(19) **RU** (11) **2 140 986** (13) **C1**

(51) МПК[6] **C 12 N 15/30, C 07 K 9/00, A 61 K 39/00**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 94046017/13, 07.05.1993

(24) Дата начала действия патента: 07.05.1993

(30) Приоритет: 08.05.1992 GB 9209993.6

(46) Дата публикации: 10.11.1999

(56) Ссылки: WO 90/11086 A, 04.10.90. EP 0463053 A1, 02.01.92. WO 88/00835 A, 09.01.88.

(85) Дата перевода заявки PCT на национальную фазу: 04.11.94

(86) Заявка PCT:
GB 93/00943 (07.05.93)

(87) Публикация PCT:
WO 93/23542 (25.11.93)

(98) Адрес для переписки:
103735, Москва, ул.Ильинка, 5/2, Союзпатент, патентному поверенному Лебедевой Н.Г.

(71) Заявитель:
Биотекнолоджи энд Биолоджикал Сайенсиз Рисерч Каунсил (GB)

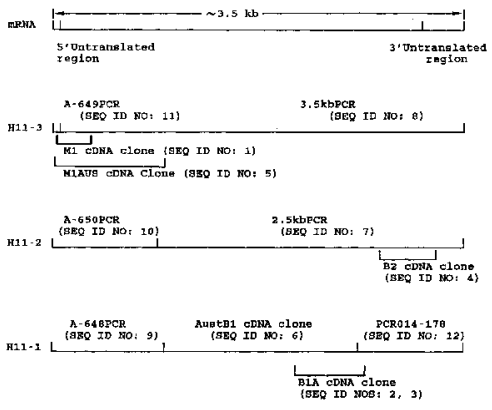
(72) Изобретатель: Маргарет Грэхэм (GB), Тревор Стэнли Смит (GB), Эдвард Альберт Манн (GB), Дэвид Патрик Кнокс (GB), Джоанна Джейн Оливер (GB), Сьюзан Элизабет Ньютон (AU)

(73) Патентообладатель:
Биотекнолоджи энд Биолоджикал Сайенсиз Рисерч Каунсил (GB)

(54) МОЛЕКУЛА НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ (ВАРИАНТЫ), ВЕКТОР ЭКСПРЕССИИ ИЛИ КЛОНИРОВАНИЯ, СИНТЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИПЕПТИД, СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПОЛИПЕПТИДА, КОМПОЗИЦИЯ ВАКЦИНЫ ДЛЯ СТИМУЛИРОВАНИЯ ИММУННОЙ РЕАКЦИИ ПРОТИВ ГЕЛЬМИНТНЫХ ПАРАЗИТОВ У ЧЕЛОВЕКА ИЛИ ЖИВОТНЫХ, СПОСОБ СТИМУЛЯЦИИ ИММУННОЙ РЕАКЦИИ ПРОТИВ ГЕЛЬМИНТНЫХ ПАРАЗИТОВ У ЧЕЛОВЕКА ИЛИ ЖИВОТНЫХ, ОЛИГОСАХАРИД

(57) Реферат:

Изобретение направлено на создание вакцины для стимулирования иммунной реакции против гельминтных паразитов у человека и животных. Вакцина содержит фармацевтически приемлемый носитель, а также носитель нуклеиновой молекулы, которая способна кодировать гельминтные энзимы аминопептидазы. Использование изобретения позволяет получить новые лекарства для борьбы с гельминтами человека и животных. 9 с. и 4 з.п. ф-лы, 21 ил., 4 табл.



Фиг.1

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

(19) **RU** (11) **2 140 986** (13) **C1**

(51) Int. Cl.[6] **C 12 N 15/30, C 07 K 9/00, A 61 K 39/00**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: 94046017/13, 07.05.1993

(24) Effective date for property rights: 07.05.1993

(30) Priority: 08.05.1992 GB 9209993.6

(46) Date of publication: 10.11.1999

(85) Commencement of national phase: 04.11.94

(86) PCT application:
GB 93/00943 (07.05.93)

(87) PCT publication:
WO 93/23542 (25.11.93)

(98) Mail address:
103735, Moskva, ul.Il'inka, 5/2,
Sojuzpatent, patentnomu poverennomu
Lebedevoj N.G.

(71) Applicant:
Bioteknolodzhi ehnd Biolodzhikal Sajensiz
Riserch Kaunsil (GB)

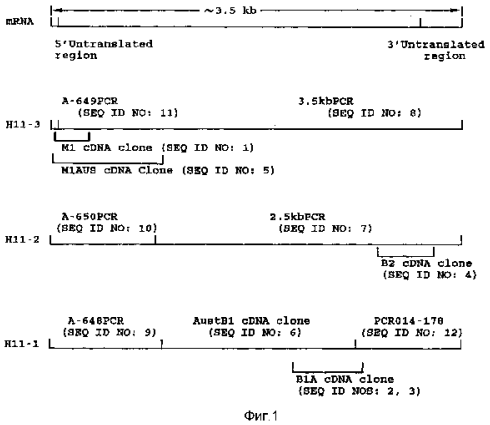
(72) Inventor: Margaret Grehkhehm (GB),
Trevor Stehnli Smit (GB), Ehdvard Al'bert Mann
(GB), Dehvid Patrik Knoks (GB), Dzhoanna
Dzhejn Oliver (GB), S'juzan Ehlizabet N'juton (AU)

(73) Proprietor:
Bioteknolodzhi ehnd Biolodzhikal Sajensiz
Riserch Kaunsil (GB)

(54) NUCLEIC ACID MOLECULE (VARIANTS), VECTOR OF EXPRESSION OR CLONING, SYNTHETIC POLYPEPTIDE, METHOD OF SYNTHESIS OF SYNTHETIC POLYPEPTIDE, VACCINE COMPOSITION FOR STIMULATION OF IMMUNE RESPONSE AGAINST HELMINTH PARASITES IN HUMAN OR ANIMALS, METHOD OF STIMULATION OF IMMUNE RESPONSE AGAINST HELMINTH PARASITES IN HUMAN OR ANIMALS, OLIGOSACCHARIDE

(57) Abstract:

FIELD: molecular biology, veterinary science, medicine. SUBSTANCE: invention relates to the development of vaccine used for stimulation of an immune response against helminth parasites in human and animals. Vaccine has a pharmaceutically acceptable carrier and a carrier of nucleic acid that encodes helminth aminopeptidases. Invention ensures to obtain new drugs for control of helminths in human and animals. EFFECT: improved method of synthesis, valuable biochemical properties. 13 cl, 36 dwg, 5 tbl, 1 ex



Фиг.1

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

Рекомбинантные молекулы ДНК, кодирующие энзимы - аминопептидазы, и их использование для получения вакцин против инфекций, вызываемых гельминтами.

Настоящее изобретение относится к получению защитных антигенов с помощью технологии рекомбинантных ДНК, для использования в качестве антигельминтных агентов и в качестве защитных иммуногенов для борьбы с заболеваниями, вызываемыми гельминтными паразитами.

Такие паразиты, как гельминты, ответственны за широкий круг заболеваний и заражений паразитами (инвазий) домашних животных, которые приводят к потере продуктивности и даже к гибели животных, что имеет существенное экономическое значение. Так, например, кровососущие нематоды Haemonchus инфицируют выстилку желудочно-кишечного тракта жвачных, что вызывает анемию и потери веса, а если не проводить лечения, это часто кончается гибелью животных. Аналогично, животные, инфицированные некровососущими нематодами Ostetagia не дают привеса и без лечения могут погибнуть. Другие рода гельминтов, представляющие экономическую важность, включают Trichostrongylus and Nematodirus, которые вызывают энтериты у различных животных, и трематоды.

Проблемы создают и такие нематоды, как анкилостомы (например, Necator, Ancylostoma, Uncinaria and Bunostomumbugu) и трематоды (например, Fasciola, Paramphistomum and Dicrocoelium) и их родственники, которые помимо жвачных и домашних животных инфицируют людей, и часто с фатальным исходом.

В настоящее время борьба с паразитами-гельминтами основывается, главным образом, на применении антигельминтных препаратов, наряду с обработкой пастбищ. Такие способы имеют ряд недостатков, частое введение лекарств и обработка пастбищ обычно непрактична и приводит к усиливающему распространению устойчивых штаммов гельминтов.

Поэтому существует необходимость в создании эффективных антигельминтных вакцин, и за последние годы в этой области были сконцентрированы усилия ученых. Однако до сих пор не существует коммерчески доступных молекулярных или субъединичных вакцин против основных видов гельминтов, особенно против желудочно-кишечных нематод жвачных, таких как Haemonchus и Ostertagia.

Наиболее обещающие на настоящее время результаты были получены с новыми протеинами, выделенными из Haemonchus, обладающими потенциалом в качестве защитных антигенов не только против Haemonchus, но и также против ряда других гельминтов. В частности, показано, что протеиновый дублет H110D, обнаруженный на люминальной поверхности кишечника H. contortus, обладает защитным иммунитетом против Haemonchus у овец.

H110D из H. contortus имеет приблизительный молекулярный вес 110 килодальтон (кд) в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях, что определено с помощью SDS-PAGE и описано в WO 88/00835 и WO 90/11086. Термин "H110D" в том смысле, как здесь использован, относится к протеиновому дублету H110D, как определено в WO 88/00835 и WO 90/11086. Как недавно было показано, соответствующие протеины находятся и в других видах гельминтов, например, Necator americanus.

В WO 88/00835 был описан ряд способов выделения H110D, что достаточно для характеристики протеина, и они могут быть масштабированы, чтобы обеспечить получение протеина в экспериментально и коммерчески подходящих количествах. Однако существует необходимость в улучшенных и более удобных источниках, из которых можно получать но только H110D, но также и родственные антигенные протеины, особенно для процессов, основанных на технологии рекомбинантных ДНК и экспрессии протеинов в соответствующим образом трансформированных прокариотических и эукариотических организмах.

Настоящее изобретение посвящено поискам такого усовершенствованного способа. Определение последовательности кДНК для H110D из Haemonchus contortus было осуществлено, и было обнаружено, что предсказанная аминокислотная последовательность демонстрирует гомологию с семейством интегральных мембранных аминопептидаз (систематическое название: α -аминоацил-пептид-гидролаза/микросомная).

У млекопитающих интегральные мембранные аминопептидазы расположены в нескольких тканях, например, на краях щетки микроворсинок кишечника и в почках. Их роль в почках неясна, но в кишечнике их функцией является расщепление мелких пептидов, которые представляют собой конечный продукт переваривания (см. Kenny и Maroux, 1982; Kenny и Turner, 1987; Noren et al, 1986; Semenza, 1986).

В одном аспекте настоящего изобретения, таким образом, предложены молекулы нуклеиновых кислот, содержащие одну или более из нуклеотидных последовательностей, которые кодируют гельминтные энзимы-аминопептидазы или их антигенные участки, практически соответствующие всей или части нуклеотидных последовательностей, представленных на фиг. 2, 3, 4 или 5 (последовательности ID N 1-15) или последовательностей, кодирующих гельминтные энзимы-аминопептидазы, которые практически гомологичны любой из указанных последовательностей, или гибридизуются с ними.

Таким образом, нуклеиновая кислота в соответствии с настоящим изобретением может быть однонитевой или двунитевой ДНК, кДНК или РНК.

Вариации нуклеотидных последовательностей, кодирующих аминопептидазы, могут наблюдаться между различными штаммами гельминтов внутри вида, между различными стадиями жизненного цикла гельминтов (например, между личинками и взрослыми особями), между аналогичными штаммами различного географического происхождения, а также внутри одного и того же гельминта. Такие вариации также включены в объем настоящего изобретения.

Термин "практически гомологичны" здесь

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

используют в смысле, который включает последовательности, в которых идентичность последовательностей составляет приблизительно 50% или более, например 60% или более, а также функционально-эквивалентные аллельные варианты и родственные последовательности, модифицированные замещением одного или нескольких оснований, их добавлением и/или делецией. Под "функционально эквивалентными" подразумевают последовательности нуклеиновых кислот, которые кодируют полипептиды, имеющие аминопептидазные активности, которые аналогично иммунореактивны, т.е. те, которые вызывают выработку защитных антител хозяина против гельминтов.

Молекулы нуклеиновых кислот, которые гибридизуются с последовательностями, представленными на фиг. 2, 3, 4 или 5 (последовательности ID N 1-15), или любые существенно гомологичные или функционально-эквивалентные последовательности, как указано ранее, также включены в объем изобретения. Термин "гибридизация" в том смысле, как здесь использован, определяет связывание последовательностей в нежестких условиях (6 x SSC/50% формамида при комнатной температуре) (SSC - раствор хлорида и цитрата натрия) и промывку в мягких условиях (2 x SSC, комнатная температура, более предпочтительно - 2 x SSC, 42°C), или в более жестких условиях, например 2 x SSC, 65°C), где SSC - 0,15 M NaCl, 0,015 M цитрата натрия, pH 7,2).

Способы получения таких производных родственных последовательностей, например, сайт-направленным мутагенезом, статистическим мутагенезом или в результате энзиматического расщепления, и/или лигирования нуклеиновых кислот, хорошо известны специалистам, как и способы определения наличия значительной гомологии между модифицированной таким образом нуклеиновой кислотой и подлинной последовательностью, например, с помощью гибридизации.

Таким образом, получение молекулы нуклеиновой кислоты по способу настоящего изобретения позволяет получать рекомбинантные аминопептидазы, или их иммуногенные фрагменты, в количествах, до сих пор недоступных, и, следовательно, позволяет разрабатывать антигельминтные вакцины.

В другом аспекте настоящего изобретения предложены молекулы нуклеиновых кислот, содержащие одну или более из нуклеотидных последовательностей, кодирующих один или более из полипептидов, способных вызывать выработку защитных антител против гельминтных паразитов, причем эти последовательности включают один или более из участков, кодирующих антигенную детерминанту, как показано на фиг. 2, 3, 4 или 5 (последовательности ID N 1-15).

Настоящее изобретение относится также к синтетическим полипептидам, содержащим одну или более из аминокислотных последовательностей, составляющих энзим-аминопептидазу или его антигенную часть, практически соответствующую всей или части нуклеотидных последовательностей, представленных на фиг.2, 3, 4 или 5 (последовательности ID N 1-15), или их функционально-эквивалентных вариантов, отличных от синтетического полипептида, соответствующего протеиновому дублету H110D, или синтетического полипептида, соответствующего любой из отдельных полипептидных последовательностей, раскрытых в WO 90/11086.

В другом варианте в настоящем изобретении предложен синтетический полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, составляющую энзим-аминопептидазу или его антигенную часть, практически соответствующую всей или части нуклеотидных последовательностей, представленных на фиг.2, 3, 4 или 5 (последовательности ID N 1-15) или их функционально-эквивалентных вариантов, практически не содержащих других Haemonchus contortus компонентов.

Далее настоящее изобретение относится к композициям вакцин для стимуляции иммунных реакций против гельминтных паразитов у людей или животных, содержащим, по крайней мере, один синтетический полипептид, определенный ранее, наряду с фармацевтически приемлемым носителем.

В WO 90/11086 раскрыт ряд полипептидных или частично полипептидных последовательностей, полученных в результате протеолитического расщепления или химического расщепления протеинового дублета H110D: (в конце описания).

Неопределенности обозначены либо такой формой, как Phe/Gly, где первый трехбуквенный кодон представляет, по всей вероятности, правильную аминокислоту на основании силы сигнала, или знаком вопроса; знак "-" обозначает неизвестный остаток.

Специфические индивидуальные полипептиды последовательности, которые раскрыты в WO 09/11086, но включены в формулу.

Термин "полипептид", в том смысле, как использован здесь, включает как протеин полной длины, так и более короткие пептидные последовательности.

Термин "функциональный эквивалент" используют в отношении полипептидной аминокислотной последовательности, которая определяет полипептиды, родственные с или полученные из вышеуказанных полипептидных последовательностей, в которых аминокислотная последовательность модифицирована одиночным или множественным замещением, добавлением или делецией аминокислоты, а также последовательностей, в которых аминокислоты модифицированы химически, включая способы гликозилирования или дегликозилирования, но которые, тем не менее, сохраняют защитную (иммуногенную) активность. Такие функционально-эквивалентные варианты могут встречаться как природные биологические вариации, или их можно получить, используя известные методики, например, функционально-эквивалентные рекомбинантные полипептиды можно получить, используя известные методики сайт-направленного мутагенеза, статистического мутагенеза или энзиматическое расщепление и/или

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

лигирование аминокислот.

Обычно синтетический полипептид настоящего изобретения представляет защитные антигенные последовательности.

Термин "защитный антиген" используют для обозначения антигенов, способных вызывать защищающую хозяина (иммуногенную) иммунную реакцию, т.е. реакцию хозяина, которая приводит к выработке иммунных эффекторных молекул, антител или клеток, которые стерилизуют оплодотворяющую способность источника поражения, ингибируют или убивают паразита и тем самым "защищают" хозяина от клинического или субклинического заболевания и снижения продуктивности. Такая защитная иммунная реакция обычно может проявляться в виде выработки антител, которые способны ингибировать метаболические функции паразита, приводя к задержке развития, отсутствию продуцирования яиц и/или к гибели.

Синтетические полипептиды в соответствии с этим аспектом настоящего изобретения можно получить за счет экспрессии в хозяйской клетке, содержащей рекомбинантную ДНК молекулу, которая содержит нуклеотидную последовательность, подробно описанную ранее, оперативно связанную с последовательностью, контролирующей экспрессию, или вектор клонирования рекомбинантной ДНК, или вектор, содержащий такую рекомбинантную ДНК молекулу. В другом варианте такие полипептиды можно экспрессировать непосредственной инъекцией выделенной молекулы ДНК настоящего изобретения в клетки хозяина.

Экспрессированный таким образом полипептид может быть полипептидом слияния, содержащим участок, представляющий иммуногенность всего или части энзима аминопептидазы, и дополнительный полипептид, кодируемый слитой ДНК. Так, например, может оказаться желательным получить протеин слияния, содержащий синтетическую аминопептидазу или другой полипептид настоящего изобретения, соединенный с таким протеином, как β- галактозидаза, фосфатаза, глютатион-S-трансфераза, уреаза, коровий антиген вируса гепатита B (Francis et al. , 1989) и т.п. Большинство протеинов слияния получают за счет экспрессии рекомбинантного гена, в котором две кодирующие последовательности соединены вместо в рамке считывания. В другом варианте полипептиды можно слить in vitro с помощью химических способов. Все такие слияния или производные гибридов аминопептидазу-кодирующих молекул нуклеиновых кислот и их соответствующих аминокислотных последовательностей входят в объем настоящего изобретения. Такие подходящие методики экспрессии рекомбинантных ДНК и полипептидов раскрыты, например, у Sambrook et al., 1989. В другом варианте, синтетические полипептидазы можно получить химическими способами, например, хорошо известным способом твердофазного синтеза Меррифильда.

Другие аспекты изобретения включают использование молекулы нуклеиновой кислоты, или синтетического пептида, или полипептида, как определено ранее, для получения композиции вакцин для стимуляции иммунных реакций у людей или животных, предпочтительно, млекопитающих, против заболеваний, вызываемых гельминтными паразитами.

В другом варианте в настоящем изобретении предложен способ стимуляции иммунной реакции у людей или животных, предпочтительно млекопитающих, против инфекций, вызываемых гельминтными паразитами, включающий введение указанному животному композиции вакцины, включающей одну или более из пептидаз, кодируемых указанной ранее нуклеотидной последовательностью.

Композиции вакцин можно получить по способу настоящего изобретения способами, известными специалистам в изготовлении вакцин. Традиционные вакцинные композиции могут содержать один или более из синтетических полипептидов по способу настоящего изобретения вместе с подходящим одним или более из соответствующих адъювантов, например, гидроксида алюминия, сапонина, Quil A или более очищенных их форм, дипептида мурамила, минеральных масел или Novasomes, в присутствии одного или более из фармацевтически приемлемых носителей или разбавителей. Подходящие носители включают такие жидкие среды, как физиологический раствор, подходящие для использования в качестве носителей для введения пептидов или полипептидов в пациента. Могут быть включены такие дополнительные компоненты, как консерванты.

Альтернативные композиции вакцин могут содержать вирусы или клетки хозяина, например, микроорганизма (например, вирус осповакцины, аденовирус, Salmonella) со встроенной в них молекулой нуклеиновой кислоты (например, молекулой ДНК) по способу настоящего изобретения для стимуляции иммунной реакции, направленной против полипептидов, кодируемых встроенной молекулой нуклеиновой кислоты.

Введение композиции вакцины можно осуществить любым удобным способом, например, орально или парентерально, например, внутривенной инъекцией, необязательно с интервалами, например, в виде двух инъекций с интервалом 7-28 дней.

Как было указано ранее, трансляция аминокислотных последовательностей, изображенных на фиг. 2, 3, 4 или 5, демонстрирует гомологию последовательностей с семейством интегральных мембранных аминопептидазных энзимов. Это было определено при поиске различных баз данных, доступных в пакете анализа последовательностей компьютерной группы генетиков, версия 7.01, ноябрь 1991 (Devereux et al., 1984), используя трансляции последовательностей, представленных на фиг. 2, 3, 4 или 5. Два из таких сопоставлений представлены на фиг.6.

Экспрессию последовательностей, кодирующих аминопептидазу настоящего изобретения, можно, как это было указано ранее, осуществить, используя различные известные методики и системы экспрессии, включая экспрессию в таких прокариотических клетках, как E. coli, и в

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

таких эукариотических клетках, как дрожжи или бакуловирусные системы клеток насекомых, или в трансформированных клетках млекопитающих и в трансгенных животных и растениях. Наиболее выгодно экспрессировать нуклеотидные последовательности, используя трансгенные системы нематод, такие как систему для нематод Caenorhabditis, описанную, например, у Fire (1986); Fire et al. (1989); Spieth et al. (1988); Han et al. (1990).

В следующем аспекте изобретение предлагает способ получения синтетического пептида, описанного ранее, который включает культивирование эукариотических или прокариотических клеток, содержащих молекулу нуклеиновой кислоты, как указано ранее, в условиях, в которых осуществляется экспрессия указанного полипептида, и выделение полученного таким образом указанного полипептида.

В дальнейшем аспекте изобретение включает клонирование векторов экспрессии, содержащих нуклеотидные последовательности изобретения. Такие векторы экспрессии включают такие соответствующие контрольные последовательности, как например, элементы, контролирующие трансляцию (например, кодоны старта и остановки) и транскрипцию (например, промотор-операторные участки, рибосомные связывающие сайты, терминальные стоп-последовательности), связанные в считывающей рамке с молекулами нуклеиновых кислот настоящего изобретения.

Векторы настоящего изобретения могут включать плазмиды и вирусы (включая как бактериофаги, так и вирусы эукариотов), согласно хорошо известным и опубликованным способам, и могут быть экспрессированы в различных экспрессирующих системах, также хорошо известных специалистам. Подходящие вирусные векторы включают, как было указано ранее, бакуловирусы, а также аденовирусы и вирус осповакцины. Специалистам известно множество других вирусных векторов.

Известны и могут быть использованы различные методики введения таких векторов в прокариотические и эукариотические клетки для экспрессии, или в зародышевые или соматические клетки для создания трансгенных животных. Подходящие способы трансформации или трансфекции подробно описаны в литературе.

Следующий аспект настоящего изобретения составляют трансформированные или трансфектированные клетки эукариотических или прокариотических хозяев или трансгенные организмы, содержащие молекулы нуклеиновых кислот настоящего изобретения.

Вообще эукариотические экспрессионные системы, и нематодная система экспрессии в частности, обладают тем преимуществом, что посттрансляционный процессинг и, в частности, гликозилирование, могут осуществляться (в случае трансгенных нематодных систем можно ожидать гликолизирование, соответствующее тому, которое происходит в нативном протеине). Это составляет важный аспект изобретения, так как во многих случаях посттрансляционный процессинг необходим для того, чтобы рекомбинантный протеин экспрессировал оптимум биологической активности.

Системы экспрессии клеток млекопитающих также имеют ряд преимуществ. Клетки млекопитающих обеспечивают хорошее воспроизведение нативной формы и защитных эпитопов антигена, так как эукариотическая экспрессионная система приводит к более подобному гликозилированию образцов, дисульфидным связям и другим посттрансляционным модификациям, нежели E. coli, которая может продуцировать нерастворимый протеин, требующий восстановления трехмерной организации и обладающий плохой репродукцией нативной формы. Кроме того, гликозилирование у млекопитающих, по-видимому, не индуцирует иммунной реакции, которая отличается от защитной антипротеиновой реакции. Для защиты людей и домашних животных, таким образом, предпочтительно использовать фибробласты или миеломные клеточные линии человека или животных, такие, как HeLa - клеточная линия человека; BHK - клетки почек детеныша хомяка; FR 3T3 - крысиные фибробласты Фишера; VERO - клеточная линия почек обезьяны; NIH3T3 - клеточная линия фибробластов мышей; клеточная линия опухоли молочной железы мышей - C127I; CV-I - фибробласты почек африканской зеленой обезьяны; 3T6 - фибробласты эмбриона мыши; L клетки - мышиная клеточная линия; CHO - клеточная линия яичников китайского хомяка; NSO NS1, SP2 и другие мышиные миеломные клеточные линии, и клеточные линии миелом у крыс, такие как YB2/0 и Y3.

Специалистам хорошо известны векторы, соответствующие различным классам клеточных линий млекопитающих. Обычно они содержат промотор и/или энхансер, операбельно связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей антиген или его фрагмент. Подходящие промоторы включают ранний или поздний промоторы SV40, например, PSVL вектор, промотор цитомегаловируса (CMV), промотор металлотионеина I мыши и длинный терминальный повтор вируса опухоли молочной железы мыши. Этот вектор, предпочтительно, включает подходящий маркер, такой как ген дигидрофолатредуктазы или глутамин-синтетазы. Векторы этих типов описаны в WO 86/05807, WO 87/04462, WO 89/01036 и WO 89/10404.

Трансфекцию клеток хозяев можно осуществить, используя стандартные методики, например, используя фосфат кальция, ДЕАЕ декстран, полибрен, протопластное слияние, липосомы, прямую микроинъекцию, генную бомбардировку или электропорацию. Последняя методика предпочтительна и способы трансфекции клеточных линий млекопитающих с использованием электропорации раскрыты Andreason et al., 1980. Вообще, линейную ДНК вводить легче, нежели циркулярную ДНК.

В случае протеина H110D, было обнаружено, что он имеет уникальную и необычную схему гликозилирования, которая, по-видимому, вносит вклад в

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

иммуноактивность, так как многие моноклональные антитела до сих пор полученные против H110D из Haemonchus распознают углеводные эпитопы, которые могут оказаться важными при разработке нужных вакцин.

В частности, был продемонстрирован следующий набор гликозилирования для H110D из Haemonchus:

i) около 65% олигосахаридов N-связаны, остальные O-связаны;

ii) основная часть (около 48%) N-связанных олигосахаридов принадлежит к сложному классу;

iii) практически все (более 95%) олигосахариды не имеют заряда;

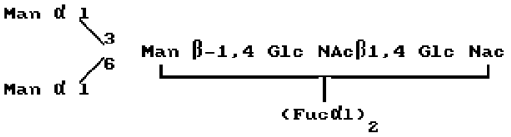
iv) относительное молярное содержание составляющих моносахаридов таково: N-ацетилгалактозамин 1,0, фукоза 3,6, галактоза 4,1, глюкоза 4,4, манноза 6,2 и N-ацетилглюкозамин 5,2;

v) олигосахариды, отличающиеся от основного олигосахарида (обозначаемого олигосахарид D), практически устойчивы к деградации в широком интервале экзо-гликозидаз (например, α-D-маннозидазы, β- D-маннозидазы, β-D-глюкозидазы, β- D-галактозидазы, α-D-галактозидазы, α- L-фукозидазы, β-D-ксилозидазы, β-D-N-ацетилглюкозаминидазы).

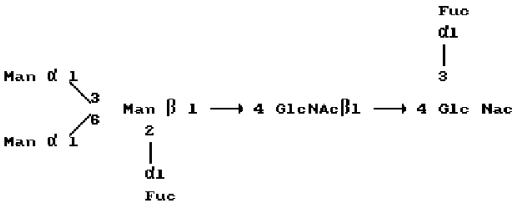
Такие олигосахариды и гликопротеины, содержащие их, составляют следующий аспект настоящего изобретения.

Олигосахарид D из Haemonchus H110D гликопротеина относится к N-связанному типу и имеет новую структуру, состоящую из двух фукозных остатков, соединенных через α-1,3 связь и α- 1,2 связь с ядром маннозы (N-ацетилглюкозамин).

Таким образом, в другом аспекте настоящего изобретения предложен олигосахарид формулы



и более конкретно формулу



особенно, если связан с протеином, например, таким рекомбинантным протеином, как протеин гельминтной аминопептидазы или ее антигенный фрагмент, или если используют для создания антиидиопатических антигенов для иммунизации, особенно очень молодых животных.

Гликопротеины животных обычно содержат α- 1,6-фукозную связь, и поэтому α- 1,3-фукозная связь олигосахарида настоящего изобретения представляется необычной характеристикой.

Далее настоящее изобретение будет более подробно описано для H110D из Haemonchus contortus. Однако, в результате использования таких методик, как гистохимия и ДНК гибридизация, H110D эквиваленты наблюдались и в других видах паразитов. Считают, что H110D протеин представляет собой мультигенный комплекс, и, кроме того, нуклеотидная кодирующая его последовательность может демонстрировать вариации между различными штаммами и различными жизненными циклами развития гельминтов. Более того, существует множество энзимных форм (изоэнзимы), которые могут по-разному экспрессироваться на различных стадиях или в различных штаммах.

В настоящем исследовании ДНК последовательности и, следовательно, предсказанные аминокислотные последовательности были определены из кДНК клонов и PCR продуктов, полученных из мРНК, соответствующих H110D гену, за счет технологии рекомбинантных ДНК из различных источников, и для различных стадий развития паразитов H. contortus жизненного цикла.

Секвенирование кДНК и PCR продуктов позволило нам идентифицировать три близко родственные H110D последовательности, которые обозначены H11-1 (последовательность ID N 19), H11-2 (последовательность ID N 20) и H11-3 (последовательность ID N 21). H11-1 содержит три непрерывные и перекрывающиеся последовательности, кДНК клон Aust B1 (последовательность ID N 6), PCR продукт A-648 (последовательность ID N 9) и с 3' конца PCR продукт 014-178 (последовательность ID N 12); H11-2 содержит PCR продукты A-650 и 2,5 kb (последовательность ID N 10 и 7 соответственно); H11-3 содержит PCR продукты 3,5 kb и A-649 (последовательности ID N 8 и 11 соответственно). Специфическое взаимоотношение между клонами индивидуальной секвенированной кДНК и PCR продуктов и H11-1, H11-2 и H11-3 суммированы на фиг.1 и детально изображены на фиг.3, 4 и 5.

Наблюдаемые различия и вариации в последовательностях, полученных из кДНК клонов и PCR продуктов, которые видны, в частности, на фиг. 2, 3, 4 и 5 (состоящих из последовательностей ID NN 1-15 и 19-21) представлены в таблице 1.

Наблюдаемые различия можно приписать различным мДНК (мультигенного семейства). Кроме того, вариации могут быть связаны, по крайней мере, частично, с различными вариантами H110D-кодирующей последовательности или мРНК, присутствующей на различных стадиях жизненного цикла или в штаммах различного географического происхождения.

В таблице 2 дополнительно представлены уровни идентичности и сходства для соответствующих предсказанных аминокислотных последовательностей и двух опубликованных последовательностей аминопептидаз млекопитающих.

Фиг.1 демонстрирует карту секвенированных клонов кДНК и PCR продуктов H. contortus H110D и их соотношения и относительные положения с H110D мРНК.

Фиг. 2 представляет H110D нуклеотидные последовательности, обозначенные H11-3

RU 2140986 C1
RU 2140986 C1

(последовательность ID N 21, полученная из клонированных PCR продуктов последовательностей ID N 8 и 11 и кДНК клона M1AUS, последовательности ID N 5), H11-2 (последовательность ID N 20, полученная из клонированных PCR продуктов последовательностей ID N 7 и 10) и H11-1 (последовательность ID N 19, полученная из клонированных PCR продуктов последовательностей ID N 9 и 12 и кДНК клона Aust B1, последовательности ID N 6).

Фиг.3 представляет последовательность H11-3 (последовательность ID N 21) (представлена на фиг. 2) с параллельно расположенными кДНК клонами M1 и M1AUS (последовательности ID N 1 и 5).

На фиг. 4 представлена последовательность H11-2 (последовательность ID N 20, представлена на фиг.2) и выравненный кДНК клон B2 (последовательность ID N 4).

На фиг.5 представлена последовательность, обозначенная H11-1 (последовательность ID N 19) и выравненный кДНК B1A и Aust B1 (последовательности ID N 2 и 6 соответственно).

На фиг. 6 представлены: a) предсказанные аминокислотные последовательности (последовательности ID N 22, 23 и 24), полученные из ДНК последовательностей H11-1, H11-2 и H11-3, представленных на фиг.2; bi) и ii) представляют предсказанную аминокислотную последовательность H11-3 в сравнении с опубликованной аминокислотной последовательностью микросомной аминопептидазы крыс M (Watt et al., 1989) и микросомной аминопептидазы мышей A (Wu et al., 1990) соответственно; идентичные части заключены в прямоугольники, пунктиром обозначены участки, введенные для максимизации уровня гомологичности сравниваемых последовательностей. Использован обычный однобуквенный код для аминокислот. Горизонтальная линия над последовательностью указывает положение трансмембранного участка, а звездочки указывают положение цинк-связывающего фрагмента. Уровни сходства указаны в таблицах 1 и 2.

На фиг. 7 представлены выравнивание аминокислотных последовательностей (обозначенных Pep A, Pep B, Pep C, Pep D и Pep E), полученных из C NBr и Lys-C фрагментов H110D, как было ранее описано (международная патентная заявка WO 90/11086 и как перечислено ранее, полипептидных последовательностей (a), (b), (e) (k) и (aa) соответственно) и трех новых последовательностей (последовательности ID N 16, 17 и 18), полученных из H110D после переваривания эластазой или термолизином с трансляциями a) H11-1, b) H11-2 и c) H11-3.

В следующем аспекте изобретения предложены молекулы нуклеиновых кислот, содержащие одну или более из нуклеотидных последовательностей, которые практически соответствуют или которые практически комплементарны одной или более из последовательностей, выбранных из клонов M1, B1A, B1A-3', B2, M1AUS, Aust B1, 014-015 (2,5PCR), 014-872 (3,5PCR клон 2), A-648 (5' конец B1), A-650 (5'конец 2,5PCR), A-649 (5' конец 3,5PCR), 014-178 (3' конец Aust B1 клона 2), 014-178 (3' конец Aust B1 клонов 3 и 6), 014-872 (3,5PCR клона 10) и 014-872 (3,5PCR клона 19), H11-1, H11-2 и H11-3, последовательности ID N 1-15 и 19-21 соответственно, как представлено на фиг.2, 3, 4 и 5 или последовательности, которые практически гомологичны с любой из этих последовательностей или гибридизуются с ними.

Как указано ранее было, сравнение последовательностей различных указанных ранее клонов с компьютерными базами данных известных последовательностей выявляет существенную гомологию с семейством микросомных аминопептидазных энзимов (EC.3.4.11. -). Исследования энзиматической активности и ингибирующей способности, осуществленные для H110D протеина и его субфракций, подтверждают, что протеин на самом дело является микросомной аминопептидазой (α -аминоацил-пептид-гидролазой (микросомной)). Эти исследования показали далее, что проявляются как аминопептидаза A-подобные, так и аминопептидаза N-подобные активности, и что каждый из компонентов H110D дублета отдельно демонстрирует энзиматическую активность.

Исследования протеолитического расщепления H110D также проводились. Используя энзим-эластазу, удалось обнаружить, что H110D может быть расщеплен частично, образуя при этом две фракции, детергент-растворимую фракцию (которая остается с мембраной) и водорастворимую фракцию (которая обозначается H11S). H11S существует в виде протеинового димера, который можно разделить на два компонента. Интересно, что было обнаружено, что только подобная аминопептидазе M активность связана с водорастворимой H11S фракцией, тогда как аминопептидаза A-подобная активность связана только с детергент-растворимой фракцией.

В следующих далее примерах приводится описание исследований, которые привели к определению последовательностей, представленных на фиг.1-7, со ссылкой на следующие дополнительные фигуры.

На фиг. 8 представлены результаты Вестернблоттинга интегральных мембранных протеинов, присутствующих в детергентном экстракте Haemonchus contortus взрослых особей, зондированных аффинно-очищенными антителами, элюированными из потенциальных H110D клонов; a) антигены в детергентном экстракте Haemonchus, распознаваемые антисывороткой к экстракту; b) антитела, элюированные из полоски так, как показано в a), тестированные снова против блота детергентного экстракта, подтверждают успех стадии элюирования; c) антитела, что и в b), которые связываются с клоном M1 экспрессированного протеина, четко распознают участок 110 kb (и относительно узкую полосу около 205 kb; d) связывания антител не происходит, если для абсорбции сыворотки используют не рекомбинанты;

На фиг. 9 представлен Нозернблоттинг мРНК выделенных из 11-, 15- и 23-дневных Haemonchus contortus зондированных a) кДНК клоном M1 (последовательность ID N 1); b) кДНК клоном M1 AUS (последовательность ID N 5); c) кДНК клоном B1A (последовательность ID N 2 и 3); d) кДНК

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

клоном Aust B1 (последовательность ID N 6); e) клонированным PCR продуктом 014-872 (3,5-2, последовательность ID N 8); и f) клонированным PCR продуктом 014-015 (последовательность ID N 7). Номера 11, 15 и 23 указывают возраст Haemonchus из которых были получены мРНК.

На фиг.10 представлен Саузернблоттинг Haemonchus contortus геномной ДНК, зондированной кДНК клонами M1AUS (последовательность ID N 5), B1A (последовательность ID N 2 и 3) и Aust B1 (последовательность ID N 6) и PCR продуктами 014-872 (3,5-2, последовательность ID N 8) и 014-015 (последовательность ID N 7); a) блоты промывают в условиях умеренной жесткости, b) блоты промывают в существенно жестких условиях; для каждого зонда дорожка 1 содержала Hind III -гидролизат ДНК в качество маркера, или оставлена без маркера, дорожки 2 и 3 содержали EcoR1 и Hind III гидролизаты, соответственно, геномной ДНК Haemonochus.

На фиг. 11 представлены Вестернблотты рекомбинантных GST-M1 и GST-B1A протеинов слияния, зондированных аффинно-очищенными антителами к электрофоретически очищенным H110D (H110DE).

На фиг.12 представлен Вестернблоттинг Con A H110D антигена, зондированного антисывороткой к Con A H110D и к рекомбинантным GST-M1 и GST-B1A протеинам слияния.

На фиг. 13 представлены a) результаты анализа H110D протеина и аминопептидазных активностей во фракциях, полученных с помощью ионообменной хроматографии Con A H110D на Mono Q колонке;

b) SDS-PAGE фракций, представлен на фиг.13a).

На фиг. 14 представлены a) pH значения, при которых были получены фракции в эксперименте с изоэлектрическим фокусированием в свободном потоке;

b) SDS-PAGE в восстанавливающих условиях фракций из 14a), где нижняя полоса H110D дублета обнаружена во фракции 6, а верхняя полоса во фракции 16, с варьируемыми количествами каждой из них в перекрывающихся фракциях;

c) Вестернблоттинг фракций представлен в 14b) зондированных

i) моноклональными антителами, обозначенными TS 3/19.7, и

ii) аффинно-очищенными поликлональными анти-MI антителами; контрольные антитела но дают детектируемой реакции.

На фиг. 15 представлены a) pH значения, при которых получают фракции в другом эксперименте изоэлектрического фокусировавания в свободном потоке; b) SDS-PAGE в восстанавливающих условиях для фракций от 15a), использованного в энзиматическом анализе, где нижняя полоса H110D дублета найдена во фракциях 4-6, а верхняя полоса - во фракциях 16-18, с варьируемыми количествами каждой полосы в перекрывающихся фракциях; c) микросомные аминопептидазные специфические активности фракций, представленных в 15 b).

На фиг. 16 представлена защита овец с помощью вакцинации отдельно верхней (U), нижней (L), рекомбинантной (U + L) и промежуточной дублетной (D) полосами из H110D; a) количество откладываемых паразитами яиц, выраженное как количество яиц на г фекалий, b) погибших червей относительно контроля.

На фиг. 17 представлена защита овец в результате вакцинации водорастворимым фрагментом (H11S), полученным из H110D в результате переваривания эластазой и H11A, остаточным детергент- растворимым H110D; a) количество яиц паразитов, выраженное в единицах яиц на г фекалий, b) погибших червой по отношению к контрольным значениям (C).

На фиг. 18 представлены примеры соотношения между ингибированием Ai), Bi) аминопептидаза M-подобной и Aii), Bii) аминопептидаза A-подобной активностями H110D за счет антисыворотки отдельных овец, вакцинированных H110D с уровнями защиты, достигнутыми за счет Ai, ii) % уменьшения погибших червей, и Bi, ii) % уменьшения количества яиц в фекалиях; □ - анти-H110D, ■ - антилошадиный ферритиновый контроль.

На фиг. 19 представлена гистохимическая локализация активности энзима аминопептидазы у взрослых особей Haemonchus contortus - световые микрофотографии криосекций взрослых самок Haemonchus contortus демонстрируют активность аминопептидазы (красный продукт реакции появляется как темная полоса (отмечена стрелкой) на этих черно-белых фотографиях), связанную только с микроворсинками (mv) кишечника (i). Ни одна из других тканей (например, кутикул (c), гиподермиса (h) генитального тракта (gt), мускулов стенок (wm)) не демонстрирует активности. В a) субстратом был L-лейцин-4-метокси -β- нафтиламид, в b) субстратом был α- (4-метокси -β- нафтиламид) L-глутаминовой кислоты;

На фиг. 20 представлена карта 3,5PCR продукта (клон 2) (последовательность ID N 8), субклонированного в бакуловирусный вектор экспрессии pBlue BacII.

На фиг. 21 представлен Вестернблоттинг экстрактов из бакуловирус-инфицированных Spodoptera frugiperda (Sf) 9 клеток, зондированных анти-H110DN антителами. Две клонированнные бляшки, P3A и P4A, экспрессируют полной длины иммунопозитивный H110D (указан стрелкой), а контроль - нет.

Пример

Методы

Конструирование U.K. λ GTII библиотеки

Выделение мРНК

Взрослых Haemonchus contortus (0,5 г) из Великобритании (U.K.), замороженных в жидком азоте, измельчают в жидком азоте, используя предварительно охлажденную ступку и пестик. Из измельченной массы экстрагируют РНК 10 объемами 4 М гуанидингидрохлорида в 25 мМ цитрате натрия, содержащем 0,5% вес. /об. саркосила и 0,7% вес./об. 2-меркаптоэтанола, с последующей экстракцией фенолом и хлороформом, используя способ Chomczynski

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

и Sacchi (1987). Информационную РНК (мРНК) получают из этого с помощью аффинной хроматографии на олиго-dT- целлюлозе (дважды) по способу Maniatis et al. (1982) и качество определяют за счет in vitro трансляции, используя набор лизатов ретикулоцитов кролика и ^{35}S-метионин от Amersham International plc в соответствии с рекомендациями изготовителей. Определяют полипептиды длиной вплоть до 120 кb.

Получение комплементарной ДНК

Первую нить комплементарной ДНК (кДНК) синтезируют из 1 мкг мРНК, используя статистическое праймирование и птичью обратную транскриптазу, а вторую нить синтезируют, используя реакцию замещения RNase H и E. coli ДНК полимеразу 1 с последующей репарацией 3' выступа, используя T4 ДНК полимеразу по способу Gubler и Hoffman (1983). Выход двунитевой (ds) кДНК составляет приблизительно 400 нг из 1 мкг мРНК. Двунитевую кДНК исследуют электрофоретически в 1% агарозном геле с последующей авторадиографией. Двунитевая кДНК имеет размер в интервале 0,2-9,4 килооснований (кв), причем основная часть имеет длину 0,5-2,3 кb.

Клонирование кДНК в λ gt II

Неселектированную по размерам кДНК используют для конструирования библиотеки в λ gt II, используя систему клонирования кДНК Amersham (набор N RPN 1280. Amersham International plc и in vitro упаковывающие экстракты (набор N 334, Amersham) в соответствии с указаниями изготовителей, а также Eco RI линкерные олигонуклеотиды (5'GGAATTCC). Полученную библиотеку помещают в E. coli штамм Y1090 в присутствии изопропилтио -β- D-галактозида (IPTG) и 5-бром, 4-хлор, 3-индолил- -β- D-галактозида (X-gal), в таких условиях, в которых рекомбинантные λ gt II проявляются как чистые ("белые") бляшки, а дикого типа не рекомбинантные λ gt II - как голубые бляшки. Библиотека содержала 90% белых бляшек и эффективность клонирования была оценена как $4 \cdot 10^7$ бляшкообразующих единиц (plaque forming units = pfu) на мкг кДНК, и титр библиотеки составляет $2 \cdot 10^6$ бляшкообразующих единиц на мл. Анализ ДНК из 20 рекомбинантов, взятых произвольно, дает средний размер вставки 0,51 кb. Однако это значение нарушается одним клоном, вставка в котором составляет 3,5 кb. Основная часть вставок имеет более 300 пар оснований (bp). Затем эту неамплифицированную библиотеку, полученную из мРНК червей из Великобритании, подвергают иммуноскринированию.

Получение антительных зондов

Антисыворотка к интегральным протеинам.

Кишечник взрослой особи Haemonchus contortus (из Великобритании) иссекают и гомогенизируют в ледяном фосфатном буфере (PBS), pH 7,4, содержащем 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЕДТА) и N1 мМ фенилметилсульфонилфторида (PMSF). Полученный гомогенат центрифугируют в течение 10 минут, используя микроцентрифугу, и полученный осадок снова суспендируют в том же буфере, содержащем 0,1% об./об. Твина 20 (Твин - торговая марка). После повторного центрифугирования осадок суспендируют в том же буфере, содержащем 2% об./об. Trion X-100, и экстрагируют в течение 2 часов при 4°C. Этот экстракт центрифугируют как указано ранее до получения надосадочной жидкости, содержащей интегральный мембранный протеин (IMP).

Овцу гипериммунизируют IMP в полном адъюванте Фрейнда (FCA) с помощью внутримышечной инъекции 50, 50, 120 и 130 мкг IMP, который вводят в 0, 7, 11 и 15 неделю. Спустя 6 недель после последней инъекции, собирают сыворотку и обозначают ее как сыворотка EE-068.

Получение интегральных мембранных протеинов за счет детергентной экстракции Haemonchus contortus

Экстракт приготавливают, гомогенизируя червей в 5-10 объемах PBS, содержащего 1 мМ ЕДТА и 1 мМ PMSF. Суспензию центрифугируют при 10000 g в течение 20 минут при 4°C и осадок промывают тем же буфером, содержащим 0,1% об. /об. Твина 20, а затем экстрагируют 5 объемами 2% об./об. Triton) X-100, как указано ранее. Надосадочную жидкость снова центрифугируют при 100000 g в течение 1 часа, а полученную надосадочную жидкость, которая обогащена H110D, но содержит другие IMP, используют в Вестернблоттинге и для получения неденатурированного H110D (см. далее).

Получение H110D и аффинно-очищенной анти-H110DN

Обогащенный H110D экстракт обрабатывают с помощью аффинной хроматографии на ConA-агарозе, а затем с помощью ионообменной хроматографии на Mono Q (как указано в WO 88/00835 и WO 90/11086. Очищенный H110D вводят внутримышечно ягненку в FCA. С трехнедельными интервалами вводят 3 дозы по 100 мкг. Сыворотку у ягненка отбирают спустя 4 недели после последней инъекции и очищают с помощью аффинной хроматографии, используя абсорбцию на колонке, содержащей очищенный H110D, который был соединен с цианогенбромид-активированной сефарозой (Pharmacia). Присоединение H110D к сефарозе, связывание антисыворотки и элюирование анти-H110D антител осуществляют в соответствии с инструкциями Pharmacia. Эти аффинно-очищенные антитела обозначают анти-H110DN. Буква "N" отличает эти антитела от тех, которые вырабатываются к денатурированным, электрофоретически очищенным HIIOL, которые обозначают анти-H110DE.

Вестернблоттинг

Весторнблоттинг осуществляют, используя стандартную методику - (Johnstone et al., 1982).

Выделение и характеристика клонов

Иммуноскрининг λ gt II библиотеки (из Великобритании)

Иммуноскрининг библиотеки осуществляют по способу Bowtell et al. (1986). Перед использованием сыворотку (EE-068) инактивируют на анти-E. coli антитела за счет абсорбции с лизатами и целыми клетками E. coli Y1090. Библиотеку высевают на клетки E. coli Y1090 плотностью

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

10^3 pfu на пластину 90 мм диаметром. Пластины закрывают нитроцеллюлозными фильтрами, пропитанными IPTG и инкубируют в течение ночи. Фильтры промывают TBST (50 мМ Tris, pH 7,4, 150 мМ NaCl, 0,05% об./об. Твин 20), а затем блокируют с 5% об./об. лошадиной сывороткой в TBST в течение 2 часов. Добавляют сыворотку EE-068, разбавленную 1: 200 в TBST, содержащем 5% лошадиную сыворотку, и полученные фильтры инкубируют в течение 4 часов при осторожном встряхивании. Фильтры снова промывают в TBST, затем инкубируют с пероксидазой хрена (HRP)-конъюгированной с лошадиным антиовечьим IgG, разбавленным 1:500 в TBST, содержащем 5% об./об. лошадиной сыворотки в точение 2 часов. (Антисыворотку к овечьему IgG вырабатывают в лошадях, антиовечий IgG очищают с помощью аффинной хроматографии на колонке с сефарозой с овечьим IgG, и антитела конъюгируют с HRP по способу Nakane and Kawaoi, 1974). Фильтры промывают далее в TBST, и положительные бляшки определяют, используя 0,6 мг/мл 3,3'-диаминобензидин (ДАВ) и 0,1% об. /об. перекиси водорода. Отбирают 25 предположительно позитивных и повторно скринируют с помощью аффинно-очищенного анти-H110DN, как указано ранее. После этого второго скринирования 5 рекомбинантов все еще остаются позитивными, причем клон, обозначенный как M1, дает наиболее сильный сигнал.

Аффинная очистка антител на рекомбинантном фаге

Конфлюэнтные пластины получают на E.coli Y1090 газонах, засевая 10^3 pfu каждого из антителоположительных клонов или нерекомбинантных λ gt II негативных контрольных фагов. Газоны инкубируют в течение 4 часов при 42°C, а затем покрывают фильтрами, пропитанными IPTG и продолжают инкубирование в течение ночи при 37°C. Фильтры удаляют с пластин и промывают в TBST перед тем, как блокировать с 5% об./об. лошадиной сывороткой в течение 1 часа. Затем полученные фильтры инкубируют с 1:100 разбавлении антисыворотки EE-068 в точение 6 часов, перед тем, как тщательно промывают TBST. Связанные антитела элюируют с фильтров, дважды нанося по 2 мл элюирующего буфера (5 мМ глицина, 500 мМ NaCl, 0,2% Твин 20, pH 2,3) в течение 2-3 минут каждый, нейтрализуют, добавляя 200 мкл 1 М трис-HCl, pH 7,4, разбавляют 1 в 200 и используют для иммуноскрининга Вестернблоттов H110D- обогащенного экстракта.

ДНК секвенирование M1 клона

Лямбда ДНК выделяют из M1 клона по способу Maniatis et al., (1982). 2,38 kb KpnI-S st1 фрагмент, содержащий 300 bp M1 фрагмент, выделяют с помощью гель-электрофореза, очищают, используя GENECLEAN набор (Stratagene) (GENECLEAN представляет торговую марку B10101), и субклонируют в pBluescriptII SK * (Stratagene). EcoRI фрагмент очищают, используя ту же методику, и снова субклонируют в том же векторе.

Нуклеотидную последовательность M1 вставки определяют, используя T7 набор для секвенирования (Pharmacia, UK), используя как прямой и обратный праймеры M13.

Получение кДНК библиотек λ GTII и λ ZAP из Австралии

Выделение мРНК

5 г взрослых особей Haemonchus contortus (австралийский McMaster восприимчивый штамм), замороженный в жидком азоте, измельчают в жидком азоте и РНК экстрагируют, используя горячий фенол по способу Gordingley et al. (1983). Полный выход РНК составляет 10,35 мг. 1,3 мг этой РНК используют для получения мРНК с помощью аффинной хроматографии на олиго-dT- целлюлозе (2 последовательные очистки), используя способ, описанный Maniatis et al. (1982). Выход мРНК составляет 21,6 мкг. Качество мРНК оценивают in vitro трансляцией в лизатах ретикулоцитов кролика в присутствии ^{35}S-метионина (Amersham) в соответствии с инструкциями изготовителя. Полученные продукты трансляции имеют заметно отличающиеся полосы, включая полосы более 200 kb, что продемонстрировал электрофорез на SDS-полиакриламидных гелях с последующей флюорографией.

Синтез кДНК и получение библиотеки

1 мкг мРНК используют для получения кДНК за счет затравки с помощью олиго-dT или статистических праймеров, используя кДНК набор для синтеза кДНК Amersham International plc в соответствии с рекомендациями изготовителей. Выход 115 нг двунитевой (ds) кДНК. Качество кДНК исследуют с помощью электрофореза ^{32}P-меченных ДНК на щелочном агарозном геле по способу Ametsham инструкций к набору кДНК. Размер кДНК (определенный по сравнению с λ- Hind III маркерами, New England Biolabs) составляет от 150 bp до более 10 kb, причем основная часть продукта имеет размер 0,6-5 kb. Олиго-dT-праймированные и статистически-праймированные dS кДНК собирают и лигируют с избытком EcoRI 8-мерными линкерами (5' GGAATTCC3' New England Biolabs, Catalogue N 1018), которые были помечены γ- ^{32}P-ATP и T4 полинуклеотидкиназой. Связанные кДНК переваривают EcoRI и избыток линкеров удаляют с помощью хроматографии на сефарозном геле 4B (Pharmacia) по способу Maniatis et al. (1982). Фракции из колонки собирают в две порции, одна из которых содержит кДНК с размерами более 2 kb, а другая - менее 2 kb. Затем каждую порцию лигируют отдельно с 1 мкг EcoRI отрезками, обрабатывают фосфатазой λ ZapII спейсеры (Stratagene) и упаковывают отдельно, используя Gigapack Gold (Stratagene). кДНК большего размера дают 1,3 • 10^5 рекомбинант, а меньшие кДНК дают 1,4 • 10^5 рекомбинант, их собирают до получения библиотеки из 2,7 • 10^5. λ Zap библиотеку амплифицируют, помещая на клетки XLI-Blue (Stratagene) в количестве 2 • 10^4 pfu на 135 мм пластины. Титр амплифицированной библиотеки составляет 7 • 10^7 pfu/мл.

Дополнительно 2 мкг мРНК используют для получения кДНК описанным ранее

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

способом, но используя в качество праймера только олиго-dT. Выход ds кДНК составляет 740 нг. Эту кДНК обрабатывают EcoRI метилазой по способу Maniatis et al. (1982) перед добавлением EcoRI линкеров, и в этом случае используют 12-мерные линкеры (5' CCGGAATTCCGG3' New England Biolabs, N по каталогу 1019). После переваривания обработанной линкером кДНК EcoRI, все фракции из колонки с сефарозой 4B, которые содержат кДНК, собирают и лигируют с 2 мкг отрезков EcoRI, обрабатывают фосфатазой λ gtII спейсеры (Stratagene). Лигирующую смесь разделяют надвое и упаковывают с двумя порциями Gigapack Gold (Stratagene); их собирают до получения λ gtII библиотеки из $7 \cdot 10^6$ pfu. Библиотеку амплифицируют, помещая на ST9 клетки в количестве $5 \cdot 10^5$ pfu на 135 мм пластины. Титр амплифицированной λ gtII библиотеки составляет $4,5 \cdot 10^{11}$ pfu/мл.

Скринирование λ gtII библиотеки из Австралии с помощью антисыворотки к H110D

Антисыворотку вырабатывают, инъецируя овце H110D протеин (из Великобритании), который был электроэлюирован из полиакриламида после электрофореза в SDS следующим образом: ConA H110D, полученный по способу WO 88/00835 и WO 90/11086, обрабатывают электрофоретически на SDS-полиакриламидных гелях (Laemmli, 1970) до получения электроэлюированных H110D. После электрофореза участки полиакриламидного геля, содержащие отрезки H110D), помещают в электроэлюатер (Atto), и элюирование проводят в течение 3 часов при мощности 10 ватт. Электроэлюированные H110D (обозначенные H110DE) концентрируют на Centriprep 10 (Amicon), и буфер обменивают на PД10 колонке (Pharmacia) в 50 мМ аммонийбикарбоната/0,07% SDS, смешанном с адъювантами, а затем вводят овце с помощью инъекции. Иммуноглобулины из сыворотки осаждают сульфатом аммония (Johnstone and Thorpe, 1982). Осажденные антитела снова суспендируют в концентрации 60 мг/мл в фосфатном буферированном растворе и разбавляют 1:10 в Tris -забуференном физиологическом растворе (TBS), содержащем 5% вес./об. молочного порошка с низким содержанием жира. 10 мг ConA H110D доводят до 0,5% SDS, нагревают до 100°C в течение 3 минут и сушат на нитроцеллюлозном фильтре. После промывки TBS, содержащим 0,2% об./об. Твин 20 и 0,5% Triton X-100 (TBSTT) фильтр инкубируют в течение 1-2 часов при комнатной температуре с антителами к H110DE. После промывания фильтра в течение 2 часов TBSTT, связанные антитела элюируют 3 мл 0,1 М глицина, 0,15 М NaCl, pH 2,6 в течение 2 минут, и немедленно доводят до нейтрального pH, добавляя 75 мкл 1,5 М Tris, pH 8,0. Эти аффинно-очищенные антитела, обозначаемые анти-H110DE, используют для скринирования $5 \cdot 10^5$ pfu библиотеки кДНК λ gt II из Австралии описанным ранее способом.

$5 \cdot 10^5$ рекомбинантов из библиотеки λ gt II, полученных из австралийских Haemonchus contortus, иммуноскринируют и три позитивных из них отбирают. После дальнейшего скринирования два из этих рекомбинантов остаются все еще положительными, и их обозначают B1A и B2.

Секвенирование B1A и B2 клонов

Эти два клона переваривают EcoRI, получая одну вставку приблизительно 500 bp для B1A, и три фрагмента B2A (около 400 bp) B2B (около 100 bp) и B2C (около 100 bp) для B2. Их субклонируют в BlueScript SK * (Stratagene) и секвенируют, используя набор секвеназ 2,0 (United States Biochemicals).

Экспрессия клонов M1 и B1A

M1 (последовательность ID N 1) и B1A (последовательность 1ID N 2 и 3) вставки экспрессируют в E.coli, используя вектор p GEX (Smith and Johnson, 1988). Этот вектор экспрессирует протеины C-конца глутатион-S-трансферазы Schistosoma japonicum (GST). M1 и B1A EcoRI-вставки лигируют с EcoRI-гидролизатом, обрабатывают фосфотазой pGEXI и трансформируют в E.coli штамм JM101 по способу, описанному Maniatis et al., 1982. Восемь экземпляров потомства отбирают из каждой трансформации, и 2 мл культур выращивают в течение 6 часов при 37°C. Добавляют IPTG для индуцирования слияния протеинов, и инкубирование продолжают в течение ночи. Клетки собирают центрифугированием, разрушают кипячением в том же самом буфере (Laemmli, 1974) и полученные экстракты анализируют с помощью SDS-PAGE и проводят Вестернблоттинг, используя аффинно-очищенные антитела овец, специфические для SDS-денатурированных H110D дублетов (анти-H110DE см. ранее). Связанные антитела определяют, используя конъюгат щелочной фосфатазы с кроличьим антиовечьим IgG (Jackson Immunoresearch) с последующим цветовым проявлением с помощью 5-бром, 4-хлор, 3-индолилфосфата (BCIP) и нитроблютетразолиума, (NBT). Культуры иммунопозитивных клонов выращивают и индуцируют как указано ранее, и разрушают ультразвуком. Продукты, полученные в результате этой обработки, разделяют на растворимые и нерастворимые фракции за счет центрифугирования (Sorval RC-2B центрифуга, HS4 ротор, 7000 об/мин, 30 минут, 4°C). Нерастворимый осадок снова суспендируют в 8 М мочевине с помощью ультразвука и образцы фракций исследуют с помощью SDS-PAGE.

Протеины слияния обнаруживают в нерастворимых фракциях тел включения. Каждый из этих препаратов используют для вакцинации 2 овец трижды в количестве 150 мкг протеина слияния на дозу в адъювантах Фрейнда. Позитивных контрольных овец иммунизуют нативным ConA H110D протеином, а негативных контрольных овец иммунизуют солюбилизированным протеином из E.coli, содержащим p GEX вектор без Haemonchus вставки. Сыворотку от вакцинированной овцы анализируют с помощью Вестернблоттинга против H110D.

Скринирование λ ZAP библиотеки из Австралии с помощью ДНК гибридизации с M1 и B1A вставками.

M1 и B1A плазмидные ДНК (клонированные в pBluescript) переваривают EcoRI и вставки выделяют электрофорезом в TBE(трис- борат-ЕДТА; 89 мМ трис-борат, 89 мМ борной кислоты, 2 мМ ЕДТА, pH

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

приблизительно 8,3) буфере в 1% агарозном геле с последующей очисткой с помощью набора GENECLEAN. Выделение и очистку повторяют во избежание загрязнений зонда плазмидными ДНК последовательностями, которые могли бы гибридизоваться с λ ZAP последовательностями, вызывая недопустимый уровень фона. Очищенные вставки ДНК метят α- ^{32}P-dCTP, используя набор для ник-трансляции (Promega Biotech) в соответствии с инструкциями изготовителей. Меченые ДНК выделяют от непрореагировавших меток на Spin хроматографической колонке (Maniatis et al. , 1982). Восемь 135 мм пластин λ ZAP библиотеки помещают в количество 10^5 pfu/пластину и бляшки снимают на нитроцеллюлозные фильтры (Maniatis et al., 1982). После нагревания в вакуумном термостате в течение 2 часов при 80°C фильтры прегибридизуют в течение 2 часов, затем гибридизуют при 42°C в течение ночи (как указано далее в разделе "Анализ по Саузерну"). Четыре фильтра скринируют M1 зондом, а четыре B1A зондом. Фильтры дважды промывают в 1 x SSC, содержащем 0,5% SDS, и все это при 50°C, и авторадиографируют. Потенциальные положительные бляшки отбирают и снова скринируют с зондами. Фаги с высокими титрами приготавливают из подтвержденных позитивов (обозначенных M1AUS для M1-гибридизующего клона и Aust B для B1A-гибридизующего клона) и клоны помещают в pBluescript в соответствии с инструкциями изготовителей для λ ZAP (Stratagene), используя BB4 штамм E.coli в качестве хозяина. Плазмидные ДНК мини-препараты полученного потомства получают щелочным лизисом (Maniatis et al. , 1982) и перевариванием EcoRI. Перевары анализируют электрофорезом на агарозном геле.

Секвенирование вставки M1AUS

Секвенирование ДНК ведут на очищенной pBluescript плазмидной ДНК, используя набор секвеназ United States Biochemicals, версия 2,0, в соответствии с рекомендациями изготовителей. Для первой реакции секвенирования используют праймеры с концов векторной последовательности для праймирования реакции. Полученные в этих реакциях данные секвенирования используют для конструирования второй пары праймеров, а из данных, полученных с этой второй парой праймеров, конструируют третью пару. Таким образом секвенируют ДНК, "прогуливаясь вдоль" с обоих концов: 5' и 3'.

Секвенирование вставки Aust B1

Его проводят, используя секвеназную 2,0 T7 полимеразу (USB Biochemicals) по способу секвенирования вставки M1AUS.

Полимеразные цепные реакции

Получение кДНК

мРНК (1 мкг) из 11-дневных постинфицированных U.K.H. contortus, полученную как указано для взрослых UK червей, смешивают с T17 адаптор-праймером:

(5'-GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTT TTTTTTT 3') в диэтилпирокарбонатом (DEPC)-обработанной воде, затем нагревают до 65°C в течение 5 минут и немедленно помещают на лед. Добавляют гидроксид метилртути до конечной концентрации 28,6 мМ и полученную смесь инкубируют при комнатной температуре в течение 3 минут. Добавляют 1-меркаптоэтанол до финальной концентрации 14,2 мМ и полученную смесь помещают на лед. К синтезированной кДНК добавляют RNase Guard (Pharmacia) до 1 ед/мкл. Буфер обратной транскриптазы (Life Sciences) до однократной концентрации, dATP, dGTP, dCTP и dTTP каждый до 1 мМ и AMV обратная транскриптаза (Life Sciences) до 2 ед/мкл (все указаны как конечные концентрации). Реакционную смесь инкубируют при 41°C в течение 75 минут, затем экстрагируют фенолом и хлороформом и очищают на Spin хроматографической колонке (Maniatis et al, 1982). Очищенную реакционную смесь разбавляют в 2,5 раза и хранят при 4°C.

PCR амплификация кДНК с использованием MIAUS-специфических праймеров

PCR реакции проводят, используя программируемый термоциклер (M.J. Research Inc.). Реакционную смесь, содержащую 1 мкл из 250 мкл разбавленной кДНК, приготовленной как указано ранее, 25 пмолей первой нити T17-адаптор-праймера, 25 пмолей второй нити праймера амплификации (либо на основании положений 865-884 (5' ACGGGTGTTCGGTTTCCGTAT 3'), либо на основании положений 30-49 (5'GCTGAATCTAACTCCAATCC 3') M1AUS последовательности (последовательность ID N 5). 1 • Tag буфер (Northumbria Biologicals Ltd) и 0,5 мМ каждого из dATP, dTTP, dGTP и dCTP в 100 мкл реакционного объема, и покрывают 40 мкл минерального масла во избежание испарения. Затем эту смесь нагревают в термоциклере до 95°C в течение 2 минут, затем выдерживают при 72°C. Все еще при 72°C добавляют 2 единицы Tag полимеразы и осторожно смешивают с остальными реагентами. Затем термоциклеру задают следующую программу:

Стадия 1: отжиг при 50°C, 5 минут

Стадия 2: удлинение при 72°C, 40 минут

Стадия 3: денатурация при 94 °C, 40 секунд

Стадия 4: отжиг при 50°C, 2 минуты

Стадия 5: удлинение при 72°C, 3 минуты

Стадия 6: 39 циклов стадий 3-5

Стадия 7: окончательное удлинение при 72°C в течение 15 минут

Стадия 8: хранение при 4°C.

Эти условия заданы Frohman et al. (1988).

Клонирование PCR продуктов

PCR продукты из вышеуказанных реакций выделяют электрофорезом в агарозном геле. Полосы ДНК приблизительно 2,5 и 3,5 kb электроэлюируют на стекловолокно (Whatman), экстрагируют фенолом и очищают хроматографически на G50 (Pharmacia) (Sambrook et al., 1989). Очищенную ДНК лигируют в pT 7 Blue T-вектор (Novagene) в соответствии с рекомендациями изготовителей.

Секвенирование 2,5 kb и 3,5 kb продуктов PCR

ДНК секвенирование осуществляют с набором секвеназ 2,0 (USBiochemicals), используя "олигонуклеотидную прогулку", методику, описанную в разделе

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

секвенирования M1AUS.

Реакции полимеразной цепи для 5' концов

Получение первой нити кДНК

1 мкг мРНК из 11-дневных постинфицированных UK Haemonchus contortus, полученной по способу, описанному для взрослых червей, смешивают с постоянным праймером (5' AAIGAAAGCGGATGGCTTGAIGC 3'), сконструированным из консервативного участка Aust B1 и 2,5 kb PCR и 3,5 kb PCR продуктами (последовательности ID N 6, 7 и 8 соответственно). Полученную смесь нагревают до 65°C в течение 5 минут, помещают на лед и добавляют гидроксид метилртути до конечной концентрации 28,6 мМ. Полученную смесь инкубируют при комнатной температуре в течение 5 минут, затем добавляют 2-меркаптоэтанол до конечной концентрации 14,2 мМ, и полученную смесь помещают на лед. Первую нить ДНК получают, используя реагенты из 5' RACE системы (Gibco/BRL) при конечной концентрации 20 мМ Tris/HCl pH 8,4, 50 мМ KCl, 2,5 мМ $MgCl_2$, 100 мкг/мл BSA, 0,5 мМ dATP, dCTP, dTTP. Добавляют 200 единиц Superscript обратной трансферазы и реакционную смесь инкубируют при 42°C в течение 30 минут, а затем нагревают при 55 °C в течение 50 минут. Добавляют RNAse H до конечной концентрации 100 ед/мл и реакционную смесь инкубируют в течение 10 минут, а затем помещают на лед. кДНК очищают, используя Glassmax spin колонку (Gibco/BRL) и хранят при -20°C.

Наращивание С-конца кДНК

1/5 первой нити кДНК нагревают при 70°C в течение 5 минут, затем охлаждают на льду в течение 1 минуты. Добавляют реагенты из 5' RACE системы (Gibco/BRL) до конечной концентрации 10 мМ Tris/HCl, pH 8,4, 25 мМ KCl, 1,25 мМ $MgCl_2$, 50 мкг/мл BSA, 0,2 мМ dCTP, 500 ед/мл терминальной трансферазы добавляют и реакционную смесь инкубируют при 37°C в течение 10 минут, затем нагревают при 70°C в течение 15 минут и хранят на льду.

PCR амплификация с использованием Aust B1, 2,5 kb PCR и 3,5 kb PCR специфических праймеров

PCR реакции осуществляют на программируемом термоциклере (M.J. Research Inc.). Для 3' конца используют один из трех праймеров.

1. Праймер, специфический для 2,5 kb PCR продукта, основанный на положениях 374-394 (5' TGTTGTGGCTAATTTCGTCCA 3').

2. Праймер, специфичный для 3,5 kb продукта, основанный на положениях 1210-1229 (5' CATCTTIAGTTATCTGACCAG 3').

3. Праймер, специфический для кДНК клона Aust B1, основанный на положениях 357-377 (5' GACCATCGCTGATGAAGTCGG 3'). Для 5'конца реакций используют обычный "якорный праймер"

(5' CUACUACUACUAGGCCACGCGTCGACTAGT ACGGGIIGGGIIGGGIIG3')

Каждая реакционная смесь содержит 4 мкл из 50 мкл кДНК с С-концом, 25 пмолей соответствующих 2 праймеров, 1 х Tag полимеразный буфер (Boechringer/Mannheim) и 0,5 мМ каждого из dATC, dCTP, dGTP и dTTP до конечного объема 100 мкл. Эту смесь покрывают 50 мкл минерального масла и нагревают до 95°C в циклере в течение 2 минут. Реакционную смесь выдерживают при 80°C и в это время добавляют 0,6 ед. Tag полимеразы, а затем включают следующую программу:

1. Отжиг при 50°C в течение 5 минут
2. Удлинение при 72°C в течение 10 минут
3. Денатурация при 94 °C в течение 45 секунд
4. Отжиг при 50°C в течение 1 минуты
5. Удлинение при 72°C в течение 2,5 минуты
6. 39 циклов пунктов 3-5
7. Удлинение при 72°C в течение 15 минут
8. Хранение при 4°C

Клонирование 5' PCR продуктов

PCR продукты выделяют электрофоретически на агарозном геле и полосы ожидаемого размера 1,3 kb, вырезают, ДНК очищают, используя GENECLEAN набор, и лигируют в PT7BlueT-вектор (Novagene) в соответствии с указаниями изготовителей.

Полимеразная цепная реакция для получения 3' конца Aust B1

Первую нить кДНК, которую используют, является нитью, описанной для получения кДНК для использования с M1AUS праймерами. Используют специфический праймер от 1414 до 1435 (5' TCTTGAAGAAATGAAAAAGCTT 3') в Aust B1 (последовательность ID N 6) с T17 адаптерным праймером, использованным для M1AUS PCR, и реакцию ведут в термоциклере (M.J. Research Inc.). Реакционная смесь состоит из 25 пмолей каждого из праймеров, 2 мкл кДНК 1 х Tag полимеразного буфера) (Boehringer Mannhein), 0,5 мМ dATP, dCTP, dGTP и dTTP в 100 мкл. Все это покрывают 50 мкл минерального масла и нагревают до 95 °C в течение 2 минут, добавляют 0,6 мкл Tag полимеразы и проводят тот же самый программируемый цикл, что и для 5' PCR, описанный ранее.

Клонирование и секвенирование 3' продуктов

Продукты PCR разделяют электрофоретически в агарозном геле и вырезают полосу ожидаемого размера, 1,3 kb, ДНК очищают с помощью набора GENECLEAN и лигируют в PCR-script (Stratagene) в соответствии с рекомендациями изготовителей.

Секвенирование клонированных PCR продуктов

ДНК PCR клонов секвенируют, используя набор секвеназ 2,0 (United States Biochemical) в соответствии с инструкциями изготовителей. Используют олигонуклеотидные праймеры для "прогулки вдоль" ДНК клонов как с 5', так и с 3' концов.

Анализ всех последовательностей ДНК

Последовательности анализируют, используя программное компьютерное обеспечение GCG (Genetics Computer Group), Devereux et al., 1984.

Норзэрнблоттинг и Саузернблоттинг

Получение Норзерн блотов

Норзерн блоты получают в формальдегидных гелях в соответствии с рекомендациями Maniatis et al. , (1982). мРНК образцы (от 11-, 15- и 23-дневных

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

взрослых H.contortus) обрабатывают 17,5% об./об. формальдегида и 50% об./об. формамида в буфере MOPS (20 мМ 3-(N-морфолино)пропансульфоновой кислоты, pH 7,0, 8 мМ ацетата натрия, 1 мМ ЕДТА) при 65°C в течение 15 минут и охлаждают на льду. Гели обрабатывают электрофоретически в MOPS буфере и получают блоты на дуралоновых мембранах за счет капиллярного переноса по способу Sambrook et al. (1989).

Проведение Саузернблоттинга

2 г взрослых Haemonchus contortus, которые были заморожены в жидком азоте, измельчают в мелкий порошок в жидком азоте. Порошок медленно добавляют к 25 мл лизисного буфера (0,05 М Tris/HCl, pH 8, 0,1 М ЕДТА, 1% вес./об. саркозила, 0,05 мг/мл протеиназы К (Boehringer Mannheim)) и инкубируют в течение 2 часов при 65°C. Затем суспензию дважды экстрагируют одним объемом фенола плюс хлороформ, дважды двумя объемами хлороформа и осаждают этанолом. Осадок геномной ДНК ресуспендируют с 20 мл Tris, ЕДТА буфера (TE, pH 8) в течение ночи при 4°C на качалке, затем проводят диализ против двух замен одного литра TE. РНК удаляют, инкубируя с DNase, не содержащей RNase A типа 1 (Sigma) в конечной концентрации 20 мкг/мл, при 37°C в течение одного часа, а затем один раз экстрагируют фенол-хлороформом, один раз хлороформом и осаждают этанолом. Осажденную геномную ДНК дважды промывают 70% об/об этанолом и ресуспендируют в 2 мл TE, как указано ранее.

Геномную ДНК переваривают EcoRI или Hind III (25 мкг ; ДНК в каждом переваре) в течение ночи при 37°C, затем электро-осаждают в 5 мкг порциях на 1% вес. /об. агарозном геле в Tris-ацетатном буфере. Гель обрабатывают по Саузерну и капиллярно переносят по способу Maniatis et al., (1982) на Hybond-N мембрану (Ametsham International). ДНК фиксируют на мембране, используя ультрафиолетовое облучение в соответствии с рекомендациями изготовителей.

Получение зондов

pBluesript плазмиды, содержащие M1AUS, B1A или Aust B1 вставки, переваривают EcoRI. pT7Blue плазмиды, содержащие 3,5 kb PCR продукта вставки переваривают BamHI, и те, которые содержат 2,5 kb PCR вставки, переваривают BamHI и Xbal. Перевары обрабатывают электрофоретически, вставки выделяют и метят радиоактивно α- ^{32}P-dCTP ник-трансляцией, как описано ранее в разделе скринирования библиотеки λ ZAP.

Условия гибридизации

Для Саузернблоттинга

Мембраны нарезают на полоски и прегибридизуют в гибридизационном буфере, как указано ранее, в течение 3 часов при 28 °C. Полоски Саузерн блотов геномных ДНК гибридизуют с каждым из указанных ранее зондов в течение ночи при 28°C, дважды промывают при комнатной температуре (24 °C), затем дважды при 42°C, в 2 x SSC, содержащем 0,1% вес./об. SDS (умеренная жесткость) и авторадиографируют. После проявления авторадиограмм полоски промывают в жестких условиях (0,1 x SSC, 0,1% вес./об. SDS при 65°C) и снова авторадиографируют.

Для Норзернблоттинга

Для зондов M1, M1AUS и B1A (последовательности ID N 1, 5 и 2 соответственно).

Норзерн блоты мРНК из 11-, 15- и 23-дневных зондируют вначале M1 вставкой. Фильтр предварительно гибридизуют в течение 2 часов при 42°C в 2 x SSC (где 20 x SSC = 3 M NaCl, 0,3 M цитрата натрия, pH 7,2), содержащего 5 x Денхардта (0,1% вес./об. Fucoll 400 (Pharmacia), 0,1% поливинилпирролидона, 0,1% бычьего сывороточного альбумина фракции V (Sigma Chemical Corp.)) 0,5% SDS (натрийдодецилсульфат), 10% декстрансульфата, 0,1 мг/мл ДНК икры лосося и 50% деионизированного формамида. Гибридизацию с зондом осуществляют в том же буфере в течение ночи при 42°C. Фильтры дважды промывают в течение 30 минут в 2 x SSC, содержащем 0,5% SDS и 50% формамида, дважды в течение 30 минут в 2 x SSC, содержащем 0,5% SDS, и дважды в течение 30 минут в 2 x SSC. Первую промывку осуществляют при 42 °C, а все остальные промывки ведут при 37°C. После авторадиографии блоты отпаривают, промывая в кипящем 0,1% SDS и снова авторадиографируют, чтобы убедиться в удалении зондов. Затем те же блоты зондируют M1AUS вставкой, промывают и авторадиграфируют. Блоты снова отпаривают и проверяют, а затем зондируют B1A вставкой. После нового отпаривания блоты зондируют, как указано далее.

Для зондов Aust B1, 2,5 kb и 3,5 kb PCR продукты (последовательности ID N 6, 7 и 8)

Норзерн блоты гибридизуют с Aust B1 вставками, используя условия умеренной жесткости, как описано для гибридизации Саузернблоттинга. После авторадиографии блоты отпаривают кипящим 0,1% SDS в соответствии с рекомендациями изготовителей (Amersham), затем зондируют 2,5 kb PCR вставкой (клон 2), снова отпаривают и зондируют 3,5 kb PCR (клон 2) вставкой.

Переваривание H110D и анализы энзимной активности

Получение H110D

Нативную H110D (H110DN) получают способом, описанным в WO 88/00835 и WO 90/11086.

Получение эластазного фрагмента (H11S) H110D

Взрослых Haemonchus гомогенизируют в 10 объемах охлажденного льдом PBS /0,02% азида натрия, а затем центрифугируют в течение 20 минут при 13000 об/мин. Осадок снова суспендируют в 10 объемах PBS /азида, снова гомогенизируют и повторяют центрифугирование. После повторного суспендирования в 50 мМ MOPS буфера, pH 7,4 (объем для суспензии составляет 1 мл для каждых 0,17 г червей) и предварительно нагревают при 37°C в течение 30 минут, материал осадка переваривают эластазой (800 мкл/20 мл суспензии; 1 мг/мл свежего исходного раствора, приготовленного в 1 мМ HCl/2 мМ Ca^{2+}) в течение 1 часа. Переваривание прекращают, добавляя 3,4 дихлоризокумарина (300 мкл исходного раствора 10 мМ в ДМСО/20 мл перевара).

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

Полученную смесь центрифугируют при 13000 об/мин в течение 20 минут, и выпавший материал осадка сохраняют. Надосадочную жидкость обрабатывают в ультрацентрифуге при 100000 g в течение 1 часа 20 минут. Полученную надосадочную жидкость вводят в ConA колонку и получают связанные фракции. Для анализа эту фракцию обрабатывают в SDS-полиакриламидном геле и электрофоретически переносят на поливинилиденфторидную мембрану (Immobilon-P, Millipore), слегка подкрашенную Кумасси синим, вырезают полосу 105 kb и анализируют в газофазном аминокислотном секвенаторе. Для исследования вакцинации ConA связывающие фракции очищают далее, концентрируя и вводя в гель-фильтрационную колонку Sperose 12 (Phatmacia), и собирают те фракции, которые содержат аминопептидазную активность.

Термолизиновое переваривание H110D

H110D дублет очищают электроэлюацией из препаративного 8% SDS-полиакриламидного геля до получения H110DE, как указано в WO 90/11086, и электроэлюированием димерной формы, выходящей как раз над 200 kb (которая дает характерный дублет на 110 kb, если повторить обработку на SDS-PAGE), до получения H110DE. Растворы H110DE концентрируют до 200 мкл, добавляют хлорид кальция до 5 мМ и полученную смесь нагревают до 37°C. Свежеприготовленный раствор 1 мг/мл термолизина (в 1 мМ HCl, 2 мМ $CaCl_2$) добавляют в отношении 0,1 мкг термолизина на мкг H110DE. Полученную смесь инкубируют при 37°C в течение 120 минут и затем реакцию останавливают, добавляя 5 мкл 0,5 М ЕДТА.

Протеиновые фрагменты разделяют электрофоротически в 15% SDS-полиакриламидном геле и электрофоретически переносят на поливинилиденфторидную мембрану (Immobilon-P, Millipore). После окрашивания Кумасси синим наиболее интенсивные дискретные полосы вырезают и анализируют в газофазном аминокислотном секвенаторе.

Получение H110D фракции (H11A), обогащенной аминопептидазной A активностью

Осадок, полученный после эластазной обработки центрифугированием на 17000 g в течение 20 минут (см. ранее), ресуспендируют в PBS при 4°C и снова осаждают центрифугированием, затем снова суспендируют в 1% Твин 20 в PBS /азиде и оставляют (при перемешивании) на 1 час. Суспензию центрифугируют при 17000 g в течение 20 минут и надосадочную жидкость удаляют. Осадок повторно экстрагируют 1% Thesit в PBS /азиде. Надосадочные жидкости после центрифугирования при 17000 g в течение 20 минут комбинируют и ультрацентрифугируют в течение 1 часа 20 минут при 100000 g. Надосадочную жидкость вводят в ConA аффинную колонку (Affigel, Biorad) и связанный материал элюируют и далее фракционируют с помощью ионообменной хроматографии на MonoQ колонке.

Анализ энзиматических активностей

α- аминоацилпептидгидролазные (микросомные) аминопептидазные активности в H110D препаратах характеризуют в анализах, используя L-лейцин, метионин, фенилаланин, α- глутаминовую кислоту и лизин-р- нитроанилиды (pNA). Все аминокислотные р-нитроанилидные субстраты (за исключением α- глутаминовой кислоты) получают от Sigma, Poole, Dorset UK, α- глутаминовая кислота от Fluka, Dorset, UK. Отдельные гидрофобные (лейцин- или фенил-аланин-) и заряженные (α-глутаминовая кислота-) аминокислотные pNA, как известно, являются субстратами для аминопептидаз-M(ApM) и -A(ApA) млекопитающих, соответственно, были выбраны как мера действия ингибиторов энзимов и сывороточного ингибирования на активность H110D аминопептидазы.

a) анализ микропластин

Ячейки микро-ELISA пластины (Dynatech Immulon 1, Vitginia, USA) заполняют (каждую) 250 мкл либо 50 мМ HEPES, либо MOPS pH 7 плюс 10 мкг подлежащей анализу фракции. Затем пластины преинкубируют при 37°C в течение 10 минут перед тем, как добавить 10 мкл 25 мМ аминокислотного р-нитроанилидного субстрата на ячейку. Затем определяют оптическую плотность (ОД) в момент 0 на 405 нМ, используя ELISA считывающее устройство, а затем пластины инкубируют при 37°C в течение 15-30 минут. Коночное значение регистрируют, как и раньше, и рассчитывают ОД изменение в минуту на мг протеина.

b) ингибиторная чувствительность

Способ, использованный для анализа энзимов, тот же, что и в a), за исключением того, что ингибиторы добавляют к 250 мкл буфера плюс 10 мкл 1 мг/мл ConA H110D и предварительно инкубируют в течение 10 минут при 37°C перед добавлением субстратов (лейцин-pNA или α- глутаминовая кислота-pNA). Процент ингибирования рассчитывают следующим образом:

$$\frac{x-y}{x} \cdot 100 = \text{процент ингибирования}$$

где x - $\triangle$ ОД/мин энзима без добавления ингибитора, а

y - $\triangle$ ОД/мин энзима плюс ингибитор.

Девять соединений с различными классами энзимов тестируют отдельно: Amastatin, Bestatin (металлопротеаза, аминопептидаза), 1,10 фенантролин, ЕДТА (металлопротеаза), фосфорамидон (металлопротеаза, термолизин, коллагеназа), Aprotinin (серин-протеаза), Pepstatin (аспарагин протеаза), PMSF (серин- и цистеин-протеазы) и E64 (цистеин-протеаза). Amastatin, bestatin, 1,10 фенантролин, PMSF и пепстатин были получены от Sigma Dorset, UK. Все остальные ингибиторы были получены от Boehringer-Mannheim. Каждый ингибитор используют в двух концентрациях, равных или больше, чем максимальные концентрации, рекомендованные Boehringer-Mannheim.

c) анализ ингибирования энзима антисывороткой

Анализ осуществляют по способу, описанному в a), за исключением того, что используют две микро-ELISA пластины. На одной пластине 10 мкл ConA H110D (1 мл/мл) плюс 10 мкл антисыворотки от каждой овцы на ячейку предварительно инкубируют при

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

37 °C в течение 15 минут. Вторую пластину с 250 мкл HEPES/бикарбонатный буфер плюс 10 мкл либо фениланин-pNA, или α-глутаминовая кислота-pNA субстрата на ячейку также предварительно инкубируют при 37°C в течение 15 минут. Смеси ConA-сыворотки добавляют к смесям буфер-субстрат на второй пластине с помощью мультипипетки

Определяют △ ОД/мин. Для внесения поправок процент ингибирования рассчитывают по формуле, приведенной ранее в разделе b), где x представляет среднее △ ОД/мин для ячеек, которые содержат энзим плюс сыворотку от негативных контрольных овец (вакцинированных ферритином селезенки лошади), а y △ ОД/мин для ячеек, которые содержат энзим плюс сыворотку от овец, вакцинированных H110D. Для внесения поправок (фиг.18) процент защиты рассчитывают, используя формулу в разделе b), где x - либо среднее количество яиц в фекалиях на грамм, либо среднее количество червей в контроле, а y - либо количество яиц в фекалиях на грамм во время эксперимента, либо количество червей у отдельной овцы, вакцинированной H110D.

Локализация активности энзима гистохимически

Аминопептидазную активность демонстрируют на 10 мкм криостатированных отрезках Haemonchus contortus, используя L-лейцин-4-метокси -β- нафтиламид и L-глутамин -α- 4-метокси -β- нафтиламид в качество субстратов по способу Nachlas et al. (1957), Nakane et al., (1974) и Lojda et al. (1980).

Экспрессия рекомбинантных H110D в эукариотической системе бакуловирусклетки насекомых

Конструирование плазмид экспрессии

3,5 kb PCR фрагменты, описанные ранее, создают за счет амплификации между олиго-dT-адаптером (который содержит Sal I сайт) и олиго-872, который представляет основания N 30-49 в M1AUS последовательности, и клонируют в pT 7 Blue вектор. Клон pT 73.5-2 ориентирован векторным полилинкерным BamHI сайтом с 5' конца и Hind III, Xbal и Sal I сайтами с 3' конца. Последовательность с 5' конца имеет вид:

```
BamHI     * -----oligo 872------- --3.5K---
5'GG ATC CGA TTG CTG AAT CTA ACT CCA ATC C...3'
                Leu Asn Leu Thr Pro Ile.......
```

Звездочки указывают 3' dT/dA выступ, используемый для клонирования в pT 7 Blue вектор.

3,5 PCR клон 2 переваривают Hind III (отдельный сайт в полилинкерной векторной последовательности с 3' конца 3,5 K гена) и концы дополняют деоксинуклеотидами, используя ДНК полимеразу (фрагмент Кленова), по способу Maniatis et al. (1982). Линкер BamHI (5' CGGATCCG 3', New Ehgland Biolabs Catalog N 1021) лигируют с тупыми концами, и клоны с дополнительным BamHI сайтом, который позволяет вырезать полной длины последовательность H110D гена, как BamHI фрагмент, отбирают. Фрагмент BamHI выделяют электрофоретически на 0,6% вес./об. агарозном геле в трис-ацетатном буфере, а затем очищают, используя (GENECLEAN (B10101). Эту процедуру проводят дважды. Затем этот очищенный фрагмент лигируют с BamHI-отрезком, фосфатазируют pBlue Bac II (Invitrogen Corp.), и клоны, содержащие фрагмент в правильной ориентации (т. е. с 5' концом 3,5 PCR клона 2) помещают под контроль бакуловирусного полиэдринового промотора, определенного перевариванием Nhel и XBal. Полученную плазмиду частично переваривают BamHI и концы дополняют, как указано выше. Ncol линкер, содержащий ATG (5' CCC **ATG** GG 3'; New England Biolabs Catalog N 1040), добавляют и смесь лигируют. Клоны, содержащие линкер, лигированный по 5' концу BamHI сайта 3,5 PCR клона 2, а но 3' сайт, определяют, переваривая Ncol. Полученная плазмида, обозначенная pBB 3,5-2 (N), схематически изображена на фиг.19.

Эта конструкция приводит к встраиванию в рамке ATG на 5' конце вставки 3,5 PCR клона 2 для инициации трансляции. Последовательность, окружающая этот инициирующий ATG, представляет собой:

```
BamHI--Ncol link-BamHI---* -----oligo 872----------
--
5'GGATCCCC ATG GGG ATC CGA TTG CTG AAT CTA ACT CCA ATC
C..
           Met Gly Ile Arg Leu Leu Asn Leu Thr Pro Ile
...
```

В экспрессированном протеине не хватает аминокислот 2-9, соответствующих H110D последовательности, и в ней содержатся 3 аминокислоты линкерной последовательности, непосредственно после ATG.

Создание рекомбинантных бакуловирусов, содержащих H110D последовательности

Плазмиду pBB 3,5-2 (N) трансформируют в Spodoptera frugiperda (Sf 9) клетках (полученных от Invitrogen Corp.), используя линейную ДНК вируса ядерного полиэдроза Autographica californica (ACNPV) и катионные липосомы (Invitrogen Corp. трансфекционный модуль), в соответствии с указаниями изготовителей. Клетки культивируют в TC-100 среду (SIGMA), дополненную сывороткой плода теленка (CSL Ltd; термоинактивирована при 56°C в течение 45 минут) и антибиотиками (пенициллин/стрептомицин, гентамицин CSL Ltd). Контрольную трансфекцию, используя pBB 3,5-2 (N) плазмиду с ATG вставкой по 3' концу 3,5 PCR клона 2 последовательности, также осуществляют. Рекомбинантные бляшки отбирают на том основании, что вектор Blue Bac II также кодирует E. coli β-галактозидазу (β- gal), включая X-gal в агарозный слой при рекомендуемых уровнях. Проводят отбор синих бляшек и подвергают двум циклам дополнительной очистки бляшек, после чего инфицированные монослои уже не демонстрируют свидетельств содержания дикого типа вируса (что проявляется наличием ядерной полиэдры). Очищенные вирусы обозначают 3,5-2-P2A, -P3A и P4A и амплифицируют двумя последовательными инфицированиями Sf 9 клетками перед использованием. Бляшки, выделенные из контрольной трансфекции, обозначают 3,5-2-rev.

Оценка экспрессии H110D в клетках насекомых, инфицированных рекомбинантным бакуловирусом

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

Монослои Sf 9 клеток (1 • 10^6 клеток в 25 $см^2$ склянках) инфицируют 3,5-2 вирусами, дикого типа вирусом (wt), контрольным вирусом, экспрессирующим β- gal, или не инфицируют. После 4 дней выращивания при 26°C монослои отделяют осторожным встряхиванием, клетки выделяют центрифугированием (2000 об/мин, 10 минут) и клеточный осадок разрушают тремя циклами замораживание - оттаивание. Полученные лизаты снова суспендируют в 500 мкг PBS и аликвоты по 25 мкл анализируют на ApM активность с помощью анализа в микроячейках.

15 мкл аликвоты (3 • 10^4 клеток эквиваленты) вышеуказанных лизатов обрабатывают электрофоретически на денатурированных 7,5% SDS-полиакриламидных гелях. Затем один гель подкрашивают Кумасси синим для оценки уровня экспрессии. Остальные гели подвергают Вестернблоттингу и блоты зондируют анти-H110D (как было указано ранее).

Результаты

Анализ иммуноположительных клонов

Анализ антител, аффинно-очищенных на клоне M1

Аффинно-очищенные антитела, специфические для каждого из 5 антителоположительных клонов, получают и используют для зондирования Вестерн блота H110D-обогащенных экстрактов. Как показано на фиг. 8, все 5 клонов, по-видимому, распознают H110D дублет. Однако реакция с клоном M1 дает более сильный сигнал (фиг.8d) по сравнению с λ gt II негативным контрольным блотом. Поэтому этот клон исследуют далее.

Норзернблоттинг клона M1

Результаты Норзернблоттинга Haemonchus contortus мРНК, зондированной M1 вставкой, представлены на фиг.9. Распознается отдельная мРНК полоса приблизительно 3,5 kb. Это достаточный размер для кодирования протеина около 110 kb.

Анализ последовательности клона M1

Анализ рестрикционных переваров ДНК с помощью EcoRI демонстрирует M1 вставку приблизительно 300 bp. ДНК последовательность M1 фрагмента определена и представлена на фиг.3. Фрагмент содержит 295 bp и открытую считывающую рамку, начинающуюся с основания номер 3.

Норзернблоттинг клона B1A

Норзернблоттинг Haemonchus contortus мРНК, зондированной B1A вставкой, представлен на фиг. 9c. Как и для M1, распознается отдельная мРНК полоса приблизительно 3,5 kb.

Секвенирование клонов B1A и B2

Клоны B1A были секвенированы (последовательности ID N 2 и 3) и полная последовательность (последовательность ID N 2) представлена в сопоставлении с H11-1 (последовательность ID N 19) и Aust B1 (последовательность ID N 6) на фиг. 5. Вставка составляет 484 bp и имеет полную ORF от первого основания. 3 фрагмента B2, полученные в результате переваривания EcoRI, секвенируют, и полная последовательность для B2 (последовательность ID N 4) имеет 581 bp. Она представлена в сопоставлении с H11-2 на фиг. 4. Последовательность имеет ORF от положения 3 до 213 bp, стоп кодон и нетранслируемый участок, совместимый с участком 2,5 kb полученной в PCR последовательности (последовательность ID N 7).

Экспрессия M1 и B1A в E. coli

В результате субклонирования в вектор экспрессии GST получают клоны, которые экспрессируют протеины слияния 38-40 kb для M1 и 45 kb для B1A. Это согласуется с предсказанными для вставок размерами, обеспечивая молекулярный вес глутатион -S-трансферазы. Оба протеина слияния очень интенсивно реагируют в Вестернблоттинге с аффинно-очищенными антителами к H110DE (фиг. 11). Протеины слияния экспрессируются как нерастворимые тела включений.

Реакция антител у овец, вакцинированных M1-GST и B1A-GST протеинами слияния

Антисыворотку овец, инфицированных протеинами слияния, тестируют в Вестернблоттинге против H110D препаратов. Как GST-M1, так и GST-B1A приводят к выработке антител, которые специфически распознают H110D дублет (фиг. 12). Сыворотка от негативно контрольных овец не распознает H110D дублет.

Выделение и характеризация клонов, селектированных за счет гибридизации с ДНК вставок M1 или B1A

Подтвержденные позитивные клоны, гибридизованные с M1 зондом, обозначают M1AUS (последовательность ID N 5), а клон, гибридизованный с B1A, обозначают AustB1 (последовательность ID N 6). Рестрикционное переваривание очищенных плазмидных ДНК EcoRI выявляет размер вставки около 900 bp для M1AUS и около 1,6 kb для Aust B1. Как представлено на фиг. 9b) и 9d), при Норзернблоттинге M1AUS и Aust B1 гибридизуются с того же размера мРНК (около 3,5 kb), что и M1 и B1A.

Анализ последовательности M1AUS

Полное секвенирование M1AUS фрагмента выполняют, используя "прогулку" синтетических олигонуклеотидов вдоль ДНК с каждого конца. Анализ полученной последовательности выявляет M1AUS вставку в 948 bp, что представлено на фиг. 3. Последовательность (последовательность ID N 5) начинается с ATG (который кодирует метионин) и содержит открытую считывающую рамку (ORF) по всей длине его. Последовательность на 19 пар оснований длиннее, чем M1 последовательность, с 5' конца, и на 634 bp длиннее с 3' конца. Последовательности, общие для двух клонов (основания 20- 314), идентичны, за исключением двух нуклеотидных различий в положении третьего кодона. Сравнение всех возможных считывающих рамок в различных базах данных показывают, что считывающая рамка, начинающаяся с ATG у основания номер один, обеспечивает гомологичность с членами семейства микросомных аминопептидаз.

Последовательность AustB1

Полное секвенирование Aust B1 фрагмента выполняют, используя "прогулку" синтетических олигонуклеотидов вдоль ДНК с обоих концов. ДНК последовательность (последовательность ID N 6) представлена на

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

фиг. 5. Этот клон имеет длину 1689 bp и имеет ORF с остатка 2. Эта последовательность образует часть H11-1, как видно на фиг. 1. Трансляция аминокислот этой последовательности демонстрирует фрагмент сайта связывания цинка, характерный для аминопептидаз.

PCR амплификация кДНК мРНК H110D

PCR с использованием M1AUS праймеров

кДНК синтезируют из Haemonchus contortus мРНК, используя в качестве праймера олиго-dT, содержащий адапторную последовательность, для облегчения последующего клонирования и манипуляций с ДНК. Затем эту ДНК используют для амплификации M1AUS последовательности в PCR, используя в качестве праймера 5' конца синтетический олигонуклеотид, основанный на положениях 965-885. PCR фрагмент около 2,5 kb амплифицируют. Он имеет размер, приблизительно соответствующий ожидаемому на основании известного размера мРНК и последовательностей кДНК аминопептидазы млекопитающих.

Осуществляют второй набор PCR реакций, используя праймер вблизи 5' конца M1AUS (основания 30-49). На агарозном геле детектируют четыре полосы. Наибольшая из них, при 3,5 kb, соответствует предсказанному размеру PCR продукта.

Клонирование и секвенирование 2,5 kb и 3,5 kb PCR продуктов из M1AUS праймеров

2,5 kb и 3,5 kb PCR продукты клонируют и обозначают 2,5 PCR (последовательность ID N 7) и 3,5 PCR (последовательность ID N 8, 14 и 15 для клонов N 2, 10 и 19 соответственно). В Нозернблоттинге 2,5 PCR и 3,5 PCR (клоны 2, 3.5 PCR-2) гибридизуются с мРНК около 3,5 kb (фиг. 9e, 9f) таким же образом (по отношению к возрасту Haemonchus, использованных для получения мРНК), что и M1, B1A, M1AUS и Aust B1.

Полное секвенирование клонов осуществляют в "олигонуклеотидной прогулке". Как видно на фиг. 1, последовательность для 2,5 kb продукта (последовательность ID N 20) и последовательность для 3,5 kb продукта (последовательность ID N 8) является основной частью H11-3 (последовательность ID N 21). Трансляция аминокислот обоих этих последовательностей (представленных на фиг. 6) содержит фрагмент связывания цинка His Glu Xaa His Xaa Trp (HEXXHXW), характерный для микросомных аминопептидаз.

Секвенирование 5' конца PCR клонов

кДНК синтезируют, используя праймерное типирование консервативной последовательности в кДНК клона Aust B1, 2,5 PCR и 3,5 PCR (последовательности ID N 6, 7 и 8), которые гибридизуются с мРНК для этих последовательностей около 1,3 kb с 5' конца кДНК завершают C-хвостом с 5' конца, а затем проводят PCR реакции с универсальным Anchor (A) праймером для 5' конца и тремя праймерами, специфическими для каждой из последовательностей Aust B1, 2,5PCR и 3,5 PCR-клона 2 (последовательности ID N 6, 7, 8) для 3' конца. В каждой реакции получается продукт предсказанного размера, а именно 1,3 kb : 1301 bp (последовательность ID N 9), 1280 bp (последовательность ID N 10) и 1292 (последовательность ID N 11) соответственно. Все три последовательности имеют нетранслируемый участок с 5' конца (фиг.2). Все начинаются с одной и той же 22 bp последовательности (5'GGTTTAATTACCCAAGTTTGAG 3'), которая известна как сплайсированная лидерная последовательность I (SLI) и присутствует в нетранслируемом 5' участке широкого круга нематод Huang et al., 1990. В последовательностях ID N 9 и 10 SLI последовательность следует непосредственно перед инициирующим ATG. В последовательности ID N 11 существуют 13 bp между SLI и инициирующим ATG. Все три последовательности имеют полную ORF.

Секвенирование Anst B1 3' конца PCR клона

Используя специфический праймер, соответствующий положениям 1414-1438 в Aust B1 (последовательность ID N 6), PCR продукт дает полосу предсказанного размера около 1,3 kb. Секвенирование клонированной полосы приводит к получению последовательностей ID N 12 и 13. Они дают ORF из 1-615 bp и практически нетранслируемый участок.

Анализ последовательностей клонированных PCR продуктов

Составы последовательностей, описанных ранее и обозначенных H11-1, H11-2 и H11-3, представлены на фиг.2. Аминокислотные последовательности, предсказанные для них, представлены на фиг. 6a. Значения предсказанных трансляций представленных ДНК последовательностей совершенно подтверждаются соответствием с аминокислотными последовательностями, определенными деградацией Эдмана из CN Br и протеолитическим расщеплением фрагментов (фиг.7). Так, 27 остатков из 29 остатков N-терминальной последовательности H11S (последовательность ID N 16) соответствуют H11-2 из остатков 61-90 (фиг.7b). Соответствия валина (V) в положении 78 и глицина (G) в положении 90 являются характеристическими для H11-1, тогда как H11-3 имеет аспарагин (N) в положении 90 и H11-1 имеет лейцин (L) в положении 86 (что соответствует положению 78 в H11-2). Два остатка H11S N-конца аминокислотной последовательности (последовательность ID N 16) не соответствуют ни одной из трех представленных H110D последовательностей. Особо следует отметить точное соответствие очень близких, но различающихся послодовательностей Pep A и B (ранее описанных в WO 90/11086) с H11-2 и H11-1, соответственно на участке остатков 540-555. Аналогично, на участке остатков 450-470 Pep D точно соответствует H11-2, тогда как аналогичная, но различающаяся Pep E более близко соответствует H11-3.

В качестве примера транслированную аминокислотную последовательность одной из полной длины последовательностей (H11-3) сравнивают на фиг. 6b с двумя последовательностями микросомных аминопептидаз млекопитающих. Гомологичность H110D трансляции с этими аминопептидазами представлена как заключение в прямоугольник идентичных аминокислот. Характеристическим фрагментом микросомных аминопептидаз является аминокислотная

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

последовательность HEXXHXW, которая функционирует как сайт связывания цинка (Jongeneel et al., 1989; Vallee et al., 1990); это показано звездочками на фиг. 6. Эта последовательность, которая должна присутствовать в трансляциях H11-1, H11-2 и H11-3, является консервативной во всех микросомных аминопептидазах. Другими характеристиками, общими для микросомных аминопептидаз Haemonchus и млекопитающих, являются присутствие сравнительно коротких внутриклеточных участков, отдельной трансмембранной последовательности, соседней с N-концом, и несколько потенциальных сайтов гликолизирования. Уровни гомологии (сходства в 52-55%, идентичности в 30-32%) H11-1, -2 и -3 с микросомными аминопептидазами млекопитающих представлены в таблице 2.

Саузернблоттинг

Результаты Саузернблоттинга H. contortus геномной ДНК, зондированной различными H110D кДНК клонами и PCR продуктами, представлены на фиг. 10. Все зонды демонстрируют множество полос гибридизации; это типично для мультигенного семейства. Как и ожидалось, B1A и Aust B1 демонстрируют аналогичный ход гибридизации друг с другом, так же, как и M1AUS и 3,5 kb PCR. Однако эти схемы заметно отличаются друг от друга и от того, что наблюдается для 2,5 kb PCR зонда, даже в условиях умеренной жесткости (фиг. 10a), что отражает различные уровни гомологичности между этими тремя кДНК.

Демонстрация активностей аминопептидаз, связанных с H110D

Было обнаружено, что активность микросомной аминопептидазы связана с теми фракциями, которые содержат H110D, т.е. надосадочная жидкость после ультрацентрифугирования Thesit экстрактов, ConA связывающих фракций (ConA H110D) и фракций, содержащих H110D, полученных ионообменной хроматографией на Mono Q колонке (таблица 3). Специфические активности со всеми тестированными субстратами повышаются с повышением чистоты H110D.

Влияние ингибиторов аминопептидаз млекопитающих на активности аминопептидазы H110D

Добавление ингибитора бестатина (который ингибирует микросомную аминопептидазу млекопитающих) к ConA H110D в концентрациях, рекомендуемых изготовителем (Boehriger Mannheim), снижает активность против лейцин-p-нитроанилида приблизительно на 70%. Проведена серия экспериментов для определения активности ингибирования для ряда протеазных ингибиторов. Те ингибиторы, которые не специфичны для металлопротеаз или аминопептидаз, но обладают ингибирующим эффектом на скорость реакции. Те ингибиторы, которые, как известно, влияют на металлопротеазу или аминопептидазу, оказывают влияние на скорость реакции, как видно из данных таблицы 4. Наиболее эффективным ингибитором оказался 5 мМ фенантролин (см. таблицу 4).

Субфракционирование H110D

Распределение активностей, связанных с фракциями после ионообменной хроматографии ConA H110D на Mono Q, представлено на фиг. 13a, а SDS-PAGE фракций - на фиг. 13b.

Далее, энзиматическая активность связана с субфракциями H110D, разделенными рециклизацией изоэлектрического фокусирования свободного потока (фиг. 14 и 15). При низких значениях pI (pH 4,5) эти субфракции содержат только более крупные из полос, составляющих H110D дублет, видный на SDS-PAGE, а при более высоких значениях (pH 6,5) они содержат только меньшие полосы, которые составляют H110D дублет. Промежуточные фракции содержат все эти полосы. Меньшие полосы можно также получить как отдельную фракцию с помощью ионообменной хроматографии на Mono Q, используя Pharmacia SMART® аппарат. Все эти субфракции связывают антитела овец с H110D аффинно-очищенных на протеине, экспрессированном λ gt II клоном M1, тогда как антитела, элюированные из λ gt II без вставки, не связывают (фиг. 14c). Все субфракции связывают мышиные моноклональные антитела, обозначаемые TS3/19,7 (фиг. 14c), которые также связываются с рекомбинантным протеином, экспрессируемым клоном M1. Все субфракции демонстрируют микросомную антипептидазную активность (фиг. 15c), хотя эта активность сравнительно ниже для фракций, полученных при наиболее высоких и наиболее низких значениях pI. Эта более низкая активность может быть приписана более низкой концентрации протеинов, эффектам крайних значений pH во время субфракционирования или требованиями наличия как наибольших, так и наименьших полос для максимальной активности.

Вакцинация выделенными компонентами H110D

Выделенные высшие и низшие полосы, полученные изоэлектрическим фокусированием свободного потока или ионообменной хроматографией, индуцируют образование защитных антител, когда их инъецируют в овец, что иллюстрируется следующим экспериментом. 30 овец возраста примерно 6 месяцев разделяют на 5 групп по 6 овец так, чтобы вес овец в каждой группе был одинаковым. Каждому животному инъецируют по 150 мкг протеина в трех равных дозах по способу Munn et al. (1992) и Tavernor et al. (1992a, b) за промежуток времени 54 дня. Животным в группе L вводят нижние (меньшие) полосы H110D дублета, группе U верхнюю полосу, L+U - снова объединенные верхнюю и нижнюю полосы, D - две (неразделенные) полосы, полученные изоэлектрическим фокусированием свободного потока при промежуточных значениях pH, и в качество контроля (группа C) ферритин селезенки лошади (антигенный неродственный протеин). Овец заражают 10000 инфекционных личинок спустя три недели после третьей инъекции, и эксперимент заканчивают на 29-31 день после инфицирования.

Результаты эксперимента суммированы на фиг. 16. Введение любой из субфракций снижает количество яиц паразитов в эксперименте на 90% и уменьшает полное количество червей на 63-84%, причем все демонстрируют существенное отличие

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

(p < 0,05) по сравнению с контролями, используя непараметрический статистический анализ. Уменьшение количества червей-самок (70-88%) оказывается больше, чем уменьшение количества червей-самцов, и (за исключением уменьшения количества самцов-червей у овец, которым вводили рекомбинантные верхнюю и нижнюю полосы, составляло p < 0,07) для обоих полов уменьшение было значительным (p < 0,05).

Вакцинация H11S и H11A

Усеченную, водорастворимую форму H110D (H11S, которая сохраняет энзиматическую активность) можно получить из нативной молекулы, обработанной эластазой. Обнаружено, что эта форма содержит преимущественно ApM-подобную активность, а Thesit экстракт эластазного перевара (H11A) обогащен ApA-подобной активностью.

Отношение

Аминопептидаза-M (лейцин-pNA): - Амиропептидаза-A (α- глутаминовой кислоты-pNA)

H110D - 1,44:1

H11S - 26,0:1

H11A - 0.48:1

Нижеследующий эксперимент показывает, что вакцинация овец либо H11S, либо H11A обеспечивает защиту против Haemonchus заражения или инфицирования. 18 овец (примерно восьмимесячных) делят на 3 группы по 6 так, чтобы в каждой группе вес овец был примерно одинаков. Каждому животному вводят всего 100 мкг протеина в двух равных дозах по способу Munn et al. (1992) и Tavernon et al. (1992a, b) за 23 дня. Животным в группе A вводят H11A, группе S вводят H11S, а группе C - ферритин селезенки лошади (антигенно неродственный протеин) в качество негативного контроля. Затем овец заражают 10000 инфекционных личинок спустя 25 дней после второй инъекции, и эксперимент заканчивают через 34-36 дней после инфицирования. Результаты эксперимента приведены на фиг. 17. Введение H11S снижает количество яиц паразитов за время эксперимента на 89% и снижает полное количество червей на 76%. Введение H11A уменьшает количество яиц паразитов за время эксперимента на 84%. Это показывает заметное различие (p < 0,05) от контрольных значений по данным непараматрического статистического анализа.

Ингибирование H110D аминопептидазной активности антителами

Растворы, содержащие H110D, инкубируют сывороткой от отдельных овец, которым были введены фракции, содержащие H110D от контрольных овец. Затем растворы анализируют на активность аминопептидазы с использованием фенилаланина и α-глутаминовой кислоты pNA в качестве субстратов. Степень ингибирования активности (максимально 80%) коррелирует с уровнем защиты, демонстрируемым отдельными овцами, у которых отбирали сыворотку (см. фиг. 18).

Локализация энзиматической активности

Замороженные отрезки взрослых Haemonchus contortus исследуют на активность аминопептидазы. Как видно на фиг. 19, активности энзима аминопептидазы локализованы в люминальной поверхности кишечника. H110D протеин также специфически обнаружен в этом место.

Экспрессия H110D (3,5 PCR клон. 2) с использованием эукаротической системы бакуловирус-клетки насекомого

Экспрессия аминопептидазной активности в клетках насекомого

Инфицированные клетки собирают и оценивают на аминопептидазную активность, используя phe-, leu-, met- и lys -pNA в качество субстратов. Анализ осложняется наблюдением, что клетки насекомых обладают аминопептидазной активностью с заметным преимуществом для lys-связвнных амидных связей. Однако клеточные экстракты, содержащие экспрессированный H110D дополнительно расщепляются leu-, met- и phe-pNA в порядке предпочтительности.

Молекулярный вес и иммунореактивность экспрессированного H110D (3,5 PCR клона 2) протеина

Образцы инфицированных или контрольных клеточных экстрактов обрабатывают электрофоретически на 7,5% SDS-полиакриламидном геле, который затем окрашивают Кумасси синим. 3,5-2-P3A и 3,5-2-P4A инфицированные клеточные лизаты оба содержат полосу того же размера, что и H110D, 110 kb, которая мигрирует непосредственно под совместно-экспрессированным β- gal, который имеет молекулярный вес 120 kb. Эта полоса 110 kb не присутствует ни в одном из негативных контрольных лизатов. (Она также отсутствует в P2A лизате, который не экспрессирует энзимную активность).

Дубликатный гель подвергают Вестернблоттингу и зондируют анти-H110DN (фиг. 21). Очень сильная, специфически позитивная иммунореакция наблюдается для 110 kb полосы, экспрессированной 3,5-2-P3A и 3,5-2-P4A, и для нативного H110D дублета в контрольной полосе, содержащем ConA H110D, тогда как реакция не наблюдается ни для одной из контрольных негативных полос.

Формула изобретения:

1. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая не менее одной последовательности, принадлежащей к набору последовательностей JD N 1 - 15 и JD N 19 - 21, представленных на фиг.2, 3, 4 или 5, кодирующих антигенные части, соответствующие по меньшей мере частично указанным последовательностям, или гельминтные энзимы аминопептидазы, или последовательностям, кодирующим гельминтные энзимы аминопептидазы, идентичные им не менее, чем на 50%, или которые гибридизируются любой из указанных последовательностей в условиях 2 SSC при комнатной температуре, причем SSC соответствует 0,15 M раствору хлорида натрия, 0,015 M раствору цитрата натрия при pH 7,2.

2. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая не менее одной нуклеотидной последовательности, способной кодировать полипептид, вызывающий выработку защитных антител против гельминтных паразитов, причем нуклеотидная последовательность включает не менее одного участка, кодирующего антигенные детерминанты из последовательностей JD N 1 - 15 и JD N 19 - 21, кодирующих аминопептидазу и представленных на фиг. 2,

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

3, 4 и 5.

3. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая не менее одной нуклеотидной последовательности, соответствующей или комплементарной не менее чем одной последовательности, выбранной из последовательности клонов MI, BIA, BIA-3', B2, MIA US, Aust B1, 0,14 - 0,15 (2,5 PCR), 014 - 872 (3,5 PCR2), A-648 (5' конец B1), A-650 (5' конец 2,5 PCR), A-649 (5' конец 3,5 PCR), 014 - 178 (3' конец Aust B1 2), 014 - 178 (3' конец Aust B1 3 и 6), 014 - 872 (3,5 PCR 10) и 014 - 872 (3,5 PCR 19), HII-1, HII-2 и HII-3, SEQ ID NOS: 1 - 15 и 19 - 21 соответственно, которые содержат последовательность, идентичную на 50% и более, представленной на фиг.2, 3, 4 и 5, или последовательностей, которые имеют идентичные им последовательности на 50% или более, или которые гибридизуются с любой из указанных последовательностей в условиях 2 SSC, при комнатной температуре, где SSC соответствует 0,15 M раствору хлорида натрия, 0,015 M цитрата натрия при pH 7,2.

4. Вектор экспрессии или клонирования, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.1 - 3.

5. Синтетический полипептид, содержащий не менее одной аминокислотной последовательности, представляющей энзим-аминопептидазу или ее антигенную часть, соответствующие всей части нуклеотидной последовательности JD N 1 - 15 и JD N 19 - 21, приведенной на фиг. 2, 3, 4 и 5 или их функционально эквивалентные варианты, отличающиеся от синтетического полипептида, соответствующего протеиновому дублету H 110 или его синтетическому полипептиду, выбранному из:

6. Полипептид по п. 5, отличающийся тем, что он является очищенным и содержит аминокислотную последовательность, состоящую из энзима аминопептидазы или его антигенной части, соответствующей всей или части нуклеотидной последовательности JD N 1 - 15 и JD N 19 - 21, представленной на фиг.2, 3, 4 или 5, или их функционально эквивалентных вариантов.

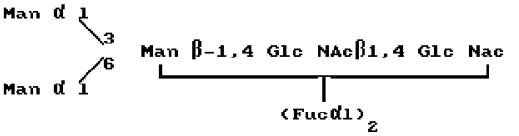
7. Полипептид по п.5 или 6, отличающийся тем, что он существует в форме полипептида слияния, содержащего дополнительный полипептид, слитый с указанной аминокислотной последовательностью, определенной в п.5 или 6.

8. Способ получения синтетического полипептида по любому из пп.5 - 7, отличающийся тем, что культивируют прокариотические или эукариотические клетки, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.1 - 3 в условиях, обеспечивающих экспрессию указанного полипептида, и выделяют указанный полипептид.

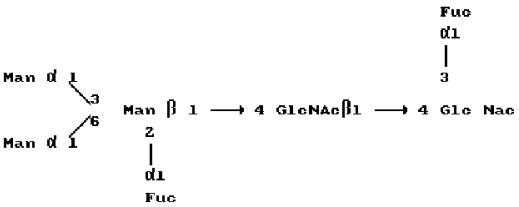
9. Композиция вакцины для стимулирования иммунной реакции против гельминтных паразитов у человека или животных, отличающаяся тем, что она содержит по крайней мере один синтетический полипептид по любому из пп.5 - 7, или вирус или клетку-хозяина, содержащие встроенную молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.1 - 3 для стимуляции иммунной реакции полипептидами, кодируемыми встроенной молекулой нуклеиновой кислоты, и фармацевтически приемлемый носитель.

10. Способ стимуляции иммунной реакции против гельминтных паразитов у человека или животных, отличающийся тем, что осуществляют введение вакционной композиции по п.9.

11. Олигосахарид общей формулы



12. Олигосахарид по п.12, отличающийся тем, что он соответствует формуле



13. Олигосахарид по п. 11 или 12, отличающийся тем, что он связан с синтетическим полипептидом по любому из пп. 5 - 7.

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

Ряд последовательностей согласно патенту WOSO \ 11086

(a) Met Gly Tyr Pro Val Val Lys Val Glu Glu Phe

(b) Met Gly Phe Pro Val Leu Thr Val Glu Ser

(c) Met Gly/Phe Asn Phe Lys Ile Glu/Val Thr/Glu Ala Gly

(d) Met Lys Pro/Glu Thr/Val Lys Asp/Ala Thr/Lys Leu - Ile Thr

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

(e) Met Leu Ala Leu Asp Tyr His Ser - Phe Val

(f) Met Leu Ala Glu/Tyr Asp Gln/Ala Glu Asp Val

(g) Met Gly Phe Pro Leu Val Thr Val Glu Ala Phe Tyr

(h) Met Lys Thr Pro Glu Phe Ala Val/Leu Gln Ala Phe/Thr Ala Thr Ser/Gly Phe Pro

(i) Lys His/Tyr Asn/Val Ser Pro Ala Ala Glu Asn/Leu Leu Asn/Gly

(j) Lys - Thr Ser Val Ala Glu Ala Phe Asn

(k) Lys Ala Ala Glu Val Ala Glu Ala Phe Asp - Ile - - - Lys Gly

(l) Lys Ala Val Glu Val/Pro Ala Glu Ala Phe Asp Asp Ile Thr? Tyr - - Gly Pro Ser

(m) Lys - Glu Glu Thr Glu Ile Phe Asn Met

(n) Lys - - - Pro Phe Asn/Asp Ile Glu Ala Leu

(o) Asp Gln Ala Phe Ser Thr Asp Ala Lys

(p) Met Gly Tyr Pro Val Val Lys Val Glu Glu Phe -Ala Thr Ala Leu

(q) Met Gly Phe Pro Val Leu Thr Val Glu Ser - Tyr? - Thr

(r) Met Glu/Phe Asn Phe Leu Ile Glu/Val Thr/Glu Ala Gly - Ile Thr

(s) Met Gly Phe Leu Val Thr Val Glu Ala Phe Tyr - Thr Ser

(t) Met Lys Thr Pro Glu Phe Ala Val/Leu Gln Ala Phe/Thr Ala Thr Ser/Gly Phe Pro

(u) Met Lys Pro/Glu Thr/Val Leu Asp/Ala Thr/Lys Leu - Ile Thr - Gly

(v) Met Leu Ala Leu Asp Tyr His Ser - Phe Val Gly?

(w) Met Leu Ala Glu/Tyr Asp Gln/Ala Glu Asp Val

(x) Lys His/Tyr Asn/Val Ser Pro Ala Ala Glu Asn/Leu Leu Asn/Gly

(y) Lys - Thr Ser Val Ala Glu Ala Phe Asn

(z) Lys Ala Ala Glu Val Ala Glu Ala Phe Asp - Ile - - - Lys Gly

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

(aa)	Lys	Ala	Val	Glu	Val/Pro	Ala	Glu	Ala	Phe
	Asp	Asp	Ile	Thr?	Tyr	-	-	Gly	Pro	Ser
(bb)	Lys	-	Glu	Gln	Thr	Glu	Ile	Phe	Asn	Met
(cc)	Lys	-	-	-	Pro	Phe	Asn/Asp	Ile	Glu	
	Ala	Leu								
(dd)	Asp	Gln	Ala	Phe	Ser	Thr	Asp	Ala	Lys	

Таблица I

Гомология выведенных аминокислотных последовательностей, полученных за счет трансляции нуклеотидных последовательностей, представленных на фиг.2

			% сходства	% идентичности
НП-1	:	НП-2	77	63
НП-1	:	НП-3	79	65
НП-2	:	НП-3	82	69

Таблица 2

Гомология НПОД аминокислотных последовательностей с крысиной аминопептидазой М(АрМ) и мышиной аминопептидазой А(АрА).

			% сходства	% идентичности
НП-1	:	АрМ	55	32
НП-1	:	АрА	55	3I
НП-2	:	АрМ	52	3I
НП-2	:	АрА	54	3I
НП-3	:	АрМ	53	32
НП-3	:	АрА	52	30

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

Таблица 3. Активности энзимов из фракций из А типичных H 110 D препаратов

Фракция	Специфические активности энзимов(O.D./ мин / мг протеина)				
	фенил-аланин -pNA	лейцин -pNA	лизин - pNA	α- глутаминовая кислота-pNA	метионин -pNA
фосфатный буферированный физ.раствор (PBS)	0.20	0.08	0.12	0.01	0.16
1% Твин 20/PBS	0.15	0.15	0.09	0.01	0.09
1% Thesit/PBS	1.94	1.25	0.57	0.54	1.91
ConA H110D	4.08	3.01	1.43	2.09	3.84
CamQ H110D	6.55	5.01	3.01	3.90	6.41

Таблица 4

Ингибирование H110 Daминопептидазных активностей с использованием различных ингибиторов протеаз

Ингибитор	концентрация	% ингибирования	% ингибирования
		α- глутаминовой кислоты - p- нитроанилид субстрат[1]	лейцин -p- нитроанилид субстрат [2]
Амастатин	10μM мкМ	0	61
	50μM мкМ	0	66
Бестатин	50μM мкМ	23	63
	100μM мкМ	35	68
EDTA	1mM мкМ	17	8
	10mM мкМ	21	16
1,10 фенантролин	1mM мкМ	78	78
	10mM мкМ	85	87
Фосфорамидон	10μM мкМ	1	0.8
	50μM мкМ	1	7

[1] субстрат аминопептидазы - А млекопитающих
[2] субстрат аминопептидазы - М млекопитающих

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

References

Andreason, G.L. & Evans, G.A. (1980) Biotechniques 6, 650.

Blin, N., & Stafford, D.W. (1976). Nucleic Acids Research 3, 2303-2308.

Bowtell, D.D.L., Saint, R.B., Rickard, M.D. & Mitchell, G.F. (1986). Parasitology 93, 599-610.

Chomcyznski, P. & Sacchi, N. (1987). Analytical Biochemistry 162, 156-159.

Cordingley, J.S., Taylor, D.W., Dunne, D.W. & Butterworth, A.E. (1983) Gene 26, 25-39.

Devereux, J., Haerberli, S. & Smithies, O.(1984), Nucleic Acids Research 12, 387-395

Feinberg, A.P. & Vogelstein, B. (1983). Analytical Biochemistry 132, 6-13.

Fire, A. (1986) EMBO Journal 5, 2673-2680.

Fire, A. & Waterston, R.H. (1989) EMBO Journal 8, 3419-3428.

Francis, M.J. & Clarke, B.E. (1989) Methods in Enzymology 178, 659

Frohman, M.A., Dush, M.K. and Martin, G.R. (1988). Proceedings of the National Academy of Sciences, Washington 85, 8998-9002.

Gubler, U. & Hoffman, B.J. (1983). Gene 25, 263-265.

Han, M. & Sternberg, P.W. (1990) Cell 63, 921-931.

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

Huang, X.-Y. & Hirsch, D. (1990) Proceedings of the National Academy of Sciences Washington 86, 8640-8644.

Johnstone, A. and Thorpe, R. (1982) Immunochemistry in Practice. Blackwell Scientific. London

Jongeneel, C.V., Bouvier, J. & Bairoch, A. (1989). FEBS Letters 242, 211-214.

Kenny, A.J. & Maroux, S. (1982). Physiological Reviews, 62, 91-128.

Kenny, A.J. & Turner, A.J. (1987). Mammalian Ectoenzymes. Elsevier Press, Amsterdam. Volume 14 of Research Monographs in Cell and Tissue Biology. (editors J.T.Dingle & J.L.Gordon).

Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680-685.

Lojda, Z. & Gossrau, R. (1980) Histochemistry 67, 267-290.

Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J. (1982). Molecular Cloning, a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Publication.

Merrifield, R.B. (1964) Biochemistry 3, 1385-1390.

Munn, E.A., Smith T.S., Graham, M., Greenwood, C.A., Tavernor, A.S. & Coetzee, G. (1992) Parasitology 106, 63-66.

Nachlas, M.M., Crawford, D.T. and Seligman, A.M. (1957). J Histochem & Cytochem. 5, 264-278.

Nakane, P.K. & Kawoi, A.K. (1974). Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 22, 1084-1091.

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

Noren, O., Sjostrom, H., Danielsen, E.M., Cowell, G.M. & Skovbjerg,H. (1986). The Enzymes of the Enterocyte Plasma Membrane. In Molecular and Cellular Basis of Digestion. Elsevier Press, Amsterdam, (editors P.Desnuelle, H.Sjostrom & O.Noren).

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Semenza, G. (1986). Annual Review of Cell Biology, 2, 255-313.

Smith, D.B. & Johnson, K.S. (1988) Gene 67, 31-40.

Spieth, J. MacMorris, M., Broverman, S., Greenspoon, S. & Blumenthal, T. (1988) Dev. Biol. 130, 285-293.

Tavernor, A.S., Smith, T.S. Langford, C.F., Graham, M. & Munn, E.A. (1992a) Parasite Immunol. 14, 671-675.

Tavernor, A.S., Smith, T.S., Langford, C.F., Munn, E.A. & Graham, M. (1992b) Parasite Immunol 14, 645-655.

Vallee, B.L. & Auld, D.S. (1990) Biochemistry 29, 5647-5659.

Watt, V.M. & Yip, C.C. (1989) Journal of Biological Chemistry 264, 5480-5487.

Woodward, MP, Young, WW Jr and Bloodgood, RA (1985). Detection of Monoclonal Antibodies specific for carbohydrate epitopes using periodate oxidation. J. Immunol. Meth. 78, 143-153.

Wu, Q., Lahti, J.M., Air, G.M., Burrows, P.D. & Cooper, M.D. (1990) Procedings of the National Academy of Sciences, Washington 87, 993-997.

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

INFORMATION FOR SEQ ID NO: 1: информация для послед. 1д № 1

SEQUENCE CHARACTERISTICS: характеристики последовательности

LENGTH: 295 base pairs — длина : 295 пар оснований
TYPE: nucleic acid — тип: нуклеиновая кислота
STRANDEDNESS: double — тип нитей: двунитевая
TOPOLOGY: linear — топология: линейная

SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 1: описание последовательности № 1

```
CGCGGACATT GCTGAATCTA ACTCCAATCC GTCTTATTGT CGCATTATTT CTAGTAGCTG   60
CTGCAGTCGG CCTCTCTATT GGTCTCACCT ATTACTTTAC TCGCAAAGCG TTCGATACCT  120
CAGAAAAGCC AGGGAAGGAT GATACTGGTG GCAAGGACAA AGACAATTCT CCCTCTGCGG  180
CGGAACTACT TCTTCCAAGT AATATAAAAC CATTGTCTTA CGACTTGACG ATCAAAACAT  240
ATCTACCTGG TTATGTGGAC TTCCCACCGG AGAAAAACCT CACATTCGAC GGGCG       295
```

INFORMATION FOR SEQ ID NO: 2: информация для последовательности 1д № 2

SEQUENCE CHARACTERISTICS: характеристики последовательности:

LENGTH: 484 base pairs — длина: 484 пары оснований
TYPE: nucleic acid — тип: нуклеиновая кислота
STRANDEDNESS: double — тип нитей : двунитевая
TOPOLOGY: linear — топология : линейная

SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 2: описание последовательности – 2

```
GCAATATCAG GATTCAATAC AATTTTGGAC TTTTTCGGCA GCGAACCCGA ATCTCAATGG   60
GCTTCGGAAT ACATGCGAAA ACTGATGAAG CCAATTTATG ACAAGAGTAG CATCAAGTTT  120
ATAGCGGAGA ACTACAAAAA AGATTCGCTT TTCTTCAAAA ATAATCTCCA AATAGCTGTT  180
ATTGACACAT ACTGTGGTCT TGGAGGCAAA GAATGTCTTG AAGAAATGAA AAAGCTTTTT  240
GACAAGGAGG TCATGAAATG TCAACCTGGT CAGCAAGCGA CCGACTGCGT AAAGGTAACT  300
GCTCCTCTCC GAAAAACTGT TTACTGCTAT GGGGTCCAGG AAGGCGGTGA TGAGGCATTC  360
GACAAGGTGA TGGAACTATA TAATGCGGAA CAAGTGCAGT TGGAGAAAGA CAGTCTACGT  420
GAAGCATTGG GATGCCATAA AGACGTTACA GCTCTAAAGG GACTTCTTAT GCTGGCTTTG  480
GATC                                                               484
```

INFORMATION FOR SEQ ID NO: 3: информация для последовательности 1д № 3

SEQUENCE CHARACTERISTICS: характеристики последовательности:

LENGTH: 216 base pairs — длина: 216 пар оснований
TYPE: nucleic acid — тип: нуклеиновая кислота
STRANDEDNESS: double — тип нитей: двунитевая
TOPOLOGY: linear — топология: линейная

SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 3: описание последовательности № 3

```
ACCTGGTCAG CAAGCGACCG ACTGCGTAAA GGTAACTGCT CCTCTCAAAA CTGTTTACTG   60
CTATGGGGTC CAGGAAGGCG GTGATGAGGC ATTCGACAAG GTGATGGAAC TATATAATGC  120
GGAACAAGTG CAGTTGGAGA AAGACAGTCT ACGTGAAGCA TTGGGATGCC ATAAAGACGT  180
TACAGCTCTA AAGGGACTTC TTATGCTGGC TTTGGA                             216
```

INFORMATION FOR SEQ ID NO: 4: информация для последовательности 1д № 4

SEQUENCE CHARACTERISTICS: характеристики последовательности:

LENGTH: 581 base pairs — длина 581 пара оснований
TYPE: nucleic acid — тип: нуклеиновая кислота
STRANDEDNESS: double — тип нитей: двунитевая
TOPOLOGY: linear — топология: линейная

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 4: описание последовательности 1Д № 4

```
GGGAGGAAAT CACTGCGAGC TTGGAAACAG AACACAGAGC AGTTGATAAA GTGGTCGGCG    60
CTTGTTGCAC AGGAATTCGC TCCCAACAAC AAATAGATCA GCTGAAGAAG AATCTACAGA   120
AGAACAATGC GCAGGCTAAG AAGTTCCATA AAATTGCCTG GATCAAGAAA CATTTTCACA   180
GATTATCGGA ATTCTTCAAG AGAGCAAGAT CATAGCTTTT CACACTGAGC TCCAATTTTA   240
ACGTCTTCAA ACTAGGAGAC AGTTTTGCTG AAAAGTCAGT TTCACATTTT CCGTTTGAAT   300
GCCATCCATT CGAATACAAC CAACCCCATT TTAAGTACCT TTCATTCACA GTGATTACTA   360
AATTTCGAAT ATATTATGAA GCTTGTATCT TGAACGTTAT GATCGGTGAC TTTCAATTTA   420
TAGAGCTCAC TCTCCATTTT GTAGCTGTGA TGACTTGCAT TTAAGACCCA CCATTTACCA   480
GCCTATAATC TTTCCCCAAT ACATTCCAAA CTCCGATCAC CTCCACCGCT GACAATGCCC   540
AGATTTGTTT CTTTGTCTGC TATCCATCTA ACTGTTTCGA T                       581
```

INFORMATION FOR SEQ ID NO: 5: информация для последовательности 1Д № 5

SEQUENCE CHARACTERISTICS: характеристики последовательности:

LENGTH: 948 base pairs — длина: 948 пар оснований
TYPE: nucleic acid — тип: нуклеиновая кислота
STRANDEDNESS: double — тип нитей: двунитевая
TOPOLOGY: linear — топология: линейная

SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 5: описание последовательности 1Д № 5

```
ATGACGTCGC AGGGGAGAAC GCGGACATTG CTGAATCTAA CTCCAATCCG TCTTATTGTC    60
GCATTATTTC TAGTAGCTGC TGCAGTCGGC CTCTCTATTG GTCTCACCTA TTACTTTACT   120
CGCAAAGCGT TCGATACCTC AGAAAAGCCA GGGAAGGATG ATACTGGTGG CAAGGACAAA   180
GACAATTCTC CCTCTGCGGC GGAACTACTC CTTCCAAGTA ATATAAAACC ATTGTCTTAC   240
GACTTGACGA TCAAAACATA TCTACCTGGT TATGTGGACT TCCCACCGGA GAAAAACCTC   300
ACATTCGATG GGCGTGTGGA AATATCAATG GTTGTAATTG AGCCAACAAA GAGTATCGTA   360
CTCAATTCAA AGAAGATCTC TGTAATACCC CAAGAATGTG AACTGGTATC GGGCGATAAA   420
AAATTCGAAA TTGAAAGTGT AAAGGAGCAC CCAAGACTGG AAAAGGTTGA GTTTCTTATC   480
AAAAGCCAAC TGGAAAAAGA TTCACAAATC TTGCTCAAGT CGGCTTACAT CGGTCTCATC   540
AGCAACAGCC TTGGTGGAAT CTACCAGACC ACTTATACCA CCCCGGATGG CACCCCTAAG   600
ATCGCTGCAG TTTCACAAAA TGAGCCCATA GATGCTCGTC GAATGGTACC ATGCATGGAT   660
GAACCGAAAT ACAAAGCAAA CTGGACCGTT ACTGTCATTC ATCCAAAAGG CACCAAAGCC   720
GTCTCGAATG GAATCGAAGT GAACGGAGAT GGAGAGATCA GTGGTGATTG GATCACATCG   780
AAGTTCTTGA CTACTCCACG GATGTCATCC TACTTGTTGG CAGTTATGGT TTCAGAATTT   840
GAATACATCG AAGGTGAAAC AAAGACGGGT GTTCGGTTCC GTATATGGTC ACGCCCAGAG   900
GCAAAGAAGA TGACACAATA TGCTCTGCAA TCTGGTATCA AGTGCATA                948
```

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

INFORMATION FOR SEQ ID NO: 6: информация для последовательности 1д № 6

SEQUENCE CHARACTERISTICS: характеристики последовательности:

LENGTH: 1689 base pairs — длина: 1689 пар оснований
TYPE: nucleic acid — тип: нуклеиновая кислота
STRANDEDNESS: double — тип нитей: двунитевая
TOPOLOGY: linear — топология: линейная

SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 6: описание последовательности № 6

```
AATTCCGGCT CGTCCGGAAG CTATGAAGAT GACAGAATAT GCCATGATAG CTGGAATCAA    60
ATGTTTGGAT TACTATGAGG ACTTCTTCGG GATCAAATTC CCACTTCCAA AACAAGATAT   120
GGTTGCTCTT CCTGACTTCT CATCTGGTGC TATGGAGAAC TGGGGTCTCA TCACATACAG   180
GGAGGGTTCC GTGCTCTACG ATGAAAACCT CTACGGACCA ATGAATAAGG AGCGGGTTGC   240
AGAAGTGATC GCGCACGAAC TTGCACATCA GTGGTTCGGT AATTTGGTCA CGATGAAGTG   300
GTGGGATAAC CTATGGCTGA ACGAAGGATT CGCGTCATTC GTGGAATACA TCGGAGCCGA   360
CTTCATCAGC GATGGTCTAT GGGAAATGAA AGATTTCTTC CTGCTGGCAC CGTACACAAG   420
TGGTATTACG GCTGATGCAG TAGCTTCAAG CCATCCGCTT TCCTTCAGAA TAGATAAGGC   480
TGCAGATGTA TCAGAAGCGT TCGATGATAT CACATACCGT AAAGGAGCAT CCGTTCTTCA   540
AATGCTATTG AATTTAGTTG GGGACGAAAA TTTCAAGCAG TCTGTTTCGC GTTACCTCAA   600
GAAGTTTTCA TATGATAATG CGGCTGCTGA AGATTTATGG GCAGCATTCG ACGAAACCGT   660
CCAAGGTATA ACCGGACCTA ATGGTGGACC ATTGAAAATG TCCGAGTTTG CGCCACAATG   720
GACAACTCAG ATGGGGTTCC CTGTTCTTAC TGTCGAGTCG GTTAACGCAA CGACTTTGAA   780
AGTCACCCAA AAACGATACA GGCAGAACAA GGATGCAAAG GAACCAGAGA AGTACCGTCA   840
TCCAACTTAT GGGTTCAAAT GGGATGTTCC TCTGTGGTAT CAGGAAGATG AACAGCAAGT   900
GAAAAGAACT TGGTTAAAAA GAGAGGAACC GCTCTATTTC CATGTAAGCA ATTCTGATTC   960
GTCAGTTGTG GTGAATGCCG AACGTCGTGC TTTTTGCCGA TCAAACTATG ACGCTAACGG  1020
TTGGAGGAAC ATTATGAGAA GACTCAAGCA GAATCATAAG GTCTATGGTC CACGAACAAG  1080
AAACGCTCTC ATAAGTGATG CGTTTGCAGC AGCTGCAGTT GAGGAAATGA ATTACGAGAC  1140
CGTATTTGAA ATGCTCAAAT ACACCGTGAA AGAAGAGGAT TACTTACCAT GGAAGGAGGC  1200
AATATCAGGA TTCAATACAA TTTTGGACTT TTTCGGCAGC GAACCCGAAT CTCAATGGGC  1260
TTCGGAATAC ATGCGAAAAC TGATGAAGCC AATTTATGAC AAGAGTAGCA TCAAGTTTAT  1320
AGCGGAGAAC TACAAAAAAG ATTCGCTTTT CTTCAAAAAT AATCTCCAAA TAGCTGTTAT  1380
TGACACATAC TGTGGTCTTG GAGGCAAAGA ATGTCTTGAA GAAATGAAAA AGCTTTTTGA  1440
CAAGGAGGTC ATGAAATGTC AACCTGGTCA GCAAGCGACC GACTGCGTAA AGGTAACTGC  1500
TCCTCTCCGA AAAACTGTTT ACTGCTATGG GGTCCAGGAA GGCGGTGATG AGGCATTCGA  1560
CAAGGTGATG GAACTATATA ATGCGGAACA AGTGCAGTTG GAGAAAGACA GTCTACGTGA  1620
AGCATTGGGA TGCCATAAAG ACGTTACAGC TCTAAAGGGA CTTCTTATGC TGGCTTTGGA  1680
TCGGAATTC                                                          1689
```

INFORMATION FOR SEQ ID NO: 7: информация для последовательности 1д № 7

SEQUENCE CHARACTERISTICS: характеристики последовательности:

LENGTH: 2472 base pairs — длина: 2472 пары оснований
TYPE: nucleic acid — тип: нуклеиновая кислота
STRANDEDNESS: double — тип нитей: двунитевая
TOPOLOGY: linear — топология: линейная

SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 7: описание последовательности № 7

```
ACGGGTGTTC GGTTCCGTAT ATGGTCTCGA CCAGAGGCGA AACGAATGAC GGCATACGCT    60
TTGGATGCTG GCATCAGATG CCTGGAGTTC TATGAGAAGT TCTTTGACAT AAAATTCCCT   120
CTGGAAAAAC AAGATATGAT TGCTCTTCCT GATTTCACCG CTGGTGCCAT GGAAAACTGG   180
GGCCTTATCA CTTATAGAGA GGATTCTCTC CTATACGATG AAAAAATTTA TGCACCGATG   240
AATAAACAGC GGGTTGCTCT CGTAGTTGCT CACGAGCTTG CTCATCAGTG GTTCGGCAAT   300
CTGGTCACAC TGAAGTGGTG GGATGATACG TGGTTGAACG AAGGTTTTGC AACATTTGTT   360
GAGTATCTTG GAATGGACGA AATTAGCCAC AACAATTTCA GAACGCAAGA TTTCTTCTTG   420
CTCGATGGAA TGGATCGCGG AATGAGAGCT GACTCGGCAG CATCGAGCCA TCCGCTTTCG   480
TTTAGGATTG ACAAAGCGGC AGAAGTTGCC GAAGCCTTTG ACGATATTTC ATACGCCAAG   540
GGAGCGTCAG TTCTCACTAT GCTACGGGCT TTGATTGGAG AGGACAATTA CAGGAATGCT   600
GTTGTGCAAT ACCTCAAGAA GTTCTCCTAC AGCAATGCAC AAGCAGCCGA TCTGTGGAAC   660
GTCTTCAATG AAGTTGTCAA AGGTGTTAAG GGTCCTGACG GCAACGTCAT GAAAATCGAC   720
CAATTTACCG ATCAGTGGAC GTATCAGATG GGTTATCCTG TGGTTAAAGT AGAAGAATTT   780
AATGCGACCG CCCTAAAGGT TACGCAGAGC CGGTACAAGA CAAATAAAGA CGCCTTGGAA   840
```

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

CCAGAGAAAT ATCGTAATCC AAAATACGGG TTCAAGTGGG ATGTTCCCCT ATGGTATCAG 900
GAAGGCAATA GCAAAGAGGT GAAGCGAACA TGGCTAAAAA GAGATGAACC GCTGTACTTG 960
AACGTCAACA ATCGGGATAC ATCCCTTGTG GTGAACGCTG ATCGACATGG ATTTTATCGA 1020
CAAAACTATG ATGCCAACGG TTGGAAAAAG ATAATCAAGC AGCTCAAGAA AGATCACAAG 1080
GTCTTCGGTC CAAGGACAAG GAACGCTATC ATAAGCGATG CATTTGCTGC AGCTACGATT 1140
GACGCAATCG ACTATGAAAC TGTATTCGAA CTACTTGAAT ATGCCAAAAA TGAAGAGGAA 1200
TTCTTGCCTT GGAAGGAAGC TCTGTCCGGC ATGTTCGCAG TTTTAAAGTT CTTCGGTAAT 1260
GAGCCGGAGA CAAAACCAGC TAGAGCTTAC ATGATGAGCA TATTAGAACC GATGTATAAT 1320
AAGAGCAGCA TTGATTACAT CGTCAAGAAT TATTTGGATG ATACGTTATT CACAAAAATT 1380
AATACTCAAA AGGATATCAT TGATGCATAT TGTTCCCTTG GATCAAAGGA CTGTATAAAG 1440
CAATATAAGG ATATCTTCTA CGATGAGGTT ATGCCCAAGT GTAAGGCCGG GGAAGCAGCA 1500
ACCAAATGCG TTAAGGTTTC CGCTCCTCTT CGAGCCAATG TTTACTGTTA TGGTGTACAG 1560
GAAGGTGGTG AAGAAGCTTT TGAAAAGGTG ATGGGGCTGT ATCTAGCAGA AGATGTTCAA 1620
CTGGAGAAGG GTATCCTGTT CAAAGCCTTG GCATGCCACA AAGATGTTAC AGCTCTAAAA 1680
GAACTTCTTT TGCGAGCCCT GGACCGTAAA TCGTCGTTTG TGCGTCTTCA GGATGTCCCT 1740
ACCGCTTTCC GTGCTGTATC TGAAAACCCT GTGGGCGAAG AATTCATGTT CAATTTCCTA 1800
ATGGAGAGAT GGGAGGAAAT CACTGCGAGC TTGGAAACAG AACACAGAGC AGTTGATAAA 1860
GTGGTCGGCG CTTGTTGCAC AGGAATTCGC TCCCAACAAC AAATAGATCA GCTGAAGAAT 1920
CTACAGAAGA ACAATGCGCA GGCTAAGAAG TTCGGCTCAT TCACCCAGGA AATCGAAAAA 1980
GGAGAACATA AAATTGCCTG GATCAAGAAA CATTTTCACA GATTATCGGA ATTCTTCAAG 2040
AGAGCAAGAT CATAGCTTTT CACACTGAGC TCCAATTTTA ACGTCTTCAA ACTAGGAGAC 2100
AGTTTTGCTG AAAAGTCAGT TTCACATTTT CCGTTTGAAT GCCATCCATT CGAATACAAC 2160
CAATAATACC ATTTTAAGTA CCTTTCATTC ACAGTGATTA CTGAATTTCG AATATATCAT 2220
GAAGCTTGTA TCTTGAACGT TATGATCGGT GACTTTCAAT TTATAGAGCT CACTCTCCAT 2280
TTTGTAGCTG TGATGACTTG CATTTAAGAC CCACCATTTA CCAGCCTAGA ATCTTTCCCC 2340
AATACATTCC AAACTCCGAT CACCTCCACC GCTGACAATG CCCAGATTTG TTTTTTTGTC 2400
TGCTATCCAT CTAACTGTTT CGATCGCCGG TTGTTTGTCA ATTGCTTATC TGATAAATAT 2460
TGACGTTGGT GT 2472

INFORMATION FOR SEQ ID NO: 8: информация для последовательности 1Д № 8

SEQUENCE CHARACTERISTICS: характеристики последовательности:

LENGTH: 3305 base pairs длина: 3305 пар оснований
TYPE: nucleic acid тип: нуклеиновая кислота
STRANDEDNESS: double тип нитей: двунитевая
TOPOLOGY: linear топология: линейная

SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 8: описание последовательности № 8

GCTGAATCTA ACTCCAATCC GTCTTATTGT CGCATTATTT CTAGTAGCTG CTGCAGTCGG 60
CCTCTCTATT GGTCTCACCT ATTACTTTAC TCGCAAAGCG TTCGATACCT CAGAAAAGCC 120
AGGGAAGGAT GATACTGGTG GCAAGGACAA AGACAATTCT CCCTCTGCGG CGGAACTACT 180
CCTTCCAAGT AATATAAAAC CATTGTCTTA CGACTTGACG ATCAAAACAT ATCTACCTGG 240
TTATGTGGAC TTCCCACCGG AGAAAAACCT CACATTCGAT GGGCGTGTGG AAATATCAAT 300
GGTTGTAATT GAGCCAACAA AGAGTATCGT ACTCAATTCA AAGAAGATCT CTGTAATACC 360
CCAAGAATGT GAACTGGTAT CGGGCGATAA AAAACTCGAA ATTGAAAGTG TAAAGGAGCA 420
CCCAAGACTG GAAAAGGTTG AGTTTCTTAT CAAAAGCCAA CTGGAAAAAG ATCAACAAAT 480
CTTGCTCAAG GTCGGCTACA TCGGTCTCAT CAGCAACAGC TTTGGTGGAA TCTACCAGAC 540
CACTTATACC ACCCCGGATG GCACCCCTAA GATCGCTGCA GTTTCACAAA ATGAGCCCAT 600
AGATGCTCGT CGAATGGTAC CATGCATGGA TGAACCGAAA TACAAAGCAA ACTGGACCGT 660
TACTGTCATT CATCCAAAAG GCACCAAAGC CGTCTCGAAT GGAATCGAAG TGAACGGAGA 720
TGGAGAGATC AGTGGTGATT GGATCACATC GAAGTTCTTG ACTACTCCAC GGATGTCATC 780
CTACTTGTTG GCAGTTATGG TTTCAGAATT TGAATACATC GAAGGTGAAA CAAAGACGGG 840
TGTTCGGTTC CGTATATGGT CACGCCCAGA GGCAAAGAAG ATGACACAAT ATGCTCTGCA 900
ATCTGGTATC AAGTGCATAG AATTCTACGA AGATTTCTTT GATATCAGAT TCCCTCTGAA 960
GAAACAAGAT ATGATTGCCC TTCCTGATTT CTCTGCCGGT GCCATGGAGA ATTGGGGCCT 1020
CATCACTTAC AGGGAAAACT CTTTGTTGTA CGATGACAGA TTCTATGCAC CGATGAATAA 1080
ACAGCGAATT GCTCGCATTG TTGCTCATGA GCTTGCTCAT CAGTGGTTCG GCGACTTGGT 1140
TACGATGAAG TGGTGGGATA ATTTGTGGTT GAATGAAGGT TTTGCAAGAT TCACAGAATT 1200
TATTGGAGCT GGTCAGATAA CTCAAGATGA CGCCAGAATG AGGAACTACT TCCTGATTGA 1260
TGTACTTGAA CGCGCTTTGA AAGCTGATTC GGTAGCGTCA AGCCATCCAC TTTCCTTCAG 1320
AATCGACAAA GCTGCAGAAG TTGAAGAAGC CTTTGATGAT ATCACATACG CCAAAGGAGC 1380
TTCTGTTCTT ACTATGCTGA GAGCCTTGAT TGGAGAAGAA AAACATAAGC ATGCAGTATC 1440
GCAGTACCTC AAGAAGTTCT CGTATAGCAA TGCAGAAGCG ACTGATCTAT GGGCAGTTTT 1500
TGATGAAGTT GTCACTGACG TCGAAGGTCC AGACGGCAAA CCTATGAAAA CCACAGAGTT 1560

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

```
TGCAAGTCAG TGGACGACTC AGATGGGCTT CCCAGTTATT TCCGTAGCAG AGTTTAACTC   1620
GACTACTTTG AAATTAACGC AAAGTCGATA TGAGGCGAAT AAAGACGCTG TGGAGAAAGA   1680
GAAGTACCGT CACCCGAAAT ACGGATTTAA ATGGGATATT CCACTGTGGT ATCAGGAAGG   1740
CGATAAGAAG GAGATAAAGC GAACATGGTT GAGAAGAGAT GAACCGCTTT ACTTGCATGT   1800
TAGTGATGCT GGCGCTCCCT TTGTGGTGAA CGCAGACCGC TATGGATTTT ATCGACAAAA   1860
TCATGACGCT AATGGTTGGA AAAAGATAAT CAAGCAGCTC AAGGATAATC ATGAGGTTTA   1920
CAGTCCCCGG ACAAGGAATG TCATCATTAG CGATGCGTTT GCTGCGGCTG CAACTGACGC   1980
AATTGAGTAT GAGACTGTAT TTGAACTTCT GAATTATGCC GAAAAAGAAA CGGAATATCT   2040
ACCATTAGAA ATCGCAATGT CCGGGATCTC TTCGATTTTG AAATACTTCC CTACCGAGCC   2100
AGAGGCAAAG CCAGCTCAAA CATACATGAT GAACATATTG AAACCGATGT ATGAAAAAAG   2160
CAGTATCGAC TTCATTGCCA ATAACTACAG AAATGACAAG CTGTTTTTCC AAATCAACCT   2220
CCAAAAAGAT GTCATTGATA TGTTCTGCGC CCTCGGATCG CAAGACTGCA GGAAGAAATA   2280
TAAAAAACTT TTCGATGACG AAGTCATGAA CAAATGCAGG GATGGTCAAG CAGCAACCGA   2340
ATGCGTAAGA ATCGCCGCTC CTCTCCGATC AAGTGTTTAT TGTTATGGTG TGAAGGAAGG   2400
CGGTGATTAT GCTTCCGACA AGGTGATGGA GCTTTATACG GCCGAAACAC TCGCCCTAGA   2460
AAAAGACTTC CTACGCCTAG CATTGGGATG TCATAAAGAT GTTACTGCTT TGAAAGGACT   2520
TCTCTTGCGG GCTCTGGACA GGAATTCGTC GTTCGTACGT ATGCAGGATA TCCCAAGTGC   2580
TTTCAACGAT GTAGCAGCAA ATCCTATTGG CGAAGAATTC ATTTTCAATT TCCTTATTGA   2640
GAGATGGCCA GATATCATTG AAAGTATAGG AACGAAGCAC ACATATGTTG AGAAAGTGAT   2700
ACCAGCCTGC ACTTCAGGAA TCCGCTCACA ACAGCAGATT GACCAGCTGA AGAATCTGCA   2760
GAAAAATGGC ATGAACGCTC GTCAATTCGG TGCATTCGAT AAAGCAATCG AACGAGCACA   2820
AAATAGGGTG GATTGGATTA AAAAACATTT CCAAAAATTA GCGGCTTTCT TCAAGAAAGC   2880
CACCTTGTAA TTCGAATTAC ATTGCCAGTA ATCCAGATCT TAAAGTTCAT GAAGGAATAT   2940
GACAGGGAAC TGACTGTCTG TTGGTCACTG TTCCACTGAA TGGAAGTTTT TACCTACAAA   3000
AATTTTTATC GTTATATTTG CCTTCCGTGA GGGGTCATTG TTGTCACTTG AATAGTAAAC   3060
AAAGCTCAGT ATTGGCAACC GTAGAACAAT ATTACTTTCG CTTCATCAAA TTGTTATCTT   3120
CCCTATACCC TCTTCCTAAC TGAATTCGGA AATTTGTTCA TATTCGTTTG TAGTCTGTTG   3180
CTCAGAACAC TTTCTCCTCA ATAGCTTCTT GTTTGTTTTT TTTTTGATTG TATTGATCGT   3240
TTTACAATTG TATAGATTAG TTATCTTATA AATATTGATG GTTAAAAAAA AAAAAAAAAA   3300
AAAAA                                                               3305
```

INFORMATION FOR SEQ ID NO: 9: информация для последовательности 1Д № 9

SEQUENCE CHARACTERISTICS: характеристики последовательности:

LENGTH: 1301 base pairs длина 1301 пара оснований
TYPE: nucleic acid тип: нуклеиновая кислота
STRANDEDNESS: double тип нитей: двунитевая
TOPOLOGY: linear топология :линейная

SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 9: описание последовательности № 9

```
GGTTTAATTA CCCAAGTTTG AGATGACAGC AGAGGAGAGT CAGGAGCAGG AGACGCAGCA   60
ACCACGAAAA AATACAGTGC TACGGCTCAC CCCAATCAAG TCTCTCTTTG CTTTGTTAGT   120
GGTAGCTGCT GCCGTCGGCC TCTCAATCGG TCTCACCTAT TACTTTACAA GGAAAGCTTT   180
TGATACTACT GGCGGAAATG GAAAAGGGGA TCAACCTATT GTCGATGATA ATTCCCCATC   240
AGCTGAAGAA TTACGTCTCC CAACAACCAT AAAACCTTTG ACATACGACT TAGTAATCAA   300
AACGTATCTG CCAAACTATG TAAACTATCC ACCTCAGAAA GATTTCGCTA TTGATGGGAC   360
TGTGGTGATT GCTATGGAAG TTGTGGAGCC AACAAAGTCT ATTGTGCTCA ACTCGAAAAA   420
TATTCCTGTA ATTGCAGACC AGTGCGAACT GTTTTCTAAC AACCAAAAAC TCGACATCGA   480
AAAGGTTGTG GATCAGCCAA GGCTGGAGAA AGTCGAATTC GTTTTGAAGA AAAAGCTGGA   540
GAAGAATCAG AAAATCACGC TCAAGATTGT ATACATTGGC CTTATCAACG ACATGCTTGG   600
AGGACTTTAT CGAACAACCT ACACGGATAA AGATGGTACA ACCAAGATTG CTGCATGCAC   660
TCATATGGAA CCGACGGACG CCCGTCTTAT GGTCCCCTGT TTCGACGAGC CGACGTTTAA   720
GGCAAACTGG ACTGTGACTG TGATTCATCC GAAGGGCACC AGTGCCGTGT CGAATGGAAT   780
AGAAAAGGGA GAAGGAGAAG TCTCTGGCGA TTGGGTCACA ACCAGATTCG ATCCAACCCC   840
GCGAATGCCT TCGTATTTGA TTGCTCTTGT GATTTCCGAA TTTAAGTACA TTGAAAATTA   900
TACGAAAAGC GGTGTTCGAT TCCGAATATG GGCTCGTCCG GAAGCTATGA AGATGACAGA   960
ATATGCCATG GTAGCTGGAA TCAAATGCTT GGATTACTAT GAGGACTTCT TCGGGATCAA   1020
ATTCCCTCTT CCAAAACAAG ATATGGTTGC TCTTCCTGAC TTCTCATCTG GTGCTATGGA   1080
GAACTGGGGT CTCATCACAT ACAGGGAGGG TTCCGTACTA TACGATGAAA ACCTCTATGG   1140
ACCAATGAAT AAGGAGCGGG TTGCAGAAGT GATTGCACAC GAGCTTGCAC ATCAGTGGTT   1200
CGGTAATTTG GTCACGATGA AGTGGTGGGA TAACCTATGG CTAAACGAAG GATTCGCGTC   1260
ATTCGTAGAA TACATTGGAG CCGACTTCAT CAGCGATGGT C                        1301
```

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

INFORMATION FOR SEQ ID NO: 10: информация для последовательности 1д № 10

SEQUENCE CHARACTERISTICS: характеристики последовательности:

LENGTH: 1280 base pairs длина: 1280 пар оснований
TYPE: nucleic acid тип: нуклеиновая кислота
STRANDEDNESS: double тип нитей: двунитевая
TOPOLOGY: linear топология: линейная

SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 10:
описание последовательности № 10

```
GGTTTAATTA CCCAAGTTTG AGATGACGGC GGAGTGGCAG AAGCGTCGAA TCTTGGGCTT   60
CTCACCTATC AGCCTACTTT GTACATTATT TGTATTAGCT GCTGCCGTTG GACTCTCCAT  120
TGGTCTTACC TATTACTTCA CTCGTAAAGC ATTCGATACC ACACAAAAAG AACAGAAGGA  180
TGACAGTGGT GGTAAAGAAA AGGATAATTC TCCTTCTGCA GAAGAACTAC TTCTTCCAAC  240
GAACATAAAA CCAGTCTCGT ACGACTTGAA CATCAAAACA TATCTACCGG GTTACGTGAA  300
CTTTCCACCA GAAAAGAATC TCACATTTGA TGCCCATGTG GAGATTGCTA TGGTTGTGGT  360
TGAGCCTACA AATAGTATTG TGCTGAACTC GAAGAAAATC ACTTTGGCAC AAGGAGGATG  420
CGAACTGTTC TCAGGTAATC AGAAACTTGA CATCGAAAGT GTAAAGATGC AGGAAAGACT  480
TGACAAGCTT GAGATTACCC TCAAAAATCA GCTGCAAAAA GATCTGAAAA TCCTGCTCAA  540
GATCACTTAC ACCGGCCTTA TTAGCGACAC TCTCGGTGGG CTCTACCAGT CCATCTACAC  600
TGATAAGGAC GGAAAAACTA AGATCGTTGC TGTTTCACAA AATGAACCAT CAGACGCTCG  660
TCGTATAGCG CCATGCTTTG ACGAACCGAA GTACAAGGCA ACATGGACTG TCACCGTCGT  720
TCATCCCAAA GGTACAAAGG CTGCATCGAA CGGCATTGAA GCAAATGGAA AAGGGGAGCT  780
CAAGGGTGAT TGGATAACGT CTAAATTTAA AACTACCCCA CCGATGTCGT CCTATTTATT  840
GGCTATTATT GTTTGTGAAT TTGAATACAT TGAAGGATTT ACAAAAACAG GTGTACGGTT  900
CCGTATATGG TCTCGACCAG AGGCGATGGC AATGACGGGA TATGCCCTGG ATGCTGGCAT  960
CAGATGTCTG GAGTTCTATG AGAGATTCTT TGACATCAAA TTCCCTCTGG AAAAACAAGA 1020
TATGATTGCT CTACCTGATT TCACCGCTGG TGCTATGGAA AACTGGGGTC TTATCACTTA 1080
CAGAGAGGAT TCTCTTCTAT ACGATGAGAA AATTTATGCG CCGATGAATA AGCAGCGGGT 1140
TGCTCTCGTA GTTGCACACG AGCTTGCTCA TCAGTGGTTC GGCAATCTGG TCACATTGAA 1200
GTGGTGGGAT GATACGTGGT TGAACGAAGG TTTTGCGACA TTTGTTGAAT ATCTTGGAAT 1260
GGACGAAATT AGCCACAACA                                              1280
```

INFORMATION FOR SEQ ID NO: 11: информация для последовательности 1д № 11

SEQUENCE CHARACTERISTICS: характеристики последовательности:
LENGTH: 1293 base pairs длина: 1293 пары оснований
TYPE: nucleic acid тип: нуклеиновая кислота
STRANDEDNESS: double тип нитей: двунитевая
TOPOLOGY: linear топология: линейная

SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 11:
описание последовательности № 11

```
GGTTTAATTA CCCAAGTTTG AGGGTCTCCA TCTAGATGAC GTCGCAGGGG AGAACGCGGA   60
CATTGCTGAA TCTAACTCCA ATCCGTCTTA TTGTCGCATT ATTTCTAGTA GCTGCTGCAG  120
TCGGCCTCTC TATTGGTCTC ACCTATTACT TTACTCGCAA AGCGTTCGAT ACCTCAGAAA  180
AGCCAGGGAA GGATGATACT GGTGGCAAGG ACAAAGACAA TTCTCCCTCT GCGGCGGAAC  240
TACTCCTTCC AAGTAATATA AAACCATTGT CTTACGACTT GACGATCAAA ACATATCTAC  300
CTGGTTATGT GGACTTCCCA CCGGAGAAAA ACCTCACATT CGATGGGCGT GTGGAAATAT  360
CAATGGTTGT AATTGAGCCA ACAAAGAGTA TCGTACTCAA TTCAAAGAAG ATCTCTGTAA  420
TACCCCAAGA ATGTGAACTG GTATCGGGCG ATAAAAAACT CGAAATTGAA AGTGTAAAGG  480
AGCACCCAAG ACTGGAAAAG GTTGAGTTTC TTATCAAAAG CCAACTGGAA AAAGATCAAC  540
AAATCTTGCT CAAGGTCGGC TACATCGGTC TCATCAGCAA CAGCCTTGGT GGAATCTACC  600
AGACCACTTA TACCACCCCG GATGGCACCC CTAAGATCGC TGCAGTTTCA CAAAATGAGC  660
CCATAGATGC TCGTCGAATG GTACCATGCA TGGATGAACC GAAATACAAA GCAAACTGGA  720
CCGTTACTGT CATTCATCCA AAAGGCACCA AAGCCGTCTC GAATGGAATC GAAGTGAACG  780
GAGATGGAGA GATCAGTGGT GATTGGATCA CATCGAAGTT CTTGACTACT CCACGGATGT  840
CATCCTACTT GTTGGCAGTT ATGGTTTCAG AATTTGAATA CATCGAAGGT GAAACAAAGA  900
CGGGTGTTCG GTTCCGTATA TGGTCACGCC CAGAGGCAAA GAAGATGACA CAATATGCTC  960
TGCAATCTGG TATCAAGTGC ATAGAATTCT ACGAAGATTT CTTTGATATC AGATTCCCTC 1020
TGAAGAAACA AGATATGATT GCCCTTCCTG ATTTCTCTGC CGGTGCCATG GAGAATTGGG 1080
GCCTCATCAC TTACAGGGAA AACTCTTTGT TGTACGATGA CAGATTCTAT GCACCGATGA 1140
ATAAACAGCG AATTGCTCGC ATTGTTGCTC ATGAGCTTGC TCATCAGTGG TTCGGCGACT 1200
TGGTTACGAT GAAGTGGTGG GATAATTTGT GGTTGAATGA AGGTTTTGCA AGATTCACAG 1260
AATTCACTGG AGCTGGTCAG ATAACTCAAG ATG                               1293
```

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

INFORMATION FOR SEQ ID NO: 12: информация для последовательности 1Д № 12

SEQUENCE CHARACTERISTICS: характеристики последовательности:

LENGTH: 746 base pairs длина: 746 пар оснований
TYPE: nucleic acid тип: нуклеиновая кислота
STRANDEDNESS: double тип нитей: двунитевая
TOPOLOGY: linear топология: линейная

SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 12: описание последовательности № 12

```
CTTGAAGAAA TGAAAAAGCT TTTTGACAAG GAGGTCATGA AATGTCAACC TGGTCAGCAA   60
GCGACCGACT GCGCGAAGGT AACTGCTCCT CTCCGAAAAA CTGTTTACTG CTATGGGGTC  120
CAGGAAGGCG GTGATGAGGC ATTCGACAAG GTGATGGAAC TATATAATGC GGAACAAGTC  180
CAGTTGGAGA AAGACAGTCT ACGTGAAGCA TTGGGATGTC ATAAAGACGT TACTGCTCTA  240
AAGGGACTTC TTATGCTGGC GTTGGATCGG AATTCGTCAT TTGTGCGTCT TCAAGATGCT  300
CATGATGTGT TTAACATTGT ATCCAGAAAT CCTGTTGGAA ACGAACTGCT GTTCAATTTC  360
CTCACAGAGC GATGGGAAGA GATACTTGAA AGTTTGTCAA TACGACACAG ATCAGTTGAT  420
CGAGTGATCA AAGCCTGTAC TCGAGGACTA CGATCCAGGG AACAAGTACA ACAGTTGAAG  480
AATCTATACA AAAATGACAA GCGTGCTCGC GAATACGGTG CATTTGGTGG GGCAATAGAA  540
AGATCGGAAC ACAGAGTCAA ATGGATTGAG AAACATTTCC GAAAACTAGC AGCTTTCTTC  600
AAAAAATCTA ATTCATAATT CTGAAATGGC TATAACTAGC ACACTGGATA GTTGTCTCGA  660
ATCATCCAAA AAGATTAATG ATGTTTTTTT ACTAGATAAT ATGGAGATAT TCTGTAAATT  720
TGTCATCGAT TCAAGTGTCT GTATTG                                       746
```

INFORMATION FOR SEQ ID NO: 13: информация для последовательности 1Д № 13

SEQUENCE CHARACTERISTICS: характеристики последовательности:

LENGTH: 1274 base pairs длина: 1274 пары оснований
TYPE: nucleic acid тип: нуклеиновая кислота
STRANDEDNESS: double тип нитей: двунитевая
TOPOLOGY: linear топология: линейная

SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 13: описание последовательности № 13

```
TCTTGAAGAA ATGAAAAAGC TTTTCGACGA AGAGGTCATG AAAAAATGTA GACCTGGTCA   60
GCAAGCGACC GACTGCGTAA AGGTAACTGC TCCTCTCCGA AAAACTGTTT ACTGCTATGG  120
GGTCCAGGAA GGCGGTGATG AGGCATTCGA CAAGGTGATG GAACTATATA ATGCGGAACA  180
AGTCCAATTG GAGAAAGACA GTCTACGTGA AGCATTGGGA TGTCATAAAG ACGTTACTGC  240
TCTAAAGGGA CTTCTTATGC TGGCTTTGGA TCGGAATTCG TCATTTGTGC GTCTTCAAGA  300
TGCTCATGAT GTGTTTAACA TTGTATCCAG AAATCCTGTT GGAAACGAAC TGCTGTTCAA  360
TTTCCTCACA GAGCGATGGG AAGAGATACT TGAAAGTTTG TCAATACGAC ACAGATCAGT  420
TGATCGAGTG ATCAAAGCCT GTACTCGAGG ACTACGATCC AGGGAACAAG TACAACAGTT  480
GAAGAATCTA TACAAAAATG ACAAGCGTGC TCGCGAATAC GGTGCATTTG GTGGGGCAAT  540
AGAAAGATCG GAACACAGAG TCAAATGGAT TGAGAAACAT TTCCGAAAAC TAGCAGCTTT  600
CTTCAAAAAA TCTAATTCAT AATTCTGAAA TGGCTATAAC TAGCACACTG GATAGTTGTC  660
TCGAATCATC CAAAAAGATT AATGATGTTT TTTTACTAGA TAATATGGAG ATATTCTGTA  720
AATTTGTCAT CGATTCAAGT GTCTGTATTG CAGCCACATT ACATATCTCG ATGGTTCTGT  780
GAATTTTTGA TGGAATTATT TTCTCCTCAA AATAGACACT ATGCGCTAAC TCCCATTATT  840
ACCAATCTTT GAGAGAAATC TTTTGCAATA TACCCTAAAT AGCCCTTGGG AACTAGCTTT  900
TTTCATTATT GTAATTTTTG TACTCTTCAA ATGACGTATT TCCAACATGA CACATTCTCA  960
GTGATTTACT CGAGTAATTT TATTCTTCTC AATTGCAGTG CCTTATTGTT ATTCGCTTTG 1020
AGACTTTGTA GCTCAACTGT TTTCTGCCCT GCTGTCTTCT TCTCTTTATC TACTACTTCA 1080
GTGATGAACT TACCTGAAGT TGTAGGTTTT AAGAAAGAAA TAACTATTTT CCATAACTCA 1140
TCTTCATGCC ATTGTTCTTT GGACTTTCTC ATGCTTCACA TTGTAGAGAT ATTTACTAAA 1200
AATGGAATTC TAATTTTCGT TTACTTACAT AAAAATCACT TATTGCCTAA AAAAAAAAAA 1260
AAAAAAAAAA AAAA                                                    1274
```

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

INFORMATION FOR SEQ ID NO: 14: информация для последовательности 1д № 14

SEQUENCE CHARACTERISTICS: характеристики последовательности:

LENGTH: 3296 base pairs — длина: 3296 пар оснований
TYPE: nucleic acid — тип: нуклеиновая кислота
STRANDEDNESS: double — тип нитей: двунитевая
TOPOLOGY: linear — топология: линейная

SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 14: описание последовательности 1д № 14

```
GCTGAATCTA ACTCCAATCC GTCTAATTTT TGCATTATTT CTAGTAGCTG CTGCAGTCGG    60
CCTCTCTATT GGTCTCACCT ATTACTTTAC TCGCAAAGCG TTCGATACCT CAGAAAAGCC   120
AGGGAAGGAT GATACTGGTG GCAAGGGCAA AGACAATTCT CCCTCTGCGG CGGAACTACT   180
TCTTCCAACC AATATAAAAC CATTGTCTTA CGATTTGACG ATCAAAACAT ATCTACCTGG   240
TTATGTGAAC TTCCCACCGG AGAAGAATCT CACATTCGAT GGGCGTGTGG AAATATCAAT   300
GGTTGTAATT GAGCCAACAA AGAGTATCGT GCTCAATTCA AAGAAGATCT CTGTGATACC   360
CCAAGAATGT GAACTGGTAT CGGGCGATAA AAAACACGAA ATTGAAAGTG TAAAGGAGCA   420
CCCAAGACTG GAAAAGGTCG AGTTTCTTCT TAAGAACCAA CTGGAAAAAG ATCAACAAAT   480
CTTGCTCAAG GTCGGCTATA TCGGCCTCAT CAGCAACAGT CTTGGAGGAA TCTACCAGAC   540
CACTTACACC ACCCCGAATG GCACCCCTAA GATCGCTGCA GTTTCACAAA ATGAGCCCAT   600
AGATGCTCGT CGAATGGTAC CATGCATGGA CGAACCGAAA TACAAAGCAA ACTGGACCGT   660
TACTGTCATT CATCCAAAAG GCACCAAAGC CGTCTCGAAT GGAATCGAAG TGAACGGAGA   720
TGGAGAGATC AGTGGTGATT GGATCACATC GAAGTTCTTG ACTACTCCAC GGATGTCATC   780
CTACTTGTTG GCAGTTATGG TTTCAGAATT TGAATACATT GAAGGTGAAA CAAGGACGGG   840
TGTCCGGTTC CGCATATGGT CACGCCCAGA GGCCAAGAAG ATGACAAAAC TTGCTTTGGA   900
TTATGGTATC AAATGCATAG AGTTCTACGA AGATTTCTTT GATATCAAAT TCCCTCTGAA   960
AAAACAAGAT ATGATCGCCC TTCCTGATTT CTCAGCAGGA GCCATGGAGA ACTGGGGTCT  1020
TATCACTTAC AGGGAAAACT CTTTGTTGTA CGATGACAGA TTCTATGCAC CGATGAATAA  1080
ACAGCGAATT GCTCGCATTG TTGCTCATGA GCTTGCCCAT CAGTGGTTTG GGGACTTGGT  1140
TACAATGAAG TGGTGGGATA ATCTGTGGTT GAATGAAGGT TTTGCAAGAT TCACGGAATT  1200
CATTGGAGCT GGTCAGATAA CTAAAGATGA CGCCAGAATG AGGAACTACT TTCTGATTGA  1260
TGTACTTGAA CGCGCTTTGA AAGCTGATTC GGTAGCGTCA AGCCATCCAC TTTCCTTCAG  1320
AATCGACAAA GCTGCAGAAG TTGAAGAAGC CTTTGATGAT ATCACATACG CCAAAGGAGC  1380
TTCTGTTCTT ACTATGTTGA GAGCCTTGAT TGGAGAAGAA AAACATAAGC ATGCAGTATC  1440
GCAGTACCTC AAGAAGTTCT CGTATAGCAA TGCAGAAGCG ACTGATCTAT GGGCAGTTTT  1500
CGATGAAGTT GTCACTGACG TCGAAGGTCC AGACGGCAAA CCTATGAAAA CCACGGAATT  1560
TGCAAGTCAG TGGACGACTC AGATGGGCTT CCCAGTTATT TCCGTAGCAG AGTTTAACTC  1620
GACTACTTTG AAATTAACGC AAAGTCGATA TAAGGCGAAT AAAGACGCTG TGGAGAAAGA  1680
GAAGTACCGT CATCCGAAAT ACGGATTTAA ATGGGATATT CCATTGTGGT ATCAGGAAGG  1740
CGATAAGAAG GAGATAAAGC GAACATGGCT GAGAAGAGAT GAACCGCTTT ACTTGCATGT  1800
TAGTAATCCT GGTGCTCCAT TTGTGGTGAA CGCAGACCGC TATGGATTTT ATCGACAAAA  1860
TCATGACGCT AATGGTTGGA AAAAGATAAT CAAGCAGCTC AAGGACAATC ATGAGGTTTA  1920
TAGTCCTCGG ACAAGGAATG TCATCATTAG CGATGCGTTT GCTGCAGCCG CAACTGACGC  1980
AATTGAGTAT GAGACTGTTT TTGAACTTCT GAAATATGCC GAAAAAGAAA CGGAATACCT  2040
ACCGTTGGAA ATAGCAATGT CCGGGATCTC TTCGATTTTG AAGTACTTCG GTACCGAGCC  2100
GGAAGCAAAG CCAGCTCAAG TGTACATGAT GAACATATTG AAGCCGATGT ATGAAAAAAG  2160
CAGTATCGAG TTCATTACCA ATAACTACAG AAACGACACG CTGTTTTTCC AAATCAACCT  2220
CCAAAAGGAT GTCGTTGATA TGTTCTGCGC CCTTCGATCG CAAGACTGCA GGCAGAAATA  2280
TAAAAAACTT TTCGATGACG AAGTCATGGC GAAATGCAGG GATGGTCAAG CAGCAACCGA  2340
ATGCGTGAGA ATCGCCGCTC CTCTCCGATC AAGTGTTTAT TGTTATGGTG TGAAGGAAGG  2400
CGGTGATTAT GCTTTCGACA AGGTGATGGA GCTTTATACG GCCGAAACAC TTGCCCTAGA  2460
AAAAGACTTC CTACGCCTAG CATTAGGATG TCACAAAGAT GTTACTGCTT TGAAAGGACT  2520
TCTCTTGCGG GCTCTGGACA GGAATTCGTC ATTCGTACGT ATGCAGGATA TCCCAAGTGC  2580
TTTCAACGAT GTAGCAGCAA ATCCTATTGG CGAAGAATTC ATTTTCAATT TCCTCATTGA  2640
GAGATGGCCA GATATCATTG AAAGTATAGG AACGAAGCAC ACATATGTTG AGAAAGTGAT  2700
ACCAGCCTGC ACTTCAGGAA TCCGCTCACA ACAGCAGATT GACCAGCTGA AGAATCTGCA  2760
GAAAAATGGC ATAAATGCTC GTCAATTTGG TGCATTCGAT AAAGCAATCG AACGAGCACA  2820
AAATAGGGTG GATTGGATTA AAAAACATTT CCAAAAATTA GCGGCTTTCT TCAAGAAAGC  2880
CACCTTGTAG TTTGAATTAC GTCGCCATTA ATCCAGATCT TAAAGCTCGC TAAGGAATAT  2940
GTGGGAACTG ACTGTGTGTT GGTTACTGTT CCACTGAATG GAAGTTTTTA CCCACAAAAA  3000
TTTTTACCAT TTGCCTTCCA TGAGGGGTCA TTGTTGTCAC TTGAATAGTA AACAAAGCTC  3060
AGTATTAGGA CCCAGTGATC AATATTACTT TTGCTTCATC AAATTGTTAC CTTCTCTATA  3120
CCCTCTTCCT ACCTGAATTC AGAAATTTGT TCATATTCGT TTGTAGTCTG TTGCTCAGAA  3180
CACTTTCTCC TCGATAGCTT TTTGTTTGTT TTTCTTTTGA TTGTATTGAT CGTTTTACAA  3240
TTGTATAGAT TAGTTATCTG ATAAATATTG ATGGCTAAAA AAAAAAAAAA AAAAAA      3296
```

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

INFORMATION FOR SEQ ID NO: 15: информация для последовательности 1Д № 15

SEQUENCE CHARACTERISTICS: характеристики последовательности:

LENGTH: 3319 base pairs длина: 3319 пар оснований
TYPE: nucleic acid тип: нуклеиновая кислота
STRANDEDNESS: double Тип нитей: двунитевая
TOPOLOGY: linear топология: линейная

SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 15: описание последовательности 1Д № 15

```
GCTGAATCTA ACTCCAATCC GTCTAATTTT TGCATTATTT CTAGTAGCCG CTGCAGTCGG    60
CCTCTCTATT GGTCTCACCT ATTACTTTAC TCGCAAAGCG TTCGATACCT CAGAAAAGCC   120
AGGGAAAGAT GATACTGGTG GTAAAGACAA AGATAATTCT CCCTCTGCGG CGGAACTACT   180
TCTTCCAACC AACATAAAAC CATTGTCTTA CGATTTGACA ATCAAAACAT ATCTACCTGG   240
TTATGTGAAC TTCCCACCGG AGAAGAATCT CACATTTGAT GGGCGTGTCG AAATTTCAAC   300
GGTTGTCATT GAGCCAACAA AGAGTATCGT GCTCAATTCA AAGAAGATCT CAGTAATACC   360
CCCTGAATGT GAACTGGTAT CGGGCGGTAA AAAACTCGAA ATCGAAAATG TAAAGGATCA   420
CCCAAGACTG GAAAAGGTTG AGTTTCTTCT TAAGAACCAA CTGGAAAAAG ATCAACAAAT   480
CTTGCTCAAG GTTGCCTACA TCGGCCTCAT CAGCAACAGC CTTGGCGGAA TCTACCAGAC   540
CACTTACACA ACCCCGGATG GCACCCCCAA GATCGCTACA GTGTCACAAA ATGAGCCCAT   600
AGATGCTCGT CGGATGGTGC CATGCATGGA TGAACCGAAA TACAAAGCGA ATTGGACCGT   660
TACTGTCATT CATCCAAAAG GTACAAAAGC CGTCTCGAAT GGCATCGAAA CGAACGGAGA   720
TGGAGAGATC AGTGGTGATT GGATTACGTC GAAGTTCTTG ACTACTCCGA GGATGTCATC   780
CTACTTGTTG GCAGTTATGG TATCAGAATT TGAATTTATC GAGGGTAAAA CAAAGACAGA   840
TGTTCGGTTC CGTATATGGT CACGCCCAGA GGCCAAGAAG ATGACAAAAC TTGCTTTGGA   900
TTATGGTATC AAATGCATAG AGTTCTACGA AGATTTCTTT GATATCAGAT TCCCCTTAAA   960
GAAACAAGAT ATGATCGCCC TTCCTGATTT CTCAGCAGGA GCCATGGAGA ACTGGGGTCT  1020
TATCACTTAC AGGGAAAACC CTTTGTTGTA CGATGACAGA TTCTATGCAC CGATGAATAA  1080
ACAGCGAATT GCTCGCATTG TTGCTCATGA GCTTGCCCAT CAGTGGTTTG GCGACTTGGT  1140
TACGATGAAG TGGTGGGATA ATCTGTGGTT GAATGAAGGT TTTGCAAGAT TCACAGAATT  1200
CATTGGAGCT GGTAAGATAA CTGAAGATGA CGCCAGAATG AGGAACTACT TCCTGATTGA  1260
TGTACTTGAA CGCGCGTTGA AAGCTGATTC CGTAGCGTCA AGCCATCCAC TTTCCTTCAG  1320
AATCGACAAA GCTGCAGAAG TTGAAGAAGC GTTTGATGAT ATCACATACG CCAAAGGAGC  1380
TTCTGTTCTT ACGATGCTGA GAGCGTTGAT CGGAGAAGAA AAACATAAGC ATGCGGTATC  1440
GCAGTATCTC AAGAAGTTCT CGTATAGCAA TGCAGAAGCG ACTGATCTAT GGGCAGTTTT  1500
CGATGAAGTT GTCACTGATG TCGAGGGTCC AGACGGCAAA CCTATGAAAA CCACGGAATT  1560
CGCAAGTCAG TGGACAACTC AGATGGGCTT TCCAGTAATT TCTGTGGCAG AGTTTAACTC  1620
GACTACTCTG AAACTAACGC AAAGTCGATA TAAGGCGAAT AAGGACGCTG TTGAGAAAGA  1680
GAAATACCGT CATCCGAAAT ACGGATTCAA GTGGGATATT CCATTGTGGT ATCAGGAAGG  1740
CGATAAGAAG GAGGTAAAGC GAGCATGGTT AAGAAGAGGT GAACCGCTTT ACTTGCATGT  1800
GAGTGATCCT GGCGCTCCAT TTGTGGTGAA TGCGGACCGC TATGGATTTT ACCGACAAAA  1860
CCACGACACT AATGGTTGGA AAAAGATAAT CAAGCAGCTC AAGGATAATC ATGAGGTTTA  1920
CAGTCCCCGG ACAAGGAATG CCATCATTAG CGATGCGTTT GCTGCGGCTG CAACTGACGC  1980
GATTGAGTAC GAGACTGTAT TCGAACTTCT GAAATATGCC GAAAAAGAAA CGGAATACCT  2040
ACCGTTGGAA ATAGCAATGT CTGGAATCTC TTCGATTTTG AAGTACTTCG GTACCGAGCC  2100
CGAGGCAAAG CCAGCTCAAA CATACATGAT GAACATATTG AAGCCGATGT ATGAGAAAAG  2160
CGATATCGAC TTCATTGCCA AAAACTACAA GGACGACAAG CTGTTTTTCC AAATCAACCT  2220
CCAAAAAGAT GTCATTGATA TGTTCTGCGC CCTTGGATCG CAAGACTGCA GGAAGAAATA  2280
TAAAAAACTT TTCGATGACA AAGTCATGGC GAAATGCAGG GATGGCCAAG CAGCAACCGA  2340
ATGCGTGAAA ATCGCCGCTC CTCTCCGATC AAGTGTTTAT TGTTATGGTG TGAAGGAAGG  2400
CGGTGATTAT GCTTTCGACA AGGTGATGGA GCTTTATACG GCCGAAACAC TCGCCCTAGA  2460
AAAAGACTTC CTACGCCTAG CATTAGGATG TCACAAAGAT GTTACCGCTT TGAAAGGACT  2520
TCTCCTGCGG GCTCTGGACA GGAATTCGTC GTTCGTACGA ATGCAGGATA TCCCAAGTGC  2580
TTTCAACGAT GTAGCAGCAA ATCCTATTGG CGAAGAATTC ATTTTCAATT TCCTTATTGA  2640
GAGATGGCCA GATATCGTTG AAAGTATAGG AACGAAACAC ACATATGTTG AAAAAGTGAT  2700
ACCAGCTTGC ACTTCAGGAA TCCGCTCACA ACAACAGATT GACCAGCTGA AGAATCTGCA  2760
GAAAAATGGC ATAAACGCTC GTCAATTTGG TGCATTCGAT AAAGCGATCG AACGAGCACA  2820
AAATAGGGTG GATTGGATTA AAAAACATTT CCAAAAATTA GCGGCTTTCT TCAAGAAAGC  2880
CACCTTGTAA TTCGTATTAC ATCACCATGA ATCCAGATCT TAAAACTCAC TAAGGAATGT  2940
GTGGGAACTG ACTGTCTGTT GCTTACTGTT CCACTGAATG GAAGTTTTTA CCCATAAAAA  3000
TTTTTACCAT TTGCCTTCCG TGAGGGGTCA TTGTTGTCAC TTGAATAGTA AACAAAGCTC  3060
AGTATTGGAC CCAGTGATCA ATATTACTTT CGCTTCATCG AATTGTTACC TTCTCTATAC  3120
CCTCGTCCTA CCTGAATTCA CACATTTGTT CATATTTGTT TGTAGTCTGT TGCTCAGAAC  3180
ACTTTCTCTT CGATAGCTTT TTGTTTGTTT TTCTTTTGAT TGTATTGATC GTTTTACAAT  3240
TGTATAGATT AGTTATCTGA TAAATATTGA TGGCTAAGGA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA  3300
AAAAAAAAAA AAAAAAAAA                                               3319
```

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

INFORMATION FOR SEQ ID NO: 16: информация для последовательности 1д № 16:

SEQUENCE CHARACTERISTICS: характеристики последовательности:

LENGTH: 30 amino acids длина: 30 аминокислот
TYPE: peptide тип: пептид

SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 16: описание последовательности № 16

Asp Asn Ser Pro Ser Ala Glu Glu Leu Leu Leu Pro Thr Asn Ile
1 5 10 15

Lys Pro Val Ser Tyr Asp Leu Lys Ile Ala Thr Tyr Leu Pro Gly
20 25 30

INFORMATION FOR SEQ ID NO: 17: информация для последовательности 1д № 17

SEQUENCE CHARACTERISTICS: характеристики последовательности

LENGTH: 15 amino acids длина: 15 аминокислот
TYPE: peptide Тип: пептид

SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 17: описание последовательности № 17

Leu Tyr Leu Ala Glu Asp Val Gln Leu Xaa Lys Gly Ile Leu Phe
1 5 10 15

INFORMATION FOR SEQ ID NO: 18: информация для последовательности 1д № 18

SEQUENCE CHARACTERISTICS: характеристики последовательности:

LENGTH: 15 amino acids длина: 15 аминокислот
TYPE: peptide тип: пептид

SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 18: описание последовательности № 18

Leu Ala Tyr Asp Glu Lys Ser Tyr Ala Pro Asp Asn Lys Gln Tyr
1 5 10 15

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

INFORMATION FOR SEQ ID NO: 19: информация для последовательности 1д № 19

SEQUENCE CHARACTERISTICS: характеристики последовательности:

LENGTH: 3084 base pairs — длина: 3084 пары оснований
TYPE: nucleic acid — Тип: нуклеиновая кислота
STRANDEDNESS: double — тип нитей : двунитевая
TOPOLOGY: linear — топология: линейная

SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 19: описание последовательности № 19

```
GGTTTAATTA CCCAAGTTTG AGATGACAGC AGAGGAGAGT CAGGAGCAGG AGACGCAGCA    60
ACCACGAAAA AATACAGTGC TACGGCTCAC CCCAATCAAG TCTCTCTTTG CTTTGTTAGT   120
GGTAGCTGCT GCCGTCGGCC TCTCAATCGG TCTCACCTAT TACTTTACAA GGAAAGCTTT   180
TGATACTACT GGCGGAAATG GAAAAGGGGA TCAACCTATT GTCGATGATA ATTCCCCATC   240
AGCTGAAGAA TTACGTCTCC CAACAACCAT AAAACCTTTG ACATACGACT TAGTAATCAA   300
AACGTATCTG CCAAACTATG TAAACTATCC ACCTGAGAAA GATTTCGCTA TTGATGGGAC   360
TGTGGTGATT GCTATGGAAG TTGTGGAGCC AACAAAGTCT ATTGTGCTCA ACTCGAAAAA   420
TATTCCTGTA ATTGCAGACC AGTGCGAACT GTTTTCTAAC AACCAAAAAC TCGACATCGA   480
AAAGGTTGTG GATCAGCCAA GGCTGGAGAA AGTCGAATTC GTTTTGAAGA AAAAGCTGGA   540
GAAGAATCAG AAAATCACGC TCAAGATTGT ATACATTGGC CTTATCAACG ACATGCTTGG   600
AGGACTTTAT CGAACAACCT ACACGGATAA AGATGGTACA ACCAAGATTG CTGCATGCAC   660
TCATATGGAA CCGACGGACG CCCGTCTTAT GGTCCCCTGT TTCGACGAGC CGACGTTTAA   720
GGCAAACTGG ACTGTGACTG TGATTCATCC GAAGGGCACC AGTGCCGTGT CGAATGGAAT   780
AGAAAAGGGA GAAGGAGAAG TCTCTGGCGA TTGGGTCACA ACCAGATTCG ATCCAACCCC   840
GCGAATGCCT TCGTATTTGA TTGCTCTTGT GATTTCCGAA TTTAAGTACA TTGAAAATTA   900
TACGAAAAGC GGTGTTCGAT TCCGAATTCC GGCTCGTCCG GAAGCTATGA AGATGACAGA   960
ATATGCCATG ATAGCTGGAA TCAAATGTTT GGATTACTAT GAGGACTTCT TCGGGATCAA  1020
ATTCCCACTT CCAAAACAAG ATATGGTTGC TCTTCCTGAC TTCTCATCTG GTGCTATGGA  1080
GAACTGGGGT CTCATCACAT ACAGGGAGGG TTCCGTGCTC TACGATGAAA ACCTCTACGG  1140
ACCAATGAAT AAGGAGCGGG TTGCAGAAGT GATCGCGCAC GAACTTGCAC ATCAGTGGTT  1200
CGGTAATTTG GTCACGATGA AGTGGTGGGA TAACCTATGG CTGAACGAAG GATTCGCGTC  1260
ATTCGTGGAA TACATCGGAG CCGACTTCAT CAGCGATGGT CTATGGGAAA TGAAAGATTT  1320
CTTCCTGCTG GCACCGTACA CAAGTGGTAT TACGGCTGAT GCAGTAGCTT CAAGCCATCC  1380
GCTTTCCTTC AGAATAGATA AGGCTGCAGA TGTATCAGAA GCGTTCGATG ATATCACATA  1440
CCGTAAAGGA GCATCCGTTC TTCAAATGCT ATTGAATTTA GTTGGGGACG AAAATTTCAA  1500
GCAGTCTGTT TCGCGTTACC TCAAGAAGTT TTCATATGAT AATGCGGCTG CTGAAGATTT  1560
ATGGGCAGCA TTCGACGAAA CCGTCCAAGG TATAACCGGA CCTAATGGTG GACCATTGAA  1620
AATGTCCGAG TTTGCGCCAC AATGGACAAC TCAGATGGGG TTCCCTGTTC TTACTGTCGA  1680
GTCGGTTAAC GCAACGACTT TGAAAGTCAC CCAAAAACGA TACAGGCAGA ACAAGGATGC  1740
AAAGGAACCA GAGAAGTACC GTCATCCAAC TTATGGGTTC AAATGGGATG TTCCTCTGTG  1800
GTATCAGGAA GATGAACAGC AAGTGAAAAG AACTTGGTTA AAAAGAGAGG AACCGCTCTA  1860
TTTCCATGTA AGCAATTCTG ATTCGTCAGT TGTGGTGAAT GCCGAACGTC GTGCTTTTTG  1920
CCGATCAAAC TATGACGCTA ACGGTTGGAG GAACATTATG AGAAGACTCA AGCAGAATCA  1980
TAAGGTCTAT GGTCCACGAA CAAGAAACGC TCTCATAAGT GATGCGTTTG CAGCAGCTGC  2040
AGTTGAGGAA ATGAATTACG AGACCGTATT TGAAATGCTC AAATACACCG TGAAAGAAGA  2100
GGATTACTTA CCATGGAAGG AGGCAATATC AGGATTCAAT ACAATTTTGG ACTTTTTCGG  2160
CAGCGAACCC GAATCTCAAT GGGCTTCGGA ATACATGCGA AAACTGATGA AGCCAATTTA  2220
TGACAAGAGT AGCATCAAGT TTATAGCGGA GAACTACAAA AAAGATTCGC TTTTCTTCAA  2280
AAATAATCTC CAAATAGCTG TTATTGACAC ATACTGTGGT CTTGGAGGCA AAGAATGTCT  2340
TGAAGAAATG AAAAAGCTTT TTGACAAGGA GGTCATGAAA TGTCAACCTG GTCAGCAAGC  2400
GACCGACTGC GTAAAGGTAA CTGCTCCTCT CCGAAAAACT GTTTACTGCT ATGGGGTCCA  2460
GGAAGGCGGT GATGAGGCAT TCGACAAGGT GATGGAACTA TATAATGCGG AACAAGTGCA  2520
GTTGGAGAAA GACAGTCTAC GTGAAGCATT GGGATGCCAT AAAGACGTTA CAGCTCTAAA  2580
GGGACTTCTT ATGCTGGCTT TGGATCGGAA TTCGTCATTT GTGCGTCTTC AAGATGCTCA  2640
TGATGTGTTT AACATTGTAT CCAGAAATCC TGTTGGAAAC GAACTGCTGT TCAATTTCCT  2700
CACAGAGCGA TGGGAAGAGA TACTTGAAAG TTTGTCAATA CGACACAGAT CAGTTGATCG  2760
AGTGATCAAA GCCTGTACTC GAGGACTACG ATCCAGGGAA CAAGTACAAC AGTTGAAGAA  2820
TCTATACAAA AATGACAAGC GTGCTCGCGA ATACGGTGCA TTTGGTGGGG CAATAGAAAG  2880
ATCGGAACAC AGAGTCAAAT GGATTGAGAA ACATTTCCGA AAACTAGCAG CTTTCTTCAA  2940
AAAATCTAAT TCATAATTCT GAAATGGCTA TAACTAGCAC ACTGGATAGT TGTCTCGAAT  3000
CATCCAAAAA GATTAATGAT GTTTTTTTAC TAGATAATAT GGAGATATTC TGTAAATTTG  3060
TCATCGATTC AAGTGTCTGT ATTG                                         3084
```

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

INFORMATION FOR SEQ ID NO: 20: информация для последовательности 1Д № 20

SEQUENCE CHARACTERISTICS: характеристика последовательности

LENGTH: 3358 base pairs — длина: 3358 пар оснований
TYPE: nucleic acid — тип: нуклеиновая кислота
STRANDEDNESS: double — тип нитей : двунитевая
TOPOLOGY: linear — топология: линейная

SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 20: описание последовательности 1Д № 20

```
GGTTTAATTA CCCAAGTTTG AGATGACGGC GGAGTGGCAG AAGCGTCGAA TCTTGGGCTT   60
CTCACCTATC AGCCTACTTT GTACATTATT TGTATTAGCT GCTGCCGTTG GACTCTCCAT  120
TGGTCTTACC TATTACTTCA CTCGTAAAGC ATTCGATACC ACACAAAAAG AACAGAAGGA  180
TGACAGTGGT GGTAAAGAAA AGGATAATTC TCCTTCTGCA GAAGAACTAC TTCTTCCAAC  240
GAACATAAAA CCAGTCTCGT ACGACTTGAA CATCAAAACA TATCTACCGG GTTACGTGAA  300
CTTTCCACCA GAAAAGAATC TCACATTTGA TGCCCATGTG GAGATTGCTA TGGTTGTGGT  360
TGAGCCTACA AATAGTATTG TGCTGAACTC GAAGAAAATC ACTTTGGCAC AAGGAGGATG  420
CGAACTGTTC TCAGGTAATC AGAAACTTGA CATCGAAAGT GTAAAGATGC AGGAAAGACT  480
TGACAAGCTT GAGATTACCC TCAAAAATCA GCTGCAAAAA GATCTGAAAA TCCTGCTCAA  540
GATCACTTAC ACCGGCCTTA TTAGCGACAC TCTCGGTGGG CTCTACCAGT CCATCTACAC  600
TGATAAGGAC GGAAAAACTA AGATCGTTGC TGTTTCACAA AATGAACCAT CAGACGCTCG  660
TCGTATAGCG CCATGCTTTG ACGAACCGAA GTACAAGGCA ACATGGACTG TCACCGTCGT  720
TCATCCCAAA GGTACAAAGG CTGCATCGAA CGGCATTGAA GCAAATGGAA AAGGGGAGCT  780
CAAGGGTGAT TGGATAACGT CTAAATTTAA AACTACCCCA CCGATGTCGT CCTATTTATT  840
GGCTATTATT GTTTGTGAAT TTGAATACAT TGAAGGATTT ACAAAAACGG GTGTTCGGTT  900
CCGTATATGG TCTCGACCAG AGGCGAAACG AATGACGGCA TACGCTTTGG ATGCTGGCAT  960
CAGATGCCTG GAGTTCTATG AGAAGTTCTT TGACATAAAA TTCCCTCTGG AAAAACAAGA 1020
TATGATTGCT CTTCCTGATT TCACCGCTGG TGCCATGGAA AACTGGGGCC TTATCACTTA 1080
TAGAGAGGAT TCTCTCCTAT ACGATGAAAA AATTTATGCA CCGATGAATA AACAGCGGGT 1140
TGCTCTCGTA GTTGCTCACG AGCTTGCTCA TCAGTGGTTC GGCAATCTGG TCACACTGAA 1200
GTGGTGGGAT GATACGTGGT TGAACGAAGG TTTTGCAACA TTTGTTGAGT ATCTTGGAAT 1260
GGACGAAATT AGCCACAACA ATTTCAGAAC GCAAGATTTC TTCTTGCTCG ATGGAATGGA 1320
TCGCGGAATG AGAGCTGACT CGGCAGCATC GAGCCATCCG CTTTCGTTTA GGATTGACAA 1380
AGCGGCAGAA GTTGCCGAAG CCTTTGACGA TATTTCATAC GCCAAGGGAG CGTCAGTTCT 1440
CACTATGCTA CGGGCTTTGA TTGGAGAGGA CAATTACAGG AATGCTGTTG TGCAATACCT 1500
CAAGAAGTTC TCCTACAGCA ATGCACAAGC AGCCGATCTG TGGAACGTCT TCAATGAAGT 1560
TGTCAAAGGT GTTAAGGGTC CTGACGGCAA CGTCATGAAA ATCGACCAAT TTACCGATCA 1620
GTGGACGTAT CAGATGGGTT ATCCTGTGGT TAAAGTAGAA GAATTTAATG CGACCGCCCT 1680
AAAGGTTACG CAGAGCCGGT ACAAGACAAA TAAAGACGCC TTGGAACCAG AGAAATATCG 1740
TAATCCAAAA TACGGGTTCA AGTGGGATGT TCCCCTATGG TATCAGGAAG GCAATAGCAA 1800
AGAGGTGAAG CGAACATGGC TAAAAAGAGA TGAACCGCTG TACTTGAACG TCAACAATCG 1860
GGATACATCC CTTGTGGTGA ACGCTGATCG ACATGGATTT TATCGACAAA ACTATGATGC 1920
CAACGGTTGG AAAAAGATAA TCAAGCAGCT CAAGAAAGAT CACAAGGTCT TCGGTCCAAG 1980
GACAAGGAAC GCTATCATAA GCGATGCATT TGCTGCAGCT ACGATTGACG CAATCGACTA 2040
TGAAACTGTA TTCGAACTAC TTGAATATGC CAAAAATGAA GAGGAATTCT TGCCTTGGAA 2100
GGAAGCTCTG TCCGGCATGT TCGCAGTTTT AAAGTTCTTC GGTAATGAGC CGGAGACAAA 2160
ACCAGCTAGA GCTTACATGA TGAGCATATT AGAACCGATG TATAATAAGA GCAGCATTGA 2220
TTACATCGTC AAGAATTATT TGGATGATAC GTTATTCACA AAAATTAATA CTCAAAAGGA 2280
TATCATTGAT GCATATTGTT CCCTTGGATC AAAGGACTGT ATAAAGCAAT ATAAGGATAT 2340
CTTCTACGAT GAGGTTATGC CCAAGTGTAA GGCCGGGGAA GCAGCAACCA AATGCGTTAA 2400
GGTTTCCGCT CCTCTTCGAG CCAATGTTTA CTGTTATGGT GTACAGGAAG GTGGTGAAGA 2460
AGCTTTTGAA AAGGTGATGG GGCTGTATCT AGCAGAAGAT GTTCAACTGG AGAAGGGTAT 2520
CCTGTTCAAA GCCTTGGCAT GCCACAAAGA TGTTACAGCT CTAAAAGAAC TTCTTTTGCG 2580
AGCCCTGGAC CGTAAATCGT CGTTTGTGCG TCTTCAGGAT GTCCCTACCG CTTTCCGTGC 2640
TGTATCTGAA AACCCTGTGG GCGAAGAATT CATGTTCAAT TTCCTAATGG AGAGATGGGA 2700
GGAAATCACT GCGAGCTTGG AAACAGAACA CAGAGCAGTT GATAAAGTGG TCGGCGCTTG 2760
TTGCACAGGA ATTCGCTCCC AACAACAAAT AGATCAGCTG AAGAATCTAC AGAAGAACAA 2820
TGCGCAGGCT AAGAAGTTCG GCTCATTCAC CCAGGAAATC GAAAAAGGAG AACATAAAAT 2880
TGCCTGGATC AAGAAACATT TTCACAGATT ATCGGAATTC TTCAAGAGAG CAAGATCATA 2940
GCTTTTCACA CTGAGCTCCA ATTTTAACGT CTTCAAACTA GGAGACAGTT TTGCTGAAAA 3000
GTCAGTTTCA CATTTTCCGT TTGAATGCCA TCCATTCGAA TACAACCAAT AATACCATTT 3060
TAAGTACCTT TCATTCACAG TGATTACTGA ATTTCGAATA TATCATGAAG CTTGTATCTT 3120
GAACGTTATG ATCGGTGACT TTCAATTTAT AGAGCTCACT CTCCATTTTG TAGCTGTGAT 3180
GACTTGCATT TAAGACCCAC CATTTACCAG CCTAGAATCT TTCCCCAATA CATTCCAAAC 3240
TCCGATCACC TCCACCGCTG ACAATGCCCA GATTTGTTTT TTTGTCTGCT ATCCATCTAA 3300
CTGTTTCGAT CGCCGGTTGT TTGTCAATTG CTTATCTGAT AAATATTGAC GTTGGTGT    3358
```

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

INFORMATION FOR SEQ ID NO: 21: информация для последовательности 1Д № 21

SEQUENCE CHARACTERISTICS: характеристики последовательности:
LENGTH: 3369 base pairs длина: 3369 пар оснований
TYPE: nucleic acid тип: нуклеиновая кислота
STRANDEDNESS: double тип нитей: двунитевая
TOPOLOGY: linear топология: линейная

SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 21: описание последовательности № 21

```
GGTTTAATTA CCCAAGTTTG AGGGTCTCCA TCTAGATGAC GTCGCAGGGG AGAACGCGGA    60
CATTGCTGAA TCTAACTCCA ATCCGTCTTA TTGTCGCATT ATTTCTAGTA GCTGCTGCAG   120
TCGGCCTCTC TATTGGTCTC ACCTATTACT TTACTCGCAA AGCGTTCGAT ACCTCAGAAA   180
AGCCAGGGAA GGATGATACT GGTGGCAAGG ACAAAGACAA TTCTCCCTCT GCGGCGGAAC   240
TACTCCTTCC AAGTAATATA AAACCATTGT CTTACGACTT GACGATCAAA ACATATCTAC   300
CTGGTTATGT GGACTTCCCA CCGGAGAAAA ACCTCACATT CGATGGGCGT GTGGAAATAT   360
CAATGGTTGT AATTGAGCCA ACAAAGAGTA TCGTACTCAA TTCAAAGAAG ATCTCTGTAA   420
TACCCCAAGA ATGTGAACTG GTATCGGGCG ATAAAAAACT CGAAATTGAA AGTGTAAAGG   480
AGCACCCAAG ACTGGAAAAG GTTGAGTTTC TTATCAAAAG CCAACTGGAA AAAGATCAAC   540
AAATCTTGCT CAAGGTCGGC TACATCGGTC TCATCAGCAA CAGCTTTGGT GGAATCTACC   600
AGACCACTTA TACCACCCCG GATGGCACCC CTAAGATCGC TGCAGTTTCA CAAAATGAGC   660
CCATAGATGC TCGTCGAATG GTACCATGCA TGGATGAACC GAAATACAAA GCAAACTGGA   720
CCGTTACTGT CATTCATCCA AAAGGCACCA AAGCCGTCTC GAATGGAATC GAAGTGAACG   780
GAGATGGAGA GATCAGTGGT GATTGGATCA CATCGAAGTT CTTGACTACT CCACGGATGT   840
CATCCTACTT GTTGGCAGTT ATGGTTTCAG AATTTGAATA CATCGAAGGT GAAACAAAGA   900
CGGGTGTTCG GTTCCGTATA TGGTCACGCC CAGAGGCAAA GAAGATGACA CAATATGCTC   960
TGCAATCTGG TATCAAGTGC ATAGAATTCT ACGAAGATTT CTTTGATATC AGATTCCCTC  1020
TGAAGAAACA AGATATGATT GCCCTTCCTG ATTTCTCTGC CGGTGCCATG GAGAATTGGG  1080
GCCTCATCAC TTACAGGGAA AACTCTTTGT TGTACGATGA CAGATTCTAT GCACCGATGA  1140
ATAAACAGCG AATTGCTCGC ATTGTTGCTC ATGAGCTTGC TCATCAGTGG TTCGGCGACT  1200
TGGTTACGAT GAAGTGGTGG GATAATTTGT GGTTGAATGA AGGTTTTGCA AGATTCACAG  1260
AATTTATTGG AGCTGGTCAG ATAACTCAAG ATGACGCCAG AATGAGGAAC TACTTCCTGA  1320
TTGATGTACT TGAACGCGCT TTGAAAGCTG ATTCGGTAGC GTCAAGCCAT CCACTTTCCT  1380
TCAGAATCGA CAAAGCTGCA GAAGTTGAAG AAGCCTTTGA TGATATCACA TACGCCAAAG  1440
GAGCTTCTGT TCTTACTATG CTGAGAGCCT TGATTGGAGA AGAAAAACAT AAGCATGCAG  1500
TATCGCAGTA CCTCAAGAAG TTCTCGTATA GCAATGCAGA AGCGACTGAT CTATGGGCAG  1560
TTTTTGATGA AGTTGTCACT GACGTCGAAG GTCCAGACGG CAAACCTATG AAAACCACAG  1620
AGTTTGCAAG TCAGTGGACG ACTCAGATGG GCTTCCCAGT TATTTCCGTA GCAGAGTTTA  1680
ACTCGACTAC TTTGAAATTA ACGCAAAGTC GATATGAGGC GAATAAAGAC GCTGTGGAGA  1740
AAGAGAAGTA CCGTCACCCG AAATACGGAT TTAAATGGGA TATTCCACTG TGGTATCAGG  1800
AAGGCGATAA GAAGGAGATA AAGCGAACAT GGTTGAGAAG AGATGAACCG CTTTACTTGC  1860
ATGTTAGTGA TGCTGGCGCT CCCTTTGTGG TGAACGCAGA CCGCTATGGA TTTTATCGAC  1920
AAAATCATGA CGCTAATGGT TGGAAAAAGA TAATCAAGCA GCTCAAGGAT AATCATGAGG  1980
TTTACAGTCC CCGGACAAGG AATGTCATCA TTAGCGATGC GTTTGCTGCG GCTGCAACTG  2040
ACGCAATTGA GTATGAGACT GTATTTGAAC TTCTGAATTA TGCCGAAAAA GAAACGGAAT  2100
ATCTACCATT AGAAATCGCA ATGTCCGGGA TCTCTTCGAT TTTGAAATAC TTCCCTACCG  2160
AGCCAGAGGC AAAGCCAGCT CAAACATACA TGATGAACAT ATTGAAACCG ATGTATGAAA  2220
AAAGCAGTAT CGACTTCATT GCCAATAACT ACAGAAATGA CAAGCTGTTT TTCCAAATCA  2280
ACCTCCAAAA AGATGTCATT GATATGTTCT GCGCCCTCGG ATCGCAAGAC TGCAGGAAGA  2340
AATATAAAAA ACTTTTCGAT GACGAAGTCA TGAACAAATG CAGGGATGGT CAAGCAGCAA  2400
CCGAATGCGT AAGAATCGCC GCTCCTCTCC GATCAAGTGT TTATTGTTAT GGTGTGAAGG  2460
AAGGCGGTGA TTATGCTTCC GACAAGGTGA TGGAGCTTTA TACGGCCGAA ACACTCGCCC  2520
TAGAAAAAGA CTTCCTACGC CTAGCATTGG GATGTCATAA AGATGTTACT GCTTTGAAAG  2580
GACTTCTCTT GCGGGCTCTG GACAGGAATT CGTCGTTCGT ACGTATGCAG GATATCCCAA  2640
GTGCTTTCAA CGATGTAGCA GCAAATCCTA TTGGCGAAGA ATTCATTTTC AATTTCCTTA  2700
TTGAGAGATG GCCAGATATC ATTGAAAGTA TAGGAACGAA GCACACATAT GTTGAGAAAG  2760
TGATACCAGC CTGCACTTCA GGAATCCGCT CACAACAGCA GATTGACCAG CTGAAGAATC  2820
TGCAGAAAAA TGGCATGAAC GCTCGTCAAT TCGGTGCATT CGATAAAGCA ATCGAACGAG  2880
CACAAAATAG GGTGGATTGG ATTAAAAAAC ATTTCCAAAA ATTAGCGGCT TTCTTCAAGA  2940
AAGCCACCTT GTAATTCGAA TTACATTGCC AGTAATCCAG ATCTTAAAGT TCATGAAGGA  3000
ATATGACAGG GAACTGACTG TCTGTTGGTC ACTGTTCCAC TGAATGGAAG TTTTTACCTA  3060
CAAAAATTTT TATCGTTATA TTTGCCTTCC GTGAGGGGTC ATTGTTGTCA CTTGAATAGT  3120
AAACAAAGCT CAGTATTGGC AACCGTAGAA CAATATTACT TTCGCTTCAT CAAATTGTTA  3180
TCTTCCCTAT ACCCTCTTCC TAACTGAATT CGGAAATTTG TTCATATTCG TTTGTAGTCT  3240
GTTGCTCAGA ACACTTTCTC CTCAATAGCT TCTTGTTTGT TTTTTTTTTG ATTGTATTGA  3300
TCGTTTTACA ATTGTATAGA TTAGTTATCT TATAAATATT GATGGTTAAA AAAAAAAAAA  3360
AAAAAAAAA                                                          3369
```

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

INFORMATION FOR SEQ ID NO: 22: информация для последовательности ID № 22

SEQUENCE CHARACTERISTICS: характеристики последовательности:

LENGTH: 977 amino acids длина 977 аминокислот
TYPE: peptide тип: пептид

SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 22: описание последовательности № 22

```
Met Thr Ala Glu Glu Ser Gln Glu Gln Glu Thr Gln Gln Pro Arg
 1               5                  10                  15
Lys Asn Thr Val Leu Arg Leu Thr Pro Ile Lys Ser Leu Phe Ala
            20                  25                  30
Leu Leu Val Val Ala Ala Ala Val Gly Leu Ser Ile Gly Leu Thr
        35                  40                  45
Tyr Tyr Phe Thr Arg Lys Ala Phe Asp Thr Thr Gly Gly Asn Gly
    50                  55                  60
Lys Gly Asp Gln Pro Ile Val Asp Asp Asn Ser Pro Ser Ala Glu
65                  70                  75
Glu Leu Arg Leu Pro Thr Thr Ile Lys Pro Leu Thr Tyr Asp Leu
            80                  85                  90
Val Ile Lys Thr Tyr Leu Pro Asn Tyr Val Asn Tyr Pro Pro Glu
        95                  100                 105
Lys Asp Phe Ala Ile Asp Gly Thr Val Val Ile Ala Met Glu Val
    110                 115                 120
Val Glu Pro Thr Lys Ser Ile Val Leu Asn Ser Lys Asn Ile Pro
125                 130                 135
Val Ile Ala Asp Gln Cys Glu Leu Phe Ser Asn Asn Gln Lys Leu
            140                 145                 150
Asp Ile Glu Lys Val Val Asp Gln Pro Arg Leu Glu Lys Val Glu
        155                 160                 165
Phe Val Leu Lys Lys Lys Leu Glu Lys Asn Gln Lys Ile Thr Leu
    170                 175                 180
Lys Ile Val Tyr Ile Gly Leu Ile Asn Asp Met Leu Gly Gly Leu
185                 190                 195
Tyr Arg Thr Thr Tyr Thr Asp Lys Asp Gly Thr Thr Lys Ile Ala
            200                 205                 210
Ala Cys Thr His Met Glu Pro Thr Asp Ala Arg Leu Met Val Pro
        215                 220                 225
Cys Phe Asp Glu Pro Thr Phe Lys Ala Asn Trp Thr Val Thr Val
    230                 235                 240
Ile His Pro Lys Gly Thr Ser Ala Val Ser Asn Gly Ile Glu Lys
245                 250                 255
Gly Glu Gly Glu Val Ser Gly Asp Trp Val Thr Thr Arg Phe Asp
            260                 265                 270
Pro Thr Pro Arg Met Pro Ser Tyr Leu Ile Ala Leu Val Ile Ser
        275                 280                 285
Glu Phe Lys Tyr Ile Glu Asn Tyr Thr Lys Ser Gly Val Arg Phe
    290                 295                 300
Arg Ile Pro Ala Arg Pro Glu Ala Met Lys Met Thr Glu Tyr Ala
305                 310                 315
Met Ile Ala Gly Ile Lys Cys Leu Asp Tyr Tyr Glu Asp Phe Phe
            320                 325                 330
Gly Ile Lys Phe Pro Leu Pro Lys Gln Asp Met Val Ala Leu Pro
        335                 340                 345
Asp Phe Ser Ser Gly Ala Met Glu Asn Trp Gly Leu Ile Thr Tyr
    350                 355                 360
Arg Glu Gly Ser Val Leu Tyr Asp Glu Asn Leu Tyr Gly Pro Met
365                 370                 375
Asn Lys Glu Arg Val Ala Glu Val Ile Ala His Glu Leu Ala His
            380                 385                 390
Gln Trp Phe Gly Asn Leu Val Thr Met Lys Trp Trp Asp Asn Leu
        395                 400                 405
Trp Leu Asn Glu Gly Phe Ala Ser Phe Val Glu Tyr Ile Gly Ala
    410                 415                 420
Asp Phe Ile Ser Asp Gly Leu Trp Glu Met Lys Asp Phe Phe Leu
425                 430                 435
```

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

Leu Ala Pro Tyr Thr Ser Gly Ile Thr Ala Asp Ala Val Ala Ser
440 445 450
Ser His Pro Leu Ser Phe Arg Ile Asp Lys Ala Ala Asp Val Ser
455 460 465
Glu Ala Phe Asp Asp Ile Thr Tyr Arg Lys Gly Ala Ser Val Leu
470 475 480
Gln Met Leu Leu Asn Leu Val Gly Asp Glu Asn Phe Lys Gln Ser
485 490 495
Val Ser Arg Tyr Leu Lys Lys Phe Ser Tyr Asp Asn Ala Ala Ala
500 505 510
Glu Asp Leu Trp Ala Ala Phe Asp Glu Thr Val Gln Gly Ile Thr
515 520 525
Gly Pro Asn Gly Gly Pro Leu Lys Met Ser Glu Phe Ala Pro Gln
530 535 540
Trp Thr Thr Gln Met Gly Phe Pro Val Leu Thr Val Glu Ser Val
545 550 555
Asn Ala Thr Thr Leu Lys Val Thr Gln Lys Arg Tyr Arg Gln Asn
560 565 570
Lys Asp Ala Lys Glu Pro Glu Lys Tyr Arg His Pro Thr Tyr Gly
575 580 585
Phe Lys Trp Asp Val Pro Leu Trp Tyr Gln Glu Asp Glu Gln Gln
590 595 600
Val Lys Arg Thr Trp Leu Lys Arg Glu Glu Pro Leu Tyr Phe His
605 610 615
Val Ser Asn Ser Asp Ser Ser Val Val Val Asn Ala Glu Arg Arg
620 625 630
Ala Phe Cys Arg Ser Asn Tyr Asp Ala Asn Gly Trp Arg Asn Ile
635 640 645
Met Arg Arg Leu Lys Gln Asn His Lys Val Tyr Gly Pro Arg Thr
650 655 660
Arg Asn Ala Leu Ile Ser Asp Ala Phe Ala Ala Ala Ala Val Glu
665 670 675
Glu Met Asn Tyr Glu Thr Val Phe Glu Met Leu Lys Tyr Thr Val
680 685 690
Lys Glu Glu Asp Tyr Leu Pro Trp Lys Glu Ala Ile Ser Gly Phe
695 700 705
Asn Thr Ile Leu Asp Phe Phe Gly Ser Glu Pro Glu Ser Gln Trp
710 715 720
Ala Ser Glu Tyr Met Arg Lys Leu Met Lys Pro Ile Tyr Asp Lys
725 730 735
Ser Ser Ile Lys Phe Ile Ala Glu Asn Tyr Lys Lys Asp Ser Leu
740 745 750
Phe Phe Lys Asn Asn Leu Gln Ile Ala Val Ile Asp Thr Tyr Cys
755 760 765
Gly Leu Gly Gly Lys Glu Cys Leu Glu Glu Met Lys Lys Leu Phe
770 775 780
Asp Lys Glu Val Met Lys Cys Gln Pro Gly Gln Gln Ala Thr Asp
785 790 795
Cys Val Lys Val Thr Ala Pro Leu Arg Lys Thr Val Tyr Cys Tyr
800 805 810
Gly Val Gln Glu Gly Gly Asp Glu Ala Phe Asp Lys Val Met Glu
815 820 825
Leu Tyr Asn Ala Glu Gln Val Gln Leu Glu Lys Asp Ser Leu Arg
830 835 840
Glu Ala Leu Gly Cys His Lys Asp Val Thr Ala Leu Lys Gly Leu
845 850 855
Leu Met Leu Ala Leu Asp Arg Asn Ser Ser Phe Val Arg Leu Gln
860 865 870
Asp Ala His Asp Val Phe Asn Ile Val Ser Arg Asn Pro Val Gly
875 880 885
Asn Glu Leu Leu Phe Asn Phe Leu Thr Glu Arg Trp Glu Glu Ile
890 895 900
Leu Glu Ser Leu Ser Ile Arg His Arg Ser Val Asp Arg Val Ile
905 910 915
Lys Ala Cys Thr Arg Gly Leu Arg Ser Arg Glu Gln Val Gln Gln
920 925 930
Leu Lys Asn Leu Tyr Lys Asn Asp Lys Arg Ala Arg Glu Tyr Gly

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

```
                935                 940                 945
Ala Phe Gly Gly Ala Ile Glu Arg Ser Glu His Arg Val Lys Trp
                950                 955                 960
Ile Glu Lys His Phe Arg Lys Leu Ala Ala Phe Phe Lys Lys Ser
                965                 970                 975
Asn Ser
```

INFORMATION FOR SEQ ID NO: 23: ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ID № 23:

SEQUENCE CHARACTERISTICS: ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

LENGTH: 972 amino acids ДЛИНА: 972 АМИНОКИСЛОТЫ
TYPE: peptide ТИП: ПЕПТИД

SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 23: ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 23:

```
Met Thr Ala Glu Trp Gln Lys Arg Arg Ile Leu Gly Phe Ser Pro
  1                 5                  10                  15
Ile Ser Leu Leu Cys Thr Leu Phe Val Leu Ala Ala Ala Val Gly
                 20                  25                  30
Leu Ser Ile Gly Leu Thr Tyr Tyr Phe Thr Arg Lys Ala Phe Asp
                 35                  40                  45
Thr Thr Gln Lys Glu Gln Lys Asp Asp Ser Gly Gly Lys Glu Lys
                 50                  55                  60
Asp Asn Ser Pro Ser Ala Glu Glu Leu Leu Leu Pro Thr Asn Ile
                 65                  70                  75
Lys Pro Val Ser Tyr Asp Leu Asn Ile Lys Thr Tyr Leu Pro Gly
                 80                  85                  90
Tyr Val Asn Phe Pro Pro Glu Lys Asn Leu Thr Phe Asp Ala His
                 95                 100                 105
Val Glu Ile Ala Met Val Val Val Glu Pro Thr Asn Ser Ile Val
                110                 115                 120
Leu Asn Ser Lys Lys Ile Thr Leu Ala Gln Gly Gly Cys Glu Leu
                125                 130                 135
Phe Ser Gly Asn Gln Lys Leu Asp Ile Glu Ser Val Lys Met Gln
                140                 145                 150
Glu Arg Leu Asp Lys Leu Glu Ile Thr Leu Lys Asn Gln Leu Gln
                155                 160                 165
Lys Asp Leu Lys Ile Leu Leu Lys Ile Thr Tyr Thr Gly Leu Ile
                170                 175                 180
Ser Asp Thr Leu Gly Gly Leu Tyr Gln Ser Ile Tyr Thr Asp Lys
                185                 190                 195
Asp Gly Lys Thr Lys Ile Val Ala Val Ser Gln Asn Glu Pro Ser
                200                 205                 210
Asp Ala Arg Arg Ile Ala Pro Cys Phe Asp Glu Pro Lys Tyr Lys
                215                 220                 225
Ala Thr Trp Thr Val Thr Val Val His Pro Lys Gly Thr Lys Ala
                230                 235                 240
Ala Ser Asn Gly Ile Glu Ala Asn Gly Lys Gly Glu Leu Lys Gly
                245                 250                 255
Asp Trp Ile Thr Ser Lys Phe Lys Thr Thr Pro Pro Met Ser Ser
                260                 265                 270
Tyr Leu Leu Ala Ile Ile Val Cys Glu Phe Glu Tyr Ile Glu Gly
                275                 280                 285
Phe Thr Lys Thr Gly Val Arg Phe Arg Ile Trp Ser Arg Pro Glu
                290                 295                 300
Ala Lys Arg Met Thr Ala Tyr Ala Leu Asp Ala Gly Ile Arg Cys
                305                 310                 315
Leu Glu Phe Tyr Glu Lys Phe Phe Asp Ile Lys Phe Pro Leu Glu
                320                 325                 330
Lys Gln Asp Met Ile Ala Leu Pro Asp Phe Thr Ala Gly Ala Met
                335                 340                 345
Glu Asn Trp Gly Leu Ile Thr Tyr Arg Glu Asp Ser Leu Leu Tyr
                350                 355                 360
Asp Glu Lys Ile Tyr Ala Pro Met Asn Lys Gln Arg Val Ala Leu
                365                 370                 375
```

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

Val Val Ala His Glu Leu Ala His Gln Trp Phe Gly Asn Leu Val
380 385 390
Thr Leu Lys Trp Trp Asp Asp Thr Trp Leu Asn Glu Gly Phe Ala
395 400 405
Thr Phe Val Glu Tyr Leu Gly Met Asp Glu Ile Ser His Asn Asn
410 415 420
Phe Arg Thr Gln Asp Phe Phe Leu Leu Asp Gly Met Asp Arg Gly
425 430 435
Met Arg Ala Asp Ser Ala Ala Ser Ser His Pro Leu Ser Phe Arg
440 445 450
Ile Asp Lys Ala Ala Glu Val Ala Glu Ala Phe Asp Asp Ile Ser
455 460 465
Tyr Ala Lys Gly Ala Ser Val Leu Thr Met Leu Arg Ala Leu Ile
470 475 480
Gly Glu Asp Asn Tyr Arg Asn Ala Val Val Gln Tyr Leu Lys Lys
485 490 495
Phe Ser Tyr Ser Asn Ala Gln Ala Ala Asp Leu Trp Asn Val Phe
500 505 510
Asn Glu Val Val Lys Gly Val Lys Gly Pro Asp Gly Asn Val Met
515 520 525
Lys Ile Asp Gln Phe Thr Asp Gln Trp Thr Tyr Gln Met Gly Tyr
530 535 540
Pro Val Val Lys Val Glu Glu Phe Asn Ala Thr Ala Leu Lys Val
545 550 555
Thr Gln Ser Arg Tyr Lys Thr Asn Lys Asp Ala Leu Glu Pro Glu
560 565 570
Lys Tyr Arg Asn Pro Lys Tyr Gly Phe Lys Trp Asp Val Pro Leu
575 580 585
Trp Tyr Gln Glu Gly Asn Ser Lys Glu Val Lys Arg Thr Trp Leu
590 595 600
Lys Arg Asp Glu Pro Leu Tyr Leu Asn Val Asn Asn Arg Asp Thr
605 610 615
Ser Leu Val Val Asn Ala Asp Arg His Gly Phe Tyr Arg Gln Asn
620 625 630
Tyr Asp Ala Asn Gly Trp Lys Lys Ile Ile Lys Gln Leu Lys Lys
635 640 645
Asp His Lys Val Phe Gly Pro Arg Thr Arg Asn Ala Ile Ile Ser
650 655 660
Asp Ala Phe Ala Ala Ala Thr Ile Asp Ala Ile Asp Tyr Glu Thr
665 670 675
Val Phe Glu Leu Leu Glu Tyr Ala Lys Asn Glu Glu Glu Phe Leu
680 685 690
Pro Trp Lys Glu Ala Leu Ser Gly Met Phe Ala Val Leu Lys Phe
695 700 705
Phe Gly Asn Glu Pro Glu Thr Lys Pro Ala Arg Ala Tyr Met Met
710 715 720
Ser Ile Leu Glu Pro Met Tyr Asn Lys Ser Ser Ile Asp Tyr Ile
725 730 735
Val Lys Asn Tyr Leu Asp Asp Thr Leu Phe Thr Lys Ile Asn Thr
740 745 750
Gln Lys Asp Ile Ile Asp Ala Tyr Cys Ser Leu Gly Ser Lys Asp
755 760 765
Cys Ile Lys Gln Tyr Lys Asp Ile Phe Tyr Asp Glu Val Met Pro
770 775 780
Lys Cys Lys Ala Gly Glu Ala Ala Thr Lys Cys Val Lys Val Ser
785 790 795
Ala Pro Leu Arg Ala Asn Val Tyr Cys Tyr Gly Val Gln Glu Gly
800 805 810
Gly Glu Glu Ala Phe Glu Lys Val Met Gly Leu Tyr Leu Ala Glu
815 820 825
Asp Val Gln Leu Glu Lys Gly Ile Leu Phe Lys Ala Leu Ala Cys
830 835 840
His Lys Asp Val Thr Ala Leu Lys Glu Leu Leu Leu Arg Ala Leu
845 850 855
Asp Arg Lys Ser Ser Phe Val Arg Leu Gln Asp Val Pro Thr Ala
860 865 870
Phe Arg Ala Val Ser Glu Asn Pro Val Gly Glu Glu Phe Met Phe

RU 2140986 C1

```
                875                 880                 885
Asn Phe Leu Met Glu Arg Trp Glu Glu Ile Thr Ala Ser Leu Glu
                890                 895                 900
Thr Glu His Arg Ala Val Asp Lys Val Val Gly Ala Cys Cys Thr
                905                 910                 915
Gly Ile Arg Ser Gln Gln Gln Ile Asp Gln Leu Lys Asn Leu Gln
                920                 925                 930
Lys Asn Asn Ala Gln Ala Lys Lys Phe Gly Ser Phe Thr Gln Glu
                935                 940                 945
Ile Glu Lys Gly Glu His Lys Ile Ala Trp Ile Lys Lys His Phe
                950                 955                 960
His Arg Leu Ser Glu Phe Phe Lys Arg Ala Arg Ser
                965                 970
```

INFORMATION FOR SEQ ID NO: 24: информация для последовательности 1Д № 24:

SEQUENCE CHARACTERISTICS: характеристики последовательности:

LENGTH: 972 amino acids длина: 972 аминокислоты
TYPE: peptide тип: пептид

SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 24: описание последовательности № 24

```
Met Thr Ser Gln Gly Arg Thr Arg Thr Leu Leu Asn Leu Thr Pro
  1                   5                  10                  15
Ile Arg Leu Ile Val Ala Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Val Gly
                 20                  25                  30
Leu Ser Ile Gly Leu Thr Tyr Tyr Phe Thr Arg Lys Ala Phe Asp
                 35                  40                  45
Thr Ser Glu Lys Pro Gly Lys Asp Asp Thr Gly Gly Lys Asp Lys
                 50                  55                  60
Asp Asn Ser Pro Ser Ala Ala Glu Leu Leu Leu Pro Ser Asn Ile
                 65                  70                  75
Lys Pro Leu Ser Tyr Asp Leu Thr Ile Lys Thr Tyr Leu Pro Gly
                 80                  85                  90
Tyr Val Asp Phe Pro Pro Glu Lys Asn Leu Thr Phe Asp Gly Arg
                 95                 100                 105
Val Glu Ile Ser Met Val Val Ile Glu Pro Thr Lys Ser Ile Val
                110                 115                 120
Leu Asn Ser Lys Lys Ile Ser Val Ile Pro Gln Glu Cys Glu Leu
                125                 130                 135
Val Ser Gly Asp Lys Lys Leu Glu Ile Glu Ser Val Lys Glu His
                140                 145                 150
Pro Arg Leu Glu Lys Val Glu Phe Leu Ile Lys Ser Gln Leu Glu
                155                 160                 165
Lys Asp Gln Gln Ile Leu Leu Lys Val Gly Tyr Ile Gly Leu Ile
                170                 175                 180
Ser Asn Ser Phe Gly Gly Ile Tyr Gln Thr Thr Tyr Thr Thr Pro
                185                 190                 195
Asp Gly Thr Pro Lys Ile Ala Ala Val Ser Gln Asn Glu Pro Ile
                200                 205                 210
Asp Ala Arg Arg Met Val Pro Cys Met Asp Glu Pro Lys Tyr Lys
                215                 220                 225
Ala Asn Trp Thr Val Thr Val Ile His Pro Lys Gly Thr Lys Ala
                230                 235                 240
Val Ser Asn Gly Ile Glu Val Asn Gly Asp Gly Glu Ile Ser Gly
                245                 250                 255
Asp Trp Ile Thr Ser Lys Phe Leu Thr Thr Pro Arg Met Ser Ser
                260                 265                 270
Tyr Leu Leu Ala Val Met Val Ser Glu Phe Glu Tyr Ile Glu Gly
                275                 280                 285
Glu Thr Lys Thr Gly Val Arg Phe Arg Ile Trp Ser Arg Pro Glu
                290                 295                 300
Ala Lys Lys Met Thr Gln Tyr Ala Leu Gln Ser Gly Ile Lys Cys
                305                 310                 315
Ile Glu Phe Tyr Glu Asp Phe Phe Asp Ile Arg Phe Pro Leu Lys
```

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

320 325 330
Lys Gln Asp Met Ile Ala Leu Pro Asp Phe Ser Ala Gly Ala Met
335 340 345
Glu Asn Trp Gly Leu Ile Thr Tyr Arg Glu Asn Ser Leu Leu Tyr
350 355 360
Asp Asp Arg Phe Tyr Ala Pro Met Asn Lys Gln Arg Ile Ala Arg
365 370 375
Ile Val Ala His Glu Leu Ala His Gln Trp Phe Gly Asp Leu Val
380 385 390
Thr Met Lys Trp Trp Asp Asn Leu Trp Leu Asn Glu Gly Phe Ala
395 400 405
Arg Phe Thr Glu Phe Ile Gly Ala Gly Gln Ile Thr Gln Asp Asp
410 415 420
Ala Arg Met Arg Asn Tyr Phe Leu Ile Asp Val Leu Glu Arg Ala
425 430 435
Leu Lys Ala Asp Ser Val Ala Ser Ser His Pro Leu Ser Phe Arg
440 445 450
Ile Asp Lys Ala Ala Glu Val Glu Glu Ala Phe Asp Asp Ile Thr
455 460 465
Tyr Ala Lys Gly Ala Ser Val Leu Thr Met Leu Arg Ala Leu Ile
470 475 480
Gly Glu Glu Lys His Lys His Ala Val Ser Gln Tyr Leu Lys Lys
485 490 495
Phe Ser Tyr Ser Asn Ala Glu Ala Thr Asp Leu Trp Ala Val Phe
500 505 510
Asp Glu Val Val Thr Asp Val Glu Gly Pro Asp Gly Lys Pro Met
515 520 525
Lys Thr Thr Glu Phe Ala Ser Gln Trp Thr Thr Gln Met Gly Phe
530 535 540
Pro Val Ile Ser Val Ala Glu Phe Asn Ser Thr Thr Leu Lys Leu
545 550 555
Thr Gln Ser Arg Tyr Glu Ala Asn Lys Asp Ala Val Glu Lys Glu
560 565 570
Lys Tyr Arg His Pro Lys Tyr Gly Phe Lys Trp Asp Ile Pro Leu
575 580 585
Trp Tyr Gln Glu Gly Asp Lys Lys Glu Ile Lys Arg Thr Trp Leu
590 595 600
Arg Arg Asp Glu Pro Leu Tyr Leu His Val Ser Asp Ala Gly Ala
605 610 615
Pro Phe Val Val Asn Ala Asp Arg Tyr Gly Phe Tyr Arg Gln Asn
620 625 630
His Asp Ala Asn Gly Trp Lys Lys Ile Ile Lys Gln Leu Lys Asp
635 640 645
Asn His Glu Val Tyr Ser Pro Arg Thr Arg Asn Val Ile Ile Ser
650 655 660
Asp Ala Phe Ala Ala Ala Ala Thr Asp Ala Ile Glu Tyr Glu Thr
665 670 675
Val Phe Glu Leu Leu Asn Tyr Ala Glu Lys Glu Thr Glu Tyr Leu
680 685 690
Pro Leu Glu Ile Ala Met Ser Gly Ile Ser Ser Ile Leu Lys Tyr
695 700 705
Phe Pro Thr Glu Pro Glu Ala Lys Pro Ala Gln Thr Tyr Met Met
710 715 720
Asn Ile Leu Lys Pro Met Tyr Glu Lys Ser Ser Ile Asp Phe Ile
725 730 735
Ala Asn Asn Tyr Arg Asn Asp Lys Leu Phe Phe Gln Ile Asn Leu
740 745 750
Gln Lys Asp Val Ile Asp Met Phe Cys Ala Leu Gly Ser Gln Asp
755 760 765
Cys Arg Lys Lys Tyr Lys Lys Leu Phe Asp Asp Glu Val Met Asn
770 775 780
Lys Cys Arg Asp Gly Gln Ala Ala Thr Glu Cys Val Arg Ile Ala
785 790 795
Ala Pro Leu Arg Ser Ser Val Tyr Cys Tyr Gly Val Lys Glu Gly
800 805 810
Gly Asp Tyr Ala Ser Asp Lys Val Met Glu Leu Tyr Thr Ala Glu
815 820 825

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

Thr Leu Ala Leu Glu Lys Asp Phe Leu Arg Leu Ala Leu Gly Cys
830 835 840
His Lys Asp Val Thr Ala Leu Lys Gly Leu Leu Leu Arg Ala Leu
845 850 855
Asp Arg Asn Ser Ser Phe Val Arg Met Gln Asp Ile Pro Ser Ala
860 865 870
Phe Asn Asp Val Ala Ala Asn Pro Ile Gly Glu Glu Phe Ile Phe
875 880 885
Asn Phe Leu Ile Glu Arg Trp Pro Asp Ile Ile Glu Ser Ile Gly
890 895 900
Thr Lys His Thr Tyr Val Glu Lys Val Ile Pro Ala Cys Thr Ser
905 910 915
Gly Ile Arg Ser Gln Gln Gln Ile Asp Gln Leu Lys Asn Leu Gln
920 925 930
Lys Asn Gly Met Asn Ala Arg Gln Phe Gly Ala Phe Asp Lys Ala
935 940 945
Ile Glu Arg Ala Gln Asn Arg Val Asp Trp Ile Lys Lys His Phe
950 955 960
Gln Lys Leu Ala Ala Phe Phe Lys Lys Ala Thr Leu
965 970

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

```
          1                                                        50
H11-3     GGTTTAATTA CCCAAGTTTG AGGGTCTCCA TCTAG..... .........A
H11-2     GGTTTAATTA CCCAAGTTTG AG..... ..... .....A
H11-1     GGTTTAATTA CCCAAGTTTG AGATGACAGC AGAGGAGAGT CAGGAGCAGG

          51                                                       100
H11-3     TGACGTCGCA GGGGAGAACG CGGACATTGC TGAATCTAAC TCCAATCCGT
H11-2     TGACGGCGGA GTGGCAGAAG CGTCGAATCT TGGGCTTCTC ACCTATCAGC
H11-1     AGACGCAGCA ACCACGAAAA AATACAGTGC TACGGCTCAC CCCAATCAAG

          101                                                      150
H11-3     CTTATTGTCG CATTATTTCT AGTAGCTGCT GCAGTCGGCC TCTCTATTGG
H11-2     CTACTTTGTA CATTATTTGT ATTAGCTGCT GCCGTTGGAC TCTCCATTGG
H11-1     TCTCTCTTTG CTTTGTTAGT GGTAGCTGCT GCCGTCGGCC TCTCAATCGG

          151                                                      200
H11-3     TCTCACCTAT TACTTTACTC GCAAAGCGTT CGATACCTCA GAAAAGCCAG
H11-2     TCTTACCTAT TACTTCACTC GTAAAGCATT CGATACCACA CAAAAAGAAC
H11-1     TCTCACCTAT TACTTTACAA GGAAAGCTTT TGATACTACT GGCGGAAATG

          201                                                      250
H11-3     GGAAGGATGA TACTGGTGGC AAGGACAAAG ACAATTCTCC CTCTGCGGCG
H11-2     AGAAGGATGA CAGTGGTGGT AAAGAAAAGG ATAATTCTCC TTCTGCAGAA
H11-1     GAAAAGGGGA TCAACCTATT GTCGAT...G ATAATTCCCC ATCAGCTGAA

          251                                                      300
H11-3     GAACTACTCC TTCCAAGTAA TATAAAACCA TTGTCTTACG ACTTGACGAT
H11-2     GAACTACTTC TTCCAACGAA CATAAAACCA GTCTCGTACG ACTTGAACAT
H11-1     GAATTACGTC TCCCAACAAC CATAAAACCT TTGACATACG ACTTAGTAAT

          301                                                      350
H11-3     CAAAACATAT CTACCTGGTT ATGTGGACTT CCCACCGGAG AAAAACCTCA
H11-2     CAAAACATAT CTACCGGGTT ACGTGAACTT TCCACCAGAA AAGAATCTCA
H11-1     CAAAACGTAT CTGCCAAACT ATGTAAACTA TCCACCTGAG AAAGATTTCG

          351                                                      400
H11-3     CATTCGATGG GCGTGTGGAA ATATCAATGG TTGTAATTGA GCCAACAAAG
H11-2     CATTTGATGC CCATGTGGAG ATTGCTATGG TTGTGGTTGA GCCTACAAAT
H11-1     CTATTGATGG GACTGTGGTG ATTGCTATGG AAGTTGTGGA GCCAACAAAG

          401                                                      450
H11-3     AGTATCGTAC TCAATTCAAA GAAGATCTCT GTAATACCCC AAGAATGTGA
H11-2     AGTATTGTGC TGAACTCGAA GAAAATCACT TTGGCACAAG GAGGATGCGA
H11-1     TCTATTGTGC TCAACTCGAA AAATATTCCT GTAATTGCAG ACCAGTGCGA

          451                                                      500
H11-3     ACTGGTATCG GGCGATAAAA AACTCGAAAT TGAAAGTGTA AAGGAGCACC
H11-2     ACTGTTCTCA GGTAATCAGA AACTTGACAT CGAAAGTGTA AAGATGCAGG
H11-1     ACTGTTTTCT AACAACCAAA AACTCGACAT CGAAAAGGTT GTGGATCAGC

          501                                                      550
H11-3     CAAGACTGGA AAAGGTTGAG TTTCTTATCA AAAGCCAACT GGAAAAAGAT
H11-2     AAAGACTTGA CAAGCTTGAG ATTACCCTCA AAAATCAGCT GCAAAAAGAT
H11-1     CAAGGCTGGA GAAAGTCGAA TTCGTTTTGA AGAAAAAGCT GGAGAAGAAT

          551                                                      600
H11-3     CAACAAATCT TGCTCAAGGT CGGCTACATC GGTCTCATCA GCAACAGCTT
H11-2     CTGAAAATCC TGCTCAAGAT CACTTACACC GGCCTTATTA GCGACACTCT
```

Фиг.2

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

```
H11-1    CAGAAAATCA CGCTCAAGAT TGTATACATT GGCCTTATCA ACGACATGCT

          601                                                 650
H11-3    TGGTGGAATC TACCAGACCA CTTATACCAC CCCGGATGGC ACCCCTAAGA
H11-2    CGGTGGGCTC TACCAGTCCA TCTACACTGA TAAGGACGGA AAAACTAAGA
H11-1    TGGAGGACTT TATCGAACAA CCTACACGGA TAAAGATGGT ACAACCAAGA

          651                                                 700
H11-3    TCGCTGCAGT TTCACAAAAT GAGCCCATAG ATGCTCGTCG AATGGTACCA
H11-2    TCGTTGCTGT TTCACAAAAT GAACCATCAG ACGCTCGTCG TATAGCGCCA
H11-1    TTGCTGCATG CACTCATATG GAACCGACGG ACGCCCGTCT TATGGTCCCC

          701                                                 750
H11-3    TGCATGGATG AACCGAAATA CAAAGCAAAC TGGACCGTTA CTGTCATTCA
H11-2    TGCTTTGACG AACCGAAGTA CAAGGCAACA TGGACTGTCA CCGTCGTTCA
H11-1    TGTTTCGACG AGCCGACGTT TAAGGCAAAC TGGACTGTGA CTGTGATTCA

          751                                                 800
H11-3    TCCAAAAGGC ACCAAAGCCG TCTCGAATGG AATCGAAGTG AACGGAGATG
H11-2    TCCCAAAGGT ACAAAGGCTG CATCGAACGG CATTGAAGCA AATGGAAAAG
H11-1    TCCGAAGGGC ACCAGTGCCG TGTCGAATGG AATAGAA... AAGGGAGAAG

          801                                                 850
H11-3    GAGAGATCAG TGGTGATTGG ATCACATCGA AGTTCTTGAC TACTCCACGG
H11-2    GGGAGCTCAA GGGTGATTGG ATAACGTCTA AATTTAAAAC TACCCCACCG
H11-1    GAGAAGTCTC TGGCGATTGG GTCACAACCA GATTCGATCC AACCCCGCGA

          851                                                 900
H11-3    ATGTCATCCT ACTTGTTGGC AGTTATGGTT TCAGAATTTG AATACATCGA
H11-2    ATGTCGTCCT ATTTATTGGC TATTATTGTT TGTGAATTTG AATACATTGA
H11-1    ATGCCTTCGT ATTTGATTGC TCTTGTGATT TCCGAATTTA AGTACATTGA

          901                                                 950
H11-3    AGGTGAAACA AAGACGGGTG TTCGGTTCCG TATATGGTCA CGCCCAGAGG
H11-2    AGGATTTACA AAAACGGGTG TTCGGTTCCG TATATGGTCT CGACCAGAGG
H11-1    AAATTATACG AAAAGCGGTG TTCGATTCCG AATTCCGGCT CGTCCGGAAG

          951                                                1000
H11-3    CAAAGAAGAT GACACAATAT GCTCTGCAAT CTGGTATCAA GTGCATAGAA
H11-2    CGAAACGAAT GACGGCATAC GCTTTGGATG CTGGCATCAG ATGCCTGGAG
H11-1    CTATGAAGAT GACAGAATAT GCCATGATAG CTGGAATCAA ATGTTTGGAT

          1001                                               1050
H11-3    TTCTACGAAG ATTTCTTTGA TATCAGATTC CCTCTGAAGA AACAAGATAT
H11-2    TTCTATGAGA AGTTCTTTGA CATAAAATTC CCTCTGGAAA AACAAGATAT
H11-1    TACTATGAGG ACTTCTTCGG GATCAAATTC CCACTTCCAA AACAAGATAT

          1051                                               1100
H11-3    GATTGCCCTT CCTGATTTCT CTGCCGGTGC CATGGAGAAT TGGGGCCTCA
H11-2    GATTGCTCTT CCTGATTTCA CCGCTGGTGC CATGGAAAAC TGGGGCCTTA
H11-1    GGTTGCTCTT CCTGACTTCT CATCTGGTGC TATGGAGAAC TGGGGTCTCA

          1101                                               1150
H11-3    TCACTTACAG GGAAAACTCT TTGTTGTACG ATGACAGATT CTATGCACCG
H11-2    TCACTTATAG AGAGGATTCT CTCCTATACG ATGAAAAAAT TTATGCACCG
H11-1    TCACATACAG GGAGGGTTCC GTGCTCTACG ATGAAAACCT CTACGGACCA

          1151                                               1200
```

Фиг.2 (прод.)

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

```
H11-3   ATGAATAAAC AGCGAATTGC TCGCATTGTT GCTCATGAGC TTGCTCATCA
H11-2   ATGAATAAAC AGCGGGTTGC TCTCGTAGTT GCTCACGAGC TTGCTCATCA
H11-1   ATGAATAAGG AGCGGGTTGC AGAAGTGATC GCGCACGAAC TTGCACATCA

        1201                                                1250
H11-3   GTGGTTCGGC GACTTGGTTA CGATGAAGTG GTGGGATAAT TTGTGGTTGA
H11-2   GTGGTTCGGC AATCTGGTCA CACTGAAGTG GTGGGATGAT ACGTGGTTGA
H11-1   GTGGTTCGGT AATTTGGTCA CGATGAAGTG GTGGGATAAC CTATGGCTGA

        1251                                                1300
H11-3   ATGAAGGTTT TGCAAGATTC ACAGAATTTA TTGGAGCTGG TCAGATAACT
H11-2   ACGAAGGTTT TGCAACATTT GTTGAGTATC TTGGAATGGA CGAAATTAGC
H11-1   ACGAAGGATT CGCGTCATTC GTGGAATACA TCGGAGCCGA CTTCATCAGC

        1301                                                1350
H11-3   CAAGATGACG CCAGAATGAG GAACTACTTC CTGATTGATG TACTTGAACG
H11-2   CACAACAATT TCAGAACGCA AGATTTCTTC TTGCTCGATG GAATGGATCG
H11-1   GATGGTCTAT GGGAAATGAA AGATTTCTTC CTGCTGGCAC CGTACACAAG

        1351                                                1400
H11-3   CGCTTTGAAA GCTGATTCGG TAGCGTCAAG CCATCCACTT TCCTTCAGAA
H11-2   CGGAATGAGA GCTGACTCGG CAGCATCGAG CCATCCGCTT TCGTTTAGGA
H11-1   TGGTATTACG GCTGATGCAG TAGCTTCAAG CCATCCGCTT TCCTTCAGAA

        1401                                                1450
H11-3   TCGACAAAGC TGCAGAAGTT GAAGAAGCCT TTGATGATAT CACATACGCC
H11-2   TTGACAAAGC GGCAGAAGTT GCCGAAGCCT TTGACGATAT TTCATACGCC
H11-1   TAGATAAGGC TGCAGATGTA TCAGAAGCGT TCGATGATAT CACATACCGT

        1451                                                1500
H11-3   AAAGGAGCTT CTGTTCTTAC TATGCTGAGA GCCTTGATTG GAGAAGAAAA
H11-2   AAGGGAGCGT CAGTTCTCAC TATGCTACGG GCTTTGATTG GAGAGGACAA
H11-1   AAAGGAGCAT CCGTTCTTCA AATGCTATTG AATTTAGTTG GGGACGAAAA

        1501                                                1550
H11-3   ACATAAGCAT GCAGTATCGC AGTACCTCAA GAAGTTCTCG TATAGCAATG
H11-2   TTACAGGAAT GCTGTTGTGC AATACCTCAA GAAGTTCTCC TACAGCAATG
H11-1   TTTCAAGCAG TCTGTTTCGC GTTACCTCAA GAAGTTTTCA TATGATAATG

        1551                                                1600
H11-3   CAGAAGCGAC TGATCTATGG GCAGTTTTTG ATGAAGTTGT CACTGACGTC
H11-2   CACAAGCAGC CGATCTGTGG AACGTCTTCA ATGAAGTTGT CAAAGGTGTT
H11-1   CGGCTGCTGA AGATTTATGG GCAGCATTCG ACGAAACCGT CCAAGGTATA

        1601                                                1650
H11-3   GAAGGTCCAG ACGGCAAACC TATGAAAACC ACAGAGTTTG CAAGTCAGTG
H11-2   AAGGGTCCTG ACGGCAACGT CATGAAAATC GACCAATTTA CCGATCAGTG
H11-1   ACCGGACCTA ATGGTGGACC ATTGAAAATG TCCGAGTTTG CGCCACAATG

        1651                                                1700
H11-3   GACGACTCAG ATGGGCTTCC CAGTTATTTC CGTAGCAGAG TTTAACTCGA
H11-2   GACGTATCAG ATGGGTTATC CTGTGGTTAA AGTAGAAGAA TTTAATGCGA
H11-1   GACAACTCAG ATGGGGTTCC CTGTTCTTAC TGTCGAGTCG GTTAACGCAA

        1701                                                1750
H11-3   CTACTTTGAA ATTAACGCAA AGTCGATATG AGGCGAATAA AGACGCTGTG
H11-2   CCGCCCTAAA GGTTACGCAG AGCCGGTACA AGACAAATAA AGACGCCTTG
H11-1   CGACTTTGAA AGTCACCCAA AAACGATACA GGCAGAACAA GGATGCAAAG
```

Фиг.2 (прод.)

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

```
          1751                                                      1800
H11-3     GAGAAAGAGA AGTACCGTCA CCCGAAATAC GGATTTAAAT GGGATATTCC
H11-2     GAACCAGAGA AATATCGTAA TCCAAAATAC GGGTTCAAGT GGGATGTTCC
H11-1     GAACCAGAGA AGTACCGTCA TCCAACTTAT GGGTTCAAAT GGGATGTTCC

          1801                                                      1850
H11-3     ACTGTGGTAT CAGGAAGGCG ATAAGAAGGA GATAAAGCGA ACATGGTTGA
H11-2     CCTATGGTAT CAGGAAGGCA ATAGCAAAGA GGTGAAGCGA ACATGGCTAA
H11-1     TCTGTGGTAT CAGGAAGATG AA...CAGCA AGTGAAAAGA ACTTGGTTAA

          1851                                                      1900
H11-3     GAAGAGATGA ACCGCTTTAC TTGCATGTTA GTGATGCTGG CGCTCCCTTT
H11-2     AAAGAGATGA ACCGCTGTAC TTGAACGTCA ACAATCGGGA TACATCCCTT
H11-1     AAAGAGAGGA ACCGCTCTAT TTCCATGTAA GCAATTCTGA TTCGTCAGTT

          1901                                                      1950
H11-3     GTGGTGAACG CAGACCGCTA TGGATTTTAT CGACAAAATC ATGACGCTAA
H11-2     GTGGTGAACG CTGATCGACA TGGATTTTAT CGACAAAACT ATGATGCCAA
H11-1     GTGGTGAATG CCGAACGTCG TGCTTTTTGC CGATCAAACT ATGACGCTAA

          1951                                                      2000
H11-3     TGGTTGGAAA AAGATAATCA AGCAGCTCAA GGATAATCAT GAGGTTTACA
H11-2     CGGTTGGAAA AAGATAATCA AGCAGCTCAA GAAAGATCAC AAGGTCTTCG
H11-1     CGGTTGGAGG AACATTATGA GAAGACTCAA GCAGAATCAT AAGGTCTATG

          2001                                                      2050
H11-3     GTCCCCGGAC AAGGAATGTC ATCATTAGCG ATGCGTTTGC TGCGGCTGCA
H11-2     GTCCAAGGAC AAGGAACGCT ATCATAAGCG ATGCATTTGC TGCAGCTACG
H11-1     GTCCACGAAC AAGAAACGCT CTCATAAGTG ATGCGTTTGC AGCAGCTGCA

          2051                                                      2100
H11-3     ACTGACGCAA TTGAGTATGA GACTGTATTT GAACTTCTGA ATTATGCCGA
H11-2     ATTGACGCAA TCGACTATGA AACTGTATTC GAACTACTTG AATATGCCAA
H11-1     GTTGAGGAAA TGAATTACGA GACCGTATTT GAAATGCTCA AATACACCGT

          2101                                                      2150
H11-3     AAAAGAAACG GAATATCTAC CATTAGAAAT CGCAATGTCC GGGATCTCTT
H11-2     AAATGAAGAG GAATTCTTGC CTTGGAAGGA AGCTCTGTCC GGCATGTTCG
H11-1     GAAAGAAGAG GATTACTTAC CATGGAAGGA GGCAATATCA GGATTCAATA

          2151                                                      2200
H11-3     CGATTTTGAA ATACTTCCCT ACCGAGCCAG AGGCAAAGCC AGCTCAAACA
H11-2     CAGTTTTAAA GTTCTTCGGT AATGAGCCGG AGACAAAACC AGCTAGAGCT
H11-1     CAATTTTGGA CTTTTTCGGC AGCGAACCCG AATCTCAATG GGCTTCGGAA

          2201                                                      2250
H11-3     TACATGATGA ACATATTGAA ACCGATGTAT GAAAAAAGCA GTATCGACTT
H11-2     TACATGATGA GCATATTAGA ACCGATGTAT AATAAGAGCA GCATTGATTA
H11-1     TACATGCGAA AACTGATGAA GCCAATTTAT GACAAGAGTA GCATCAAGTT

          2251                                                      2300
H11-3     CATTGCCAAT AACTACAGAA ATGACAAGCT GTTTTTCCAA ATCAACCTCC
H11-2     CATCGTCAAG AATTATTTGG ATGATACGTT ATTCACAAAA ATTAATACTC
H11-1     TATAGCGGAG AACTACAAAA AAGATTCGCT TTTCTTCAAA AATAATCTCC

          2301                                                      2350
H11-3     AAAAAGATGT CATTGATATG TTCTGCGCCC TCGGATCGCA AGACTGCAGG
H11-2     AAAAGGATAT CATTGATGCA TATTGTTCCC TTGGATCAAA GGACTGTATA
```

Фиг.2 (прод.)

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

```
H11-1    AAATAGCTGT TATTGACACA TACTGTGGTC TTGGAGGCAA AGAATGTCTT

          2351                                                2400
H11-3    AAGAAATATA AAAAACTTTT CGATGACGAA GTCATGAACA AATGCAGGGA
H11-2    AAGCAATATA AGGATATCTT CTACGATGAG GTTATGCCCA AGTGTAAGGC
H11-1    GAAGAAATGA AAAAGCTTTT TGACAAGGAG GTCATG...A AATGTCAACC

          2401                                                2450
H11-3    TGGTCAAGCA GCAACCGAAT GCGTAAGAAT CGCCGCTCCT CTCCGATCAA
H11-2    CGGGGAAGCA GCAACCAAAT GCGTTAAGGT TTCCGCTCCT CTTCGAGCCA
H11-1    TGGTCAGCAA GCGACCGACT GCGTAAAGGT AACTGCTCCT CTCCGAAAAA

          2451                                                2500
H11-3    GTGTTTATTG TTATGGTGTG AAGGAAGGCG GTGATTATGC TTCCGACAAG
H11-2    ATGTTTACTG TTATGGTGTA CAGGAAGGTG GTGAAGAAGC TTTTGAAAAG
H11-1    CTGTTTACTG CTATGGGGTC CAGGAAGGCG GTGATGAGGC ATTCGACAAG

          2501                                                2550
H11-3    GTGATGGAGC TTTATACGGC CGAAACACTC GCCCTAGAAA AAGACTTCCT
H11-2    GTGATGGGGC TGTATCTAGC AGAAGATGTT CAACTGGAGA AGGGTATCCT
H11-1    GTGATGGAAC TATATAATGC GGAACAAGTG CAGTTGGAGA AAGACAGTCT

          2551                                                2600
H11-3    ACGCCTAGCA TTGGGATGTC ATAAAGATGT TACTGCTTTG AAAGGACTTC
H11-2    GTTCAAAGCC TTGGCATGCC ACAAAGATGT TACAGCTCTA AAAGAACTTC
H11-1    ACGTGAAGCA TTGGGATGCC ATAAAGACGT TACAGCTCTA AAGGGACTTC

          2601                                                2650
H11-3    TCTTGCGGGC TCTGGACAGG AATTCGTCGT TCGTACGTAT GCAGGATATC
H11-2    TTTTGCGAGC CCTGGACCGT AAATCGTCGT TTGTGCGTCT TCAGGATGTC
H11-1    TTATGCTGGC TTTGGATCGG AATTCGTCAT TTGTGCGTCT TCAAGATGCT

          2651                                                2700
H11-3    CCAAGTGCTT TCAACGATGT AGCAGCAAAT CCTATTGGCG AAGAATTCAT
H11-2    CCTACCGCTT TCCGTGCTGT ATCTGAAAAC CCTGTGGGCG AAGAATTCAT
H11-1    CATGATGTGT TTAACATTGT ATCCAGAAAT CCTGTTGGAA ACGAACTGCT

          2701                                                2750
H11-3    TTTCAATTTC CTTATTGAGA GATGGCCAGA TATCATTGAA AGTATAGGAA
H11-2    GTTCAATTTC CTAATGGAGA GATGGGAGGA AATCACTGCG AGCTTGGAAA
H11-1    GTTCAATTTC CTCACAGAGC GATGGGAAGA GATACTTGAA AGTTTGTCAA

          2751                                                2800
H11-3    CGAAGCACAC ATATGTTGAG AAAGTGATAC CAGCCTGCAC TTCAGGAATC
H11-2    CAGAACACAG AGCAGTTGAT AAAGTGGTCG GCGCTTGTTG CACAGGAATT
H11-1    TACGACACAG ATCAGTTGAT CGAGTGATCA AAGCCTGTAC TCGAGGACTA

          2801                                                2850
H11-3    CGCTCACAAC AGCAGATTGA CCAGCTGAAG AATCTGCAGA AAAATGGCAT
H11-2    CGCTCCCAAC AACAAATAGA TCAGCTGAAG AATCTACAGA AGAACAATGC
H11-1    CGATCCAGGG AACAAGTACA ACAGTTGAAG AATCTATACA AAAATGACAA

          2851                                                2900
H11-3    GAACGCTCGT CAATTCGGTG CATTCGATAA AGCAATCGAA CGAGCACAAA
H11-2    GCAGGCTAAG AAGTTCGGCT CATTCACCCA GGAAATCGAA AAAGGAGAAC
H11-1    GCGTGCTCGC GAATACGGTG CATTTGGTGG GGCAATAGAA AGATCGGAAC

          2901                                                2950
```

Фиг.2 (прод.)

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

```
H11-3    ATAGGGTGGA TTGGATTAAA AAACATTTCC AAAAATTAGC GGCTTTCTTC
H11-2    ATAAAATTGC CTGGATCAAG AAACATTTTC ACAGATTATC GGAATTCTTC
H11-1    ACAGAGTCAA ATGGATTGAG AAACATTTCC GAAAACTAGC AGCTTTCTTC

          2951           2958
H11-3    AAGAAAGCCA CCTTGTAA
H11-2    AAGAGAGCAA GATCATAG
H11-1    AAAAAATCTA ATTCATAA
```

Фиг.2 (прод.)

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

```
         1                                                  50
M1                          C GCGGACATTG CTGAATCTAA CTCCAATCCG
AustM1   ATGACGTCGC AGGGGAGAAC GCGGACATTG CTGAATCTAA CTCCAATCCG
H11-3    ATGACGTCGC AGGGGAGAAC GCGGACATTG CTGAATCTAA CTCCAATCCG

         51                                                100
M1       TCTTATTGTC GCATTATTTC TAGTAGCTGC TGCAGTCGGC CTCTCTATTG
AustM1   TCTTATTGTC GCATTATTTC TAGTAGCTGC TGCAGTCGGC CTCTCTATTG
H11-3    TCTTATTGTC GCATTATTTC TAGTAGCTGC TGCAGTCGGC CTCTCTATTG

         101                                               150
M1       GTCTCACCTA TTACTTTACT CGCAAAGCGT TCGATACCTC AGAAAAGCCA
AustM1   GTCTCACCTA TTACTTTACT CGCAAAGCGT TCGATACCTC AGAAAAGCCA
H11-3    GTCTCACCTA TTACTTTACT CGCAAAGCGT TCGATACCTC AGAAAAGCCA

         151                                               200
M1       GGGAAGGATG ATACTGGTGG CAAGGACAAA GACAATTCTC CCTCTGCGGC
AustM1   GGGAAGGATG ATACTGGTGG CAAGGACAAA GACAATTCTC CCTCTGCGGC
H11-3    GGGAAGGATG ATACTGGTGG CAAGGACAAA GACAATTCTC CCTCTGCGGC

         201                                               250
M1       GGAACTACTT CTTCCAAGTA ATATAAAACC ATTGTCTTAC GACTTGACGA
AustM1   GGAACTACTC CTTCCAAGTA ATATAAAACC ATTGTCTTAC GACTTGACGA
H11-3    GGAACTACTC CTTCCAAGTA ATATAAAACC ATTGTCTTAC GACTTGACGA

         251                                               300
M1       TCAAAACATA TCTACCTGGT TATGTGGACT TCCCACCGGA GAAAAACCTC
AustM1   TCAAAACATA TCTACCTGGT TATGTGGACT TCCCACCGGA GAAAAACCTC
H11-3    TCAAAACATA TCTACCTGGT TATGTGGACT TCCCACCGGA GAAAAACCTC

         301                                               350
M1       ACATTCGACG GGCG
AustM1   ACATTCGATG GGCGTGTGGA AATATCAATG GTTGTAATTG AGCCAACAAA
H11-3    ACATTCGATG GGCGTGTGGA AATATCAATG GTTGTAATTG AGCCAACAAA

         351                                               400
AustM1   GAGTATCGTA CTCAATTCAA AGAAGATCTC TGTAATACCC CAAGAATGTG
H11-3    GAGTATCGTA CTCAATTCAA AGAAGATCTC TGTAATACCC CAAGAATGTG

         401                                               450
AustM1   AACTGGTATC GGGCGATAAA AAATTCGAAA TTGAAAGTGT AAAGGAGCAC
H11-3    AACTGGTATC GGGCGATAAA AAACTCGAAA TTGAAAGTGT AAAGGAGCAC

         451                                               500
AustM1   CCAAGACTGG AAAAGGTTGA GTTTCTTATC AAAAGCCAAC TGGAAAAAGA
H11-3    CCAAGACTGG AAAAGGTTGA GTTTCTTATC AAAAGCCAAC TGGAAAAAGA

         501                                               550
AustM1   TTCACAAATC TTGCTCAAGT CGGCTTACAT CGGTCTCATC AGCAACAGCC
H11-3    TCAACAAATC TTGCTCAAGG TCGGCTACAT CGGTCTCATC AGCAACAGCT

         551                                               600
AustM1   TTGGTGGAAT CTACCAGACC ACTTATACCA CCCCGGATGG CACCCCTAAG
H11-3    TTGGTGGAAT CTACCAGACC ACTTATACCA CCCCGGATGG CACCCCTAAG

         601                                               650
AustM1   ATCGCTGCAG TTTCACAAAA TGAGCCCATA GATGCTCGTC GAATGGTACC
H11-3    ATCGCTGCAG TTTCACAAAA TGAGCCCATA GATGCTCGTC GAATGGTACC
```

Фиг.3

RU 2140986 C1

```
          651                                                        700
AustM1    ATGCATGGAT GAACCGAAAT ACAAAGCAAA CTGGACCGTT ACTGTCATTC
H11-3     ATGCATGGAT GAACCGAAAT ACAAAGCAAA CTGGACCGTT ACTGTCATTC

          701                                                        750
AustM1    ATCCAAAAGG CACCAAAGCC GTCTCGAATG GAATCGAAGT GAACGGAGAT
H11-3     ATCCAAAAGG CACCAAAGCC GTCTCGAATG GAATCGAAGT GAACGGAGAT

          751                                                        800
AustM1    GGAGAGATCA GTGGTGATTG GATCACATCG AAGTTCTTGA CTACTCCACG
H11-3     GGAGAGATCA GTGGTGATTG GATCACATCG AAGTTCTTGA CTACTCCACG

          801                                                        850
AustM1    GATGTCATCC TACTTGTTGG CAGTTATGGT TTCAGAATTT GAATACATCG
H11-3     GATGTCATCC TACTTGTTGG CAGTTATGGT TTCAGAATTT GAATACATCG

          851                                                        900
AustM1    AAGGTGAAAC AAAGACGGGT GTTCGGTTCC GTATATGGTC ACGCCCAGAG
H11-3     AAGGTGAAAC AAAGACGGGT GTTCGGTTCC GTATATGGTC ACGCCCAGAG

          901                                                        950
AustM1    GCAAAGAAGA TGACACAATA TGCTCTGCAA TCTGGTATCA AGTGCATA
H11-3     GCAAAGAAGA TGACACAATA TGCTCTGCAA TCTGGTATCA AGTGCATAGA

          951                                                       1000
H11-3     ATTCTACGAA GATTTCTTTG ATATCAGATT CCCTCTGAAG AAACAAGATA

         1001                                                       1050
H11-3     TGATTGCCCT TCCTGATTTC TCTGCCGGTG CCATGGAGAA TTGGGGCCTC

         1051                                                       1100
H11-3     ATCACTTACA GGGAAAACTC TTTGTTGTAC GATGACAGAT TCTATGCACC

         1101                                                       1150
H11-3     GATGAATAAA CAGCGAATTG CTCGCATTGT TGCTCATGAG CTTGCTCATC

         1151                                                       1200
H11-3     AGTGGTTCGG CGACTTGGTT ACGATGAAGT GGTGGGATAA TTTGTGGTTG

         1201                                                       1250
H11-3     AATGAAGGTT TTGCAAGATT CACAGAATTT ATTGGAGCTG GTCAGATAAC

         1251                                                       1300
H11-3     TCAAGATGAC GCCAGAATGA GGAACTACTT CCTGATTGAT GTACTTGAAC

         1301                                                       1350
H11-3     GCGCTTTGAA AGCTGATTCG GTAGCGTCAA GCCATCCACT TTCCTTCAGA

         1351                                                       1400
H11-3     ATCGACAAAG CTGCAGAAGT TGAAGAAGCC TTTGATGATA TCACATACGC

         1401                                                       1450
H11-3     CAAAGGAGCT TCTGTTCTTA CTATGCTGAG AGCCTTGATT GGAGAAGAAA

         1451                                                       1500
H11-3     AACATAAGCA TGCAGTATCG CAGTACCTCA AGAAGTTCTC GTATAGCAAT

         1501                                                       1550
```

Фиг.3 (продол.)

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

```
H11-3   GCAGAAGCGA CTGATCTATG GGCAGTTTTT GATGAAGTTG TCACTGACGT

        1551                                                1600
H11-3   CGAAGGTCCA GACGGCAAAC CTATGAAAAC CACAGAGTTT GCAAGTCAGT

        1601                                                1650
H11-3   GGACGACTCA GATGGGCTTC CCAGTTATTT CCGTAGCAGA GTTTAACTCG

        1651                                                1700
H11-3   ACTACTTTGA AATTAACGCA AAGTCGATAT GAGGCGAATA AAGACGCTGT

        1701                                                1750
H11-3   GGAGAAAGAG AAGTACCGTC ACCCGAAATA CGGATTTAAA TGGGATATTC

        1751                                                1800
H11-3   CACTGTGGTA TCAGGAAGGC GATAAGAAGG AGATAAAGCG AACATGGTTG

        1801                                                1850
H11-3   AGAAGAGATG AACCGCTTTA CTTGCATGTT AGTGATGCTG GCGCTCCCTT

        1851                                                1900
H11-3   TGTGGTGAAC GCAGACCGCT ATGGATTTTA TCGACAAAAT CATGACGCTA

        1901                                                1950
H11-3   ATGGTTGGAA AAAGATAATC AAGCAGCTCA AGGATAATCA TGAGGTTTAC

        1951                                                2000
H11-3   AGTCCCCGGA CAAGGAATGT CATCATTAGC GATGCGTTTG CTGCGGCTGC

        2001                                                2050
H11-3   AACTGACGCA ATTGAGTATG AGACTGTATT TGAACTTCTG AATTATGCCG

        2051                                                2100
H11-3   AAAAAGAAAC GGAATATCTA CCATTAGAAA TCGCAATGTC CGGGATCTCT

        2101                                                2150
H11-3   TCGATTTTGA AATACTTCCC TACCGAGCCA GAGGCAAAGC CAGCTCAAAC

        2151                                                2200
H11-3   ATACATGATG AACATATTGA AACCGATGTA TGAAAAAAGC AGTATCGACT

        2201                                                2250
H11-3   TCATTGCCAA TAACTACAGA AATGACAAGC TGTTTTTCCA AATCAACCTC

        2251                                                2300
H11-3   CAAAAAGATG TCATTGATAT GTTCTGCGCC CTCGGATCGC AAGACTGCAG

        2301                                                2350
H11-3   GAAGAAATAT AAAAAACTTT TCGATGACGA AGTCATGAAC AAATGCAGGG

        2351                                                2400
H11-3   ATGGTCAAGC AGCAACCGAA TGCGTAAGAA TCGCCGCTCC TCTCCGATCA

        2401                                                2450
H11-3   AGTGTTTATT GTTATGGTGT GAAGGAAGGC GGTGATTATG CTTCCGACAA

        2451                                                2500
H11-3   GGTGATGGAG CTTTATACGG CCGAAACACT CGCCCTAGAA AAAGACTTCC
```

Фиг.3 (продол.)

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

```
          2501                                                      2550
H11-3     TACGCCTAGC ATTGGGATGT CATAAAGATG TTACTGCTTT GAAAGGACTT

          2551                                                      2600
H11-3     CTCTTGCGGG CTCTGGACAG GAATTCGTCG TTCGTACGTA TGCAGGATAT

          2601                                                      2650
H11-3     CCCAAGTGCT TTCAACGATG TAGCAGCAAA TCCTATTGGC GAAGAATTCA

          2651                                                      2700
H11-3     TTTTCAATTT CCTTATTGAG AGATGGCCAG ATATCATTGA AAGTATAGGA

          2701                                                      2750
H11-3     ACGAAGCACA CATATGTTGA GAAAGTGATA CCAGCCTGCA CTTCAGGAAT

          2751                                                      2800
H11-3     CCGCTCACAA CAGCAGATTG ACCAGCTGAA GAATCTGCAG AAAAATGGCA

          2801                                                      2850
H11-3     TGAACGCTCG TCAATTCGGT GCATTCGATA AAGCAATCGA ACGAGCACAA

          2851                                                      2900
H11-3     AATAGGGTGG ATTGGATTAA AAAACATTTC CAAAAATTAG CGGCTTTCTT

          2901                2919
H11-3     CAAGAAAGCC ACCTTGTAA
```

Фиг.3 (продол.)

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

```
H11-2  GGTTTAATTA CCCAAGTTTG AGATGACGGC GGAGTGGCAG AAGCGTCGAA   50
H11-2  TCTTGGGCTT CTCACCTATC AGCCTACTTT GTACATTATT TGTATTAGCT  100
H11-2  GCTGCCGTTG GACTCTCCAT TGGTCTTACC TATTACTTCA CTCGTAAAGC  150
H11-2  ATTCGATACC ACACAAAAAG AACAGAAGGA TGACAGTGGT GGTAAAGAAA  200
H11-2  AGGATAATTC TCCTTCTGCA GAAGAACTAC TTCTTCCAAC GAACATAAAA  250
H11-2  CCAGTCTCGT ACGACTTGAA CATCAAAACA TATCTACCGG GTTACGTGAA  300
H11-2  CTTTCCACCA GAAAAGAATC TCACATTTGA TGCCCATGTG GAGATTGCTA  350
H11-2  TGGTTGTGGT TGAGCCTACA AATAGTATTG TGCTGAACTC GAAGAAAATC  400
H11-2  ACTTTGGCAC AAGGAGGATG CGAACTGTTC TCAGGTAATC AGAAACTTGA  450
H11-2  CATCGAAAGT GTAAAGATGC AGGAAAGACT TGACAAGCTT GAGATTACCC  500
H11-2  TCAAAAATCA GCTGCAAAAA GATCTGAAAA TCCTGCTCAA GATCACTTAC  550
H11-2  ACCGGCCTTA TTAGCGACAC TCTCGGTGGG CTCTACCAGT CCATCTACAC  600
H11-2  TGATAAGGAC GGAAAAACTA AGATCGTTGC TGTTTCACAA AATGAACCAT  650
H11-2  CAGACGCTCG TCGTATAGCG CCATGCTTTG ACGAACCGAA GTACAAGGCA  700
H11-2  ACATGGACTG TCACCGTCGT TCATCCCAAA GGTACAAAGG CTGCATCGAA  750
H11-2  CGGCATTGAA GCAAATGGAA AAGGGGAGCT CAAGGGTGAT TGGATAACGT  800
H11-2  CTAAATTTAA AACTACCCCA CCGATGTCGT CCTATTTATT GGCTATTATT  850
H11-2  GTTTGTGAAT TTGAATACAT TGAAGGATTT ACAAAAACGG GTGTTCGGTT  900
H11-2  CCGTATATGG TCTCGACCAG AGGCGAAACG AATGACGGCA TACGCTTTGG  950
H11-2  ATGCTGGCAT CAGATGCCTG GAGTTCTATG AGAAGTTCTT TGACATAAAA 1000
H11-2  TTCCCTCTGG AAAAACAAGA TATGATTGCT CTTCCTGATT TCACCGCTGG 1050
H11-2  TGCCATGGAA AACTGGGGCC TTATCACTTA TAGAGAGGAT TCTCTCCTAT 1100
H11-2  ACGATGAAAA AATTTATGCA CCGATGAATA AACAGCGGGT TGCTCTCGTA 1150
H11-2  GTTGCTCACG AGCTTGCTCA TCAGTGGTTC GGCAATCTGG TCACACTGAA 1200
H11-2  GTGGTGGGAT GATACGTGGT TGAACGAAGG TTTTGCAACA TTTGTTGAGT 1250
H11-2  ATCTTGGAAT GGACGAAATT AGCCACAACA ATTTCAGAAC GCAAGATTTC 1300
H11-2  TTCTTGCTCG ATGGAATGGA TCGCGGAATG AGAGCTGACT CGGCAGCATC 1350
H11-2  GAGCCATCCG CTTTCGTTTA GGATTGACAA AGCGGCAGAA GTTGCCGAAG 1400
H11-2  CCTTTGACGA TATTTCATAC GCCAAGGGAG CGTCAGTTCT CACTATGCTA 1450
```

Фиг.4

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

```
H11-2  CGGGCTTTGA TTGGAGAGGA CAATTACAGG AATGCTGTTG TGCAATACCT 1500
H11-2  CAAGAAGTTC TCCTACAGCA ATGCACAAGC AGCCGATCTG TGGAACGTCT 1550
H11-2  TCAATGAAGT TGTCAAAGGT GTTAAGGGTC CTGACGGCAA CGTCATGAAA 1600
H11-2  ATCGACCAAT TTACCGATCA GTGGACGTAT CAGATGGGTT ATCCTGTGGT 1650
H11-2  TAAAGTAGAA GAATTTAATG CGACCGCCCT AAAGGTTACG CAGAGCCGGT 1700
H11-2  ACAAGACAAA TAAAGACGCC TTGGAACCAG AGAAATATCG TAATCCAAAA 1750
H11-2  TACGGGTTCA AGTGGGATGT TCCCCTATGG TATCAGGAAG GCAATAGCAA 1800
H11-2  AGAGGTGAAG CGAACATGGC TAAAAAGAGA TGAACCGCTG TACTTGAACG 1850
H11-2  TCAACAATCG GGATACATCC CTTGTGGTGA ACGCTGATCG ACATGGATTT 1900
H11-2  TATCGACAAA ACTATGATGC CAACGGTTGG AAAAAGATAA TCAAGCAGCT 1950
H11-2  CAAGAAAGAT CACAAGGTCT TCGGTCCAAG GACAAGGAAC GCTATCATAA 2000
H11-2  GCGATGCATT TGCTGCAGCT ACGATTGACG CAATCGACTA TGAAACTGTA 2050
H11-2  TTCGAACTAC TTGAATATGC CAAAAATGAA GAGGAATTCT TGCCTTGGAA 2100
H11-2  GGAAGCTCTG TCCGGCATGT TCGCAGTTTT AAAGTTCTTC GGTAATGAGC 2150
H11-2  CGGAGACAAA ACCAGCTAGA GCTTACATGA TGAGCATATT AGAACCGATG 2200
H11-2  TATAATAAGA GCAGCATTGA TTACATCGTC AAGAATTATT TGGATGATAC 2250
H11-2  GTTATTCACA AAAATTAATA CTCAAAAGGA TATCATTGAT GCATATTGTT 2300
H11-2  CCCTTGGATC AAAGGACTGT ATAAAGCAAT ATAAGGATAT CTTCTACGAT 2350
H11-2  GAGGTTATGC CCAAGTGTAA GGCCGGGGAA GCAGCAACCA AATGCGTTAA 2400
H11-2  GGTTTCCGCT CCTCTTCGAG CCAATGTTTA CTGTTATGGT GTACAGGAAG 2450
H11-2  GTGGTGAAGA AGCTTTTGAA AAGGTGATGG GGCTGTATCT AGCAGAAGAT 2500
H11-2  GTTCAACTGG AGAAGGGTAT CCTGTTCAAA GCCTTGGCAT GCCACAAAGA 2550
H11-2  TGTTACAGCT CTAAAAGAAC TTCTTTTGCG AGCCCTGGAC CGTAAATCGT 2600
H11-2  CGTTTGTGCG TCTTCAGGAT GTCCCTACCG CTTTCCGTGC TGTATCTGAA 2650

B2                                                      GGGA    4
H11-2  AACCCTGTGG GCGAAGAATT CATGTTCAAT TTCCTAATGG AGAGATGGGA 2700

B2     GGAAATCACT GCGAGCTTGG AAACAGAACA CAGAGCAGTT GATAAAGTGG   54
H11-2  GGAAATCACT GCGAGCTTGG AAACAGAACA CAGAGCAGTT GATAAAGTGG 2750

B2     TCGGCGCTTG TTGCACAGGA ATTCGCTCCC AACAACAAAT AGATCAGCTG  104
H11-2  TCGGCGCTTG TTGCACAGGA ATTCGCTCCC AACAACAAAT AGATCAGCTG 2800

B2     AAGAAGAATC TACAGAAGAA CAATGCGCAG GCTAAGAAGT TC........  154
```

Фиг.4 (продолжен.)

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

```
H11-2  AAGAA...TC TACAGAAGAA CAATGCGCAG GCTAAGAAGT TCGGCTCATT 2850

B2     .......... .......... .....CATAA AATTGCCTGG ATCAAGAAAC  204
H11-2  CACCCAGGAA ATCGAAAAAG GAGAACATAA AATTGCCTGG ATCAAGAAAC 2900

B2     ATTTTCACAG ATTATCGGAA TTCTTCAAGA GAGCAAGATC ATAGCTTTTC
H11-2  ATTTTCACAG ATTATCGGAA TTCTTCAAGA GAGCAAGATC ATAGCTTTTC 2950

B2     ACACTGAGCT CCAATTTTAA CGTCTTCAAA CTAGGAGACA GTTTTGCTGA
H11-2  ACACTGAGCT CCAATTTTAA CGTCTTCAAA CTAGGAGACA GTTTTGCTGA 3000

B2     AAAGTCAGTT TCACATTTTC CGTTTGAATG CCATCCATTC GAATACAACC
H11-2  AAAGTCAGTT TCACATTTTC CGTTTGAATG CCATCCATTC GAATACAACC 3050

B2     AA...CCCCA TTTTAAGTAC CTTTCATTCA CAGTGATTAC TAAATTTCGA
H11-2  AATAATACCA TTTTAAGTAC CTTTCATTCA CAGTGATTAC TGAATTTCGA 3100

B2     ATATATTATG AAGCTTGTAT CTTGAACGTT ATGATCGGTG ACTTTCAATT
H11-2  ATATATCATG AAGCTTGTAT CTTGAACGTT ATGATCGGTG ACTTTCAATT 3150

B2     TATAGAGCTC ACTCTCCATT TTGTAGCTGT GATGACTTGC ATTTAAGACC
H11-2  TATAGAGCTC ACTCTCCATT TTGTAGCTGT GATGACTTGC ATTTAAGACC 3200

B2     CACCATTTAC CAGCCTATAA TCTTTCCCCA ATACATTCCA AACTCCGATC
H11-2  CACCATTTAC CAGCCTAGAA TCTTTCCCCA ATACATTCCA AACTCCGATC 3250

B2     ACCTCCACCG CTGACAATGC CCAGATTTGT TTCTTTGTCT GCTATCCATC
H11-2  ACCTCCACCG CTGACAATGC CCAGATTTGT TTTTTTGTCT GCTATCCATC 3300

B2     TAACTGTTTC GAT
H11-2  TAACTGTTTC GATCGCCGGT TGTTTGTCAA TTGCTTATCT GATAAATATT 3350

H11-2  GACGTTGGTG T                                          3361
```

Фиг.4 (продолжен.)

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

```
          1                                                          50
H11-1     GGTTTAATTA CCCAAGTTTG AGATGACAGC AGAGGAGAGT CAGGAGCAGG

          51                                                         100
H11-1     AGACGCAGCA ACCACGAAAA AATACAGTGC TACGGCTCAC CCCAATCAAG

          101                                                        150
H11-1     TCTCTCTTTG CTTTGTTAGT GGTAGCTGCT GCCGTCGGCC TCTCAATCGG

          151                                                        200
H11-1     TCTCACCTAT TACTTTACAA GGAAAGCTTT TGATACTACT GGCGGAAATG

          201                                                        250
H11-1     GAAAAGGGGA TCAACCTATT GTCGATGATA ATTCCCCATC AGCTGAAGAA

          251                                                        300
H11-1     TTACGTCTCC CAACAACCAT AAAACCTTTG ACATACGACT TAGTAATCAA

          301                                                        350
H11-1     AACGTATCTG CCAAACTATG TAAACTATCC ACCTGAGAAA GATTTCGCTA

          351                                                        400
H11-1     TTGATGGGAC TGTGGTGATT GCTATGGAAG TTGTGGAGCC AACAAAGTCT

          401                                                        450
H11-1     ATTGTGCTCA ACTCGAAAAA TATTCCTGTA ATTGCAGACC AGTGCGAACT

          451                                                        500
H11-1     GTTTTCTAAC AACCAAAAAC TCGACATCGA AAAGGTTGTG GATCAGCCAA

          501                                                        550
H11-1     GGCTGGAGAA AGTCGAATTC GTTTTGAAGA AAAAGCTGGA GAAGAATCAG

          551                                                        600
H11-1     AAAATCACGC TCAAGATTGT ATACATTGGC CTTATCAACG ACATGCTTGG

          601                                                        650
H11-1     AGGACTTTAT CGAACAACCT ACACGGATAA AGATGGTACA ACCAAGATTG

          651                                                        700
H11-1     CTGCATGCAC TCATATGGAA CCGACGGACG CCCGTCTTAT GGTCCCCTGT

          701                                                        750
H11-1     TTCGACGAGC CGACGTTTAA GGCAAACTGG ACTGTGACTG TGATTCATCC

          751                                                        800
H11-1     GAAGGGCACC AGTGCCGTGT CGAATGGAAT AGAAAAGGGA GAAGGAGAAG

          801                                                        850
H11-1     TCTCTGGCGA TTGGGTCACA ACCAGATTCG ATCCAACCCC GCGAATGCCT

          851                                                        900
H11-1     TCGTATTTGA TTGCTCTTGT GATTTCCGAA TTTAAGTACA TTGAAAATTA

          901                                                        950
AustB1                                AATTCC GGCTCGTCCG GAAGCTATGA
H11-1     TACGAAAAGC GGTGTTCGAT TCCGAATTCC GGCTCGTCCG GAAGCTATGA
```

Фиг.5

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

```
          951                                                      1000
AustB1    AGATGACAGA ATATGCCATG ATAGCTGGAA TCAAATGTTT GGATTACTAT
 H11-1    AGATGACAGA ATATGCCATG ATAGCTGGAA TCAAATGTTT GGATTACTAT

          1001                                                     1050
AustB1    GAGGACTTCT TCGGGATCAA ATTCCCACTT CCAAAACAAG ATATGGTTGC
 H11-1    GAGGACTTCT TCGGGATCAA ATTCCCACTT CCAAAACAAG ATATGGTTGC

          1051                                                     1100
AustB1    TCTTCCTGAC TTCTCATCTG GTGCTATGGA GAACTGGGGT CTCATCACAT
 H11-1    TCTTCCTGAC TTCTCATCTG GTGCTATGGA GAACTGGGGT CTCATCACAT

          1101                                                     1150
AustB1    ACAGGGAGGG TTCCGTGCTC TACGATGAAA ACCTCTACGG ACCAATGAAT
 H11-1    ACAGGGAGGG TTCCGTGCTC TACGATGAAA ACCTCTACGG ACCAATGAAT

          1151                                                     1200
AustB1    AAGGAGCGGG TTGCAGAAGT GATCGCGCAC GAACTTGCAC ATCAGTGGTT
 H11-1    AAGGAGCGGG TTGCAGAAGT GATCGCGCAC GAACTTGCAC ATCAGTGGTT

          1201                                                     1250
AustB1    CGGTAATTTG GTCACGATGA AGTGGTGGGA TAACCTATGG CTGAACGAAG
 H11-1    CGGTAATTTG GTCACGATGA AGTGGTGGGA TAACCTATGG CTGAACGAAG

          1251                                                     1300
AustB1    GATTCGCGTC ATTCGTGGAA TACATCGGAG CCGACTTCAT CAGCGATGGT
 H11-1    GATTCGCGTC ATTCGTGGAA TACATCGGAG CCGACTTCAT CAGCGATGGT

          1301                                                     1350
AustB1    CTATGGGAAA TGAAAGATTT CTTCCTGCTG GCACCGTACA CAAGTGGTAT
 H11-1    CTATGGGAAA TGAAAGATTT CTTCCTGCTG GCACCGTACA CAAGTGGTAT

          1351                                                     1400
AustB1    TACGGCTGAT GCAGTAGCTT CAAGCCATCC GCTTTCCTTC AGAATAGATA
 H11-1    TACGGCTGAT GCAGTAGCTT CAAGCCATCC GCTTTCCTTC AGAATAGATA

          1401                                                     1450
AustB1    AGGCTGCAGA TGTATCAGAA GCGTTCGATG ATATCACATA CCGTAAAGGA
 H11-1    AGGCTGCAGA TGTATCAGAA GCGTTCGATG ATATCACATA CCGTAAAGGA

          1451                                                     1500
AustB1    GCATCCGTTC TTCAAATGCT ATTGAATTTA GTTGGGGACG AAAATTTCAA
 H11-1    GCATCCGTTC TTCAAATGCT ATTGAATTTA GTTGGGGACG AAAATTTCAA

          1501                                                     1550
AustB1    GCAGTCTGTT TCGCGTTACC TCAAGAAGTT TTCATATGAT AATGCGGCTG
 H11-1    GCAGTCTGTT TCGCGTTACC TCAAGAAGTT TTCATATGAT AATGCGGCTG

          1551                                                     1600
AustB1    CTGAAGATTT ATGGGCAGCA TTCGACGAAA CCGTCCAAGG TATAACCGGA
 H11-1    CTGAAGATTT ATGGGCAGCA TTCGACGAAA CCGTCCAAGG TATAACCGGA

          1601                                                     1650
AustB1    CCTAATGGTG GACCATTGAA AATGTCCGAG TTTGCGCCAC AATGGACAAC
 H11-1    CCTAATGGTG GACCATTGAA AATGTCCGAG TTTGCGCCAC AATGGACAAC

          1651                                                     1700
AustB1    TCAGATGGGG TTCCCTGTTC TTACTGTCGA GTCGGTTAAC GCAACGACTT
```

Фиг.5 (продолж.)

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

```
H11-1   TCAGATGGGG TTCCCTGTTC TTACTGTCGA GTCGGTTAAC GCAACGACTT

        1701                                                1750
AustB1  TGAAAGTCAC CCAAAAACGA TACAGGCAGA ACAAGGATGC AAAGGAACCA
H11-1   TGAAAGTCAC CCAAAAACGA TACAGGCAGA ACAAGGATGC AAAGGAACCA

        1751                                                1800
AustB1  GAGAAGTACC GTCATCCAAC TTATGGGTTC AAATGGGATG TTCCTCTGTG
H11-1   GAGAAGTACC GTCATCCAAC TTATGGGTTC AAATGGGATG TTCCTCTGTG

        1801                                                1850
AustB1  GTATCAGGAA GATGAACAGC AAGTGAAAAG AACTTGGTTA AAAAGAGAGG
H11-1   GTATCAGGAA GATGAACAGC AAGTGAAAAG AACTTGGTTA AAAAGAGAGG

        1851                                                1900
AustB1  AACCGCTCTA TTTCCATGTA AGCAATTCTG ATTCGTCAGT TGTGGTGAAT
H11-1   AACCGCTCTA TTTCCATGTA AGCAATTCTG ATTCGTCAGT TGTGGTGAAT

        1901                                                1950
AustB1  GCCGAACGTC GTGCTTTTTG CCGATCAAAC TATGACGCTA ACGGTTGGAG
H11-1   GCCGAACGTC GTGCTTTTTG CCGATCAAAC TATGACGCTA ACGGTTGGAG

        1951                                                2000
AustB1  GAACATTATG AGAAGACTCA AGCAGAATCA TAAGGTCTAT GGTCCACGAA
H11-1   GAACATTATG AGAAGACTCA AGCAGAATCA TAAGGTCTAT GGTCCACGAA

        2001                                                2050
AustB1  CAAGAAACGC TCTCATAAGT GATGCGTTTG CAGCAGCTGC AGTTGAGGAA
H11-1   CAAGAAACGC TCTCATAAGT GATGCGTTTG CAGCAGCTGC AGTTGAGGAA

        2051                                                2100
AustB1  ATGAATTACG AGACCGTATT TGAAATGCTC AAATACACCG TGAAAGAAGA
H11-1   ATGAATTACG AGACCGTATT TGAAATGCTC AAATACACCG TGAAAGAAGA

        2101                                                2150
AustB1  GGATTACTTA CCATGGAAGG AGGCAATATC AGGATTCAAT ACAATTTTGG
  B1a                             GCAATATC AGGATTCAAT ACAATTTTGG
H11-1   GGATTACTTA CCATGGAAGG AGGCAATATC AGGATTCAAT ACAATTTTGG

        2151                                                2200
AustB1  ACTTTTTCGG CAGCGAACCC GAATCTCAAT GGGCTTCGGA ATACATGCGA
  B1a   ACTTTTTCGG CAGCGAACCC GAATCTCAAT GGGCTTCGGA ATACATGCGA
H11-1   ACTTTTTCGG CAGCGAACCC GAATCTCAAT GGGCTTCGGA ATACATGCGA

        2201                                                2250
AustB1  AAACTGATGA AGCCAATTTA TGACAAGAGT AGCATCAAGT TTATAGCGGA
  B1a   AAACTGATGA AGCCAATTTA TGACAAGAGT AGCATCAAGT TTATAGCGGA
H11-1   AAACTGATGA AGCCAATTTA TGACAAGAGT AGCATCAAGT TTATAGCGGA

        2251                                                2300
AustB1  GAACTACAAA AAAGATTCGC TTTTCTTCAA AAATAATCTC CAAATAGCTG
  B1a   GAACTACAAA AAAGATTCGC TTTTCTTCAA AAATAATCTC CAAATAGCTG
H11-1   GAACTACAAA AAAGATTCGC TTTTCTTCAA AAATAATCTC CAAATAGCTG

        2301                                                2350
AustB1  TTATTGACAC ATACTGTGGT CTTGGAGGCA AAGAATGTCT TGAAGAAATG
  B1a   TTATTGACAC ATACTGTGGT CTTGGAGGCA AAGAATGTCT TGAAGAAATG
H11-1   TTATTGACAC ATACTGTGGT CTTGGAGGCA AAGAATGTCT TGAAGAAATG
```

Фиг.5 (продолж.)

RU 2140986 C1

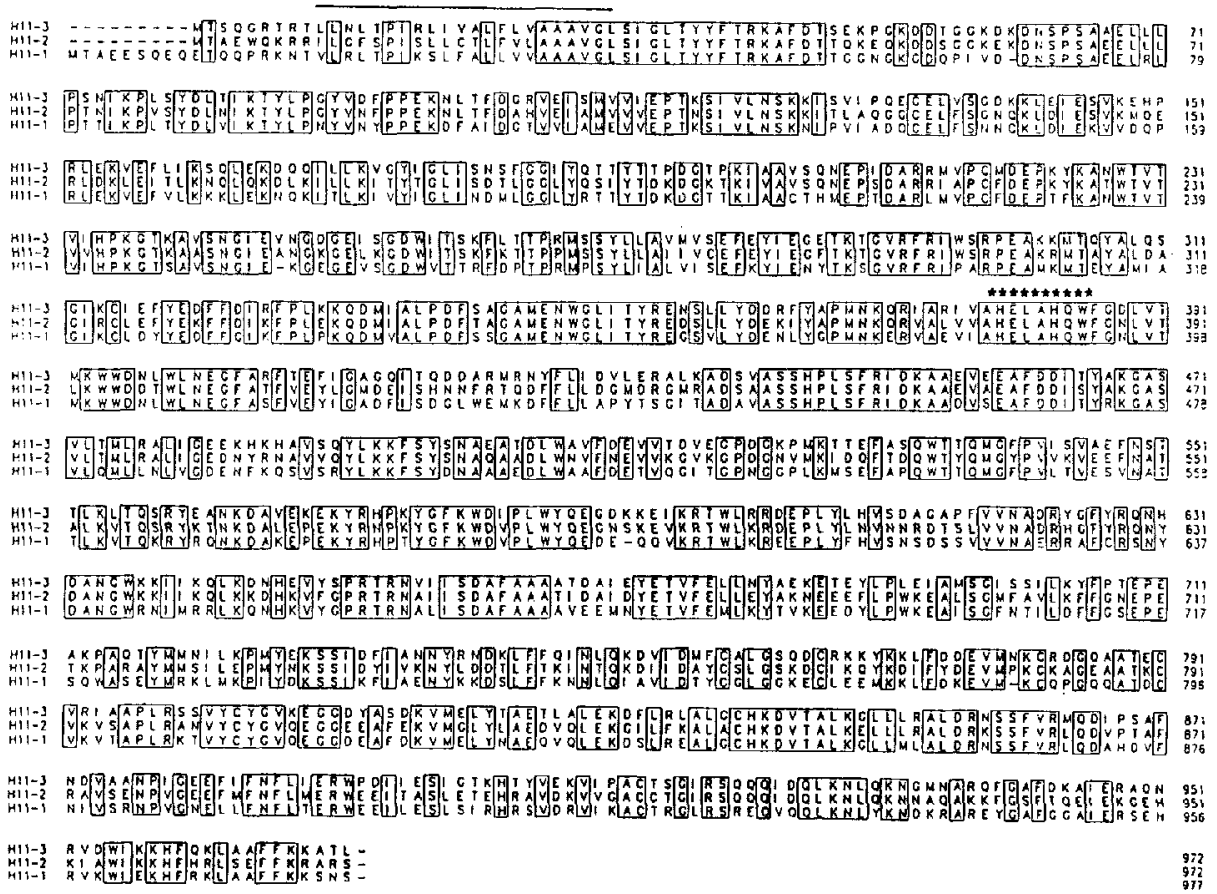
RU 2140986 C1

```
          2351                                                       2400
AustB1    AAAAAGCTTT TTGACAAGGA GGTCATGAAA TGTCAACCTG GTCAGCAAGC
  B1a     AAAAAGCTTT TTGACAAGGA GGTCATGAAA TGTCAACCTG GTCAGCAAGC
 H11-1    AAAAAGCTTT TTGACAAGGA GGTCATGAAA TGTCAACCTG GTCAGCAAGC

          2401                                                       2450
AustB1    GACCGACTGC GTAAAGGTAA CTGCTCCTCT CCGAAAAACT GTTTACTGCT
  B1a     GACCGACTGC GTAAAGGTAA CTGCTCCTCT CCGAAAAACT GTTTACTGCT
 H11-1    GACCGACTGC GTAAAGGTAA CTGCTCCTCT CCGAAAAACT GTTTACTGCT

          2451                                                       2500
AustB1    ATGGGGTCCA GGAAGGCGGT GATGAGGCAT TCGACAAGGT GATGGAACTA
  B1a     ATGGGGTCCA GGAAGGCGGT GATGAGGCAT TCGACAAGGT GATGGAACTA
 H11-1    ATGGGGTCCA GGAAGGCGGT GATGAGGCAT TCGACAAGGT GATGGAACTA

          2501                                                       2550
AustB1    TATAATGCGG AACAAGTGCA GTTGGAGAAA GACAGTCTAC GTGAAGCATT
  B1a     TATAATGCGG AACAAGTGCA GTTGGAGAAA GACAGTCTAC GTGAAGCATT
 H11-1    TATAATGCGG AACAAGTGCA GTTGGAGAAA GACAGTCTAC GTGAAGCATT

          2551                                                       2600
AustB1    GGGATGCCAT AAAGACGTTA CAGCTCTAAA GGGACTTCTT ATGCTGGCTT
  B1a     GGGATGCCAT AAAGACGTTA CAGCTCTAAA GGGACTTCTT ATGCTGGCTT
 H11-1    GGGATGCCAT AAAGACGTTA CAGCTCTAAA GGGACTTCTT ATGCTGGCTT

          2601                                                       2650
AustB1    TGGATCGGAA TTC
  B1a     TGGATC
 H11-1    TGGATCGGAA TTCGTCATTT GTGCGTCTTC AAGATGCTCA TGATGTGTTT

          2651                                                       2700
 H11-1    AACATTGTAT CCAGAAATCC TGTTGGAAAC GAACTGCTGT TCAATTTCCT

          2701                                                       2750
 H11-1    CACAGAGCGA TGGGAAGAGA TACTTGAAAG TTTGTCAATA CGACACAGAT

          2751                                                       2800
 H11-1    CAGTTGATCG AGTGATCAAA GCCTGTACTC GAGGACTACG ATCCAGGGAA

          2801                                                       2850
 H11-1    CAAGTACAAC AGTTGAAGAA TCTATACAAA AATGACAAGC GTGCTCGCGA

          2851                                                       2900
 H11-1    ATACGGTGCA TTTGGTGGGG CAATAGAAAG ATCGGAACAC AGAGTCAAAT

          2901                                                       2950
 H11-1    GGATTGAGAA ACATTTCCGA AAACTAGCAG CTTTCTTCAA AAAATCTAAT

          2951                                                       3000
 H11-1    TCATAATTCT GAAATGGCTA TAACTAGCAC ACTGGATAGT TGTCTCGAAT

          3001                                                       3050
 H11-1    CATCCAAAAA GATTAATGAT GTTTTTTTAC TAGATAATAT GGAGATATTC

          3051                                    3084
 H11-1    TGTAAATTTG TCATCGATTC AAGTGTCTGT ATTG
```

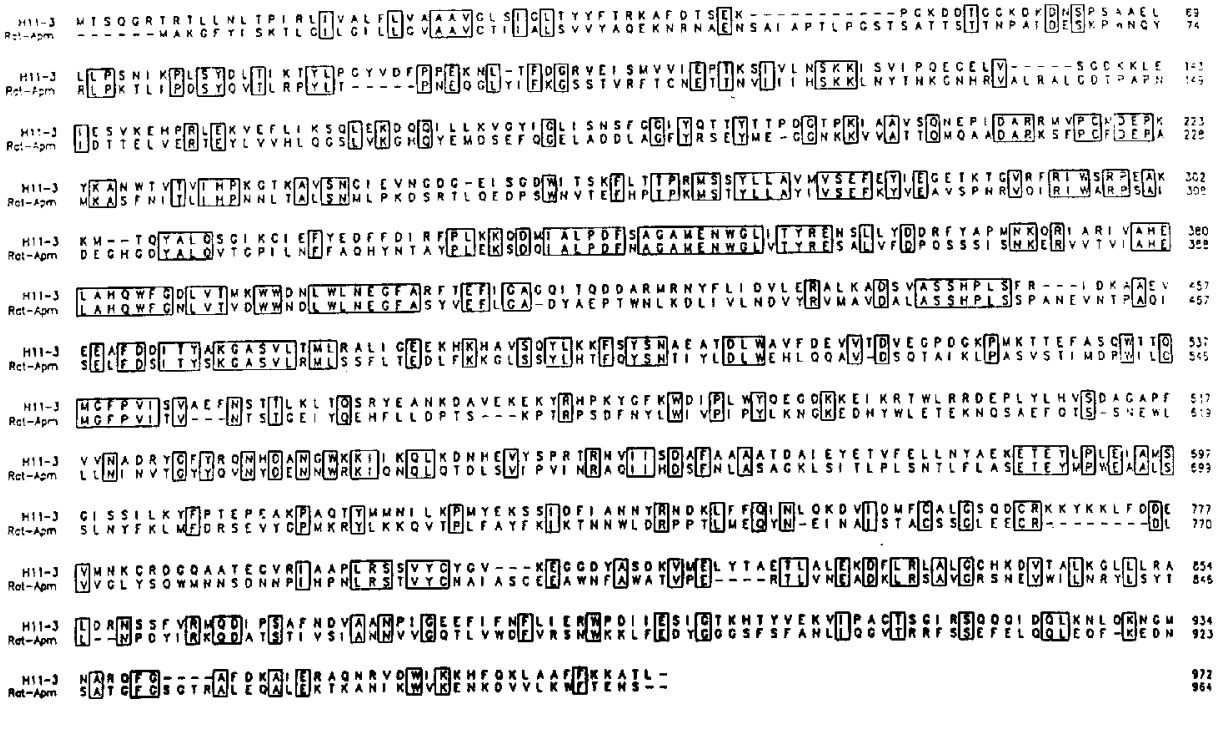
Фиг.5 (продолж.)

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1



Фиг.6a



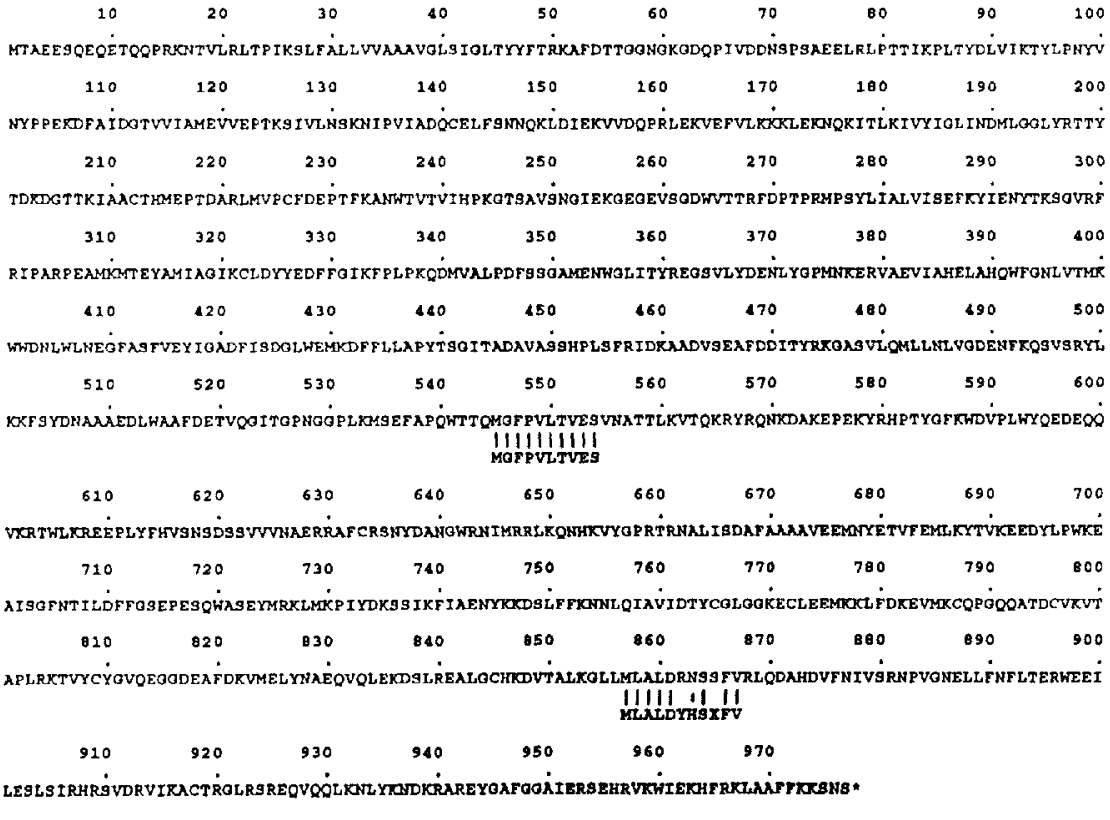
Фиг.6bI

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1



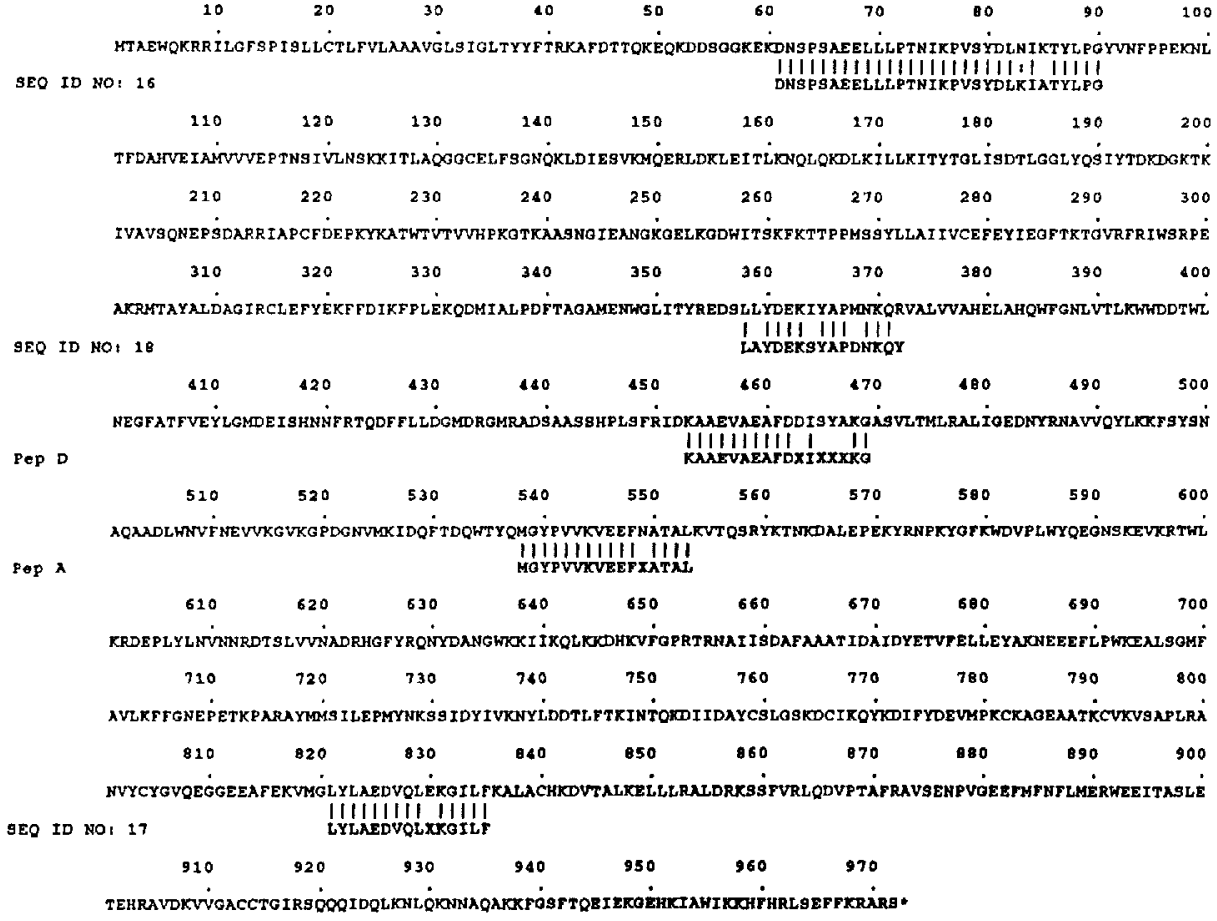
Фиг.6bII



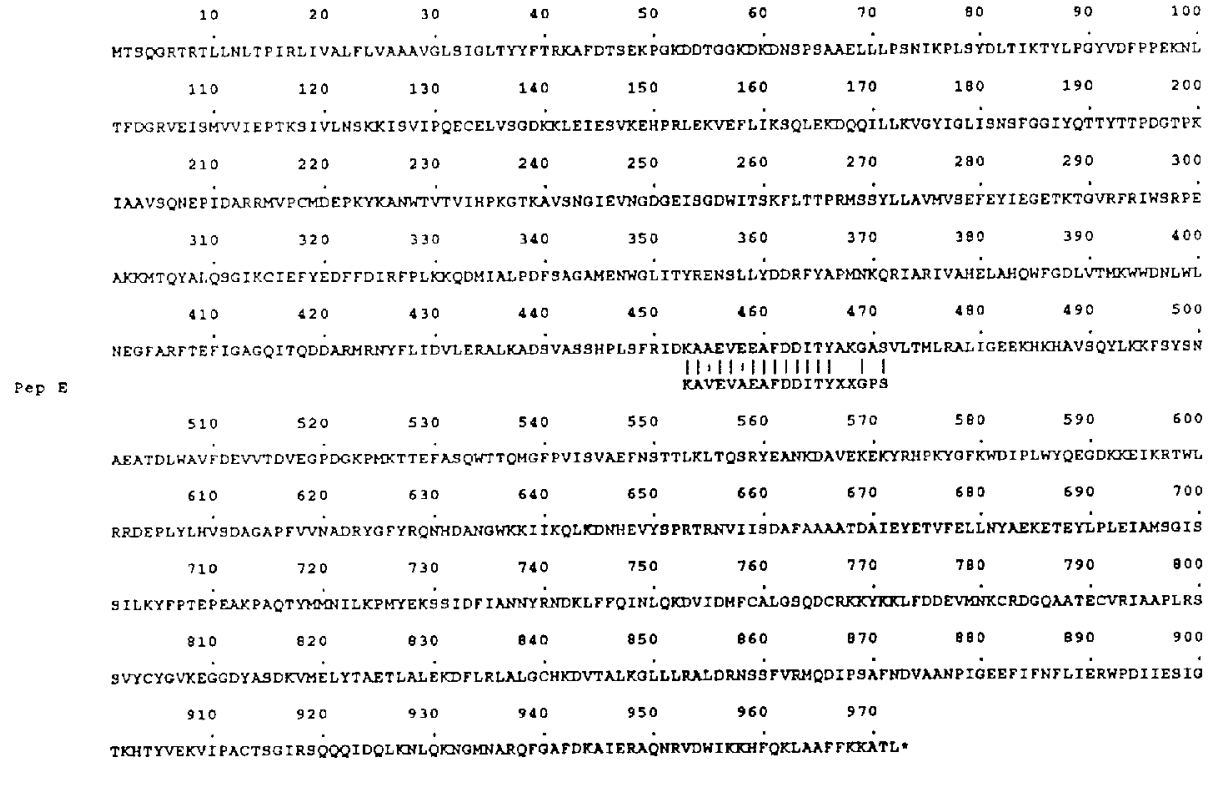
Фиг.7a

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1



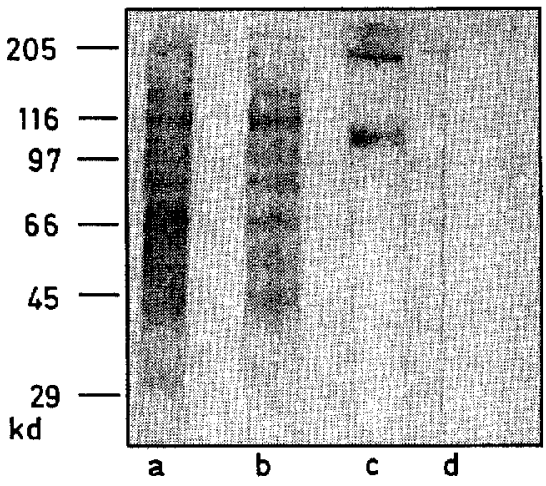
Фиг.7b



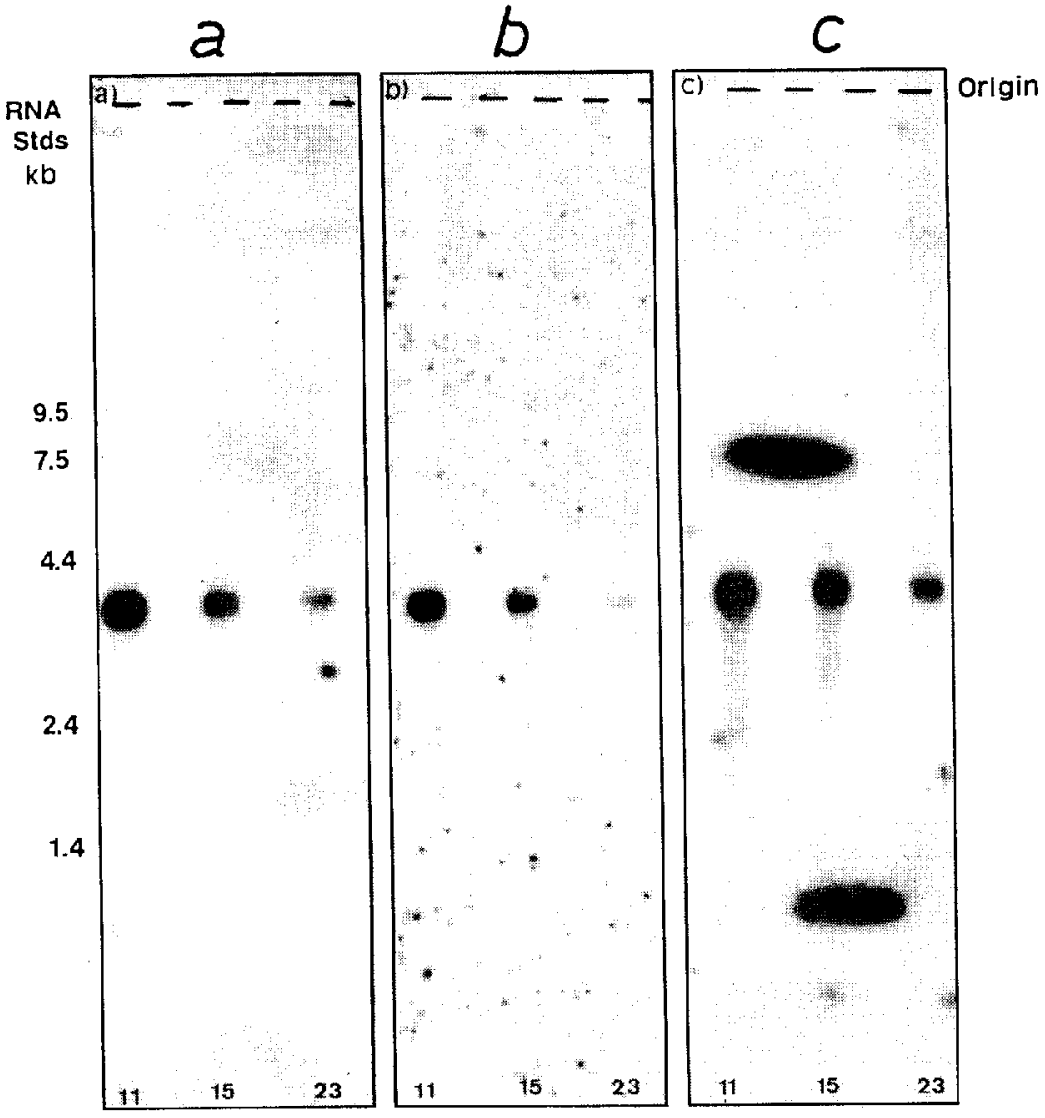
Фиг.7c

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1



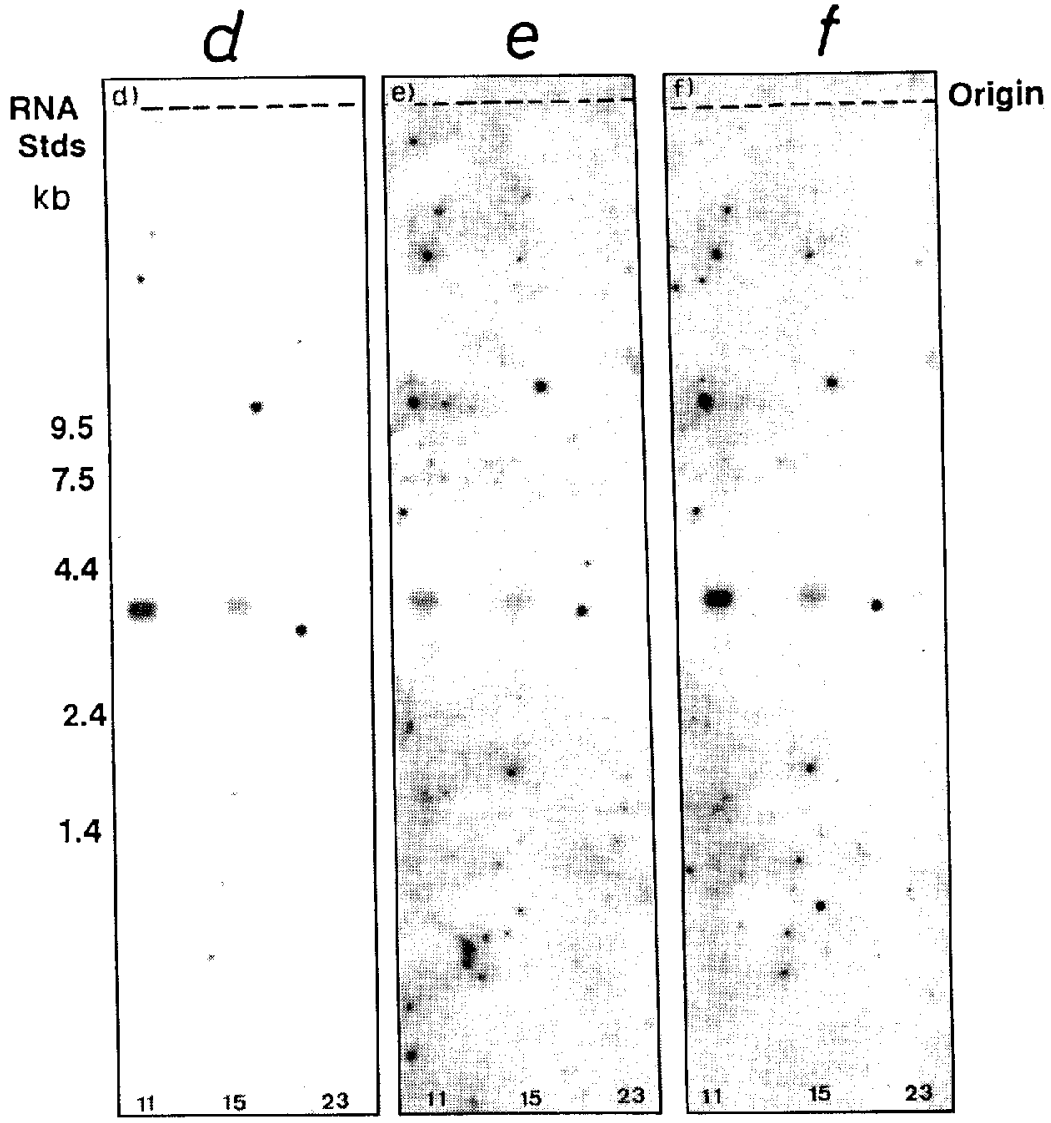
Фиг.8



Фиг.9 а

RU 2140986 C1

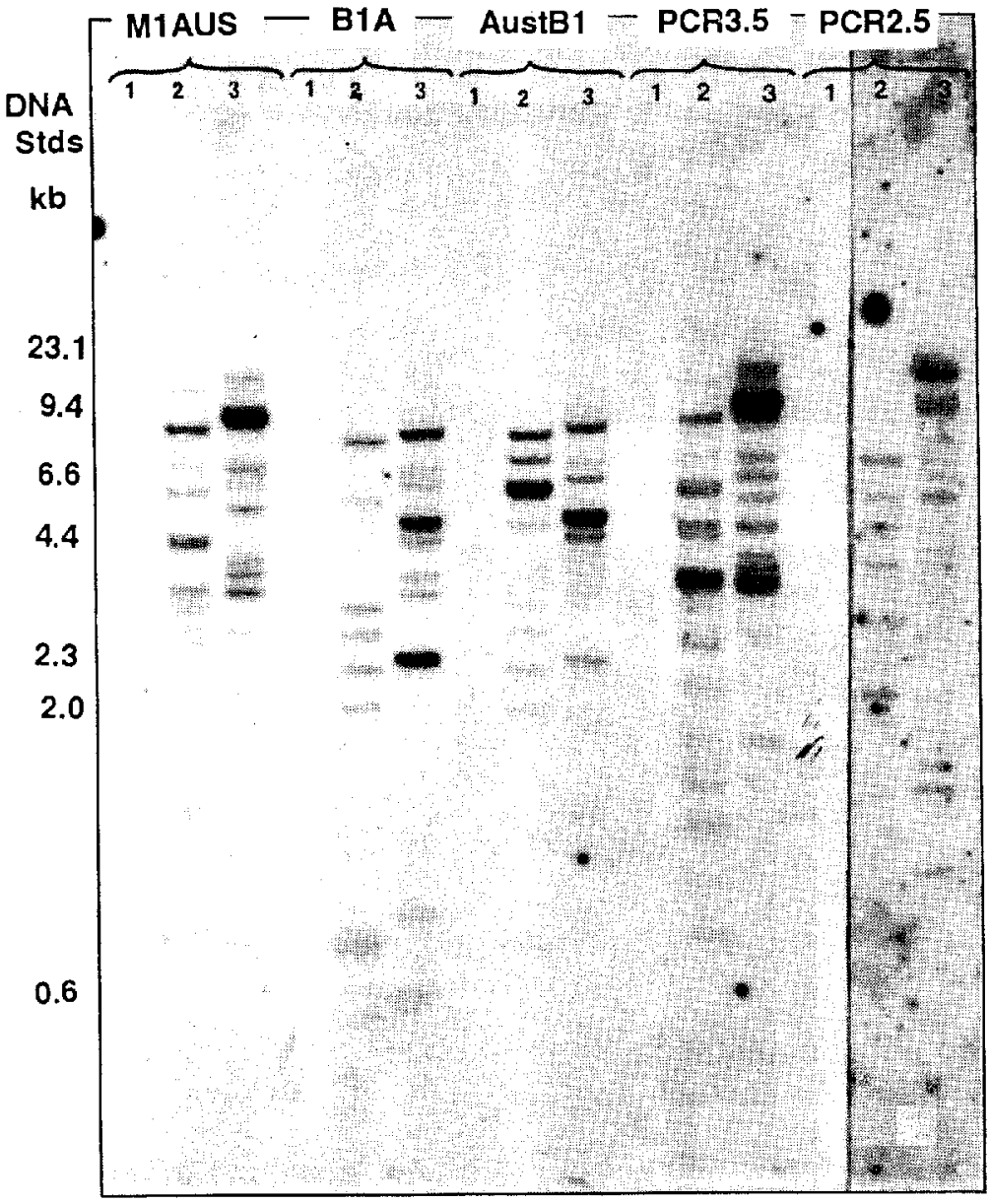
RU 2140986 C1



Фиг.9 b

RU 2140986 C1

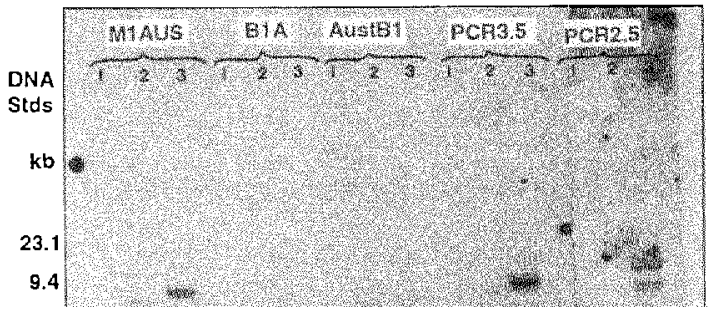
RU 2140986 C1

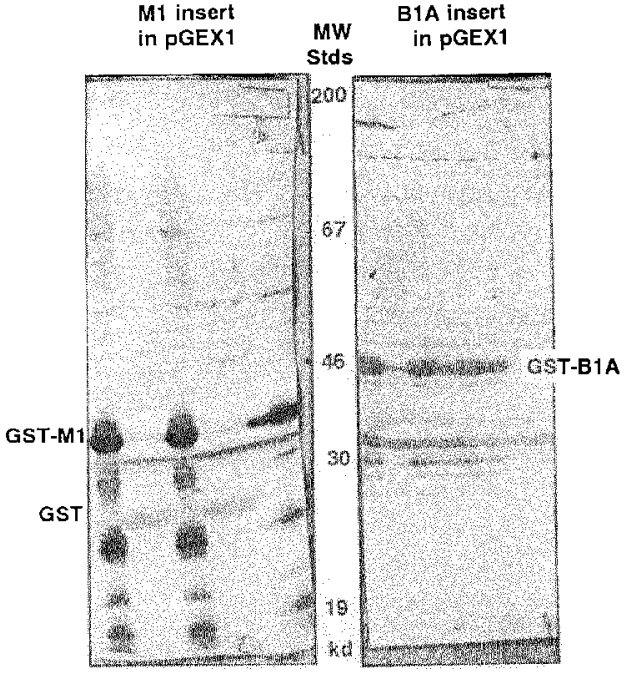


Фиг.10а

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1

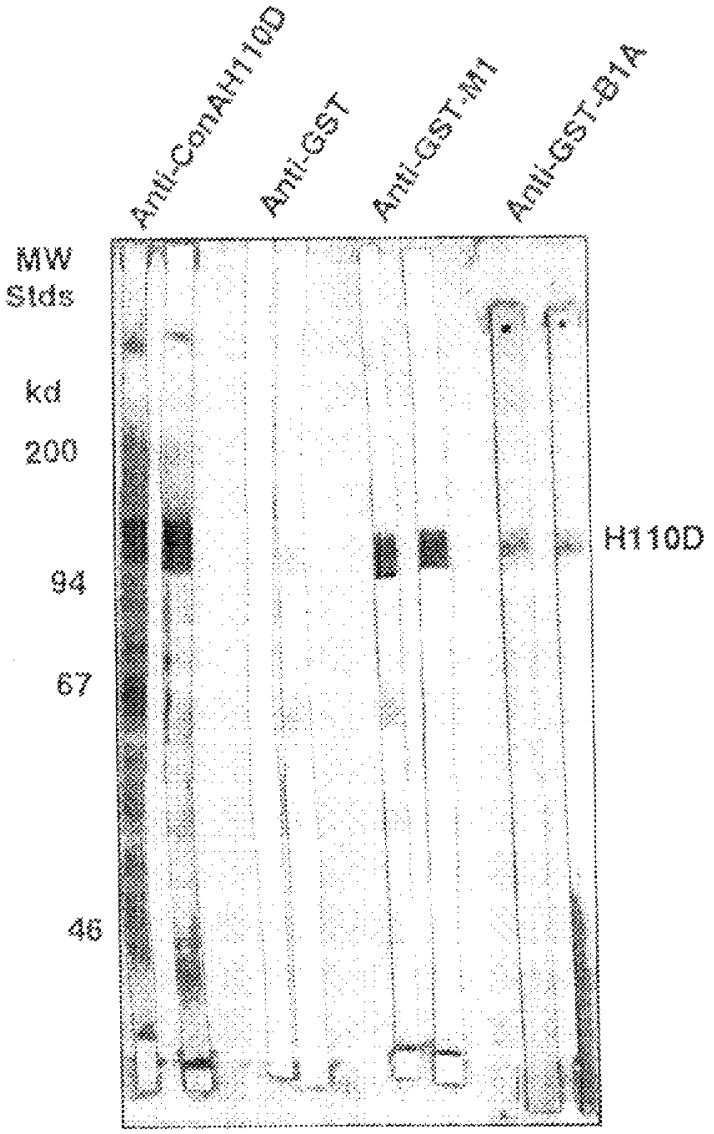




Фиг.11

RU 2140986 C1

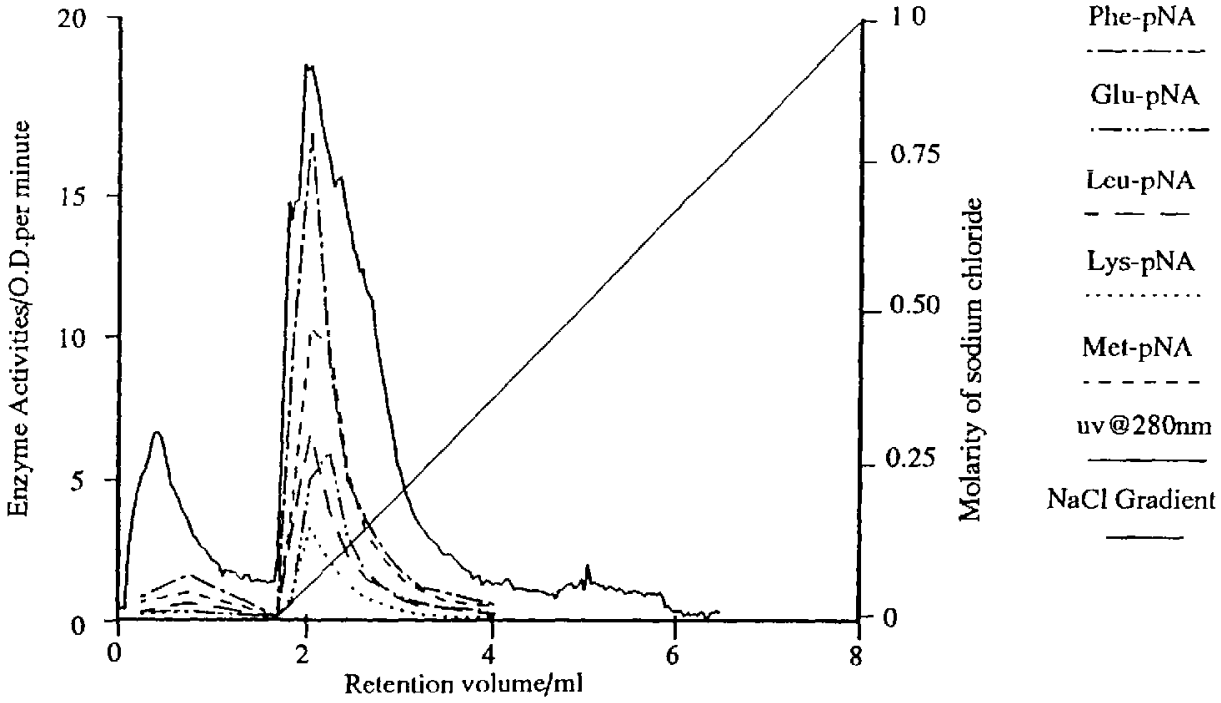
RU 2140986 C1



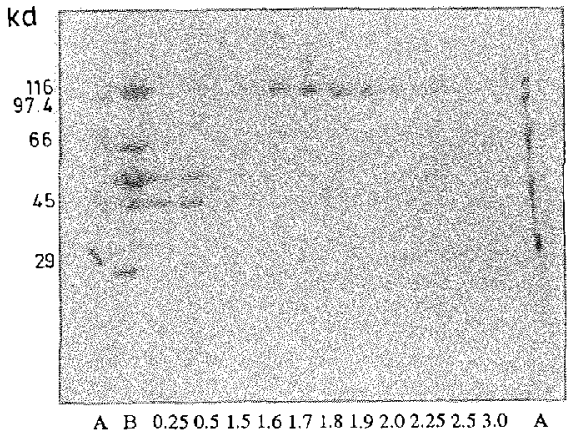
Фиг.12

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1



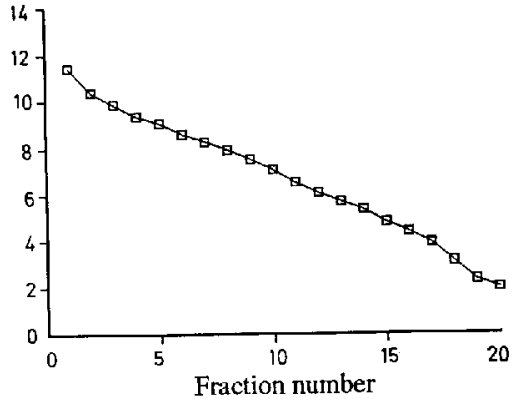
Фиг.13a



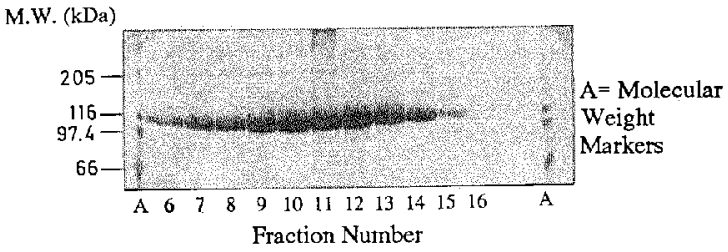
Фиг.13b

RU 2140986 C1

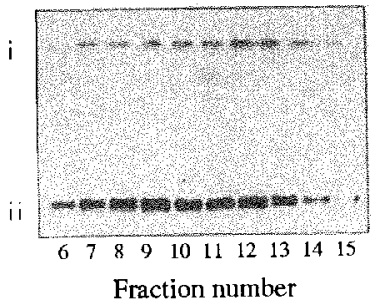
RU 2140986 C1



Фиг.14a



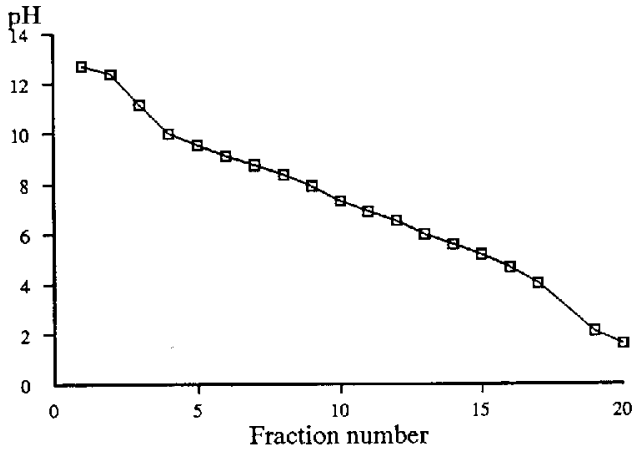
Фиг.14b



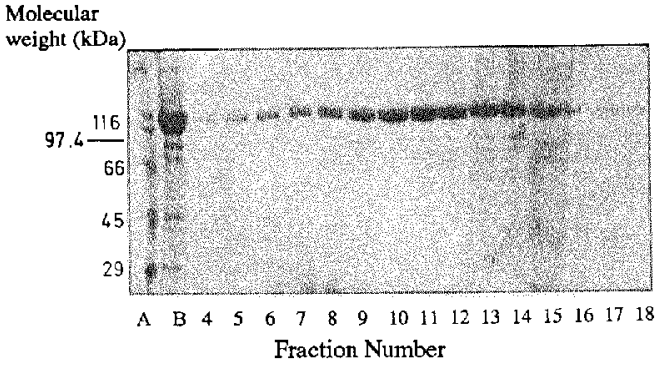
Фиг.14c

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1



Фиг.15a



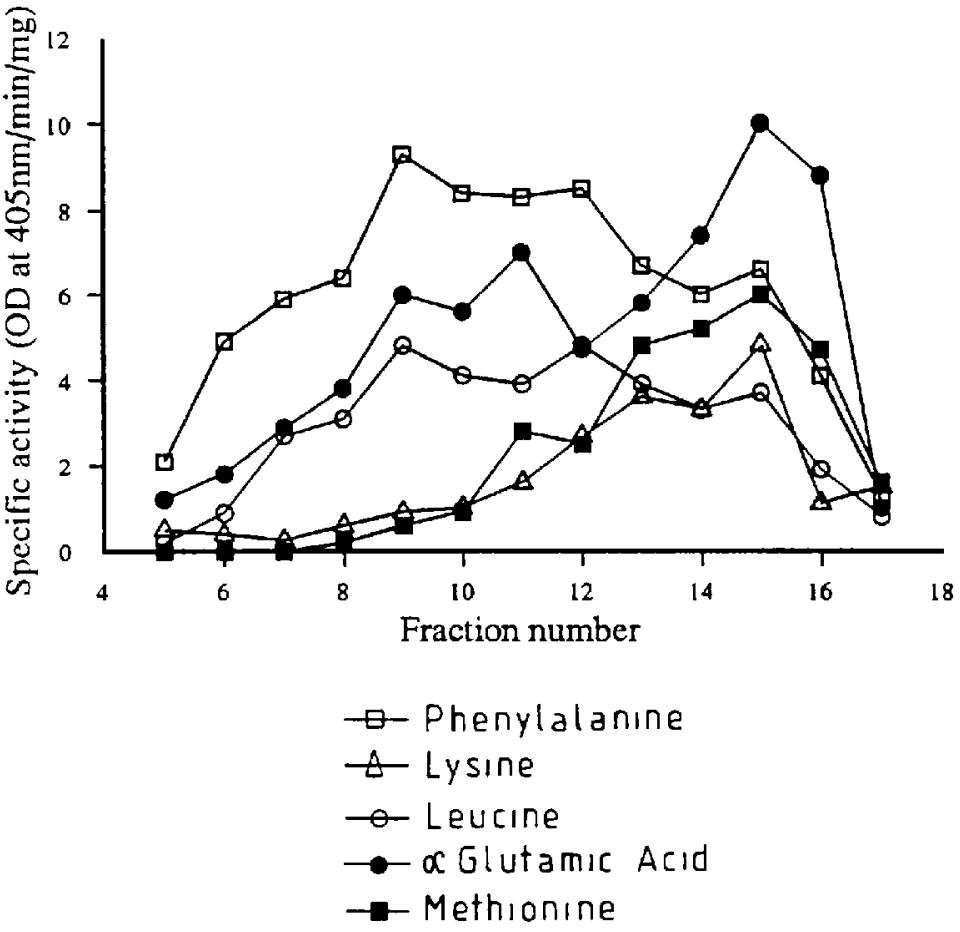
A= Molecular Weight Markers

B= ConA H110D starting material

Фиг.15b

RU 2140986 C1

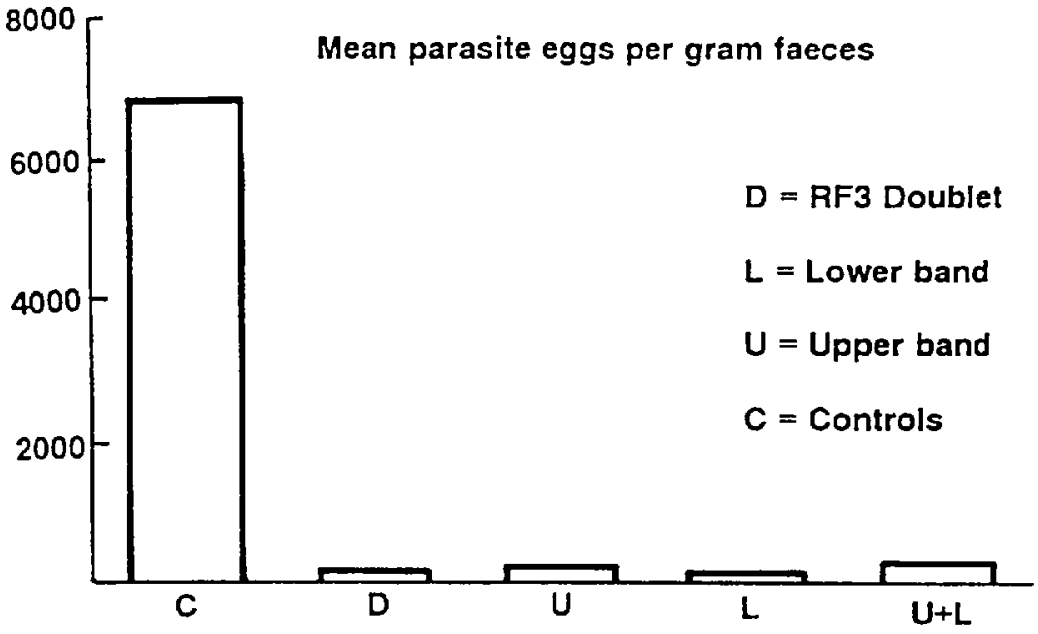
RU 2140986 C1



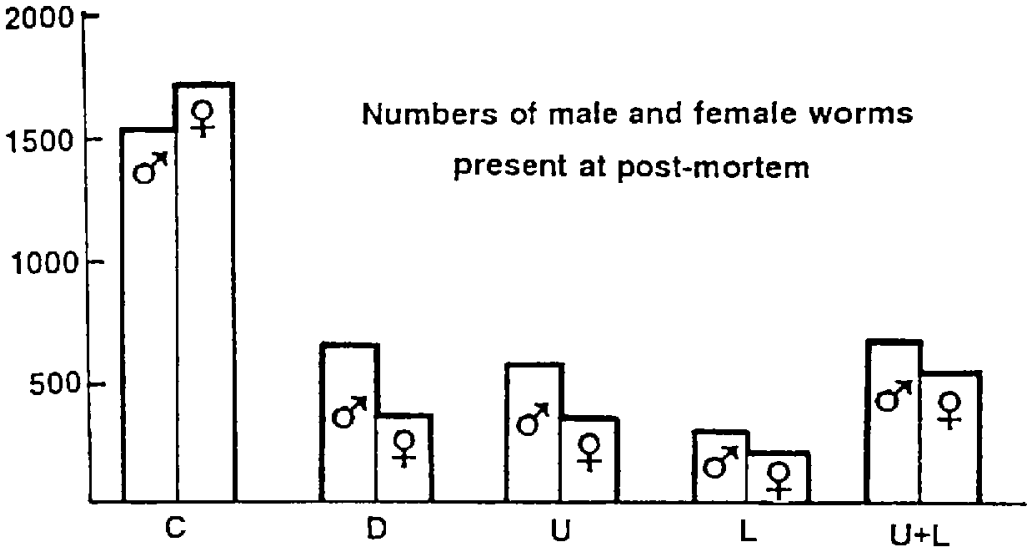
Фиг.15c

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1



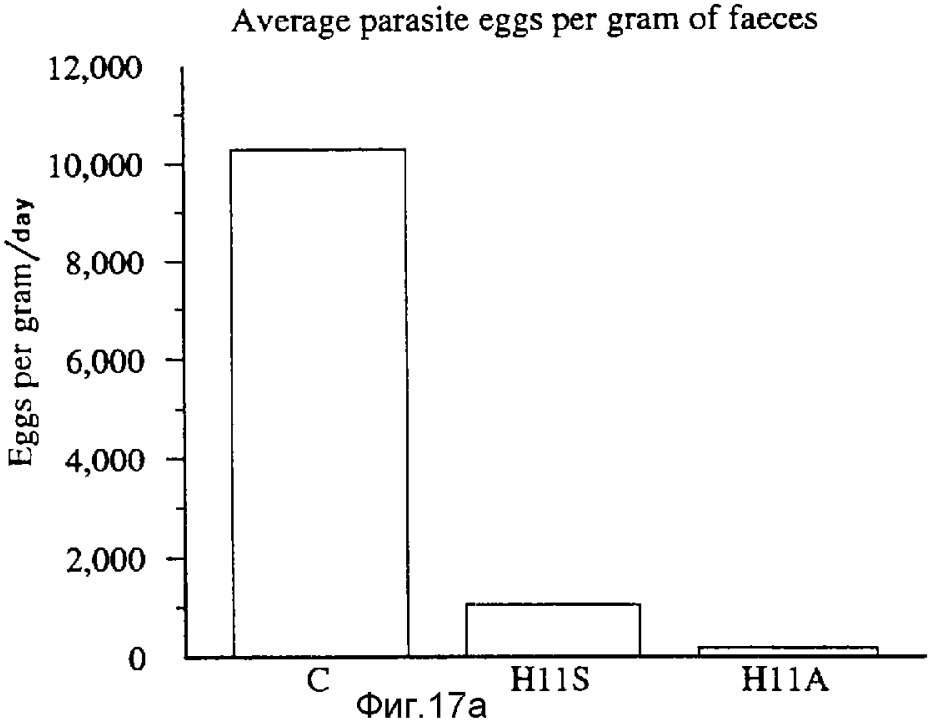
Фиг.16a



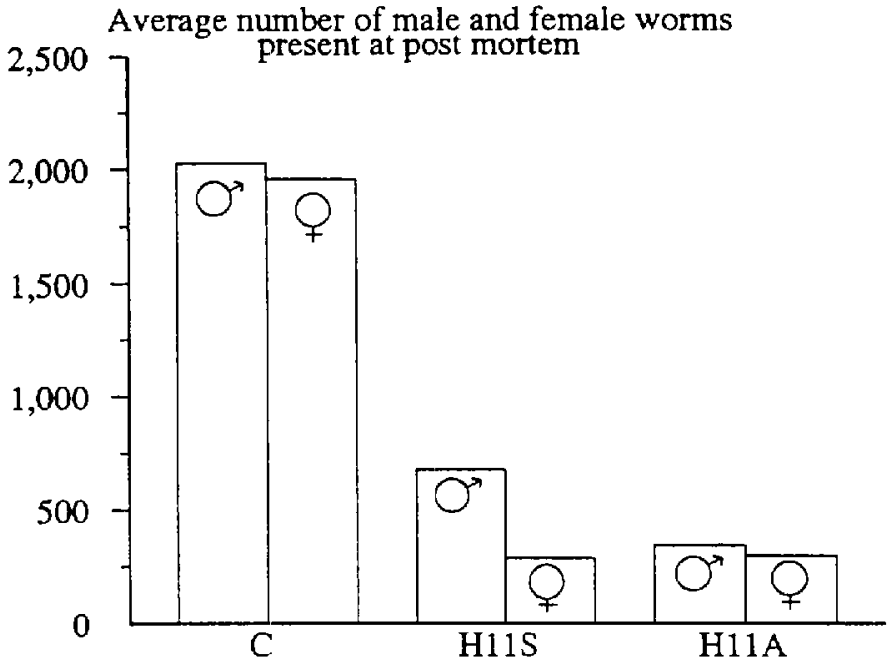
Фиг.16 b

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1



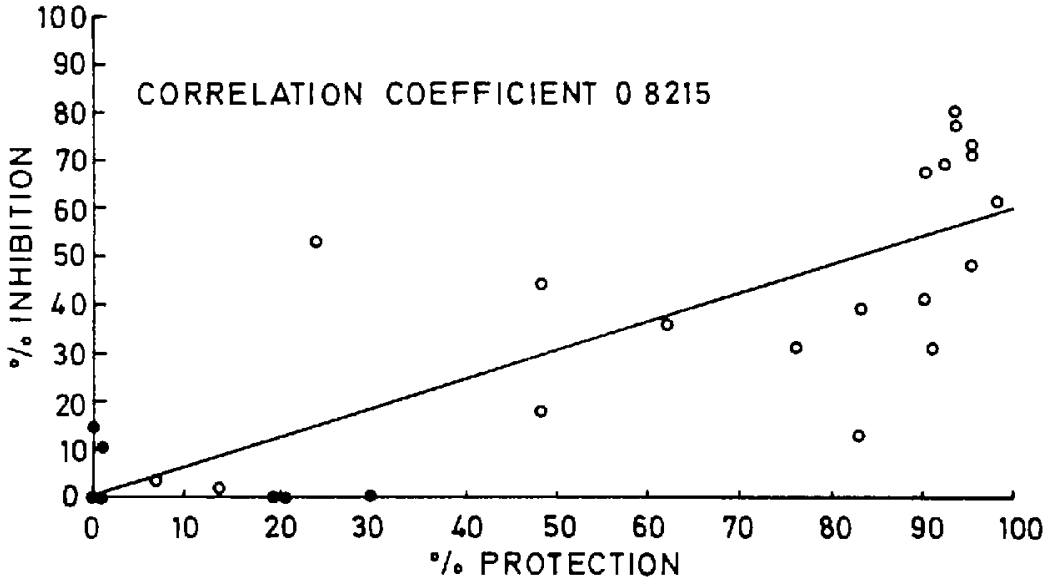
Фиг.17a



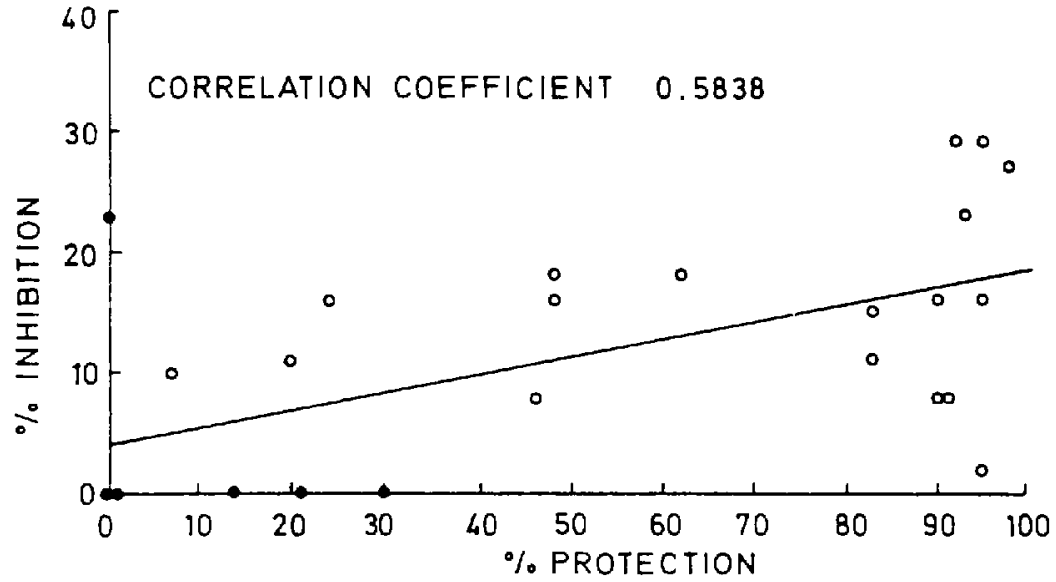
Фиг.17b

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1



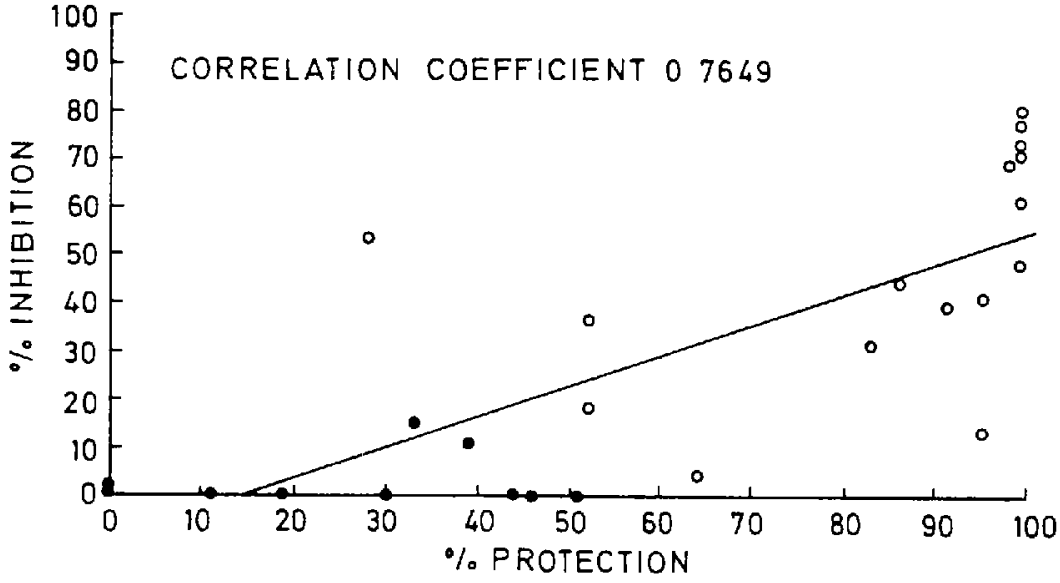
Фиг.18а) i



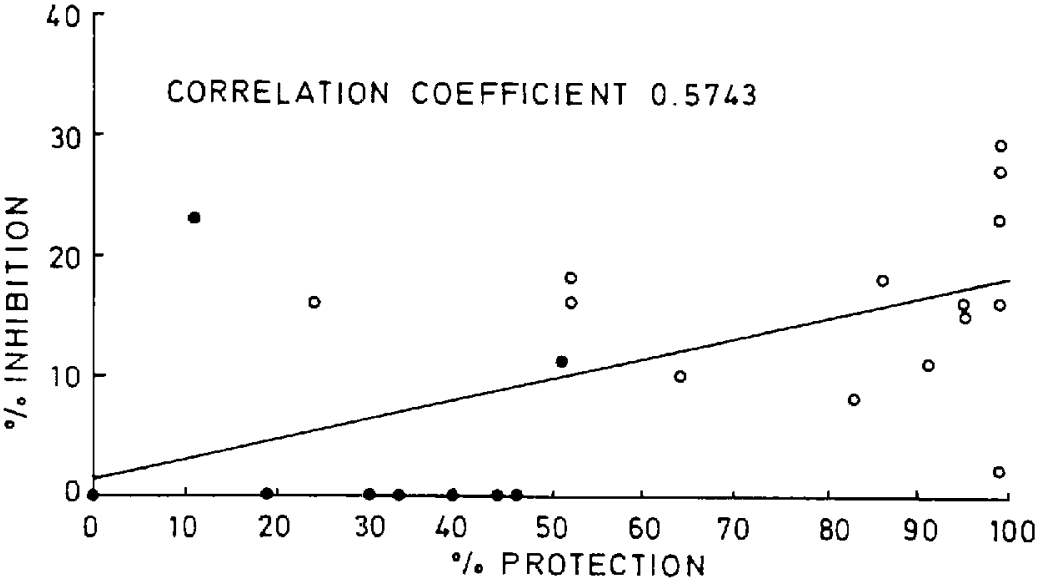
Фиг.18а) ii

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1



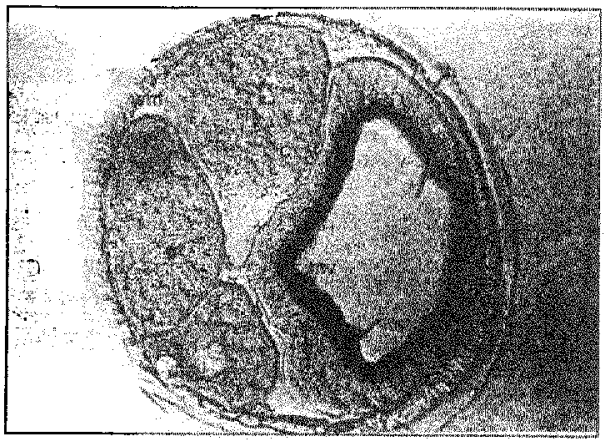
Фиг.18b) i



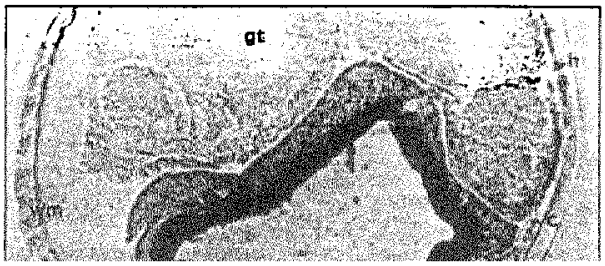
Фиг.18)b ii

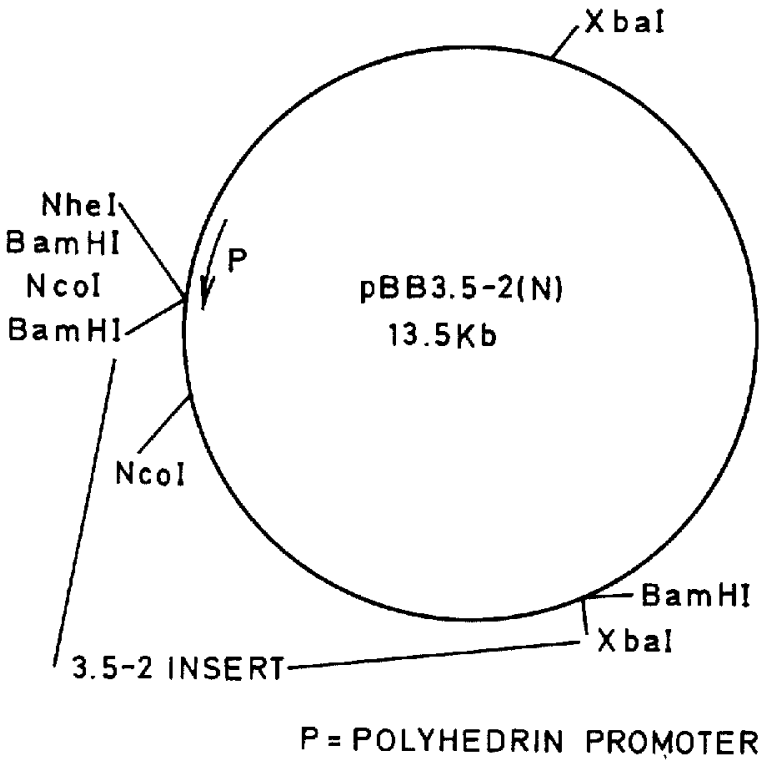
RU 2140986 C1

RU 2140986 C1



Фиг.19а

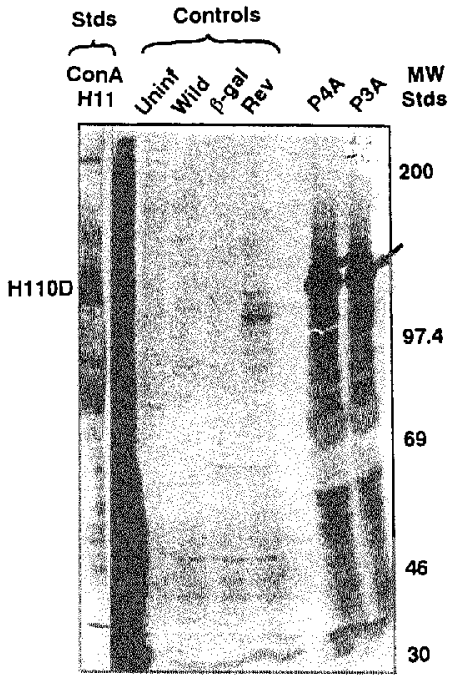




Фиг.20

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1



Фиг.21

RU 2140986 C1

RU 2140986 C1