



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2014103168/10, 31.01.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
31.01.2014

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 31.01.2014

(43) Дата публикации заявки: 10.08.2015 Бюл. № 22

(45) Опубликовано: 27.05.2016 Бюл. № 15

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: EP 1969127 A2, 17.09.2008. RU 2488633 C1, 27.07.2013. DB "EBI Dbfetch" AGM62863, размещена 30.05.2013. US 7220569 B2, 22.05.2007.

Адрес для переписки:

119071, Москва, Ленинский проспект, 33 стр.2
ФИЦ Биотехнологии РАН, патентная группа

(72) Автор(ы):

Ковнир Сергей Владимирович (RU),
Орлова Надежда Александровна (RU),
Воробьев Иван Иванович (RU),
Ходак Юлия Владимировна (RU),
Дронина Мария Алексеевна (RU),
Смирнов Иван Витальевич (RU),
Пономаренко Наталья Александровна (RU),
Скрябин Константин Георгиевич (RU),
Габибов Александр Габитович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

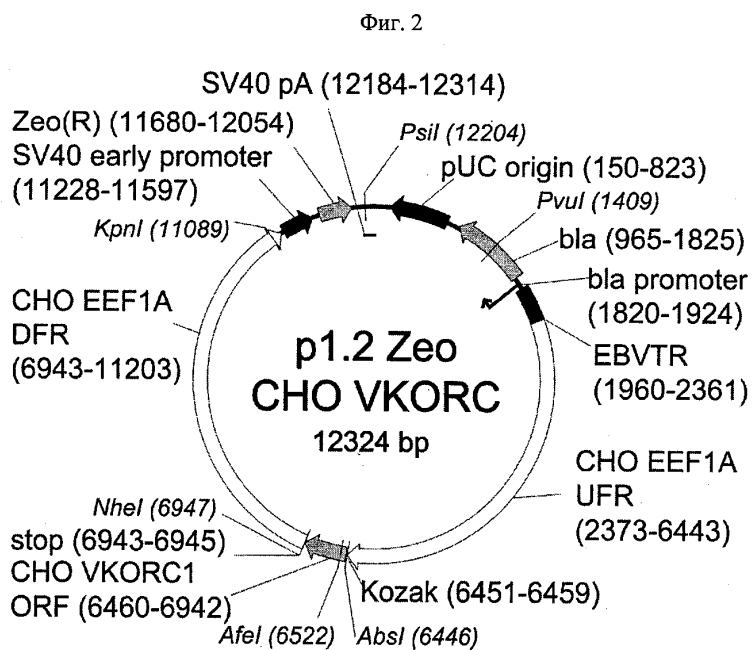
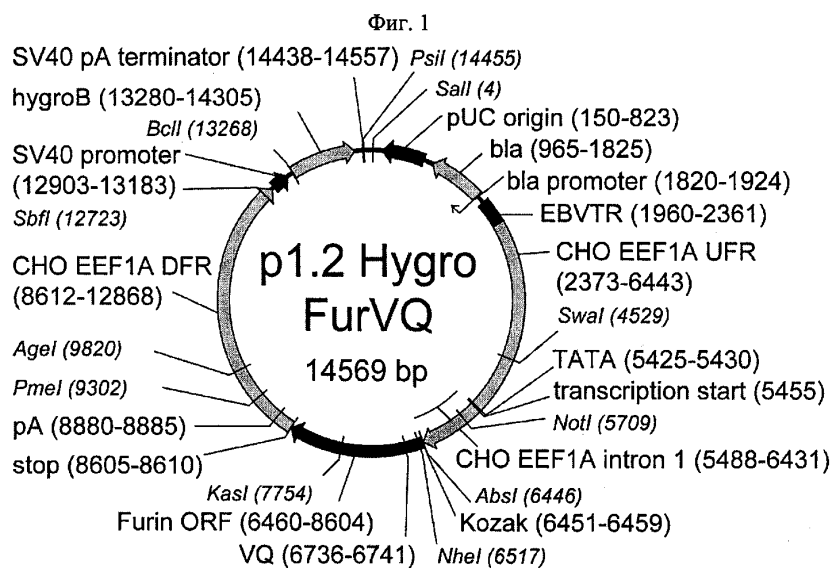
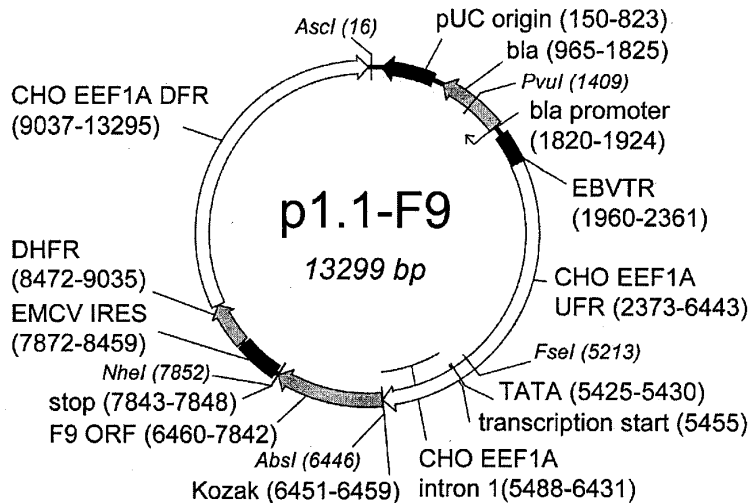
Федеральное государственное учреждение
"Федеральный исследовательский центр
"Фундаментальные основы биотехнологии"
Российской академии наук"(ФИЦ
Биотехнологии РАН) (RU),
Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт
биоорганической химии им. академиков
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук (RU)

(54) ПЛАЗМИДА ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ РЕКОМБИНАНТНОГО ФАКТОРА СВЕРТЫВАЕМОСТИ КРОВИ IX ЧЕЛОВЕКА, КЛЕТКА СНО - ПРОДУЦЕНТ РЕКОМБИНАНТНОГО ФАКТОРА СВЕРТЫВАЕМОСТИ КРОВИ IX ЧЕЛОВЕКА И СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ УКАЗАННОГО ФАКТОРА

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, в частности к рекомбинантной продукции факторов свертываемости крови, и может быть использовано для экспрессии фактора свертываемости крови IX человека (hFIX). Конструируют плазмиду для экспрессии hFIX в клетках СНО, состоящую из области начала репликации плазмиды pUC, открытой рамки считывания бета-лактамазы (bla) и прокариотического промотора гена bla; участка терминального повтора EBVTR, функционального промотора и первого интрона гена фактора элонгации 1 альфа китайского

хомячка, фланкированного 5' нетранслируемой областью этого гена; открытой рамки считывания гена, кодирующего hFIX; внутреннего сайта IRES EMCV; открытой рамки считывания DHFR, экспрессирующейся в составе бицистронной мРНК вместе с геном, кодирующим hFIX; и функционального терминатора гена фактора элонгации 1 альфа китайского хомячка, фланкированного 3' нетранслируемой областью этого гена. Изобретение позволяет повысить эффективность продукции hFIX. 3 н. и 12 з.п. ф-лы, 3 ил., 3 табл., 7 пр.



Фиг. 3



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 585 532** (13) **C2**

(51) Int. Cl.

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2014103168/10, 31.01.2014

(24) Effective date for property rights:
31.01.2014

Priority:

(22) Date of filing: 31.01.2014

(43) Application published: 10.08.2015 Bull. № 22

(45) Date of publication: 27.05.2016 Bull. № 15

Mail address:

119071, Moskva, Leninskij prospekt, 33 str. 2 FITS
Biotekhnologii RAN, patentnaja gruppa

(72) Inventor(s):

Kovnir Sergej Vladimirovich (RU),
Orlova Nadezhda Aleksandrovna (RU),
Vorobev Ivan Ivanovich (RU),
KHodak Yuliya Vladimirovna (RU),
Dronina Mariya Alekseevna (RU),
Smirnov Ivan Vitalevich (RU),
Ponomarenko Natalya Aleksandrovna (RU),
Skryabin Konstantin Georgievich (RU),
Gabibov Aleksandr Gabibovich (RU)

(73) Proprietor(s):

Federalnoe gosudarstvennoe uchrezhdenie
"Federalnyj issledovatel'skij tsentr
"Fundamentalnye osnovy biotekhnologii"
Rossijskoj akademii nauk"(FITS Biotekhnologii
RAN) (RU),
Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethoe
uchrezhdenie nauki Institut bioorganicheskoy
khimii im. akademikov M.M. SHemyakina i
YU.A. Ovchinnikova Rossijskoj akademii nauk
(RU)

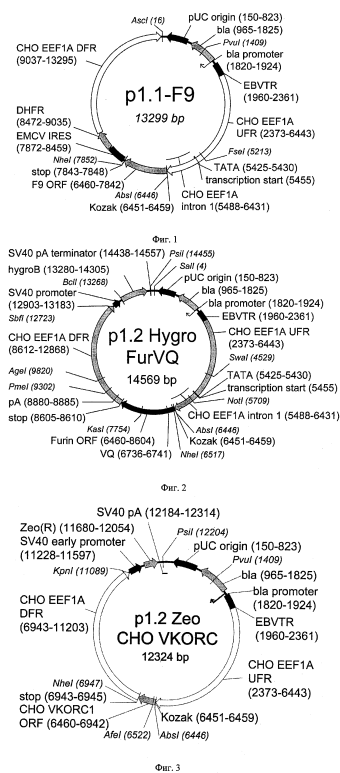
(54) **PLASMID FOR EXPRESSION OF HUMAN RECOMBINANT BLOOD CLOTTING FACTOR IX, CHO CELL PRODUCING HUMAN RECOMBINANT BLOOD CLOTTING FACTOR IX AND METHOD OF PRODUCING SAID FACTOR**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology, particularly to recombinant production of coagulation factors, and can be used for expression of human coagulation factor IX (hFIX). Method comprises constructing plasmid for expression of hFIX in CHO cells, consisting of field of replication start OF plasmid pUC, open reading frame of beta-lactamase (bla) and procariotic gene promoter bla; section of a terminal repetition EBVTR, functional promoter and first of elongation factor 1 alpha Chinese hamster, flanked 5' untranslated region of said gene; open reading frame gene coding hFIX; internal site IRES EMCV; open reading frame DHFR expressed in bicystronic mRNA together with gene coding hFIX; and functional terminator gene elongation factor 1 alpha Chinese hamster, flanked 3' untranslated region of said gene.

EFFECT: higher efficiency of product hFIX.
15 cl, 3 dwg, 3 tbl, 7 ex



Область применения

Изобретение относится к области биотехнологии, а именно к технологии получения биологически активных веществ (БАВ) методами генной инженерии, точнее к методам получения фактора свертываемости крови IX человека.

Актуальность

Фактор IX (FIX) - это элемент каскада свертывания крови, профермент сериновой протеазы, которая в присутствии Ca^{2+} и мембранных фосфолипидов гидролизует связь аргинин-изолейцин в молекуле фактора X с образованием активированного фактора X (FIXa). Каталитическая эффективность активированного фактора IX (FIXa) сильно возрастает при связывании кофактора активированного фактора свертывания крови VIII (FVIIIa). Нековалентный комплекс FIXa, FVIIIa и FX, связанных с фосфолипидной мембраной, называется «X-аза» или «теназа» и представляет собой основной элемент петли положительной обратной связи в каскаде свертывания крови.

FIX синтезируется в печени в виде неактивного белка-предшественника, который процессируется в эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи, где подвергается множественным посттрансляционным модификациям различных типов и секретируется в кровоток после протеолитического отщепления пропептида от N-конца молекулы. Циркулирующий зрелый FIX имеет молекулярную массу около 57 кДа и среднюю концентрацию в плазме крови около 90 нМ. В каскаде свертывания крови FIX активируется после протеолитического расщепления активированным фактором XI (внутренний путь) или активированным фактором VII (внешний путь) с образованием двух полипептидных цепей, связанных дисульфидной связью. Активированный FIX постепенно инактивируется, в основном путем медленного связывания с антитромбином III, нексином-2, белок Z зависимым ингибитором протеаз и рецепторами эндоцитоза гепатоцитов, а также подвергается расщеплению эластазой нейтрофилов.

FIX состоит из четырех структурных доменов - Gla-домена, двух ЭФР-подобных доменов (ЭФР - эпидермальный фактор роста) и C-концевого домена сериновой протеазы. N-концевой лидерный пептид FIX отделяется при транслокации полипептида в эндоплазматический ретикулум, пропептид, непосредственно предшествующий домену Gla, отделяется при секреции зрелого белка. Активационный пептид, расположенный между вторым ЭФР-подобным доменом и доменом сериновой протеазы, специфически отделяется факторами XIa или VIIa при активации FIX.

Gla-домен, расположенный N-конце молекулы зрелого FIX, обеспечивает связывание FIX и FIXa с поверхностью эндотелиальных клеток, причем такое взаимодействие полностью нарушается при блокировании γ -карбоксилирования остатков Asp в составе домена. Первый ЭФР-подобный домен FIX содержит высокоаффинный сайт связывания иона кальция, а также обуславливает взаимодействие FIX с фактором VIIIa и с тканевым фактором (фактором III). Второй ЭФР-подобный домен FIX принимает участие в образовании комплекса FIXa-FVIIIa-FX. Он соединяется с доменом сериновой протеазы при помощи активационного пептида и единственной дисульфидной связи.

Активационный пептид FIX содержит большую часть сайтов посттрансляционных модификаций, влияющих на свойства FIX. Домен сериновой протеазы составляет около половины общей массы FIX, содержащийся в нем активный сайт скрыт активационным пептидом и экспонируется после его отделения. Из всех посттрансляционных модификаций только γ -карбоксилирование в домене Gla непосредственно определяет прокоагуляционную активность FIX. Влияние остальных модификаций на функции FIX выражено в меньшей степени, в ряде случаев оно отсутствует или остается неизвестным.

Врожденное отсутствие функционального фактора IX или его низкий уровень

приводят к развитию гемофилии В, X-связанному рецессивному генетическому заболеванию, требующему проведения постоянной заместительной терапии препаратами фактора IX. Гемофилия В проявляется у одного из 30 тысяч человек. Первоначально терапия гемофилии В ограничивалась периодическими переливаниями плазмы крови, впоследствии замененными на более эффективные концентраты протромбинового комплекса - смеси витамин К-зависимых факторов свертывания крови IX, II, VII и X. Основным ограничением такой терапии был существенный риск развития тромботических эпизодов. Лекарственные препараты FIX с большей степенью чистоты были получены из фракций плазмы крови, разделяемой методом Кона, при помощи дополнительной очистки ионообменной хроматографией. Безопасность плазменных концентратов FIX также лимитируется существенным уровнем примеси активированного FIX (FIXa) и остаточных количеств других факторов свертывания, достаточных для увеличения риска возникновения тромботических эпизодов. Дополнительная очистка FIX при помощи иммуноаффинной хроматографии позволяет полностью удалить эти примеси, однако, как и в случае других продуктов переработки плазмы крови, риск вирусного или: прионного инфицирования больных не может быть полностью устранен.

В настоящий момент зарегистрирован один лекарственный препарат рекомбинантного FIX - нонаког альфа (торговое название Бенефикс), одобренный для применения в США и странах ЕС в 1997 г. Нонаког альфа получают в клетках CHO, культивируемых в питательной среде, не содержащей сыворотки или других продуктов животного происхождения. Выделение и очистку рекомбинантного FIX проводят при помощи четырех хроматографических стадий, не используя иммуноаффинную хроматографию, потенциально присутствующие вирусы удаляют при помощи нанофильтрации на фильтре с порогом отсека 70 кДа. В готовой лекарственной форме нонакога альфа не используется альбумин человека. Таким образом, в процессе получения лекарственного препарата исключено использование веществ животного происхождения и компонентов донорской плазмы.

Предшествующий уровень техники

В исходных работах, описывающих экспрессию FIX в клетках CHO, обнаружено, что секретируемый FIX содержит значительную долю неактивных молекул с непротессированным пропептидом. Полное или почти полное отщепление пропептида достигается только при коэкспрессии субтилизин/кексин-подобной конвертазы PACE/furin или гомологичной ей конвертазы PC5. Прокоагулянтная активность FIX зависит от уровня γ -карбоксилирования домена Gla - в полностью активном FIX первые 10 остатков Glu должны быть конвертированы в остатки Gla, при этом уровень конверсии двух последних остатков Glu не влияет на свойства FIX. В молекуле природного FIX все 12 остатков Glu в домене Gla полностью γ -карбоксилированы, в то время как в рекомбинантном FIX, получаемом в клетках CHO, уровень модификации двух последних остатков Glu несколько снижен. Общее число остатков Gla в рекомбинантном FIX из клеток CHO достигает 11,5 на одну молекулу белка. Удельная Прокоагулянтная активность такого FIX составляет не менее 200 МЕ/мг и не отличается от удельной активности природного FIX.

Основной методический подход к созданию эукариотических продуцентов рекомбинантного фактора IX человека в клетках млекопитающих описан в патенте США 4,770,999. Продуценты рекомбинантного фактора IX на основе клеток CHO были получены при помощи экспрессионного вектора p91023-IX, содержащего энхансер вируса SV40, область открытой рамки считывания фактора IX под контролем промоторного участка поздних генов аденовируса AdMLP, гены аденовируса VA и

область ОРС дигидрофолатредуктазы мыши. При препаративной трансфекции плазмиды р91023-1X было ко-трансфицировано вместе с вспомогательной плазмидой рAd26SVpA3, кодирующей ген дигидрофолатредуктазы под контролем промотора MLP и ориджин репликации SV40. Популяцию стабильно трансфицированных клеток культивировали в присутствии возрастающих концентраций метотрексата (до 20 мкМ), при этом концентрация секретируемого фактора IX, измеренная при помощи ИФА, увеличилась от 0,015 мг/л до 43,4 мг/л. При добавлении в ростовую среду витамина K1 до 10 мкг/мл и последующем культивировании в ней клеток наиболее продуктивной популяции скорость секреции активного фактора IX составила 0,268 МЕ/мл/день, таким образом, удельная активность секретируемого фактора IX составила около 9% от нормальной.

Основной причиной недостаточности удельной активности рекомбинантного фактора IX, секретируемого клетками CHO, являлся низкий уровень процессинга пропептида протеазами семейства PACE/furin в аппарате Гольджи клеток CHO. При ко-экспрессии PACE человека клетками-продуцентами фактора IX наблюдалось увеличение активности секретируемого фактора IX с 0,17 до 0,33 МЕ/мл (концентрация всех форм фактора IX - 30 мг/л, удельная активность 11 МЕ/мг), при этом по данным иммунопреципитации молекулы фактора IX с неотщепленным пропептидом практически не обнаруживались (Wasley L.C., Rehemtulla A., Bristol J.A., Kaufman R.J. // J. Biol. Chem. 1993. V.268. №12. P.8458-8465.). Аналогичные данные были получены для растворимого укороченного варианта PACE человека (PACE) с удаленным трансмембранным доменом.

Молекулы рекомбинантного фактора IX с неудаленным пропептидом могут быть специфически отделены от молекул зрелого белка при помощи анионообменной хроматографии, как описано в Европейской патентной заявке EP 0705901 A2, однако степень разделения этих двух форм фактора IX не превышает 10.

Другие известные клональные линии-продуценты рекомбинантного фактора IX следующие:

1. Описанный в Европейском патенте EP 0430930 B1 клон С6, полученный путем трансфекции линии клеток почки собаки MDCK плазмидой рIJ5/9, включающей область ОРС кДНК фактора IX человека под контролем промотора SV40 и маркер устойчивости к действию неомицина. Клон С6 обладает максимальной продуктивностью 0,375 мг/л фактора IX на 8 днях культивирования (данные ИФА, удельная активность после очистки 91% от нормальной, предположительный уровень секреции активного фактора IX 0,094 МЕ/мл).

2. Описанный в Европейской патентной заявке EP 2164971 A2 клон GFSC- 15, полученный путем ко-трансфекции клеток линии CHO DG-44 плазмидой рMSG-FIXI, содержащей область ОРС и укороченный первый интрон из кДНК фактора IX человека под контролем промотора SV40 и области ассоциации с ядерным матриксом (MAR) из гена бета-глобина человека, а также плазмидой, кодирующей дигидрофолатредуктазу мыши, с последующей трансфекцией полученной линии-продуцента аналогичными по структуре плазмидами, кодирующими вспомогательные гены фурина человека и гамма-карбоксилазы человека. Удельная продуктивность лучшей клональной линии-продуцента GFSC-15 составила 4,4 мкг/млн клеток/день (данные ИФА), максимальная активность секретируемого фактора IX в культуральной среде - около 2,3 МЕ/мл на 10 днях культивирования с дополнительным внесением питательных веществ на 5-й день.

3. Поликлональная популяция Нек293/FIX_{D359v}LXIN, описанная в патентной заявке РСТ WO 2011011841 A1 и полученная инфицированием клеток линии почки человека НЕК 293 дефектными по репликации ретровирусными частицами, полученными при

помощи вектора рLXIN. Описанный максимальный уровень секреции мутеина фактора IX - 11,8 МЕ/мл. Мутация фактора IX B359V приводит к многократному увеличению уровня секреции фактора IX клетками, однако применение мутеина в качестве лекарственного средства для терапии гемофилии В представляется затруднительным

из-за риска увеличения числа больных, вырабатывающих нейтрализующие антитела.

4. Моноклональная линия Nuh7-CD4, описанная в Европейской патентной заявке EP 2496252 A1 и полученная трансфекцией линии иммортализованных гепатоцитов человека Nuh7 плазмидой рсDNAFIXwt, кодирующей ОРС фактора IX человека под контролем немедленного раннего промотора цитомегаловируса (CMV), селективный маркер - ген устойчивости к неомицину. При культивации линии-продуцента в бессывороточной среде в роллерных бутылках достигнута удельная продуктивность около 0,8 мкг/2 млн клеток/день, удельная активность секретируемого продукта превышала удельную активность стандарта фактора IX приблизительно в полтора раза.

5. Клон #6, описанный в патенте США US 7375084 B2, полученный трансфекцией линии НЕК 293 плазмидой рCMV-FIX-нео, кодирующей фактор IX под контролем промотора CMV и содержащей ген устойчивости к неомицину, с последующей трансфекцией вспомогательной плазмиды рCMV-VKORC I - EDHpro, кодирующей ОРС кофактора 1 витамин-К-оксиредуктазы человека. Удельная продуктивность клона #6 составила 3,3 МЕ/млн клеток/день (26 мкг/млн клеток/день по данным ИФА). Несмотря на относительно высокий уровень секреции, полученный для линий-продуцентов на основе клеток человека НЕК 293, применимость данной системы экспрессии для получения лекарственных средств рекомбинантного фактора IX ограничена, поскольку культивируемые клетки человека с большей вероятностью могут содержать опасные для человека вирусы и онкогены человека, остаточные количества которых могут контаминировать целевой продукт.

Наиболее близкий по технической реализации аналог настоящего изобретения - это описанный в Европейской патентной заявке EP 1969127 A2 клон 130-17 и его аналоги, полученные путем последовательной трансфекции клеток линии СНО плазмидой, кодирующей ОРС фактора IX человека под контролем промотора гена фактора элонгации 1 альфа китайского хомячка (промотор CHEF-I или EEF1A), селекции популяции стабильно трансфицированных клеток, последующей трансфекции плазмид, кодирующих вспомогательные гены витамин-К зависимой гамма-карбоксилазы (VKGC) и витамин-К эпоксиредуктазы (VKOR или VKORC1), отбора наиболее продуктивных клонов стабильно трансфицированных клеток, повторной трансфекции плазмидой, кодирующей VKOR и окончательного отбора клонов продуцентов. При культивировании полученного таким образом клона 130-17 в перемешиваемых колбах без смены среды в течение 18 дней конечная активность секретируемого фактора IX составила 7,75 МЕ/мл (31 мг/л "активного фактора IX", доля активного фактора IX - 64%).

Описанная в патентной заявке EP 1969127 A2 система экспрессии фактора IX человека в клетках СНО позволяет получать целевой белок в достаточно больших количествах при очень длинном периоде культивирования - 18 дней, однако целевой продукт может быть загрязнен существенными количествами фактора IX с непротессированным пропептидом вследствие того, что при получении клона 130-17 и родственных клонов не была проведена трансфекция клеток геном сигнальной протеазы PACE/furin человека. Данные о конкретном уровне процессинга пропептида в секретируемом факторе IX в патентной заявке EP 1969127 A2 не приведены.

Краткое описание настоящего изобретения

Технической задачей, решаемой авторами, являлось создание высокопродуктивной технологии получения рекомбинантного фактора свертываемости крови IX человека для биофармацевтического производства.

5 Технический результат достигался путем создания новой экспрессионной плазмидной ДНК p1.1-F9, кодирующей открытую рамку считывания белка фактора свертываемости крови IX человека и создания на ее основе клональной клеточной линии-продуцента.

В основе данной технологии лежит разработанная плазмидная ДНК p1.1-F9 длиной 13299 п.о. (SEQ ID NO:1, Фиг.1), состоящая из:

10 - фрагмента ДНК, длиной 1406 п.о., содержащего синтетическую последовательность Козак (сайт связывания рибосом, SEQ ID NO:1 6451 - 6459), обеспечивающую инициацию трансляции мРНК, последовательность 1383 п.о. (SEQ ID NO:1 6460-842), кодирующую ОРС фактора свертываемости крови IX человека и блок стоп-кодонов (SEQ ID NO:1 7843-7848)

15 - фрагмента 11893 п.о. плазмиды p1.1 (SEQ ID NO:1 7852-6445), содержащего регуляторные элементы, обеспечивающие экспрессию целевого белка:

- 5' и 3' нетранслируемые области (НТО) гена фактора элонгации 1 альфа китайского хомячка включающие соответственно функциональный промотор (5' НТО) и терминатор и сигнал полиаденилирования (3'НТО) этого гена, а также фланкирующие
20 нетранскрибируемые области этого гена, обеспечивающие эухроматинизацию сайтов инсерции и транскрипционную активность генетической кассеты в геноме CHO;

- последовательность фактора устойчивости трансфицированных клеток к воздействию метотрексата - дигидрофолатредуктазы (DHFR) и регуляторные элементы для экспрессии DHFR - последовательность IRES вируса энцефаломиокардита. (EMCV),
25 обеспечивающая бицистронную экспрессию в животных клетках и сигнал полиаденилирования.

- область начала репликации плазмиды pUC, открытую рамку считывания бета-лактамазы (bla) и прокариотический промотор гена bla, обеспечивающей устойчивость бактерий к антибиотику ампициллину, позволяющие проводить препаративную
30 наработку плазмиды в E. coli.

Плазида p1.1-F9 содержит уникальные сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции AscI (16), PvuI (1409), FseI (5213), AbsI (6446), NheI (7852).

Плазида была введена в клетки CHO DG-44 методом липосомальной трансфекции (Straus S.E. et al, J. Virol., 1981, Jul; 39(1):290-4). При помощи культивирования в
35 безбелковой среде, не содержащей гипоксантин и тимидин, и дополнительно содержащей 200 нМ ингибитора DHFR метотрексата (MTX) были получены олигоклональные линии стабильно трансфицированных клеток. Для отобранной олигоклональной линии с высокой продуктивностью была проведена амплификация кассеты в геноме путем последовательных культивировании в присутствии возрастающих концентраций
40 метотрексата. Была получена поликлональная линия клеток, устойчивых к высокой концентрации метотрексата и продуцирующая увеличенные количества целевого белка, и использована для клонирования методом предельного разведения. Полученные клоны клеток-продуцентов были проанализированы методами иммуоферментного анализа и коагулометрии и были отобраны клоны, дающие максимальный уровень экспрессии
45 целевого белка. Амплификация векторной вставки была произведена при действии метотрексата в максимальной концентрации 4 мкМ. В выбранный клон методом электротрансфекции (Straus S.E. et al, J. Virol., 1981, Jul; 39(1):290-4) были последовательно введены дополнительные плазмиды p1.2-Zeo-CHO-VKORC1 и p1.2-Hygro-FurVQ,

кодирующие гены укороченного растворимого варианта сигнальной протеазы PACE/furin человека и витамин-К эпоксиредуктазы (VKOR или VKORC1) китайского хомячка, соответственно, и обеспечивающие высокий уровень посттрансляционного процессинга молекул синтезируемого клетками фактора IX до биологически активной формы.

- 5 Трансфицированные плазмидой p1.2-Zeo-CHO-VKORC1 клетки культивировали в присутствии 1 мг/мл зеоцина до восстановления жизнеспособности клеток более 85%. Клетки данной популяции трансфицировали плазмидой p1.2-Hygro-FurVQ и культивировали в присутствии 750 мкг/мл гигромицина до восстановления жизнеспособности клеток более 90%. Была получена популяция клеток, секретирующих
- 10 более 1,5 МЕ/млн клеток/день активного фактора IX с долей молекул фактора IX с непротессированным пропептидом менее 75%. Клетки данной популяции подвергли клонированию методом предельных разведений. Полученные клоны клеток-продуцентов были проанализированы методами иммуноферментного анализа и коагулометрии. Были отобраны клоны, дающие максимальный уровень секреции биологически
- 15 активного фактора IX.

- Среди них был выбран клон P1.1-F9/3B12-86, при культивировании которого в суспензионной культуре в бессывороточной среде в отсутствии селекционных агентов (метотрексата и антибиотиков) конечная активность фактора IX составляла 3,5 МЕ/мл (удельная активность 190 МЕ/мг) при концентрации клеток 1,25 млн клеток/мл,
- 20 время культивации 3 дня. Полученная клеточная линия P1.1-F9/3B 12-86 депонирована в Специализированную Коллекцию Культур Клеток позвоночных Института Цитологии РАН, Российской Коллекции Клеточных культур 05.02.2013 под номером РККК (П) 755Д.

- Целью настоящего изобретения является предоставление плазмиды для экспрессии
- 25 рекомбинантного фактора свертываемости крови IX человека, в частности плазмиды p1.1-F9. Также целью настоящего изобретения является предоставление моноклональной линии клеток млекопитающего, в частности клеток яичника китайского хомячка, P1.1-F9/3B 12-86 - продуцентов рекомбинантного фактора свертываемости крови IX человека, содержащей в геноме множественные копии экспрессионной кассеты, соответствующей
- 30 линеаризованной экспрессионной плазмиде, в частности плазмиды p1.1-F9. Иллюстративным примером указанной моноклональной линии клеток являются клетки яичника китайского хомячка клона P1.1-F9/3B 12-86.

- Также целью настоящего изобретения является предоставление способа получения рекомбинантного фактора свертываемости крови IX человека с использованием
- 35 указанных клеток.

Подробное описание настоящего изобретения

- Для реализации настоящего изобретения главной технической задачей явилось создание технологии высокопродуктивного получения рекомбинантного фактора свертываемости крови IX для биофармацевтического производства с использованием
- 40 культивируемых клеток яичника китайского хомячка, адаптированных к суспензионному культивированию в безбелковой среде, содержащих в геноме множественные копии генетической кассеты, представляющей собой линеаризованную экспрессионную плазмиду, содержащую фрагмент ДНК, кодирующий фактор свертываемости крови IX под контролем промотора и регуляторных элементов, функционирующих в
- 45 эукариотической клетке.

Термин «экспрессионная плаزمида» («экспрессионная плазмидная ДНК») означает плазмидную ДНК, содержащую все необходимые генетические элементы для экспрессии внедренного в него гена, например, такие как промотор, терминатор, сигнал

полиаденилирования. Конкретным примером генетических элементов, необходимых для экспрессии рекомбинантного фактора свертываемости крови IX в составе экспрессионной кассеты согласно настоящему изобретению, является, но не ограничивается им, промотор гена фактора элонгации 1 альфа китайского хомячка.

Фрагментом ДНК, кодирующим рекомбинантный фактор свертываемости крови IX согласно настоящему изобретению, является ген, кодирующий ОРС полипептида фактора IX, который может быть получен, например, как указано в Примере 1. Также указанный фрагмент ДНК может быть получен, например, с использованием технологии клонирования фирмы Sloning BioTechnology, описанной в заявке РСТ WO 2005071077.

Последовательность гена, кодирующего ОРС рекомбинантного фактора свертываемости крови IX человека согласно настоящему изобретению, представлена в Перечне последовательностей под номером SEQ ID NO:1 (нуклеотиды 6460-7842).

Аминокислотная последовательность секретируемого фактора свертываемости крови IX человека согласно настоящему изобретению представлена в Перечне последовательностей под номером SEQ ID NO:2, и представляет собой продукт трансляции нуклеотидов 6460 - 7842 последовательности ОРС SEQ ID NO:1 без 18 первых аминокислот секреторного лидерного пептида и пропептида.

Чтобы обеспечить эффективную трансляцию гена в клетках китайского хомячка, предпочтительно, чтобы ОРС предварялась последовательностью для кэп-зависимой инициации трансляции (последовательность Козак), например, синтетической.

Фрагменты ДНК, которые кодируют по существу тот же белок, могут быть получены, например, путем модификации нуклеотидной последовательности фрагмента ДНК (SEQ ID NO:1 нуклеотиды 6460 - 7842), например, посредством метода сайт-направленного мутагенеза, так, что один или несколько аминокислотных остатков в определенном сайте будут делегированы, заменены, вставлены или добавлены.

Фрагменты ДНК, модифицированные, как описано выше, могут быть получены с помощью традиционных методов обработки с целью получения мутации. Фрагменты ДНК, которые кодируют по существу такой же функциональный белок, могут быть выявлены путем экспрессии фрагментов ДНК, имеющих мутацию, описанную выше, в соответствующей клетке и установления активности экспрессируемого продукта.

Фактор IX свертывания крови (FIX) - это профермент сериновой протеазы, которая в присутствии Ca^{2+} и мембранных фосфолипидов гидролизует связь аргинин-изолейцин в молекуле фактора X с образованием активированного фактора X (FXa).

Природный фактор свертываемости крови IX человека в кровотоке преимущественно представляет собой гликопротеин с молекулярной массой около 57 кДа.

Рекомбинантный фактор свертываемости крови IX полностью сохраняет прокоагулянтную (биологическую) активность, при этом его удельная прокоагулянтная активность, выраженная в международных единицах на один миллиграмм чистого белка составляет 200-250 МЕ/мг.

Показатели функциональной активности, при которой считается, что полученный белок обладает свойствами рекомбинантного фактора свертываемости крови IX человека, определяются по его способности уменьшать время свертывания (коагуляции) плазмы крови человека с удаленным фактором IX в тесте активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ). Так, например, активность рекомбинантного фактора свертываемости крови IX человека можно детектировать по уменьшению времени образования сгустка в плазмы крови с удаленным фактором IX после смешивания исследуемого раствора фактора IX, плазмы крови с удаленным фактором IX, контактного активатора свертывания эллаговой кислоты, кислых фосфолипидных

мицелл и раствора хлорида кальция. Определяют время свертывания плазмы, смешанной с несколькими разведениями исследуемого раствора и сопоставляют измеренные времена образования сгустка с временами образования сгустка, полученными для нескольких разведений стандарта активности фактора IX - нормальной плазмы крови или раствора

5 изолированного фактора IX. Концентрацию фактора IX человека определяют при помощи иммуноферментного анализа в сравнении со стандартом - плазмой крови или раствором очищенного фактора IX с известным содержанием. Удельную активность фактора IX определяют как отношение прокоагулянтной активности и концентрации фактора IX и выражают в МЕ/мг. Считается, что вариант белка обладает свойствами

10 рекомбинантного фактора IX свертываемости крови человека при условии, что удельная активность указанного варианта составляет не ниже 10% от удельной активности природного фактора IX человека, то есть не менее 20 МЕ/мг.

Экспрессионная плазида согласно настоящему изобретению содержит фрагмент ДНК, кодирующий фактор свертываемости крови IX под контролем промотора и

15 регуляторных элементов, функционирующих в эукариотической клетке. В качестве рекомбинантной плазмиды согласно настоящему изобретению могут использоваться различные плазмиды, обладающие способностью к экспрессии в клетке-реципиенте, такие как плазмиды pсDNA3.1, pCMV-Мус, pDEF38 и подобные им, но список плазмид не ограничивается ими.

20 Конкретным вариантом реализации настоящего изобретения является плазида р1.1-F9 длиной 13299 п.о. (SEQ ID NO 1), которая содержит следующие функциональные элементы, перечисленные в порядке их расположения:

1. область начала репликации плазмиды рUC (150-283), открытую рамку считывания бета-лактамазы (Ыа) и прокариотический промотор гена bla (965 - 1924) - позволяющие

25 проводить препаративную наработку плазмиды в E.coli.

2. фрагмент конкатемера терминальных повторов вируса Эпштейна-Барр (1960-2361) - обеспечивающей увеличение частоты интеграции генетической кассеты в геном клеток СНО и увеличение скорости амплификации кассеты в геноме.

3. фрагмент последовательности, фланкирующей ген фактора элонгации 1 альфа китайского хомячка «выше по течению» (2373-6443), включающий нетранскрибируемые области этого гена, промотор этого гена, первый интрон этого гена, обеспечивающий конститутивную экспрессию гена фактора IX человека в геноме клеток СНО;

30

4. синтетическую последовательность Козак (сайт связывания рибосом) (6451-6459), обеспечивающую кэп-зависимую инициацию трансляции мРНК в животных клетках;

35 5. последовательность, кодирующую открытую рамку считывания фактора свертываемости крови IX человека (6460-7842) и блок стоп-кодона (7843-7848)

6. последовательность внутреннего сайта связывания рибосом вируса энцефаломиокардита EMCV (7872-8459), обеспечивающая кэп-независимую инициацию трансляции второго цистрона бицистронной РНК в животных клетках;

40 7. последовательность, кодирующую открытую рамку считывания дигидрофолатредуктазы (8472-9035) - фактора устойчивости трансфицированных клеток к воздействию метотрексата;

8. фрагмент последовательности, фланкирующей ген фактора элонгации 1 альфа китайского хомячка «ниже по течению» (9037 - 13295), включающий терминатор и

45 сигнал полиаденилирования, а также нетранскрибируемые области этого гена, обеспечивающий конститутивную экспрессию гена фактора IX человека в геноме клеток СНО.

Плазида р1.1-F9 содержит уникальные сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции

Asci (16), PvuI (1409), FseI (5213), AclI (6446), NheI (7852). Структура плазмиды p1.1-F9 приведена на Фигуре 1.

Плазмида p1.1-F9 сконструирована на базе экспрессионной плазмиды p1.1, разработанной авторами настоящего изобретения ранее и подробно описанной в патентной заявке РФ 2011146243, целиком включенной в настоящее описание посредством ссылки. Плазмида p1.1 содержит функциональные промотор и терминатор гена фактора элонгации 1 альфа китайского хомячка, обеспечивающие конститутивную экспрессию целевого гена в клетках СНО, фланкированные 5' и 3' НТО этого гена, обеспечивающими эухроматинизацию сайтов интеграции экспрессионной кассеты в геном СНО; участок для клонирования открытых рамок считывания целевых белков; внутренний сайт связывания рибосом вируса энцефаломиокардита (EMCV IRES), обеспечивающий реинициацию трансляции на бицистронной мРНК в клетках млекопитающих и полное генетическое сцепление уровней продукции целевого белка и DHFR; OPC DHFR мыши, экспрессирующуюся в составе бицистронной мРНК вместе с целевым геном (IRES DHFR) и обеспечивающую устойчивость стабильно трансфицированных клеток к отсутствию в среде тимидина и дозозависимую устойчивость к воздействию метотрексата (MTX), что позволяет вести направленную селекцию высокопродуктивных клонов с множественными копиями экспрессионной кассеты в геноме СНО; участок терминального повтора вируса Эпштейн-Барр человека (EBVTR), обеспечивающий повышенный уровень интеграции кассет в геном клеток СНО и ускорение процесса амплификации амплификации целевого гена в геноме под действием MTX. Использование плазмиды p1.1 позволяет осуществлять высокочастотную интеграцию и ускоренную амплификацию экспрессионной кассеты в клетках млекопитающих, а также получать линии-продуценты с высоким уровнем продукции целевого белка и высокой стабильностью.

При помощи созданной плазмиды согласно настоящему изобретению, в частности плазмиды p1.1-F9, можно трансформировать эукариотическую клетку, предпочтительно иммортализованную клетку китайского хомячка. Выбор конкретной линии клеток не является критическим, поскольку методология и приемы трансформации хорошо известны специалисту в данной области техники. После проведения одного или нескольких раундов селекции и клонирования популяции трансформированных клеток могут быть получены клональные линии-продуценты рекомбинантного фактора свертываемости крови IX человека. Методология и приемы селекции и клонирования клеток известны специалисту в данной области техники. И хотя в зависимости от вида клетки и условий культивирования и селекции трансформантов уровень экспрессии фактора свертываемости крови IX человека может варьироваться, факт транзientной экспрессии целевого белка будет иметь место при условии успешной трансформации клетки - реципиента, факт стабильной экспрессии целевого белка будет иметь место при успешном проведении раунда селекции популяции клеток-трансформантов.

Прокоагулянтная активность рекомбинантного FIX зависит от степени гамма карбоксилирования его Gla-домена, и соответствует природной при карбоксилировании первых 10 из 12 остатков глутаминовой кислоты Gla-домена [McGraf D.M., Walsh G. Directory of therapeutic enzymes. NY 2005. 312pp.]. Удельная активность рекомбинантного FIX может быть увеличена при коэкспрессии в линиях продуцентах фермента витамин-К-эпоксид-редуктазы (VKORC1), восстанавливающей витамин К (донор электронов для ферментативной гамма-карбоксилирования до его активной формы [Wajih N. Et al. Increased production of functional recombinant human clotting factor IX by baby hamster kidney cells engineered to overexpress VKORC1, the vitamin K 2,3-epoxide-reducing enzyme of the

vitamin K cycle. Journal of Biological Chemistry 2005 280 (280), 31603-31607].

Иллюстративным вариантом плазмиды для интеграции в геном клеток дополнительных копий гена *vkorc1* является экспрессионная плазида p1.2-Zeo-CHO-VK.ORG (SEQ ID NO:20, Фиг.3), содержащая ген *vkorc1* китайского хомячка, находящихся под контролем сильного конститутивного промотора.

Активность рекомбинантного FIX также зависит от наличия или отсутствия в его составе пропептида. Для повышения активности целевого белка предпочтительно проводить коэкспрессию рекомбинантного FIX и растворимого укороченного варианта протеазы РАСЕ/фурин. Иллюстративным вариантом плазмиды для экспрессии протеазы РАСЕ/фурин является плазида p1.2-Hygro-FurVQ (SEQ ID NO:18, Фиг.2).

«Трансформация клетки плазмидой» означает введение плазмиды в клетку с помощью методов, хорошо известных специалисту в данной области техники. Методы трансформации включают любые стандартные методы, известные специалисту в данной области техники, например электропорацию, использование трансфекционных агентов, например метод, описанный в техническом документе компании Invitrogen, Inc. "Lipofectamine® 2000 Reagent" Pub. No.MAN0000995 Rev. Date 20 July 2012.

Согласно настоящему изобретению, «клеточная линия - продуцент фактора свертывания крови IX человека» означает клональную линию клеток млекопитающих, обладающую способностью к продукции и секреции фактора свертывания крови IX человека, когда она согласно настоящему изобретению выращивается в указанной питательной среде. Используемый здесь термин «клеточная линия - продуцент фактора свертывания крови IX человека» также означает линию клеток, которые способна секретировать функционально активный фактор свертывания крови IX человека с продуктивностью не менее 0,1 МЕ/млн клеток/день при культивировании в суспензионной культуре в бессывороточной среде. Указанный фактор свертывания крови IX человека секретируется указанными клетками в культивационную среду.

Среди клеток млекопитающих предпочтительно использование клеток китайского хомячка (*Cricetulus griseus*), предпочтительно клеток яичника (CHO). В качестве примера предпочтительных клеток яичника китайского хомячка может быть приведена линия CHO DG44 (Invitrogen cGMP banked, США; Mol Cell Biol 5, 1750-1759 Kaufman RJ et al. 1985). Круг сублиний CHO не ограничен каким-либо образом, например, могут быть использованы сублинии CHO CHOZN DHFR, CHO DUKX B11 и подобные им.

Конкретным примером линии для получения продуцента фактора свертывания крови IX человека согласно настоящему изобретению является линия CHO DG44, но спектр линий клеток не ограничиваются ей.

Линия CHO DG44 характеризуется следующими культурально-морфологическими, физиолого-биохимическими признаками и генетическими признаками:

- Данные по видовой принадлежности: китайский хомячок *Cricetulus griseus*, яичник.
- Контроль видовой идентичности: кариологический, изоферментный (ЛДГ и Г6ФДГ).
- Маркерные признаки и методы их оценки: иммунологические, цитогенетические, биохимические, физиологические:
- Морфология: эпителиоподобная.
- Кариология: $2n=22$, пределы изменчивости по числу хромосом 10-28, модальное число хромосом 22, псевдодиплоид, имеются микрохромосомы, количество полиплоидов 9,0%.
- Биохимия: Дигидрофолатредуктазная активность по резистентности к метотрексату.
- Условия выращивания: среда - бессывороточная, определенного химического состава, CD Opti CHO (Invitrogen, США), температура $+37^{\circ}\text{C}$, концентрация CO_2 - 8%,

скорость перемешивания - 120-130 об/мин.

- Культуральные свойства: способ культивирования - суспензионный, посевная доза - 300 000 на мл., кратность посева - 1:2 - 1:6, процедура посева - центрифугирование суспензии на скорости 1200 об/мин, 5 мин, ресуспендирование в новой ростовой среде.

5 Оптимальная плотность $1,0-1,2 \times 10^6$ клеток/мл. Трансформация клеток линии СНО DG44 плазмидой p1.1-F9 с последующей селекцией и клонированием приводит к получению клеточных линий-продуцентов рекомбинантного фактора IX человека. Последующая трансформация полученных линий клеток плазмидами p1.2-Zeo-СНО-VKORC и p1.2-Hygro-FurVQ с последующей селекцией и клонированием приводит к
10 получению клеточных линий - эффективных продуцентов высокоактивного рекомбинантного фактора IX человека. Примером клеточной линии -эффективного продуцента высокоактивного рекомбинантного фактора IX человека является линия-продуцент P1.1-F9/3B 12-86.

15 Линия-продуцент P1.1-F9/3B12-86 обеспечивает синтез и секрецию рекомбинантного фактора IX человека в количестве 3,5 МЕ конечной активности фактора свертываемости крови IX на 1 мл среды при концентрации клеток 1,25 млн клеток/мл при культивировании в суспензионной культуре в бессывороточной среде. Линия-продуцент P1.1-F9/3B12-86 депонирована в Российской Коллекции Культур Клеток позвоночных Института Цитологии РАН 05.02.2013, регистрационный номер РККК (П) 755Д.

20 Также целью настоящего изобретения является предоставление способа получения рекомбинантного фактора IX человека в клетках млекопитающих, включающего культивирование в питательной среде описанных выше клеток млекопитающих -продуцентов рекомбинантного фактора IX человека, и выделение полученного целевого рекомбинантного белка из культуральной жидкости.

25 Выращивание клеток, выделение и очистка целевого белка из культуральной или подобной ей жидкости может быть осуществлена способом, подобным традиционным способам культивирования, в которых рекомбинантный белок продуцируется с использованием клеток млекопитающих.

30 Питательная среда, используемая для культивирования, может быть как синтетической, так и натуральной, при условии, что указанная среда содержит источники углерода, азота, минеральные добавки и, если необходимо, соответствующее количество питательных добавок, необходимых для роста клеток. В качестве источника углерода могут использоваться различные углеводы, такие как глюкоза или сахароза и другие органические кислоты. В качестве источника азота могут использоваться различные
35 неорганические соли аммония, такие как аммиак и сульфат аммония, другие соединения азота, такие как амины, природные источники азота. В качестве минеральных добавок могут использоваться фосфат калия, сульфат магния, хлорид натрия, сульфат железа, сульфат марганца, хлорид кальция и подобные им соединения. В качестве витаминов могут использоваться тиамин, дрожжевой экстракт и т.п.

40 Для получения фармацевтически значимого рекомбинантного фактора IX человека предпочтительно использование бессывороточной питательной среды для культивирования.

45 Выращивание может осуществляться в аэробных условиях, предпочтительно с повышенным содержанием CO_2 (8%), таких как перемешивание культуральной жидкости в колбах, при температуре в пределах от 20 до 40°C, предпочтительно в пределах от 30 до 38°C. Обычно, выращивание в течение от 12 часов до 4 дней приводит к накоплению целевого рекомбинантного белка в культуральной среде или в цитоплазме клетки.

После выращивания твердые остатки, такие как клетки, могут быть удалены из культуральной жидкости методом центрифугирования, а затем целевой белок может быть выделен и очищен методами хроматографии и/или концентрирования.

Особенности созданной экспрессионной плазмиды, линии клеток и результаты практического применения изобретения приведены на фигурах 1-3.

Осуществление изобретения

Пример 1. Получение генетической конструкции p1.1-F9, кодирующей белок человеческого фактора свертываемости крови IX, для трансфекции линии клеток CHO-DG-44.

В качестве источника кДНК для клонирования гена fIX использовали коммерчески доступный клон pCMV6-XL4/NM_000133.2 (проприетарная коллекция компании Origene Inc, США, номер sc 126517, последовательность верифицирована к публичной коллекции IMAGE), содержащий полную последовательность полноразмерной кДНК фактора IX, совпадающую с теоретически определенной кДНК фактора IX по данным Human Genome Organization. При помощи праймеров AD-9-AbsF и AD-9-NheR (SEQ ID NO:3-4) и Origen sc 126517 в качестве матрицы получали ПЦР-продукт, содержащий открытую рамку считывания фактора IX свертываемости крови человека. Олигонуклеотиды были синтезированы ЗАО «Евроген», РФ. ПЦР проводили при помощи смеси Tersus polymerase mix (ЗАО «Евроген», РФ) по инструкции производителя на приборе PTC-100 Thermal Cycler (MJ Reseach, США).

ПЦР продукты очищали, используя набор реактивов "Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System" («Promega», США) по инструкции производителя, и клонировали в вектор pAL-TA (Евроген) ДНК-лигазой фага T4 (Fermentas, Литва) по методике производителя фермента. Полученной лигазной смесью трансформировали клетки E. coli штамма

TOP10 (Invitrogen, США) с генотипом: F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 A(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) end A1. Для этого к 100 мкл замороженной суспензии клеток E. coli добавляли 5 мкл лигазной смеси, инкубировали на льду 30 минут для сорбции плазмидной ДНК, нагревали до 42°C на 45 секунд и инкубировали на льду 2 минуты. После чего добавляли 800 мкл питательного бульона SOC (20 г/л триптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 0,5 г/л NaCl, 250 мМ KCl, 10 мМ MgC₂) и инкубировали при 37°C 60 минут. После инкубации переносили суспензию на чашку Петри с твердой агаризованной средой 2xYT-arap (16 г/л триптона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л NaCl, 18 г/л агара), содержащей ампициллин в концентрации 100 мкг/мл и помещали в термостат на 18 часов при 37°C. Отдельные клоны трансформантов инокулировали в 5 мл питательного бульона LB с добавлением ампициллина в концентрации 50 мкг/мл, наращивали 18 часов при 37°C, и выделяли плазмидную ДНК набором реактивов "Wizard Plus SV Minipreps" («Promega», США) по протоколу производителя. Полностью секвенировали области вставки полученных плазмид, используя праймеры к последовательностям вектора T7prom и SP6 (SEQ ID NO:5-6), а также специфический праймер к последовательности гена фактора IX человека 9SQf (SEQ ID NO:7) с использованием набора BigDye Terminator v. 3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, США) и капиллярного секвенатора ABI PRISM 3730 genetic analyzer (Applied Biosystems, США), анализ данных вели при помощи программы Chromas 1.45 (Technelysium Pty Ltd, Australia).

После обнаружения клонов с корректной нуклеотидной последовательностью области вставки плазмиду PAL-F9 рестрицировали эндонуклеазами AbsI и NheI и переносили фрагмент, содержащий ОРС F9 с участком консенсусной последовательности Козак и блоком стоп-кодона в рестрицированный эндонуклеазами AbsI и NheI вектор

p1.1 с образованием экспрессионной плазмиды p1.1-F9 (SEQ ID NO:1). Проводили лигирование, трансформацию и выделение плазмидной ДНК как описано выше.

Открытую рамку считывания FIX, а также области основных функциональных элементов экспрессионной конструкции секвенировали как описано выше. Для секвенирования области ОРС и функциональных элементов экспрессионной плазмиды использовали специфический праймер к последовательности гена фактора IX человека 9SQf (SEQ ID NO:7), а также праймеры к последовательностям вектора SQ-5CH6-F, IRESArev (SEQ ID NO:8-9). Результаты сравнивали с теоретически предсказанными последовательностями гена фактора FIX свертываемости крови человека и соответствующих регуляторных элементов, нуклеотидных замен не было обнаружено.

Полученная экспрессионная конструкция фактора свертываемости крови IX человека в векторе p1.1-p1.1-F9 (Фиг.1) имеет размер 13299 п.о. и содержит уникальные сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции AscI (16), PvuI (1409), FseI (5213), AbsI (6446), NheI (7852). Данная конструкция предназначена для трансфекции эукариотических клеток геном фактора свертываемости крови IX человека с последующим отбором и амплификацией по сцепленному признаку DHFR⁺. Сообщает клеткам-реципиентам следующие фенотипические признаки: при трансформации прокариот - устойчивость к ампицилину, карбенициллину; при трансфекции эукариот - ограниченная устойчивость к метотрексату, увеличивающаяся при селективном отборе, экспрессия рекомбинантного фактора FIX свертываемости крови человека. Созданную генетическую конструкцию использовали для получения линии-продуцента.

Пример 2. Получение экспрессионной генетической конструкции p1.2-Hygro-FurVQ, кодирующей протеазу PACE/furin человека для трансфекции линии клеток DG-1.1-F9.

При помощи праймеров AD-FUR-AbsF и AD-FUR-XbaR (SEQ ID NO:10-11) и Origene SC118550 в качестве матрицы получили ПЦР-продукт, содержащий открытую рамку считывания растворимого делеционного варианта протеазы PACE/furin человека с делецией двух аминокислот (VQ). Полимеразную цепную реакцию проводили как описано выше, продукт клонировали в вектор pAL-TA как описано выше, полученную в результате плазмиду pAL-Fur секвенировали с использованием праймеров T7prom и SP6 (SEQ ID NO:5-6), а также специфических праймеров SQ-FUR639-F, SQ-FUR1228-F, SQ-FUR1563-R (SEQ ID NO:12-14).

Для введения шести недостающих нуклеотидов в открытую рамку считывания PACE/furin в соответствие с NM_002569 был проведен сайт-направленный мутагенез плазмиды pAL-Fur методом инвертированной ПЦР с использованием праймеров IP-fVQ-F (SEQ ID NO:15) и IP-fVQ-R (SEQ ID NO:16). Сайт-направленный мутагенез методом инвертированной ПЦР проводили по [Michael P. Weiner, Tim Gackstetter, Gina L. Costa, John C. Bauer, and Keith A. Kretz. Site-directed Mutagenesis using PCR in Molecular Biology: Current Innovations and Future Trends. Eds. A.M. Griffin and H.G. Griffin. ISBN 1-898486-01-8 1995 Horizon Scientific Press, PO Box 1, Wymondham, Norfolk, U.K.] с модификациями.

Каждый праймерный олигонуклеотид фосфорилировали отдельно. Реакцию проводили в буфере Трис-HCl, pH 7,5, содержащем 10 mM MgCl₂, 50 mM дитиотреитола, 1 mM АТФ и 100 пМ олигонуклеотида, 1 ед. полинуклеотидкиназы фага Т4 (Сибэнзим, Россия) в течение 30 минут при 37°C. После окончания реакции фермент инактивировали при 65°C 10 мин. Затем реакционную смесь использовали для проведения инвертированной ПЦР в количестве 20 пМ на реакцию. ПЦР проводили с использованием набора реактивов "Encyclo PCR kit" (ЗАО Евrogen, Россия) по инструкции производителя. ПЦР проводили по следующей схеме: 1 цикл: 4 мин 94°C, 2 мин 50°C, 2 мин 72°C; затем 11 циклов 11 мин - 94°C, 1 мин - 55°C, 2 мин 72°C. После чего разводили вдвое однократным

буфером эндонуклеазы DpnI, добавляли эндонуклеазу DpnI (10 U) и инкубировали при 37°C 30 минут, затем вносили полимеразу Pfu (2.5U) и переносили на 72°C и инкубировали еще 30 минут. Полученную смесь очищали, используя набор "Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System" («Promega», США) по протоколу производителя. После чего проводили лигирование очищенного продукта инвертированной ПЦР с использованием ДНК-лигазы фага T4 и стандартного буферного раствора (Fermentas, Литва) в течение 1 часа при комнатной температуре. Полученной лигазной смесью трансформировали клетки E. coli штамма TOP10 (Invitrogen, США) как описано выше. Колонии E. coli анализировали методом ПЦР с клонов, с использованием праймерных олигонуклеотидов T7prom и SP6 (SEQ ID NO:5-6) и специфического олигонуклеотида SQ-fVQ-R (SEQ ID NO:17) на мутант.

4 клона наращивали в 5 мл питательного бульона 2xYT-Amp и выделяли плазмидную ДНК при помощи набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, Литва) по протоколу производителя. Для полученных генетических конструкций определяли нуклеотидную последовательность методом ПЦР-секвенирования с использованием олигонуклеотидов T7prom и SP6 (SEQ ID NO:5-6), а также специфических праймеров SQ-FUR639-F, SQ-FUR1228-F, SQ-FUR1563-R (SEQ ID NO:12-14).

После обнаружения клонов с корректной нуклеотидной последовательностью области вставки плазмиды PAL-FurVQ рестрицировали эндонуклеазами AbsI и XbaI и переносили фрагмент, содержащий OPC PACE/furin с участком консенсусной последовательности Козак и блоком стоп-кодона в рестрицированный эндонуклеазами AbsI и NheI вектор p1.2-Hygro с образованием экспрессионной плазмиды p1.2-Hygro-FurVQ (SEQ ID NO:18). Проводили лигирование, трансформацию и выделение плазмидной ДНК как описано выше. Для секвенирования использовали специфические праймеры SQ-FUR639-F, SQ-FUR1228-F, SQ-FUR1563-R (SEQ ID NO:12-14), а также праймеры к последовательностям вектора SQ-5CH6-F (SEQ ID NO:8), 3CH1-Rev (SEQ ID NO:19).

Пример 3. Препаративное выделение плазмидной ДНК для трансфекций и получение первичных поликлональных линий клеток CHO-DG44, стабильно трансфицированных плазмидой p1.1-F9.

Экспрессионная плазида p1.1-F9, кодирующая фактор IX человека, была сконструирована по методике, приведенной в Примере 1, выращена в препаративных количествах в штамме E. coli TOP10 (Invitrogen, Ltd., США), очищена при помощи набора EndoFree Plasmid MaxiKit, (Qiagen, США), линеаризована эндонуклеазой рестрикции PvuI (Fermentas, Литва) с разрушением гена бета-лактамазы и стерилизована фильтрованием.

Клетки линии CHO-DG-44 (Life Technologies, США) культивировали в безбелковой среде Lonza Pro-CHO 5 (Lonza AG, Швейцария) с 8 mM L-глутамина. Для поддержания роста клеток, дефектных по гену dhfr в среду вносили нуклеотидные добавки -гипоксантин ЮмМ и тимидин 1,6 mM. Клетки выращивали в стерильных одноразовых колбах Эрленмеера (30 мл суспензии в колбах вместимостью 125 мл) на орбитальной качалке при 130 об/мин в атмосфере, содержащей 5% углекислого газа при температуре 37°C. Подсчет плотности клеточной суспензии и доли живых клеток проводится в счетной камере Горяева, при окрашивании трипановым синим. Пассирование культуры проводили по достижении плотности 1,2 млн клеток/мл, посевная концентрация 0,3 млн клеток/мл. За 48 часов и 24 ч до трансфекций клетки дополнительно пассировали до посевной концентрации 0,5 млн клеток/мл. Трансфекцию линеаризованной плазмиды p1.1-F9 проводили при помощи липосомного реагента FuGENE HD (Promega, США) в

бессывороточной среде CHO-S-SFM2 (Life Technologies, США), используя $1,5 \times 10^7$ клеток в 30 мл среды в колбе Эрленмейера, 60 мкг плазмидной ДНК и 80 мкл трансфекционного агента. Смешивание ДНК и трансфекционного реагента проводили по методике производителя агента. Эффективность трансфекций по регистрации флуоресцентного продукта транзистентно котрансфецированной (5% от общей массы ДНК) плазмиды рEGFP-C2 (Clontech, США) через 48 часов составила 8,2%. По истечении 48 часов после трансфекций среду полностью заменяли центрифугированием на Lonza PRO-CHO 5 с 8 мМ глутамина, но не содержащую гипоксантин и тимидин. При этом клеточную массу разделили на три равные части и в дальнейшем культивировали отдельно в описанных выше суспензионных условиях в присутствии специфического ингибитора дигидрофолатредуктазы (DHFR) метотрексата (MTX) в концентрациях 50 нМ, ЮОнМ и 200 нМ. Культуры пересевали по прошествии 5 дней с полной заменой среды центрифугированием, либо по достижении плотности 1,2 млн клеток/мл разведением до посевной плотности 3×10^5 клеток/мл. Культуры считались стабильными при достижении доли живых клеток более 90% по окраске трипановым синим. Генерация стабильных поликлональных линий была проведена за 6 пассажей и заняла от 27 до 30 дней. Для полученных таким образом поликлональных культур уровень секреции FIX определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА, ELISA) по достижении плотности посева 1,2 млн клеток/мл. Уровень секреции в трех последовательных пассажах составил $0,69 \pm 0,04$ мкг/мл, $1,05 \pm 0,05$ мкг/мл и $1,83 \pm 0,24$ мкг/мл при действии 50 нМ, 100 нМ и 200 нМ MTX соответственно, при этом время удвоения полученных культур было определено как 29,5 часов, 26,8 часов и 28,1 часов. Полученная при действии 200 нМ MTX поликлональная линия была клонирована методом предельных разведений в бессывороточной среде ex-cell Cloning (Sigma-Aldrich, США) с 8 мМ L-глутамина, 20 мМ гипоксантина и 3,2 мМ тимидина без селекционного давления MTX. Эффективность клонирования составила 41%. Наилучшие по уровню секреции FIX клональные культуры были возвращены к суспензионному культивированию без нуклеотидных добавок и селективного давления. Уровень секреции FIX для трех наилучших полученных моноклональных линий составил $11,9 \pm 0,4$ мкг/мл, $12,3 \pm 0,4$ мкг/мл, $9,9 \pm 0,3$ мкг/мл после 3-х дней культивации. Выбранная для дальнейшей работы моноклональная линия р1.1-F9-T2/S показала в трех последовательных пассажах удельную продуктивность $2,99 \pm 0,06$ пкг/клетка/день, что более чем в 6 раз превзошло показатели поликлонального клеточного пула при сократившемся времени удвоения клеточной культуры 22,5 ч. При этом копийность векторной вставки в геном, определенная по гену dhfr, как описано в Примере 8, составила 14 ± 7 копий целевого гена на гаплоидный геном, что оказалось меньше, чем для родительской поликлональной популяции - 20 ± 4 копии.

Пример 4. Амплификация целевого гена под действием метотрексата и получение клональных линий-продуцентов FIX.

Полученная, как описано в Примере №3 моноклональная клеточная линия р1.1-F9-T2/S была подвергнута амплификации векторной вставки в геноме. Для этого исходную моноклональную клеточную линию культивировали в суспензионных условиях как описано в Примере 3, используя питательную среду Lonza PRO-CHO 5 с 8 мМ глутамина и 20 мкг/мл водорастворимого витамина К3 (менадионбисульфита), но не содержащей гипоксантин и тимидин. На каждом шаге амплификации в клеточную суспензию добавляли возрастающие концентрации MTX 1 мкМ, 2 мкМ, 4 мкМ, 8 мкМ. Культуры пересевали по прошествии 5 дней с полной заменой среды центрифугированием, либо

по достижении плотности $1,2 \times 10^6$ клеток/мл разведением до посевной плотности 3×10^5 клеток/мл. Культуры считали стабильными при достижении доли живых клеток более 90% по окраске трепановым синим. Стабильная культура замораживалась в среде Lonza PRO-CHO 5 с добавлением 10% диметилсульфоксида (DMSO) в виде образцов объемом 1 мл, в которых клетки были сконцентрированы центрифугированием при 300 g до плотности 10^7 клеток/мл. Для стабильных культур, размороженных в обычных условиях суспензионного культивирования при действии генерационной концентрации МТХ, определяли уровень секреции рекомбинантного FIX, время клеточного удвоения культуры (по методикам Примера 3) и копийность векторной вставки в геном (по методике Примера 8). Успешно размороженную культуру также переводили на следующий шаг амплификации со следующей концентрацией МТХ. При этом применение МТХ в концентрации 8 мкМ не позволило получить стабильной культуры, таким образом, максимальное селективное давление составило 4 мкМ МТХ.

Показатели продуцентов при амплификации трансгена под действием метотрексата.				
Код культуры и клональность	Концентрация МТХ	Удельная продуктивность по ИФА, пг фактора ГХ/клетка/день	Копийность вставки в геном по dhfr, копий/геном	Время клеточного удвоения, часы
p1.1-F9/200-T2/S моноклональная	-	2,99±0,09	14±7	20,9
p1.1-F9.T2/1k поликлональная	1 мкМ	3,53±0,12	23±4	19,8
p1.1-F9.T2/2k поликлональная	2 мкМ	4,03±0,31	39±2	22,5
p1.1-F9.T2/4k поликлональная	4 мкМ	5,97±0,18	81±7	24,2
p1.1-F9.T2/8k поликлональная	8 мкМ	не определяли		
1.1-F9-T2/4k-3B12 моноклональная	-	10,72±0,43	75±4	20,1

Полученную поликлональную культуру p1.1-F9-T2/4k клонировали методом предельных разведений в бессывороточной среде ex-cell Cloning с 8 мМ L-глутамина, 20 мМ гипоксантина и 3,2 мМ тимидина без селекционного давления МТХ. Эффективность клонирования составила 34,6%. Всего было получено 432 моноклональных колонии, для которых на 21 день роста прикрепленных условиях методом ИФА определяли концентрацию накопленного в среде фактора IX. Наилучшие по уровню секреции фактора IX клональные культуры (24 клона) повторно адаптировались к суспензионному культивированию без нуклеотидных добавок и селективного давления, при этом у половины моноклональных культур была утрачена продуктивность и/или способность к росту в суспензии (менее 0,5 пкг/клетка/день или время удвоения более 48 часов).

Наилучшая из 12 успешно адаптированных к суспензионному культивированию моноклональных клеточных культур p1.1-F9-T2/4k-3B12 показала в трех последовательных пассажах удельную продуктивность $10,72 \pm 0,43$ пкг фактора IX/клетка/день, что в 2 раза превзошло показатели поликлонального клеточного пула при времени удвоения клеточной культуры 20,2 ч (определено по методике Примера 3). При этом копийность векторной вставки в геном уменьшилась до 75 ± 4 (определено по методике Примера 8).

Пример 5. Получение линии клеток, стабильно трансфицированных плазмидами p1.1-F9 и p1.2-Zeo-CHO-VKORCL

Моноклональная клеточная линия p1.1-F9-T2/4k-3B12 при определении ее удельной продуктивности (как описано в Примере 4) на трехдневных культивационных циклах с плотностью в момент пересева $1,2 \times 10^6$ клеток/мл накапливала не более 0,22 МЕ/мл активного фактора IX при общей концентрации фактора IX, определенной по ИФА, 59 мкг/мл, что соответствовало удельной активности секретируемого фактора IX человека 1,83% (полная удельная активность - 200 МЕ/мг). Прокоагулянтная активность рекомбинантного FIX зависит от степени гамма-карбоксилирования его Gla-домена, и соответствует природной при карбоксилировании первых 10 из 12 остатков глутаминовой кислоты Gla-домена [McGraf D.M., Walsh G. Directory of therapeutic enzymes. NY 2005. 312 pp.]. Удельная активность рекомбинантного FIX может быть увеличена при коэкспрессии в линиях-продуцентах фермента витамин-К-эпоксид-редуктазы (VKORC1), восстанавливающей витамин К (донор электронов для ферментативной гамма-карбоксилирования до его активной формы [Wajih N. Et al. Increased production of functional recombinant human clotting factor IX by baby hamster kidney cells engineered to overexpress VKORC1, the vitamin K 2,3-epoxide-reducing enzyme of the vitamin K cycle. Journal of Biological Chemistry 2005 280 (280), 31603-31607].

Для интеграции в геном моноклональной клеточной линии p1.1-F9-T2/4k-3B12 дополнительных копий гена *vkorc1* китайского хомячка, находящихся под контролем сильного конститутивного промотора, использовали экспрессионную плазмиду p1.2-Zeo-CHO-VKORC (SEQ ID NO:20, Фиг.3), полученную аналогично описанной в Примере 2. Плазмиду вводили в клетки методом электротрансфекции одинарным прямоугольным импульсом длительностью 20 мс при постоянном напряжении 200 В и зазоре кюветы 4 мм, использовали 30 мкг плазмидной ДНК p1.2-Zeo-CHO-VKORC, линейаризованной рестриктазой PvuI. Эффективность трансфекции составила 12,4%. Через 48 часов после трансфекции к культуре добавили селекционный антибиотик зеоцин (Life Technologies, США) в концентрации 1 мг/мл. Пассирования культуры проводили по достижении плотности 1,2 млн клеток/мл, но не позднее чем через 5 суток после предыдущего пассирования. Через 30 дней после трансфекции была получена стабильная культура с долей, живых клеток 87%. Уровень секреции фактора IX в полученной культуре составил $6,87 \pm 0,39$ пкг/клетка/день при времени удвоения клеточной культуры 22,5 часа (определены по методикам примера №3), а копияность вставки гена *vkorc1* составила $3,24 \pm 0,53$ копий на гаплоидный геном после отмены селекционного давления зеоцина (по методике примера №8).

Пример 6. Получение линии клеток, стабильно трансфицированных плазмидами p1.1-F9, p1.2-Zeo-CHO-VKORC1 и p1.2-Hygro-FurVQ.

При секреции зрелой формы фактора свертывания IX, способной проявлять прокоагуляционную активность, от него отделяется пропептид. Такая же посттрансляционная модификация может производиться в культуральной среде при коэкспрессии рекомбинантного FIX и растворимого укороченного варианта протеазы PACE/фурин [McGraf D.M., Walsh G. Directory of therapeutic enzymes. NY 2005. 312 pp.]. Полученная в Примере №4 моноклональная клеточная культура p1.1-F9-T2/4k-3B12 секретирует рекомбинантный фактор IX с низкой удельной активностью - 1,8% от стандарта, при этом более 97% молекул фактора IX содержали неотделенный пропептид по данным ИФА с использованием антител к пропептиду фактора IX.

Для повышения активности целевого белка поликлональную клеточную популяцию p1.1-F9-T2/4k-3B12-VKOR/Zeo, полученную в Примере 5, трансфицировали экспрессионной плазмидой p1.2-Hygro-FurVQ (SEQ ID NO:18, Фиг.2), полученной как описано в Примере 2. Трансфекцию проводили электропорацией по методике, описанной

в Примере 5, но в качестве селекционно антибиотика применялся Гигромицин В (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 750 мкг/мл. Эффективность трансфекции составила 20,2%. Генерация стабильно трансфицированной поликлональной культуры с долей живых клеток более 90% продолжалась 21 день. Полученная поликлональная популяция

5 p1.1-F9-T2/4k-3B12-VKOR/Zeo-FurVQ/Hyg обладала уровнем секреции фактора IX $5,83 \pm 0,42$ пкг/клетка/день, долей молекул фактора IX с неотделенным пропептидом 3,1%, удельная прокоагуляционная активность продукта в культуральной среде - 27% от стандарта, копияность вставки гена fix в геном $40,6 \pm 1,0$ копий на гаплоидный геном (по методике из Примера 8).

10 Удельная продуктивность популяции p1.1-F9-T2/4k-3B12-FurVQ/Hyg по биологически активному фактору IX составила $1,6 \pm 0,03$ МЕ/млн клеток/день при скорости удвоения клеток 23,25 часа.

Для получения моноклональных линий-продуцентов рекомбинантного фактора IX, пригодных для фармацевтического производства, поликлональная популяция p1.1-F9-T2/4k-3B12-VKOR/Zeo-FurVQ/Hyg была клонирована методом предельных разведений

15 в бессывороточной среде ex-cell cloning с 8 mM L-глутамина, 20 mM гипоксантина и 3,2 mM тимидина без селекционного давления MTX или антибиотиков. Эффективность клонирования составила 25,9%. Всего было получено 199 моноклональных колоний, для которых на 21 день роста в прикрепленных условиях методом ИФА определяли

20 общий уровень секреции фактора IX. По результатам первичного скрининга было отбрано 80 клонов, накопивших более 12,5 мкг/мл целевого белка. Отобранные клоны были переведены на полуадгезионное культивирование без перемешивания в среде Lonza PRO-CHO 5 с 8 mM глутамина и 20 мкг/мл витамина К3, но не содержащей гипоксантина, тимидина и селекционных компонентов. После 5 дней культивирования

25 в кондиционированной среде при помощи флуориметра Fusion-Alpha FP HT 4 (PerkinElmer, Inc, США) с парой светофильтров 400 нм/460 нм была кинетическим методом измерена пептидазная активность по отношению к флуорогенному субстрату протеиназы PACE/furin. Всего было отобрано 24 моноклона, для которых относительная пептидазная активность в кондиционированной среде превысила более чем в 100 раз

30 пептидазную активность в кондиционированной среде родительской линии 1.1-F9-T2/4k-3B12, не трансфицированной геном PACE/furin. Для всех отобранных клонов доля молекул фактора IX, содержащих неотделенный пропептид, составила менее 3,5% (то есть находилась ниже предела определения для использованного метода ИФА). Для дальнейшего суспензионного культивирования с перемешиванием было отбрано 12

35 моноклональных линий, секретировавших более 14,5 мкг/мл фактора IX за 3 дня культивации. Только 5 из 12 отобранных моноклональных линий сохранили способность делиться в обычных условиях суспензионного культивирования в среде Lonza PRO-CHO 5 с 8 mM глутамина и 20 мкг/мл витамина К3. Удельная активность рекомбинантного фактора IX, секретиремого всеми пятью отобранными

40 моноклональными линиями-продуцентами составила более 185 МЕ/мг. Другие характеристики полученных клеточных линий обобщены в Таблице 2.

Таблица 2

Основные свойства моноклональных линий-продуцентов.

Код линии, клональность	Секреция фактора IX, пкг/клетка/день (ИФА)	Удельная продуктивность, МЕ/млн клеток/день (коагулометрия)	Доля активно-го секретиремого фактора IX	Доля молекул фактора IX с пропептидом	Число вставок в геном по dhfr, копий/гапл. геном	Время клеточного удвоения, ч
p1.1-F9/200-T2/S моноклональная	$2,99 \pm 0,09$	н/о	-	96%	14 ± 7	20,9

5	p1.1-F9-T2/1k поликлональ- ная	3,53±0,12	н/о	-	97%	23±4	19,8
	p1.1-F9-T2/2k поликлональ- ная	4,03±0,31	н/о	-	96%	39±2	22,5
	p1.1-F9-T2/4k поликлональ- ная	5,97±0,18	0,02±0,005	1,1%	99%	81±7	24,2
	1.1-F9-T2/4k- 3B12 монокло- нальная	10,72±0,43	0,03±0,001	1,8%	97%	75±4	20,1
10	p1.1-F9-T2/4k- 3B12-FurVQ/ Hug поликло- нальная	5,83±0,42	1,6±0,029	27%	3,03%	40±3	23,1
15	p1.1-F9/3B 12- 05 монокло- нальная	7,03±0,21	1,21±0,008	89%	1,21%	21±1	19,6
	p1.1-F9/3B12- 78 монокло- нальная	10,10±0,16	1,71±0,004	84%	2,65%	9±1	20,9
	p1.1-F9/3B 12- 86 монокло- нальная	11,19±0,27	2,08±0,003	95%	1,41%	22±2	25,71

Пример 7. Измерение числа копий экспрессионных плазмид, введенных в геном клеток и уровней мРНК FIX человека в клетках.

Количественный анализ копийности экспрессионной кассеты в геноме и уровня мРНК проводили методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с использованием амплификатора iCycler iQ (Bio-Rad, США). Для ПЦР использовали готовую 5х реакционную смесь с горячим стартом, содержащую интеркалирующий краситель SYBR Green I, qPCRMix-HS SYBR («Евроген», Россия). Каждую реакцию повторяли 3 раза в объеме 25 мкл, в 3-5 повторах. Геномную ДНК выделяли из 0,5-5 млн. клеток набором «Wizard SV Genomic DNA Purification System» (Promega, США) по инструкции производителя. Суммарную РНК выделяли из 0,5-5 млн клеток набором «RNeasy Mini Kit» (Qiagen, США) по инструкции производителя. Для приготовления образцов кДНК использовали по 1 мкг суммарной РНК и набор реактивов «Mint» (Евроген, Россия). Для определения копийности экспрессионной кассеты в геноме в качестве матрицы использовали геномную ДНК и олигонуклеотидные праймеры, не гомологичные геномным последовательностям китайского хомячка - к гену FIX человека - RT-F9-f и RT-F9-r (SEQ ID NO:21-22) и к области IRES-DHFR RT-ID-F и RT-ID-R (SEQ ID NO:23-24). Для анализа копийности вспомогательных кассет в геномной ДНК клеток использовали пару праймеров к гену устойчивости к гигромицину - RT-Hyg-F и RT-Hyg-R (SEQ ID NO:25-26); пару праймеров к гену устойчивости к зеоцину - RT-Zeo-F и RT-Zeo-R (SEQ ID NO:27-28); пару праймеров к С-концевой области VKORC1 китайского хомячка и 3' НТО плазмиды p1.2-Zeo-CHO-VKORC - RT-cVKOspC -F и RT-cVKOspC-R (SEQ ID NO:29-30), пару праймеров к С-концевой области фурина человека RT-FURC-F и RT-FURC-R (SEQ ID NO:31-32).

Для определения уровня экспрессии мРНК в качестве матрицы использовали кДНК и уникальные олигонуклеотидные праймеры, не гомологичные последовательностям китайского хомячка. Для определения уровня экспрессии VKORC1 использовали праймеры RT-cVKOspN-F и RT-cVKOspN-R (SEQ ID NO:33-34).

Для амплификации опорных генов, в случае ПЦР с геномной ДНК, использовали праймеры к области гена пептидил-пролил изомеразы В (циклофилина В), предположительно уникальной для генома CHO, RT-PPIB-F и RT-PPIB-R (SEQ ID NO: 35-36), а в случае ПЦР с кДНК использовали праймеры к бета-актину CHO - RT-bACT-F

и RT-bACT-R (SEQ ID NO:37-38).

Копийность экспрессионной кассеты определяли из калибровочной кривой, построенной для серийных разведений экспрессионных плазмид p1.1-F9, p1.2-Zeo-CHO-VKORC1, p1.2-Hygro-FurVQ. Результаты ПЦР сравнивали с результатами для контрольного ампликона, представленного в геноме клеток CHO только один раз по поисковой выдаче алгоритма BLAST из базы данных NCBI Nucleotide Collection. При анализе уровней экспрессии мРНК было установлено, что эффективность ПЦР составляет не менее 99% для всех использованных пар праймеров, вычисление относительных концентраций мРНК проводили по формуле $C=2^{(-CT)}$, где CT - пороговый цикл амплификации.

Хотя указанное изобретение описано в деталях со ссылкой на Примеры, для специалиста в указанной области техники очевидно, что могут быть совершены различные изменения и произведены эквивалентные замены, и такие изменения и замены не выходят за рамки настоящего изобретения.

Список литературы

1. Патент США 4,770,999.
2. Wasley L.C., Rehemtulla A., Bristol J.A., Kaufman R.J. // J. Biol. Chem. 1993. V.268. №12. P.8458-8465.
3. Европейская патентная заявка EP 0705901 A2.
4. Европейский патент EP 0430930 B1.
5. Европейская патентная заявка EP 2164971 A2.
6. Патентная заявка PCT WO 2011011841 A1.
7. Европейская патентная заявка EP 2496252 A1.
8. Патент США US 7375084 B2.
9. Европейская патентная заявка EP 1969127 A2.
10. Патентная заявка PCT WO 2005071077.
11. Патентная заявка РФ 2011146243.
12. McGraf D.M., Walsh G. Directory of therapeutic enzymes. NY 2005. 312 pp.
13. Wajih N. et al. Journal of Biological Chemistry 2005 280 (280), 31603-31607.
14. Invitrogen, Inc. "Lipofectamine® 2000 Reagent" Pub. No.MAN0000995 Rev. Date 20 July 2012.
15. Kaufman RJ et al. Mol Cell Biol 5, 1750-1759 1985.
16. Michael P. Weiner, Tim Gackstetter, Gina L. Costa, John C. Bauer, and Keith A. Kretz. Site-directed Mutagenesis using PCR in Molecular Biology: Current Innovations and Future Trends. Eds. A.M. Griffin and H.G. Griffin. ISBN 1-898486-01-8 1995 Horizon Scientific Press, PO Box 1, Wymondham, Norfolk, U.K.

Краткое описание Фигур.

На Фигуре 1 показана карта экспрессионной плазмиды p1.1-F9. Используются следующие обозначения: pUC origin - область начала репликации плазмиды pUC; bla -открытая рамка считывания бета-лактамазы, обеспечивающей устойчивость к ампициллину; bla promoter - прокариотический промотер гена bla; EBV TR - участок терминального повтора вируса Эпштейна-Барр человека; CHO EEF1A UFR функциональный промотер гена фактора элонгации 1 альфа китайского хомячка, 5' нетранслируемая область этого гена и нетранскрибируемая область, фланкирующая этот ген; transcription start - точка начала транскрипции, TATA - TATA-бокс, CHO EEF1A intron I - первый интрон гена фактора элонгации 1 альфа китайского хомячка, EMCV IRES - внутренний сайт связывания рибосом вируса энцефаломиокардита (EMCV); DHFR - открытая рамка считывания дигидрофолатредуктазы мыши для селективного

отбора и амплификации в эукариотических клетках; CHO EEF1A DFR функциональный I терминатор и сигнал полиаденилирования гена фактора элонгации 1 альфа китайского хомячка, 3' нетранслируемая область этого гена и нетранскрибируемая область, фланкирующая этот ген; Kozak - область, кодирующая последовательность Козак для кэп-зависимой инициации трансляции, F9 ORF - ОПС фактора IX свертывания крови человека, stop - блок стоп-кодона. Стрелками указаны направления транскрипции генов, в скобках указаны номера первого и последнего нуклеотидов фрагментов. Курсивом выделены сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции, в скобках указаны номера нуклеотидов в точках разрезания.

На Фигуре 2 показана карта экспрессионной плазмиды p1.2-Hygro-FurVQ. Используются обозначения аналогично Фигуре 1, а также Fur ORF - ОПС протеазы PACE/furin человека, SV40 promoter - область промотора вируса SV40; SV40pA, terminator - терминатор и сигнал полиаденилирования вируса SV40; hygrob - ОПС гена устойчивости к гиромизину, VQ - точка инсерции пары кодонов, кодирующих аминокислоты V и.

На Фигуре 3 показана карта экспрессионной плазмиды p1.2-Zeo-CHO-VKORC1. Используются обозначения аналогично Фигуре 1, а также CHO VKORC1 ORF - ОПС VKORC1 китайского хомячка, SV40 promoter - область промотора вируса SV40; SV40pA, terminator - терминатор и сигнал полиаденилирования вируса SV40; ZeoR - ОПС гена устойчивости к зеоцину.

Формула изобретения

1. Плазмида для экспрессии рекомбинантного фактора свертываемости крови IX человека в культивируемых клетках китайского хомячка линии CHO, в следующей последовательности по существу состоящая из области начала репликации плазмиды рUC, открытой рамки считывания бета-лактамазы (bla) и прокариотического промотора гена bla; участка терминального повтора вируса Эпштейн-Барр человека (EBVTR), функционального промотора и первого интрона гена фактора элонгации 1 альфа китайского хомячка, фланкированного 5' нетранслируемой областью этого гена; открытой рамки считывания гена, кодирующего фактор свертываемости крови IX человека; внутреннего сайта связывания рибосом (IRES) вируса энцефаломиокардита (EMCV); открытой рамки считывания дигидрофолатредуктазы (DHFR), экспрессирующейся в составе бицистронной мРНК вместе с геном, кодирующим фактор свертываемости крови IX человека; и функционального терминатора гена фактора элонгации 1 альфа китайского хомячка, фланкированного 3' нетранслируемой областью этого гена.

2. Плазмида по п. 1, отличающаяся тем, что ген фактор свертываемости крови IX человека кодирует полипептид фактора свертываемости крови IX человека, последовательность аминокислот которого приведена в SEQ ID NO: 2.

3. Плазмида по п. 1, отличающаяся тем, что участок терминального повтора вируса Эпштейн-Барр человека (EBVTR) представляет собой фрагмент конкатемера терминального повтора EBVTR.

4. Плазмида по п. 1, отличающаяся тем, что используют открытую рамку считывания дигидрофолатредуктазы (DHFR) мыши.

5. Плазмида по п. 1, отличающаяся тем, что указанная плазмида дополнительно содержит консенсусную последовательность Козак перед последовательностью, кодирующей открытую рамку считывания фактора свертываемости крови IX человека.

6. Плазмида по п. 1, отличающаяся тем, что указанной плазмидой является плазмида p1.1-F9, представленная в Перечне последовательностей под номером SEQ ID NO: 1.

7. Клетка яичника китайского хомячка (СНО) - продуцент рекомбинантного фактора свертываемости крови IX человека, трансформированная плазмидой по пп. 1-6.

8. Клетка по п. 7, дополнительно трансформированная плазмидой, экспрессирующей витамин-К-эпоксид-редуктазу (VKORC1).

5 9. Клетка по п. 8, отличающаяся тем, что указанной плазмидой является плазида р1.2-Zeo-CHO-VKORC1, представленная в Перечне последовательностей под номером SEQ ID NO: 20.

10. Клетка по п. 8, дополнительно трансформированная плазмидой, экспрессирующей растворимый укороченный вариант протеазы PACE/фурин.

10 11. Клетка по п. 10, отличающаяся тем, что указанной плазмидой является плазида р1.2-Hygro-FurVQ, представленная в Перечне последовательностей под номером SEQ ID NO: 18.

12. Клетка по п. 11, отличающаяся тем, что указанной клеткой является клетка яичника китайского хомячка моноклональной линии P1.1-F9/3B12-86, депонированной
15 в Российской Коллекции Культур Клеток позвоночных Института Цитологии РАН под регистрационным номером РККК (П) 755Д.

13. Способ получения рекомбинантного фактора свертываемости крови IX человека, включающий следующие стадии:

- культивирование в питательной среде клеток по пп. 7, 8 или 10; и
- 20 - выделение полученного рекомбинантного белка из культуральной жидкости.

14. Способ по п. 13, отличающийся тем, что культивируют клетки яичника китайского хомячка моноклональной линии P1.1-F9/3B12-86, депонированной в Российской Коллекции Культур Клеток позвоночных Института Цитологии РАН, регистрационный номер РККК (П) 755Д.

25 15. Способ по п. 13, отличающийся тем, что питательная среда для культивирования является бессывороточной.

30

35

40

45

SEQUENCE LISTING

<110> Centre "Bioengineering" Russian Academy of Sciences

<120> Плазмида для экспрессии рекомбинантного фактора свёртываемости крови IX человека, моноклональная линия клеток млекопитающего- продуцент рекомбинантного фактора свёртываемости крови IX человека и способ получения указанного фактора

<130> F9 pat

<160> 39

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 13299

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> expression plasmid

<220>

<221> CDS

<222> (6460)..(7842)

<400> 1

```

cgtccggagc tcaggcgcg catggctctt ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct      60
cggctcgttc gctgcggcga gcggtatcag ctcaactcaaa ggcggtataa cggttatcca      120
cagaatcagg ggataacgca ggaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga      180
accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct ccgccccctt gacgagcatc      240
acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg      300
cgtttcccc tggaagctcc ctctgctgct ctctgttcc gacctgccg cttaccggat      360
acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca cgctgtaggt      420
atctcagttc ggtgtaggtc gttcgtccca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgttc      480
agccccgacc ctgcgcctta tccggttaact atcgtcttga gtccaacccg gtaagacacg      540
acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg      600
gtgctacaga gttcttgaag tgggtggccta actacggcta cactagaaga acagtatttg      660
gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg      720
gcaaacaaac caccgctggg agcggttttt ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa      780
aaaaaggatc tcaagaagat cttttgatct tttctacggg gtctgacgct cagtggaacg      840
aaaactcacg ttaagggatt ttggtcatga gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc      900
ttttaaatga aaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat atatgagtaa acttggtctg      960
acagttacca atgcttaatc agtgaggcac ctatctcagc gatctgtcta tttcgttcat      1020
ccatagtgtc ctgactcccc gtcgtgtaga taactacgat acgggagggc ttaccatctg      1080
gccccagtgc tgcaatgata ccgcgagacc cagctcacc ggctccagat ttatcagcaa      1140
taaaccagcc agccggaagg gccgagcgca gaagtgggtc tgcaacttta tccgcctcca      1200

```

Страница 1

tccagtctat taattgttgc cggaagcta gagtaagtag ttcgccagtt aatagtttgc	1260
gcaacgttgt tgccattgct acaggcatcg tgggtgtcacg ctcgtcgttt ggtatggctt	1320
cattcagctc cggttcccaa cgatcaaggc gagttacatg atcccccattg ttgtgcaaaa	1380
aagcggttag ctcccttcggt cctccgatcg ttgtcagaag taagttggcc gcagtgttat	1440
cactcatggt tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt catgccatcc gtaagatgct	1500
tttctgtgac tgggtgagta tcaaccaagt cattctgaga atagtgtatg cggcgaccga	1560
gttgcctctt cccggcgta atacgggata ataccgcgcc acatagcaga actttaaaag	1620
tgctcatcat tggaaaacgt tcttcggggc gaaaactctc aaggatctta ccgctgttga	1680
gatccagttc gatgtaaccc actcgtgcac ccaactgac ttcagcatct tttactttca	1740
ccagcgtttc tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaatgc cgcaaaaaag ggaataaggg	1800
cgacacggaa atgttgata ctcatactct tcctttttca atattattga agcatttatc	1860
agggttattg tctcatgagc ggatacatat ttgaatgtat ttagaaaaat aaacaaatag	1920
gggttccgcg cacatttccc cgaaaagtgc cacctgcac tcatcacggt cagcatggc	1980
tgcccccgcg cagcgcccc cgaccccc cgatcccc gaacgccagc cgccatccac	2040
cgcccgagc ccccgagcc cgcgagccc gacccccgc cgctcgccc ccgttgcgcc	2100
gctctctgcg ggggggctag gggggcgcg ggggaaggcc acgccccctc cactttttcc	2160
aggaatgccc ggcatgacc gccccccca tgaccgcca acaccccc gatgcccc	2220
gggggtctt cctggggggc ctttgtcagg gttgcctgtg tcaccacagg gcccttggc	2280
cacgcttgcc tgggtcacc cgagcccc ggtcacgttt gccggggtca gccctggggc	2340
gcttcttcac gctccattgc catgcagaat tccacgttgt gcatagaaac agatgcaggc	2400
aaaacatcca cacatataaa acaaaaaatt aaaaccaata aaactcctaa acttttggtc	2460
tttcttgaat cttcaatccc tcaggttatg aaataatcat ttatgcagtc aaaaatttgc	2520
cattcttggt gccagggtgt gtgatgattc ggggaagcag aagcaggcag atctctgtga	2580
atgaggccag cctggtctac aaagtgagtc ccaggacagt caggcctgtt acacagagaa	2640
accttgaaaa aaaaaagata atatgtactg ttgtattacc ccaatatata aggctaaacc	2700
attagaagca caactgtgt aagtacggaa aataatatct agtgtggtag agttactact	2760
actataatac actaatatag ctgtgggaaa ctagtccaa agatgaatta ctaaccagt	2820
tttccaagga aataaatgaa agcagagaga ttagttctat tgctagtgtt tcattttcgt	2880
atatttctta caatttctct tgttacaat aggcactagg gtatcaagat aattttaacg	2940
actggctgag aaccctagaa aatctctgtg aaaaaggat ttgtgaaatg agagagggt	3000
atgtggccat tatagaaaag gcttttgtgt gccttgcag catagaccct gtgtttgatc	3060
tcttaacacc ctcttgacc agaaaaagct tctgtggata gaaaatgatt agttatatat	3120
acttttaggg aaacgtagtt ctggattctt tggttacaat taacagaatt aagtgcaaac	3180
aaagccagaa acctcctgat aaatgagaaa acctgctgtt agaagggtgt aaggctctgt	3240

Страница 2

aatataggaa ttaggagaaa agaaacctgt gtggtggggc acgtctgtaa tcccagcatt	3300
gggaagtaga ggtagaagat tagaaatcaa aggccagcct cagcaacaca gtgagtttga	3360
ggccaccctg aactacatca ggttctgtct cctttctttt tttttttttt cttttctttt	3420
tttggtttct ctgtgtagtt ttggagccta tcctggcact agctctgaag agcaggctgg	3480
cctcgaactc agagatcagc cagcctctgc tgggattaaa ggtatgcacc accaacgccc	3540
caggttttgt ctcaaacaaa caaaaataac atcaggaggt ggtgagaggg ctgagtgggc	3600
acaggcattc tctgcaaagc ctgactctga gttggatcct ttagagctac atggttgagg	3660
gaagagaact gactcctgga aggtgtcctc tggccccac acatagctat acacagcatg	3720
tgcattcaca cacactaaat aatgtatttt ttaaaaaaat taaaaacaac aacagtttgg	3780
gttgtgaaaa ctagaactag ataataggta agaatcaagt atcatgtaaa ttgctttca	3840
actcatccca aaatttgttt tatatttcag tttttttcct tcctagcttg actgtggagt	3900
cttgtccgga agcaaatagt tcctttgcag atcccacatg tggacaccgg acagtaggtc	3960
ctcaaatgct ccttattagg ttggttcaat aatatcaatt gtttgttact aggcagtgat	4020
gttgtacatc tggaggagat ctcttgagcc cataatcagg ttattaggaa taaatactct	4080
aaggctaaaa atgtagctta gtgataagag tgcttgccctg gtgtgctgag accctcggtt	4140
ccatctccac aaccccatat tccattacaa aatacctttt caccgtccct agcattaaga	4200
aacaaaacaa caaagaagtt tttctttctt ctgagatcct gcccggagag gcatttaaaa	4260
ctggccaggg ccaaaaaaaa aaaaaaaaaa agaaaaaaa gaaaagaaaa caggctaggg	4320
ccggcatggt ggcgcacgcc tttaatccca gcacgcagga ggcagaggca gggcggtatc	4380
ctgtgagttt gaggtcagcc tggctctact agtgagtttc agggcaccca gggctaaaga	4440
gactgtctca aaaacaaaac agccacacaa tcagaaccac agcaaaacgc agttatgatc	4500
cttggaactg taggaatgac aagcatttaa ataataggac gagccatttt tgagaagctc	4560
tgatttcaca agtgtcaggg atgggctctg ggcgagtaag attgctaag ctggcctcta	4620
aatgagacca cgtggagttg attagattct tticattgtt ctcgtgctct atcaataaac	4680
tgtacccaaa tacacacaca cacacacaca cacaatgcgc gcacacacaa aatccttttt	4740
tagcttaaga agcccagaat cagaagtaaa gctaactgtg ggacttaagt attattctga	4800
acggaactcc cagggcgtag agcgcgcttc aggcctccag agaagcagct ggcgctggat	4860
ggaatgaacc aagaggccag cacaggggca gatccgtcga gctctcgcc accgagctga	4920
gcccttaggt tctggggctg ggaagggtcc ctaggattgt gcacctctcc cgcgggggac	4980
aagcaggggg atggcggggc tgacgtcggg aggtggcctc cacgggaagg gacaccgga	5040
tctcgacaca gccttggcag tggagtcagg aagggtaggg acagattctg gacgccctct	5100
tggccagctc ctaccgccc ccccccgac tggagccgag agtaattcat acaaaaggag	5160
ggatcgctt cgccttggtg aatcccagg accgtcgcta aattctggcc ggcctcccag	5220
cccgaaccg ctgtgcccgc ccagcgggc gggaggagcc tgcgcctagg gcggatcgcg	5280

Страница 3

ggtcggcggg agagcacaag cccacagtcc ccggcggtgg gggaggggcg cgctgagcgg	5340
gggccccgga gccagcgcgg ggcaactg gaaagtgggt tcgtgtgctg gctccgccct	5400
cttccccgagg gtgggggaga acggtataaa agtgcggtag tcgcttgga cgttcttttt	5460
cgcaacgggt ttgccgtcag aacgcagggt agtggcgggt gtggcctccg cgggccccgg	5520
ctccctcctt tgagcggggt cggaccgccg tgcgggtgtc gtcggccggg cttctctgcg	5580
agcgttcccc ccctggatgg cgggctgtgc gggagggcga gggggggagg cctggcggcg	5640
gccccggagc ctgcctcgt gtcgggcgtg aggcctagcg tggcttccgc cccgccgcgt	5700
gccaccgcgg ccgcgctttg ctgtctgccc ggctgccctc gattgcctgc ccgcggcccc	5760
ggccaacaaa gggagggcgt ggagctggct ggtagggagc cccgtagtcc gcatgtcggg	5820
cagggagagc ggcagcagtc ggggggggga ccgggccccg ccgtcccga gcacatgtcc	5880
gacgccgcct ggacgggtag cggcctgtgt cctgataagg cggccgggcg gtgggtttta	5940
gatgccgggt tcaggtgccc ccgggtcccc gcccggtctg gccagtacc cgtagtggct	6000
tagctccgag gaggcgagg cccgcccgcc cggcaccagt tgcgtgcgcg gaaagatggc	6060
cgctccccgg ccctgtagca aggagctcaa aatggaggac gcggcagccc ggcggagcgg	6120
ggcgggtgag tcaccacac aaaggaagag ggccttgccc ctgcgggcc gctgcttcct	6180
gtgaccccggt ggtgtaccgg ccgcattca gtcaccccg gcgctctttc ggagaccgc	6240
tggcctccgc tgggggagg gatctgtcta atggcgttg agtttctca catttggtgg	6300
gtggagactg tagccaggcc agcctggcca tgaaagtaat tcttgaatt tgccatttt	6360
gagtttgag cgaagctgat tgacaaagct gcttagccgt tcaaaggat tcttcgaact	6420
ttttttttaa ggtgtgtga aaacctcag gccgccacc atg cag cgc gtg aac	6474
Met Gln Arg Val Asn	
1 5	
atg atc atg gca gaa tca cca ggc ctc atc acc atc tgc ctt tta gga	6522
Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Gly Leu Ile Thr Ile Cys Leu Leu Gly	
10 15 20	
tat cta ctc agt gct gaa tgt aca gtt ttt ctt gat cat gaa aac gcc	6570
Tyr Leu Leu Ser Ala Glu Cys Thr Val Phe Leu Asp His Glu Asn Ala	
25 30 35	
aac aaa att ctg aat cgg cca aag agg tat aat tca ggt aaa ttg gaa	6618
Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu	
40 45 50	
gag ttt gtt caa ggg aac ctt gag aga gaa tgt atg gaa gaa aag tgt	6666
Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys	
55 60 65	
agt ttt gaa gaa gca cga gaa gtt ttt gaa aac act gaa aga aca act	6714
Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr	
70 75 80 85	
gaa ttt tgg aag cag tat gtt gat ggg gat cag tgt gag tcc aat cca	6762
Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro	
90 95 100	
tgt tta aat ggc ggc agt tgc aag gat gac att aat tct tat gaa tgt	6810

Cys	Leu	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Asp	Ile	Asn	Ser	Tyr	Glu	Cys	
			105					110					115			
tgg	tgt	ccc	ttt	gga	ttt	gaa	gga	aag	aac	tgt	gaa	tta	gat	gta	aca	6858
Trp	Cys	Pro	Phe	Gly	Phe	Glu	Gly	Lys	Asn	Cys	Glu	Leu	Asp	Val	Thr	
		120					125					130				
tgt	aac	att	aag	aat	ggc	aga	tgc	gag	cag	ttt	tgt	aaa	aat	agt	gct	6906
Cys	Asn	Ile	Lys	Asn	Gly	Arg	Cys	Glu	Gln	Phe	Cys	Lys	Asn	Ser	Ala	
	135					140					145					
gat	aac	aag	gtg	gtt	tgc	tcc	tgt	act	gag	gga	tat	cga	ctt	gca	gaa	6954
Asp	Asn	Lys	Val	Val	Cys	Ser	Cys	Thr	Glu	Gly	Tyr	Arg	Leu	Ala	Glu	
	150				155					160					165	
aac	cag	aag	tcc	tgt	gaa	cca	gca	gtg	cca	ttt	cca	tgt	gga	aga	gtt	7002
Asn	Gln	Lys	Ser	Cys	Glu	Pro	Ala	Val	Pro	Phe	Pro	Cys	Gly	Arg	Val	
				170					175					180		
tct	gtt	tca	caa	act	tct	aag	ctc	acc	cgt	gct	gag	act	gtt	ttt	cct	7050
Ser	Val	Ser	Gln	Thr	Ser	Lys	Leu	Thr	Arg	Ala	Glu	Thr	Val	Phe	Pro	
			185					190					195			
gat	gtg	gac	tat	gta	aat	tct	act	gaa	gct	gaa	acc	att	ttg	gat	aac	7098
Asp	Val	Asp	Tyr	Val	Asn	Ser	Thr	Glu	Ala	Glu	Thr	Ile	Leu	Asp	Asn	
		200					205					210				
atc	act	caa	agc	acc	caa	tca	ttt	aat	gac	ttc	act	cgg	gtt	gtt	ggc	7146
Ile	Thr	Gln	Ser	Thr	Gln	Ser	Phe	Asn	Asp	Phe	Thr	Arg	Val	Val	Gly	
	215					220					225					
gga	gaa	gat	gcc	aaa	cca	ggt	caa	ttc	cct	tgg	cag	gtt	gtt	ttg	aat	7194
Gly	Glu	Asp	Ala	Lys	Pro	Gly	Gln	Phe	Pro	Trp	Gln	Val	Val	Leu	Asn	
	230				235					240					245	
ggt	aaa	gtt	gat	gca	ttc	tgt	gga	ggc	tct	atc	gtt	aat	gaa	aaa	tgg	7242
Gly	Lys	Val	Asp	Ala	Phe	Cys	Gly	Gly	Ser	Ile	Val	Asn	Glu	Lys	Trp	
				250					255					260		
att	gta	act	gct	gcc	cac	tgt	gtt	gaa	act	ggt	gtt	aaa	att	aca	gtt	7290
Ile	Val	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Val	Glu	Thr	Gly	Val	Lys	Ile	Thr	Val	
			265					270					275			
gtc	gca	ggt	gaa	cat	aat	att	gag	gag	aca	gaa	cat	aca	gag	caa	aag	7338
Val	Ala	Gly	Glu	His	Asn	Ile	Glu	Glu	Thr	Glu	His	Thr	Glu	Gln	Lys	
		280					285					290				
cga	aat	gtg	att	cga	att	att	cct	cac	cac	aac	tac	aat	gca	gct	att	7386
Arg	Asn	Val	Ile	Arg	Ile	Ile	Pro	His	His	Asn	Tyr	Asn	Ala	Ala	Ile	
	295					300					305					
aat	aag	tac	aac	cat	gac	att	gcc	ctt	ctg	gaa	ctg	gac	gaa	ccc	tta	7434
Asn	Lys	Tyr	Asn	His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Glu	Leu	Asp	Glu	Pro	Leu	
	310				315					320					325	
gtg	cta	aac	agc	tac	gtt	aca	cct	att	tgc	att	gct	gac	aag	gaa	tac	7482
Val	Leu	Asn	Ser	Tyr	Val	Thr	Pro	Ile	Cys	Ile	Ala	Asp	Lys	Glu	Tyr	
				330					335					340		
acg	aac	atc	ttc	ctc	aaa	ttt	gga	tct	ggc	tat	gta	agt	ggc	tgg	gga	7530
Thr	Asn	Ile	Phe	Leu	Lys	Phe	Gly	Ser	Gly	Tyr	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	
			345					350					355			
aga	gtc	ttc	cac	aaa	ggg	aga	tca	gct	tta	gtt	ctt	cag	tac	ctt	aga	7578
Arg	Val	Phe	His	Lys	Gly	Arg	Ser	Ala	Leu	Val	Leu	Gln	Tyr	Leu	Arg	
		360					365					370				
gtt	cca	ctt	gtt	gac	cga	gcc	aca	tgt	ctt	cga	tct	aca	aag	ttc	acc	7626

Страница 5

Val	Pro	Leu	Val	Asp	Arg	Ala	Thr	Cys	Leu	Arg	Ser	Thr	Lys	Phe	Thr		
375						380					385						
atc	tat	aac	aac	atg	ttc	tgt	gct	ggc	ttc	cat	gaa	gga	ggt	aga	gat	7674	
Ile	Tyr	Asn	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Phe	His	Glu	Gly	Gly	Arg	Asp		
390					395				400						405		
tca	tgt	caa	gga	gat	agt	ggg	gga	ccc	cat	gtt	act	gaa	gtg	gaa	ggg	7722	
Ser	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Val	Thr	Glu	Val	Glu	Gly		
				410					415					420			
acc	agt	ttc	tta	act	gga	att	att	agc	tgg	ggt	gaa	gag	tgt	gca	atg	7770	
Thr	Ser	Phe	Leu	Thr	Gly	Ile	Ile	Ser	Trp	Gly	Glu	Glu	Cys	Ala	Met		
				425				430					435				
aaa	ggc	aaa	tat	gga	ata	tat	acc	aag	gta	tcc	cgg	tat	gtc	aac	tgg	7818	
Lys	Gly	Lys	Tyr	Gly	Ile	Tyr	Thr	Lys	Val	Ser	Arg	Tyr	Val	Asn	Trp		
		440					445					450					
att	aag	gaa	aaa	aca	aag	ctc	act	taatgaaagc	tagcggccgc	gcagttaacg	7872						
Ile	Lys	Glu	Lys	Thr	Lys	Leu	Thr										
	455					460											
ccgccccctct	ccctcccccc	cccctaactg	tactggccga	agccgcttgg	aataaggccg	7932											
gtgtgctgtt	gtctatatgt	tattttccac	catattgccg	tcttttgga	atgtgagggc	7992											
ccggaaacct	ggccctgtct	tcttgacgag	cattcctagg	ggtctttccc	ctctcgccaa	8052											
aggaatgcaa	ggtctgttga	atgtcgtgaa	ggaagcagtt	cctctggaag	cttcttgaag	8112											
acaacaacg	tctgtagcga	ccctttgcag	gcagcggaaac	ccccacctg	gcgacaggtg	8172											
cctctgcggc	caaaagccac	gtgtataaga	tacacctgca	aaggcggcac	aaccccagtg	8232											
ccacgttgtg	agttggatag	ttgtggaaag	agtcaaatgg	ctctcctcaa	gcgtattcaa	8292											
caaggggctg	aaggatgccc	agaaggtacc	ccattgtatg	ggatctgatc	tggggcctcg	8352											
gtacacatgc	tttacctgtg	tttagtcgag	gttaaaaaaa	cgtctaggcc	ccccgaacca	8412											
cggggacgtg	gttttccttt	gaaaaacacg	atgataatat	ggccacaaga	tctgccacca	8472											
tggttcgacc	attgaactgc	atcgtcgccg	tgtcccaaaa	tatggggatt	ggcaagaacg	8532											
gagacctacc	ctggcctccg	ctcaggaacg	agttcaagta	cttccaaaga	atgaccacaa	8592											
cctcttcagt	ggaaggtaaa	cagaatctgg	tgattatggg	taggaaaacc	tggttctcca	8652											
ttcctgagaa	gaatcgacct	ctaaaggaca	gaattaatat	agttctcagt	agagaactca	8712											
aagaaccacc	acgaggagct	cattttcttg	ccaaaagttt	ggatgatgcc	ttaagactta	8772											
ttgaacaacc	ggaattggca	agtaaagtag	acatggtttg	gatagtcgga	ggcagttctg	8832											
tttaccagga	agccatgaat	caaccaggcc	acctcagact	ctttgtgaca	aggatcatgc	8892											
aggaatttga	aagtgcacg	tttttcccag	aaattgattt	ggggaaatat	aaacttctcc	8952											
cagaataccc	aggcgtcctc	tctgaggtcc	aggaggaaaa	aggcatcaag	tataagtttg	9012											
aagtctacga	gaagaaagac	taatctagca	tattaccctc	aacacctgcc	accccagctc	9072											
taatcagtg	tggaagaacg	gtctcagaac	tgttgtctc	aattggccat	ttaagtttaa	9132											
tagtgaaaga	ctggttaatg	ataacaatgc	atcggaaaac	cttcaggagg	aaaggagaat	9192											
gttttgtgga	acatttttgt	gtgtgtggca	gttttaagtt	attagttttc	aaaatcagta	9252											

Страница 6

ctttttaatg gaaacaactt gacccaaaat ctgtcacaga attttgagac ccattaaaat	9312
acaagtttaa tgagaagtct gtctctgtta atgctgaagt cattactaag tgcttagctt	9372
agcaaggatg gtggatgcc atttgtgttc caagggattg gactgttcat caggacccag	9432
agctgagttt caagggctca agagatggct tattacctgt ggggtgtctg aaggttctgg	9492
ttgggacaaa ttaggaatgt ttttggcaga catggtgact acccttcacg tgggtgagtt	9552
cagttgattt gtcttgagcc tttggggttt acacaagtaa atgacatcat acagttagtg	9612
tattgttagt gaatattaat atatgaggca ggctttgctc tagcaatttt agaactagtt	9672
ttcaggaaaag ggttcacctt gtgcattgga tgtttgattc tatcacttag agtttaaaact	9732
gaaagtgtc aagaggtttt atttaggctg ggaataaaat aagcctttct gtagcttgta	9792
atgggtatcag gaatttaaaa ggccatctgg ggcacaaaga ttaagcagaa aaggtagaag	9852
gtgagattgg gggactttga gtacttcaca cactttaatg tgtgagtgtc ttagtgcata	9912
tagtacaact gccagataag ggcattccaca tctgattgtt tggaaggcac cttgtggttt	9972
ctgggaattc agaattggga gaaaaagtgc tcccaaccgc tgaagccctt ggtaattctgc	10032
aggggtgtta tttagcagga gataaggaca aaaagttata gtgtggagtt ggttgagttg	10092
gtagatgtca ttacaacagg tggctttaa ttgggttagg agtcactttg aaataacctg	10152
gccataagca aagtggcatt ttcacctttc aggagaaaact ggtacactta tccattctat	10212
agtgcattgt tgttcaattg ggctgatgac taaaccggtg actaaagggt tgtcagtata	10272
aatggatggg ttgtaggcag acggtgagga attactatac ctgcaaggag tcattgcctg	10332
atctgcctgg aaagggcgag gattgagtct cagaagggtg acaccatagg atatggaaaa	10392
atgtgtcacg cctagcattc aacttagtgg tgtagcgcca cctactggca ctttaaaagc	10452
ttagcataga ggagcatgtg tgttaggagc tcggatggga tccagggcct caaggtttgc	10512
atgtaaataa aagcccttta ccaaattaac tacataccag catacatcag tccttttagt	10572
ttgaaaaaca gaagtgaag ctaatatata tagtgcttgc tttatttaag tctagctgat	10632
tacgtgtttg gttgccagtg tgactagtct ggagttgaat ttgtcctcag acacgtaaaa	10692
tggaatttgg gattcacac actctagtat gagggacctt atggcctgta ccaggcacia	10752
acgtgtctat aaactacaca aaacgaagga atttacagga attaggaagg tattcttaac	10812
atataaacat tatgggcatt ttaaaaaag ctttgacagg atttctttgt catggctgtc	10872
ctggagctag ttgtgtagac caggctgggc tgaaatcttg tctgcctgcc tggcttggac	10932
acttttttat tatgtatata acattctgct tccatgtata tctgcacatt agaagacggc	10992
accagatctc ctaatggatg gttgtgagcc accatgtggt tgctgggaat tgaactcagg	11052
acctctggaa gagcagtgtc cttaacctct gagccatctc cagccccagc ttgggcacat	11112
ttttaatggc tgggaaatca aaccccttag gccttctgtc agtaatgaag ggcttttggc	11172
taccgagagt aggatttaag gttattcgga gctgcaggtc tgcctcagtg caggtttggg	11232
agtccagcat ctagaaaaat gcagtgaagc caagctgagc tatattttgt ttaaaaaaaa	11292

aataagtggg taaagtgtg ctgagcctga tgaccaagct gggacacaag tagaagaaca	11352
taggccaatg ctctatatta aaagcatggg tcatttttaa tgctcttgag aaggctatgc	11412
ctacactact ctgagccacc gcagcgtgtt taaattaaac tagtttgga attttctttg	11472
ggggtaaagct atttaacctg gtgccttggc aggtatacta ctgaactctc ctccctcattc	11532
ctttttgttt ttttaagaatt tcagtcaggc tcaggcagcc cttaaacttg tgattaagcc	11592
tgagaacagt tacgattatg agcctattag tataccgac aatatgtgaa tttttttggg	11652
atgggggtca ggcctccctg cctcccaaat actgggacta aaggctgcac caccacaacc	11712
tggctcttga aatacttttc tacatttttt ggggggcatg ggtgggagag cagggtttct	11772
ctgtattagc cctggctctc ctggaactct gtagaccagg ctattcttga gctcagatta	11832
gcctgtctct gcctcctaaa ttctgggatt aaaggtgtgt gctactgctg cctggctaca	11892
aagacatttt tttttttctt aaatttaaaa acaaaagtgg ttcttttaga aggggtggtg	11952
gtgttggcac atactccaag cactcagggt ttgagtttgt cccaggaatg aagactgcat	12012
tactgccgcc cctccctggt aagggtctaca cagagaaatc ctatttgag cctgtcctgg	12072
taactcgtc tgtagaccag gctggcctcg aactcaagag aaccacctgc ctctgaatgc	12132
tggattaag ggcaggcacc accaacacc agcctaaaa atgtcttttt tttaaagatt	12192
tttttttttt tttttacaga ataaacattc tgtttacaat attctgcttc tatgtatatc	12252
tgcaactag aagagggcac ccgattctcat aatggatggt tgtgagccac caagtgggtg	12312
ctgggaattg aactcagaac ctctggaaga gcagtcagtg ctcttaacct ctgagccatc	12372
tctccagccc ctaaaaatgg ctcttgagat agggctctca gtagtttgag actgagttgg	12432
ctatataaac aaggctggca catagcacca tgtacagctg ggtttagttt acatgggggtg	12492
tttttgtctc tggaggcagg aggatcattt gagcataggg agttaatagt gaggtcatgt	12552
tttatctact ctctgaatt gagaactaag ctgatgcaaa gcaagtttga ctgaagaagt	12612
ccagtttatg agaacaaggg tggaaactaa tgtgtcaaag atggccttgc atgtgtttta	12672
gatgatgacc cagtcacttg ggaattactg gatgtgtaag acctatatct tgacaggagt	12732
gaacagtgtc ttataggtcc tatatgaaag aaatgagaca taccattttt gtttccccta	12792
agaattcact tttcctaacc tggttcatgc tatttaggtt attttacttg caaatcctag	12852
ggtgctccct taccagtat tgcttatgtg gcaccaaagt cactcactcc catgatttgc	12912
aagtctctgg gaacttccat gacaacctag aatagcaact caatacatt ttctcagtac	12972
caattttgaa gaaaaaatat ttgcaaaaat agctgtatgg atgggtacta aatagtgagg	13032
ttatctccag aaggcctatg aagaattaag gttgagttca gttgagttca gcagcaagtt	13092
taaggttcat ccatttttgt acagtgtttt cctattacgg taagtgtttt gcctgcagga	13152
atatctgtac cacatgcttg cctggtacct atatcgcca gaagagggtc ttggatcctc	13212
tggacttgaa ttacagatgg gtattagcca ccatttaggt gctgggaatt gaaaccaagt	13272
cctctggaag aacagcaagt gactcga	13299

<210> 2
 <211> 461
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 2

```

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

Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu Cys Thr Val Phe Leu
20          25          30

Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg Tyr Asn
35          40          45

Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys
50          55          60

Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn
65          70          75          80

Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln
85          90          95

Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Asp Ile
100         105         110

Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys
115         120         125

Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu Gln Phe
130         135         140

Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr Glu Gly
145         150         155         160

Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe
165         170         175

Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala
180         185         190

Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu
195         200         205

Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe
210         215         220

```

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

<210> 3
 <211> 461
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Gly Leu Ile Thr
 Страница 10

1	5	10	15
Ile Cys Leu	Leu Gly Tyr Leu Leu	Ser Ala Glu Cys Thr Val	Phe Leu
	20	25	30
Asp His Glu	Asn Ala Asn Lys Ile Leu	Asn Arg Pro Lys Arg Tyr Asn	
	35	40	45
Ser Gly Lys Leu Glu Glu	Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys		
	50	55	60
Met Glu Glu Lys Cys Ser	Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn		
	65	70	75
Thr Glu Arg Thr	Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln		
	85	90	95
Cys Glu Ser	Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Asp Ile		
	100	105	110
Asn Ser Tyr	Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys		
	115	120	125
Glu Leu Asp Val Thr Cys	Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu Gln Phe		
	130	135	140
Cys Lys Asn Ser Ala	Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr Glu Gly		
	145	150	155
Tyr Arg Leu Ala	Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe		
	165	170	175
Pro Cys Gly	Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala		
	180	185	190
Glu Thr Val	Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu		
	195	200	205
Thr Ile Leu Asp Asn Ile	Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe		
	210	215	220
Thr Arg Val Val Gly	Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp		
	225	230	235
Gln Val Val Leu	Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly Ser Ile		
	245	250	255
Val Asn Glu	Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu Thr Gly		
	260	265	270
Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly	Glu His Asn Ile Glu Glu Thr Glu		

275 280 285
 His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His His Asn
 290 295 300
 Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Glu
 305 310 315 320
 Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile
 325 330 335
 Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr
 340 345 350
 Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val
 355 360 365
 Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg
 370 375 380
 Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His
 385 390 395 400
 Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val
 405 410 415
 Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly
 420 425 430
 Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser
 435 440 445
 Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
 450 455 460

<210> 4
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR primer

<400> 4
 ttcctcgagg ccgccaccat gcagcgctg aacatg

36

<210> 5
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR primer

<400> 5

atgctagctt tcattaagtg agctttg	27
<210> 6	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> PCR primer	
<400> 6	
taatacgact cactataggg	20
<210> 7	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> PCR primer	
<400> 7	
gatttaggtg acactatag	19
<210> 8	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> PCR primer	
<400> 8	
cggtatgtca actggattaa g	21
<210> 9	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> PCR primer	
<400> 9	
gccgctgctt cctgtgac	18
<210> 10	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> PCR primer	
<400> 10	
aggtttcg ggcctcacat tg	22
<210> 11	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220>
 <223> PCR primer
 <400> 11
 ttctctgagg ccgccaccat ggagctgagg ccctg 35

<210> 12
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> PCR primer
 <400> 12
 aatctagact atcactcagg caggtgtgag ggc 33

<210> 13
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> PCR primer
 <400> 13
 caacggtgtc tgtggtgtag g 21

<210> 14
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> PCR primer
 <400> 14
 gccaccta atgccaacg 19

<210> 15
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> PCR primer
 <400> 15
 cagggtggag cgggtg 16

<210> 16
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> primer
 <400> 16
 gctgcagagg gagcctaag tacagtggct ggaacagcag gtg 43

<210> 17

<211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 17
 cacctgctgt tccagccact gtacttgagg ctccctctgc agc 43

<210> 18
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 18
 gttccagcca ctgtacttg 19

<210> 19
 <211> 14569
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> expression plasmid

<400> 19
 ccgtcgacct ctaggcgcgc catggctctt ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct 60
 cggtcggttcg gctgcggcga gcggtatcag ctcaactcaaa ggcggaataa cggttatcca 120
 cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga 180
 accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct ccgccccct gacgagcatc 240
 acaaaaatcg acgctcaagt cagagggtggc gaaacccgac aggactataa agataaccagg 300
 cgtttccccc tggaagctcc ctctgcgct ctccgtgttc gaccctgccg cttaccggat 360
 acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca cgctgtaggt 420
 atctcagttc ggtgtaggtc gttcgcgtcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccggtc 480
 agccccgaccg ctgcgcctta tccggtaact atcgtcttga gtccaacccg gtaagacacg 540
 acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg 600
 gtgctacaga gttcttgaag tgggtggccta actacggcta cactagaaga acagtatttg 660
 gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg 720
 gcaaacaaac caccgctggg agcggttttt ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa 780
 aaaaaggatc tcaagaagat cttttgatct tttctacggg gtctgacgct cagtggaaacg 840
 aaaactcacg ttaagggatt ttggtcatga gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc 900
 ttttaaatca aaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat atatgagtaa acttgggtctg 960
 acagttacca atgcttaatc agtgaggcac ctatctcagc gatctgtcta tttcgttcat 1020
 ccatagtgtc ctgactcccc gtcgtgtaga taactacgat acgggagggc ttaccatctg 1080

gccccagtgc tgcaatgata ccgcgagacc cacgctcacc ggctccagat ttatcagcaa	1140
taaaccagcc agccggaagg gccgagcgca gaagtgggtcc tgcaacttta tccgcctcca	1200
tccagtctat taattgttgc cggaagcta gagtaagtag ttcgccagtt aatagtttgc	1260
gcaacgttgt tgccattgct acaggcatcg tgggtgcacg ctcgtcgttt ggtatggctt	1320
cattcagctc cggttcccaa cgatcaaggc gagttacatg atcccccattg ttgtgcaaaa	1380
aagcggttag ctcttcggt cctccgatcg ttgtcagaag taagttggcc gcagtgttat	1440
cactcatggt tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt catgccatcc gtaagatgct	1500
tttctgtgac tgggtgagtac tcaaccaagt cattctgaga atagtgtatg cggcgaccga	1560
gttgctcttg cccggcgta atacgggata ataccgcgcc acatagcaga actttaaaag	1620
tgctcatcat tggaaaacgt tcttcggggc gaaaactctc aaggatctta ccgctgttga	1680
gatccagttc gatgtaacct actcgtgcac ccaactgatc ttcagcatct tttactttca	1740
ccagcgtttc tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaaatgc cgcaaaaag ggaataaggg	1800
cgacacggaa atgttgaata ctcatactct tcctttttca atattattga agcatttatc	1860
agggttatg tctcatgagc ggatacatat ttgaatgtat ttagaaaaat aaacaaatag	1920
gggttccgcg cacatttccc gaaaagtgc cacctgcac tcatcacggt cacgcatggc	1980
tgccccgcg cagcgcctcc cgaccccccc ccgatccccg gaacgccagc cgccatccac	2040
cgccccgagc ccccgagacc cgcggaaccc gacccccgcg cgctcgcccc cggttgcgcc	2100
gctctctgcg ggggggctag gggggcgcg ggggaaggcc acgccccctc cactttttcc	2160
aggaaatgcgc ggcatgacct gccccccca tgaccgcga acaccccccc gatgcccccc	2220
gggggtcttt cctggggggc ctttgtcagg gttgcctgtg tcaccacagc gcccttggc	2280
cacgcttgcc tgggtcacc cgagccccg ggtcacgttt gccggggtca gccctggggc	2340
gcttcttcac gctccattgc catgcagaat tccacgttgt gcatagaaac agatgcaggc	2400
aaaacatcca cacatataaa acaaaaaatt aaaaccaata aaactcctaa acttttggtc	2460
tttcttgaat cttcaatccc tcaggttatg aaataatcat ttatgcagtc aaaaatttgc	2520
cattcttggt gccagggtgt gtgatgattc ggggaagcag aagcaggcag atctctgtga	2580
atgaggccag cctgggtctac aaagtgagtc ccaggacagt caggcctgtt acacagagaa	2640
accttgaaaa aaaaaagata atatgtactg ttgtattacc ccaatatata aggctaaacc	2700
attagaagca caacactggt aagtacggaa aataatatct agtgtggtac agttactact	2760
actataatac actaatatag ctgtgggaaa ctagtccaag agatgaatta ctaaccagtg	2820
tttccaagga aataaatgaa agcagagaga ttagttctat tgctagtgtt tcattttcgt	2880
atatttctta caatttctct tgttacaagt aggcactagg gtatcaagat aattttaacg	2940
actggctgag aaccctagaa aatctctgtg aaaaagggat ttgtgaaatg agagagggtg	3000
atgtggccat tatagaaaag gcttttgtgt gccttgcatt catagaccct gtgtttgatc	3060
tcttaacacc ctcttgacc agaaaaagct tctgtggata gaaaatgatt agttatatat	3120

acttttaggg aaacgtagtt ctggattctt tggttacaat taacagaatt aagtgcaaac 3180
 aaagccagaa acctcctgat aaatgagaaa acctgcttgt agaaggttgt aaggctctgt 3240
 aatataggaa ttaggagaaa agaaacctgt gtggtggggc acgtctgtaa tcccagcatt 3300
 gggaagtaga ggtagaagat tagaaatcaa aggccagcct cagcaacaca gtgagtttga 3360
 ggccaccctg aactacatca ggttctgtct cttttctttt tttttttttt cttttctttt 3420
 tttggtttct ctgtgtagtt ttggagccta tcctggcact agctctgaag agcaggctgg 3480
 cctcgaactc agagatcagc cagcctctgc tgggattaaa ggtatgcacc accaacgccc 3540
 caggttttgt ctcaaacaaa caaaaataac atcaggaggt ggtgagaggg ctcagtggtc 3600
 acaggcattc tctgcaaagc ctgactctga gttggatcct ttagagctac atggttgagg 3660
 gaagagaact gactcctgga aggtgtcctc tgggtccccc acatagctat acacagcatg 3720
 tgcattcaca cacactaaat aatgctattt ttaaaaaaat taaaaacaac aacagtttgg 3780
 gttgtgaaaa ctagaactag ataataggta agaatcaagt atcatgtaaa tttgctttca 3840
 actcatccca aaatttgttt tatatttcag tttttttcct tcctagcttg actgtggagt 3900
 cttgtccgga agcaaatagt tcctttgcag atcccacatg tggacaccgg acagtaggtc 3960
 ctcaaatgct ccttattagg ttggttcaat aatatcaatt gtttgttact aggcagtgat 4020
 gttgtacatc tggaggagat ctcttgagcc cataatcagg ttattaggaa taaatactct 4080
 aaggctaaaa atgtagctta gtgataagag tgcttgcttg gtgtgctgag accctcggtt 4140
 ccatctccac aaccccatat tccattacaa aatacctttt caccgtccct agcattaaga 4200
 aacaaaacaa caaagaagtt tttctttctt ctgagatcct gcccggagag gcatttaaaa 4260
 ctggccaggg ccaaaaaaaaa aaaaaaaaaa agaaaaaaaa gaaaaagaaa caggctaggg 4320
 ccggcatggt ggcgcacgcc tttaatccca gcacgcagga ggcagaggca gggcggatct 4380
 ctgtgagttt gaggtcagcc tgggtctacct agtgagtttc agggcaccca gggctaaga 4440
 gactgtctca aaaacaaaac agccacacaa tcagaaccac agcaaaacgc agttatgac 4500
 cttggaactg taggaatgac aagcatttaa ataataggac gagccatttt tgagaagctc 4560
 tgatttcaca agtgtcaggg atgggctctg ggcgagtaag attgctaag ctggcctcta 4620
 aatgagacca cgtggagttg attagattct tttcatgttc ctctgtctct atcaaataac 4680
 tgtacccaaa tacacacaca cacacacaca cacaatgcgc gcacacacaa aatccttttt 4740
 tagcttaaga agcccagaat cagaagtaaa gctaactgtg ggacttaagt attattctga 4800
 acggaactcc cagggcgtga agcgcgcttc aggcctccag agaagcagct ggcgctggat 4860
 ggaatgaacc aagaggccag cacaggggca gatccgtcga gctctcgcc accgagctga 4920
 gcccttaggt tctggggctg ggaagggctc ctaggattgt gcacctctcc cgcgggggac 4980
 aagcaggggg atggcggggc tgacgtcggg aggtggcctc cacgggaagg gacccccgga 5040
 tctcgacaca gccttggcag tggagtcagg aagggtaggg acagattctg gacgccctct 5100
 tggccagctc ctcaccgccc caccctcgac tggagccgag agtaattcat acaaaaggag 5160

ggatcgccctt cgcccctggg aatcccaggg accgtcgcta aattctggcc ggcctcccag	5220
cccggaaaccg ctgtgcccgc ccagcgccgc gggaggagcc tgcgcctagg gcggatcgcg	5280
ggtcggcggg agagcacaag cccacagtcc ccggcggtag gggaggggag cgctgagcgg	5340
gggcccggga gccagcgcg ggcaaaactgg gaaagtggg tcgtgtgctg gctccgccct	5400
cttcccagg gtgggggaga acggtataaa agtgcggtag tcgcgttgga cgttcttttt	5460
cgcaacgggt ttgccgtcag aacgcagggt agtggcgggt gtggcctccg cgggcccggg	5520
ctccctcctt tgagcggggt cggaccgccc tgcgggtgtc gtcggccggg cttctctgcg	5580
agcgttcccg ccctggatgg cgggctgtgc gggagggcga gggggggagg cctggcggcg	5640
gccccggagc ctgcctcgt gtcgggctg aggcctagcg tggcttccgc cccgccgcgt	5700
gccaccgcgg ccgcgctttg ctgtctgccc ggtgcccctc gattgcctgc ccgcgccccg	5760
ggccaacaaa gggagggcgt ggagctggct ggtagggagc cccgtagtcc gcatgtcggg	5820
cagggagagc ggcagcagtc ggggggggga ccgggcccgc ccgtcccga gcacatgtcc	5880
gacgccgcct ggacgggtag cggcctgtgt cctgataagg cggccgggag gtgggtttta	5940
gatgccgggt tcagggtgcc ccgggtcccc gcccggtctg gccagtaacc cgtagtggt	6000
tagctccgag gagggcgagg cccgcccgc ccggcaccagt tgcgtgcgag gaaagatggc	6060
cgctcccggg ccctgtagca aggagctcaa aatggaggac gcggcagccc ggcggagcgg	6120
ggcgggtgag tcacccacac aaaggaagag ggccttgccc ctgcgcggcc gctgcttcct	6180
gtgaccccgt ggtgtaccgg ccgcacttca gtcaccccgg gcgctctttc ggagcaccgc	6240
tggcctccgc tgggggaggg gatctgtcta atggcgttg agtttctca catttggtgg	6300
gtggagactg tagccaggcc agcctggcca tgaagtaat tcttgaatt tgcccatttt	6360
gagtttgag cgaagctgat tgacaaagct gcttagccgt tcaaaggat tcttcgaact	6420
ttttttttaa ggtgttgta aaacctcgag gccgccacca tggagctgag gccctggtg	6480
ctatgggtgg tagcagcaac aggaacctg gtcctgctag cagctgatgc tcagggccag	6540
aaggcttca ccaacacgtg ggctgtgccc atccctggag gccagcggg ggccaacagt	6600
gtggcacgga agcatgggtt cctcaacctg gccagatct tcggggacta ttaccacttc	6660
tggcatcgag gagtgacgaa gcggtccctg tcgcctcacc gcccgcgga cagccggctg	6720
cagagggagc ctcaagtaca gtggctggaa cagcaggtg caaagcgag gactaaacgg	6780
gacgtgtacc aggagcccac agacccaag tttctcagc agtggtacct gtctggtgtc	6840
actcagcggg acctgaatgt gaaggcgccc tgggcgcagg gctacacagg gcacggcatt	6900
gtggtctcca ttctggacga tggcatcgag aagaaccacc cggacttggc aggcaattat	6960
gacctgggg ccagttttga tgtcaatgac caggaccctg acccccagcc tcggtacaca	7020
cagatgaatg acaacaggca cggcacacgg tgtgcggggg aagtggctgc ggtggccaac	7080
aacggtgtct gtggtgtagg tgtggcctac aacgcccga ttggaggggt gcgcatgctg	7140
gatggcgagg tgacagatgc agtgaggga cgctcgctgg gcctgaacc caaccacatc	7200

cacatctaca	gtgccagctg	gggccccgag	gatgacggca	agacagtgga	tgggccagcc	7260
cgcttcgccg	aggaggcctt	cttcctgtgg	gttagccagg	gccgagggg	gctgggctcc	7320
atctttgtct	gggcctcggg	gaacgggggc	cggaacatg	acagctgcaa	ctgcgacggc	7380
tacaccaaca	gtatctacac	gctgtccatc	agcagcgcca	cgagtttg	caacgtgccg	7440
tggtacagcg	aggcctgctc	gtccacactg	gccacgacct	acagcagtgg	caaccagaat	7500
gagaagcaga	tcgtgacgac	tgacttgccg	cagaagtgca	cggagtctca	cacgggcacc	7560
tcagcctctg	cccccttagc	agccggcatc	attgctctca	ccctggaggc	caataagaac	7620
ctcacatggc	gggacatgca	acacctgtg	gtacagacct	cgaagccagc	ccacctcaat	7680
gccaacgact	gggccaccaa	tggtgtgggc	cggaagtga	gccactcata	tggttacggg	7740
cttttgacg	caggcgccat	ggtggccctg	gcccagaatt	ggaccacagt	ggccccccag	7800
cggaagtgca	tcacgacat	cctcaccgag	cccaaagaca	tcgggaaacg	gctcgagggtg	7860
cggaagaccg	tgaccgcgtg	cctgggagcg	cccaaccaca	tcactcggtc	ggagcacgct	7920
caggcgccgc	tcacctgtgc	ctataatcgc	cgtaggcgacc	tggccatcca	cctggtcagc	7980
cccattggga	cccgctccac	cctgctggca	gccaggccac	atgactactc	cgcatagggg	8040
tttaattgact	gggccttcat	gacaactcat	tcctgggatg	aggatccctc	tggcgagtgg	8100
gtcctagaga	ttgaaaacac	cagcgaagcc	aacaactatg	ggacgctgac	caagttcacc	8160
ctcgtactct	atggcaccgc	ccctgagggg	ctgcccgtac	ctccagaaag	cagtggctgc	8220
aagacctca	cgtccagtca	ggcctgtgtg	gtgtgcgagg	aaggcttctc	cctgcaccag	8280
aagagctgtg	tccagactg	ccctccaggc	ttcgcccccc	aagtcctcga	tacgcactat	8340
agcaccgaga	atgacgtgga	gaccatccgg	gccagcgtct	gcgccccctg	ccacgcctca	8400
tgtgccacat	gccagggggc	ggccctgaca	gactgcctca	gctgccccag	ccacgcctcc	8460
ttggaccctg	tggagcagac	ttgctcccgg	caaagccaga	gcagccgaga	gtccccgcca	8520
cagcagcagc	cacctcggtc	gcccccgag	gtggaggcgg	ggcaacggct	gcgggcaggg	8580
ctgctgccct	cacacctgcc	tgagtgatag	tctagcatat	taccctaac	acctgccacc	8640
ccagtcttaa	tcagtgggtg	aagaacggtc	tcagaactgt	ttgtctcaat	tggccattta	8700
agtttaatat	tgaaagactg	gttaatgata	acaatgcac	ggaaaacctt	caggaggaaa	8760
ggagaatggt	ttgtggaaca	ttttgtgtg	tgtggcagtt	ttaagttatt	agttttcaaa	8820
atcagtactt	tttaattgaa	acaacttgac	caaaaatctg	tcacagaatt	ttgagacca	8880
ttaaaataca	agtttaata	gaagtctgtc	tctgttaatg	ctgaagtcat	tactaagtgc	8940
ttagcttagc	aaggatgtg	gatgccatt	tgtgttccaa	gggattggac	tgttcatcag	9000
gacccagagc	tgagtttcaa	gggtcaaga	gatggcttat	tacctgtggg	tgtcttgaag	9060
gttctggttg	ggacaaatta	ggaatgtttt	tggcagacat	ggtgactacc	ttcatctggg	9120
tgagttcagt	tgatttgtct	tgagcctttg	gggtttacac	aagtaaatga	catcatacag	9180
ttagtgtatt	gttagtgaat	attaatatat	gaggcaggct	ttgctctagc	aatttttagaa	9240

ctagttttca ggaaggggtt catcttgtgc attggatggt tgattctatc acttagagtt	9300
taaactgaaa gtgctcaaga ggttttattt aggctgggat ataaataagc ctttctgtag	9360
cttgtaatgg tatcaggaat ttaaaaggcc atctggggca caaagattaa gcagaaaagg	9420
tagaagggtga gattggggga ctttgagtac ttcacacact ttaatgtgtg agtgctttag	9480
tgcatatagt acaactgccca gataagggca tccacatctg attgtttgga aggcaccttg	9540
tggtttctgg gaattcagaa ttgggagaaa aatgctccca accgctgaag cccttggtaa	9600
tctgcagggt gtttatttag caggagataa ggacaaaaag ttatagtgtg gagttgggtg	9660
agttggtaga tgtcattaca acagggtgtc ttaaattggg ttaggagtca ctttgaaata	9720
cctgggcat aagcaaagtg gcattttcac ctttcaggag aaactggtag acttatccat	9780
tctatagtgc atgcttgttc aattgggctg atgactaaac cggtgactaa aggtttgtca	9840
gtataaatgg atgggttcta ggcagacggg gaggaattac tatacctgca aggagtcatt	9900
gcctgatctg cctggaaagg ggcaggattg agtctcagaa ggtgtacacc ataggatatg	9960
gaaaaatttg tcacgcctag cattcaactt agtgggttag cgccacctac tggcacttta	10020
aaagcttagc atagaggagc atgtgtgtta ggagctcgga tgggattccag ggcctcaagg	10080
tttgcatgta aataaaagcc ctttaccaaa ttaactacat accagcatac atcagtcctt	10140
tagtgttgaa aaacagaagt gaaagctaata atatatagt cttgctttat ttaagtctag	10200
ctgattacgt gtttggttgc cagtgtgact agtctggagt tgaatttgc ctcagacacg	10260
taaaatggaa tttgggattc acaacactct agtatgaggg acctaattgc ctgtaccagg	10320
cacaaacgtg tctataaact acacaaaacg aaggaattta caggaattag gaaggatttc	10380
ttaacattaa aacattatgg gcattttaaa aaaagctttg acaggatttc tttgtcatgg	10440
ctgtcctgga gctagtgtg tagaccaggc tgggctgaaa tcttgtctgc ctgcctggct	10500
tggacacttt tttattatgt atacaacatt ctgcttccat gtatatctgc acattagaag	10560
acggcaccag atctcctaata ggtggttgt gagccaccat gtggttgctg ggaattgaac	10620
tcaggacctc tggaagagca gtgctcttaa cctctgagcc atctccagcc ccagcttggg	10680
cacattttta atggctggga aatcaaacc cctaggcctt ctgtcagtaa tgaagggtt	10740
ttggctaccg agagtaggat ttaaggttat tcggagctgc aggtctgcct cagtgcagg	10800
ttgggagtcc agcatcttag aaaatgcagt gaagccaagc tgagctatat tttgtttaaa	10860
aaaaaaataa gtgggtaaag tgctgctgag cctgatgacc aagctgggac acaagtagaa	10920
gaacataggc caatgctcta tattaagaac atgggtcatt tttaatgctc ttgagaaggc	10980
tatgcctaca ctactctcag ccaccgcagc gtgtttaaat taaactagtt tggaaatttt	11040
ctttgggggt aagctattta acctagtgcc ttggcaggta tactactgaa ctctcctct	11100
cattcctttt tgttttttaa gaatttcagt caggctcagg cagcccttaa acttgtgatt	11160
aagcctgaga acagttacga ttatgagcct attagtatac cgatcaatat gtgaattttt	11220
ttgggatggg ggtcaggcct ccctgcctcc caaatactgg гactaaaggc tgcaccacca	11280

caacctggct cttgaaatac ttttctacat tttttggggg gcatgggtgg gagagcaggg	11340
tttctctgta ttagccctgg ctctcctgga actctgtaga ccaggctatt cttgagctca	11400
gattagcctg tctctgcctc ctaaattctg ggattaaagg tgtgtgctac tgctgcctgg	11460
ctacaaagac attttttttt ttcttaaatt taaaaacaaa agtgggtctt ttagaagggt	11520
ggttggtgtt ggcacatact ccaagcactc aggttttgag ttgtgccag gaatgaagac	11580
tgattactg ccgcccctcc ctggaaggg ctacacagag aaatcctatt tggagcctgt	11640
cctggtaact cgctctgtag accaggctgg cctcgaactc aagagaacca cctgcctctg	11700
aatgctggtt ttaagggcag gcaccaccaa caccagcct aaaaaatgtc ttttttttaa	11760
agattttttt tttttttttt acagaataaa cattctgttt acaatattct gcttctatgt	11820
atatctgcac actagaagag ggcacccgat ctcataatgg atggttgtag gccaccaagt	11880
ggttgctggg aattgaactc agaacctctg gaagagcagt cagtgtcttt aacctctgag	11940
ccatctctcc agcccctaaa aatggctctt gagatagggt ctcaagtagt ttgagactga	12000
gttggtata taaacaaggc tggcacatag caccatgtac agctgggttt agtttacatg	12060
gggtgttttt gtctctggag gcaggaggat catttgagca tagggagtta atagttaggt	12120
catgttttat ctactcttct gaattgagaa ctaagctgat gcaaagcaag ttgactgaa	12180
gaagtccagt ttatgagaac aagggtggaa actaatgtgt caaagatggc cttgcatgtg	12240
ttttagatga tgaccagtc acttggaat tactggatgt gtaagaccta tatcttgaca	12300
ggagtgaaca gtgtcttata ggtcctatat gaaagaaatg agacataccc atttgtttc	12360
ccctaagaat tcacttttcc taacctggtt catgctattt aggttatattt acttgcaaat	12420
cctagggtgc tcccttacc agtattgctt atgtggcacc aaagtcactc actcccatga	12480
tttgcaagtc tctgggaact tccatgacaa cctagaatag caactcaaat acattttctc	12540
agtaccaatt ttgaagaaaa aatattttgc aaaatagctg tatggatggg tactaaatag	12600
tgaggttatc tccagaaggc ctatgaagaa ttaagggtga gttcagttga gttcagcagc	12660
aagtttaagg ttcattccatt tttgtacagt gttttcctat tacggtaagt gttttgcctg	12720
caggaatatc tgtaccacat gcttgctgg tacctatatt ggccagaaga gggctttgga	12780
tcctctggac ttgaattaca gatgggtatt agccaccatt taggtgctgg gaattgaaac	12840
caagtcctct ggaagaacag caagtgactc gacgtccgga gctcaggcgc gcctgtggaa	12900
tgtgtgtcag ttaggggtgtg gaaagtcccc aggtccccca gcaggcagaa gtatgcaaag	12960
catgcatctc aattagtcag caaccagggtg tggaaagtcc ccaggctccc cagcaggcag	13020
aagtatgcaa agcatgcatc tcaattagtc agcaaccata gtcccgcgcc taactccgcc	13080
catcccgccc ctaactccgc ccagttccgc ccattctccg ccccatggct gactaatttt	13140
ttttatttat gcagaggccg aggccgcctc tgcctctgag ctattccaga agtagtgagg	13200
aggctttttt ggaggcctag gcttttgcaa aaagctcccc ggagcttgta tatccatttt	13260
cggatctgat cagcacgtga tgaaaaagcc tgaactcacc gcgacgtctg tcgagaagtt	13320

tctgatcgaa aagttcgaca gcgtctccga cctgatgcag ctctcggagg gcgaagaatc 13380
 tcgtgctttc agcttcgatg taggagggcg tggatatgtc ctgcgggtaa atagctgcgc 13440
 cgatggtttc tacaagatc gttatgttta tcggcacttt gcatcggccg cgctcccgat 13500
 tccggaagtg cttgacattg gggaattcag cgagagcctg acctattgca tctcccgccg 13560
 tgcacagggt gtcacgttgc aagacctgcc tgaaccgaa ctgcccgtg ttctgcagcc 13620
 ggtcgcggag gccatggatg cgatcgctgc ggccgatctt agccagacga gcgggttcgg 13680
 ccatttcgga ccgcaaggaa tcggtcaata cactacatgg cgtgatttca tatgcgcgat 13740
 tgctgatccc catgtgtatc actggcaaac tgtgatggac gacaccgtca gtgcgtccgt 13800
 cgcgaggct ctcgatgagc tgatgctttg ggccgaggac tgcccgaag tccggcacct 13860
 cgtgcacgag gatttcggct ccaacaatgt cctgacggac aatggccgca taacagcggt 13920
 cattgactgg agcgaggcga tggtcgggga ttcccaatac gaggtcgcca acatcttctt 13980
 ctggaggccg tggttgctt gtatggagca gcagacgcgc tacttcgagc ggaggcatcc 14040
 ggagcttgca ggatcgccgc ggctccgggc gtatatgtc cgcatgggtc ttgaccaact 14100
 ctatcagagc ttggttgacg gcaatttcga tgatgcagct tgggcgcagg gtcgatgcga 14160
 cgcaatcgtc cgatccggag ccgggactgt cggggtgaca caaatcgccc gcagaagcgc 14220
 ggccgtctgg accgatggct gtgtagaagt actcgccgat agtggaaacc gacgcccag 14280
 cactcgctcg agggcaagg aatagcacgt gctacgagat ttcgattcca ccgccgcctt 14340
 ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt ccgggacgcc ggctggatga tcctccagcg 14400
 cggggatctc atgctggagt tcttcgccc cccaacttg ttatttcag cttataatgg 14460
 ttacaataa agcaatagca tcacaaattt cacaaataa gcatTTTTT cactgcattc 14520
 tagttgtggt ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat gtctgtata 14569

<210> 20
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 20
 acaaacagtt ctgagaccg 19

<210> 21
 <211> 12318
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> expression plasmid

<400> 21
 ccgtcgacct ctaggcgcg catggctctt ccgttcctc gctcactgac tcgctgcgct 60
 cggtcgttcg gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaa ggcggtataa cggttatcca 120

cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga	180
accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct ccgccccct gacgagcatc	240
acaaaaatcg acgctcaagt cagagggtggc gaaacccgac aggactataa agataaccagg	300
cgtttcccc tggaagctcc ctcgtgcgct ctcctgttcc gaccctgccg cttaccggat	360
acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca cgctgtaggt	420
atctcagttc ggtgtaggtc gttcgtcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgttc	480
agcccagccg ctgcgctta tccggttaact atcgtcttga gtccaacccg gtaagacacg	540
acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg	600
gtgctacaga gttcttgaag tgggtgccta actacggcta cactagaaga acagtatttg	660
gtatctgcgc tctgtgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg	720
gcaacaaac caccgctggt agcggttttt ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa	780
aaaaggatc tcaagaagat ctttgatct tttctacggg gtctgacgct cagtggaacg	840
aaaactcacg ttaagggatt ttggtcatga gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc	900
ttttaatta aaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat atatgagtaa acttggtctg	960
acagttacca atgcttaatc agtgaggcac ctatctcagc gatctgtcta tttcgttcat	1020
ccatagtgtc ctgactcccc gtcgtgtaga taactacgat acgggagggc ttaccatctg	1080
gccccagtc tgcaatgata ccgcgagacc cagctcacc ggctccagat ttatcagcaa	1140
taaaccagcc agccggaagg gccgagcgca gaagtggctc tgcaacttta tccgcctcca	1200
tccagtctat taattgttgc cgggaagcta gagtaagtag ttcgccagtt aatagtttgc	1260
gcaacgttgt tgccattgct acaggcatcg tgggtgcacg ctcgtcgttt ggtatggctt	1320
cattcagctc cggttcccaa cgatcaaggc gagttacatg atccccatg ttgtgcaaaa	1380
aagcggttag ctccttcggt cctccgatcg ttgtcagaag taagttggcc gcagtgttat	1440
cactcatggt tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt catgccatcc gtaagatgct	1500
tttctgtgac tggtagtac tcaaccaagt cattctgaga atagtgtatg cggcgaccga	1560
gttgctcttg ccggtgctca atacgggata atacgcgcc acatagcaga actttaaaag	1620
tgctcatcat tgaaaaacgt tcttcggggc gaaaactctc aaggatctta ccgctgttga	1680
gatccagttc gatgtaaccc actcgtgcac ccaactgatc ttcagcatct tttactttca	1740
ccagcgtttc tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaaatgc cgcaaaaaag ggaataaggg	1800
cgacacggaa atgttgaata ctcatactct tcctttttca atattattga agcatttatc	1860
agggttattg tctcatgagc ggatacatat ttgaatgtat ttagaaaaat aaacaaatag	1920
gggttccgcg cacattttcc cgaaaagtgc cacctgcac tcacacggg cagcatggc	1980
tgcgcccgcg cagcgcccc cgaccccc ccatcccc gaacgccagc cgccatccac	2040
cgcccgagc ccccgagcc cgcggacccc gacccccgc cgtcgcgcc cggttgcgcc	2100
gctctctgcg ggggggctag ggggcccgg ggggaaggcc acgccccctc cactttttcc	2160

aggaatgcgc ggcattgaccc gccccccca tgacccgccac acaccccccc gatgcccccc 2220
 ggggggtcttt cctgggggggc cttgttcagg gttgcctgtg tcacccacgg gcccttggc 2280
 cacgcttgcc tgggtcaccc cggagccccg ggtcacgttt gccggggtca gccctggggc 2340
 gcttcttcac gctccattgc catgcagaat tccacgttgt gcatagaaac agatgcaggc 2400
 aaaacatcca cacatataaa acaaaaaatt aaaaccaata aaactcctaa acttttggtc 2460
 tttcttgaat cttcaatccc tcagggttatg aaataatcat ttatgcagtc aaaaatttgc 2520
 cattcttggt gccagggtgtg gtgatgattc ggggaagcag aagcaggcag atctctgtga 2580
 atgaggccag cctggtctac aaagtgcagc ccaggacagt caggcctgtt acacagagaa 2640
 acctgaaaa aaaaaagata atatgtactg ttgtattacc ccaatatata aggctaaacc 2700
 attagaagca caacactggt aagtacggaa aataatatct agtgtggtac agttactact 2760
 actataatac actaatatag ctgtgggaaa ctagtccaa agatgaatta ctaaccagtg 2820
 tttccaagga aataaatgaa agcagagaga ttagttctat tgctagtgtt tcattttcgt 2880
 atatttctta caatttctct tgttacaat aggcactagg gtatcaagat aattttaacg 2940
 actggctgag aaccctagaa aatctctgtg aaaaaggat ttgtgaaatg agagagggtg 3000
 atgtggccat tatagaaaag gcttttgtgt gccttgcatg catagaccct gtgtttgatc 3060
 tcttaacacc ctcttgacc agaaaaagct tctgtggata gaaaatgatt agttatatat 3120
 acttttaggg aaacgtagtt ctggattctt tggttacaat taacagaatt aagtgaac 3180
 aaagccagaa acctcctgat aaatgagaaa acctgctgtg agaaggttgt aaggctctgt 3240
 aatataggaa ttaggagaaa agaaacctgt gtggtggggc acgtctgtaa tcccagcatt 3300
 ggggaagtaga ggtagaagat tagaaatcaa aggccagcct cagcaacaca gtgagtttga 3360
 ggccaccctg aactacatca ggttctgtct ctttctttt tttttttttt ctttctttt 3420
 tttggtttct ctgtgtagtt ttggagccta tcctggcact agctctgaag agcaggctgg 3480
 cctcgaactc agagatcagc cagcctctgc tgggattaaa ggtatgcacc accaacgccc 3540
 caggttttgt ctcaaaaaa caaaaaatac atcaggaggt ggtgagaggg ctcagtggtc 3600
 acaggcattc tctgcaaagc ctgactctga gttggatcct ttagagctac atggttgagg 3660
 gaagagaact gactcctgga aggtgtctc tgggtccccc acatagctat acacagcatg 3720
 tgcattcaca cactaaat aatgctattt ttaaaaaaat taaaaacaac aacagtttgg 3780
 gttgtgaaaa ctagaactag ataataagta agaatacagt atcatgtaaa tttgctttca 3840
 actcatccca aaatttggtt tatatttcag ttttttctt tcctagcttg actgtggagt 3900
 cttgtccgga agcaaatagt tcctttgagc atcccacatg tggacaccgg acagtaggtc 3960
 ctcaaatgct cttattagg ttggttcaat aatatcaatt gtttgttact aggcagtgat 4020
 gttgtacatc tggaggagat ctcttgagcc cataatcagg ttattaggaa taaatactct 4080
 aaggctaaaa atgtagctta gtgataagag tgcttgctg gtgtgctgag accctcggtt 4140
 ccatctccac aaccctatat tccattaca aatacctttt caccgtccct agcattaaga 4200

aacaaaacaa caaagaagtt tttctttctt ctgagatcct gcccggagag gcatttaaaa	4260
ctggccaggg ccaaaaaaaa aaaaaaaaaa agaaaaaaa gaaaagaaaa caggctaggg	4320
ccggcatggt ggcgcacgcc tttaatccca gcacgcagga ggcagaggca gggcggatct	4380
ctgtgagttt gaggtcagcc tggctctacct agtgagtttc agggcaccca gggctaaaga	4440
gactgtctca aaaacaaaac agccacacaa tcagaaccac agcaaaacgc agttatgatc	4500
cttggaactg taggaatgac aagcatttaa ataataggac gagccatttt tgagaagctc	4560
tgatttcaca agtgtcaggg atgggctctg ggcgagtaag attgctaattg ctggcctcta	4620
aatgagacca cgtggagttg attagattct tttcatgttc ctcgtgctct atcaataaac	4680
tgtacccaaa tacacacaca cacacacaca cacaatgcgc gcacacacaa aatccttttt	4740
tagcttaaga agcccagaat cagaagtaaa gctaactgtg ggacttaagt attattctga	4800
acggaactcc cagggcgtga agcgcgcttc aggccttcag agaagcagct ggcgctggat	4860
ggaatgaacc aagaggccag cacaggggca gatccgtcga gctctcggcc accgagctga	4920
gcccttaggt tctggggctg ggaagggctc ctaggattgt gcacctctcc cgcgggggac	4980
aagcaggggg atggcggggc tgacgtcggg aggtggcctc cacgggaagg gacaccgga	5040
tctcgacaca gccttgccag tggagtcagg aagggtaggg acagattctg gacgccctct	5100
tggccagctc ctcaccgccc cacccccagc tggagccgag agtaattcat acaaaaggag	5160
ggatcgcctt cgcctctggg aatcccaggg accgtcgcta aattctggcc ggcctcccag	5220
cccgaaccg ctgtgcccgc ccagcgcggc gggaggagcc tgcgcctagg gcgcatcgcg	5280
ggtcggcggg agagcacaag cccacagtcc ccggcgggtg gggaggggcg cgtgagcgg	5340
gggcccggga gccagcgcgg ggcaaaactg gaaagtgggt tcgtgtgctg gctccgccct	5400
cttcccaggg gtgggggaga acggtataaa agtgcggtag tcgcttgga cgttcttttt	5460
cgcaacgggt ttgccgtcag aacgcagggt agtggcgggt gtggcctccg cgggcccggg	5520
ctccctcctt tgagcggggt cggaccgccc tgcgggtgtc gtcggccggg cttctctgcg	5580
agcgttcccg ccctggatgg cgggctgtgc gggaggcgga gggggggagg cctggcggcg	5640
gccccggagc ctcgcctcgt gtcgggctg aggcctagcg tggcttccgc cccgccgct	5700
gccaccgagg ccgctctttg ctgtctgccc ggctgccctc gattgcctgc ccgcgcccg	5760
ggccaacaaa gggagggcgt ggagctggct ggtagggagc cccgtagtcc gcatgtcggg	5820
cagggagagc ggcagcagtc ggggggggga ccgggcccgc ccgtcccga gcacatgtcc	5880
gacgccgctt ggacgggtag cggcctgtgt cctgataagg cggccgggcg gtgggtttta	5940
gatgccgggt tcaggtgccc ccgggtcccc gcccggtctg gccagtacc cgtagtggct	6000
tagctccgag gagggcgagg cccgcccggc cggcaccagt tgcgtgcgcg gaaagatggc	6060
cgtcccgagg ccctgtagca aggagctcaa aatggaggac gcggcagccc ggcggagcgg	6120
ggcgggtgag tcaccacac aaaggaagag ggccttgccc ctcgcccggc gctgcttcct	6180
gtgaccccgt ggtgtaccgg ccgcacttca gtcaccccgg gcgtcttttc ggagcaccgc	6240

tgccctccgc tgggggaggg gatctgtcta atggcggttg agtttgctca catttggtgg	6300
gtggagactg tagccaggcc agcctggcca tgaaagtaat tcttgggaatt tgcccatttt	6360
gagtttgag cgaagctgat tgacaaagct gcttagccgt tcaaaggat tcttcgaact	6420
tttttttaaa ggtgttgta aaacctcgag gccgccacca tgggcaccac ctggaggagc	6480
ccgggacgca ggcgcctggc actctgcctc gctggccttag cgctctcgct gtacgcgctg	6540
cacgtgaagg cggcgcgcg cccgagacgag gattaccgag ctctctgcga cgtgggcacg	6600
gccatcagct gtacacgct cttctcctct cgggtgggca agggctttgg gctggtggaa	6660
catgtgctag gatctgacag cgtcctcaac caatccaaca gcatatttgg gtgcatcttc	6720
tacaccatac agctgttgtt aggttgcttg aggggacgct gggcctctct cctactggta	6780
ctgagttccc tgggtgcctt cgccggttct gtctacctgg cctggatcct gttcttttg	6840
ctctatgact tctgcattgt ctgcattacc acctatgccca tcaatgtggg cttgatgttg	6900
cttaatttcc agggaggtgcc agaacacaag gccaaaaggc cctgagctag catattacc	6960
ctaaccctg ccacccagct cttaatcagt ggtggaagaa cggctcaga actgtttgtc	7020
tcaattggcc atttaagttt aatagtgaag gactgggtta tgataacaat gcatcgaaa	7080
accttcagga ggaaggaga atgttttggt gaacattttt gtgtgtgtgg cagttttaag	7140
ttattagttt tcaaaatcag tactttttaa tggaaacaac ttgacaaaa atctgtcaca	7200
gaattttgag acccattaaa atacaagttt aatgagaagt ctgtctctgt taatgctgaa	7260
gtcattacta agtgcttagc ttagcaaggt atgtggatgc ccatttgtgt tccaaggat	7320
tggactgttc atcaggacct agagctgagt ttcaagggt caagagatgg cttattacct	7380
gtgggtgtct tgaaggttct ggttgggaca aattaggaat gtttttggca gacatggtga	7440
ctacctcat ctgggtgagt tcagttgatt tgtcttgagc ctttggggtt tacacaagta	7500
aatgacatca tacagttagt gtattgttag tgaatattaa tatatgaggc aggccttgct	7560
ctagcaattt tagaactagt tttcaggaaa ggttcacat tgtgcattgg atgtttgatt	7620
ctatcactta gagtttaaac tgaaagtgt caagaggttt tatttaggct gggatataaa	7680
taagccttct ttagcttgt aatggtatca ggaatttaaa agccatctg gggcacaag	7740
attaagcaga aaaggtagaa ggtgagattg ggggactttg agtacttcac aactttaat	7800
gtgtgagtgc tttagtgc atagtacaac tgccagataa gggcatccac atctgattgt	7860
ttggaaggca ccttgtggtt tctgggaatt cagaattggg agaaaaatgc tccaaccgc	7920
tgaagccctt ggtaatctgc aggtgtttta tttagcagga gataaggaca aaaagttata	7980
gtgtggagtt ggttgagttg gtagatgtca ttacaacagg tggctctaaa ttgggttagg	8040
agtcactttg aaatacctgg gccataagca aagtggcatt ttcaccttcc aggagaaact	8100
ggtacactta tccattctat agtgcattgt gtgtcaattg ggctgatgac taaaccggtg	8160
actaaagggt tgtcagtata aatggatggg ttgtaggcag acggtgagga attactatac	8220
ctgcaaggag tcattgcctg atctgcctgg aaaggggag gattgagtct cagaagggtg	8280

acaccatagg atatgaaaa atttgtcacg cctagcattc aacttagtgg tgtagcgcca	8340
cctactggca ctttaaaagc ttagcataga ggagcatgtg tgtaggagc tcggatggga	8400
tccagggcct caaggtttgc atgtaaataa aagcccttta ccaaattaac tacataccag	8460
catacatcag tccttttagtg ttgaaaaaca gaagtgaag ctaatatata tagtgcttgc	8520
tttatttaag tctagctgat tacgtgtttg gttgccagtg tgactagtct ggagttgaat	8580
ttgtcctcag acacgtaaaa tggaatttgg gattcacaa accttagtat gagggaccta	8640
atggcctgta ccaggcaca acgtgtctat aaactacaca aaacgaagga atttacagga	8700
attaggaagg tattcttaac attaaaacat tatgggcatt ttaaaaaag ctttgacagg	8760
atttctttgt catggctgtc ctggagctag ttgtgtagac caggctgggc tgaaatcttg	8820
tctgcctgcc tggtttggac acttttttat tatgtatata acattctgct tccatgtata	8880
tctgcacatt agaagacggc accagatctc ctaatggatg gttgtgagcc accatgtggt	8940
tgctgggaat tgaactcagg acctctggaa gagcagtgtc cttaacctct gagccatctc	9000
cagccccagc ttgggcacat ttttaatggc tgggaaatca aacccctag gccttctgtc	9060
agtaatgaag ggcttttggc taccgagagt aggatttaag gttattcgga gctgcaggtc	9120
tgctcagtg cagggttggg agtccagcat ctagaaaat gcagtgaagc caagctgagc	9180
tatattttgt ttaaaaaaa aataagtggg taaagtgtg ctgagcctga tgaccaagct	9240
gggacacaag tagaagaaca taggccaatg ctctatatta aaagcatggg tcatttttaa	9300
tgctcttgag aaggctatgc ctacactact ctccagccacc gcagcgtgtt taaattaaac	9360
tagtttgaa attttctttg ggggtaagct atttaaccta gtgccttggc aggtatacta	9420
ctgaactctc ctctcattc cttttgttt ttttaagaatt tcagtcaggc tcaggcagcc	9480
cttaaaactg tgattaagcc tgagaacagt tacgattatg agcctattag tataccgatc	9540
aatatgtgaa tttttttggg atgggggtca ggcctccctg cctcccaat actgggacta	9600
aaggctgcac caccacaacc tggctcttga aatacttttc tacatttttt ggggggcatg	9660
ggtgggagag cagggtttct ctgtattagc cctggctctc ctggaactct gtagaccagg	9720
ctattcttga gctcagatta gcctgtctct gcctcctaaa ttctgggatt aaagggtgtg	9780
gctactgctg cctggctaca aagacatttt ttttttctt aaatttaaaa acaaaagtgg	9840
ttcttttaga aggggtgtg gtgttggcac atactccaag cactcaggtt ttgagtttgt	9900
cccaggaatg aagactgcat tactgccgcc cctccctggg aagggtaca cagagaaatc	9960
ctatttgag cctgtcctgg taactcgtc ttagaccag gctggcctcg aactcaagag	10020
aaccacctgc ctctgaatgc tggatttaag ggcaggcacc accaacacc agcctaaaa	10080
atgtcttttt tttaaagatt ttttttttt tttttacaga ataaacattc tgtttacaat	10140
attctgcttc tatgtatata tgcacactag aagagggcac ccgatctcat aatggatggt	10200
tgtgagccac caagtgggtg ctgggaattg aactcagaac ctctggaaga gcagtcagt	10260
ctcttaacct ctgagccatc tctccagccc ctaaaaatgg ctcttgagat agggctctca	10320

gtagtttgag actgagttgg ctatataaac aaggctggca catagcacca tgtacagctg	10380
ggttttagttt acatgggggtg tttttgtctc tggaggcagg aggatcattt gagcataggg	10440
agttaatagt gaggtcatgt tttatctact cttctgaatt gagaactaag ctgatgcaaa	10500
gcaagtttga ctgaagaagt ccagtttatg agaacaaggg tggaaactaa tgtgtcaaag	10560
atggccttgc atgtgtttta gatgatgacc cagtcacttg ggaattactg gatgtgtaag	10620
acctatatct tgacaggagt gaacagtgtc ttataggtcc tatatgaaag aaatgagaca	10680
taccattttt gtttccccta agaattcact tttcctaacc tggttcatgc tatttaggtt	10740
attttacttg caaatcctag ggtgctccct taccagtat tgcttatgtg gcaccaaagt	10800
cactcactcc catgatttgc aagtctctgg gaacttccat gacaacctag aatagcaact	10860
caaatacatt ttctcagtac caattttgaa gaaaaaatat ttgcaaaat agctgtatgg	10920
atgggtacta aatagtgagg ttatctccag aaggcctatg aagaattaag gttgagttca	10980
gttgagttca gcagcaagtt taaggttcat ccatttttgt acagtgtttt cctattacgg	11040
taagtgtttt gcctgcagga atatctgtac cacatgcttg cctggtacct atatcgcca	11100
gaagagggtt ttggatcctc tggacttgaa ttacagatgg gtattagcca ccatttaggt	11160
gctgggaatt gaaaccaagt cctctggaag aacagcaagt gactcgacgt ccggagctca	11220
ggcgcgcctg tggaatgtgt gtcagttagg gtgtggaaag tccccaggct cccagcagg	11280
cagaagtatg caaagcatgc atctcaatta gtcagcaacc aggtgtggaa agtccccagg	11340
ctccccagca ggcagaagta tgcaaagcat gcatctcaat tagtcagcaa ccatagtccc	11400
gcccctaact ccgccatcc cgcccctaac tccgccagt tccgccatt ctccgcccc	11460
tggtgacta atttttttta tttatgcaga ggccgaggcc gcctctgcct ctgagctatt	11520
ccagaagtag tgaggagggt tttttggagg ctaggcttt tgcaaaaagc tcccgggagc	11580
ttgtatatcc attttcggat ctgatcagca cgtgttgaca attaatcatc ggcatagtat	11640
atcggcatag tataatacga caaggtagg aactaaacca tggccaagtt gaccagtgcc	11700
gttccggtgc tcaccgcgcg cgacgtcgcc ggagcggctg agttctggac cgaccggctc	11760
gggttctccc gggacttcgt ggaggacgac ttcgccggtg tggtcggga cgacgtgacc	11820
ctgttcacga gcgcggtcca ggaccagggt gtgccggaca acaccctggc ctgggtgtgg	11880
gtgcgcggcc tggacgagct gtacgccgag tggtcggagg tcgtgtccac gaacttccgg	11940
gacgcctccg ggccggccat gaccgagatc ggcgagcagc cgtgggggcg ggagtccgcc	12000
ctgcgcgacc cggccggcaa ctgcgtgcac ttcgtggccg aggagcagga ctgacacgtg	12060
ctacgagatt tcgattccac cgccgccttc tatgaaaggt tgggcttcgg aatcgttttc	12120
cgggacgccg gctggatgat cctccagcgc ggggatctca tgctggagtt cttcgccac	12180
cccaacttgt ttattgcagc ttataatggt tacaataaaa gcaatagcat cacaatttc	12240
acaaataaag catttttttc actgcattct agttgtgggt tgtccaaact catcaatgta	12300
tcttatcatg tctgtata	12318

<210> 22
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> primer

 <400> 22
 ttagatgtaa catgtaacat taagaatggc ag 32

 <210> 23
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> primer

 <400> 23
 cattaaatga ttgggtgctt tgag 24

 <210> 24
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> primer

 <400> 24
 gccacaagat ctgccaccat g 21

 <210> 25
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> primer

 <400> 25
 gtaggtctcc gttcttgcca atc 23

 <210> 26
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> primer

 <400> 26
 ttcggctcca acaatgtc 18

 <210> 27
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> primer

<400> 27 gtctgctgct ccatacaag	19
<210> 28 <211> 19 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> primer	
<400> 28 agttgaccag tgccgttcc	19
<210> 29 <211> 18 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> primer	
<400> 29 ggcgaagtcg tcctccac	18
<210> 30 <211> 22 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> primer	
<400> 30 gggcttgatg ttgcttaatt tc	22
<210> 31 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> primer	
<400> 31 gcagggtgta ggggtaatat g	21
<210> 32 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> primer	
<400> 32 agcgggacct gaatgtgaag	20
<210> 33 <211> 20 <212> DNA	

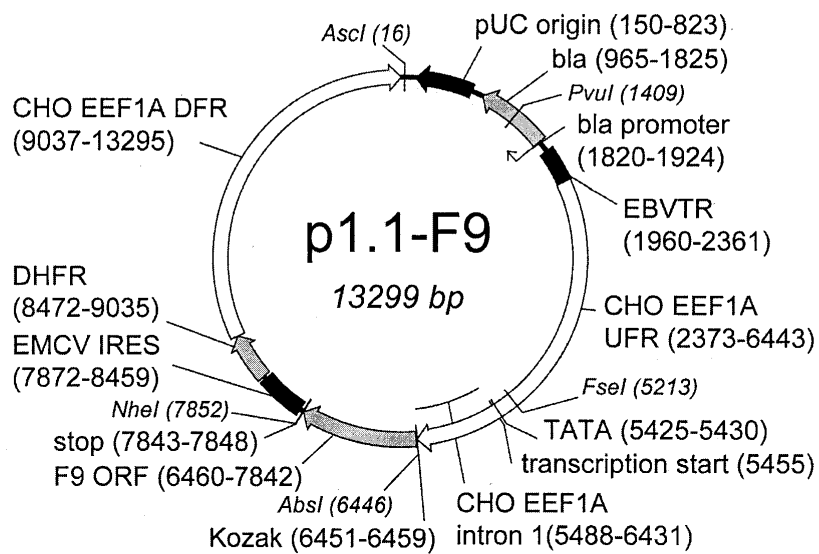
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer	
<400> 33	
ggtggttctt ctcgatgcca	20
<210> 34	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer	
<400> 34	
gcaggcaaag acaccaatg	19
<210> 35	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer	
<400> 35	
ctccaccttc ctcactacat c	21
<210> 36	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer	
<400> 36	
gctcttttcc agccttcctt	20
<210> 37	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer	
<400> 37	
gagccagagc agtgatctcc	20
<210> 38	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer	
<400> 38	
aacgggtttg ccgtcagaac	20

<210> 39
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

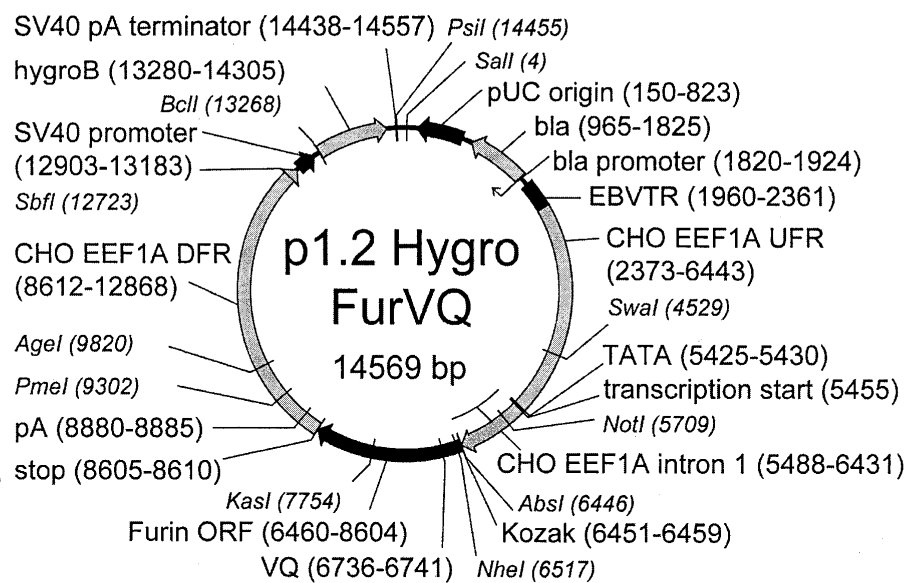
<220>
<223> primer

<400> 39
cggtaatcct cgtctcgg

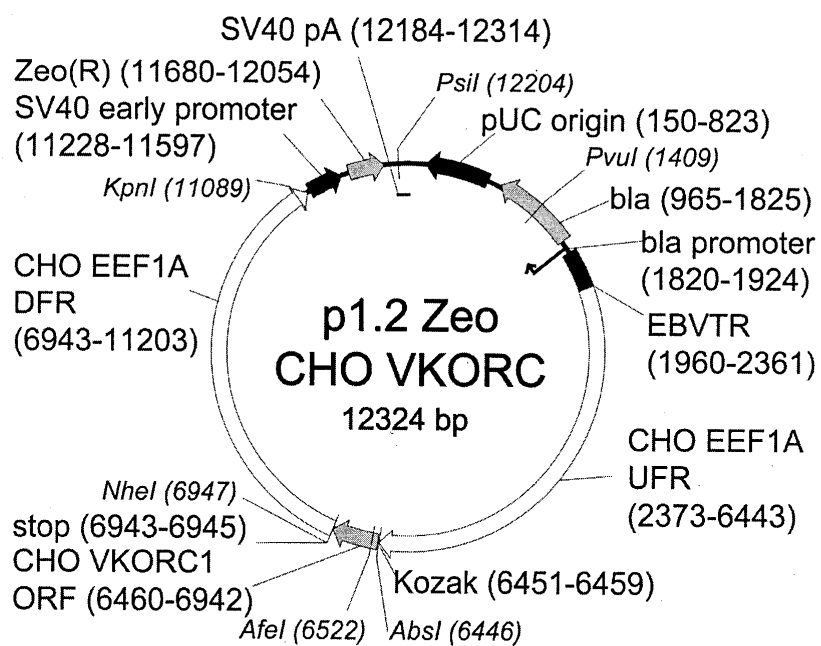
18



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3