karcinomos ir melanomos išvestas ląstelių linijas, kurios yra CD40⁺ T ląstelės. (Clark and Ledbetter, Proc. Natl. Acad. Sci. (1986) 83:4494-98; Schriever et al., J. Eksp. Med. (1989) 169:2043-58; Caux et al., J. Exp. Med. (1994) 180:1263-72; Alderson et al., J. Exp. Med. (1993) 178:669-74; Young et al., Int. J. Cancer (1989) 43:786-94; Paulie et al., Cancer Immunol. Immunother. (1985) 20:23-28; Denfeld et al., Eur. J. Immunol. (1996) 26:2329-34; Gaspari et al., Eur. J. Immunol. (1996) 26:1371-77; Peguet-Navarro et al., J. Immunol. (1997) 158:144-52; Hollenbaugh et al.,

J. Exp. Med. (1995) 182:33-40; Galy and Spits, J. Immunol. (1992) 149:775-82). Gp39 taip pat yra žinomas kaip CD40L, TRAP, T-BAM, o dabar turi oficialų CD pavadinimą nuo Leucocyte Workshop CD154. *In vitro* bandymuose gp39 pasirodo ant T ląstelių praėjus maždaug 2-4 valandoms po T ląstelių aktyvavimo ir pasiekia maksimumą po 6-8 valandų. Po to baltymo kiekis labai greitai mažėja ir pasidaro nebenustatomas praėjus 24 valandoms po stimuliavimo. Gp39 ekspresija taip pat buvo nustatyta ant eozinofilų ir mastinių ląstelių. (Noelle et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (1992) 89:6550-54; Hollenbaugh et al., EMBO J. (1992) 11:4313-21; Spriggs et al., J. Exp. Med. (1992) 176:1543-50; Graf et al., Eur. J. Immunol. (1992) 22:3191-94; Covey et al., Mol. Immunol. (1994) 31:471-84; Castle et al., J. Immunol. (1993) 151:1777-88; Roy et al., J. Immunol. (1993) 151:2497-2510; Gauchat et al., Nature (1993) 365:340-43; Gauchat et al., Eur. J. Immunol. (1995) 25:863-65; Koshy et al., J. Clin. Invest. (1996) 98:826-37; Desai-Mehta et al., J. Clin. Invest. (1996) 97:2063-73).

CD40 yra stiprus signalinis receptorius, kuris suteikia galimybę aktyvuotoms T-ląstelėms reguliuoti platų imuninių ir uždegiminių atsakų intervalą. *In vitro* ir *in vivo* tyrimai su gp39 ligando rekombinantinėmis formomis ir su anti-CD40 mAb parodė, kad signalo perdavimas per šį receptorių duoda ląstelinį atsaką visose žinomose CD40⁺ ląstelėse, ir kad to išdava ne tik keičiasi priklausomai nuo ląstelės tipo, bet taip pat yra moduluojama konkuruojančių signalinių procesų per kitus receptorius. Pavyzdžiui, B ląstelėse CD40 signalo perdavimas, kartu su IL-4 receptoriaus signalo perdavimu, sukelia B ląstelių proliferaciją ir IgE izotipo antikūnų gaminimąsi, o CD40 signalo perdavimas kartu su signalais iš IL-4 receptoriaus sukelia B ląstelių proliferaciją ir IgG izotipo antikūnų gaminimąsi (Gordon et al., Eur. J. Immunol. (1987) 17:1535-38; Rousset et al., J. Exp. Med. (1991) 173:705-710; Jabara et al., J. Exp. Med. (1990) 172:1861-64; Gascan et al., J. Immunol. (1991) 147:8-13). Gp39 tarpininkaujamas CD40 signalo perdavimas gali vaidinti vaidmenį ląstelės imuniniškume per CD80 ir CD86 - svarbių T ląstelių kostimuliatorinių molekulių, kurios suriša CD28 ir CTLA4 – indukciją (Goldstein et al., Mol. Immunol. (1996) 33:541-52).

CD40/gp39 receptoriaus/ligando sistema yra viena iš daugelio sistemų, kurios dalyvauja produktyvioje sąveikoje tarp aktyvuotų T ląstelių ir kitų imuninės sistemos ląstelių. Tačiau daugelis duomenų duoda suprasti, kad ši sąveika yra unikali ir pagrindinė žmogaus humoralinio atsako reguliavime. Konkrečiau kalbant, buvo parodyta, kad gp39 ekspresijos arba struktūros defektai yra žmogaus imunodeficitu, žinomo kaip X-ryšio hiper-IgM (X-HIM) sindromas, priežastis. Šiam imunodeficitui yra būdingas jo paveiktų individų nesugebėjimas gaminti kitokių nei IgM izotipo antikūnus, kas rodo, kad efektyviam humoraliniam imuniniam atsakui yra reikalinga produktyvi sąveika tarp gp39 ir CD40 (Allen et al., Science (1993) 259:990-93; Aruffo et al., Cell (1993) 72:291-300; Di Santo et al., Nature (1993) 361:541-43; Fuleihan, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (1993) 90(6):2170-73; Korthauer et al., Nature (1993) 361:539-541; Notarangelo et al., Immunodef. Rev. (1992) 3:101-22. Panašiu būdu, neseni duomenys rodo, kad žmogaus ne-X-ryšio HIM sindromą sukelia defektai CD40 molekulėje. Naudojant genų nokauto technologiją, buvo išvestos pelės, neturinčios CD40 arba gp39. Šios pelės atitinka fenotipą, kuris turi tas pačias charakteristikas kaip ir HIM sindromas, o tai leidžia manyti, kad pelės gali būti tinkamas modelis, kuris gali būti naudojamas nustatyti gydymo arba anti-CD40, arba anti-gp39 mAb'ais, kurie blokuoja sąveiką tarp CD40 ir gp39, efektams *in vivo* (Kawabe et al., Immunity (1994) 1:167-78; Xu et al., Immunity (1994) 1:423-431; Renshaw et al., J. Exp. Med. (1994) 180:1889-1900; Castigli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) 91:12135-39).

CD40/gp39 sąveikos inhibavimo efektai *in vivo* buvo plačiai tirti bandymuose su normaliomis pelėmis ir su ligos pelių modeliais, naudojant žiurkėno anti-pelės gp39 mAb (MR1). Šio antikūno imunosupresijos geba atsispindi jo sugebėjime pilnai inhibuoti humoralinį imuninį atsaką į T-ląstelėms priklausančius antigenus (Foy, et al., J. Exp. Med. (1993) 178:1567-75). Tai pat buvo parodyta, kad keletas imuninių ligų pelių modelių yra inhibuojami gydant šiuo antikūnu, įskaitant tuos, kuriuose tarpininkauja ląstelių imuniniai atsakai. Ligų modeliai, kurie buvo parodyti, kad jie yra inhibuojami gydant anti-gp39, yra kolageno sukeltas artritas, eksperimentinis alerginis encefalomyelitas, su vilklige susijęs nefritas, persodinto organo

atmetimas ir implantatas prieš šeimininką ligą (Durie et al., Science (1993) 261:1328-30; Berry et al., neatspausdinta; Gerritse et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 93:2499-504; Mohan et al., J. Immunol. (1995) 154:1470-1480; Larsen et al., Transplantation (1996) 61:4-9; Hancock et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996) 93:13967-72; Parker et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92:9560-64; Durie et al., J. Clin. Invest. (1994) 94:1333-38; Wallace, et al., neatspausdinta). CD40/gp39 vaidmuo ląstelinio atsako sustiprinimui gali būti tiesioginis – per aktyvuotų T ląstelių, kurios gali ekspresuoti CD40, subpopuliacijos stimuliavimą, arba netiesioginis – per citokinų indukciją ir svarbių kostimuliatorių ląstelių paviršiaus molekulių, tokių kaip CD80 ir CD86, kurios prisijungia prie T ląstelių receptorių CD28 ir CTLA-4, ekspresiją. Šio inhibitoriaus priešūždegiminiai efektai buvo pademonstruoti naudojant tyrimams deguonies sukeltą plaučių pažeidimo pelės modelį. Poveikis į uždegimą *in vivo* buvo paremtas rezultatais *in vitro*, rodančiais CD40 stimuliavimą ant vaskuliarinių endotelinų ląstelių ir monocitų, kurie duoda ląstelių adhezijos molekulių ekspresiją, azoto oksidą (NO), matricines metaloproteazes ir prouždegiminius citokinus (Kiener et al., J. Immunol. (1995) 155:4917-25; Malik et al., J. Immunol. (1995) 156:3952-60; Hollenbaugh et al., J. Exp. Med. (1995) 182:33-40).

Tyrimai su anti-žmogaus gp39 mAb bandyme su beždžionėmis parodė, kad bioagentai, kurie inhibuoja sąveiką tarp gp39 ir CD40 *in vivo*, yra efektyvūs imunosupresiniai agentai primatams. Buvo parodyta, kad anti-gp39 mAb efektyviai inhibuoja antikūnų atsaką į T ląstelėms priklausančius antigenus, ir apsaugo alotransplantatus nuo atmetimo (rezultatai analogiški rezultatams, gautiems bandyme su graužikais).

Bendrai paėmus, aukščiau pateikti rezultatai parodė, kad agentai, kurie suardo sąveiką tarp gp39 ir CD40, turėtų būti stiprūs imunosupresiniai ir priešūždegiminiai agentai. Todėl, norint gauti imunosupresinį arba priešūždegiminį efektą, yra reikalinga surasti efektyvų būdą CD40/gp39 sąveikai blokuoti. Šio išradimo tikslas yra pateikti antikūną, kuris blokuotų sąveiką tarp gp39 ir CD40.

Kitas šio išradimo tikslas yra pateikti chimerinį antikūną, kuris efektyviai blokuotų sąveiką tarp CD40 ir gp39.

Dar kitas šio išradimo tikslas yra pateikti humanizuotą antikūną, kuris efektyviai blokuotų sąveiką tarp CD40 ir gp39.

Dar vienas šio išradimo tikslas yra imuninio atsako moduliavimo būdas, įvedant šio išradimo antikūną, chimerinį antikūną arba humanizuotą antikūną. Šis būdas gali būti naudingas gydant bet kokias autoimunines ligas, bei odos arba kitų organų transplantacijoje.

Išradimo santrauka

Šis išradimas apima naują antikūną, tiksliau chimerizuotą anti-žmogaus CD40 monokloninį antikūną (mAb), kuris blokuoja sąveiką tarp gp39 ir CD40. Viena šio išradimo realizavimo variante ypatingai tinkamas chimerizuotas anti-žmogaus CD40 mAb yra žymimas "chi220". Chi220 yra chimerinis antikūnas, apimantis pelės kintamąją ir žmogaus kapa ir gama 1 pastoviąsias sritis. Chi220, kaip ir jo pradininkas pelės mAb, prisijungia prie CD40 ir dėl to efektyviai blokuoja humoralinius imuninius atsakus į T ląstelėms priklausančius antigenus nuo dozės priklausančiu būdu.

Taip pat į šio išradimo apimtį patenka humanizuoti anti-CD40 antikūnai, kurie blokuoja sąveiką tarp gp39 ir CD40. Viena šio išradimo įgyvendinimo variante humanizuotas antikūnas yra pažymėtas F4; kitame įgyvendinimo variante humanizuotas antikūnas yra pažymėtas L3.17. Tinkamiausi humanizuoti šio išradimo antikūnai apima žmogaus kintamąją sunkiąją ir lengvąją sritis su į jas įterptais pelės CDR.

Šio išradimo anti-CD40 antikūnai, geriau chimeriniai ir humanizuoti čia aprašyti antikūnai, veiksmingai moduliuoja humoralinius imuninius atsakus prieš T ląstelėms priklausančius antigenus, kolageno sukeltą artitą ir transplantanto atmetimą. Šio išradimo anti-CD40 antikūnai, geriau chimeriniai ir humanizuoti čia aprašyti antikūnai, taip pat yra naudingi dėl jų priešūždegiminių savybių (kurios yra panašios į anti-gp39 savybes).

Šio išradimo antikūnai, ypatingai anti-CD40 chimerinis antikūnas chi220 ir anti-CD40 humanizuoti antikūnai F4 ir L3.17, turi platų terapinį pritaikymą, įskaitant autoimunines ligas, uždegimines ligas ir transplantaciją.

Kadangi CD40 ekspresija stebima ant kai kurių histologinių tipų piktybinių ląstelių, anti-CD40 antikūnų, ypač šio išradimo chimerinių ir humanizuotų antikūnų, pritaikymo galimybė onkologijoje yra akivaizdi.

Šioje paraiškoje yra naudojami tokie specialistams žinomi sutrumpinimai: APC (antigeną pateikianti ląstelė); CDR (komplementarumą apsprendžianti sritis); CHO (kuniškojo žiurkėno kiaušidė); CIA (kolageno sukeltas artritas); Cmax (maksimali koncentracija serume); COS (Afrikos žaliosios beždžionės fibroblastų ląstelių linija); DMARD (ligą modifikuojantys priešreumatiniai vaistai); ELISA (fermento, prijungto prie imunosorbento, testas); EPT (galinio taško titrai); EU (endotoksino vienetai); Fab (antigeną jungiantis fragmentas); FITC (fluorizotiocianatas); Hu (humanizuotas); h106-2 (humanizuotas anti-gp39 mAb); HAMA (žmogaus-anti-pelės antikūnai); im (intraraumeninis); KLH (sraigės limfos hemocianinas); mAb (monokloninis antikūnas); MTX (metotreksatas); OVA (ovalbuminas); PBS (fosfatinis buferis su NaCl); PCR (polimerazinė grandinės sintezė); PE (fikoeriterinas); sc (poodinis); SDS-PAGE (natrio dodecilsulfato poliakrilamidinio gelio elektroforezė); SEC (molekulinių sietų chromatografija); SRBC (avies eritrocitai); STR (maišomo bako tipo reaktorius); TNF (auglio nekrozės faktorius); VL (antikūno lengvosios grandinės kintamoji sritis); VH (antikūno sunkiosios grandinės kintamoji sritis).

Nukleorūgštis, koduojanti tinkamiausią lengvąją šio išradimo chimerinio antikūno (chimerinis antikūnas 2.220) grandinę, buvo deponuota Amerikos tipinių kultūrų kolekcijoje su depozito numeriu ATCC 203630. Nukleorūgštis, koduojanti tinkamiausią sunkiąją šio išradimo chimerinio antikūno (2.220) grandinę, buvo deponuota Amerikos tipinių kultūrų kolekcijoje su depozito numeriu ATCC 203629.

Nukleorūgštis, koduojanti tinkamiausią lengvąją šio išradimo humanizuoto antikūno (humanizuotas antikūnas F4) grandinę, buvo deponuota Amerikos tipinių kultūrų kolekcijoje su depozito numeriu ATCC 203628. Nukleorūgštis, koduojanti papildomą tinkamiausią lengvąją šio išradimo humanizuoto antikūno (humanizuotas antikūnas L3.17) grandinę, buvo deponuota Amerikos tipinių kultūrų kolekcijoje su depozito numeriu

ATCC 203774. Nukleorūgštis, koduojanti tinkamiausią sunkiąją šio išradimo humanizuoto antikūno (F4 ir L3.17) grandinę, buvo deponuota Amerikos tipinių kultūrų kolekcijoje su depozito numeriu ATCC 203631.

Čia nurodyti depozitai bus laikomi pagal Budapešto sutarties dėl Tarptautinio mikroorganizmų depozitų palaikymo patentiniams tikslams terminus. Šie depozitai yra pateikiami vien tikslai specialistų patogumui ir nelaikoma, kad indėliui taikomas 35 U.S.C. § 112. Deponuotų medžiagų polinukleotidų sekos bei jų koduojamos aminorūgščių sekos čia yra pridedamos kaip nuorodos ir yra kontrolinės tuo atveju, jei iškyla nesutapimas su duotu sekos aprašymu. Deponuotų medžiagų gaminimui, panaudojimui arba pardavimui turi būti reikalaujama licenzijos, ir tokios licenzijos čia neduodama.

Visi šioje paraiškoje cituojami literatūros šaltiniai, ar tai yra *supra* ar *infra*, čia yra pridedami pilnumoje.

Trumpas brėžinių aprašymas

Fig.1 rodo sgp39 prisijungimo prie Raji ląstelių inhibavimą anti-žmogaus CD40 mAb.

Fig.2 yra scematiniai primatų tyrimo metodikos metmenys. Gydomo dienos pavaizduotos rombais. Imunizavimas SRBC ir KLH pažymėtas atitinkamai stačiakampiais ir trikampiais. Gyvuliukai, paveikti 2.36, po I fazės tirti nebuvo, o gyvuliukai, paveikti 1.106 nebuvo tirti po II fazės.

Fig.3 rodo anti-SRBC antikūno atsaką primatuose. Fig.3a rodo IgM anti-SRBC antikūnų analizės rezultatus. Fig.3b rodo IgG anti-SRBC antikūnų analizės rezultatus.

Fig.4a rodo chi220 lengvosios grandinės kintamosios srities seką paryškintomis raidėmis (SEQ ID NO:1), o Fig.4b rodo chi220 sunkiosios grandinės kintamosios srities seką paryškintomis raidėmis (SEQ ID NO:2). Fig.4a ir 4b pabrauktos sekos yra žmogaus antikūno įterptos signalinės sekos su artimiausia homologija, kurios buvo naudojamos kaip humanizavimo matrica.

Fig.5 rodo *in vitro* bandymų rezultatus, tiriant šio išradimo chimerinį ir humanizuotą antikūną. Fig.5a rodo chi220 ir h220v3 prisijungimą prie hCD40-mG2b ELISA testu paremtame bandyme. Fig.5b rodo sgp39 tarpininkaujamo žmogaus B ląstelių kostimuliavimo inhibavimą anti-žmogaus CD40 mAb.

Fig.6 rodo IgM anti-SRBC antikūno atsaką. Fig.6a rodo rezultatus su beždžionėmis, kurios gavo 10, 40 arba 100 mg/kg chi220. Fig.6b rodo rezultatus su beždžionėmis, kurios gavo 0,1 arba 1 mg/kg chi220.

Fig.7 rodo IgG anti-SRBC antikūno atsaką. Fig.7a rodo rezultatus su beždžionėmis, kurios gavo 10, 40 arba 100 mg/kg chi220. Fig.7b rodo rezultatus su beždžionėmis, kurios gavo 0,1 arba 1 mg/kg chi220.

Fig.8 rodo anti-OVA antikūno atsaką primatuose. Fig.8a rodo IgM anti-OVA antikūnų analizės rezultatus. Fig.8b rodo IgG anti-OVA antikūnų analizės rezultatus.

Fig.9 rodo anti-KLH antikūno atsaką primatuose. Fig.9a rodo IgM anti-KLH antikūnų analizės rezultatus. Fig.9b rodo IgG anti-KLH antikūnų analizės rezultatus.

Fig.10 rodo 7E1-G1 ir 7E1-G2b antikūnų gebos slopinti IgG atsaką į SRBC palyginimą.

Fig.11 rodo antikūno atsaką į SRBC inhibavimo 7E1-G2b priklausomybę nuo dozės.

Fig. 12 rodo šio išradimo chimerinio antikūno sunkiosios grandinės srities ir lengvosios grandinės srities ekspresijos vektorių žemėlapius.

Fig.13 pateikiama ekspresijos vektoriaus, galinčio ekspresuoti šio išradimo chimerinio antikūno sunkiąją grandinę, nukleorūgščių seka (SEQ ID No:5). Startinis ATG (1000-1002 nukleotidai), koduojantis žmogaus antikūno įterptos signalinės sekos startinį Met, yra paryškintas. Pabraukti nukleotidai 1057-1422 (SEQ ID NO:13) rodo tinkamiausią nukleorūgščių seką, koduojančią šio išradimo antikūno kintamą sunkiąją grandinę.

Fig.14 pateikiama ekspresijos vektoriaus, galinčio ekspresuoti šio išradimo chimerinio antikūno lengvąją grandinę, nukleorūgščių seka (SEQ ID No:6). Startinis ATG (1005-1007 nukleotidai), koduojantis žmogaus antikūno įterptos signalinės sekos startinį Met, yra paryškintas. Pabraukti nukleotidai

1065-1388 (SEQ ID NO:14) rodo tinkamiausią nukleorūgščių seką, koduojančią šio išradimo antikūno kintamą lengvąją grandinę.

Fig.15 rodo pelės anti-CD40 kintamųjų sričių ir žmogaus matricos sekų sugretinimą. Pelės anti-CD40 H ir L grandinių kintamosios sritys buvo panaudotos homologinėms žmogaus embrioninės linijos sekoms identifikuoti. Liekanų numeracija ir CDR'ų (pabraukti) nustatymas buvo atliekamas remiantis Kabat et al. (Kabat, E.A., et al., (1991) Sequences of proteins of immunological interest (5th Ed). Washington DC: United States Department of Health and Human Services; Kabat, E.A., et al., (1977) *J. Biol. Chem.* 252:6609-6616). Skirtumai tarp sekų nurodyti vertikaliomis linijomis, o karkaso padėtys, charakterizuotos sudėtinėje ekspresijos bibliotekoje, pažymėtos žvaigždute.

Fig.16 rodo humanizuoto anti-CD40 variantų titravimo rezultatus su imobilizuotu antigenu. Buvo charakterizuoti bakterijose ekspresuoto chimerinio anti-CD40 Fab ir parinkti variantai iš kiekvienos bibliotekos. Chimerinis (juodi skrituliukai), Hu I-19C11 (balti skrituliukai), Hu II-CW43 (balti kvadratai), Hu III-2B8 (juodi trikampiai) ir neturintys nieko bendro su šiais antikūnais (juodi kvadratai) Fab buvo išlaisvinti iš 15 ml bakterijų kultūrų periplazminės erdvės ir serijiniai skiedimai buvo inkubuojami su CD40-Ig antigenu, imobilizuotu ant mikrotitro plokštelių. Antikūno susijungimo kiekis buvo nustatytas žemiau aprašytu būdu.

Fig.17 rodo, kaip antikūno afiniškumas koreliuojasi su tirpaus-gp39 prisijungimo prie CD40-Ig inhibavimu. CD receptoriaus ligandas – gp39 – buvo imobilizuotas ant mikrotitro plokštelės. Po to kintami kiekiai išgryninto chimerinio (juodi skrituliukai), Hu II-CW43 (balti skrituliukai), Hu III-2B8 (juodi trikampiai), HuII/III-2B12 (balti skrituliukai) ir neturintys nieko bendro su šiais antikūnais (juodi kvadratai) Fab buvo koinkubuoti su 2 µg/ml CD40-Ig ant mikrotitro plokštelės. CD40-Ig prisijungimo prie gp39 kiekis buvo įvertintas žemiau aprašytu būdu.

Fig.18 rodo pelės karkaso liekanų aktyviuose variantuose kiekybinį įvertinimą. Buvo nustatytos aktyviausios anti-CD40 variantų iš karkaso optimizavimo bibliotekos Hu I (A) ir iš karkaso/HCDR3 optimizavimo

bibliotekos Hu II (B) kintamųjų sričių sekos, norint nustatyti aminorūgštis karkaso bibliotekos padėtyse. Buvo nustatyta kiekvieno atskiros varianto kategorija remiantis bendru skaičiumi pelės liekanų, išlikusių 8 karkaso bibliotekos padėtyse. Buvo nustatytos 34 klonų iš Hu I bibliotekos ir 40 klonų iš Hu II bibliotekos sekos, ir tai leido identifikuoti atitinkamai 24 ir 10 atskirų variantų. Išsistinė linija rodo sekų, lauktų iš vienodo skaičiaus atsitiktinai pasirinktų variantų, pasiskirstymą.

Smulkus išradimo aprašymas

Šiame išradime buvo sukurti chimeriniai ir humanizuoti anti-žmogaus CD40 antikūnai su imunosupresinėmis savybėmis. Tokie anti-žmogaus CD40 antikūnai turi akivaizdų pritaikymą kaip vaistai. Šiame išradime taip pat sukurtas labai panašus anti-pelės CD40 mAb (labai panašus į anti-žmogaus CD40 mAb), kuris tinka anti-CD40 mAb terapijos poveikiams tirti eilėje imuninių ir uždegiminių ligų pelių modelių. Anti-CD40 antikūnų sukūrimą komplikuoja tas faktas, kad CD40 yra stipri signalinė molekulė. Antikūnai, kurie jungiasi prie šio antigeno, gali būti paskirstomi į kategorijas, remiantis sugebėjimu stimuliuoti CD40 signalo perdavimą, o taip pat ir sugebėjimu blokuoti CD40/gp39 sąveiką.

Pareiškėjų anti-žmogaus CD40 mAb, kurie blokuoja CD40/gp39 sąveiką, buvo parinkti iš gausios anti-CD40 mAb grupės. Antikūnas, pažymėtas 2.220, buvo chimerizuotas ir humanizuotas. "Chimeriniai" antikūnai turi lengvąją grandinę ir sunkiąją grandinę: lengvoji grandinė turi lengvosios grandinės kintamąją sritį ir lengvosios grandinės pastoviąją sritį; sunkioji grandinė turi sunkiosios grandinės kintamąją sritį ir sunkiosios grandinės pastoviąją sritį. Chimeriniai antikūnai turi kintamąsias sritis iš vienu rūšių ir pastoviąsias sritis iš kitų rūšių (pavyzdžiui, pelės kintamosios sritys prijungtos prie žmogaus pastoviųjų sričių). (Žr. pvz., U.S. Patents 4,816,39 ir 4,816,567). Kiekviena iš lengvosios grandinės kintamųjų sričių (VL) ir sunkiosios grandinės kintamųjų sričių (VH) susideda iš "karkaso" sričių, pertrauktų trijų hiperkintamų sričių, vadinamų "komplementarumą

apsprendžiančiomis sritimis" arba "CDR". "Humanizuoti" antikūnai apima antikūnus su žmogaus karkasinėmis sritimis, sujungtomis su CDR iš donorinės pelės arba žiurkės imunoglobulino. (Žr. pvz., U.S. Patent 5,530,101). Į šio išradimo apimtį patenka humanizuoti antikūnai, kurie turi CDR, išvestus iš čia parodytų pelės kintamųjų grandinių.

Labiausiai tiesioginę antikūno humanizavimo strategiją sudaro CDR iš donorinio mAb įjungimas į žmogaus karkasą (Jones, P.T., et al., (1986) *Nature* 321:522-525). Tačiau tam tikros karkaso liekanos palaiko CDR struktūrą, ir kontaktinės antigeninės implantuotos pelės CDR į žmogaus karkaso matricas gali sumažinti gauto humanizuoto mAb susirišimo aktyvumą (Foote, J., et al., (1992) *J. Mol. Biol.* 224:487-499). Vertinant konkrečių karkaso liekanų potencialų įnašą į antikūno afiniškumą, susiduriama su dviem problemomis. Pirma, konkrečiam mAb sunku numatyti, kuri karkaso liekana atlieka kritinį vaidmenį afiniškumo ir specifiškumo palaikyme. Antra, karkaso padėtims, kurios yra skirtingos pradiniam mAb ir žmogaus matricoje, yra sunku numatyti, ar atsiradusi iš pelės pradininko, ar žmogaus matricos aminorūgštis duos aktyvesnį mAb. Taigi, antikūnų humanizavimo būdai, kurie remiasi vien tik struktūros nagrinėjimu, ne visada yra sėkmingi.

Ankstesniuose darbuose galima rasti bendros antikūnų gaminimo strategijos aprašymą, kuriame akcentuojama, kad po humanizavimo yra sunku išlaikyti antikūninį surišimo aktyvumą (Rosok, M.J., et al., (1996) *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618). Potencialiai svarbios karkaso liekanos, kurios yra skirtingos pradiniam mAb ir žmogaus matricoje, yra apibūdinamos vienoje stadijoje, sintezuojant ir ekspresuojant sudėtinę antikūnų biblioteką, kurioje yra visi galimi pradinio ir žmogaus matricos aminorūgščių dariniai tiriamajame karkase. Variantai, kurie turi optimalią karkaso struktūrą, nustatomi atrinkimo metu, o po to optimali karkaso struktūra(os) nustatoma nustatant DNR sekas. Paprastai daugelio aktyvių klonų sekų nustatymas atskleidžia kritines karkaso padėtis, kurios reikalauja konkrečios aminorūgšties ekspresijos. Atvirkščiai, pelės arba žmogaus aminorūgšties ekspresija bibliotekos karkaso padėtyje, esant ekvivalentiniam dažniui, aktyviuose klonuose sutampa su mažiau svarbia konkrečios karkaso padėties

funkcija. Taigi, humanizuota antikūno versija, kuri išlaiko pradinio mAb surišimo aktyvumą, yra greitai nustatoma remiantis funkciniu surišimu.

Antikūno humanizavimo ir afiniškumo subbrandinimo procesai dažnai vykdomi atskirais etapais (Rostok (1996), *supra*; Yelton, d. E., et al., (1995) *J. Immunol.* 155:1994-2004; Wu, H., et al., (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:6037-6042; Baca, M., et al., (1997) *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684; Marks, J.D., et al., (1992) *J. Biol. Chem.* 267:16007-16010). Naudojant žemiau aprašytą modifikuotą strategiją, buvo sukurta daug humanizuotų pelės mAb 2.220 versijų, kurių afiniškumas buvo toks pat arba geresnis nei chimerinio Fab.

Pareiškėjų šio išradimo chimerinis antikūnas čia yra žymimas "chi220". Pareiškėjų labai artimas anti-pelės CD40 mAb čia yra žymimas "7E1". Pareiškėjų humanizuoti šio išradimo anti-CD40 antikūnai čia yra žymimi "F4" ir "L3.17".

Buvo sukurti du skirtingi 7E1 izotipo variantai. Šie du 7E1 variantai yra tinkami tiriant molekulės Fc dalies vaidmenį anti-CD40 mAb terapijoje priešklinikiniuose imuninių ir uždegiminių ligų modeliuose. Čia taip pat yra pateikiamas anti-pelės CD40 mAb sukūrimas, kriterijai, naudojami atrinkti antikūnui, kuris atitinka chi220 savybes, šio mAb izotipo variantų sukūrimas ir jų *in vivo* aktyvumas imuninių ligų pelių modeliuose. Tyrimai ir su chi220, ir su jo pradiniu pelės mAb 2.200 bandyme su beždžionėmis, o taip pat ir tyrimai su 7E1 bandyme su pelėmis parodė, kad šie anti-CD40 mAb yra stiprūs imunosupresiniai agentai, ir jie bus smulkiau aptarti toliau. Čia aprašyti tyrimai buvo atlikti naudojant specialistams žinomą standartinę technologiją.

Taigi, buvo parodyta, kad pareiškėjų antikūnai slopina beždžionių humoralinį imuninį atsaką. Be to, du artimi anti-pelės CD40 mAb (7E1) izotipo variantai parodė imunosupresinį aktyvumą eilėje žmogaus ligų priešklinikinių modelių. Bendrai paėmus, šie duomenys rodo, kad chi220, F4 ir L3.17 yra tinkami klinikiniam vartojimui gydant autoimunines ligas ir transplantacijoje.

Toliau duodami pavyzdžiai yra skirti vien tik iliustracijos tikslams, ir jie neapriboja pareiškėjų išradimo, kurio ribas nustato tik išradimo apibrėžtis.

1 pavyzdys

Pelės anti-žmogaus CD40 antikūno pasirinkimas

A. Išskyrimas ir charakterizavimas *in vivo*

Panaudojant standartinę hibridomų technologiją su žmogaus CD40 sulietu baltymu kaip imunogenu buvo generuotas monokloninių antikūnų rinkinys. Buvo atrinkti antikūnai pagal susirišimą su CD40, panaudojant ir CD40⁺ ląstelių liniją ir sulietus baltymus. Klonuotiems antikūnams apibūdinti buvo naudojami gp39 susijungimo su CD40 testai ir stimuliavimo per CD40 funkciniai testai. Atrinkti antikūnai po to buvo charakterizuoti pagal krosreaktingumą su primatų ląstelėmis, norint nustatyti antikūnų tinkamumą naudojimui primatų priešklinikiuose modeliuose.

1. Imunizavimas ir suliejimas

Norint generuoti anti-žmogaus CD40 mAb gaminančias hibridomas, buvo atlikti du suliejimai. Imunizavimai imuninių limfocitų generavimui buvo atliekami imant 6-8 savaičių amžiaus BALB/c pelių pateles, imunogenu naudojant rekombinantinį sulietą baltymą, susidedantį iš žmogaus CD40 ekstraląstelinės srities, prijungtos prie šarnyro – pelės IgG2b antikūno CH2 ir CH3 sričių (hCD40-mD2b).

Suliejimui 40-1 pelė iš pradžių buvo imunizuojama, suleidžiant po oda 3-4 vietose 30 µg hCD40-mG2b emulsiją pilname Froindo adjuvante (iš viso 200 µl). Gyvuliukas buvo panašiai paveiktas 21-ą dieną hCD40-mG2b nepilname Froindo adjuvante, po to 37-ą dieną gavo galutinę prieš suliejimą vykdomą imunizaciją, suleidžiant į veną 30 µg hCD40-mG2p PBS. Imunizavimai suliejimui 40-2 buvo atliekami panašiai, išskyrus tai, kad Froindo adjuvantas buvo pakeistas Ribi adjuvantu (R-730). Pakartotinės imunizacijos buvo atliekamos 21-ą ir 42-ą dieną, o galutinė prieš-suliejimo imunizacija – 58-ą dieną.

Praėjus 3 dienoms po paskutinės reimunizacijos injekcijos, buvo paimti leukocitai iš blužnies ir limfmazgių ir sulieti 3:1 santykiu su X63-Ad8.653 pelės mielomos ląstelėmis, naudojant standartinius metodus (Kearney et al., J. Immunol. (1979) 123:1548-50; Lane, J. Immunol. (1985) 81:223-28). Kiekvieno suliejimo ląstelių suspensijos buvo supilstytos į 96 duobučių ląstelių auginimo plokšteles, gaunant maždaug 170000 ląstelių (prieš-suliejimo) duobutei tankį.

2. Atrinkimas ir klonavimas

Norint identifikuoti mAb, turinčius specifiškumą natyviame žmogaus CD40, buvo naudoti du bandymo tipai. Iš pradžių buvo atrinkti ląstelių kultūros nuopilai iš visų duobučių, nustatant jų sugebėjimą susiristi su CD40 teigiama, EBV transformuota žmogaus B ląstelių linija (IA2-2C) ELISA paremtame variante. Po to kiekvienas nuopilas buvo tirtas ELISA paremtame variante, nustatant jo sugebėjimą reaguoti su išgrynintu rekombinantiniu sulietu baltymu, susidedančiu iš žmogaus CD40 ekstraląstelinės dalies, sulietos su šarnyru (žmogaus IgG1 antikūno CH2 ir CH3 sritimis) - hCD40-Ig - ir su panašiai sukonstruotu neturinčiu nieko bendro su žmogaus Ig sulietu baltymu - Leu8-hlg (Hollenbaugh, et al., EMBO J. (1992) 11:4313-4321). Sugebėjimas reaguoti su pirmuoju, o ne su antruoju sulietu baltymu, pridėjus ląstelių surišimo duomenis, leido nustatyti specifinio natyviame CD40 antikūno buvimą maždaug 200 šeimininko duobučių.

Svarbiausia norimo anti-CD40 mAb savybė yra jo sugebėjimas visiškai blokuoti CD40 ir jo ligando (gp39) sąveiką. Taigi, kaip sekantis antikūno parinkimo žingsnis, buvo nustatomas visų CD40 specifinių šeimininko duobučių nuopilų sugebėjimas inhibuoti tirpaus rekombinantinio pelės CD8-žmogaus gp39 sulieto baltymo (sgp39) susijungimą su imobilizuotu hCD40-Ig ELISA paremtame variante. Tie nuopilai, kurie pilnai inhibavo šią sąveiką, buvo po to titruoti tame pačiame variante, nustatant kuri duobutė turi didžiausią antikūno inhibavimo titrą. Pagal šios analizės duomenis klonavimui buvo parinkta 10 stipriausiai inhibuojančių šeimininko duobučių.

Reikiamą antikūną sekretuojančių ląstelių klonavimas buvo vykdomas dviem stadijomis. Ląstelės iš kiekvienos šeimininko duobutės iš pradžių buvo "miniklonuotos", imant 10 ląstelių/duobutei pasėlio tankį, po to didžiausią titrą turinti CD40-specifinio "miniklono" duobutė buvo formaliai klonuota limituojančių skiedimų metodu.

3. Tolesnis charakterizavimas

Tolesniam antikūnų charakterizavimui buvo naudoti šeši bandymų tipai. Tai buvo sgp39 prisijungimo prie žmogaus B ląstelių inhibavimas, B ląstelių proliferacijos, sukeltos spg39 plius anti-IgM, inhibavimas, aktyvuotomis T ląstelėmis indukuotų B ląstelių sukeltos antikūnų sintezės inhibavimas *in vitro*, tiesioginė B ląstelių kostimuliacija anti-IgM, B ląstelių kostimuliacija anti-IgM, esant kryžmiškai sujungiančiam anti-kapa lengvosios grandinės antikūnui, ir B ląstelių kostimuliacija anti-IgM, esant antrajam anti-CD40 mAb – G28-5. Žinoma, kad šis mAb pasižymi stipriu kostimuliaciniu aktyvumu ir jis nepilnai blokuoja CD40/gp39 sąveiką. Jis buvo panaudotas daugelyje šių bandymų palyginimo tikslams.

Ši analizė leido atrinkti keturis mAb: 1.66 (IgG2b), 2.36 (IgG2a), 2.174 (IgG1) ir 2.220 (IgG2a). Buvo atlikti bandymai mAb charakterizuoti. Viename eksperimente ląstelės iš žmogaus B ląstelių Raji linijos buvo inkubuotos su 2 arba 20 µg/ml įvairių anti-CD40 mAb, o po to atliktas antras inkubavimas neskistame COS ląstelių nuopile, turinčiame mCD8-gp39 sulieto baltymo (sgp39). Surištas sgp39 buvo nustatytas toliau inkubuojant ląsteles su FITC žymėtu anti-mCD8 mAb ir analizuojant ląsteles FACScan. Procentinė inhibicija buvo apskaičiuota padalinant inkubuotų su antikūnu mėginių vidutinę fluorescenciją iš pirmojo inkubavimo mėginių be antikūno vidutinės fluorescencijos (fig. 1).

Kaip parodyta fig.1, kiekvienas iš šių keturių mAb galėjo pilnai inhibuoti sgp39 sulieto baltymo prisijungimą prie žmogaus B ląstelių linijos, ekspresuojančios didelius kiekius CD40, nors 2.174 atveju pilnai blokadai reikia daug antikūno. Panašūs rezultatai buvo gauti naudojant žmogaus

tonzilines B ląsteles. Šie duomenys buvo lygiagretūs pagal du funkcinis testus. Pirmiausia, buvo parodyta, kad kiekvienas mAb galėjo pilnai blokuoti sgp39 tarpininkaujamą žmogaus tonzilių B ląstelių kostimuliavimą. Antra, kiekvienas iš jų aiškiai inhibavo IgG ir IgM produkciją nuo T ląstelių priklausomą B ląstelių antikūnų *in vitro* sintezės teste.

Trys iš šių keturių antikūnų parodė ribotą sugebėjimą kostimuliuoti B ląstelių proliferaciją esant anti-IgM. Mab 2.220 turėjo labiausiai išreikštą sugebėjimą indukuoti silpną kostimuliacinį aktyvumą. Pridėjus anti-kapa lengvosios grandinės antikūno, naudojamo kryžmiškai sujungti šiuos anti-CD40 mAb, 2.36 įgavo žymų kostimuliacinį aktyvumą, tuo tarpu kai kitų trijų antikūnų aktyvumas buvo nepaveiktas. Buvo parodyta, kad G28-5 kostimuliacinė geba, kai jis suporuojamas derinyje su kiekvienu iš šių keturių naujų antikūnų, yra moduluojama skirtingai. Mab 1.66 ir ypatingai 2.174 stiprina G28-5 kostimuliaciją, tuo tarpu kai 2.220 ir 2.36 – ją silpnina.

Atlikus atranką, paremtą žmogaus sistemų įvertinimu *in vitro*, šių keturių anti-CD40 mAb tinkamumas buvo toliau tiriamas *in vivo*, įvertinant juos tyrimuose su primatais (ne žmonėmis). Du pagrindiniai analizės klausimai buvo: kiekvieno iš jų prisijungimo prie primatų B ląstelių santykinis stiprumas ir nuo T ląstelių priklausomos B ląstelių antikūnų sintezės slopinimas *in vitro*. Buvo rasta, kad visi keturi mAb kryžmiškai susijungė su šunbeždžionės makakos (*Macaca fascicularis*) B ląstelėmis. 2.36 ir 2.220 jungėsi smarkiau nei 2.174 ir 1.66. Žemesnis stebimas 2.174 ir 1.66 mAb susijungimas buvo ne dėl jų skirtingų izotipų, kadangi kitą izotipą atitinkantys anti-CD40 mAb rodė surišimo lygius, artimus 2.36 ir 2.220 (pvz. G28-5 ir 2.118). Šie rezultatai prieštaravo rezultatams, gautiems su žmogaus B ląstelėmis, kur kiekvienas iš šių mAb parodė panašų surišimą. Buvo rasta, kad šių keturių mAb beždžionių B ląstelių vykdomos antikūnų sintezės slopinimo geba yra lygiagreti susijungimo gebai.

B. Charakterizavimas *in vivo*

Norint įvertinti anti-CD40 kaip imunosupresinio agento tinkamumą ir parinkti atitinkamą antikūną tolesniems tyrimams, buvo atlikti du bandymai su

primatais (ne žmonėmis), naudojant pelės anti-žmogaus CD40 mAb. Pirmiausia buvo palygintas šių keturių atrinktų anti-CD40 mAb *in vivo* klirensas ir ūmus toksiškumas. Šie rezultatai buvo panaudoti dviem antikūnams – 2.36 ir 2.220 – atrinkti, kurie po to buvo tirti antrajame bandyme, skirtame antikūno atsako į T-priklausantį antigeną inhibicijos efektyvumo ir ūmaus toksiškumo įvertinimui.

2.36 ir 2.220 veiksmingumo primatams tyrimas

Remiantis ankstesniais duomenimis, buvo nustatytas 2.36 ir 2.220 mAb sugebėjimas slopinti T-priklausomą antikūninį atsaką po intraveninio įvedimo šunbeždžionėms. Šis tyrimas buvo padalintas į tris fazes (fig.2). I fazėje keturios grupės, susidedančios iš 1 arba 2 šunbeždžionių patinų ir 2 patelių, buvo imunizuojamos 1-ą dieną kiekvienai beždžionei suleidžiant į veną avies eritrocitų (SRBC), po to 1-ą, 3-ą ir 5-ą dieną veikiama 20 mg/kg mAb 2.36, 2.220, 1.106 (IgG1 pelės anti-žmogaus gp39, teigiama kontrolė) arba L6 (IgG2a pelės anti-žmogaus auglio antigenas, neigiama kontrolė). Buvo nustatoma IgM ir IgG titrai SRBC imunogenui, tiriamųjų ir kontrolinių agentų kiekiai serume, anti-testinių ir kontrolinių agentų antikūnų buvimas, imunoglobulinų kiekiai serume, periferinio kraujo leukocitų skaičius ir periferinio kraujo limfocitų įvairių subpopuliacijų dažnis. II fazėje, kai kontroliniai ir tiriamieji agentai pasišalino iš organizmo, gyvūnai buvo imunizuoti SRBC ir antruoju antigenu – sraigės limfos hemocianinu (KLH) - imunologinės tolerancijos indukcijos ir stebėtos imunosupresijos įvertinimui. III fazėje parinkti gyvūnai buvo vėl imunizuoti, norint nustatyti, ar iš pradžių nuslopintas anti-SRBC antikūno atsakas vėl atsirado po papildomo iššaukimo SRBC, ir norint įvertinti antrinį antikūno atsaką į KLH.

Buvo atliktas bandymas, norint parodyti, kad mAb 2.220 žymiai slopina pirminį antikūno atsaką į SRBC (fig.3). Beždžionės buvo veikiamos 20 mg/kg vieno iš 1.106, L6, 2.36 arba 2.220 mAb I-je fazėje 1-ą, 3-ą ir 5-ą dieną. Beždžionės buvo imunizuojamos SRBC 1-ą I, II ir III fazės dieną. Fig.3a parodyti serumo mėginių rezultatai, kuriuose buvo nustatomi IgM anti-SRBC antikūnai; fig. 3b parodyti serumo mėginių rezultatai, kuriuose buvo nustatomi

IgG anti-SRBC antikūnai. Duomenys buvo išreikšti anti-SRBC titro geometriniu vidurkiu kiekvienai grupei (n=3 arba 4).

Maksimalus pirminis atsakas buvo inhibuotas 85 % ir 98 % atitinkamai IgM ir IgG. Po mAb 2.220 pasišalinimo iš serumo žemiau nustatomų kiekių, maksimalus antrinis atsakas į SRBC dar buvo inhibuotas 79 % ir 56 % atitinkamai IgM ir IgG, lyginant su neigiamos kontrolės atsaku I fazėje. Priešingai, teigiamos kontrolės (mAb 1.106) atveju buvo stebėtas stiprus antrinis antikūno atsakas į SRBC. Tretinis atsakas į SRBC nebuvo inhibuojamas, kas rodo, kad mAb 2.220 indukuoja ilgai trunkančią imunosupresiją, bet ne imunologinę toleranciją. Visi KLH imunizuoti gyvūnai davė pirminį ir antrinį anti-KLH atsaką, kas duoda pagrindo teigti, kad ši imunosupresija yra grįžtama. Gyvūnai, paveikti 2.36, nebuvo tiriami II-je fazėje, kadangi žymios inhibicijos nebuvo stebėta I-je tyrimo stadijoje.

Vidutinės didžiausios koncentracijos serume, atsirandančios tuoj pat po paskutinės dozės, buvo 744 ir 405 $\mu\text{g/ml}$ atitinkamai 2.220 ir 2.36 mAb. Mab 2.36 iš serumo pasišalino iki mažesnių nei nustatomi lygių 15-ą dieną, tuo tarpu kai mAb 2.220 tik 29-ą dieną. Abu mAb (2.36 ir 2.220) buvo imunogeniniai.

Su vaistais susijusių klinikinių pastebėjimų, kūno masės arba maisto sunaudojimo pokyčių arba hematologijos bei Ig kiekio serume pokyčių nepastebėta nei vienam gyvūnui. Vienintelis su vaistais susijęs pastebėtas duomuo buvo trumpalaikiai 70 % ir 43 % periferinių B ląstelių procentinio kiekio sumažėjimai atitinkamai 2.36 ir 2.220 mAb. B ląstelės atsistatė iki normalaus lygio per 2-3 savaites po gydymo.

Reziumuojant galima pasakyti, kad mAb 2.200 žymiai slopino antikūninį atsaką į SRBC, o 2.36 – neslopino. Nors mAb 2.200 sukėlė ilgalaikę antigenui specifinę imunosupresiją, ji buvo grįžtama. Remiantis šiais duomenimis, mAb 2.200 buvo pasirinktas tolesniam tyrimui.

2 pavyzdys

Chimerinio antikūno chi220 gavimas

Norint nukreipti pelės anti-žmogaus mAb 2.220 imunogeniškumą, buvo generuotos rekombinantinės formos, kuriose kintamosios sritys buvo prijungtos prie žmogaus pastoviųjų sričių, ir palygintas jų veiksmingumas *in vitro*. Dvi naudotos strategijos buvo: chimerinio antikūno, turinčio nepakeistas pelės kintamąsias sritis, gavimas ir humanizuotos formos, kuriose pelės hiperkintamosios sritys (CDR) yra įjungtos į žmogaus karkasines sekas su kintamomis sritimis. Chimeriniai antikūnai išlaiko pradinio antikūno antigenines prisijungimo savybes, bet gali turėti didesnę tikimybę būti imunogeniniais. Humanizuoti antikūnai turi mažesnę tikimybę būti imunogeniniais, bet humanizacijoje gautos mutacijos gali veikti antigeno prijungimą.

A. Chimerinių ir humanizuotų antikūnų konstravimas ir charakterizavimas *in vitro*

PCR būdu buvo gautos VL ir VH sritys iš anti-CD40 mAb 2.220. kDNR buvo gauta iš RNR, išskirtos iš hibridomos, ekspresuojant 2.220 mAb, naudojant IgG1-specifinį arba C κ -specifinį antiprasminį pradmenį atitinkamai VH ir VL sritims gauti. Prie šių viengrandžių kDNR buvo pridėta poli-G uodega. Po to kintamosios sritys buvo amplifikuotos PCR būdu, prasminiu pradmeniu naudojant oligonukleotidą, turintį poli-C seką, komplementarią poli-G uodegai, ir įstatytą rinkinį antiprasminių pradmenų. Po to gautas PCR produktas buvo įterptas į bakterinį vektorių, naudojant į pradmenis įjungtas restrikcijos vietas. Po to buvo nustatytos įvairiarūšių klonų sekos, panaudojant dideoksinukleotidinį sekvenavimą. Buvo atlikti du nepriklausomi bandymai, pradedant nuo RNR stadijos, ir gautos sekos buvo tokios pačios.

Norint gauti chimerinę antikūno formą, kintamosios sritys buvo amplifikuotos PCR būdu naudojant pradmenis, kurie įvedė seką, koduojančią žmogaus antikūno signalinę seką, artimiausiai atitinkančią 2.220 seką, kaip parodyta 4 fig. Pabrauktos lengvosios grandinės kintamosios sekos (fig.4a) ir sunkiosios grandinės kintamosios sekos (fig.4b) dalys reiškia žmogaus antikūno su artimiausia homologija pelės 2.220 įterptas signalines sekas. Šie

PRC produktai buvo įterpti į vektorių, turintį sekas, koduojančias pastovias žmogaus kapa arba žmogaus $\gamma 1$ sritis, norint generuoti atitinkamai pilną lengvąją arba sunkiąją grandinę. Vektoriuose taip pat buvo atitinkami atsparumo vaistui genai stabilų baltymų ekspresuojančių linijų generavimui ir amplifikavimui. Baltymas pradiniam charakterizavimui buvo pagamintas pereinamosios ekspresijos iš COS ląstelių būdu, po to baltymas A buvo gryninamas.

Kaip pavyzdys, chimerinį antikūną produkuojančių ląstelių linija buvo generuota kotransfekuojant CHO DG44 ląsteles atskirais ekspresijos vektoriais sunkiajai ir lengvajai chimerinio antikūno grandinei, o kointegracijos skatinimui buvo naudotas didelio kopijų skaičiaus elektroporacijos metodas. (Žr. U.S. Patent 4,956,288). Chi220 sunkioji ir lengvoji grandinės buvo įklonuotos į atitinkamai pD17 ir pD16 ekspresijos vektorius. Abu vektoriai buvo pagaminti iš In Vitrogen plazmidės pcDNA3 ir turėjo tokias ypatybes (fig.12): (1) atsparumo neomicinui genas pcDNA3 buvo pakeistas pelės dihidrofolato reduktazės (DHFR) genu kontroliuojant nestiprinančiu SV40 promotoriumi (kuris dar vadinamas "susilpnintas DHFR"; atkreipkite dėmesį, kad tik promotorius yra susilpnintas, o ne DHFR fermentas – nestiprinantis promotorius dar turi SV40 replikacijos pradžią, taigi šie vektoriai gali būti naudojami pereinamose COS transfekcijose); (2) dominantis genas yra ekspresuojamas iš CMV promotoriaus, o poliadenilinimo signalas yra iš jaučio augimo hormono geno; (3) dominančio geno ekspresijos kasetė yra flankuota transkripcijos baigmės sekomis (t.y. 5' prie promotoriaus ir 3' prie poli A vietos); (4) vektoriai turi dvi atskiras restrikcijos vietas polijunges - vieną 3' nuo promotoriaus dominančio geno klonavimui ir vieną 5' nuo promotoriaus vektoriaus ištiesinimui prieš transfekciją; ir (5) atsparumo ampicilinui genas ir ColE1 kilmės plazmidei dauginti E. coli.

Naudoti sunkiosios ir lengvosios grandinės genai buvo genominės konstrukcijos, turinčios tokias modifikacijas: (1) sunkiosios grandinės signalinį peptidą koduojančios sekos, kintamoji sritis ir CH1 sritis buvo gretimos (t.y. nebuvo intronų); ir (2) lengvosios grandinės signalinį peptidą ir kintamąją sritį koduojančios sekos buvo gretimos.

Šiame išradime nagrinėjami ir kiti specialistams žinomi vektoriai, galintys ekspresuoti šio išradimo chimerinį antikūną. Nukleorūgšties seka, tinkanti ekspresijos vektoriui, galinčiam ekspresuoti šio išradimo chimerinio antikūno sunkiąją grandinę, yra parodyta fig.13; nukleorūgšties seka, tinkanti ekspresijos vektoriui, galinčiam ekspresuoti šio išradimo chimerinio antikūno lengvąją grandinę, yra parodyta fig.14.

Pilna šio chimerinio antikūno ("chi220") sunkiosios ir lengvosios grandinių, įskaitant kintamąją ir pastoviąją sritis, aminorūgščių seka yra tokia (paryškintos aminorūgštys rodo kintamąją sunkiąją ir kintamąją lengvąją grandines):

Sunkiosios grandinės seka (SEQ ID NO:3)

QIQLVQSGPE LKKPGETVRI SCKASGYAFT TTGMQWVQEM PGKGLKWIGW 50
 INTHSGVPHY VEDFKGRFAF SLETSANTAY LQISNLKNE TATYFCVRSG 100
 NGNYDLAYFA YWGQGTLLTV SAASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL 150
 VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSSLGT 200
 QTYICNVNHK PSNTKVDKKV EPKSCDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP 250
 KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWWYVDGVEVH NAKTKPREEQ 300
 YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE 350
 PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCVLKGFYPS DIAVEWENG QPENNYKTP 400
 PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP 450
 GK 452

Lengvosios grandinės seka (SEQ ID NO:4)

DIVLTQSPAT LSVTPGDRVS LSCRASQSS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY 50
 ASHSISGIPS RFGSGSGSD FTLINSVEP EDVGIYYCQH GHSFPWTFGG 100
 GTKLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV 150
 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG 200
 LSSPVTKSFN RGEK 214

Buvo generuota keletas humanizuotų 220 formų. Šis procesas apima pelės ir žmogaus embrioninių sekų su artimiausia homologija VH ir VL sritims identifikavimu. Pelės embrioninės sekos buvo naudotos somatinių mutacijų, kurios atsirado afininio brandinimo proceso metu, panašių padėčių identifikavimui. Po to kaip matrica buvo naudotos žmogaus sekos, ir sekos

sritys, kurios yra žinomos arba įtariamos kaip esančios svarbios surišimo specifiškumui, yra pakeičiamos žmogaus sekose ir VH, ir VL. Po to šių sekų struktūros buvo modeliuojamos naudojant matrica artimiausios homologijos baltymą, kurio kristalo struktūra buvo nustatyta. Humanizuotas formas koduojančios plazmidės buvo generuojamos, naudojant PCR kryptingą mutagenezę, ir naudojamos generuoti antikūnui pereinamos ekspresijos iš COS ląstelių būdu. *In vitro* testai buvo atliekami su šio išradimo chimeriniais ir humanizuotais antikūnais, ir rezultatai yra pavaizduoti fig.5. Fig.5a rodo surišimo bandymo rezultatus, tiriant chi220 ir h220v3 surišimą su hCD40-mG2b ELISA paremtame teste. Immulon-2 plokštelių duobutės buvo padengtos hCD40-mG2b, imant 10 ng/ml koncentraciją PBS ir laikant 2 val. Duobutės buvo blokuotos Specimen Diluent'u (Genetic Systems) ir pridedama nurodytų koncentracijų antikūnų. Po 1 val. inkubavimo duobutės buvo perplautos ir antikūno buvimas nustatytas naudojant peroksidazės - ožkos anti-žmogaus IgG antikūno konjugatą. H220v3 yra humanizuota mAb 2.220 forma. Reikšmės yra dviejų duobučių reikšmių vidurkiai, o paklaidų atžymos atitinka standartinį nukrypimą.

Fig.5b parodyti sgp39-tarpininkaujamos žmogaus B ląstelių kostimuliacijos anti-žmogaus CD40 mAb inhibavimo tyrimo bandymo rezultatai. Ramybės būsenoje esančios žmogaus tonzilinės B ląstelės (50000 ląstelių/duobutei) buvo inkubuojamos su sgp39 sulietu baltymu, 20 µg/ml triušio anti-žmogaus IgM padengtų imunogranulių ir su nurodytų koncentracijų anti-CD40 mAb arba tik terpe kontrolei 96 duobučių plokštelėse. Praėjus 72 valandoms po auginimo pradžios, visos duobutės buvo apspinduliuotos 1 µCi/duobutei [³H]timidino ir ląstelės auginamos dar 18 val. Po to ląstelės surenkamos, o įsiterpęs [³H]timidinas išmatuojamas scintiliacijos skaičiuokliu.

Remiantis šiais *in vitro* tyrimais (fig.5a ir 5b, kuriose parodyta, kad ir chimerinis, ir humanizuotas antikūnas efektyviai rišasi su CD40 ir inhibuoja B ląstelių stimuliavimą), tolimesniems tyrimams buvo pasirinktas chimerinis antikūnas.

3 pavyzdys

Chi220 veiksmingumas**A. Chimerinis mAb 2.220: vienkartinės dozės efektyvumo tyrimas bandyme su primatais (ne žmonėmis)**

Buvo įvertintas chi220 sugebėjimas slopinti pirminį ir antrinį humoralinį imuninį atsaką į T ląstelėms priklausančius antigenus bandyme su šunbeždžionėmis. Viename bandyme keturių beždžionių grupė buvo imunizuota avies eritrocitais (SRBC) ir gavo antrinę imunizaciją ovalbuminu (OVA) prieš pat gaunant intraveninę vienkartinę arba chi220 10, 40 arba 100 mg/kg dozę, arba kaip kontrolę sterilais fosfatinio buferio su NaCl (PBS) dozę. Visos trys dozės davė žymų pirminio humoralinio imuninio atsako į SRBC slopinimą, rodantį chi220 veiksmingumą primatuose. Visose chi220 paveiktose beždžionėse buvo stebėta nuo dozės priklausanti periferinio kraujo B ląstelių kiekio sumažėjimas, o jų atsistatymo laikas taip pat priklausė nuo dozės. Esant dviem aukščiausioms dozėms, buvo stebėtas trumpalaikis nedidelis periferinio kraujo T ląstelių vidutinio absoliutinio skaičiaus sumažėjimas grupėje. Buvo stebėti trumpalaikiai minimalūs IgM kiekio serume sumažėjimai, o susijusių su vaistu IgG arba IgA kiekių pokyčių serume pastebėta nebuvo.

Norint įvertinti imunologinės tolerancijos indukciją ir imunosupresinio aktyvumo grįžtamumą, visos beždžionės buvo imunizuojamos OVA, SRBC ir neoantigeno – sraigės limfos hemocianinu (KLH) – 149-ą dieną, kai chi220 kiekis 100 mg/kg grupėje buvo žemiau kiekio, kuris yra laikomas imunosupresiniu (~ 10 µg/ml), o periferinio kraujo B ląstelių skaičius sugrįžo į prieš vaisto įvedimą buvusį lygį. Anti-SRBC atsakas, esant mažiausiai dozei, buvo paprastai panašus į pirminį anti-SRBC antikūno atsaką kontrolinėse beždžionėse. Tačiau antikūno atsakas į SRBC buvo dar dalinai arba gana nemažai nuslopintas beždžionėse, gavusiose dvi aukštesnes dozes.

Norint daugiau ištirti imunosupresijos ir B ląstelių kiekio sumažėjimo priklausomybę nuo dozės, buvo atliktas antras bandymas, kuriame kitos beždžionės (keturios beždžionės grupėje) buvo imunizuotos SRBC, po to

gavo vienkartinę 0,1 arba 1,0 mg/kg chi220 dozę, arba PBS. Abiems dozėms buvo stebėta antikūninio atsako į SRBC suboptimali imunosupresija. Beždžionėse, gavusiose 1,0 mg/kg chi220, buvo stebėtas vidutinio lygio periferinio kraujo B ląstelių skaičiaus sumažėjimas, kuris atsistatė 29-ą dieną. Imant 0,1 mg/kg dozę, buvo stebėtas periferinio kraujo B ląstelių skaičiaus ir procentinio kiekio sumažėjimas, tačiau reikšmės neišėjo iš normalių istorinių B ląstelių procentinių ribų. Absoliutaus periferinio kraujo B ląstelių skaičiaus istorinės ribos nustatytos nebuvo. Trumpalaikis minimalus periferinio kraujo T ląstelių skaičiaus sumažėjimas ir nedidelis *ex vivo* T ląstelių proliferacijos sumažėjimas buvo stebėtas beždžionėms, kurios gavo 1 mg/kg chi220. Pagaliau, nebuvo nustatyta komplementinio aktyvavimo arba susijusių su vaistu IL-6 arba TNF α kiekio pokyčių serume. *Ex vivo* T ląstelių aktyvavimas, komplementinis aktyvavimas ir citokino kiekiai serume nebuvo tirti beždžionėse, gavusiose 10, 40 arba 100 mg/kg chi220.

Abiejuose bandymuose buvo tiriami serumo mėginiai po chi220 įvedimo, nustatant tiriamojo agento cirkuliuojančius kiekius ir tiriant antikūno prieš tiriamąjį agentą susidarymą. Farmakokinetinė analizė parodė, kad vidutinė didžiausia chi 220 koncentracija serume (C_{max}) nedidėja proporcingu dozės inkrementui būdu, ir kad chi220 puslaikis pailgėja, kai padidinama įvesta dozė. Buvo rasta, kad chi220 yra imunogeninis, kai jo įvedama 0,1, 1 arba 10 mg/kg. Kai cirkuliuojančios koncentracijos yra didesnės nei 10 μ g/ml, pasirodo, kad chi220 gali slopinti nukreiptą prieš jį antikūninį atsaką.

1. Eksperimento metodika

Aukščiau minėtame pradiniam tyrime šunbeždžionės buvo suskirstytos į keturias grupes, susidedančias iš dviejų patinėlių ir dviejų patelių kiekvienoje grupėje. Visos beždžionės buvo imunizuotos prieš 28 dienas nuo chi220 arba kontrolinio agento įvedimo OVA (5 mg/kg, im ir 10 mg/kg, sc). Pirmą dieną visos beždžionės buvo imunizuotos SRBC (10 % suspensijos 1,7 ml/kg, iv) ir gavo antrinę imunizaciją OVA (5 mg/kg, im ir 10

mg/kg, sc) prieš pat 10, 40 arba 100 mg/kg chi220 arba sterilaus PBS kaip kontrolės vienkartinės intraveninės dozės įvedimą. 149-ą dieną, kai chi220 kiekis serume nukrito žemiau visuotinai priimtų imunosupresinių lygių (~10 µg/ml), o periferinio kraujo B ląstelių kiekiai sugrįžo į pradinį lygį visose grupėse, beždžionės buvo imunizuojamos OVA, SRBC ir KLH (10 mg/gyvūnui, im). KLH imunizavimo tikslas buvo parodyti, kad beždžionės gali duoti imuninį atsaką į neoantigeną po to, kai jos buvo paveiktos chi220.

Norint pademonstruoti geresnį dozės atsaką imunosupresijos ir periferinio kraujo B ląstelių kiekio sumažėjimo atžvilgiu, antrajame tyrime kitos beždžionės (po dvi vienos lyties grupėje) buvo imunizuotos SRBC, o po to 1-ą dieną gavo vienkartinę arba 0,1, arba 1,0 mg/kg chi220 dozę, arba PBS kaip kontrolę. Pasirinktuose laiko taškuose abiejų eksperimentų metu buvo kontroliuojami hematologiniai parametrai ir periferinio kraujo limfocitų subpopuliacijos. Serumo cheminiai parametrai buvo nustatinėjami beždžionėms, gavusioms 10, 40 arba 100 mg/kg chi220, ir nebuvo nustatinėjami esant 0,1 ir 1 mg/kg dozėms, nes didesnių dozių atveju nebuvo stebėta su vaistais susijusių pokyčių. Be to, buvo matuojami IgM, IgG, IgA ir chi220 kiekiai serume. Veiksmingumo nustatymui specifinių IgM ir IgG antikūnų susidarymas prieš SRBC ir OVA imunogenus buvo nustatytas atitinkamuose serumo mėginiuose, paimtuose prieš pat imunogeno įvedimą ir kas savaitę po to. Specifinių IgM ir IgG antikūnų susidarymas prieš tiriamuosius agentus beždžionėse, kurios gavo chi220, buvo nustatytas prieš tiriamojo agento įvedimą 1-ą dieną ir kas savaitę po to. Antikūnų atsakų tarp grupių palyginimui buvo naudotas geometrinis titrų vidurkis. Be to, buvo matuotas bendras hemolitinis komplementinis aktyvumas (CH_{50}) ir C4d fragmento kiekiai, o TNF- α ir IL-6 kiekiai buvo nustatyti beždžionėse, kurios gavo 0,1 arba 1 mg/kg chi220 pasirinktuose laiko taškuose po chi220 įvedimo. Taip pat buvo nustatomas periferinio kraujo T ląstelių aktyvavimas *ex vivo* po stimuliavimo konkavalinu A beždžionėse, gavusiose 0,1 ir 1 mg/ml chi220 17-ą ir 31-ą dieną, norint įvertinti chi220 efektus į T ląstelių sugebėjimą atsakyti į mitogeną. Be to, visos beždžionės kasdien buvo

stebimos, ar neatsirado klinikinių toksiškumo požymių, kas savaitę matuojamas kūno svoris, o maisto sunaudojimas nustatomas kasdien.

Prieš gaunant tirpiklį arba 10, 40 arba 100 mg/kg chi220 (fig.6a), arba 0.1 arba 1 mg/kg chi220 (fig.6b), beždžionės buvo imunizuojamos SRBC 1-ą dieną. Serumo mėginiai buvo analizuojami nustatant IgM anti-SRBC antikūnus ELISA. Duomenys išreikšti anti-SRBC antikūno galinio taško titro (EPT) geometrinio vidurkiu kiekvienai grupei ($n=2$ [100 mg/kg grupė po 15-os dienos] arba 4), kur EPT yra ekvivalentiškas didžiausio serumo praskiedimo, turinčio didesnę sugertį nei dviguba vidutinė plokštelės foninė sugertis, atvirkštiniam dydžiui.

2. Rezultatai

a. Anti-SRBC antikūninis atsakas

Chi220, įvestas beždžionėms 10, 40 arba 100 mg/kg dozėmis, efektyviai slopino pirminį antikūninį atsaką į SRBC. Pirminio IgM anti-SRBC antikūninio atsako kontrolės didžiausios reikšmės dieną (8 dieną), vidutinis pirminis IgM anti-SRBC antikūninis atsakas buvo nuslopintas maždaug 92-94 % beždžionėse, paveiktose 10, 40 ir 100 mg/kg chi220, lyginant su kontrolėmis (fig.6a). Grupės vidutinis IgM anti-SRBC antikūninis atsakas netapo teigiamu iki 85-os dienos, esant 10, 40 arba 100 mg/kg dozėms. Pirminio IgG anti-SRBC antikūninio atsako kontrolės didžiausios reikšmės dieną (15 dieną), vidutinis pirminis IgG anti-SRBC antikūninis atsakas buvo nuslopintas 98 %, 99 % ir 85 % beždžionėse, kurios gavo atitinkamai 10, 40 ir 100 mg/kg chi220, lyginant su kontrolėmis (fig.7a). Didesni bendri prieš dozės gavimą anti-SRBC antikūnų titrai 100 mg/kg grupėje gali paaiškinti stebimą imunosupresijos nepriklausomybę nuo dozės. Bendrai imant, beždžionės, paveiktos 10 arba 100 mg/kg chi220, nerodė pirminio IgG anti-SRBC antikūninio atsako 85-ą dieną. Tačiau dvi iš paveiktų 40 mg/kg chi220 beždžionių turėjo uždelstą pirminį IgG antikūninį atsaką į SRBC (jo dydis buvo panašus į kontrolinį), kuris pasidarė teigiamu 36-ą dieną ir pasiekė maksimumą 51-ą dieną.

149-ą dieną, kai chi220 kiekiai serume nukrito žemiau pripažintų imunosupresinių kiekių ($\sim 10 \mu\text{g/ml}$), o periferinio kraujo B ląstelių kiekiai grįžo į prieš dozės įvedimą buvusį lygį, beždžionės buvo imunizuotos antrą kartą SRBC. Kaip ir buvo laukta, kontrolinės beždžionės rodė stiprų antrinį IgG antikūninį atsaką į SRBC. Beždžionės, paveiktos 10 mg/kg chi220, rodė pirminį IgM ir IgG antikūninį atsaką į SRBC, kurie buvo iš esmės panašūs į pirminį antikūninį atsaką kontrolinėse beždžionėse. Tačiau antikūninis atsakas į SRBC buvo dalinai nuslopintas esant 40 mg/kg dozei ir stipriai nuslopintas esant 100 mg/kg dozei. Nors dvi beždžionės, paveiktos 40 mg/kg chi220 doze, kurios anksčiau rodė silpnus pirminius antikūninius atsakus į SRBC, išvystė IgM ir IgG anti-SRBC antikūnų titrus, būdingus antriniam antikūniniam atsakui, anti-SRBC antikūniniai atsakai kitose dviejose šios grupės beždžionėse ir likusiose 100 mg/kg chi220 doze paveiktose beždžionėse dar buvo maždaug 90 % nuslopinti, lyginant su kontrolinių beždžionių vidutiniu pirminiu anti-SRBC antikūniniu atsaku.

Antikūninio atsako į SRBC suboptimali imunosupresija buvo stebėta po 0,1 arba 1,0 mg/kg chi220 įvedimo (fig. 6b ir 7b). Nors visos chi220 paveiktos beždžionės rodė teigiamą IgM antikūninį atsaką į SRBC antigeną, bendras vidutinis maksimalus IgM anti-SRBC antikūninis atsakas buvo nuslopintas maždaug 56 % beždžionėse, paveiktose 1 mg/kg chi220, lyginant su vidutiniu maksimaliu kontroliniu atsaku. Beždžionėse, paveiktose 0,1 mg/kg chi220 doze, IgM anti-SRBC antikūninio atsako slopinimo nebuvo pastebėta. Vidutinis IgM anti-SRBC antikūninis atsakas pasiekė maksimumą 15-ą dieną kontrolinėse beždžionėse, ir 8-ą dieną beždžionėse, kurios gavo 0,1 ir 1,0 mg/kg chi220. Bendrai imant, vidutinis maksimalus IgG anti-SRBC antikūninis atsakas buvo nuslopintas 56 % ir 42 % atitinkamai 0,1 ir 1,0 mg/kg chi220 paveiktose beždžionėse. Vidutinis IgG anti-SRBC antikūninis atsakas pasiekė maksimumą 15-ą dieną kontrolinėse beždžionėse ir 1 mg/kg chi220 doze paveiktose beždžionėse, ir 8-ą dieną beždžionėse, kurios gavo 0,1 mg/kg chi220.

Beždžionėms buvo suleista intraveninė 10, 40 arba 100 mg/kg chi220 dozė 1-ą dieną. Be to, 28-ą, 1-ą ir 149-ą dieną visos beždžionės buvo imunizuotos OVA. Buvo analizuojami serumo mėginiai, nustatant IgM (fig.8a) arba IgG (fig.8b) anti-OVA antikūnus. Duomenys išreikšti kaip anti-OVA galinio taško titro (ETP) geometrinis vidurkis kiekvienai grupei ($n=2$ [100 mg/kg grupei po 15-os dienos] arba 4), kur EPT yra ekvivalentiškas didžiausio serumo praskiedimo, turinčio didesnę sugertį nei dviguba vidutinė plokštelės foninė sugertis, atvirkštiniam dydžiui.

Specifinių IgM ir IgG antikūnų atsiradimas prieš OVA tyrimo metu buvo kontroliuojamas kas savaitę beždžionėse, kurios gavo 10, 40 arba 100 mg/kg chi220. Pirminis ir antrinis anti-OVA antikūniniai atsakai buvo labai kintami ir paprastai silpni visose beždžionėse (fig.8). Beždžionės, kurios gavo chi220 1-ą dieną, turėjo didesnius anti-OVA antikūnų titrus nei kontrolinės grupės beždžionės.

149-ą dieną beždžionės gavo tretinę OVA imunizaciją. Visos beždžionės rodė teigiamus IgG antikūninius atsakus į OVA 7 dienų laikotarpyje po poveikimo. Kontrolinės beždžionės ir beždžionės, gavusios 10 mg/kg chi220 dozę, turėjo antikūnų titrus, būdingus tretiniam antikūniam atsakui, o beždžionės, paveiktos 40 arba 100 mg/kg chi220, rodė antikūnų titrus, kurie buvo būdingesni antriniam antikūniam atsakui.

c. Anti-KLH antikūninis atsakas

Beždžionėms buvo suleista intraveninė 10, 40 arba 100 mg/kg chi220 dozė 1-ą dieną. Be to, 149-ą dieną visos beždžionės buvo imunizuotos KLH. Buvo analizuojami serumo mėginiai, nustatant IgM (fig.8a) arba IgG (fig.8b) anti-KLH antikūnus. Duomenys buvo išreikšti kaip anti-KLH galinio taško titro (ETP) geometrinis vidurkis kiekvienai grupei ($n=2$ [100 mg/kg grupei po 15-os dienos] arba 4), kur EPT yra ekvivalentiškas didžiausio serumo praskiedimo, turinčio didesnę sugertį nei dviguba vidutinė plokštelės foninė sugertis, atvirkštiniam dydžiui.

149-ą dieną, kai chi220 kiekiai serume nukrito žemiau pripažintų imunosupresinių kiekių ($\sim 10 \mu\text{g/ml}$), o periferinio kraujo B ląstelių kiekiai grįžo

į prieš dozės įvedimą buvusį lygį, beždžionės buvo imunizuotos KLH (10 mg/gyvūnui, im). Visos beždžionės rodė teigiamus IgM ir IgG antikūninius atsakus į KLH, kas rodo, kad sugebėjimas atsakyti į naują antigeną nebuvo pažeistas (fig.9).

d. Tiriomojo agento kiekiai serume ir anti-tiriomojo agento antikūno atsakas

Po chi220 įvedimo buvo tiriami serumo mėginiai, norint nustatyti tiriomojo agento cirkuliuojančius kiekius ir įvertinti antikūnų prieš tiriamąjį agentą susidarymą. Vidutinės maksimalios chi220 koncentracijos (C_{max}) serume atsirado praėjus 3 minutėms po 10 arba 40 mg/kg dozių įvedimo ir praėjus 6 valandoms po 100 mg/kg dozės įvedimo. Chi220 C_{max} reikšmės buvo 329, 2429 ir 2343 $\mu\text{g/ml}$ beždžionėms, paveiktoms atitinkamai 10, 40 arba 100 mg/kg chi220. Tačiau buvo žymūs C_{max} reikšmių skirtumai tarp atskirų beždžionių 40 ir 100 mg/kg grupėse. Buvo nustatyta, kad vidutinis chi220 puslaikis serume yra apytikriai 114, 173 ir 315 valandų beždžionėms, paveiktoms atitinkamai 10, 40 arba 100 mg/kg chi220.

Vidutinės C_{max} reikšmės, atsiradusios praėjus trimis minutėms po chi220 įvedimo, buvo 1,77 ir 33 $\mu\text{g/ml}$ atitinkamai 0,1 ir 1 mg/kg dozėms. Kiekvienos dozės atveju nebuvo pastebėta chi220 kiekio serume skirtumų priklausomai nuo lyties. Vidutinės AUC_{inf} reikšmės buvo 15,5 ir 847 $\mu\text{g.val/ml}$ atitinkamai 0,1 ir 1 mg dozėms. Bendrai paėmus, šie tyrimai rodo, kad chi220 puslaikis pailgėja padidinus įvedamą dozę. Be to, chi220 C_{max} didėja neproporcingu dozės inkrementui būdu.

Nors IgM anti-tiriamasis agentas atsakas buvo minimalus arba jo išvis nebuvo beždžionėse, gavusiose 10, 40 arba 100 mg/kg chi220, žymus IgG anti-tiriamasis agentas atsakas buvo stebimas beždžionėse, kurios gavo 10 mg/kg chi220. Vidutinis IgG anti-tiriomojo agento antikūninis atsakas beždžionėse, kurios gavo 10 mg/kg chi220, pasidarė teigiamas 29-ą dieną, maždaug po 1 savaitės, kai vidutinė grupės chi220 koncentracija serume nukrito žemiau 10 $\mu\text{g/ml}$, ir pasiekė maksimumą 36-ą ir 43-ą dieną, titro geometriniam vidurkiui esant 12627. IgG anti-tiriomojo agento antikūnų

pasirodymas beždžionėse, kurios buvo paveiktos 10 mg/kg chi220, taip pat sutapo su pirmuoju aptinkamu B ląstelių skaičiaus padidėjimu po išsekimo. Paskutinę matavimo dieną (149-ą) beždžionėse, kurios gavo 40 arba 100 mg/kg chi, dar neatsirado teigiamo antikūninio atsako prieš chi220, nors grupė vidutiniai chi220 kiekiai serume buvo mažesni už 10 µg/ml 57-ą dieną (40 mg/kg grupė) arba 92-ą dieną (100 mg/kg grupė).

Chi220 buvo imunogeninis, kai jo buvo įvedama 0,1 arba 1 mg/kg. Tyrimo eigoje 3 iš 4 beždžionių, gavusių arba 0,1, arba 1 mg/kg chi220, turėjo silpnus teigiamus IgM anti-tiriamąjo agento antikūninius atsakus 15-ą dieną. Trys iš 4 beždžionių, paveiktų 1 mg/kg chi220, turėjo žymų IgG anti-tiriamąjo agento antikūninius atsakus 22-ą dieną, galutinio taško titro geometriniam vidurkiui esant 16618. Bendrai imant, geometrinis vidutinis IgG anti-tiriamąjo agento antikūninis atsakas nebuvo teigiamas beždžionėse, kurios gavo 0,1 mg/kg chi220, ir tik viena beždžionė, kuri gavo 0,1 mg/kg chi220, turėjo silpną teigiamą IgG anti-tiriamąjo agento antikūninį atsaką, galutinio taško titro maksimumui esant 2430 22-ą dieną. Susumavus šiuos rezultatus, galima matyti, kad chi220 gali slopinti antikūninį atsaką prieš save patį, kai jo kiekiai serume yra didesni nei maždaug 10 µg/ml.

4 pavyzdys

Humanizuotų anti-CD40 antikūnų F4 ir L3.17 gavimas

Mab humanizuoti buvo naudojami įvairūs šioje srityje žinomi būdai. Buvo įrodyta, kad yra naudingos struktūra paremtos strategijos, bet sudėtingumas, kylantis iš didelio skaičiaus karkaso liekanų, kurios gali dalyvauti surišime, sumažina sėkmės tikimybę. Vietoj to, kad modeliavimo būdu būtų numatytas optimalus karkasas, žemiau aprašyta antikūnų bibliotekos strategija leidžia identifikuoti aktyvias karkaso konformacijas, remiantis daugelio kombinacijų atrinkimu. Mutagenezės strategijos, sujungtos su selekcijos metodais, leidžia išanalizuoti daugelį variantų ir imituoja *in vivo* brendimo procesus (reziumuota Marks, J.D., et al., (1992) *J. Biol. Chem.*

267:16007-16010). Mutagenezė kodonų pagrindu leidžia sukonstruoti bibliotekas, kurios charakterizuoja konkrečių liekanų įnašą, ir todėl yra efektyvesnė nei atsitiktinės mutagenezės strategija. Pavyzdžiui, linkusi į klaidas PCR negali būti naudojama žemiau aprašytų suderinamų karkasų bibliotekų sintezei. Be to, atsitiktinė mutagenezė sukuria platesnes labai įvairias bibliotekas ir, deja, dauguma mutacijų nestiprina mAb surišimo aktyvumo. Taigi, norint identifikuoti aktyvius variantus, reikia atrinkti labai daug klonų.

Žmogaus mAb išskirti iš fagų ekspozicijos bibliotekos dvistadijiniu būdu buvo panaudota strategija, vadinama "valdoma selekcija", kurioje kaip matrica naudojami graužikų mAb (Jespers, L.S., et al., (1994) *Bio/Technology* 12:899-903). Neseniai buvo aprašytas valdomos selekcijos, naudojant fagų ekspozicijos technologijas, variantas, kuriame chimerinis Fd fragmentas buvo panaudotas L grandinei atrinkti iš bibliotekos, turinčios žmogaus L grandinės su implantuotu pelės CDR3 (Rader, C., et al., (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:8910-8915). Po to aktyviausia L grandinė buvo panaudota H grandinei atrinkti iš žmogaus H grandinių bibliotekos, turinčios pelės HCDR3. Pagal šias strategijas išskirti mAb yra pilnai žmogaus (Jespers, *supra*) arba daugiausia žmogaus (Rader, *supra*), bet kiekvienoje proceso stadijoje įvesta antikūnų įvairovė reikalauja panaudoti afiniškumo praturtinimo metodus.

Šio išradimo humanizuotiems anti-CD40 antikūnams F4 ir L3:17 generuoti buvo naudojamos tokios medžiagos ir metodai.

1. Chimerinio anti-CD40 sukūrimas

Remiantis anti-CD40 pelės mAb2.220 seka buvo susintetinti ir išgryninti persidengiantys oligonukleotidai, koduojantys V_H ir V_L (69-75 bazių ilgio). Kintamosios H ir L sritys buvo susintetintos atskirai, sumaišant 25 pmol kiekvieno iš persidengiančių oligonukleotidų su *Pfu* DNR polimeraze (Stratagene) 50 μ l PCR reakcijoje, susidedančioje iš 5 ciklų: denatūracijos 94 °C temperatūroje 20 sek., renatūracijos 50 °C temperatūroje 30 sek., temperatūros kėlimo iki 72 °C per 1 min. ir išlaikymo 72 °C temperatūroje 30

sek. Po to renatūracijos temperatūra buvo pakelta iki 55 °C 25 cikluose. Atbulinis pradmuo ir biotinilintas priešakinis pradmuo buvo naudoti tolimesnei 1 µl sulieto produkto amplifikacijai 100 µl PCR reakcijoje, naudojant tą pačią programą. Produktai buvo išgryninti agarozės gelio elektroforeze, elektroliuoti ir fosforilinti T4 polinukleotidine kinaze (Boehringer Mannheim), o po to inkubuoti su streptavidino magnetinėmis granulėmis (Boehringer Mannheim) 5 mM Tris-Cl, pH 7,5, 0,5 mM EDTA, 1M NaCl ir 0,05 % Tween 20 15 min. 25 °C temperatūroje. Granulės buvo perplautos, ir nebiotinilinta minusinės grandinės DNR buvo išplauta inkubuojant su 0,15 M NaOH 25 °C temperatūroje 10 minučių. Chimerinis anti-CD40 Fab buvo susintetintas modifikuotame M13IX104 vektoriuje (Kristensson, K., et al., (1995) *Vaccines* 95, pp. 39-43, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY), pavadintame M13IX104CS, hibridizacinės mutagenezės būdu (Rosok, M.J., et al., (1996) *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618; Kunkel, T.A. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492) naudojant V_H ir V_L oligonukleotidus uridinilinto vektoriaus matricos trigubame moliniame pertekliuje. M13IX104 vektorius buvo modifikuojamas pakeičiant cisteino liekanas kapa gale, o γ 1 pastoviasias sritis - serinu. Reakcijos produktai buvo elektroporuoti į DH10B kiuvetes ir titruoti panaudojant XL-1 mėlio plokštelę.

1. Sudėtinio karkaso ir karkaso/CDR3 bibliotekų sukūrimas

Sudėtinio karkaso biblioteka (Hu I) buvo susintetinta tuo pačiu metodu, kuris buvo naudojamas chimeriniam anti-CD40 sukurti, su modifikacijomis. Buvo susintetinti persidengiantys oligonukleotidai, koduojantys žmogaus matricos H ir L kintamųjų sričių karkaso sritis ir pelės anti-CD40 CDR, kaip aprašė Kabat *et al.* (Kabat, E.A., et al., (1991) *Sequences of proteins of immunological interest* (5th Ed), Washington DC: United States Department of Health and Human Services; Kabat, E.A., et al., (1977) *J. Biol. Chem.* 252:6609-6616). Buvo susintetinti išsigimę oligonukleotidai, koduojantys ir pelės, ir žmogaus aminorūgštis septintoje V_H ir pirmoje V_K karkaso padėtyje (fig.15, žvaigždute pažymėtos liekanos).

Karkasas/HCDR3 (Hu II) ir karkasas/HCDR3/LCDR3 (Hu III) bibliotekos buvo susintetintos tokiu pačiu būdu, kaip ir sudėtinio karkaso biblioteka, su modifikacijomis. Mutagenezei parinktos CDR liekanos buvo: Ser⁹⁵-Tyr¹⁰² HCDR3'e ir Gln⁸⁹-Thr⁹⁷ LCDR3'e (fig.15, pabraukta). Oligonukleotidai, koduojantys HCDR3 ir LCDR3, buvo sukurti tokie, kad duotų mutaciją vienoje CDR liekanoje, ir buvo susintetinti įvedant NN(G/T) kiekvienoje padėtyje, kaip yra aprašyta (Glaser, S.M., et al., (1992) *J. Immunol.* 149:3903-3913). Persidengiantys nukleotidai, koduojantys karkaso bibliotekos ir ne bibliotekos pelės CDR, buvo sumaišyti su 25 pmol oligonukleotidų, koduojančių mutacijas turintį HCDR3, arba su 25 pmol kiekvieno iš oligonukleotidų, koduojančių mutacijas turinčius HCDR3 ir LCDR3.

3. Fagų ekspresijos bibliotekų atrinkimas

Hu II ir Hu III bibliotekos iš pradžių buvo atrenkamos pagal modifikuotą specialistams žinomą zonų perkėlimo strategiją, vadinamą imobilizavimo liftu (Watkins, J.D., et al., (1998) *Anal. Biochem.* 256:169-177). Trumpai tariant, nitroceliulioziniai filtrai (82 mm) buvo padengti ožkos anti-žmogaus kapa, blokuoti 1 % BSA ir uždėti ant agaro plokštelės, turinčios fagu infekuotų bakterijų zoną. Pradiniam atrinkimui plokštelė buvo padengta fagais, imant 10^5 fagų/100 mm plokštei. Imobilizavus fagų ekspresuotus anti-CD40 varianto Fab, filtrai buvo inkubuoti 3 val. 25 °C temperatūroje su 5 ng/ml CD40-Ig PBS, turinčiame 1 % BSA. Filtrai buvo perplauti keturis kartus PBS, turinčiu 0,1 % Tween 20, ir inkubuoti su ožkos anti-pelės IgG_{2b}-šarminės fosfatazės konjugatu (Southern Biotechnology), 3000 kartų praskiestu PBS, turinčiu 1 % BSA, 1 val. 25 °C temperatūroje. Filtrai buvo perplauti keturis kartus PBS, turinčiu 0,1 % Tween 20, ir išryškinti kaip aprašyta (Watkins (1998), *supra*). Atskirų klonų išskyrimui buvo išrinktos teigiamos zonos iš pradinio atrinkimo, padengtos imant mažesnį tankį ($<10^3$ fagų/100 mm plokštei) ir atrinktos pagal tą pačią strategiją.

Hu I sudėtinė biblioteka buvo pirmiausia atrinkta ELISA metodu, kuris leidžia greitai įvertinti variantų santykinius afiniškumus (Watkins, J.D., et al., (1997) *Anal. Biochem.* 253:37-45). Be to, ELISA buvo naudota charakterizuoti klonams, identifikuotiems imobilizavimo lifto atrinkimo būdu. Trumpai tariant, mikrotitro plokštelės buvo padengtos 5 µg/ml ožkos anti-žmogaus kapa (Southern Biotechnology) ir blokuotos 3 % BSA PBS. Po to plokštelė buvo inkubuojama su 50 µl Fab iš *Escherichia coli* kultūros nuopilo arba iš ląstelių lizato 1 val. 25 °C temperatūroje, plaunama tris kartus PBS, turinčiu 0,1 % Tween 20, ir 0,1 µg/ml CD40-Ig PBS, turinčiame 1 % BSA, 2 val. 25 °C temperatūroje. Plokštelė buvo plaunama tris kartus PBS, turinčiu 0,1 % Tween 20, pridama ožkos anti-pelės IgG_{2b}-šarminės fosfatazės konjugato, praskiesto 3000 kartų PBS, turinčiu 1 % BSA ir laikoma 1 val. 25 °C temperatūroje. Plokštelė buvo perplauta tris kartus PBS, turinčiu 0,1 % Tween 20, ir išryškinta kaip aprašyta (Watkins (1997), *supra*).

4. DNR sekų nustatymas

Buvo išskirtos viengrandės DNR ir nustatytos šio išradimo humanizuotų antikūnų genų H ir L grandinių kintamosios sritys, panaudojant fluorescencinį dinukleotidinės baigmės metodą (Perkin-Elmer, Foster City, CA).

Humanizuoto antikūno F4 kintamosios lengvosios grandinės nukleorūgšties (SEQ ID NO:7) ir aminorūgščių (SEQ ID NO:8) sekos yra tokios:

GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT	42
E I V L T Q S P A T L S L S	14
CCA GGG GAA AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT	84
P G E R A T L S C R A S Q S	28
ATT AGC GAT TAC TTA CAT TGG TAC CAA CAG AAA CCT GGC CAG	126
I S D Y L H W Y Q Q K P G Q	42
GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT TAC GCA TCC CAC TCC ATC TCT	168
A P R L L I Y Y A S H S I S	56

GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC 210
G I P A R F S G S G S G T D 70

TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA 252
F T L T I S S L E P E D F A 84

GTT TAT TAC TGT CAG CAT GGC CAC TCT TTT CCT TGG ACC TTC 294
V Y Y C Q H G H S F P W T F 98

GGA GGG GGG ACC AAG GTG GAA ATT AAA 321
G G G T K V E I K 107

Humanizuotų antikūnų F4 ir L3.17 kintamosios sunkiosios grandinės
nukleorūgšties (SEQ ID NO:9) ir aminorūgščių (SEQ ID NO:10) sekos yra
tokios:

CAG GTG CAG CTG GTG CAA TCT GGG TCT GAG TTG AAG AAG CCT 42
Q V Q L V Q S G S E L K K P 14

GGG GCC TCA GTG AAG GTT TCC TGC AAG GCT TCT GGA TAC GCC 84
G A S V K V S C K A S G Y A 28

TTC ACT ACC ACT GGC ATG CAG TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGA 126
F T T T G M Q W V R Q A P G 42

CAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA TGG ATC AAC ACC CAC AGC GGG 168
Q G L E W M G W I N T H S G 56

GTC CCA AAG TAT GTC GAG GAC TTC AAA GGA CGG TTT GTC TTC 210
V P K Y V E D F K G R F V F 70

TCC TTG GAC ACC TCT GTC AGC ACG GCA TAT CTG CAG ATC AGC 252
S L D T S V S T A Y L Q I S 84

AGC CTA AAG GCT GAG GAC ACT GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA 294
S L K A E D T A V Y Y C A R 98

TCT GGC AAT GGG AAC TAT GAC CTG GCA TAC TTT AAG TAT TGG 336
S G N G N Y D L A Y F K Y W 112

GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA 366
G Q G T L V T V S S 122

Humanizuoto antikūno L3.17 kintamosios lengvosios grandinės
nukleorūgšties (SEQ ID NO:11) ir aminorūgščių (SEQ ID NO:12) sekos yra
tokios:

GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT	42
E I V L T Q S P A T L S L S	14
CCA GGG GAA AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT	84
P G E R A T L S C R A S Q S	28
ATT AGT GAT TAC TTA CAT TGG TAC CAA CAG AAA CCT GGC CAG	126
I S D Y L H W Y Q Q K P G Q	42
GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT TAC GCA TCC CAC TCC ATC TCT	168
A P R L L I Y Y A S H S I S	56
GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC	210
G I P A R F S G S G S G T D	70
TTC ACT CTC ACC ACT AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA	252
F T L T I S S L E P E D F A	84
GTT TAT TAC TGT CAG CAT GGC CAC TCT TAT CCT TGG ACC TTC	294
V Y Y C Q H G H S Y P W T F	98
GGA GGG GGG ACC AAG GTG GAA ATT AAA	321
G G G T K V E I K	107

5. Fab ekspresija ir gryninimas

Kai kurie Fab buvo įklonuoti į ekspresijos vektorių kontroliuojant arabinozės reguliuojamam BAD promotoriui. Be to, šešių histidinių tag buvo prijungtas prie H grandinės karboksi-galo, kad būtų galima gryninti naudojant nikelio chelatus sudarančias dervas. Išgryninto Fab kiekis buvo nustatytas kaip aprašyta (Watkins (1997), *supra*).

6. Charakterizavimo bandymai

Immulon II mikrotitro plokštelės buvo padengtos 0,1 µg/ml CD40-Ig PBS, laikant 16 val. 4 °C temperatūroje ir blokuotos 3 % BSA PBS. Šios plokštelės buvo perplautos tris kartus PBS, turinčiu 0,1 % Tween 20, o iš perioplazminės erdvės išsilaisvinęs Fab buvo praskiestas serijiniu būdu tris kartus PBS, turinčiu 1 % BSA, ir inkubuotas plokštelėje 2 val. 25 °C temperatūroje. Po to plokštelė buvo plaunama keturis kartus PBS, turinčiu 0,1

% Tween 20, ir antkūno prisijungimas buvo nustatytas inkubuojant su ožkos anti-žmogaus kapa-šarminės fosfatazės konjugatu, praskiestu 2000 kartų PBS, turinčiu 1 % BSA ir laikoma 1 val. 25 °C temperatūroje. Plokštelė buvo plaunama keturis kartus PBS, turinčiu 0,1 % Tween 20, ir išryškinta kalorimetriškai (Watkins (1997), *supra*).

Norint nustatyti šių variantų ligando surišimo inhibavimą, Immulon II mikrotitro plokštelės buvo padengtos 2 µg/ml anti-pelės CD8 sgp39 surišti sulietam baltymui, kuris ekspresuoja CD8 sritį. Plokštelės buvo perplautos vieną kartą PBS, turinčiu 0,05 % Tween 20, ir blokuotos 3 % BSA tirpalu PBS. Plokštelė buvo vieną kartą perplauta PBS, turinčiu 0,05 % Tween 20, ir inkubuota su ląstelių auginimo terpe, prisotinta sgp39, 2 val. 25 °C temperatūroje. Nesurištas sgp39 buvo nusiurbtas, o plokštelė perplauta du kartus PBS, turinčiu 0,05 % Tween 20. Po to buvo pridėta 25 µl išgrynintų Fab variantų, praskiestų serijiniu būdu 3 kartus PBS, o po to 25 µl 4 µg/ml koncentracijos CD40-žmogaus Ig tirpalo PBS. Plokštelės buvo inkubuotos 2 val. 25 °C temperatūroje ir plautos tris kartus PBS, turinčiu 0,05 % Tween 20. Surištas CD40-Ig buvo nustatytas po 1 val. inkubavimo 25 °C temperatūroje su ožkos F(ab')₂ anti-žmogaus IgG Fcγ-spezifiniu krienų peroksidazės konjugatu (Jackson), praskiestu 10000 kartų PBS. Plokštelė buvo perplauta keturis kartus PBS, turinčiu 0,05 % Tween 20, ir sujungimo kiekis nustatytas kolorimetriškai, inkubuojant su 1 mg/ml o-fenilendiamino dihidrochlorido ir 0,003 % vandenilio peroksidu 50 mM citrinos rūgštyje, 100 mM Na₂HPO₄, pH 5. Reakcija buvo stabdoma pridedant H₂SO₄ iki 0,36 M galutinės koncentracijos ir nustatomas optinis tankis esant 490 nm bangos ilgiui.

7. BIAcore analizė

Sąveikos tarp CD40 ir anti-CD40 variantų kinetinės konstantos buvo nustatytos paviršiaus plazmonų rezonanso būdu (BIAcore). CD40-Ig sulietas baltymas buvo imobilizuotas ant 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]karbodiimido hidrochloridu ir N-hidroksisukcinimidu aktyvuoto sensoriaus dalies CM5, įleidžiant 8 µl 10 µg/ml koncentracijos CD40-Ig 10 mM natrio acetate, pH 4.

CD40-Ig buvo imobilizuotas naudojant nedidelį tankį (~150 RU), kad būtų apsaugoma nuo Fab grįžtamo susirišimo disociacijos fazės metu. Asociacijos greičio konstantoms (k_{on}) gauti buvo nustatyti susirišimo greičiai, esant šešioms skirtingoms Fab koncentracijoms 25-600 nM intervale PBS tirpale, kai srauto greitis buvo 20 μ l/min. Disociacijos greičio konstantos (k_{off}) buvo šešių matavimų vidurkis, gautas analizuojant disociacijos fazę. Sensogramos buvo analizuotos BIAevaluation 3.0 programa. K_d buvo išskaičiuota iš $K_d = k_{off}/k_{on}$. Likęs Fab buvo pašalintas po kiekvieno matavimo, pasinaudojant ilgalaikę disociacija.

Humanizuotų antikūnų F4 ir L3.17 kinetinės analizės rezultatų palyginimas su chimeriniu Fab parodytas toliau duodamoje 1 lentelėje.

1 lentelė

Klono ID#	k_{on}	k_{off}	K_d	Komentariai
chimerinis Fab	8,43E+5	2,65E-3	3,14 nM	pagamintas skaldant chimerinį 2.220 IgG papainu
F4	2,00E+6	4,77E-4	0,24 nM	humanizuotas
L3.17	3,17E+6	3,28E-4	0,10 nM	humanizuotas

8. Humanizavimo rezultatai

Kaip aukščiau minėta, pelės anti-CD40 mAb kintamosios srities karkaso sekos buvo naudotos labiausiai homologiškų žmogaus embrioninių sekų identifikavimui. H grandinės karkaso liekanos buvo 74 % identiškios žmogaus embrioninės linijos VH7 (7-4.1) ir JH4 sekoms, o L grandinė buvo 75 % identiška atitinkamoms žmogaus embrioninės linijos VKIII (L6) ir JK4 sekoms. H ir L grandinių kintamųjų sekų sugretinimas parodytas fig.15. CDR liekanos, apibūdinamos Kabat et al. (Kabat, E.A., et al., (1991) Sequences of proteins of immunological interest (5th Ed), Washington DC: United States Department of Health and Human Services; Kabat, E.A., et al., (1977) *J. Biol. Chem.* 252:6609-6616), yra pabrauktos; jų homologinė analizė nebuvo vykdoma. Karkaso liekanos, kuriose stebimi skirtumai tarp pelės mAb ir žmogaus matricų, buvo analizuojamos atskirai.

Remiantis struktūrine ir sekų analize CDR antikūnai, išskyrus HCDR3, rodo limituotą skaičių pagrindinės grandinės konformacijų, vadinamų kanoninėmis struktūromis (Chothia, C. et al., (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917; Chothia, C., et al., (1989) *Nature* 342:877-883). Be to, buvo identifikuotos tam tikros liekanos, ypačiai svarbios pagrindinės grandinės CDR kilpų konformacijoms (Chothia (1987), *supra*; Chothia (1989), *supra*). Tokiu būdu buvo identifikuotos pelės anti-CD40 kanoninės karkaso liekanos ir buvo nustatyta, kad aminorūgštys visose ypatingos svarbos kanoninėse padėtyse žmogaus matricų H ir L grandinių karkasuose yra identiškos atitinkamoms pelės liekanoms.

Paviršiuje išdėstytos pelės aminorūgštys, paprastai nerandamos žmogaus antikūnuose, matyt, turi įnašą į humanizuoto mAb imunogeniškumą (Padlan, E. A. (1991) *Mol. Immunol.* 28:489-498). Todėl buvo analizuotos karkaso liekanos, kurios yra skirtingos pelės anti-CD40 ir žmogaus matricose, ir remiantis jų sąveika su tirpikliu buvo sprendžiama, ar jos yra paslėptos, ar jos yra ant antikūno paviršiaus (Padlan (1991), *supra*). Nelaukiama, kad į tirpiklį nukreiptos karkaso liekanos nutolusios nuo CDR, turės didelės įtakos į antigeno surišimą ir todėl, išskyrus dvi H grandinės liekanas, visos buvo keičiamos į atitinkamas žmogaus aminorūgštis norint sumažinti potencialų imunogeniškumą. Laikoma, kad nukreiptos į tirpiklį yra H grandinės 28 ir 46 liekanos. Tačiau, kaip nustatė Chothia et al., *supra*, H28 yra HCDR1 srities viduje ir gali sąveikauti su antigenu. Be to, lizinas H46 padėtyje pelės mAb yra šiek tiek neįprastas ir žymiai skiriasi nuo glutamo rūgšties žmogaus matricoje. Todėl pelės ir žmogaus liekanos H28 ir H46 buvo ekspresuotos sudėtinėje bibliotekoje (fig.15, žvaigždutės).

Kitos besiskiriančios karkaso liekanos, kurios, kaip manoma, yra paslėptos antikūno viduje, buvo tiriamos įvertinant: (1) artimumą CDR; (2) galimybę kontaktuoti su priešinga sritimi V_K - V_L riboje; (3) besiskiriančių aminorūgščių giminingumą; ir (4) numatomą svarbą moduliuojant CDR aktyvumą, kaip nustatė Studnicka et al. (Studnicka, G. M., et al. (1994) *Protein Eng.* 7:805-814). Dauguma L grandinės karkaso paslėptų liekanų skirtumų buvo giminingos aminorūgštys padėtyse, kurios laikomos tiesiogiai nesusijusiomis su CDR konformacija. Tačiau L49 yra greta LCDR2, ji gali

kontaktuoti su V_H sritimi, yra negimininga žmogaus liekanai ir gali dalyvauti apsprendžiant LCDR2 konformaciją. Dėl šių priežasčių pelės ir žmogaus aminorūgštys L49 padėtyje buvo ekspresuotos sudėtinio karkaso bibliotekoje (fig.15, žvaigždutės).

Pelės H grandinės sekos ir žmogaus matricos analizė buvo sudėtingesnė. Pelės mAb H9 liekana yra prolinas, o žmogaus matricoje yra negimininga serino liekana. H9 padėtis taip pat gali vaidinti vaidmenį CDR konformacijos moduliavime ir todėl buvo pasirinkta kaip sudėtinės bibliotekos vieta (fig.15, žvaigždutės). Likusios paslėptos karkaso liekanos, kurios yra skirtingos pelės anti-CD40 ir H grandinės matricoje, buvo 38, 39, 48 ir 91 karkaso padėtyse. Pelės anti-CD40 mAb H38 ir H39 atitinkamai yra glutaminas ir glutamo rūgštis, o žmogaus matricoje - argininas ir glutaminas. H38 liekana yra greta HCDR1, glutamino $\rightarrow$ arginino pakeitimas yra neišlaikytas ir glutamino ekspresija šioje vietoje pelės Ab yra šiek tiek neįprasta. Panašiai glutamo rūgštis $\rightarrow$ glutaminas yra neišlaikomas skirtumas paslėptoms aminorūgštims, H39 yra potenciali V_K kontakto liekana, o glutamo rūgštis yra šiek tiek neįprasta pelės mAb. H48 liekana yra labai arti prie HCDR2, o H91 yra laikoma didelės rizikos vieta (Studnicka (1994), *supra*; Harris, L. et al., (1995) *Prot. Sci.* 4:306-310), kuri gali kontaktuoti su V_K sritimi. Taigi buvo ekspresuotos ir pelės, ir žmogaus liekanos H38, 39, 48 ir 91 padėtyse (fig.15, žvaigždutės).

Visumoje karkaso biblioteka susidėjo iš pelės CDR, implantuotų į žmogaus matricas. Be to, viena karkaso liekana L grandinėje ir septynios karkaso liekanos H grandinėje buvo laikomos potencialai svarbiomis mAb aktyvumui išlaikyti. Visos šios vietos buvo charakterizuotos sintezuojant sudėtinę biblioteką, kuri ekspresuoja visas galimas pelės ir žmogaus aminorūgščių, rastų šiose liekanose, kombinacijas. Bendra šios bibliotekos, pavadintos Hu I, įvairovė buvo 2^8 arba 256 variantai (žemiau duodama 2 lentelė).

2 lentelė: Faguose ekspresuotų anti-CD40 antikūnų bibliotekų sąvadas

Biblioteka	Bibliotekos padėtys	Dydis*	Atrinkta**
Hu I	Karkasas	256	$2,4 \times 10^3$
Hu II	karkasas, HCDR3	$1,1 \times 10^5$	$2,0 \times 10^6$
Hu III	karkasas, HCDR3, LCDR3	$3,1 \times 10^7$	$5,5 \times 10^5$

*Skaičius atskirų klonų remiantis DNR seka. Visoms 20 aminorūgščių kiekvienoje CDR padėtyje užkoduoti buvo naudoti 32 kodonai.

**Hu I bibliotekos atrinkimas buvo vykdomas ELISA metodu, naudojant antikūnus, ekspresuotus mažos apimties bakterijų kultūroje (Watkins (1997), *supra*). Hu II ir Hu III bibliotekos buvo paskleistos ant XL-1 Blue/agaro plokštelių, imant 10^5 zonų/100 mm lėkštei, ir buvo vykdoma atranka panaudojant imobilizavimo liftą (Watkins (1998), *supra*).

Hu I biblioteka buvo ekspresuota mažos apimties (<1 ml) bakterijos kultūrose, išlaisvintų iš periplazminės erdvės Fab vienodi kiekiai buvo imobilizuoti ant mikrotitro plokštelės ir antikūnų surišimo geba buvo palyginama tiesiogiai ELISA metodu (Watkins (1997), *supra*). Nors buvo identifikuoti variantai, kurie suriša tikslinį antigeną panašiu arba geresniu už chimerinio Fab afiniškumu, dauguma atrinktų Hu I klonų buvo mažiau aktyvūs nei chimerinis anti-CD40 Fab. Apytikriai 6 % atsitiktinai parinktų Hu I variantų rodė surišimo aktyvumą panašų į chimerinio Fab aktyvumą (duomenys neparodyti). Identifikavimas daugybės Hu I variantų, turinčių panašų į chimerinio CD40 aktyvumą, patvirtina interpretaciją, kad į sudėtinę biblioteką pateko pačios svarbiausios karkaso liekanos.

Aktyvūs klonai toliau buvo charakterizuoti titruojant imobilizuotu antigenu, norint patvirtinti daugelio variantų, turinčių padidintą afiniškumą, identifikavimą. Pavyzdžiui, 19C11 klonas jungiasi su CD40 receptoriais didesniu afiniškumu nei chimerinis Fab, ką rodo titravimo kreivės poslinkis (fig.16, balti skrituliukai palyginus su juodais skrituliukais). Trisdešimt keturių aktyviausių klonų DNR sekų nustatymas leido identifikuoti 24 atskiras karkaso kombinacijas, ir kiekvienoje iš jų buvo 2-6 pelės karkaso liekanos (duomenys neparodyti).

LCDR3 ir HCDR3 kontaktuoja tiesiogiai su antigenu, sąveikauja su kitais CDR ir dažnai žymiai veikia antikūnų afiniškumą ir specifiškumą (Wilson, I.A., et al., (1993) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3:113-118; Padlan, E.A.

(1994) *Mol. Immunol.* 31:169-213). Be to, LCDR3 ir HCDR3 konformacijas dalinai apsprendžia tam tikros karkaso liekanos. Norint identifikuoti aktyviausią antikūną, oligonukleotidams sintezuoti buvo panaudota mutagenezė kodonų pagrindu (Glaser, S.M., et al., (1992) *J. Immunol.* 149:3903-3913), kuri įveda mutacijas kiekvienoje HCDR3 padėtyje (iš karto vieną) ir gaunama visų 20 aminorūgščių ekspresija kiekvienoje CDR liekanoje. Kiekvienas oligonukleotidas koduoja ne daugiau nei vienos aminorūgšties pakeitimą. Karkaso/HCDR3 bibliotekai sukurti oligonukleotidų, koduojančių HCDR3 biblioteką, mišinys buvo sumaišytas su persidengiančiais oligonukleotidais, koduojančiais sudėtinį karkasą, ir kitais CDR. Šios bibliotekos, pavadintos Hu II, įvairovė buvo $1,1 \times 10^5$ (aukščiau duota 2 lentelė). Biblioteka LCDR3 buvo sintezuota panašiu būdu. Karkaso/HCDR3/LCDR3 bibliotekos, pavadintos Hu III, sukūrimui buvo panaudoti oligonukleotidai, koduojantys LCDR3, HCDR3 ir sudėtinį karkasą. Bibliotekoje, kurios sudėtingumas buvo $3,1 \times 10^7$ (aukščiau duota 2 lentelė), buvo gauta labai daug karkaso/CDR3 kombinacijų.

Derinant mutacijas LCDR3 ir/arba HCDR3 su karkaso biblioteka, humanizuotų anti-CD40 variantų potenciali įvairovė padidėjo nuo 256 iki daugiau nei 10^7 . Norint efektyviau atlikti šių bibliotekų atrinkimą, buvo panaudotas modifikuotas zonų perkėlimo bandymas, vadinamas imobilizavimo liftu (Watkins (1998), *supra*). Trumpai tariant, fagais infekuotos bakterijos buvo paskleistos ant kietų agarų plokštelių ir po to jos buvo padengtos nitroceliulioziniais filtrais, kurie buvo padengti Fab-spezifiniu reagentu. Kai buvo sulaikyta beveik vienodi kiekiai fago ekspresuotų Fab, filtrai buvo veikiami 5 ng/ml CD40-Ig sulieto baltymo. Kadangi filtrai buvo veikiami antigenais, kurio koncentracija buvo daug mažesnė nei Fab K_d , buvo detektuojami tik tie variantai, kurie turėjo padidintą afiniškumą. Atlikus $>10^6$ variantų iš Hu II ir $>10^5$ variantų iš Hu III bibliotekos atrinkimą, naudojant 82 mm filtrus, turinčius $\approx 10^5$ variantų/filtre, buvo identifikuota daug klonų, turinčių didesnius afiniškumus (2 lentelė).

Dėl didelio fagų tankio ant filtrų buvo išrinktos teigiamos zonos, perdengta imant mažesnį tankį ir vėl atliktas atrinkimas. Po to variantai, kurie

davė intensyviausią kolorimetrinį signalą imobilizavimo lifto bandyme buvo toliau charakterizuoti ELISA metodu. Kaip ir buvo galima tikėtis, dauguma imobilizavimo lifto atrinkimo teste identifikuotų klonų prijungė CD40 geriau nei chimerinis Fab. Šių variantų titravimas imobilizuotu CD40-Ig parodė daug klonų, turinčių didesnius nei chimerinio ir humanizuoto Fab afiniškumus (fig.16, palyginkite baltus kvadratus ir juodus trikampius su skrituliukais).

Karkaso/CDR mutacijos, kurios rodė padidintą afiniškumą, buvo identifikuotos DNR sekų nustatymo būdu. Buvo identifikuotos unikalios kintamosios srities sekos 10/13 Hu II variantų ir 3/4 Hu III variantų. Ir Hu II, ir Hu III variantai turėjo 1-5 pelės karkaso liekanas ir 0-2 CDR3 mutacijas, kaip parodyta toliau duodamoje 3 lentelėje.

3 lentelė. Vienalaikė karkaso ir CDR liekanų optimizacija identifikuoja didesnio afiniškumo variantus

Biblioteka	Klonas	Pelės karkaso liekanos*	CDR mutacijos
	chimerinis	(43)	0
Hu I	19C11	(2) H28, 48	0
Hu II	CW43	(3) H9, 28, 91	HCDR3, ¹⁰¹ A→R
	2B12	(5) H9, 28, 38, 46, 48	HCDR3, ¹⁰¹ A→K
Hu III	2B12	(5) H9, 28, 38, 46, 48	HCDR3, ¹⁰¹ A→K
	2B8	(1) H28	HCDR3, ¹⁰¹ A→K
			LCDR3, ⁹⁶ R→Y

*Pelės karkaso liekanų, kurios skiriasi nuo labiausiai homologiškos žmogaus embrioninės sekos, skaičius, remiantis Kabat et al., *supra*, CDR žymėjimu. Pelės karkaso liekanų, besiskiriančių nuo žmogaus matricos, skaičius yra nurodytas skliausteliuose. Visi karkaso skirtumai tarp pelės mAb ir humanizuotų versijų yra H grandinės nurodytose padėtyse, naudojant Kabat et al. numeravimo sistemą.

Bakterijose ekspresuotų chimerinių Fab ir parinktų variantų iš kiekvienos bibliotekos afiniškumai buvo kruopščiau charakterizuoti naudojant paviršiaus plazmonų rezonanso matavimus, norint nustatyti išgrynintų Fab asociacijos ir disociacijos su imobilizuotu CD40-Ig greičius. Chimerinis anti-CD40 turėjo disociacijos konstantą $K_d = 3,14$ nM, o pagal atrinkimo rezultatus dauguma variantų turėjo didesnius afiniškumus. Du iš geriausių klonų – F4 ir L3.17 – turėjo K_d atitinkamai 0,24 nM ir 0,10 nM (1 lentelė). Pagerinti anti-

CD40 variantų afiniškumai daugiausia buvo dėl lėtesnės disociacijos, nes visų variantų asociacijos greičiai buvo labai panašūs (jų reikšmės yra $0,9-3,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ribose).

Pagaliau padidintą afiniškumą rodantys variantai buvo tyrinėjami, norint įvertinti jų sugebėjimą blokuoti gp39 ligando susirišimą su CD40 receptoriais. Visi šie variantai inhibavo tirpaus CD40-Ig sulieto baltymo susirišimą su imobilizuotu gp39 antigeno nuo dozės priklausančiu būdu, kuris koreliavo su Fab afiniškumu (fig.17). Pavyzdžiui, veiksmingiausias ligando susirišimo su CD40-Ig sulietu baltymu inhibitorius buvo 2B8 variantas, kuris taip pat buvo didžiausio afiniškumo CD40 variantas (fig.17). 2B8 variantas rodė ≈ 17 kartų didesnę afiniškumą CD40 nei chimerinis Fab ir ≈ 7 kartus efektyviau inhibavo ligando prisijungimą.

5 pavyzdys

Pelės modelio sistema

Pareiškėjai taip pat sukūrė ir išbandė *in vivo* žiurkės anti-pelės CD40 mAb, pavadintą 7E1-G2b, ir jo predecesorių – 7E1-G1. Šis antikūnas buvo generuotas norint ištirti anti-CD40 terapijos galimybes autoimuninių, uždegiminių ir transplantavimo ligų pelės modeliuose. Pirminis pelės modelio sistemos tikslas buvo generuoti anti-pelės atitikmenį, kuris imituotų 2.220 pilną ir potencialią gp39/CD40 sąveikos blokadą, pasižymėdamas silpnu kostimuliaciniu aktyvumu, ir išbandyti *in vivo* standartiniuose eksperimentiniuose ligų modeliuose.

A. Anti-pelės CD monokloninių antikūnų 7E1-G1 ir 7E1-G2b išskyrimas ir charakterizavimas

1. Imunizavimas, suliejimas ir charakterizavimas

Aštuonių savaikių amžiaus Lewis žiurkių patelėms imunizuoti, įskiepijant per letenėles, buvo naudojamas rekombinantinis pelės CD40 imunoglobulino sulietas baltymas, susidedantis iš ekstraląstelinės pelės CD40 srities, sulietos su šarnyru – pelės Ig2a antikūno CH2 ir CH3 sritimis

(mCD40-mIg). Praėjus trimis dienoms po paskutinės imunizacijos, leukocitai iš drenuojamų limfmazgių buvo sulieti su X63-Ag8.653 pelės mielomos ląstelėmis, sukuriant žiurkės x pelės heterohibridomas. Buvo identifikuotos duobutės, turinčios antikūną, specifinį natyviame pelės CD40, nustatant reaktingumą su originaliu mCD40-mIg imunogenu ELISA metodu ir reaktingumą su CD40 teigiamos pelės B ląstelių limfomos ląstelių linija (WEHI-231, ATCC CLR-1702). Po to buvo tiriami nuopilai, nustatant jų sugebėjimą inhibuoti mCD40-mIg susijungimą su tirpiu rekombinantiniu mCD8-pelės gp39 sulietu baltymu (m gp39) – s gp39 pelės ekvivalentu. Maždaug 12 iš labiausiai veiksmingų inhibitoriaus šeimininko duobučių buvo klonuota panaudojant limituojančio skiedimo metodą.

Po klonavimo buvo atlikti funkciniai bandymai su kultūrų nuopilais ir buvo išgryninti antikūnai, norint tiksliau įvertinti anti-CD40 mAb sugebėjimą inhibuoti pelės gp39 sąveiką su CD40 ir nustatyti jų, kaip stimuliatorių, savybes. Inhibicinės savybės buvo matuojamos pagal jų sugebėjimą inhibuoti m gp39 susirišimą su WEHI-231, naudojant žinomas standartines metodikas. Stimuliatorinės savybės buvo matuojamos pagal WEHI-231 ląstelių tamprios homotipinės adhezijos indukciją ir blužnies B ląstelių proliferaciją esant šio antikūno ir anti-IgM, naudojant žinomas metodikas. Iš šių rezultatų buvo nustatyti trys mAb (5A3, 7E1-G1 ir 8E1), panašiausi į anti-žmogaus CD40 mAb 2.220 gp39/CD40 blokados ir kostimuliacinio aktyvumo lygio atžvilgiu.

2. 7E1, kaip pagrindinio anti-pelės CD40 mAb, pasirinkimas

In vivo tyrimai bandyme su pelėmis buvo skirti nustatyti, kuris iš blokuojančių/nestimuliacinių anti-CD40 mAb labiausiai slopina specifinius antikūno atsakus į T priklausantį antigeną. Buvo tirtas IgG antikūninio atsako į SRBC slopinimas pelėse anti-pelės CD40 mAb. Grupės po 5 BALB/c pelės buvo imunizuojamos iv 1×10^8 SRBC ir tuo pačiu metu paveiktos ip būdu 1 mg anti-pelės CD40 mAb 5A3, 7E1-G1 arba 8E1. Kaip kontrolės, grupės panašiai imunizuotų pelių buvo veikiamos MR1 (žiurkės anti-pelės gp39, teigiama kontrolė, 250 µg), 6E9 (žiurkės anti-žmogaus gp39, neigiama kontrolė, 1 mg) arba PBS. Pelėms buvo nustatyti IgG anti-SRBC titrai ELISA

metodu 7-a, 14-a, 21-a ir 35-a dieną. Rezultatai parodė, kad įvedant antikūną kaip vienkartinę dozę tuo pačiu metu kaip ir antigeno iššaukimas SRBC, mAb 7E1-G1 yra efektyvesnis IgG anti-SRBC atsako slopintojas lyginant su mAb 5A3 arba 8E1, ir todėl jis pasirinktas kaip pagrindinis anti-CD40 mAb pelių tyrimuose.

3. mAb 7E1-G1 izotipo perkeitimo variantas

7E1-G1 neturi efektorinės funkcijos charakteristikų artimų chimerinio 2.220 anti-žmogaus CD40 mAb (t.y. žiurkės IgG1 nėra toks veiksmingas kaip žmogaus IgG1 komplementiniam fiksavimui ir Fc receptoriaus sąveikai), ir 7E1 specifinio antikūno slopinimo vaizdas *in vivo* nėra toks pilnas kaip 2.220 mAb primatuose. Taigi buvo ieškoma antikūno, turinčio 7E1 specifiškumą, bet daugiau su žiurkės izotipu, savo efektorinėmis galimybėmis panašaus į žmogaus IgG1. Šiam tikslui buvo generuotas 7E1 natūralus izotipo perkeitimo variantas (iš IgG1 į IgG2b), panaudojant subselekcijos metodiką (Hale et al., *J. Immunol. Methods* (1987) 103(1):59-67). Trumpai tariant, IgG2b izotipo anti-CD40 mAb buvo identifikuotas ELISA metodu tarp 96 plokštelių nuopilų, kurios buvo užsėtos pradine 7E1 hibridoma, imant 1000 ląstelių/duobutei. Paskesni padengimo ir IgG2b teigiamų duobučių identifikavimo ciklai, imant užsėjimo tankius 200, po to 20 ląstelių/duobutei, po to einantys du klonavimo limituojančio skiedimo būdu ciklai leido išskirti 7E1 kloninį IgG2b perkeitimo variantą – 7E1-G2b.

7E1-G2b yra leistinas IgG1 perkeitimo variantas, ką rodo trys duomenų serijos. Pirma, sunkiosios grandinės N-galo sekos nustatymas parodė, kad abi versijos turi vienodas 35 aminorūgščių liekanas. Antra, PCR analizė, naudojant specifinius 7E1-G1 kintamosios sunkiosios grandinės CDR pradmenis, davė atitinkamo dydžio juostą nuo kDNR, gautos arba iš 7E1-G1, arba 7E1-G2b, o ne dviejų kitų negiminingų antikūnų. Pagaliau, išgrynintų šių dviejų versijų partijų susijungimo su imobilizuotu mCD40-hlg aktyvumas ELISA teste, naudojant anti-kapa žymėtą reagentą, davė iš esmės vienodas titravimo kreives.

B. Tyrimai *in vivo*

1. 7E1-G1 palyginimas su 7E1-G2b *in vivo* antikūno atsako modelyje

Buvo palygintas 7E1-G1 ir 7E1-G2b efektyvumas *in vivo*, naudojant SRBC kaip T ląstelėms priklausantį antigeną. Grupės iš 3-5 gyvuliukų buvo imunizuojamos iv SRBC ir tuo pačiu metu veikiamos ip 7E1-G1 arba 7E1-G2b antikūnu, imant 1, 0,25 arba 0,1 mg junginio 0-ą dieną, kaip parodyta fig.10. Anti-pelės gp39 mAb MR1 tarnavo teigiama imunosupresinio poveikio kontrole. Mab 6E9 ir PBS tarnavo kaip atitinkamai ryšio neturinčio mAb ir mAb nenaudojimo kontrolės. ELISA metodu 7-ą, 14-ą ir 21-ą dieną buvo nustatomi pelių anti-SRBC titrai. Titras atitinka apskaičiuotą serumo praskiedimą, kuris duoda OD reikšmę = 0,3 ELISA teste. Kaip parodyta fig.10, 7E1-G2b slopino IgG atsaką į SRBC esant tokioms dozėms, kurios 7E1-G1 atveju neslopino.

2. 7E-G2b dozės atsakas T-priklausančio antigeno pelės modelyje

7E1-G2b buvo tirtas T ląstelėms priklausančiame pirminio imuninio atsako modelyje, antigenu naudojant SRBC. Buvo tirtos įvairios 7E1-G2b dozės norint nustatyti mažiausią efektyvią dozę. BALB/c pelėms buvo suleista iv 1×10^8 SRBC ir joms padaryta viena injekcija 7E1-G2b, imant nurodytą dozę, arba suleista MR1 (anti-pelės gp39) arba PBS tuo pačiu metu kaip ir antigenas 0-ą dieną. Fig.11 parodyta IgG anti-SRBC atsakas 7-ą, 16-ą ir 28-ą dieną. Parodytos reikšmės yra ELISA optinio tankio reikšmės esant serumo praskiedimui 1/50. Paklaidų atžymos rodo standartinį nukrypimą.

Kaip parodyta fig.11, vienkartinis poveikis 7E1-G2b imant 25 μ g/pelei (1,25 mg/kg) slopino IgG imuninį atsaką 87 % 16-ą dieną, o visiškas nuslopinimas buvo gautas 50 arba 100 μ g dozėmis 16-ą dieną. 28-ą dieną 50 μ g/pelei dozė nuslopino IgG atsaką 89 %, o 100 μ g/pelei dozė nuslopino

visiškai. Atkreipkite dėmesį, kad MR1 buvo naudotas kaip teigiama imunosupresijos kontrolė imant suboptimalią 100 µg/pelei dozę.

3. 7E1-G2b prevenciniame kolageno sukeltos artrito (CIA) pelės modelyje

Norint nustatyti 7E1-G2b poveikį artrito prevencijai, buvo naudotas standartinis eksperimentinis pelės reumatinio artrito modelis – kolageno sukeltas artrito modelis (CIA). DBA/1J pelių patinėliams (6-8 savaičių amžiaus) 0-ą dieną į odą buvo suleista 200 µg II tipo viščiukų kolageno (CII) pilname Froindo adjuvante. Gydytas 7E1-G2b, imant 250 µg dozę, buvo atliekamas ip būdu kas 4 dienas pradedant nuo 7-os dienos. Kontrolinė grupė buvo veikama PBS pagal tą patį dozavimo grafiką. Visos pelės buvo veikiamos CII nepilname Froindo adjuvante 21-ą dieną. Pelės buvo apžiūrimos kasdien, nustatant letenėlių patinimą ir subjektyviai nustatomi balai 0-3 balų skalėje, 3 balais vertinant maksimalų patinimą ir eritemą. Letenėlės taip pat buvo matuojamos išormačiu. Pateikti klinikiniai balai buvo išvesti susumavus kiekvienos letenėlės balus pelių sunaikinimo metu ir padalinant iš bendro gyvuliukų skaičiaus kiekvienoje grupėje. Paskelbtos reikšmės yra vidutinis grupių intervalas.

Artrito atsiradimą, taigi ir pelių sąnario uždegimą visiškai inhibavo gydymas 7E1-G2b, kaip parodyta toliau duodamoje 4 lentelėje. 7E1-G2b gydytos pelės visiškai nesirgo per 90 dienų.

4 lentelė. Kolageno sukeltos artrito gydymas

Tx grupė	Artrito apimtis	Vidurkis (intervalas) pradžioje	Vidurkis (intervalas)) klinikiniai balai	Vidurkis (intervalas) letenėlės matmenys
7E1-G1	0/5	0	0	0,075
7E1-G2b	0/5	0	0	0,075
PBS kontrolė	4/4	30 (27-32)	3,5 (3-4)	0,114(0,110-0,117)

Kaip parodyta aukščiau, šio išradimo antikūnai yra veiksmingi imunomodulatoriai, kurie gali būti naudojami įvairių ligų gydymui.

Šis išradimas apima aukščiau aprašytus chimerinį ir humanizuotą antikūnus, turinčius papildomus konservatyviųjų aminorūgščių pakeitimus, kurie iš esmės neturi poveikio į CD40 surišimą. Konservatyvieji pakeitimai paprastai yra vienos aminorūgšties pakeitimas kita aminorūgštimi, turinčia panašias charakteristikas, pvz., pakeitimai šiose grupėse: valinas, glicinas; glicinas, alaninas; valinas, izoleucinas, leucinas; asparto rūgštis, glutamo rūgštis; asparaginas, glutaminas; serinas, treoninas; lizinas, argininas; ir fenilalaninas, tirozinas.

Vienu aspektu šis išradimas yra skirtas aukščiau aprašytų chimerinio ir/arba humanizuoto antikūnų sukūrimui, ekspresuojant rekombinantinės DNR segmentais, koduojančiais pelės lengvąją kintamąją grandinę ir sunkiąją kintamąją grandinę (arba jos dalis), prijungtais prie DNR segmentų, koduojančių žmogaus pastoviasias sritis. Pavyzdinės DNR sekos, sukonstruotos pagal šį išradimą, koduoja polipeptidines grandines, turinčias savyje visą lengvosios grandinės kintamąją sritį arba jos dalį, kaip parodyta SEQ ID NO:1 arba jos deponuotame ATCC klone, ir/arba visą sunkiosios grandinės kintamąją sritį arba jos dalį, kaip parodyta SEQ ID NO:2 arba jos deponuotame ATCC klone.

Šiame išradime taip pat yra apimamos parodytos sunkiosios ir lengvosios grandinės kintamosios sritys ir veiklios arba funkcinės jų dalys. Imunologiškai kompetentinė arba funkcinė baltymo forma arba jos dalis taip pat čia vadinama "lengvosios/sunkiosios grandinės kintamoji sritis arba biologiškai aktyvi jos dalis". Šiuo atveju biologiškai aktyvi jos dalis apima minėtos lengvosios arba sunkiosios grandinės dalį, kuri, kai ji įterpiama į antikūną, dar leidžia antikūnui susirišti su žmogaus CD40.

Šiame išradime ypatingai apimamos nukleorūgščių sekos, koduojančios šio išradimo antikūno kintamąją sunkiąją grandinę ir kintamąją lengvąją grandinę. Pavyzdžiui, fig.13 nukleotidai 1057-1422 (SEQ ID NO:5) duoda tinkamiausią nukleorūgšties seką, koduojančią šio išradimo antikūno kintamąją sunkiąją grandinę; fig.14 nukleotidai 1065-1388 (SEQ ID NO:6) duoda tinkamiausią nukleorūgšties seką, koduojančią šio išradimo antikūno kintamąją lengvąją grandinę. SEQ ID NO:7 ir SEQ ID NO:11 parodytos tinkamiausios nukleorūgščių sekos, koduojančios šio išradimo humanizuotų

antikūnų kintamąsias lengvasias grandines; SEQ ID NO:9 parodyta tinkamiausia nukleorūgšties seka, koduojanti šio išradimo humanizuoto antikūno kintamąją sunkiąją grandinę. Plazmidės, turinčios savyje SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 ir SEQ ID NO:11 parodytus nukleotidus, buvo deponuotos su ATCC.

Chimeriniai ir/arba humanizuoti antikūnai, kurie susiriša su žmogaus CD40, ir kurie yra iš esmės homologiniai, arba kurie turi iš esmės identišką seką, čia parodytoms kintamosios lengvosios ir sunkiosios grandinės sekoms, taip pat patenka į šį išradimą. Pavyzdžiui, chimeriniai antikūnai, turintys lengvosios grandinės sritį, kuri rodo bent apie 85 % sekos identiškumą, geriau bent apie 90 % sekos identiškumą, dar geriau bent apie 95 % sekos identiškumą ir visų geriausia bent apie 98 % sekos identiškumą su lengvosios grandinės sritimi, kaip parodyta SEQ ID NO:4, patenka į šio išradimo sferą. Konkrečiau, chimeriniai antikūnai, turintys kintamąją lengvosios grandinės sritį, kuri rodo bent apie 85 % sekos identiškumą, geriau bent apie 90 % sekos identiškumą, dar geriau bent apie 95 % sekos identiškumą ir visų geriausia bent apie 98 % sekos identiškumą su kintamąja lengvosios grandinės sritimi, kaip parodyta SEQ ID NO:1, taip pat patenka į šio išradimo sferą. Taip pat į šio išradimo sferą patenka humanizuoti antikūnai, turintys lengvosios grandinės sritį, kuri rodo bent apie 85 % sekos identiškumą, geriau bent apie 90 % sekos identiškumą, dar geriau bent apie 95 % sekos identiškumą ir visų geriausia bent apie 98 % sekos identiškumą su lengvosios grandinės sritimi, kaip parodyta SEQ ID NO:8 ir/arba SEQ ID NO:12.

Be to, chimeriniai antikūnai, turintys sunkiosios grandinės sritį, kuri rodo bent apie 85 % sekos identiškumą, geriau bent apie 90 % sekos identiškumą, dar geriau bent apie 95 % sekos identiškumą ir visų geriausia bent apie 98 % sekos identiškumą su sunkiosios grandinės sritimi, kaip parodyta SEQ ID NO:3, patenka į šio išradimo sferą. Konkrečiau, chimeriniai antikūnai, turintys kintamąją sunkiosios grandinės sritį, kuri rodo bent apie 85 % sekos identiškumą, geriau bent apie 90 % sekos identiškumą, dar geriau bent apie 95 % sekos identiškumą ir visų geriausia bent apie 98 % sekos identiškumą su kintamąja sunkiosios grandinės sritimi, kaip parodyta SEQ ID

NO:2, taip pat patenka į šio išradimo sferą. Taip pat į šio išradimo sferą patenka humanizuoti antikūnai, turintys kintamąją sunkiosios grandinės sritį, kuri rodo bent apie 85 % sekos identiškumą, geriau bent apie 90 % sekos identiškumą, dar geriau bent apie 95 % sekos identiškumą ir visų geriausia bent apie 98 % sekos identiškumą su kintamąja sunkiosios grandinės sritimi, kaip parodyta SEQ ID NO:10, taip pat patenka į šį išradimą.

Paprastai DNR segmentai turi dar ir ekspresijos kontrolės DNR seką, per operoną prijungtą prie chimerinio arba humanizuoto antikūno kodavimo sekų, ir natūraliai asocijuotas arba heterologines promotoriaus sritis. Pageidautina, kad ekspresijos kontrolės sritys būtų eukariotinio promotoriaus sistemos, galinčios transformuoti arba transfekuoti eukariotinių šeimininkų ląsteles, bet taip pat gali būti naudojamos ir prokariotinių šeimininkų kontrolinės sekos. Kai į atitinkamą šeimininką įvedamas vektorius, šeimininkas yra laikomas dideliu nukleotidinės sekos ekspresijos lygiui gauti tinkamose sąlygose ir, jeigu pageidaujama, po to kintamosios lengvosios grandinės, sunkiosios grandinės, lengvosios/sunkiosios grandinės dimerai arba nepalietas antikūnas, surišimo fragmentai arba kitos imunoglobulino formos gali būti surenkamos ir išgryninamos. (Žr. Beychok, S., "Cells of Immunoglobulin Synthesis", Academic Press, N.Y. (1979)). Taip pat gali būti pagaminami vienos grandinės antikūnai, sujungiant nukleorūgščių sekas, koduojančias čia parodytas VL ir VH sritis, su DNR, koduojančia polipeptidinę jungę.

Šio išradimo antikūnui ekspresuoti gali būti naudojami prokariotiniai šeimininkai, tokie kaip E. coli, ir kiti mikrobai, tokie kaip mielės. Apart mikroorganizmų, šio išradimo antikūnams ekspresuoti ir gaminti taip pat gali būti naudojamos žinduolių audinių ląstelių kultūros. Tinkamesnės yra eukariotinės ląstelės, kadangi šioje srityje sukurta daug tinkamų šeimininkų ląstelių linijų, galinčių išskirti nepalietus imunoglobulinus; tokiais yra CHO ląstelių linijos, įvairios COS ląstelių linijos, HeLa ląstelės, mielomos ląstelių linijos ir hibridomos. Ekspresijos vektoriais šioms ląstelėms gali būti ekspresijos kontrolinės sekos, tokios kaip promotorius ir enhanceris, ir būtinos procesingo informacijos vietos, tokios kaip ribosominės surišimo

vietos, RNR sujungimo vietos, poliadenilinio vietos ir transkripcijos baigmės sekos, kurios yra žinomos specialistams.

Vektoriai, turintys dominančius DNR segmentus (pvz. sunkiąją ir/arba lengvąją grandinę koduojančias sekas ir ekspresijos kontrolės sekas), gali būti perkelti į šeimininko ląstelę gerai žinomais būdais, kurie kinta priklausomai nuo ląstelės šeimininko tipo. Pavyzdžiui, prokariotinėms ląstelėms paprastai yra naudojama kalcio chlorido transfekcija, o kitiems ląstelių šeimininkams gali būti naudojamas apdorojimas kalcio fosfatu arba elektroporacija. (Žr., pvz., Maniatis, et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Press (1982)).

Po ekspresijos pilni antikūnai, jų dimerai, atskiros lengvosios ir sunkiosios grandinės arba kitos šio išradimo imunoglobulinų formos gali būti gryninamos pagal standartines šioje srityje naudojamas metodikas, įskaitant nusodinimą amonio sulfatu, afininės kolonėlės, kolonėlių chromatografiją, gelio elektroforezę ir panašias. Farmaciniams tikslams pageidautini iš esmės gryni imunoglobulinai, bent 90-95 % homogeniškumo, geriau 98-99 % arba didesnio homogeniškumo.

Šio išradimo antikūnai paprastai turėtų rasti pritaikymą gydant sutrikimus, kuriuose tarpininkauja antikūnas ir/arba T ląstelės. Tipiškos ligos būklės, kurios gali būti taip gydomos, yra implantanto prieš šeimininką liga ir persodinto organo atmetimas, bei autoimuninės ligos, kaip antai I tipo diabetas, psoriazė, išsėtinė sklerozė, reumatinis artritas, sisteminė eriteminė vilkligė ir sunkioji miestemija.

Šio išradimo antikūnai ir farmacinės kompozicijos yra ypatingai tinkamos parenteriniam vartojimui, t.y. suleidžiant po oda, į raumenis arba į veną. Farmacinės kompozicijos parenteriniam vartojimui paprastai bus antikūno, ištirpinto tinkamame nešiklyje, geriausia vandeniniame nešiklyje, tirpalas. Gali būti naudojami įvairiausi gerai specialistams žinomi vandeniniai nešikliai, pvz., vanduo, vandeninis buferis, druskos tirpalas, glicinas ir panašūs. Šie tirpalai yra sterilūs ir paprastai neturi smulkių dalelių. Šios farmacinės kompozicijos gali būti sterilizuojamos panaudojant įprastas gerai žinomas sterilizavimo metodikas. Kompozicijose gali būti farmaciškai priimtinių pagalbinių medžiagų, kurių reikia priartėjimui prie fiziologinių sąlygų,

tokių kaip pH sureguliuavimo ir buferio agentų, toksiškumą sureguliuojančių agentų ir pan., pavyzdžiui, natrio acetato, natrio chlorido, kalio chlorido, kalcio chlorido, natrio laktato, žmogaus albumino ir t.t.

Kompozicijos, į kurias įeina šio išradimo antikūnai, gali būti vartojamos profilaktiniam ir/arba terapiniam gydymui. Taikant terapijoje, kompozicijos yra skiriamos jau ligos varginamam pacientui, duodant kiekį, kurio pakanka ligos ir jos komplikacijų išgydymui ar bent daliniam sustabdymui. Kiekis, kuris atitinka šių funkcijų atlikimą, yra vadinamas "terapiškai efektyvia doze". Šiam panaudojimui efektyvūs kiekiai priklauso nuo ligos būsenos laipsnio ir paties paciento imuninės sistemos bendrosios būklės, ir jį gali nustatyti patyręs specialistas.

Taikant profilaktikoje, šio išradimo antikūnus turinčios kompozicijos yra skiriamos dar nesančiam ligos būklėje pacientui, norint sustiprinti paciento pasipriešinimą ligai (imuninio atsako slopinimui). Toks kiekis yra vadinamas "profilaktiškai efektyvia doze". Šiam panaudojimui tikslūs kiekiai taip pat priklauso nuo paciento sveikatos stovio ir bendro imuniškumo lygio. Tinkamiausias profilaktinis panaudojimas yra panaudojimas transplanto atmetimo prevencijai, pvz. persodinto inksto atmetimo prevencijai.

Nors šis išradimas yra aprašytas remiantis iliustracijomis ir pavyzdžiais, skirtais didesniam aiškumui ir supratimui, turėtų būti suprantama, kad toliau duodamos apibrėžties ribose yra galimi įvairūs jo pakeitimai ir modifikacijos.

SEKŲ SĄRAŠAS

<110> Aruffo, Alejandro A.
 Siadak, Anthony W.
 Berry, Karen K.
 Harris, Linda
 Thorne, Barbara A.
 Bajorath, Jurgen
 Huse, William D.
 Wu, Herren
 Watkins, Jeffri D.

<120> ANTIKŪNAI PRIEŠ ŽMOGAUS CD40

<130> DB2a SEKA

<140> 09/247,352

<141> 1999-02-10

<150> 09/026,291

<151> 1998-02-19

<160> 14

<170> Patentin Ver. 2.0

<210> 1

<211> 108

<212> PRT

<213> žmogaus ir pelės

<400> 1

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Tyr

20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Lys Tyr Ala Ser His Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Gln His Gly His Ser Phe Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 2

<211> 122

<212> PRT

<213> žmogaus ir pelės

<400> 2

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

Thr Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Thr Thr
 20 25 30

Gly Met Gln Trp Val Gln Glu Met Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Ile
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Val Glu Asp Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr
 65 75 75 80

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

Val Arg Ser Gly Asn Gly Asn Tyr Asp Leu Ala Tyr Phe Ala Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 3

<211> 451

<212> PRT

<213> žmogaus ir pelės

<400> 3

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

Thr Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Thr Thr
 20 25 30

Gly Met Gln Trp Val Gln Glu Met Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Ile
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Val Glu Asp Phe
 50 55 60

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

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

Val Arg Ser Gly Asn Gly Asn Tyr Asp Leu Ala Tyr Phe Ala Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

275

280

285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445

Pro Gly Lys
 450

<210> 4

<211> 214

<212> PRT

<213> žmogaus ir pelės

<400> 4

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

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

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

Lys Tyr Ala Ser His Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Gln His Gly His Ser Phe Pro Trp
 85 90 95

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala-Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 5

<211> 8614

<212> DNR

<213> žmogaus ir pelės

<400> 5

gacggatcgg	gagatctgct	aggtgacctg	aggcgcgcc	gcttcgaata	gccagagtaa	60
			g			
cctttttt	taattttatt	ttattttatt	tttgagatgg	agtttgccgc	cgatctcccg	120
atcccctatg	gtcgactctc	agtacaatct	gctctgatgc	cgcatagtta	agccagtatc	180
tgctccctgc	ttgtgtgttg	gaggtcgctg	agtagtgccg	gagcaaaatt	taagctacaa	240

caaggcaagg	cttgaccgac	aattgcatga	agaatctgct	tagggtagg	cgttttgcg	300
tgcttcgga	tgtacgggc	agatatacgc	gttgacattg	attattgact	agttattaat	360
agtaataaat	tacggggica	ttagttcata	gcccataat	ggagttccgc	gttacataac	420
ttacggtaaa	tggccgcct	ggctgaccgc	ccaacgaccc	ccgcccattg	acgtcaataa	480
tgacgtatgt	tcccatagta	acgccaatag	ggactttcca	ttgacgtcaa	tgggtggact	540
atttacggta	aactgcccac	tggcagtag	atcaagtgt	tcataigcca	agtagcggcc	600
ctattgacgt	caatgacggt	aaatggcccc	cctggcatta	tgccagtag	atgacattat	660
gggactttcc	tacttggcag	tacatctacg	tattagtcac	cgctattacc	atggtagtgc	720
ggttttggca	gtacatcaat	gggctgtggt	agcggtttga	ctacggggga	tttccaagtc	780
tccaccccat	tgacgtcaat	gggagtttgt	tttggacca	aaatcaacgg	gactttccaa	840
aatgtcgtaa	caactccgcc	ccattgacgc	aaatggcgcg	taggcgtgta	cgggtggagg	900
tctatataag	cagagctctc	tggctaacta	gagaaccca	tgcttactgg	cttatcgaaa	960
			c			
ttaatacgac	tcactatagg	gagacccaa	cttggtagca	tggactggac	ctggagaatc	1020
		g				
ctcttcttgg	tggcagcagc	aacagggtgcc	cactccaga	tccagttggt	gcaatctgga	1080
cctgagctga	agaagcctgg	agagacagtc	aggatctcct	gcaaggcttc	tgggtatgcc	1140
ttcacaacta	ctggaatgca	gtgggtgcaa	gagatgccag	gaaagggttt	gaagtggatt	1200
ggctggataa	acacccactc	tggagtgcga	aaatagttag	aagacttcaa	gggacgggtt	1260
gccttctctt	tggaaacctc	tgccaacact	gcatatttac	agataagcaa	cctcaaaaat	1320
gaggacacgg	ctacgtattt	ctgtgtgaga	tccgggaatg	gtaactatga	cctggcctac	1380
ttgtcttact	ggggccaag	gacactggtc	actgtctctg	cagctagcac	caagggccca	1440
	g					
tcggtcttcc	ccctggcacc	ctctccaag	agcacctctg	ggggcacagc	ggccctgggc	1500
tgcttggtca	aggactactt	ccccgaacgg	gtgacgggtg	cgtaggaactc	aggcgccctg	1560
accagcggcg	tgacacactt	cccggctgtc	ctacagtcct	caggactcta	ctccctcagc	1620
agcgtggtga	ccgtgccctc	cagcagcttg	ggcaccag	cctacatctg	caacgtgaat	1680
			a			
cacaagccca	gcaacacca	ggtggacaag	aaagtgggtg	agaggccagc	acagggagg	1740
	a				g	
aggggtgtctg	ctggaagcca	ggctcagcgc	tctgcctgg	acgcatcccg	gctatgcagc	1800
cccagtcag	ggcagcaag	caggccccgt	ctgcctcttc	accggagggc	ctctgcccgc	1860
	g					
cccactcatg	ctcagggaga	gggtcttctg	gcttttccc	caggctctgg	gcaggcaca	1920
					g	
gctagggtgcc	cctaaccag	gccctgcaca	caaagggggc	ggtgctgggc	tcagacctgc	1980
			a			
caagagccat	atccgggagg	accctgcccc	tgacctaagc	ccaccccaaa	ggccaaactc	2040
tccactccct	cagctcggac	accttctctc	ctcccagatt	ccagtaactc	ccaatcttct	2100
ctctgcagag	cccaaatctt	gtgacaaaac	tcacacatgc	ccaccgtgcc	caggtaagcc	2160
agccagggcc	tcgcccctca	gctcaaggcg	ggacagggtg	cctagagtag	cctgcatcca	2220
gggacaggcc	ccagccgggt	gctgacacgt	ccacctccat	ctcttctca	gcacctgaac	2280
tcttgggggg	accgtcagtc	ttcttcttcc	ccccaaaacc	caaggacacc	ctcatgatct	2340
cccggacccc	tgaggtcaca	tgctgtgtgg	tggacgtgag	ccacgaagac	cctgaggtca	2400
agttcaactg	gtacgtggac	ggcgtggagg	tgcataatgc	caagacaaag	ccgctgggag	2460
					g	
agcagtacaa	cagcacgtac	cgtgtgtgtca	gcgtctctac	cgtcctgcac	caggactggc	2520
tgaatggcaa	ggagtacaag	tgcaagggtct	ccaacaaag	cctcccagcc	cccatcgaga	2580
			c			
aaaccatctc	caaagccaa	ggtgggaccc	gtgggggtgcg	agggccacat	ggacagagg	2640
	a				c	
cggctcggcc	caccctctgc	cctgagagtg	accgctgtac	caacctctgt	ccctacaggg	2700
cagccccgag	aaccacaggt	gtacacccctg	ccccatccc	gggatgagct	gaccaagaa	2760
					c	
caggtcagcc	tgacctgcct	ggtcaaaggc	ttctatccca	gcgacatcgc	cgtggagtg	2820
gagagcaatg	ggcagccgg	gaacaactac	aagaccacg	ctcccgtgct	ggactccgac	2880
	a		c			
ggctccttct	tcctctacag	caagctcacc	gtggacaaga	gcagggtggca	gcaggggaa	2940
					c	
gtcttctcat	gctccgtgat	gcatgaggct	ctgcacaacc	actacacgca	gaagagcctc	3000

tccctgtctc	cgggtaaattg	agtgcgacgg	cgggcaagcc	cccgtcccc	gggtctctgc	3060
ggctgcacga	ggatgcttgg	cacgtacccc	ctgtacatac	ttcccggggc	cccagcatgg	3120
aaataaagca	cccagcgctg	ccctggggcc	ctgcgagact	gtgatggttc	ttccacggg	3180
tcaggccgag	tctgaggcct	gagtggcatg	agggaggca	agcgggtccc	actgtcccca	3240
			g			
cactggccca	ggctgtgcag	gtgtgcctgg	gccccctagg	gtggggctca	gccaggggct	3300
gccccctggca	gggtggggga	tttgccagcg	tggccctccc	tccagcagca	cctgccttgg	3360
gctggggccac	gggaagccct	aggagcccct	ggggacaga	acacagcccc	tgcctctgta	3420
			c			
ggagactgtc	ctgttctgtg	agcggcccctg	tcttcccgc	ctccatgccc	actcgggggc	3480
atgcctagtc	catgtgcgta	gggacaggc	ctccctcacc	catctacccc	cacggcacta	3540
		c				
acccctggct	gccccgccca	gcctcgcacc	cgcatgggga	cacaaccgca	tccggggaca	3600
tgactctcg	ggccctgttg	agggactggt	gcagatgccc	acacacacac	tcagcccaga	3660
cccgttcaac	aaaccccgca	ctgaggttgg	cggccacac	ggccaccaca	cacacacgtg	3720
cacgcctcac	acacggagc	tcaccggggc	gaactgcaca	gcacccagac	cagagcaag	3780
	c				g	
tctcgcaca	cgtgaacact	cctcggacac	aggcccccac	gagccccacg	cggcacctca	3840
aggcccaacga	gcctctcggc	agcttctcca	catgtcgacc	tgctcagaca	aaccagccc	3900
tcctctcaca	aggggtgccc	tgacgcccgc	acacacacac	aggggatcac	acaccacgtc	3960
acgtccctgg	ccctggccca	cttcccagtg	cggcccttcc	ctgcaggacg	gatcagcctc	4020
gactgtgcct	tctagtggcc	agccatctgt	tggttgcccc	tccccctg	cttcttgac	4080
cctggaaggt	gccactccca	ctgtcctttc	ctaataaaat	gaggaaattg	catcgcattg	4140
tctgagtagg	tgtcattcta	ttctgggggg	tggggtgggg	caggacagca	agggggagg	4200
					a	
ttgggaagac	aatagcaggc	atgctgggga	tgcggtgggc	tctatggctt	ctgaggcgga	4260
aagaaccagc	tggggctcta	gggggtatcc	ccacgcgccc	tgtagcgggc	cattaagcgc	4320
ggcgggtgtg	gtggttacgc	gcagcgtgac	cgctacactt	gccagcgccc	tagcggccgc	4380
tcctttcgct	ttctccctt	cctttctgc	cacgttcgcc	gggcctctca	aaaaaggga	4440
					a	
aaaaagcatg	catctcaatt	agttagcaac	catagtccc	cccctaactc	cgcccatccc	4500
gccctaact	ccgcccagtt	ccgcccattc	tccgcccatt	ggctgactaa	tttttttat	4560
ttatgcagag	gccgaggcc	cctcggcctc	tgagctattc	cagaagtagt	gaggaggctt	4620
	g					
tttggaggc	ctaggctttt	gcaaaaagct	tggacagctc	agggctgcga	tttcgcgcca	4680
aacttgacgg	caatcctagc	gtgaaggctg	gtaggatttt	atccccgctg	ccatcatggt	4740
tcgaccattg	aactgcacg	tcgccgtgtc	ccaaaatatg	gggattggca	agaacggag	4800
					a	
cctaccctgg	ccctcgtca	ggaacgagtt	caagtacttc	caaagaatga	ccacaacctc	4860
ttcagtggaa	ggtaaacaga	atctggtgat	tatgggtagg	aaaacctggt	tctccattcc	4920
tgagaagaat	cgacctttaa	aggacagaat	taatatagtt	ctcagtagag	aactcaaaga	4980
accaccacga	ggagctcatt	ttcttgccaa	aagtttgat	gatgccttaa	gacttattga	5040
acaaccggaa	ttggcaagta	aagtagacat	ggtttgata	gtcggaggca	gttctgttta	5100
ccaggaagcc	atgaatcaac	caggccacct	tagactcttt	gtgacaagga	tcatgcagga	5160
atttgaaagt	gacacgtttt	tcccagaaat	tgatttgggg	aaatataaac	ttctcccaga	5220
ataccacaggc	gtcctctctg	aggtccagga	ggaaaaagg	atcaagtata	agtttgaagt	5280
			c			
ctacgagaag	aaagactaac	aggaagatgc	tttcaagttc	tctgctcccc	tcctaaagct	5340
atgcattttt	ataagaccat	gggacttttg	ctggcttttag	atctctttgt	gaagggaacct	5400
tacttctgtg	gtgtgacata	attggacaaa	ctacctacag	agatttaaag	ctctaaggta	5460
aatataaaat	ttttaagtgt	ataatgtgtt	aaactactga	ttctaattgt	ttgtgtattt	5520
tagattccaa	cctatggaac	tgatgaatgg	gagcagtggt	ggaatgcctt	taatgaggaa	5580
aacctgtttt	gtcagaaga	aatgccatct	agtgtatgat	aggctactgc	tgactctcaa	5640
cattctactc	ctccaaaaaa	gaagagaaa	gtagaagacc	ccaaggactt	tccttcagaa	5700
		g				
ttgctaagtt	ttttgagtca	tgctgtgttt	agtaatagaa	ctcttgcttg	ctttgctatt	5760
tacaccacaa	aggaaaaag	tgactgtcta	tacaagaaaa	ttatggaaaa	atatctgta	5820
	c					
accttataa	gtaggcataa	cagttataat	cataacatac	tgtttttct	tactccacac	5880
aggcatagag	tgtctgctat	taataactat	gtcaaaaaat	tgtgtacctt	tagcttttta	5940

attttaaag	gggttaataa	ggaatatttg	atgtatagtg	ccttgactag	agatcataat	6000
cagccataacc	acattttag	aggttttact	tgctttaa	aacctccac	acctccccct	6060
gaacctgaaa	cataaaatga	atgcaattgt	tggtgtaac	ttgttattg	cagctataa	6120
tggttacaaa	taaagcaata	gcatcacaaa	ttcacaaat	aaagcatttt	tttactgca	6180
ttctagtgt	ggttgtcca	aactcatcaa	tgtatcttat	catgtctgga	tgggtggat	6240
gatcctccag	cgcggggac	tcatgtcga	gttctcgcc	cacccaact	tgttattgc	6300
agcttataat	ggttacaaat	aaagcaatag	catcacaaat	ttcacaaata	aagcattttt	6360
ttcactgcat	tctagtgtg	gtttgtccaa	actcatcaat	gtatcttct	atgtctgtat	6420
accgtcgacc	tctagctaga	gcttggcgta	atcatggtca	tagctgttc	ctgtgtgaa	6480
ttgttatccg	ctcacattc	cacacaacat	acgagccgg	agcataaagt	gtaaagcctg	6540
		a	aattgcgttg	cgctcactgc	ccgctttcca	6600
gggtgcctaa	tgagttagct	aactcacatt	atgaatcggc	caacgcgcgg	ggagaggcg	6660
gtcgggaaac	ctgtcgtgcc	agctgcatta		g		
			gctcactgac	tgcgtgcgt	cggtcgttcg	6720
tttgcgtatt	gggcgcctt	ccgcttcctc	ggcggttaata	cggttatcca	cagaatcagg	6780
gctgcggcga	gcggtatcag	ctcactcaaa	aggccagca	aaggccagga	accgtaaaaa	6840
ggataacgca	ggaaagaac	tgtgagcaaa	a			
	a		ccgccccct	gacgagcatc	acaaaaatcg	6900
ggcgcggttg	ctggcggttt	tccataggct	aggactataa	agataccagg	cgtttcccc	6960
acgctcaagt	cagaggtggc	gaaacccga				
		c	gacctgcgg	cttaccggat	acctgtccgc	7020
tggaagctcc	ctcgtgcgct	ctcctgttcc	tcaatgctca	cgctgtaggt	atctcagttc	7080
ctttctccct	tccgggaagcg	tggcgctttc	tgtgcacgaa	cccccgcttc	agcccgaccg	7140
ggtgtaggctc	gttcgctcca	agctgggctg	gtccaaccg	gtaagacacg	acttatcgcc	7200
ctgcgcctta	tccggttaact	atcgtcttga	cagagcgag	tatgtaggcg	gtgtacaga	7260
actggcagca	gccactggta	acaggattag	g			
			cactagaagg	acagtatttg	gtatctgcgc	7320
gttcttgaag	tggtggccta	actacggcta	agttgtagc	tctgatccg	gcaaacaaa	7380
tctgctgaag	ccagttacct	tccgaaaaag			c	
			caagcagca	attacgcgca	gaaaaaaag	7440
caccgcgtgt	agcgggtggt	ttttgtttg	g		g	
			ggggtctgac	gctcagtga	acgaaaactc	7500
atctcaagaa	gatccttga	tctttctac	aaaaaggatc	ttcacctaga	tccttttaa	7560
acgttaagg	attttgtca	tgagattatc	tatatatgag	taaaactggt	ctgacagtta	7620
ttaaaaatga	agttttaaat	caatctaaag	agcgtatctg	ctatttcgtt	catccatagt	7680
ccaatgctta	atcagttagg	cacctatctc	gatacgggag	ggcttaccat	ctggccccag	7740
tgccgtgactc	cccgctgtgt	agataactac	accggctcca	gatttatcag	caataaacca	7800
tgctgcaatg	ataccgcgag	acccacgctc	tctgcaact	ttatccgcct	ccatccagtc	7860
gccagccgga	agggccgag	gcagaagtgg				
	c		gttaatagtt	tgcgcaacgt		7920
tattaattgt	tgccgggaag	ctagagtaag	tttggtatgg	cttcattcag		7980
tggtgccatt	gctacaggca	tctgtgtgtc	atgtgtgca	aaaaagcgg		8040
ctccggttcc	caacgatcaa	ggcgagttac	gcccagtggt	tatcactcat		8100
tagtctcttc	ggctctccga	tctgtgtcag	tgtcatgcca	gctttctgt		8160
ggttatggca	gcactgcata	attctcttac	agaatagttg	cgagttgctc		8220
gactgggtgag	tactcaacca	agtcattctg	gccacatagc	aagtgtctcat		8280
ttgccggcg	tcaatacggg	ataataccgc	ctcaaggatc	tgagatccag		8340
cattggaaaa	cggttctcgg	ggcgaaaact	atcttcagca	tcaccagcgt		8400
ttcgatgtaa	cccactcgtg	cacccaactg	tgccgcaaaa	ggcgacac		8460
ttctgggtga	gcaaaaaaca	gaaggcaaaa		g		
	g	a	tcaatattat	tgaagcattt	atcagggtta	8520
gaaatgttga	atactcatat	tcttcctttt	tatttagaaa	aataa-caaa	taggggttcc	8580
ttgtctcatg	agcggatata	tatttgaatg	cgtc			8614
gcgcacattt	cccggaaaa	tgccacctga				
	g					

<210> 6

<211> 8858

<212> DNR

<213> žmogaus ir pelės

<400> 6

gacgatcg	gagatctgt	agcccgggtg	acctgaggcg	cgccggcttc	gaatagccag	60
agtaacctt	tttttaatt	ttattttatt	ttatttttga	gatggagttt	ggcgccgatc	120
tccccgatccc	ctatggtcga	ctctcagtac	aatctgctct	gatgccgcat	agttaagcca	180
gtatctgtc	cctgctgtg	tgttgagggt	cgcgagtag	tgcgcgagca	aaatttaagc	240
tacaacaagg	caaggcttga	ccgacaattg	catgaagaat	ctgcttaggg	ttaggcggtt	300
tgcgtgctt	cgcgatgtac	gggccagata	tacgcgttga	cattgattat	tgactagtta	360
ttaatagtaa	tcaattacgg	ggtcattagt	tcatagccca	tatatggagt	tccgcgttac	420
ataacttacg	gtaaatggcc	cgcttggtg	accgccaac	gaccccgcc	cattgacgtc	480
aataatgacg	taigtccca	tagtaacgcc	aatagggact	ttccattgac	gtcaatgggt	540
ggactattga	cggtaaactg	cccacttggc	agtacatcaa	gtgtatcata	tgccaagtac	600
gccccctatt	gacgtcaatg	acggtaaatg	gcccgcctgg	cattatgccc	agtacatgac	660
cttatgggac	tttctactt	ggcagtacat	ctacgtatta	gtcatcgcta	ttaccatggt	720
gatgcgggtt	tggcagtaca	tcaatgggag	tggatagcgg	tttgactcac	ggggatttcc	780
aagctccac	cccattgacg	tcaatgggag	tttgttttg	caccaaatac	aacgggactt	840
tcaaaatgt	cgtaacaact	ccgccccatt	gacgcaaagt	ggcgtagggc	gtgtacgggtg	900
ggaggtctat	ataagcagag	ctctctggct	aactagagaa	cccactgctt	actggcttat	960
cgaaattaat	acgactcact	atagggagac	ccaagcttgg	taccatggaa	gccccagctc	1020
agcttctctt	cctctgcta	ctctggctcc	cagataccac	cggagacatt	gttctgactc	1080
agtctccagc	caccctgtct	gtgactccag	gagatagagt	ctctcttcc	tgcagggccca	1140
gccagagtat	tagcgactac	ttacactggt	atcaacaaaa	atcacatgag	tctccaaggc	1200
ttctcatcaa	atatgcttcc	cattccatct	ctgggatccc	ctccagggtt	agtggcagtg	1260
gatcagggtc	agatttcaat	ctcagtatca	acagtgtgga	acctgaagat	gttggaaatt	1320
attactgtca	acatggtcac	agctttccgt	ggacgttcgg	tggaggcacc	aagctggaaa	1380
tcaacgtaa	gtctcgagtc	ttagataaac	cgttcaatcg	gtcaatcgat	tggaaattcta	1440
aactctgagg	gggtcggatg	acgttgccat	tctttgccta	aagcattgag	tttactgcaa	1500
ggtcagaaaa	gcatgcaaa	ccctcagaat	ggctgcaaa	agctccaaca	aaacaattta	1560
gaactttatt	aaggaaatag	gggaagctag	gaagaaactc	aaaacatcaa	gattttaaat	1620
acgtctcttg	gtctccttgc	tataattatc	tgggataagc	atgtctgttt	ctgtctgtcc	1680
ctaactgccc	cttatccgca	aacaacaca	ccaagggca	aactttgtta	cttaaacacc	1740
		c	g			
atcctgtttg	cttcttctt	caggaactgt	ggctgcacca	tctgtcttca	tcttcccgcc	1800
atctgatgag	cagttgaaat	ctggaactgc	ctcgttgtg	tgctgtctga	ataacttcta	1860
tcccagagag	gccaaagtac	agtggaaagt	ggataacgcc	ctccaatcgg	gtaactccca	1920
ggagagtgtc	acagagcag	acagcaagg	cagcacctac	agcctcagca	gcaccctgac	1980
	g	a				
gctgagcaaa	gcagactacg	agaaacaca	agtctacgcc	tgcaagatca	cccatcaggg	2040
		a				
cctgagctcg	cccgtcacaa	agagcttcaa	cagggggaga	tgttagaggg	agaagtgtccc	2100
		g				
ccacctgtc	ctcagttcca	gcctgacccc	ctccccctt	ttggcctctg	accctttttc	2160
cacaggggac	ctacccctat	tgcggtcctc	cagctcatct	ttcacctcac	ccccctctc	2220
ctccttggt	ttaattatgc	taatgttga	ggagaatgaa	taaataaagt	gaatcttgc	2280
acctgtggtt	tctctctt	ctcattta	aattattatc	tgttgtttta	ccaactactc	2340
aatttctctt	ataagggact	aaatatgtag	tcacctaag	gcacgtaacc	atttataaaa	2400
atcatccttc	attctatttt	accctatcat	cctctgcaag	acagtcctcc	ctcaaacccta	2460
caagccttct	gtcctcacag	tcccctgggc	catggtagga	gagacttgct	tccttgtttt	2520
cccctcctca	gcaagccctc	atagtccttt	ttaaggggtga	caggctttac	agtcatatat	2580
ccttgattc	aattccctga	gaatcaacca	aagcaaat	ttcaaaaagaa	gaaacctgtc	2640
ataaagagaa	tcatctatg	caacatgata	taaaataaca	acacaataaa	agcaattaaa	2700
taaacaacaa	atagggaat	gtttaagttc	atcatggtac	ttagacttaa	tggaaatgca	2760
tgcttattt	acatttttaa	acagggtactg	agggactcct	gtctgccaag	ggccgtattg	2820
agtactttcc	acaacctaat	ttaatccaca	ctatactgtg	agattaaaaa	cattcattaa	2880
aatgttgcaa	aggttctata	aagctgagag	acaaatatat	tctataactc	agcaatccca	2940
cttctagatg	actgagtgtc	cccaccacc	aaaaaactat	gcaagaatgt	tcaaagcagc	3000
tttatttaca	aaagccaaa	attggaaata	gcccgtattg	ccaacaatag	aatgagttat	3060
	a					

taaactgtgg	tatgtttata	cattagaata	cccaatgagg	agaattaaca	agctacaact	3120
atacctactc	acacagatga	atctcataaa	aataatgtta	cataagagaa	actcaatgca	3180
aaagatatgt	tctgtatgtt	ttcatccata	taaagttcaa	aaccaggtaa	aaataaagtt	3240
agaaatttgg	atggaaatta	ctcttagctg	ggggtgggcg	agttagtgcc	tgggagaaga	3300
caagaagggg	cttctggggt	cttgtaatg	ttctgttctt	cgtgtggggt	tgtgcagtta	3360
tgatctgtgc	actgttctgt	atacacatta	tgcttcaaaa	taacttcaca	taaagaacat	3420
cttataccca	gttaatagat	agaagagga	taagtaatag	gtcaagacca	acgcagctgg	3480
		a				
taagtggggg	cctgggatca	aatagctacc	tgccaatcc	tgccwcttg	agccctgaat	3540
gagtctgcct	tccagggctc	aagggtctca	acaaaacaa	aggcctgcta	tttctctggc	3600
			c			
atctgtgccc	tggttggcta	gctaggagca	cacatacata	gaaattaat	gaaacagac	3660
					c	
ttcagcaagg	ggacagagg	cagaattaac	cttggccaga	cactggaaac	ccatgtatga	3720
	a					
acactcacat	gtttgggaag	ggggaaggg	acatgtaaat	gaggactctt	cctcattcta	3780
		c				
tggggcactc	tggccctgcc	cctctcagct	actcatccat	ccaacacacc	tttctaagta	3840
cctctctctg	cctacactct	gaaggggttc	aggagtaact	aacacagcat	ccctccctc	3900
aaatgactga	caatcccttt	gtcctgtctt	gttttcttt	ccagtcagta	ctgggaaagt	3960
ggggaaggac	agtcattggag	aaactacata	aggaagcac	ttgccctct	gcctcttgag	4020
			c			
aatgttgatg	agtatcaaat	ctttcaaact	ttggagggtt	gagtaggggt	gagactcagt	4080
aatgtccctt	ccaatgacat	gaacttgctc	actcatccct	gggggccaac	ttgaacaatc	4140
aaaggcaggc	ataatccagt	tatgaattct	tgccggcgct	tgctagcttc	acgtgttggg	4200
tccaaccgcg	gaagggccct	attctatagt	gtcacctaaa	tgctagagct	cgctgatcag	4260
cctcgactgt	gccttctagt	tgccagccat	ctgttgtttg	ccccctcccc	gtgccttctt	4320
tgaccttgga	aggtgccact	cccactgtcc	tttctaata	aaatgaggaa	atfgcatcgc	4380
attgtctgag	taggtgtcat	tctattctgg	gggggtgggt	ggggcaggac	agcaagggg	4440
					g	
aggattggga	agacaatagc	aggcatgctg	gggatgcggt	gggctctatg	gcttctgagg	4500
cggaagaagc	cagctggggc	tctaggggtt	atccccacgc	gccctgtagc	ggcgcatcaa	4560
gcgcggcggg	tgtgtgtgtt	acgcgcagc	tgaccgtac	acttgccagc	gccctagcgc	4620
		g				
ccgctccttt	cgctttcttc	ccttcctttc	tcgccacgtt	cgccgggcct	ctcaaaaaag	4680
ggaaaaaaag	catgcacttc	aattagtcag	caaccatagt	cccggcccta	actccgcca	4740
tcccggccct	aactccgccc	agttccgccc	attctccgcc	ccatggctga	ctaattttt	4800
ttatttatgc	agaggccga	gcgcctcgg	cctctgagct	attccagaag	tagtgaggag	4860
	g					
gcttttttgg	aggcctaggc	ttttcaaaa	agcttggaac	gctcagggct	gcgatttcgc	4920
gccaacttgg	acggcaatcc	tagcgtgaag	gctggttaga	ttttatcccc	gctgccatca	4980
tgggtcgacc	attgaactgc	atcgtcgccg	tgtcccaaaa	tatggggatt	ggcaagaac	5040
					g	
gagacctacc	ctggcctccg	ctcaggaacg	agttcaagta	cttccaaaga	atgaccacaa	5100
cctcttcagt	ggaaggtaaa	cagaatctgg	tgattatggg	taggaaaacc	tggttctcca	5160
ttcttgagaa	gaatcgacct	ttaaaggaca	gaattaatat	agttctcagt	agagaactca	5220
aagaaccacc	acgaggagct	cattttcttg	ccaaaagttt	ggatgatgcc	ttaagactta	5280
ttgaacaacc	ggaattggca	agtaaagtag	acatggtttg	gatagtcgga	ggcagttctg	5340
ttaccagga	agccatgaat	caaccaggcc	accttagact	cttgtgaca	aggatcatgc	5400
aggaatttga	aagtgcacgc	ttttcccag	aaattgattt	ggggaaatat	aaacttctcc	5460
cagaataccc	aggcgtcctc	tctgaggtcc	aggaggaaa	aggcatcaag	tataagtttg	5520
			a			
aagtctacga	gaagaaaga	taacaggaag	atgctttcaa	gttctctgct	ccccctctaa	5580
	c					
agctatgcat	ttttataaga	ccatgggact	tttctggct	ttagatctct	ttgtgaagga	5640
accttacttc	tgtgtgttga	cataattgga	caaactacct	acagagattt	aaagctctaa	5700
ggtaaatata	aaatttttaa	gtgtataatg	tgttaaacta	ctgattctaa	ttgttttgt	5760
attttagatt	ccaacctatg	gaactgatga	atgggagcag	tgttggaatg	cctttaatga	5820
ggaaaacctg	ttttgtcag	aagaaatgcc	atctagtatg	gatgaggcta	ctgctgactc	5880
tcaacattct	actcctccaa	aaaagaaga	aaaggtagaa	gacccaagg	actttccttc	5940

agaattgcta	agtttttga	g	gtcatgctgt	gtttagtaat	agaactcttg	cttgctttgc	6000
tatttacacc	acaaaggaa	a	aagctgcact	gctatacaag	aaaattatgg	aaaaatattc	6060
tgtaaccttt	ataagtaggc	ataacagtta	taatcataac	atactgtttt	ttctactcc		6120
acacaggcat	agagtgtctg	ctattaataa	ctatgctcaa	aaattgtgta	ccttagctt		6180
tttaatttgt	aaaggggtta	ataaggaata	ttgatgtat	agtgccttga	ctagagatca		6240
taatcagcca	taccacattt	gtagagggtt	tactgtctt	aaaaaacctc	ccacacctcc		6300
ccctgaacct	gaaacataaa	atgaatgcaa	ttgtgttgt	taactgttt	attgcagctt		6360
ataatggta	caaataaagc	aatagcatca	caaatttcac	aaataaagca	ttttttcac		6420
tgcatctag	ttgtgtttg	tccaaactca	tcaatgtatc	ttatcatgtc	tggatcggct		6480
ggatgatcct	ccagcgcgg	gatctcatgc	tggagtctt	cgcccacccc	aactgtttta		6540
ttgcagctta	g						
tttttact	taatggttac	aaataaagca	atagcatcac	aaatttcaca	aataaagcat		6600
gtataccgtc	gcattctagt	tgtgtttgt	ccaaactcat	caatgtatct	tatcatgtct		6660
gaaattgtta	gacctctagc	tagagcttgg	cgtaatcatg	gtcatagctg	tttctgtgt		6720
cctgggggtgc	tccgtctaca	attccacaca	acatacgagc	cggaagcata	aagtgtaaag		6780
tccagtcggg	ctaagtgtg	agctaactca	cattaattgc	gttgcgctca	ctgcccgctt		6840
	aaacctgtcg	tgccagctgc	attaatgaat	cggccaacgc	gcgggggaga		6900
					g		
gcgggttgcg	tattgggcgc	tcttccgctt	cctcgctcac	tgactcgctg	cgctcggtcg		6960
ttcggctgcg	gcgagcggta	tcagctcact	caaaggcggg	aatacggtta	tccacagaat		7020
caggggataa	cgcaggaaa	aacatgtgag	caaaaggcc	gcaaaaggcc	aggaaccgta		7080
	g		a				
aaaaggccgc	gttgcggcg	ttttccata	ggctcggccc	ccctgacgag	catcacaaaa		7140
atcgacgctc	aagtcagagg	tggcgaaacc	cgacaggact	ataaagatac	caggcggttc		7200
cccctggaag	ctccctcgtg	cgctctcctg	ttccgaccct	gccgcttacc	ggatacctgt		7260
cgcctttct	cccttcggga	agcgtggcgc	tttctcaatg	ctcacgctgt	aggtatctca		7320
gttcggtgta	ggtcgttcgc	tccaagctgg	gctgtgtgca	cgaaccccc	gttcagcccg		7380
accgctgcgc	cttatccggt	aactatcgtc	ttgagtccaa	cccggtaaga	cacgacttat		7440
cgccactggc	agcagccact	ggtaacagga	ttagcagagc	gaggatgta	ggcgggtcta		7500
cgaggttctt	gaagtggtg	cctaactacg	gtacactag	aaggacagta	tttggtatct		7560
gcgctctgct	gaagccagtt	acctcggaa	aaagagttgg	tagctcttga	tccggcaaac		7620
aaaccaccgc	tggtagcgg	ggttttttg	tttgaagca	gcagattacg	cgcagaaaa		7680
					a		
aaggatctca	agaagatcct	ttgatctttt	ctacggggtc	tgacgctcag	tggaaacgaaa		7740
actcacgtta	agggattttg	gtcatgagat	tatcaaaaag	gatcttcacc	tagatccttt		7800
taaaataaaa	atgaagtttt	aaatcaatct	aaagtatata	tgagtaaact	tggctgaca		7860
gttaccaatg	cttaaatcagt	gaggcaccta	tctacgcat	ctgtctattt	cgttcatcca		7920
tagttgcctg	actccccgtc	gttagataaa	ctacgatacg	ggaggggctta	ccatctggcc		7980
ccagtgtctg	aatgataccg	cgagaccac	gctcaccggc	tccagattta	tcagcaataa		8040
accagccagc	c	gagcgcaga	gtggtcctgc	aactttatcc	gcctcatcc		8100
	g	a					
agtctattaa	ttgttgccgg	gaagctagag	taagtagttc	gccagttaat	agtttgcgca		8160
acgttgttgc	cattgtctaca	ggcatcgtgg	tgtcacgctc	gtcgtttggt	atggcttcat		8220
tcagctccgg	ttcccaacga	tcaaggcgag	ttacatgac	ccccatgttg	tgcaaaaaag		8280
cggtagctc	cttcggctct	ccgatcgttg	tcagaagtaa	gttggccgca	gtgttatcac		8340
tcattggtat	ggcagcactg	cataattctc	ttactgtcat	gccatccgta	agatgctttt		8400
ctgtgactgg	tgagtactca	accaagtcac	tctgagaata	gtgtatgcgg	cgaccgagtt		8460
gctcttgccc	ggcgtaata	cgggataata	ccgcgccaca	tagcagaact	ttaaaagtgc		8520
tcattcattg	aaaacgttct	tcggggcgaa	aactctcaag	gatcttaccg	ctgttgagat		8580
ccagtttcgat	gttaaccact	cgtgcacca	actgatcttc	agcatctttt	actttcacca		8640
gcgtttctgg	gtgagcaaaa	acaggaagg	aaaatgccgc	aaaaaaggg	ataagggcga		8700
		c		a			
cacggaaatg	ttgaatactc	atactcttcc	ttttcaata	ttattgaagc	atttatcagg		8760
gttattgtct	catgagcgga	tacatatttg	aatgtattta	gaaaaataaa	caaatagggg		8820
ttccgcgcac	atttccccga	aaagtgccac	ctgacgtc				8858

<211> 321

<212> DNR

<213> žmogaus ir pelės

<400> 7

gaaattgtgt	tgacacagtc	tccagccacc	ctgtcttgt	Ctccagggga	aagagccacc	60
ctctcctgca	gggccagtca	gagtattagc	gattacttac	Attggtacca	acagaaacct	120
ggccaggctc	ccaggctcct	catctattac	gcatccact	Ccatctctgg	catcccagcc	180
aggttcagtg	gcagtgggtc	tgggacagac	ttcactctca	Ccatcagcag	cctagagcct	240
gaagattttg	cagtttatta	ctgtcagcat	ggccactctt	Ttcctggac	cttcggcggg	300
gggaccaagg	tggaataaa	a				321

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> žmogaus ir pelės

<400> 8

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Tyr

20	25	30
----	----	----

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35	40	45
----	----	----

Tyr Tyr Ala Ser His Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50	55	60
----	----	----

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65	70	75	80
----	----	----	----

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Gly His Ser Phe Pro Trp

85	90	95
----	----	----

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100	105
-----	-----

<210> 9

<211> 366

<212> DNR

<213> žmogaus ir pelės

<400> 9

caggtgcagc	tgggtgcaatc	tgggtctgag	ttgaagaagc	ctggggcctc	agtgaaggtt	60
tctgcaagg	cttctggata	cgccttact	accactggca	tgcagtgggt	gcgacaggcc	120
cctggacaag	ggcttgagtg	gatgggatgg	atcaacaccc	acagcggggt	cccaaagtat	180
gtcgaggact	tcaaaggacg	gtttgtctc	tccttgga	cctctgtcag	cacggcatat	240
ctgcagatca	gcagcctaaa	ggctgaggac	actgccgtgt	attactgtgc	gagatctggc	300

aatgggaact	atgacctggc	atactttaag	tattggggcc	agggaaccct	ggtcaccgtc	360
tcctca						366

<210> 10

<211> 122

<212> PRT

<213> žmogaus ir pelės

<400> 10

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala

1	5	10	15
---	---	----	----

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Thr Thr

20	25	30
----	----	----

Gly Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35	40	45
----	----	----

Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Val Glu Asp Phe

50	55	60
----	----	----

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr

65	70	75	80
----	----	----	----

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85	90	95
----	----	----

Ala Arg Ser Gly Asn Gly Asn Tyr Asp Leu Ala Tyr Phe Lys Tyr Trp

100	105	110
-----	-----	-----

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115	120
-----	-----

<210> 11

<211> 321

<212> DNR

<213> žmogaus ir pelės

<400> 11

gaaattgtgt	tgacacagtc	tccagccacc	ctgtcttgt	ctccagggga	aagagccacc	60
ctctcctgca	gggccagtc	gagtattagc	gattacttac	attggtacca	acagaaacct	120
ggccaggctc	ccaggctcct	catctattac	gcatccact	ccatctctgg	catcccagcc	180
aggttcagtg	gcagtgggtc	tgggacagac	ttcactctca	ccactagcag	cctagagcct	240
gaagattttg	cagtttatta	ctgtcagcat	ggccactctt	atccttgga	cttcggaggg	300
gggaccaagg	tggaatttaa	a				321

<210> 12

<211> 107

<212> PRT

<213> žmogaus ir pelės

<400> 12

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

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

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

Tyr Tyr Ala Ser His Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Gly His Ser Phe Pro Trp
85 90 95

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

<210> 13

<211> 366

<212> DNR

<213> žmogaus ir pelės

<400> 13

cagatccagt	tggtgcaatc	tggaacctgag	ctgaagaagc	ctggagagac	agtcaggatc	60
tcctgcaagg	cttctgggta	tgccctcaca	actactggaa	tgcaagtgggt	gcaagagatg	120
ccaggaaagg	gtttgaagtg	gattggctgg	ataaacaccc	actctggagt	gccaaaatat	180
gtagaagact	tcaagggacg	gtttgccttc	tctttgaaa	cctctgccaa	cactgcatat	240
ttacagataa	gcaacctcaa	aaatgaggac	acggctacgt	atttctgtgt	gagatccggg	300
aatgtaact	atgacctggc	ctactttgct	tactggggcc	aagggacact	ggtcactgtc	360
tctgca						366

<210> 14

<211> 324

<212> DNR

<213> žmogaus ir pelės

<400> 14

gacattgttc	tgactcagtc	tccagccacc	ctgtctgtga	ctccaggaga	tagagtctct	60
ctttctgca	gggccagcc	gagtattagc	gactacttac	actggtatca	acaaaaatca	120
	a					
catgagtctc	caaggcttct	catcaaata	gcttccatt	ccatctctgg	gatccctcc	180
aggttcagtg	gcagtggatc	agggtcagat	ttcactctca	gtatcaacag	tgtggaacct	240
gaagatgttg	gaatttatta	ctgtcaacat	ggtcacagct	ttccgtggac	gttcggtgga	300
ggcaccaagc	tggaatcaa	acgt				324

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Lengvosios grandinės kintamoji sritis, apimanti visą aminorūgščių seką, parodytą SEQ ID NO:1 (fig.4a), arba biologiškai aktyvią jos dalį.
2. Sunkiosios grandinės kintamoji sritis, apimanti visą aminorūgščių seką, parodytą SEQ ID NO:2 (fig.4b), arba biologiškai aktyvią jos dalį.
3. Chimerinis antikūnas, kuris jungiasi su žmogaus CD40, *b e s i s k i r i a n t i s* tuo, kad jis turi lengvąją grandinę ir sunkiąją grandinę, ir ši lengvoji grandinė turi lengvosios grandinės kintamąją sritį pagal 1 punktą.
4. Chimerinis antikūnas, kuris jungiasi su žmogaus CD40, *b e s i s k i r i a n t i s* tuo, kad jis turi lengvąją grandinę ir sunkiąją grandinę, ir ši sunkioji grandinė turi sunkiosios grandinės kintamąją sritį pagal 2 punktą.
5. Chimerinis antikūnas pagal 3 punktą, *b e s i s k i r i a n t i s* tuo, kad minėta sunkioji grandinė turi sunkiosios grandinės kintamąją sritį pagal 2 punktą.
6. Chimerinis antikūnas, kuris jungiasi su žmogaus CD40, turintis lengvąją grandinę ir sunkiąją grandinę, *b e s i s k i r i a n t i s* tuo, kad minėta lengvoji grandinė turi visą aminorūgščių seką, parodytą SEQ ID NO:4, arba jos biologiškai aktyvią dalį, o minėta sunkioji grandinė turi visą aminorūgščių seką, parodytą SEQ ID NO:3, arba jos biologiškai aktyvią dalį.
7. Nukleorūgšties molekulė, turinti nukleotidų seką, koduojančią lengvosios grandinės kintamąją sritį pagal 1 punktą.
8. Nukleorūgšties molekulė, turinti nukleotidų seką, koduojančią sunkiosios grandinės kintamąją sritį pagal 2 punktą.
9. Ekspresijos vektorius, *b e s i s k i r i a n t i s* tuo, kad jis turi nukleorūgšties seką pagal 7 punktą.
10. Ekspresijos vektorius, *b e s i s k i r i a n t i s* tuo, kad jis turi nukleorūgšties seką pagal 8 punktą.

11. Humanizuotas antikūnas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis turi dalį lengvosios grandinės kintamosios srities pagal 1 punktą.
12. Humanizuotas antikūnas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis turi dalį sunkiosios grandinės kintamosios srities pagal 2 punktą.
13. Farmacinė kompozicija, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad į ją įeina chimerinis antikūnas pagal 5 punktą.
14. Farmacinė kompozicija, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad į ją įeina chimerinis antikūnas pagal 6 punktą.
15. Chimerinis antikūnas, kuris jungiasi su žmogaus CD40, turintis lengvosios grandinės kintamąją sritį ir sunkiosios grandinės kintamąją sritį, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėta lengvosios grandinės kintamoji sritis apima aminorūgščių seką, turinčią bent 90 % sekos identiškumą lengvosios grandinės kintamajai sričiai pagal 1 punktą.
16. Chimerinis antikūnas, kuris jungiasi su žmogaus CD40, turintis lengvosios grandinės kintamąją sritį ir sunkiosios grandinės kintamąją sritį, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėta sunkiosios grandinės kintamoji sritis apima aminorūgščių seką, turinčią bent 90 % sekos identiškumą sunkiosios grandinės kintamajai sričiai pagal 2 punktą.
17. Farmacinė kompozicija pagal 14 punktą, skirta panaudoti paciento, varginamo T ląstelių tarpininkaujamo sutrikimo gydymui.
18. Nuleorūgšties molekulė pagal 7 punktą, turinti nukleotidų seką, parodytą SEQ ID NO:6.
19. Nuleorūgšties molekulė pagal 8 punktą, turinti nukleotidų seką, parodytą SEQ ID NO:5.
20. Chimerinis antikūnas pagal 6 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis turi lengvosios grandinės aminorūgščių seką, parodytą SEQ ID NO:4 ir sunkiosios grandinės aminorūgščių seką, parodytą SEQ ID NO:3.
21. Humanizuotas antikūnas pagal 11 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis turi lengvosios grandinės kintamąją sritį, parodytą SEQ ID NO:8.

22. Humanizuotas antikūnas pagal 11 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis turi sunkiosios grandinės kintamąją sritį, parodytą SEQ ID NO:10.
23. Humanizuotas antikūnas pagal 12 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis turi lengvosios grandinės kintamąją sritį, parodytą SEQ ID NO:8.
24. Humanizuotas antikūnas pagal 12 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis turi sunkiosios grandinės kintamąją sritį, parodytą SEQ ID NO:10.
25. Humanizuotas antikūnas pagal 11 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis turi lengvosios grandinės kintamąją sritį, parodytą SEQ ID NO:8, ir sunkiosios grandinės kintamąją sritį, parodytą SEQ ID NO:10.
26. Humanizuotas antikūnas pagal 11 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis turi lengvosios grandinės kintamąją sritį, parodytą SEQ ID NO:12.
27. Humanizuotas antikūnas pagal 26 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis turi sunkiosios grandinės kintamąją sritį, parodytą SEQ ID NO:10.
28. Humanizuotas antikūnas pagal 11 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis turi lengvosios grandinės kintamąją sritį, parodytą SEQ ID NO:12, ir sunkiosios grandinės kintamąją sritį, parodytą SEQ ID NO:10.
29. Farmacinė kompozicija, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad į ją įeina humanizuotas antikūnas pagal 25 punktą.
30. Farmacinė kompozicija, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad į ją įeina humanizuotas antikūnas pagal 28 punktą.

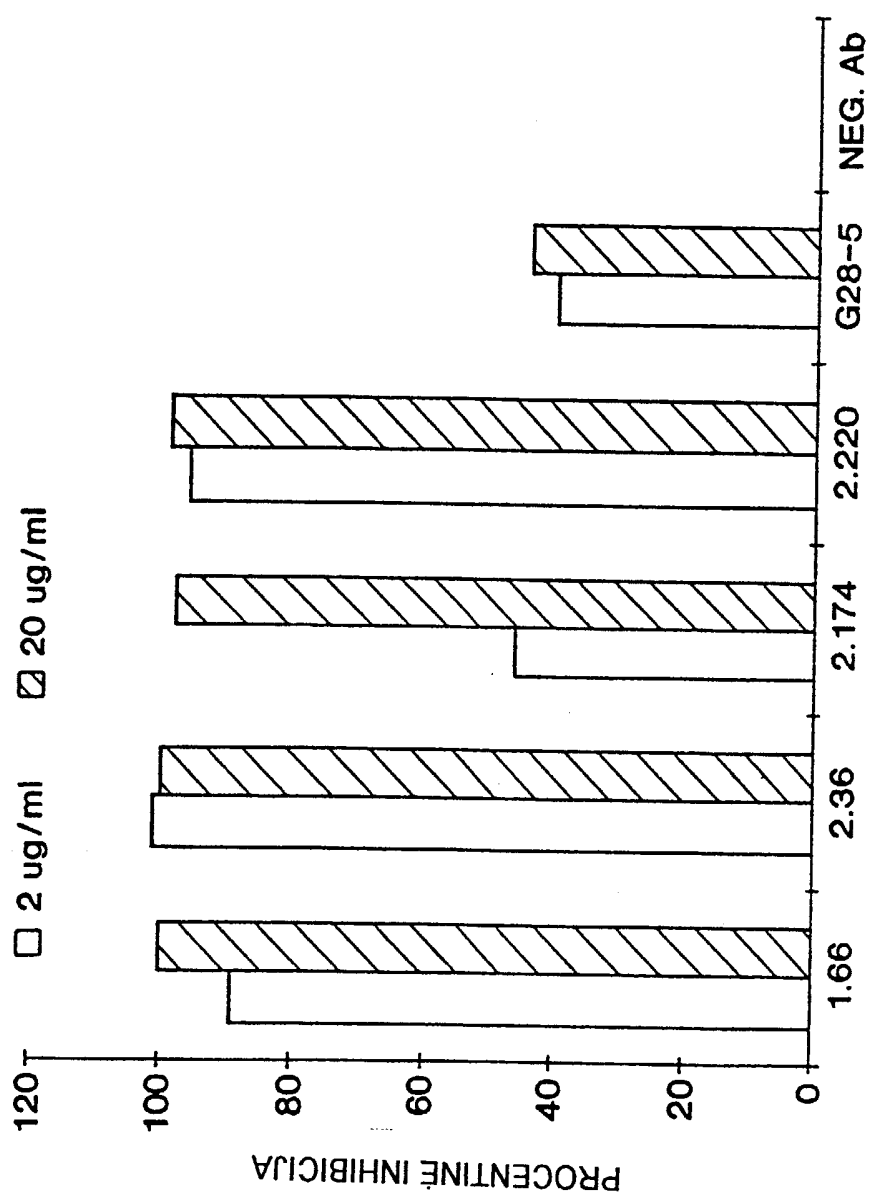


FIG. 1

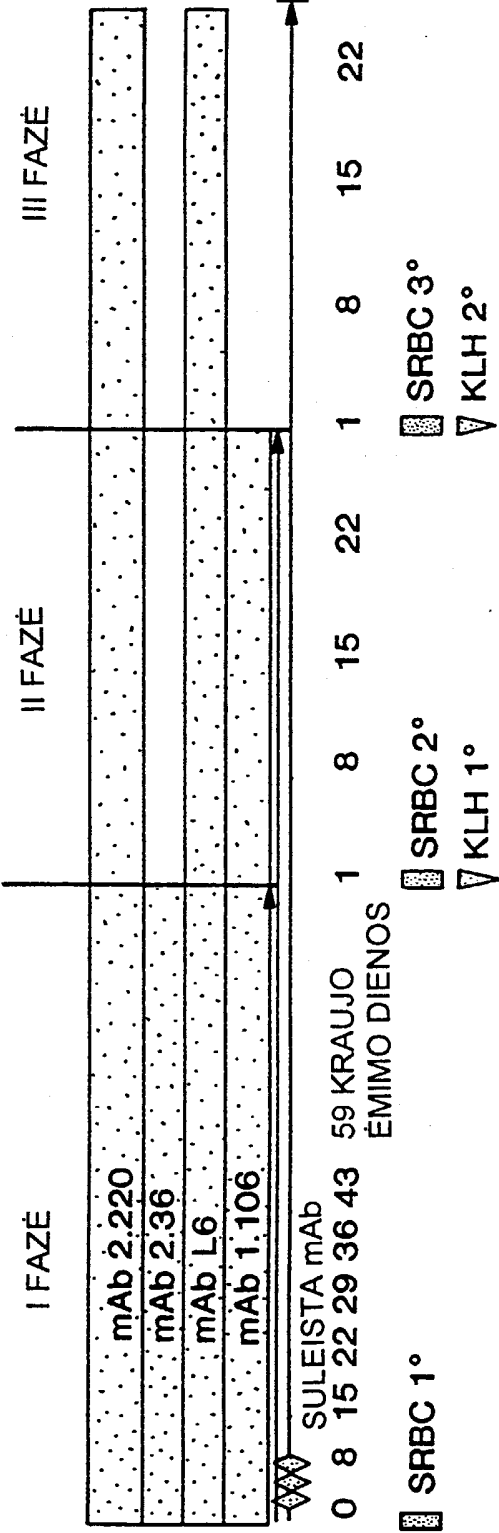
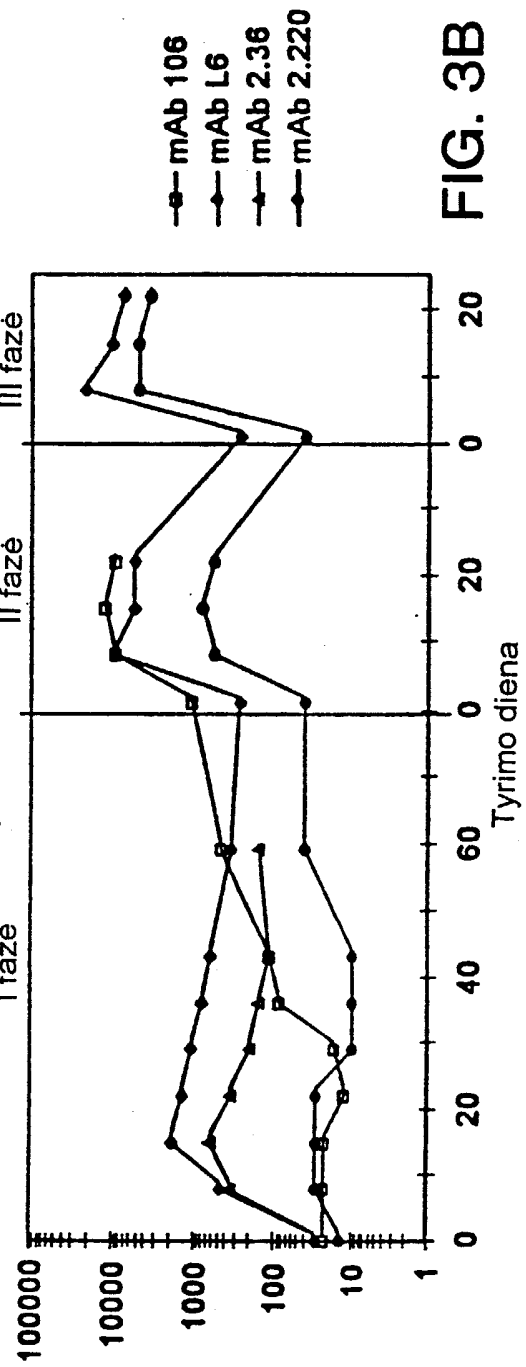
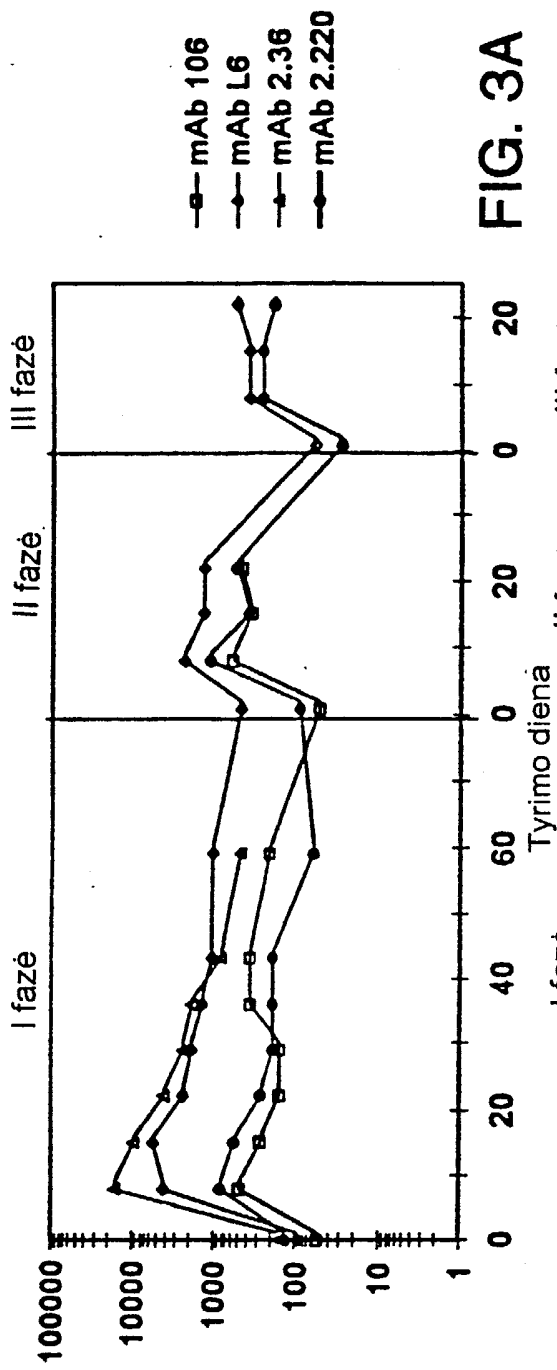


FIG. 2



A) Lengvosios grandinės kintamoji sritis (SEQ ID NO:1)

MEAPAOLLFLLLWLPDTTGDIVLTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQSISDYLSHWYQQKS
HESPRLLIKYASHSISGIPSRFSGSGSDFTLSINSVEPEDVGIYCQHGHSFPWTFG
GTKLEIXR

B) Sunkiosios grandinės kintamoji sritis (SEQ ID NO:2)

MDWTRILFLVAATGAHSQIQLVQSGPELKKPGETVRISCKASGYAFTTGMQWVQEMP
GKGLKWIGWINTHSGVPKYVEDFKGRFASLETSANTAYLQISNLKNEDTATYFCVRSGN
GNYDLAYFAYWGQGTLVTVSA

FIG. 4

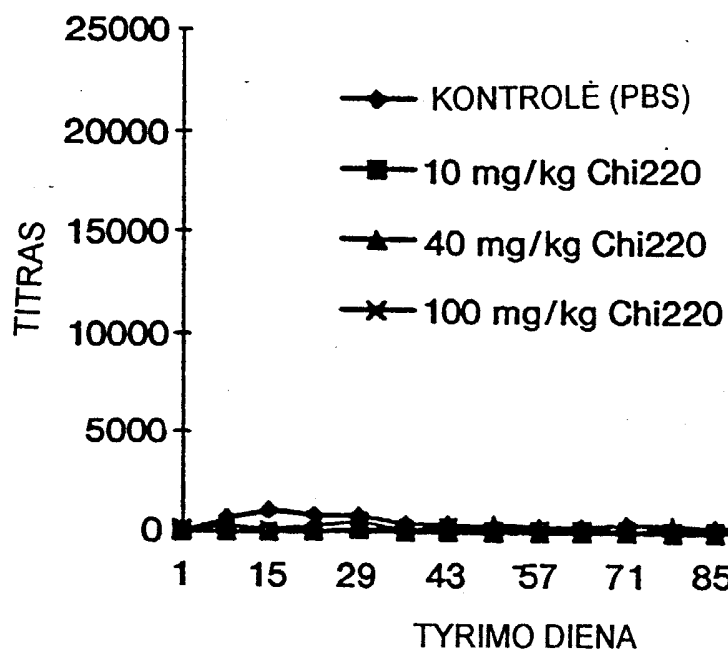


FIG. 7A

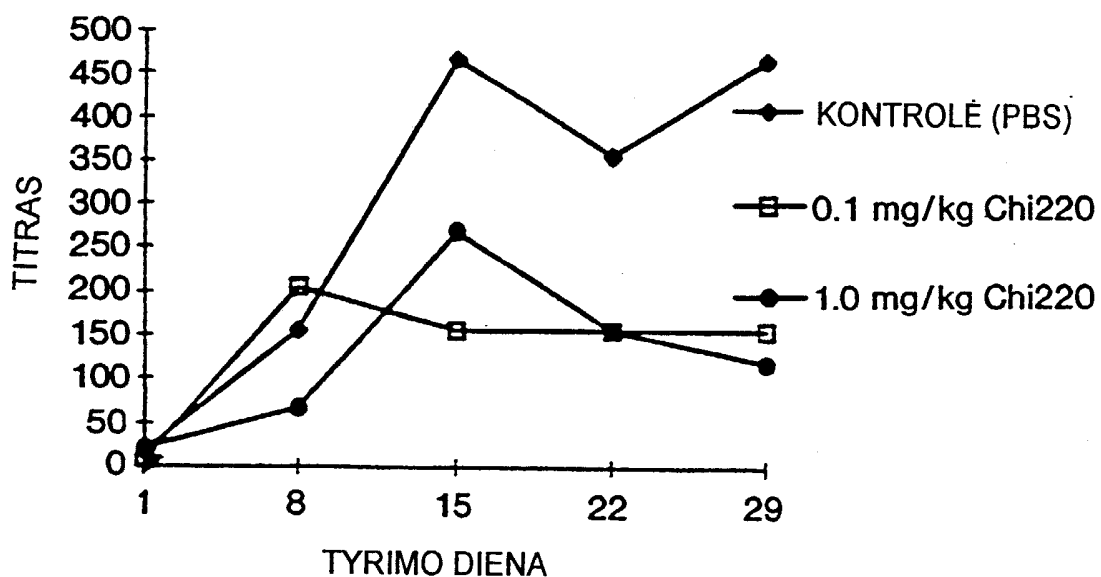


FIG. 7B

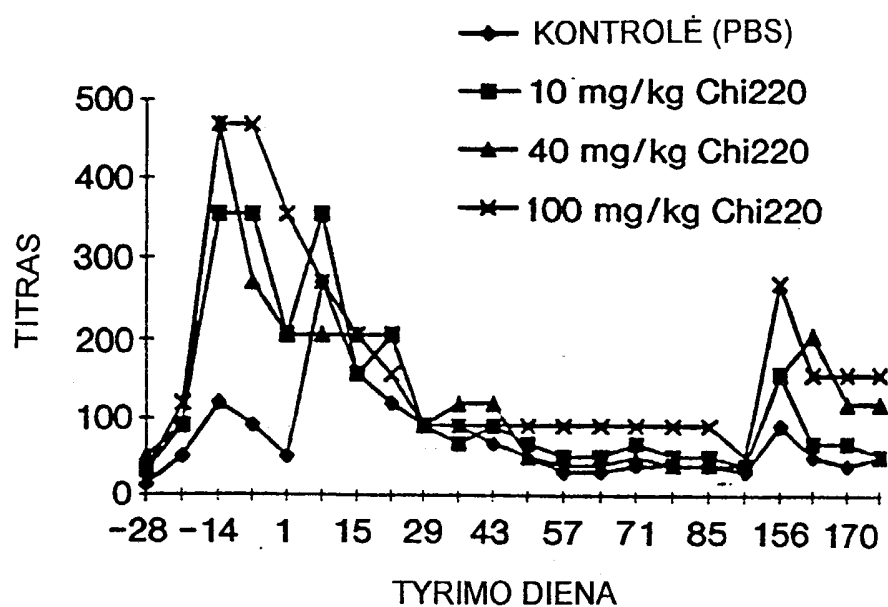


FIG. 8A

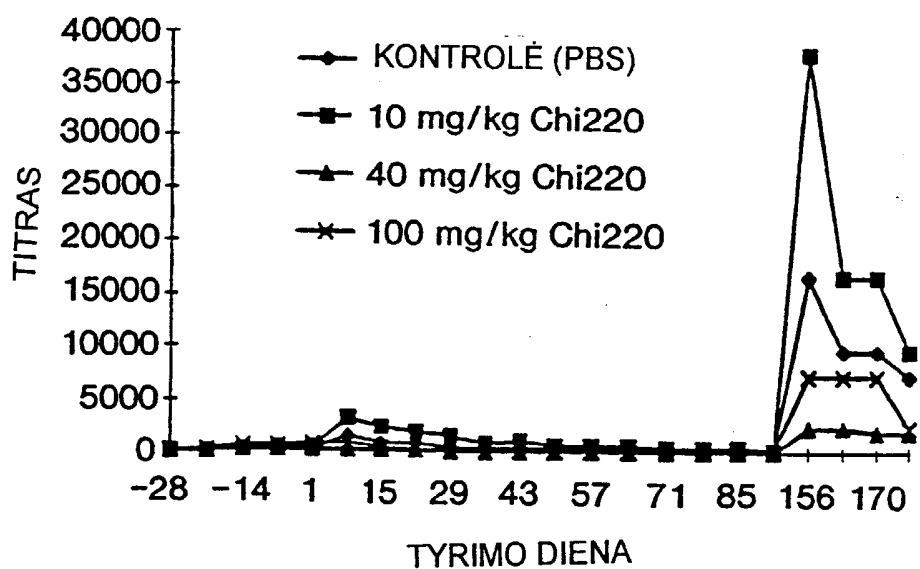


FIG. 8B

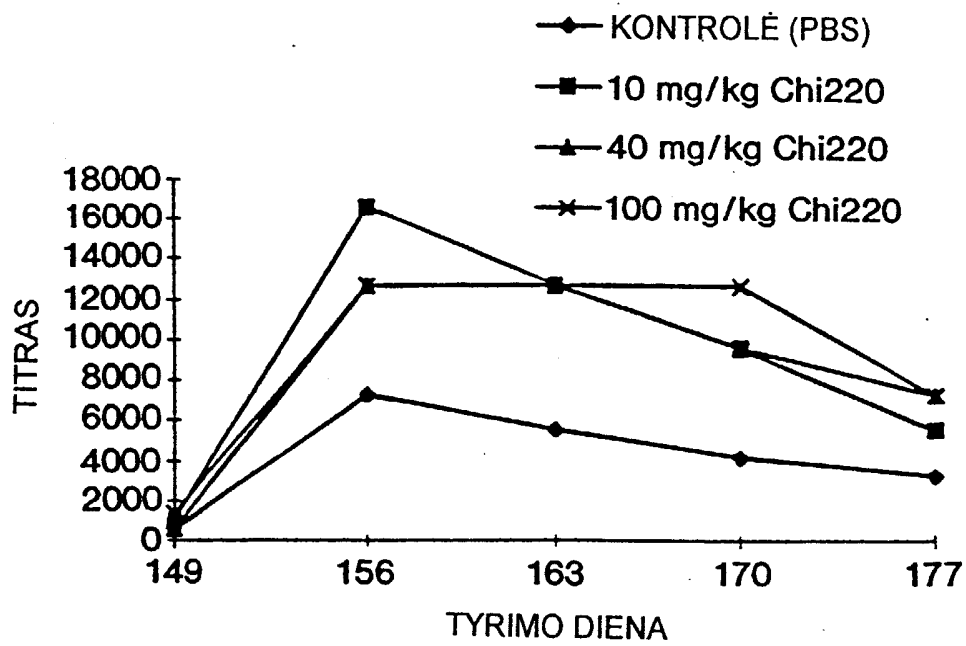


FIG. 9A

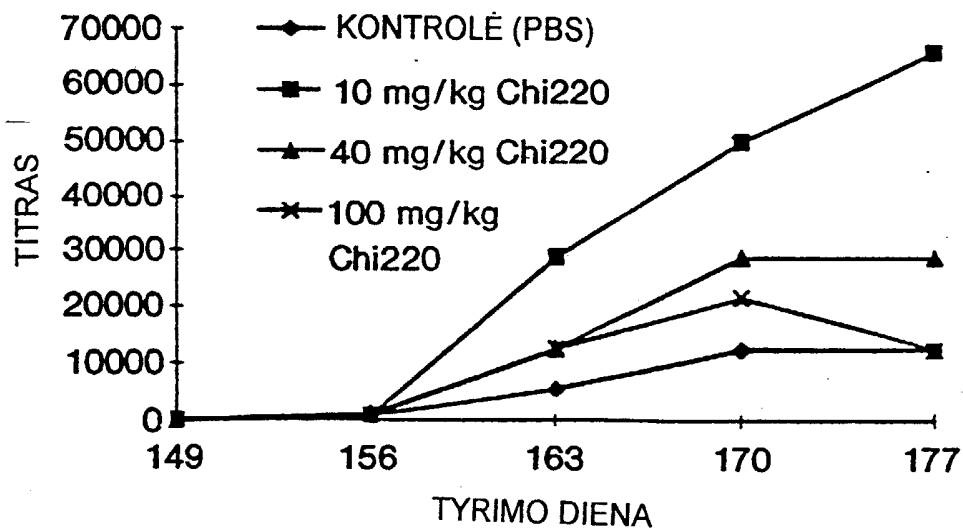


FIG. 9B

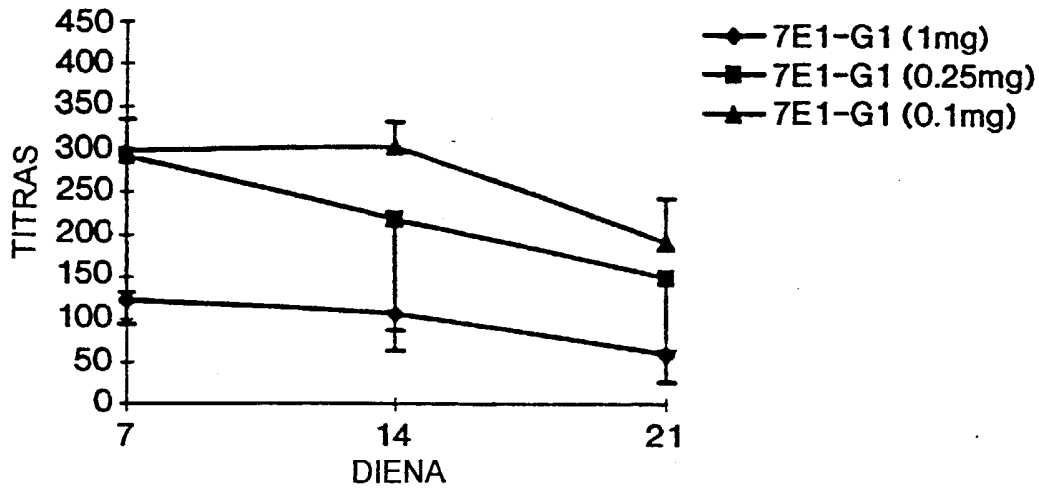


FIG. 10A

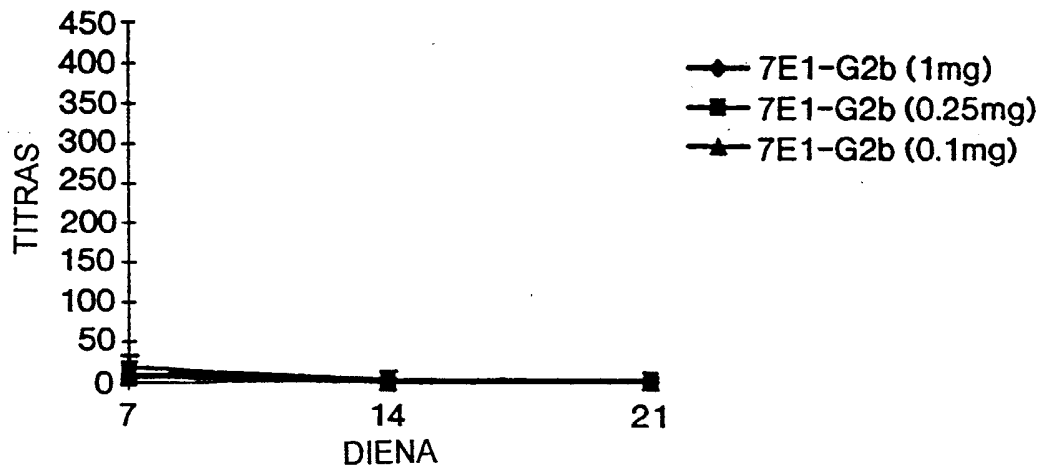


FIG. 10B

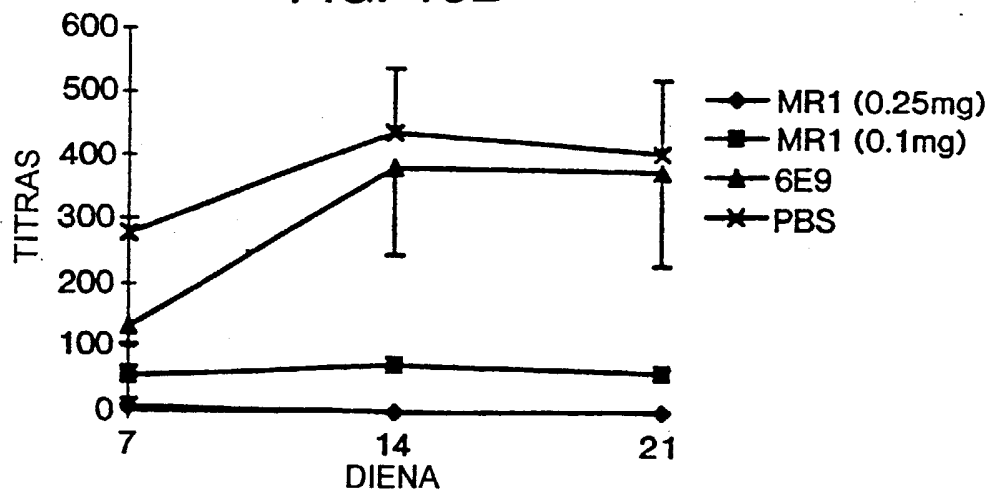


FIG. 10C

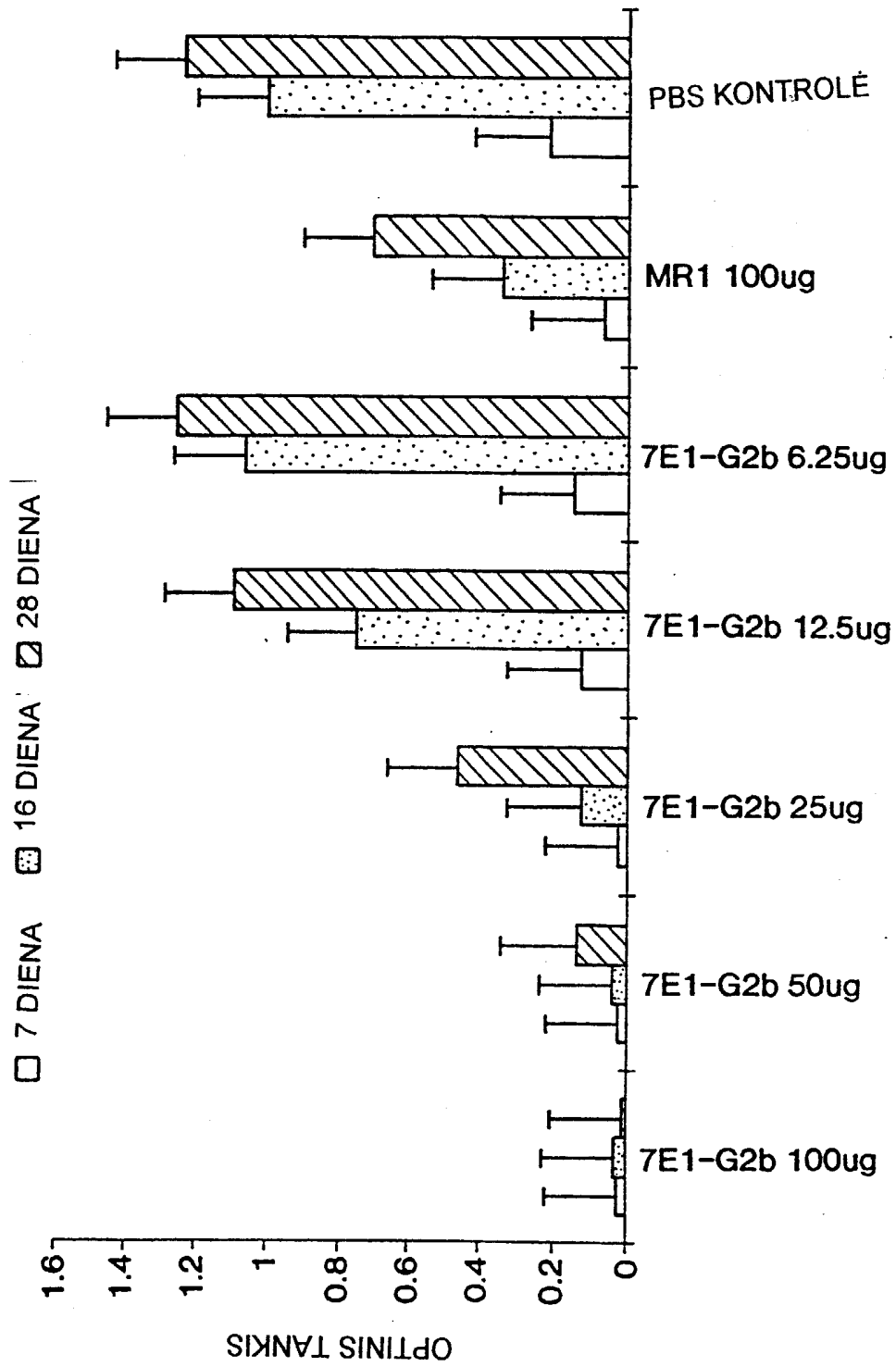


FIG. 11

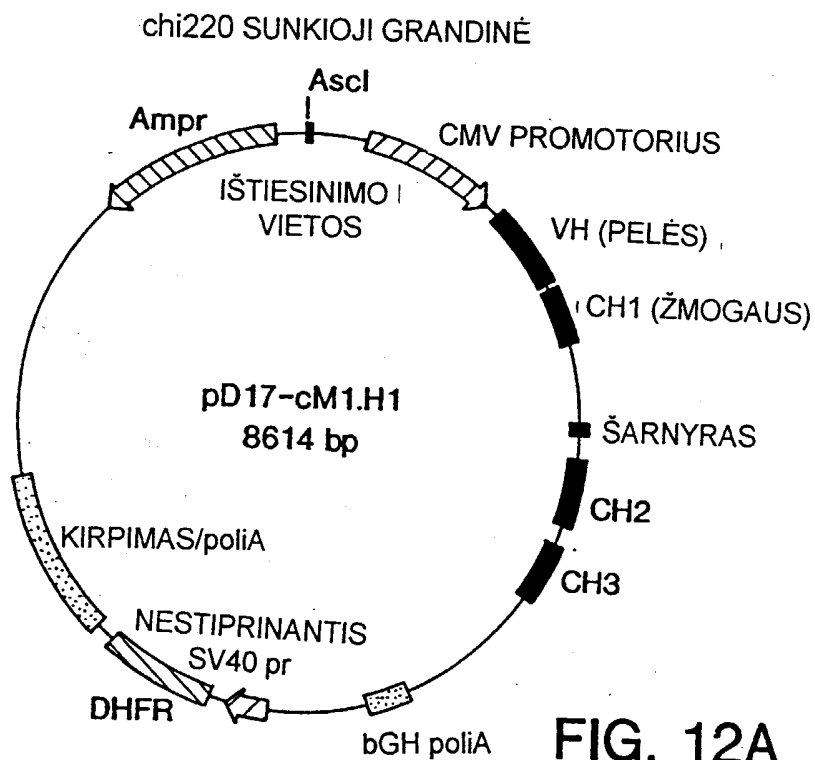


FIG. 12A

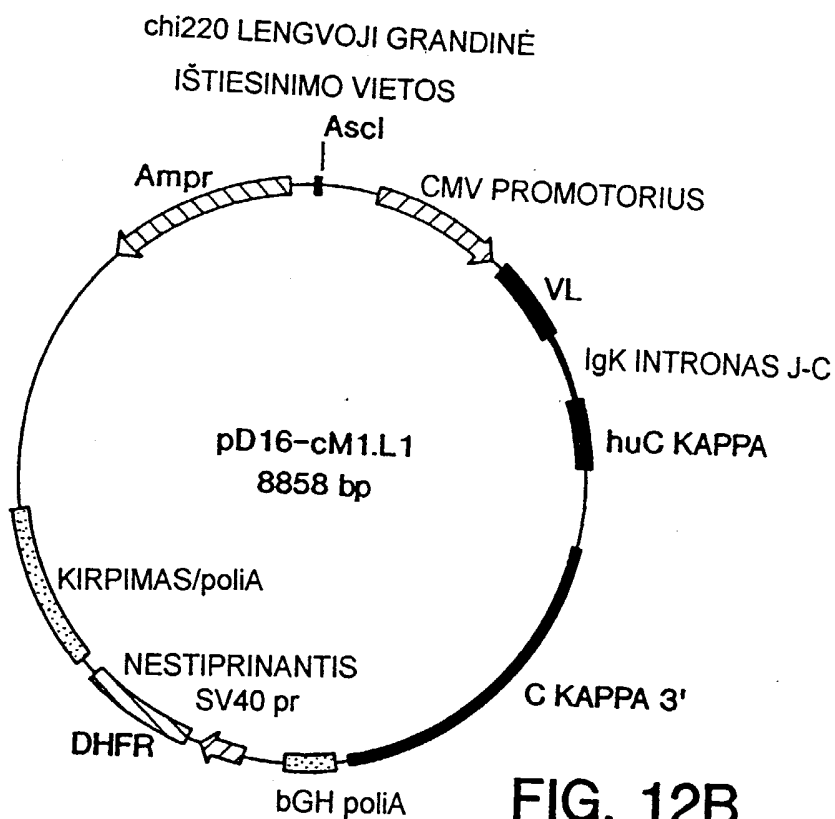


FIG. 12B

```

1   GACGGATCGG GAGATCTGCT AGGTGACCTG AGGCGCGCCG GCTTCGAATA GCCAGAGTAA
61  CCTTTTTTTT TAATTTTATT TTATTTTATT TTTGAGATGG AGTTTGGCGC CGATCTCCCCG
121 ATCCCCATATG GTCGACTCTC AGTACAATCT GCTCTGATGC CGCATAGTTA AGCCAGTATC
181 TGCTCCCTGCT TTGTGTGTTG GAGGTGCTG AGTAGTGCGC GAGCAAAATT TAAGCTACAA
241 CAAGGCAAGG CTTGACCGAC AATTGCATGA AGAATCTGCT TAGGGTTAGG CGTTTTGCGC
301 TGCTTCGCGA TGTACGGGCC AGATATACGC GTTGACATTG ATTATTGACT AGTTATTAAT
361 AGTAATCAAT TACGGGGTCA TTAGTTCATA GCCCATATAT GGAGTTCCGC GTTACATAAC
421 TTACGGTAAA TGGCCCCGCT GGCTGACCGC CCAACGACCC CCGCCCATG ACGTCAATAA
481 TGACGTATGT TCCCATAGTA ACGCCAATAG GGACTTTCCA TTGACGTCAA TGGGTGGACT
541 ATTTACGGTA AACTGCCCCC TTGGCAGTAC ATCAAGTGTA TCATATGCCA AGTACGCCCC
601 CTATTGACGT CAATGACGGT AAATGGCCCC CTTGGCATTG TGCCGAGTAC ATGACCTTAT
661 GGGACTTTCC TACTTGGCAG TACATCTACG TATTAGTCAT CGCTATTACC ATGGTGTATG
721 GGTTTTGGCA GTACATCAAT GGGCGTGGAT AGCGGTTTGA CTCACGGGGA TTTCCAAGTC
781 TCCACCCCAT TGACGTCAAT GGGAGTTTGT TTTGGCACCA AAATCAACGG GACTTTCCAA
841 AATGTCGTAA CAACTCCGCC CCATTGACGC AAATGGGCGG TAGGCGTGTA CGGTGGGAGG
901 TCTATATAAG CAGAGCTCTC TGGCTAACTA GAGAACCAC TGCTTACTGG CTTATCGAAA
961 TTAATACGAC TCACTATAGG GAGACCCAAG CTTGGTACCA TGGACTGGAC CTGGAGAATC
1021 CTCTTCTTGG TGGCAGCAGC AACAGGTGCC CACTCCCAGA TCCAGTTGGT GCAATCTGGA
1081 CCTGAGCTGA AGAAGCCTGG AGAGACAGTC AGGATCTCCT GCAAGGCTTC TGGGTATGCC
1141 TTCACAATA CTGGAATGCA GTGGGTGCAA GAGATGCCAG GAAAGGGTTT GAAGTGGATT
1201 GGCTGGATAA ACACCCACTC TGGAGTGCCA AAATATGTAG AAGACTTCAA GGGACGGTTT
1261 GCCTTCTCTT TGGAAACCTC TGCCAACACT GCATATTTAC AGATAAGCAA CCTCAAAAAT
1321 GAGGACACGG CTACGTATTT CTGTGTGAGA TCCGGGAATG GTAACATAGA CCTGGCCTAC
1381 TTTGCTTACT GGGGCCAAGG GACACTGGTC ACTGTCTCTG CAGCTAGCAC CAAGGGCCCCA
1441 TCGGTCTTCC CCCTGGCACC CTCCTCCAAG AGCACCTCTG GGGGCACAGC GGCCCTGGGC
1501 TGCCTGGTCA AGGACTACTT CCCCGAACCG GTGACGGTGT CGTGGAATC AGGCGCCCTG
1561 ACCAGCGGCG TGCACACCTT CCGGCTGTC CTACAGTCCT CAGGACTCTA CTCCCTCAGC
1621 AGCGTGGTGA CCGTGCCCTC CAGCAGCTTG GGCACCCAGA CCTACATCTG CAACGTGAAT
1681 CACAAGCCCA GCAACACCAA GGTGGACAAG AAAGTTGGTG AGAGGCCAGC ACAGGGAGGG
1741 AGGGTGTCTG CTGGAAGCCA GGCTCAGCGC TCCTGCCTGG ACGCATCCCC GCTATGCAGC
1801 CCCAGTCCAG GGCAGCAAGG CAGGCCCCGT CTGCCTCTTC ACCCGGAGGC CTCTGCCCCG
1861 CCCACTCATG CTCAGGGAGA GGGTCTTCTG GCTTTTTCCC CAGGCTCTGG GCAGGCACAG
1921 GCTAGGTGCC CCTAACCCAG GCCCTGCACA CAAAGGGGCA GGTGCTGGGC TCAGACCTGC
1981 CAAGAGCCAT ATCCGGGAGG ACCCTGCCCC TGACCTAAGC CCACCCCAA GGCCAAACTC
2041 TCCACTCCCT CAGCTCGGAC ACCTTCTCTC CTCCCAGATT CCAGTAACTC CCAATCTTCT
2101 CTCTGCAGAG CCCAAATCTT GTGACAAAC TCACACATGC CCACCGTGCC CAGGTAAGCC
2161 AGCCCAGGCC TCGCCCTCCA GCTCAAGGCG GGACAGGTGC CCTAGAGTAG CCTGCATCCA
2221 GGGACAGGCC CCAGCCGGGT GCTGACACGT CCACCTCCAT CTCTTCTCA GCACCTGAAC
2281 TCCTGGGGGG ACCGTCAGTC TTCCTCTTCC CCCCAAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT
2341 CCCGGACCCC TGAGGTCACTA TGCGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CTTGAGGTCA
2401 AGTTCAACTG GTACGTGGAC GCGGTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG
2461 AGCAGTACAA CAGCACGTAC CGTGTGGTCA GCGTCTCAC CGTCTGCAC CAGGACTGGC
2521 TGAATGGCAA GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CTAACAAAGC CCTCCAGCC CCCATCGAGA
2581 AAACCATCTC CAAAGCCAAA GGTGGGACCC GTGGGGTGCG AGGGCCACAT GGACAGAGGC
2641 CGGCTCGGCC CACCTCTGTC CCTGAGAGTG ACCGCTGTAC CAACCTCTGT CCCTACAGGG
2701 CAGCCCCGAG AACCACAGGT GTACACCCTG CCCCATCCC GGGATGAGCT GACCAAGAAC
2761 CAGGTCAGCC TGACCTGCCT GGTCAAAGGC TTCTATCCCA GCGACATCGC CGTGGAGTGG
2821 GAGAGCAATG GGCAGCCGGA GAACAACTAC AAGACCACGC CTCCCGTGCT GGACTCCGAC
2881 GGCTCCTTCT TCCTCTACAG CAAGCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC
2941 GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC ACTACACGCA GAAGAGCCTC
3001 TCCCTGTCTC CGGGTAAATG AGTGCGACGG CCGGCAAGCC CCCGCTCCCC GGGCTCTCGC

```

FIG. 13A

```

3061 GGTCGCACGA GGATGCTTGG CACGTACCCC CTGTACATAC TTCCCGGGCG CCCAGCATGG
3121 AAATAAAGCA CCCAGCGCTG CCCTGGGCCC CTGCGAGACT GTGATGGTTC TTTCCACGGG
3181 TCAGGCCGAG TCTGAGGCCT GAGTGGCATG AGGGAGGCAG AGCGGGTCCC ACTGTCCCCA
3241 CACTGGCCCA GGCTGTGCAG GTGTGCCTGG GCCCCCTAGG GTGGGGCTCA GCCAGGGGCT
3301 GCCCTCGGCA GGGTGGGGGA TTTGCCAGCG TGGCCCTCCC TCCAGCAGCA CCTGCCCTGG
3361 GCTGGGCCAC GGAAGCCCT AGGAGCCCCT GGGGACAGAC ACACAGCCCC TGCCTCTGTA
3421 GGAGACTGTC CTGTTCTGTG AGCGCCCCTG TCCTCCCGAC CTCCATGCCC ACTCGGGGGC
3481 ATGCCTAGTC CATGTGCGTA GGGACAGGCC CTCCCTCACC CATCTACCCC CACGGCACTA
3541 ACCCCTGGCT GCCCTGCCCA GCCTCGCACC CGCATGGGGA CACAACCGAC TCCGGGGACA
3601 TGCACTCTCG GGCCCTGTGG AGGGAAGTGT CGAGATGCCC ACACACACAC TCAGCCCAGA
3661 CCCGTTCAAC AAACCCCGCA CTGAGGTTGG CCGGCCACAC GGGCACCACA CACACAGTG
3721 CACGCCTCAC ACACGGAGCC TCACCCGGGC GAACTGCACA GCACCCAGAC CAGAGCAAGG
3781 TCCTCGCACA CGTGAACACT CCTCGGACAC AGGCCCCCAC GAGCCCCACG CGGCACCTCA
3841 AGGCCCACGA GCCTCTCGGC AGCTTCTCCA CATGCTGACC TGCTCAGACA AACCCAGCCC
3901 TCCTCTCACA AGGGTGCCCC TGCAGCCGCC ACACACACAC AGGGGATCAC ACACCACGTC
3961 ACGTCCCTGG CCCTGGCCCC CTTCCCAGTG CCGCCCTTCC CTGCAGGACG GATCAGCCTC
4021 GACTGTGCCT TCTAGTTGCC AGCCATCTGT TGTTTGCCCC TCCCCCGTGC CTTCTTGAC
4081 CCTGGAAGGT GCCACTCCCA CTGTCTTTC CTAATAAAAT GAGGAAATTG CATCGCATTG
4141 TCTGAGTAGG TGTCATTCTA TTCTGGGGGG TGGGGTGGGG CAGGACAGCA AGGGGGAGGA
4201 TTGGGAAGAC AATAGCAGGC ATGCTGGGGA TCGGGTGGGC TCTATGGCTT CTGAGGCGGA
4261 AAGAACCAGC TGGGGCTCTA GGGGGTATCC CCACGCGCCC TGTAGCGCGC CATTAAGCGC
4321 GGCGGGTGTG GTGGTTACGC GCAGCGTGAC CGCTACACTT GCCAGCGCCC TAGCGCCCGC
4381 TCCTTTCGCT TTCTTCCCTT CCTTCTCGC CACGTTGCGC GGGCCTCTCA AAAAAAGGAA
4441 AAAAAGCATG CATCTCAATT AGTCAGCAAC CATAGTCCCG CCCCTAACTC CGCCCATCCC
4501 GCCCCTAACT CCGCCCAGTT CCGCCCATTC TCCGCCCCAT GGCTGACTAA TTTTTTTTAT
4561 TTATGCAGAG GCCGAGGCCG CCTCGGCCCTC TGAGCTATTC CAGAAGTAGT GAGGAGGCTT
4621 TTTTGGAGGC CTAGGCTTTT GCAAAAAGCT TGGACAGCTC AGGGCTGCGA TTTGCGCCA
4681 AACTTGACGG CAATCCTAGC GTGAAGGCTG GTAGGATTTT ATCCCCGCTG CCATCATGGT
4741 TCGACCATG AACTGCATCG TCGCCGTGTC CCAAAATATG GGGATTGGCA AGAACGGAGA
4801 CCTACCCTGG CCTCCGCTCA GGAACGAGTT CAAGTACTTC CAAAGAATGA CCACAACCTC
4861 TTCAGTGGA GGTAAACAGA ATCTGGTGAT TATGGGTAGG AAAACCTGGT TCTCCATTCC
4921 TGAGAAGAAT CGACCTTTAA AGGACAGAAT TAATATAGTT CTCAGTAGAG AACTCAAAGA
4981 ACCACCACGA GGAGCTCATT TTCTTGCCAA AAGTTTGGAT GATGCCTTAA GACTTATGA
5041 ACAACCGGAA TTGGCAAGTA AAGTAGACAT GGTTTGGATA GTCGGAGGCA GTTCTGTTTA
5101 CCAGGAAGCC ATGAATCAAC CAGGCCACCT TAGACTCTTT GTGACAAGGA TCATGCAGGA
5161 ATTTGAAAAGT GACACGTTTT TCCCAGAAAT TGATTTGGGG AAATATAAAC TTCTCCAGA
5221 ATACCCAGGC GTCCTCTCTG AGGTCCAGGA GGAAAAAGGC ATCAAGTATA AGTTTGAAGT
5281 CTACGAGAAG AAAGACTAAC AGGAAGATGC TTTCAAGTTC TCTGCTCCCC TCCTAAAGCT
5341 ATGCATTTT ATAAGACCAT GGGACTTTTG CTGGCTTTAG ATCTCTTTGT GAAGGAACCT
5401 TACTTCTGTG GTGTGACATA ATTGGACAAA CTACCTACAG AGATTTAAAG CTCTAAGGTA
5461 AATATAAAAT TTTTAAGTGT ATAATGTGTT AAACACTGTA TTCTAATTGT TTGTGTATTT
5521 TAGATTCCAA CCTATGGAAC TGATGAATGG GAGCAGTGGT GGAATGCCTT TAATGAGGAA
5581 AACCTGTTTT GCTCAGAAGA AATGCCATCT AGTGATGATG AGGCTACTGC TGACTCTCAA
5641 CATTCTACTC CTCCAAAAA GAAGAGAAAG GTAGAAGACC CCAAGGACTT TCCTTCAGAA
5701 TTGCTAAGTT TTTTGAGTCA TGCTGTGTTT AGTAATAGAA CTCTTGCTTG CTTTGCTATT
5761 TACACCACAA AGGAAAAAGC TGCACTGCTA TACAAGAAAA TTATGGAAAA ATATTCTGTA
5821 ACCTTTATAA GTAGGCATAA CAGTTATAAT CATAACATAC TGTTTTTTCT TACTCCACAC
5881 AGGCATAGAG TGTCTGCTAT TAATAACTAT GCTCAAAAAT TGTGTACCTT TAGCTTTTTA
5941 ATTTGTAAAG GGGTTAATAA GGAATATTTG ATGTATAGTG CCTTGACTAG AGATCATAAT
6001 CAGCCATACC ACATTTGTAG AGGTTTTACT TGCTTTAAAA AACCTCCCAC ACCTCCCCCT
6061 GAACCTGAAA CATAAAATGA ATGCAATTGT TGTTGTTAAC TTGTTTATTG CAGCTTATAA

```

FIG. 13B

6121	TGGTTACAAA	TAAAGCAATA	GCATCACAAA	TTTCACAAAT	AAAGCATTFT	TTTCACTGCA
6181	TTCTAGTTGT	GGTTTGTCCA	AACTCATCAA	TGTATCTTAT	CATGTCTGGA	TCGGCTGGAT
6241	GATCCTCCAG	CGCGGGGATC	TCATGCTGGA	GTTCTTCGCC	CACCCCAACT	TGTTTATTGC
6301	AGCTTATAAT	GGTTACAAAT	AAAGCAATAG	CATCACAAAT	TTCACAAATA	AAGCATTFTT
6361	TTCACTGCAT	TCTAGTTGTG	GTTTGTCCAA	ACTCATCAAT	GTATCTTATC	ATGTCTGTAT
6421	ACCGTCGACC	TCTAGCTAGA	GCTTGGCGTA	ATCATGGTCA	TAGCTGTTTC	CTGTGTGAAA
6481	TTGTTATCCG	CTCACAATTC	CACACAACAT	ACGAGCCGGA	AGCATAAAGT	GTAAAGCCTG
6541	GGGTGCCTAA	TGAGTGAGCT	AACTCACATT	AATTGCGTTG	CGCTCACTGC	CCGCTTTCCA
6601	GTCGGGAAAC	CTGTCGTGCC	AGCTGCATTA	ATGAATCGGC	CAACGCGCGG	GGAGAGGCGG
6661	TTTGCCTATT	GGGCGCTCTT	CCGCTTCCTC	GCTCACTGAC	TCGCTGCGCT	CGGTCGTTCC
6721	GCTGCGGCGA	GCGGTATCAG	CTCACTCAAA	GGCGGTAATA	CGGTTATCCA	CAGAATCAGG
6781	GGATAACGCA	GGAAAGAACA	TGTGAGCAAA	AGGCCAGCAA	AAGGCCAGGA	ACCGTAAAAA
6841	GGCCGCGTTG	CTGGCGTTTT	TCCATAGGCT	CCGCCCCCCT	GACGAGCATC	ACAAAAATCG
6901	ACGCTCAAGT	CAGAGGTGGC	GAAACCCGAC	AGGACTATAA	AGATACCAGG	CGTTTCCCCC
6961	TGGAAGCTCC	CTCGTGCGCT	CTCCTGTTCC	GACCCCTGCCG	CTTACCGGAT	ACCTGTCCGC
7021	CTTCTCTCCCT	TCGGGAAGCG	TGGCGCTTTC	TCAATGCTCA	CGCTGTAGGT	ATCTCAGTTC
7081	GGTGTAGGTC	GTTGCGTCCA	AGCTGGGCTG	TGTGCACGAA	CCCCCGTTTC	AGCCCCGACG
7141	CTGCGCCTTA	TCCGGTAACT	ATCGTCTTGA	GTCCAACCCG	GTAAGACACG	ACTTATCGCC
7201	ACTGGCAGCA	GCCACTGGTA	ACAGGATTAG	CAGAGCGAGG	TATGTAGGCG	GTGCTACAGA
7261	GTTCTTGAAG	TGGTGGCCTA	ACTACGGCTA	CACTAGAAGG	ACAGTATTTG	GTATCTGCGC
7321	TCTGCTGAAG	CCAGTTACCT	TCGGAAAAAG	AGTTGGTAGC	TCTTGATCCG	GCAAAACAAAC
7381	CACCGCTGGT	AGCGGTGGTT	TTTTTGTTTG	CAAGCAGCAG	ATTACGCGCA	GAAAAAAAGG
7441	ATCTCAAGAA	GATCCTTTGA	TCTTTTCTAC	GGGGTCTGAC	GCTCAGTGGA	ACGAAAACTC
7501	ACGTTAAAGG	ATTTTGGTCA	TGAGATTATC	AAAAAGGATC	TTCACCTAGA	TCCTTTTAAA
7561	TTAAAAATGA	AGTTTTAAAT	CAATCTAAAG	TATATATGAG	TAAACTTGGT	CTGACAGTTA
7621	CCAATGCTTA	ATCAGTGAGG	CACCTATCTC	AGCGATCTGT	CTATTTTCGT	CATCCATAGT
7681	TGCCTGACTC	CCCGTCGTGT	AGATAACTAC	GATACGGGAG	GGCTTACCAT	CTGGCCCCAG
7741	TGCTGCAATG	ATACCGCGAG	ACCCAGGCTC	ACCGGCTCCA	GATTTATCAG	CAATAAACCA
7801	GCCAGCCGGA	AGGGCCGAGC	GCAGAAGTGG	TCCTGCAACT	TTATCCGCCT	CCATCCAGTC
7861	TATTAATTGT	TGCCGGGAAG	CTAGAGTAAG	TAGTTCGCCA	GTTAATAGTT	TGCGCAACGT
7921	TGTTGCCATT	GCTACAGGCA	TCGTGGTGTC	ACGCTCGTCG	TTTGGTATGG	CTTCATTACG
7981	CTCCGGTTCC	CAACGATCAA	GGCGAGTTAC	ATGATCCCCC	ATGTTGTGCA	AAAAAGCGGT
8041	TAGCTCCTTC	GGTCCTCCGA	TCGTTGTCAG	AAGTAAGTTG	GCCGCAGTGT	TATCACTCAT
8101	GGTTATGGCA	GCACTGCATA	ATTCTCTTAC	TGTCATGCCA	TCCGTAAGAT	GCTTTTCTGT
8161	GA CTGGTGAG	TACTCAACCA	AGTCATTCTG	AGAATAGTGT	ATGCGGCGAC	CGAGTTGCTC
8221	TTGCCCCGGC	TCAATACGGG	ATAATACCGC	GCCACATAGC	AGAACTTTAA	AAGTGCTCAT
8281	CATTGGAAAA	CGTTCTTCGG	GGCGAAAACT	CTCAAGGATC	TTACCGCTGT	TGAGATCCAG
8341	TTCGATGTAA	CCCACTCGTG	CACCCAACTG	ATCTTCAGCA	TCTTTTACTT	TCACCAGCGT
8401	TTCTGGGTGA	GCAAAAAACAG	GAAGGCAAAA	TGCCGCAAAA	AAGGGAATAA	GGGCGACACG
8461	GAAATGTTGA	ATACTCATAC	TCTTCCTTTT	TCAATATTAT	TGAAGCATTT	ATCAGGGTTA
8521	TTGTCTCATG	AGCGGATACA	TATTTGAATG	TATTTAGAAA	AATAAACAAA	TAGGGGTTCC
8581	GCGCACATTT	CCCCGAAAAG	TGCCACCTGA	CGTC		

FIG. 13C

1 GACGGATCGG GAGATCTGCT AGCCCGGGTG ACCTGAGGCG CGCCGGCTTC GAATAGCCAG
 61 AGTAACCTTT TTTTAAATT TTATTTTATT TTATTTTGA GATGGAGTTT GGCGCCGATC
 121 TCCCGATCCC CTATGGTCGA CTCTCAGTAC AATCTGCTCT GATGCCGCAT AGTTAAGCCA
 181 GTATCTGCTC CCTGCTTG TGTTGGAGGT CGCTGAGTAG TCGCGAGCA AAATTTAAGC
 241 TACAACAAGG CAAGGCTTGA CCGACAATTG CATGAAGAAT CTGCTTAGGG TTAGGCGTTT
 301 TGCGCTGCTT CGCGATGTAC GGGCCAGATA TACGCGTTGA CATTGATTAT TGACTIONT
 361 TTAATAGTAA TCAATTACGG GGTCAATAGT TCATAGCCCA TATATGGAGT TCCGCGTTAC
 421 ATAACCTTACG GTAAATGGCC CGCCTGGCTG ACCGCCAAC GACCCCGCC CATTGACGTC
 481 AATAATGACG TATGTTCCCA TAGTAACGCC AATAGGGACT TTCCATTGAC GTCAATGGGT
 541 GGACTATTTA CGGTAAACTG CCCACTTGGC AGTACATCAA GTGTATCATA TGCCAAGTAC
 601 GCCCCCTATT GACGTCAATG ACGGTAAATG GCCCGCCTGG CATTATGCCC AGTACATGAC
 661 CTTATGGGAC TTTCTACTT GGCAGTACAT CTACGTATTA GTCATCGCTA TTACCATGGT
 721 GATGCGTTT TGGCAGTACA TCAATGGGCG TGGATAGCGG TTTGACTCAC GGGGATTTCC
 781 AAGTCTCCAC CCCATTGACG TCAATGGGAG TTTGTTTTGG CACCAAAATC AACGGGACTT
 841 TCCAAAATGT CGTAACAACT CCGCCCCATT GACGCAATG GGCGGTAGGC GTGTACGGTG
 901 GGAGGTCTAT ATAAGCAGAG CTCTCTGGCT AACTAGAGAA CCCACTGCTT ACTGGCTTAT
 961 CGAAATTAAT ACGACTCACT ATAGGGAGAC CCAAGCTTGG TACCATGGAA GCCCCAGCTC
 1021 AGCTTCTCTT CCTCTGCTA CTCTGGCTCC CAGATACCAC CGGAGACATT GTTCTGACTC
 1081 AGTCTCCAGC CACCCTGTCT GTGACTCCAG GAGATAGAGT CTCTCTTCC TGCAGGGCCA
 1141 GCCAGAGTAT TAGCGACTAC TTACTCTGGT ATCAACAAAA ATCAGATGAG TCTCCAAGGC
 1201 TTCTCATCAA ATATGCTTCC CATTCCATCT CTGGGATCCC CTCCAGGTTT AGTGGCAGTG
 1261 GATCAGGGTC AGATTTCACT CTCAGTATCA ACAGTGTGGA ACCTGAAGAT GTTGAATTT
 1321 ATTACTGTCA ACATGGTCAC AGCTTTCCGT GGACGTTCCG TGGAGGCACC AAGCTGGAAA
 1381 TCAAACGTAA GTCTCGAGTC TCTAGATAAC CGGTCAATCG GTCAATCGAT TGGAATTCTA
 1441 AACTCTGAGG GGGTCGGATG ACGTGGCCAT TCTTTGCCTA AAGCATTGAG TTTACTGCAA
 1501 GGTCAGAAAA GCATGCAAAG CCTCAGAAT GGCTGCAAAG AGCTCCAACA AAACAATTTA
 1561 GAACTTTATT AAGGAATAGG GGAAGCTAG GAAGAACTC AAAACATCAA GATTTTAAAT
 1621 ACGCTTCTTG GTCTCCTTGC TATAATTATC TGGGATAAGC ATGCTGTTTT CTGTCTGTCC
 1681 CTAACATGCC CTTATCCGCA AACAACACAC CCAAGGGCAG AACTTTGTTA CTTAAACACC
 1741 ATCCTGTTTG CTTCTTTCCT CAGGAAGTGT GGCTGCACCA TCTGTCTTCA TCTTCCCGCC
 1801 ATCTGATGAG CAGTTGAAAT CTGGAAGTGC CTCTGTTGTG TGCCTGCTGA ATAACCTCTA
 1861 TCCAGAGAG GCCAAAGTAC AGTGAAGGT GGATAACGCC CTCCAATCGG GTACCTCCCA
 1921 GGAGAGTGTC ACAGAGCAGG ACAGCAAGGA CAGCACCTAC AGCCTCAGCA GCAACCTGAC
 1981 GCTGAGCAA GCAGACTACG AGAAACACAA AGTCTACGCC TCGGAAGTCA CCCATCAGGG
 2041 CCTGAGCTCG CCCGTCACAA AGAGCTTCAA CAGGGGAGAG TGTTAGAGGG AGAAGTGCCC
 2101 CCACCTGCTC CTCAGTTCCA GCCTGACCCC CTCCCATCCT TTGGCCTCTG ACCCTTTTTT
 2161 CACAGGGGAC CTACCCCTAT TGCGGTCTCT CAGCTCATCT TTCACCTCAC CCCCTCCTC
 2221 CTCCTTGGCT TTAATTATGC TAATGTTGGA GGAGAATGAA TAAATAAAGT GAATCTTTGC
 2281 ACCTGTGGTT TCTCTCTTTC CTCATTTAAT AATTATTATC TGTGTTTTTA CCAACTACTC
 2341 AATTTCTCTT ATAAGGGACT AAATATGTAG TCATCCTAAG GCACGTAACC ATTTATAAAA
 2401 ATCATCCTTC ATTCTATTTT ACCCTATCAT CCTCTGCAAG ACAGTCCTCC CTCAAACCCA
 2461 CAAGCCTTCT GTCCTCACAG TCCCCTGGGC CATGGTAGGA GAGACTTGCT TCCTTGTTTT
 2521 CCCCTCCTCA GCAAGCCCTC ATAGTCCTTT TTAAGGGTGA CAGGTCTTAC AGTCATATAT
 2581 CTTTGTATTC AATTCCCTGA GAATCAACCA AAGCAAATTT TTCAAAGAA GAAACCTGCT
 2641 TAAACAAACA ATAGGGAAAT GTTTAAGTTC ATCATGGTAC TTAGACTTAA TGGAATGTCA
 2701 TAAACAAACA ATAGGGAAAT GTTTAAGTTC ATCATGGTAC TTAGACTTAA TGGAATGTCA
 2761 TGCCTTATTT ACATTTTAA ACAGGTACTG AGGGACTCCT GTCTGCCAAG GGCCGTATTG
 2821 AGTACTTTCC ACAACCTAAT TTAATCCACA CTATACTGTG AGATTAAAA CATTCAATTA
 2881 AATGTTGCAA AGGTTCTATA AAGCTGAGAG ACAAATATAT TCTATAACTC AGCAATCCCA
 2941 CTTCTAGATG ACTGAGTGTC CCCACCACC AAAAACTAT GCAAGAATGT TCAAAGCAGC
 3001 TTTATTTACA AAAGCCAAAA ATTGGAAATA GCCCGATTGT CCAACAATAG AATGAGTTAT

FIG. 14A

3061	TAAACTGTGG	TATGTTTATA	CATTAGAATA	CCCAATGAGG	AGAATTAACA	AGCTACAAC
3121	ATACCTACTC	ACACAGATGA	ATCTCATAAA	AATAATGTTA	CATAAGAGAA	ACTCAATGCA
3181	AAAGATATGT	TCTGTATGTT	TTCATCCATA	TAAAGTTCAA	AACCAGGTAA	AAATAAAGTT
3241	AGAAATTTGG	ATGGAAATTA	CTCTTAGCTG	GGGGTGGGCG	AGTTAGTGCC	TGGGAGAAGA
3301	CAAGAAGGGG	CTTCTGGGGT	CTTGTAATG	TTCTGTTFCCT	CGTGTGGGGT	TGTGCAGTTA
3361	TGATCTGTGC	ACTGTTCTGT	ATACACATTA	TGCTTCAAAA	TAACTTCACA	TAAAGAACAT
3421	CTTATACCCA	GTTAATAGAT	AGAAGAGGAA	TAAGTAATAG	GTCAAGACCA	ACGCAGCTGG
3481	TAAGTGGGGG	CCTGGGATCA	AATAGCTACC	TGCCTAATCC	TGCCCWCTTG	AGCCCTGAAT
3541	GAGTCTGCCT	TCCAGGGCTC	AAGGTGCTCA	ACAAAACAAC	AGGCCTGCTA	TTTTCTCTGGC
3601	ATCTGTGCCC	TGTTTGGCTA	GCTAGGAGCA	CACATACATA	GAAATTAAT	GAAACAGACC
3661	TTCAGCAAGG	GGACAGAGGA	CAGAAATTAAC	CTTGCCCAGA	CACTGGAAC	CCATGTATGA
3721	ACACTCACAT	GTTTGGGAAG	GGGGAAGGGC	ACATGTAAAT	GAGGACTCTT	CCTCATTCTA
3781	TGGGGCACTC	TGGCCCTGCC	CCTCTCAGCT	ACTCATCCAT	CCAACACACC	TTTCTAAGTA
3841	CCTCTCTCTG	CCTACACTCT	GAAGGGGTTT	AGGAGTAACT	AACACAGCAT	CCCTTCCCTC
3901	AAATGACTGA	CAATCCCTTT	GTCCTGCTTT	GTTTTCTTT	CCAGTCAGTA	CTGGGAAAGT
3961	GGGGAAGGAC	AGTCATGGAG	AAACTACATA	AGGAAGCACC	TTGCCCTTCT	GCCTCTTGAG
4021	AATGTTGATG	AGTATCAAAT	CTTTCAAACT	TTGGAGGTTT	GAGTAGGGGT	GAGACTCAGT
4081	AATGTCCCTT	CCAATGACAT	GAAGGCTGCT	ACTCATCCCT	GGGGGCCAAA	TTGAACAATC
4141	AAAGGCAGGC	ATAATCCAGT	TATGAATTCT	TGCGGCCGCT	TGCTAGCTTC	ACGTGTTGGA
4201	TCCAACCGCG	GAAGGGCCCT	ATTCTATAGT	GTCACCTAAA	TGCTAGAGCT	CGCTGATCAG
4261	CCTCGACTGT	GCCTTCTAGT	TGCCAGCCAT	CTGTTGTTTG	CCCCTCCCCC	GTGCCTTCTT
4321	TGACCCTGGA	AGGTGCCACT	CCCCTGTCC	TTTCCTAATA	AAATGAGGAA	ATTGCATCGC
4381	ATTGTCTGAG	TAGGTGTCAT	TCTATTCTGG	GGGGTGGGGT	GGGGCAGGAC	AGCAAGGGGG
4441	AGGATTGGGA	AGACAATAGC	AGGCATGCTG	GGGATGCGGT	GGGCTCTATG	GCTTCTGAGG
4501	CGGAAAGAAC	CAGTGTGGGC	TCTAGGGGGT	ATCCCCACGC	GCCCTGTAGC	GGCGCATTA
4561	GCGCGGCGGG	TGTGGTGGTT	ACGCGCAGCG	TGACCGCTAC	ACTTGCCAGC	GCCCTAGCGC
4621	CCGCTCCTTT	CGCTTCTTTC	CCTTCCTTTC	TCGCCACGTT	CGCCGGGCCT	CTCAAAAAAG
4681	GGAAAAAAG	CATGCATCTC	AATTAGTCAG	CAACCATAGT	CCCGCCCCCTA	ACTCCGCCCCA
4741	TCCCGCCCCCT	AACTCCGCCC	AGTCCGCCC	ATTCTCCGCC	CCATGGCTGA	CTAATTTTTT
4801	TTATTTTATGC	AGAGGCCGAG	GCCGCCTCGG	CCTCTGAGCT	ATTCCAGAAG	TAGTGAGGAG
4861	GCTTTTTTTGG	AGGCCTAGGC	TTTTGCAAAA	AGCTTGAGCA	GCTCAGGGCT	GCGATTTTCGC
4921	GCCAAACTTG	ACGGCAATCC	TAGCGTGAAG	GCTGGTAGGA	TTTTATCCCC	GCTGCCATCA
4981	TGGTTCGACC	ATTGAACTGC	ATCGTCGCCG	TGTCCCAAAA	TATGGGGATT	GGCAAGAACG
5041	GAGACCTACC	CTGGCCTCCG	CTCAGGAACG	AGTTCAGTA	CTTCCAAAGA	ATGACCACAA
5101	CCTCTTCAGT	GGAAGGTAAA	CAGAACTCTGG	TGATTATGGG	TAGGAAAACC	TGGTTCCTCA
5161	TTCCTGAGAA	GAATCGACCT	TTAAAGGACA	GAATTAATAT	AGTTCCTCAGT	AGAGAACTCA
5221	AAGAACCACC	ACGAGGAGCT	CATTTTCTTG	CCAAAAGTTT	GGATGATGCC	TTAAGACTTA
5281	TTGAACAACC	GGAATTGGCA	AGTAAAGTAG	ACATGGTTTG	GATAGTCGGA	GGCAGTTCTG
5341	TTTACCAGGA	AGCCATGAAT	CAACCAGGCC	ACCTTAGACT	CTTTGTGACA	AGGATCATGC
5401	AGGAATTTGA	AAGTGACACG	TTTTTCCCAG	AAATTGATTT	GGGGAAATAT	AAACTTCTCC
5461	CAGAATACCC	AGGCGTCCTC	TCTGAGGTCC	AGGAGGAAAA	AGGCATCAAG	TATAAGTTTG
5521	AAGTCTACGA	GAAGAAAGAC	TAACAGGAAG	ATGCTTTCAA	GTTCTCTGCT	CCCCCTCTAA
5581	AGCTATGCAT	TTTTATAAGA	CCATGGGACT	TTTGCTGGCT	TTAGATCTCT	TTGTGAAGGA
5641	ACCTTACTTC	TGTGGTGTGA	CATAATTGGA	CAAACTACCT	ACAGAGATTT	AAAGCTCTAA
5701	GGTAAATATA	AAATTTTTAA	GTGTATAATG	TGTTAAACTA	CTGATTCTAA	TTGTTTGTGT
5761	ATTTTAGATT	CCAACCTATG	GAAGTATGTA	ATGGGAGCAG	TGGTGGAATG	CCTTTAATGA
5821	GGAAAACCTG	TTTTGCTCAG	AAGAAATGCC	ATCTAGTGAT	GATGAGGCTA	CTGCTGACTC
5881	TCAACATTCT	ACTCCTCCAA	AAAAGAAGAG	AAAGGTAGAA	GACCCCAAGG	ACTTTCCTTC
5941	AGAATTGCTA	AGTTTTTTGA	GTCATGCTGT	GTTTAGTAAT	AGAACTCTTG	CTTGCTTTGC
6001	TATTTACACC	ACAAAGGAAA	AAGCTGCACT	GTTATACAAG	AAAATTATGG	AAAAATATTC
6061	TGTAACCTTT	ATAAGTAGGC	ATAACAGTTA	TAATCATAAC	ATACTGTTTT	TTCTTACTCC

FIG. 14B

```

6121 ACACAGGCAT AGAGTGTCTG CTATTAATAA CTATGCTCAA AAATTGTGTA CCTTTAGCTT
6181 TTTAATTTGT AAAGGGGTTA ATAAGGAATA TTTGATGTAT AGTGCCTTGA CTAGAGATCA
6241 TAATCAGCCA TACCACATTT GTAGAGGTTT TACTTGCTTT AAAAAACCTC CCACACCTCC
6301 CCCTGAACCT GAAACATAAA ATGAATGCAA TTGTTGTTGT TAACCTGTTT ATTGCAGCTT
6361 ATAATGGTTA CAAATAAAGC AATAGCATCA CAAATTTTAC AAATAAAGCA TTTTTTTCAC
6421 TGCATTCTAG TTGTGGTTTG TCCAAACTCA TCAATGTATC TTATCATGTC TGGATCGGCT
6481 GGATGATCCT CCAGCGCGGG GATCTCATGC TGGAGTTCTT CGCCCACCCC AACTTGTTTA
6541 TTGCAGCTTA TAATGGTTAC AAATAAAGCA ATAGCATCAC AAATTTTACA AATAAAGCAT
6601 TTTTTTCACT GCATTCTAGT TGTGGTTTGT CCAAACCTCAT CAATGTATCT TATCATGTCT
6661 GTATACCGTC GACCTCTAGC TAGAGCTTGG CGTAATCATG GTCATAGCTG TTTCTGTGT
6721 GAAATTGTTA TCCGCTCACA ATTCCACACA ACATACGAGC CGGAAGCATA AAGTGTAAG
6781 CCTGGGGTGC CTAATGAGTG AGCTAACTCA CATTAAATGCG GTTGCGCTCA CTGCCGCTT
6841 TCCAGTCGGG AAACCTGTCTG TGCCAGCTGC ATTAATGAAT CGGCCAACGC GCGGGGAGAG
6901 GCGGTTTGCG TATTGGGCGC TCTTCCGCTT CCTCGCTCAC TGACTCGCTG CGCTCGGTCTG
6961 TTCGGCTGCG GCGAGCGGTA TCAGCTCACT CAAAGGCGGT AATACGGTTA TCCACAGAAT
7021 CAGGGGATAA CGCAGGAAAG AACATGTGAG CAAAAGGCCA GCAAAAGGCC AGGAACCGTA
7081 AAAAGGCCGC GTTGCTGGCG TTTTTCATA GGCTCCGCCC CCCTGACGAG CATCACAAAA
7141 ATCGACGCTC AAGTCAGAGG TGGCGAAACC CGACAGGACT ATAAAGATAC CAGGCGTTTC
7201 CCCCTGGAAG CTCCCTCGTG CGCTCTCCTG TTCCGACCCT GCCGCTTACC GGATACCTGT
7261 CCGCCTTTCT CCCTTCGGGA AGCGTGCGC TTTCTCAATG CTCACGCTGT AGGTATCTCA
7321 GTTCGGTGTA GGTGCTTCGC TCCAAGCTGG GCTGTGTGCA CGAACCCCCC GTTCAGCCCCG
7381 ACCGCTGCGC CTTATCCGGT AACTATCGTC TTGAGTCCAA CCCGGTAAGA CACGACTTAT
7441 CGCCACTGGC AGCAGCCACT GGTAACAGGA TTAGCAGAGC GAGGTATGTA GGCGGTGCTA
7501 CAGAGTTCTT GAAGTGGTGG CCTAACTACG GCTACACTAG AAGGACAGTA TTTGGTATCT
7561 GCGCTCTGCT GAAGCCAGTT ACCTTCGGAA AAAGAGTTGG TAGCTCTTGA TCCGGCAAAC
7621 AAACCACCGC TGGTAGCGGT GGTTTTTTTT TTTGCAAGCA GCAGATTACG CGCAGAAAAA
7681 AAGGATCTCA AGAAGATCCT TTGATCTTTT CTACGGGGTC TGACGCTCAG TGAACGAAA
7741 ACTCACGTTA AGGGATTTTG GTCATGAGAT TATCAAAAAG GATCTTCACC TAGATCCTTT
7801 TAAATTAATA ATGAAGTTT AAATCAATCT AAAGTATATA TGAGTAACT TGGTCTGACA
7861 GTTACCAATG CTTAATCAGT GAGGCACCTA TCTCAGCGAT CTGTCTATTT CGTTCATCCA
7921 TAGTTGCCGT ACTCCCCGTC GTGTAGATAA CTACGATACG GGAGGGCTTA CCATCTGGCC
7981 CCAGTGCTGC AATGATACCG CGAGACCCAC GCTCACCAGC TCCAGATTTA TCAGCAATAA
8041 ACCAGCCAGC CGGAAGGGCC GAGCGCAGAA GTGGTCTGTC AACTTTATCC GCCTCCATCC
8101 AGTCTATTAA TTGTTGCCGG GAAGCTAGAG TAAGTAGTTC GCCAGTTAAT AGTTTGCGCA
8161 ACGTTGTTGC CATTGCTACA GGCATCGTGG TGTACGCTC GTCGTTTGGT ATGGCTTCAT
8221 TCAGCTCCGG TTCCCAACGA TCAAGGCGAG TTACATGATC CCCCATGTTG TGCAAAAAAG
8281 CGGTTAGCTC CTTCGGTCCT CCGATCGTTG TCAGAAGTAA GTTGGCCGCA GTGTTATCAC
8341 TCATGGTTAT GGCAGCACTG CATAATTCTC TTAATGTCAT GTCATCCGTA AGATGCTTTT
8401 CTGTGACTGG TGAGTACTCA ACCAAGTCAT TCTGAGAATA GTGTATGCGG CGACCGAGTT
8461 GCTCTTGCCC GGCGTCAATA CGGGATAATA CCGCGCCACA TAGCAGAACT TTAAAAGTGC
8521 TCATCATTTG AAAACGTTCT TCGGGGCGAA AACTCTCAAG GATCTTACCG CTGTTGAGAT
8581 CCAGTTCGAT GTAACCCACT CGTGACCCCA ACTGATCTTC AGCATCTTTT ACTTTCACCA
8641 GCGTTTCTGG GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC AAAATGCCGC AAAAAAGGGA ATAAGGGCGA
8701 CACGGAATG TTGAATACTC ATACTCTTCC TTTTCAATA TTATTGAAGC ATTTATCAGG
8761 GTTATTGTCT CATGAGCGGA TACATATTTG AATGTATTTA GAAAAATAAA CAAATAGGGG
8821 TTCCGCGCAC ATTTCCCCGA AAAGTGCCAC CTGACGTC

```

FIG. 14C

V_K sritis

CD40
DIVLTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQSISDY³⁰LHWYQQKSHESPRLLIK⁴⁰
|
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIY*

	50	60	70	80	90	100					
CD40	YASH	ISGIP	SRFSGSGSGS	DFTL	SINSE	VEDVGIY	CQHGH	SFPWT	FGGG	TKLEIK	
VKIII/JK4	DASN	RATGI	PARFSGSGSGT	DFTL	TISSE	LEPEDF	AVY	CQORSN	WPLT	TFGGG	TKVEIK

 V_H sritis

	1	10	20	30	40
CD40	QIQLVQSGPELKKPGETVRISSCKASGYAFTTGTGMQWVQE				MPGKGLKWIG
VH7	QVLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYAMNNWVRQA				PQGGL EWMG

	50	60	70	80	abc	90
CD40	WINTHSGVPKYVEDFKGRFAFSL	ETSA	NTAYLQ	ISNL	KNED	TATYFCVR
VH7	WINTNTGNPTYAQGFTGRFVFS	LDTS	VS	TAYLQ	ISSL	KAEDTAVYYCAR

	110
CD40	SGNGNYDLAYFAYWGQGLVTVSA
JH4	YFDYWGQGLVTVSS

FIG. 15

FIG. 16

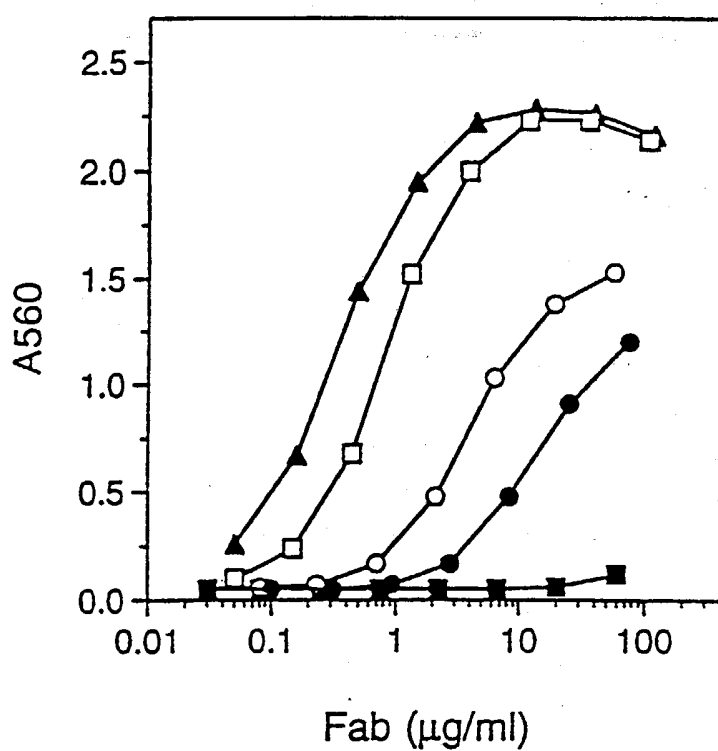


FIG. 17

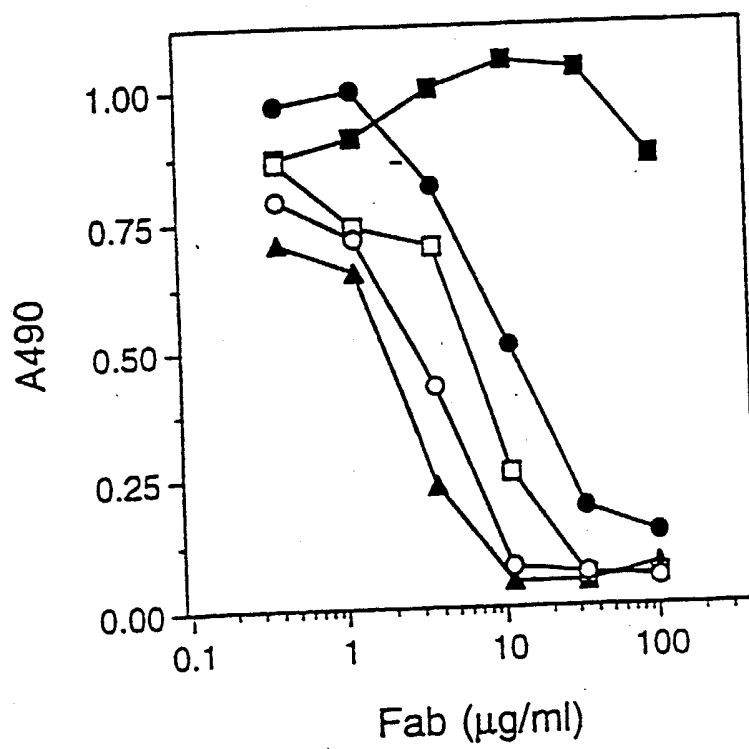


FIG. 18A

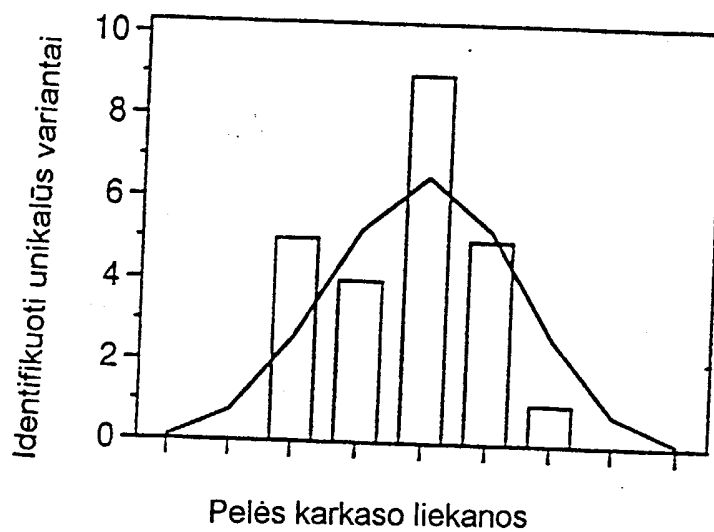


FIG. 18B

