



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013143210/10, 24.09.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
24.09.2013

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 24.09.2013

(43) Дата публикации заявки: 27.03.2015 Бюл. № 9

(45) Опубликовано: 20.08.2015 Бюл. № 23

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: US 5240832, 31.08.1993. OLIVJE W. et al., Molecular biology and biochemistry of human recombinant follicle stimulating hormone (Puregon), Molec.Human Reprod., 1996, v.2, n.5, p.371-382. RU 2012106207, 27.08.2013. US 20090291473 A1, 26.11.2009. KIM D.-J. et al., Highly expressed recombinant human follicle-stimulating hormone from Chinese hamster (см. прод.)

Адрес для переписки:

190000, Санкт-Петербург, ВОХ-сервис 1125,
"Патентика", Цветковой Е.О.

(72) Автор(ы):

ВОРОБЬЕВ Иван Иванович (RU),

ОРЛОВА Надежда Александровна (RU),

КОВНИР Сергей Владимирович (RU),

ХОДАК Юлия Александровна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Общество с ограниченной ответственностью
"АйВиФарма" (ООО "АйВиФарма") (RU)

(54) ПЛАЗМИДА ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ В КЛЕТКАХ СНО РЕКОМБИНАНТНОГО
Фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) человека, ПЛАЗМИДА ДЛЯ
ЭКСПРЕССИИ В КЛЕТКАХ СНО БЕТА-СУБЪЕДИНИЦЫ РЕКОМБИНАНТНОГО ФСГ ЧЕЛОВЕКА,
КЛЕТКА СНО - ПРОДУЦЕНТ РЕКОМБИНАНТНОГО ФСГ ЧЕЛОВЕКА И СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ
УКАЗАННОГО ГОРМОНА

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии и может быть использовано для рекомбинантного получения фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) человека. Конструируют плазмиду для экспрессии в клетках СНО рекомбинантного ФСГ человека, включающую область начала репликации плазмиды pUC, открытую рамку считывания бета-лактамазы (bla) и прокариотический промотор гена bla, участок терминального повтора вируса Эпштейн-Барр человека (EBVTR), функциональные элементы гена фактора элонгации 1 альфа китайского хомячка, последовательность Козак; открытые рамки

считывания альфа- и бета-субъединиц ФСГ человека с блоками стоп-кодона; внутренний сайт связывания рибосом (IRES) вируса EMCV; открытую рамку считывания дигидрофолатредуктазы (DHFR), экспрессирующуюся в составе трицистронной мРНК вместе с геном, кодирующим альфа- и бета-субъединицы ФСГ человека. Полученной плазмидой трансформируют клетку СНО с получением клетки-продуцента ФСГ. Клетка-продуцент может быть дополнительно трансформирована плазмидой, экспрессирующей бета-субъединицу ФСГ человека. Изобретение позволяет существенно повысить эффективность

продукции ФСГ человека в клетках СНО. 4 н. и 11 з.п. ф-лы, 7 ил., 3 табл., 10 пр.

(56) (продолжение):

ovary cells grown in serum-free medium and its effect on induction of folliculogenesis and ovulation, Fertil and Steril., 2010, v.93, n.8, p.2652-2660

R U 2 5 6 0 5 9 6 C 2

R U 2 5 6 0 5 9 6 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 560 596** (13) **C2**

(51) Int. Cl.

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/16 (2006.01)

C12N 15/79 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2013143210/10, 24.09.2013**

(24) Effective date for property rights:
24.09.2013

Priority:

(22) Date of filing: **24.09.2013**

(43) Application published: **27.03.2015** Bull. № 9

(45) Date of publication: **20.08.2015** Bull. № 23

Mail address:

**190000, Sankt-Peterburg, VOKh-servis 1125,
"Patentika", Tsvetkovoj E.O.**

(72) Inventor(s):

**VOROB'EV Ivan Ivanovich (RU),
ORLOVA Nadezhda Aleksandrovna (RU),
KOVNIR Sergej Vladimirovich (RU),
KhODAK Julija Aleksandrovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Obshchestvo s ogranichennoj otvetstvennost'ju
"AjViFarma" (OOO "AjViFarma") (RU)**

(54) EXPRESSION PLASMID FOR HUMAN RECOMBINANT FOLLICLE-STIMULATING HORMONE (FSH) IN CHO CELLS, EXPRESSION PLASMID FOR BETA-SUBUNIT OF HUMAN RECOMBINANT FSH IN CHO CELLS, CHO CELL PRODUCING HUMAN RECOMBINANT FSH, AND METHOD FOR PRODUCING ABOVE HORMONE

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention refers to biotechnology and can be used for the recombinant production of human follicle-stimulating hormone (FSH). The procedure involves constructing an expression plasmid for human recombinant FSH in CHO cells; the above plasmid contains a region of origin of replication of the pUC plasmid, a beta-lactamase (bla) open reading frame and a bla gene prokaryotic promoter, a human Epstein-Barr virus terminal repeat (EBVTR) site, functional elements of Chinese hamster elongation factor 1 alpha gene, Kozak sequence; open reading frames of alpha- and beta-subunits of human FSH with stop-codons; an

internal ribosomal entry site (IRES) of EMCV virus; an open reading frame of dihydrofolate reductase (DHFR) expressed as a part of tricistronic mRNA with the gene coding alpha- and beta-subunit of human FSH. The produced plasmid is used to transform a CHO cell to produce a FSH producer cell. The producer cell can be additionally transformed by the plasmid expressing the beta-subunit of human FSH.

EFFECT: invention enables substantially increasing the production effectiveness of human FSH in CHO cells.

15 cl, 7 dwg, 3 tbl, 10 ex

Область техники

Изобретение относится к биотехнологии, конкретно к способу получения рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона человека, который может быть использован в медицине, методом рекомбинантных ДНК.

5 Предшествующий уровень техники

Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) является незаменимым для нормального роста и созревания фолликулов и для образования половых стероидов у человека. У женщин уровень ФСГ является критичным для начала и протекания развития фолликулов и, следовательно, для установления определенного ритма созревания и количества достигающих зрелости фолликулов, у мужчин - для индукции и поддержания сперматогенеза. Вследствие этого рекомбинантные и нативные варианты фолликулостимулирующего гормона могут применяться для стимуляции развития фолликулов и образования стероидов во многих случаях нарушения половой функции. Существенная часть производимых лекарственных средств ФСГ используется при 15 применении вспомогательных репродуктивных технологий, проводимых под медицинским контролем, таких как экстракорпоральное оплодотворение и перенос эмбрионов (ЭКО/ПЭ), перенос гамет в маточную трубу (ГИФТ) и интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида (ИКСИ) (van Wely M. et al. (2011), "Recombinant versus urinary gonadotrophin for ovarian stimulation in assisted reproductive technology cycles". Cochrane Database of Syst. Rev., 2: CD005354).

В клинической практике препараты, содержащие ФСГ, обычно используют при ановуляторном бесплодии у женщин, а также при применении вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток с: (1) первым классом ановуляторного бесплодия (гипоталамо-гипофизарная недостаточность), для которого характерны 25 очень низкие содержания эндогенных ФСГ, лютеинизирующего гормона (ЛГ) и эстрадиола; (2) второго класса ановуляторного бесплодия (гипоталамо-гипофизарная дисфункция), для которого характерны низкий или нормальный уровень эндогенного ФСГ, высокое или нормальное содержание эндогенного ЛГ, высокий или нормальный уровень тестостерона, а также при наличии мужского фактора бесплодия (Dhont M. 30 (2005), "WHO-classification of anovulation: background, evidence, problems. International congress series. 1279:3-9).

На сегодняшний день существует два класса фармацевтических препаратов, содержащих ФСГ: полученные из мочи женщин в постменопаузе и полученные с использованием рекомбинантных ДНК. Препараты ФСГ мочевого происхождения 35 появились на рынке много лет назад (1958 г.) и на сегодняшний день представлены: высокоочищенными мочевыми гонадотропинами с биохимической чистотой ФСГ до 77-95% и содержащими около 2% активности ЛГ; мочевыми гонадотропинами с биохимической чистотой ФСГ до 70%, а также содержащими ЛГ, хорионический гонадотропин (ХГ) и существенные количества посторонних белков, не относящихся 40 к гонадотропинам. Применение технологии рекомбинантной ДНК позволило получить фармацевтические препараты ФСГ, содержащие рекомбинантный ФСГ человека с чистотой более 99% и не содержащих других гонадотропинов. Разработка новых методов и подходов, позволяющих получать большие количества рекомбинантного ФСГ в культивируемых клетках млекопитающих, представляет большой интерес для 45 фармацевтической промышленности вследствие постоянного роста потребления лекарственных препаратов ФСГ и низкой продуктивности разработанных в конце 80-х годов прошлого века систем экспрессии ФСГ, использованных для производства оригинальных препаратов рекомбинантного ФСГ. Оптимизация эукариотической

системы экспрессии рекомбинантного ФСГ, проведенная путем многократного увеличения удельной продуктивности получаемой моноклональной клеточной линии лежат в основе настоящего изобретения.

ФСГ - гетеродимерный гликопротеиновый гормон (34 кДа), продуцирующийся аденогипофизом. Он состоит из двух нековалентно связанных друг с другом субъединиц, кодирующихся разными генами (Pierce J.G., Parsons T.F. (1981), "Glycoprotein hormones: structure and function". *Annu. Rev. Biochem.*, 50:465-495). Альфа-субъединица ФСГ человека содержит 92 а.к. и также представлена в лютеинизирующем гормоне, хорионическом гонадотропине и тиреотропном гормоне (ТТГ). Все данные гормоны являются гетеродимерами одинаковой альфа-цепи и различных специфических бета-цепей (или субъединиц). Бета-субъединица ФСГ состоит из 111 а.к. Альфа- и бета-субъединицы ФСГ человека подвергаются N-гликозилированию по остаткам аспарагина альфа-52, альфа-78 и бета-7, бета-24 соответственно, что определяет высокую степень гликозилирования ФСГ до 35% в весовом соотношении, тем самым создавая микрогетерогенность гормона (Mulders J.W. et al. (1997). "Prediction of the in vivo Biological Activity of Human Recombinant Follicle Stimulating Hormone Using Quantitative Isoelectric Focusing". *Biologicals*, 25(3):269-81). Вторичные модификации углеводных цепей включают образование разветвленных структур на основе сиаловых кислот, количественный и качественный состав которых определяет время полужизни ФСГ в кровотоке, биологическую активность гормона in vivo и способность к активации рецепторов ФСГ in vitro (Ulloa-Aguirre A. et al. (1995). "Follicle-stimulating isohormones: characterization and physiological relevance". *Endocr Rev.*; 16(6):765-87). Изогормоны ФСГ с изоэлектрической точкой (pI) 5.5 в 2-3 раза превышают способность к активации рецепторов ФСГ в тестах in vitro изогормонами с pI 4.3, в то же время наиболее кислые формы изогормонов ФСГ (pI 3.5) имеют в 100-200 раз большую биологическую активность в тестах in vivo, по сравнению с изогормонами, имеющими pI 5.5 (Mulders J.W. et al. (1999). "Prediction of the in-vivo biological activity of human recombinant follicle-stimulating hormone using quantitative isoelectric focusing. Optimization of the model". *Pharm. Pharmacol. Commun.*, 5:51-55).

Известен самый первый способ создания векторов, кодирующих альфа- и бета-субъединицы ФСГ человека, и генетическая модификация этими векторами культивируемых клеток мыши линии С127 в целях получения рекомбинантного ФСГ (патенты США 4923805, 5156957). Для экспрессии генов альфа- и бета-субъединиц ФСГ, содержащих все экзоны и интроны, используются две независимые плазмидные конструкции pRF375 и CL28FSH2.8BPV соответственно. Недостатком описанного способа является использование для экспрессии целевых генов металлотеонеинового промотора (МТ) мыши, который не является наиболее сильным для экспрессии белков в эукариотических клетках. Также полученные плазмиды не были использованы для создания стабильной линии клеток-продуцентов полноразмерного ФСГ человека, поэтому неизвестен уровень секреции рекомбинантного ФСГ в культуральную среду при использовании полученных плазмид.

Известен способ получения векторов, кодирующих альфа- и бета-субъединицы ФСГ человека, и генетическая модификация этими векторами культивируемых клеток китайского хомяка линии CHO (Keene J.L. et al. (1989). "Expression of biologically active human follitropin in Chinese hamster ovary cells". *J. Biol. Chem.*, 264:4769-4775). Гены альфа- и бета-субъединицы ФСГ, содержащие интроны и экзоны, клонируют в векторы pM²/α и pM² соответственно, экспрессия субъединиц находится под контролем промотора вируса саркомы мышей Харви (LTR). К недостаткам этого способа относится

использование генов субъединиц ФСГ человека, содержащих интроны, которые могут содержать как энхенсерные, так и сайленсерные регуляторные элементы, положительно и отрицательно влияющие на экспрессию кодируемого белка. Обе созданные плазмиды содержат последовательность, обеспечивающую устойчивость трансфицированных

5 клеток к селективному антибиотику - генетицину (G418), тогда как использование двух селективных антибиотиков и последовательности дигидрофолатредуктазы мыши (DHFR) для селективного отбора и амплификации являются более перспективными при создании генетической модификации клеточных культур. При описании данного способа не указывается продуктивность по целевому белку полученной клеточной линии, а также

10 на протяжении скольких пассажей сохраняется продукция ФСГ.

Известен другой способ создания эукариотических продуцентов рекомбинантных гетеродимерных гормонов человека, в том числе ФСГ (патент США 5240832). Способ основан на получении двух независимых плазмидных конструкций. Первая плазида создана на основе вектора CLN3AXSC2DHFR и содержит полноразмерный ген альфа-субъединицы

15 ФСГ человека, а также открытую рамку считывания DHFR для селективного отбора и амплификации в эукариотических клетках. Вторая плазида создана на основе вектора CLN3AXSC20DOC и содержит кДНК бета-субъединицы ФСГ человека, ген орнитин декарбоксилазы (ODC) мыши для селективного отбора трансформантов. Экспрессия генов обеих субъединиц ФСГ находится под контролем

20 МТ промотора. С помощью котрансфекции линии клеток DUKX CHO двумя вышеописанными плазмидами с последующей их амплификацией в среде с добавлением 200 мМ метотрексата (MTX) получают несколько линий клеток-продуцентов ФСГ. Уровень секреции полноразмерного ФСГ в культуральную среду по 9 полученным

25 линиям составляет в среднем 1,25 мкг/10⁶ клеток/день. К недостаткам этого метода относится использование полноразмерного гена альфа-субъединицы ФСГ человека, так как интроны могут содержать сайленсерные регуляторные элементы, отрицательно влияющие на экспрессию кодируемого белка в процессе культивирования. При описании

данного способа не указывается конечная концентрация секретируемого ФСГ (т.н. вольюметрическая продуктивность) и число пассажей культуры до падения уровня

30 секреции.

Известен способ создания продуцентов рекомбинантного человеческого ФСГ на основе линии клеток CHO-K1 (Olijve W. et al. (1996). "Molecular biology and biochemistry of human recombinant folliclestimulating hormone" Mol. Hum. Rep., 2(5):371-382). Ген альфа-субъединицы

35 ФСГ, содержащий интроны, и открытую рамку считывания бета-субъединицы ФСГ клонируют в вектор рKMS, созданный на основе вектора рBR327, с получением вектора рKMS.FSHαβγ, в котором экспрессия гена альфа-субъединицы находится под контролем раннего вирусного промотора SV40, с содержанием энхенсерных последовательностей SV40, а бета-субъединицы - под контролем

40 металлотеонеинового промотора (MT-II), с содержанием энхенсерных последовательностей вируса лейкемии мышей (MuLV). Амплификацию плазмиды в геноме эукариотических клеток CHO-K1 обеспечивает открытая рамка считывания дигидрофолатредуктазы мыши, присутствующая в векторе рKMS.FSHαβγ. Клетки CHO-K1 котрансфицируют плазмидами рKMS.FSHαβγ и вспомогательной плазмидой

45 рAG60/MT2, содержащей ген металлотеонеина и ген устойчивости к неомицину, которые обеспечивают резистентность культуры клеток к тяжелым металлам (Cd²⁺) и селективному антибиотику генетицину (G418) соответственно. Продуктивность линии-продуцента сохраняется при культивировании в биореакторе на микроносителях на

протяжении 3-х месяцев и составляет $5-8 \text{ ME}/10^6$ клеток/день, что приблизительно соответствует $0,5-0,8 \text{ мкг}/10^6$ клеток/день. Данный способ обладает недостатками, а именно: для экспрессии гетерологического белка в эукариотической системе используются неоптимальные промоторы - металлотеонеиновый (MT-II) и вирусный (SV40), активность последнего может подавляться клетками в процессе культивирования. Также наличие интронов в клонированной последовательности альфа-субъединицы ФСГ может индуцировать отрицательную регуляцию экспрессии этой субъединицы в клетках.

Известен способ получения плазмиды рХМ17ss#6 для экспрессии альфа- и бета-субъединиц ФСГ человека в клетках эукариот, которая способна экспрессировать оптимизированные кодирующие синтетические последовательности альфа- и бета-субъединиц ФСГ (патентная заявка США 20120034655 А1). К недостаткам данного метода относится выбор неоптимальных вирусных промоторов (SV40 и CMV), проведение только временной трансфекции полученной плазмидой без проведения амплификации экспрессионной кассеты метотрексатом и дальнейшей селекции антибиотиком, так как известно, что свойства поликлональной культуры клеток после проведения временной трансфекции и стабильно-трансфицированной клеточной культуры могут значительно различаться как по стабильности, так и по продуктивности целевого белка.

Известен способ создания клеток-продуцентов ФСГ с использованием синтетических генов альфа- и бета-субъединиц ФСГ человека (патентная заявка РФ №2012106207). Синтетический ген альфа-субъединицы ФСГ человека клонируют в вектор рсDNA-ТОРО (Invitrogen, США) с получением плазмиды рсDNA/FSНальфа, для получения плазмиды рOptiVEC/FSНбета синтетический ген бета-субъединицы клонируют в вектор рOptiVEC-ТОРО (Invitrogen, США). В обеих полученных плаزمиде экспрессия альфа- и бета-субъединиц ФСГ находится под контролем конститутивного промотора цитомегаловируса (CMV), плаزمида рсDNA/FSНальфа содержит ген устойчивости к антибиотику неомицин для селекции стабильных клеточных линий генетицином, плазмида рOptiVEC/FSНбета содержит последовательность дигидрофолатредуктазы. После проведения котрансфекции клеток линии CHO K1 DXB11 полученными плазмидами, получают линию клеток huFSHIK, которая способна секретировать в культуральную среду полноразмерный гормон ФСГ в количестве $1,5 \text{ мкг}/10^6$ клеток/день в течение 30 пассажей при культивировании с МТХ (в селективных условиях) и, по крайней мере, в течение 15 пассажей без МТХ (в неселективных условиях). Данный метод обладает следующими недостатками. Для экспрессии генов обеих субъединиц ФСГ используется промотор цитомегаловируса (CMV), эффективность которого для экспрессии генов-интереса может изменяться как в течение культивирования модифицированной культуры клеток, так и при криоконсервации клеточной культуры, что может приводить к снижению продуктивности экспрессии каждого из генов двух субъединиц и впоследствии к значительному стехиометрическому дисбалансу в продукции альфа- и бета-субъединиц ФСГ. Также при получении клеток-продуцентов ФСГ клетки культивировали в присутствии 50-100 нМ метотрексата, что недостаточно для получения максимальной амплификации экспрессионных кассет в геноме. Синтетические последовательности открытых рамок считывания альфа- и бета-субъединиц ФСГ были получены путем оптимизации кодонов для экспрессии в млекопитающих, в то же время известно, что оптимизация кодонов и другие манипуляции с кодирующей последовательностью могут приводить к снижению уровней экспрессии

целевых генов. Культивирование генетически модифицированных плазмидами клеток проводили в среде с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота (FBS), что также является недостатком описанного метода ввиду неэкономичности использования FBS при промышленном культивировании клеток, а также наличии риска потери продуктивности клеточной культуры при адаптации к росту в бессывороточной среде культивирования и постоянному риску контаминации промышленной культуры вирусами крупного рогатого скота и прионами.

Известны способ получения вектора, содержащего гены альфа- и бета-субъединицы ФСГ человека, и линия-продуцент рекомбинантного ФСГ, полученная после трансфекции созданным вектором линии клеток DUKX-B11 CHO (Yoon S.K. et al. (2007). "Effect of culture temperature on follicle-stimulating hormone production by Chinese hamster ovary cells in a perfusion bioreactor". Appl. Microbiol. Biotechnol., 76:83-89). Из описания способа неизвестно, какой вектор и структурные элементы были использованы для создания экспрессионной плазмиды. С помощью данного способа получают стабильную клеточную линию, способную при культивировании в биореакторе с перфузией при 28°C продуцировать ФСГ в количестве более 10 мкг/10⁶ клеток/день. К недостаткам данного способа относится возможность получения продуцируемого ФСГ на высоком уровне лишь в течение 8 дней их культивирования (с 15 по 23 день культивирования).

Известен способ получения двух плазмид, кодирующих альфа- и бета-субъединицы ФСГ на основе вектора pLCED, созданного с использованием модифицированного вектора pCDM8 (Invitrogen, США) (Kim D.J. et al. (2010). "Highly expressed recombinant human follicle-stimulating hormone from Chinese hamster ovary cells grown in serum-free medium and its effect on induction of folliculogenesis and ovulation". Fertil. Steril., 93:2652-60).

Открытую рамку считывания обеих субъединиц получают с помощью последовательно проведенных полимеразных цепных реакций (ПЦР) и клонируют в отдельный вектор pLCED. Экспрессия субъединиц в клетках СНО начинается независимо по контролю вирусного промотора (CMV), причем обе плазмиды способны экспрессировать также ген DHFR, связанный с генами субъединиц участком, содержащим сайт внутреннего связывания рибосом (IRES). Продуктивность получаемой клональной линии составляет 0,0085 мМЕ/клетку/48 часов, что составляет приблизительно 0,425 мкг/10⁶ клеток/день. К недостаткам данного способа относится использование неоптимальных вирусных промоторов и невысокий уровень продукции ФСГ. Информация о стабильности полученной культуры к продукции ФСГ также отсутствует.

Известен способ создания продуцента ФСГ, в котором последовательность, кодирующую альфа-субъединицу ФСГ, клонируют в вектор pE-neo, а последовательность, кодирующую бета-субъединицу, - в вектор pE-hygr (патентная заявка США 2009/0291473 A1). кДНК альфа-субъединицы получают путем ПЦР из библиотеки кДНК человеческой плаценты, а кДНК бета-субъединицы из библиотеки кДНК человеческого гипофиза. Клетки линии СНО котрансфицируют полученными плазмидами и производят селекцию клонов с использованием антибиотиков - гигромицина и генетицина (G418), получают клеточную линию, адаптированную к росту в суспензии в бессывороточной среде, продуктивность которой не превышает 1 мкг ФСГ/10⁶ клеток/день. При данном способе для индукции экспрессии обеих субъединиц используется промотор EF-1 (коровая область промотора фактора элонгации трансляции 1 человека), который является относительно слабым промотором для экспрессии белков в клетках грызунов. Стабильность продукции ФСГ линией-продуцентом в данной заявке не упоминается.

Известны способы повышения биологической активности рекомбинантного ФСГ за счет увеличения его гликозилирования (патентные заявки США 2009/0018070 A1, 2005/0100989 A1) и добавления С-концевого пептида (СТР, carboxyterminalpeptide) бета-субъединицы человеческого хорионического гонадотропина к бета-субъединице ФСГ (патенты США 5338835 и 5585345).

Краткое описание настоящего изобретения

Технической задачей, решаемой авторами, являлось создание высокопродуктивной технологии получения рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона человека для биофармацевтического производства.

Технический результат достигался путем создания пары новых совместимых экспрессионных плазмидных ДНК р1.1-FSH-AIB и р1.2-Hygro-B-chain, кодирующих открытые рамки считывания альфа- и бета-цепей гетеродимерного белка фолликулостимулирующего гормона человека и создание на их основе клональной клеточной линии-продуцента.

В основе данной технологии лежит разработанная пара совместимых плазмидных ДНК р1.1-FSH-AIB (длина 13222 пар оснований, SEQ ID NO:1, Фиг.1) и р1.2-Hygro-B-chain (длина 12811 пар оснований, SEQ ID NO:4, Фиг.2).

Плазида р1.1-FSH-AIB состоит из:

- фрагмента ДНК длиной 1324 п.о., в следующей последовательности содержащего:
- последовательность 363 п.о. (SEQ ID NO:1 4079-4441), содержащую синтетическую последовательность Козак (сайт кэп-зависимой инициации трансляции), SEQ ID NO:1 4079-4087), обеспечивающую инициацию трансляции мРНК, и ОРС альфа-субъединицы фолликулостимулирующего гормона человека (SEQ ID NO:1 4088-4438) с блоком стоп-кодонов (SEQ ID NO:1 4436-4441),

- последовательность 955 п.о. (SEQ ID NO:1 4448-5402), содержащую последовательность IRES вируса энцефаломиокардита (EMCV) дикого типа (SEQ ID NO:1 4448-5012), обеспечивающую бицистронную экспрессию в животных клетках, и ОРС бета-субъединицы фолликулостимулирующего гормона человека (SEQ ID NO:1 5010-5399) с блоком стоп-кодонов (SEQ ID NO:1 5397-5402); и

- фрагмента ДНК длиной 11898 п.о. плазмиды р1.1 (SEQ ID NO:1 5403-13222, 1-4074, Фиг.3), в следующей последовательности содержащего регуляторные элементы, обеспечивающие экспрессию целевого белка:

- последовательность IRES вируса энцефаломиокардита (EMCV), обеспечивающая бицистронную экспрессию в животных клетках, (SEQ ID NO:1 5423-6010) и

- последовательность фактора устойчивости трансфицированных клеток к воздействию метотрексата - дигидрофолатредуктазы (DHFR) (SEQ ID NO:1 6023-6586),

- 3' нетранслируемую область (3'НТО) гена фактора элонгации 1 альфа китайского хомячка, включающую терминатор и сигнал полиаденилирования этого гена, а также фланкирующие нетранскрибируемые области этого гена, обеспечивающие

- эухроматинизацию сайтов инсерции и транскрипционную активность генетической кассеты в геноме CHO (SEQ ID NO:1 6588-10846);

- область начала репликации плазмиды рUC, открытую рамку считывания бета-лактамазы (bla) и прокариотический промотор гена bla, обеспечивающей устойчивость бактерий к антибиотику ампициллину, позволяющие проводить препаративную наработку плазмиды в E.coli (SEQ ID NO:1 11000-10846), и участок терминального повтора вируса Эпштейн-Барр человека (EBVTR) (SEQ ID NO:1 12810-13211);

- 5' нетранслируемую область (5'НТО) гена фактора элонгации 1 альфа китайского хомячка, включающие фланкирующие нетранскрибируемые области этого гена,

обеспечивающие эухроматинизацию сайтов инсерции и транскрипционную активность генетической кассеты в геноме CHO, и его функциональный промотор (SEQ ID NO:1 11-4074).

Плазмида p1.2-Hygro-B-chain состоит из:

- 5 - фрагмента ДНК, длиной 402 п.о., в следующей последовательности содержащего, последовательность 363 п.о. (SEQ ID NO:4 12409-12810), содержащую синтетическую последовательность Козак (сайт кэп-зависимой инициации трансляции, SEQ ID NO:1 12409-12417), обеспечивающую инициацию трансляции мРНК, и ОРС цепи бета-субъединицы фолликулостимулирующего гормона человека (SEQ ID NO:1 12418-12804)
- 10 с блоком стоп-кодона (SEQ ID NO:1 12805-12810),
- фрагмента 12409 п.о. плазмиды p1.2 (SEQ ID NO:4 1-12408, Фиг.4), в следующей последовательности содержащего регуляторные элементы, обеспечивающие экспрессию целевого белка:
- 3' нетранслируемую область (3'НТО) гена фактора элонгации 1 альфа китайского хомячка, включающую терминатор и сигнал полиаденилирования этого гена, а также фланкирующие нетранскрибируемые области этого гена, обеспечивающие эухроматинизацию сайтов инсерции и транскрипционную активность генетической кассеты в геноме CHO (SEQ ID NO:4 1-4257);
- промотор вируса SV40, последовательность фактора устойчивости
- 20 трансфицированных клеток к селекционному маркеру - антибиотику гигромицину, сигнал полиаденилирования и терминатор вируса SV40 (SEQ ID NO:4 4292-5946),
- область начала репликации плазмиды pUC, открытую рамку считывания бета-лактамазы (bla) и прокариотический промотор гена bla, обеспечивающей устойчивость бактерий к антибиотику ампициллину, позволяющие проводить препаративную
- 25 наработку плазмиды в E.coli (SEQ ID NO:4 6108-6781),
- участок терминального повтора вируса Эпштейн-Барр человека (EBVTR) (SEQ ID NO:4 7918-8319),
- 5' нетранслируемую область (5'НТО) гена фактора элонгации 1 альфа китайского хомячка, включающую фланкирующие нетранскрибируемые области этого гена,
- 30 обеспечивающие эухроматинизацию сайтов инсерции и транскрипционную активность генетической кассеты в геноме CHO функциональный промотор этого гена, а также его функциональный промотор (SEQ ID NO:4 8331-12401).

Плазмида p1.1-FSH-AIB имеет размер 13222 п.о. и содержит уникальные сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции NheI (1), AgeI (2396), AscI (5464), PvuI (6857),

35 BstBI (11863), AbsI (11894), XbaI (12080).

Плазмида p1.2-Hygro-B-chain имеет размер 12811 п.о. и содержит уникальные сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции AgeI (1209), KpnI (4143), NdeI (5120), PsiI (5844), SalI (5962), SmaI (10487), FseI (11171), AbsI (12404).

Плазмиды были последовательно введены методом электротрансфекции (Straus S.E. et al., J. Virol., 1981, Jul; 39(1):290-4) в клетки линии CHO-S (Invitrogen, США; кат. № R800-07), адаптированной к бессывороточной ростовой среде и выделенной в виде отдельного субклона из клеточной линии CHO-K1. После введения в клетки

40 линеаризованной плазмиды p1.1-FSH-AIB вели культивацию в безбелковой среде, не содержащей гипоксантин и тимидин, и дополнительно содержащей 1 мкМ ингибитора DHFR метотрексата (MTX) до восстановления жизнеспособности клеток более 85%.

45 После этого была проведена амплификация целевых генов цепей ФСГ в геноме путем последовательных культивировании в присутствии возрастающих концентраций метотрексата до концентрации MTX 8 мкМ. Была получена поликлональная популяция

клеток, устойчивых к высокой концентрации МТХ и продуцирующих увеличенные количества ФСГ и значительные количества свободной альфа-цепи ФСГ. Клетки данной популяции трансфицировали плазмидой p1.2-Hygro-B-chain, после чего культивировали в присутствии 8 мкМ МТХ и 750 мкг/мл гигромицина до восстановления

- жизнеспособности клеток более 85%. Была получена популяция клеток, секретирующих большее количество гетеродимера ФСГ. Клетки данной популяции подвергли клонированию методом предельных разведений. Полученные клоны клеток-продуцентов были проанализированы методом иммуоферментного анализа, и были отобраны клоны, дающие максимальный уровень экспрессии гетеродимера ФСГ. Среди них был выбран клон С-Р1.3-FSH-G4, при культивировании которого в суспензионной культуре в бессывороточной среде конечная концентрация фолликулостимулирующего гормона человека составляла 36,5 мкг/мл при конечной концентрации клеток 1,55 млн/мл, удельная продуктивность не менее 10 пг/клетка/день. Полученная клеточная линия С-Р1.3-FSH-G4 депонирована во Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов (ВКПМ) под регистрационным номером ВКПМ Н-140.

- Целью настоящего изобретения является предоставление плазмид для экспрессии рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона человека, в частности плазмид p1.1-FSH-AIB и p1.2-Hygro-B-chain. Также целью настоящего изобретения является предоставление моноклональной линии клеток млекопитающего, в частности клеток яичника китайского хомячка, - продуцентов рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона человека, содержащей в геноме множественные копии экспрессионных кассет, соответствующих линейаризованным экспрессионным плазмидам, в частности плазмидам p1.1-FSH-AIB и p1.2-Hygro-B-chain. Иллюстративным примером указанной моноклональной линии клеток являются клетки яичника китайского хомячка клона С-Р1.3-FSH-G4.

Также целью настоящего изобретения является предоставление способа получения рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона человека с использованием указанных клеток.

Подробное описание настоящего изобретения

- Для реализации настоящего изобретения главной технической задачей явилось создание технологии высокопродуктивного получения рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона человека для биофармацевтического производства с использованием культивируемых клеток яичника китайского хомячка, адаптированных к суспензионному культивированию в безбелковой среде, содержащих в геноме множественные копии генетических кассет, представляющих собой линейаризованные экспрессионные плазмиды, содержащих фрагмент ДНК, кодирующих альфа- и бета-цепи фолликулостимулирующего гормона человека под контролем промотора и регуляторных элементов, функционирующих в эукариотической клетке.

- Термин «экспрессионная плазида» («экспрессионная плазмидная ДНК») означает плазмидную ДНК, содержащую все необходимые генетические элементы для экспрессии внедренного в него гена, например, такие как промотор, терминатор, сигнал полиаденилирования. Конкретным примером генетических элементов, необходимых для экспрессии рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона в составе экспрессионной кассеты согласно настоящему изобретению, является, но не ограничивается им, промотор гена фактора элонгации 1 альфа китайского хомячка.

Фрагментами ДНК, кодирующими рекомбинантный фолликулостимулирующий гормон человека согласно настоящему изобретению, являются гены, кодирующие ОРС полипептидов альфа- и бета-цепей ФСГ, которые могут быть получены, например, как

указано в Примере 1. Также указанные фрагменты ДНК могут быть получены, например, с использованием технологии клонирования фирмы SloningBioTechnology, описанной в заявке РСТ WO2005071077.

Последовательность искусственного гена, кодирующего ОРС обеих субъединиц рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона человека согласно настоящему изобретению, представлена в Перечне последовательностей под номером SEQ ID NO:1 (цепь альфа-субъединицы - нуклеотиды 4088-4438, цепь бета-субъединицы - нуклеотиды 5010-5399). Аминокислотная последовательность секретируемого фолликулостимулирующего гормона человека согласно настоящему изобретению представлена в Перечне последовательностей под номерами SEQ ID NO:2 и 3, и представляет собой продукт трансляции нуклеотидов 4088-4438 и 5010-5399 последовательности ОРС SEQ ID NO:1, включая 24 аминокислоты N-концевого сигнального пептида альфа-цепи и 18 аминокислот N-концевого сигнального пептида бета-цепи, отделяющихся при посттрансляционном процессинге цепей ФСГ и отсутствующих в зрелом секретированном гетеродимерном белке. Часть молекул цепей ФСГ может быть секретирована в свободной форме, для целей настоящего изобретения важно накопление только двуцепочечной формы гетеродимера цепей ФСГ в культуральной среде.

Чтобы обеспечить эффективную трансляцию гена в клетках китайского хомячка, предпочтительно, чтобы ОРС предварялась последовательностью для кэп-зависимой инициации трансляции (последовательность Козак), например, синтетической. Для кэп-независимой инициации трансляции предпочтительно использование вирусных регуляторных элементов класса сайтов внутреннего связывания рибосом (IRES).

Фрагменты ДНК, которые кодируют по существу тот же белок, могут быть получены, например, путем модификации нуклеотидной последовательности фрагмента ДНК SEQ ID NO:1 (цепь альфа-нуклеотиды 4088-4438, цепь бета-нуклеотиды 5010-5399), например, посредством метода сайт-направленного мутагенеза, так, что один или несколько аминокислотных остатков в определенном сайте будут делегированы, заменены, вставлены или добавлены. Фрагменты ДНК, модифицированные, как описано выше, могут быть получены с помощью традиционных методов обработки с целью получения мутации. Фрагменты ДНК, которые кодируют по существу такой же функциональный белок, могут быть выявлены путем экспрессии фрагментов ДНК, имеющих мутацию, описанную выше, в соответствующей клетке и установления активности экспрессируемого продукта.

ФСГ - гетеродимерный гликопротеиновый гормон (34 кДа), продуцирующийся аденогипофизом, и состоит из двух нековалентно связанных друг с другом субъединиц, кодирующихся разными генами (Pierce J.G., Parsons T.F. (1981), "Glycoprotein hormones: structure and function". Annu. Rev. Biochem., 50:465-495).

Показатели функциональной активности, при которой считается, что полученный белок обладает свойствами рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона человека, определяются по его способности стимулировать рост фолликулов. Так, например, биологическую активность рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона человека можно определить с помощью теста Steelman-Pohley, по линейному увеличению веса яичников крыс в зависимости от вводимой дозы препарата ФСГ (Steelman S.L., Pohley F.M. (1953) "Assay of the follicle stimulating hormone based on the augmentation with human chorionic gonadotropin". Endocrinology, 53:604-16). Концентрацию гетеродимерного фолликулостимулирующего гормона человека определяют при помощи иммуоферментного анализа в сравнении со стандартом, в качестве которого

можно использовать образцы плазмы крови женщин, калиброванные против первичного международного стандарта ФСГ, изготавливаемого Всемирной Организацией Здравоохранения, например стандарта NIBSC code: 08/282. Удельную активность фолликулостимулирующего гормона человека определяют как отношение активности и концентрации ФСГ и выражают в МЕ/мг. Считается, что вариант белка обладает свойствами рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона человека при условии, что удельная активность указанного варианта составляет не ниже 1% от удельной активности природного фолликулостимулирующего гормона человека, выделяемого из мочи, то есть не менее 60 МЕ/мг.

Экспрессионная плаزمида согласно настоящему изобретению содержит фрагмент ДНК, кодирующий цепи альфа- и бета-субъединиц фолликулостимулирующего гормона человека или индивидуальную цепь бета-субъединицы ФСГ человека под контролем промотора и регуляторных элементов, функционирующих в эукариотической клетке. В качестве рекомбинантной плазмиды согласно настоящему изобретению могут использоваться различные плазмиды, обладающие способностью к экспрессии в клетке-реципиенте, такие как плазмиды pcDNA3.1, pCMV-Мус, pDEF38 и подобные им, но список плазмид не ограничивается ими.

Пара совместимых плазмид согласно настоящему изобретению означает две такие экспрессионные плазмиды, которые могут быть использованы для одновременной или последовательной трансфекции культивируемых клеток млекопитающих и последующей селекции стабильно трансфицированных клеток. Необходимым условием совместимости векторов является наличие в их составе различных генов устойчивости к действию селекционных агентов, сообщающих трансфицированным клеткам устойчивость к действию только одного из нескольких используемых селекционных агентов.

Экспрессионные плазмиды из пары совместимых плазмид могут кодировать ген, содержащий ОРС одной или обеих цепей ФСГ.

Конкретным вариантом реализации настоящего изобретения является пара совместимых плазмид p1.1-FSH-AIB (длина 13222 пар оснований, SEQ ID NO:1, Фиг.1) и p1.2-Hygro-B-chain (длина 12811 пар оснований, SEQ ID NO:4, Фиг.2), которые содержат следующие функциональные элементы, перечисленные в порядке их расположения:

Для плазмиды p1.1-FSH-AIB

1. область начала репликации плазмиды pUC (11000-11673), открытую рамку считывания бета-лактамазы (bla) (11815-122675) и прокариотический промотор гена bla (12670-12774), позволяющие проводить препаративную наработку плазмиды в E.coli;

2. участок терминального повтора вируса Эпштейн-Барр человека (EBVTR), представляющий собой фрагмент конкатемера терминальных повторов вируса Эпштейна-Барр (12810-13211), обеспечивающей увеличение частоты интеграции генетической кассеты в геном клеток СНО и увеличение скорости амплификации кассеты в геноме;

3. фрагмент последовательности, фланкирующей ген фактора элонгации 1 альфа китайского хомячка «выше по течению» (1-4071), включающий нетранскрибируемые области этого гена, промотор этого гена, первый интрон этого гена, обеспечивающий конститутивную экспрессию гена фолликулостимулирующего гормона человека в геноме клеток СНО;

4. синтетическую последовательность Козак (сайт связывания рибосом) (4079-4087), обеспечивающую кэп-зависимую инициацию трансляции мРНК в животных клетках;

5. последовательность, кодирующую открытую рамку считывания альфа-субъединицы фолликулостимулирующего гормона человека (4088-4438) с блоком стоп-кодона

(4436-4441);

6. последовательность внутреннего сайта связывания рибосом вируса энцефаломиокардита EMCV дикого типа (4448-5012), обеспечивающая кэп-независимую инициацию трансляции полицистронных РНК в животных клетках;

5 7. последовательность, кодирующую открытую рамку считывания бета-субъединицы фолликулостимулирующего гормона человека (5010-5399) с блоком стоп-кодона (5397-5402);

8. последовательность аттенюированного внутреннего сайта связывания рибосом вируса энцефаломиокардита EMCV (5423-6010), обеспечивающую кэп-независимую
10 инициацию трансляции полицистронных РНК в животных клетках;

9. последовательность, кодирующую открытую рамку считывания дигидрофоллатредуктазы (6023-6586) - фактора устойчивости трансфицированных клеток к воздействию метотрексата;

10. фрагмент последовательности, фланкирующей ген фактора элонгации 1 альфа
15 китайского хомячка «ниже по течению» (6588-10846), включающий терминатор и сигнал полиаденилирования, а также нетранскрибируемые области этого гена, обеспечивающий конститутивную экспрессию гена фолликулостимулирующего гормона человека в геноме клеток СНО.

Для плазмиды p1.2-Hygro-B-chain:

20 1. область начала репликации плазмиды pUC (6108-6781), открытую рамку считывания бета-лактамазы (bla) (6923-7783) и прокариотический промотор гена bla (7778 7882), позволяющие проводить препаративную наработку плазмиды в E.coli;

2. участок терминального повтора вируса Эпштейн-Барр человека (EBVTR), представляющий собой фрагмент конкатемера терминальных повторов вируса
25 Эпштейна-Барр (7918-8319), обеспечивающей увеличение частоты интеграции генетической кассеты в геном клеток СНО и увеличение скорости амплификации кассеты в геноме;

3. фрагмент последовательности, фланкирующей ген фактора элонгации 1 альфа китайского хомячка «выше по течению» (8331-12401), включающий нетранскрибируемые
30 области этого гена, промотор этого гена, первый интрон этого гена, обеспечивающий конститутивную экспрессию гена бета-цепи фолликулостимулирующего гормона человека в геноме клеток СНО;

4. синтетическую последовательность Козак (сайт связывания рибосом) (12409-12417), обеспечивающую кэп-зависимую инициацию трансляции мРНК в животных клетках;

35 5. последовательность, кодирующую открытую рамку считывания бета цепи фолликулостимулирующего гормона человека (12418-12804) с блоком стоп-кодона (12805-12810);

6. фрагмент последовательности, фланкирующей ген фактора элонгации 1 альфа китайского хомячка «ниже по течению» (1-4257), включающий терминатор и сигнал
40 полиаденилирования, а также нетранскрибируемые области этого гена, обеспечивающий конститутивную экспрессию гена бета-субъединицы фолликулостимулирующего гормона человека в геноме клеток СНО.

7. последовательность фактора устойчивости трансфицированных клеток к селекционному маркеру - антибиотику гигромицину (4669-5694) и регуляторные
45 элементы для его экспрессии - промотор (4292-4572), сигнал полиаденилирования и терминатор вируса SV40 (5827-5946).

Плазида p1.1-FSH-AIB содержит уникальные сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции NheI (1), AgeI (2396), AscI (5464), PvuI (6857), BstBI (11863), AbsI (11894), XbaI

(12080).

Плазмида p1.2-Hygro-B-chain содержит уникальные сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции AgeI (1209), KpnI (4143), NdeI (5120), PsiI (5844), SalI (5962), SwaI (10487), FseI (11171), AbsI (12404).

5 Структура плазмиды p1.1-FSH-AIB приведена на Фигуре 1.

Структура плазмиды p1.2-Hygro-B-chain приведена на Фигуре 2.

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

Плазмида p1.2-Hygro-B-chain сконструирована на базе экспрессионной плазмиды
30 p1.2 для моноцистронной экспрессии, и подробно описанной в патентной заявке РФ 2013122048, целиком включенной в настоящее описание посредством ссылки. Плазмида p1.2 содержит функциональные промотор и терминатор гена фактора элонгации 1 альфа китайского хомячка, обеспечивающие конститутивную экспрессию целевого гена в клетках CHO, фланкированные 5' и 3' НТО этого гена, обеспечивающими
35 эухроматинизацию сайтов интеграции экспрессионной кассеты в геном CHO; участок для клонирования открытых рамок считывания целевых белков; участок терминального повтора вируса Эпштейн-Барр человека (EBVTR), обеспечивающий повышенный уровень интеграции кассет в геном клеток CHO и кассету, обеспечивающую экспрессию селекционного маркера гена устойчивости к антибиотику, под контролем генетических
40 элементов для экспрессии в клетках млекопитающего. Использование плазмиды p1.2 позволяет осуществлять высокочастотную интеграцию экспрессионной кассеты в клетках млекопитающих, а также получать линии-продуценты с высоким уровнем продукции целевого белка при одновременной или последовательной трансфекции культивируемых клеток млекопитающих плазмидами на основе p1.1 и p1.2 и
45 последующей селекции стабильно трансфицированных клеток.

При помощи созданных плазмид согласно настоящему изобретению, в частности плазмид p1.1-FSH-AIB и p1.2-Hygro-B-chain, можно трансформировать эукариотическую клетку, предпочтительно иммортализованную клетку яичника китайского хомячка.

Выбор конкретной линии клеток не является критическим, поскольку методология и приемы трансформации хорошо известны специалисту в данной области техники. После проведения одного или нескольких раундов селекции и клонирования популяции трансформированных клеток могут быть получены клональные линии-продуценты рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона человека. Методология и приемы селекции и клонирования клеток известны специалисту в данной области техники. И хотя в зависимости от вида клетки и условий культивирования и селекции трансформантов уровень экспрессии фолликулостимулирующего гормона человека может варьироваться, факт транзientной экспрессии целевого белка будет иметь место при условии успешной трансформации клетки - реципиента, факт стабильной экспрессии целевого белка будет иметь место при успешном проведении раунда селекции популяции клеток-трансформантов.

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

Согласно настоящему изобретению «клеточная линия - продуцент фолликулостимулирующего гормона человека» означает клональную линию клеток млекопитающих, обладающую способностью к продукции и секреции фолликулостимулирующего гормона человека, когда она согласно настоящему изобретению выращивается в указанной питательной среде. Используемый здесь термин «клеточная линия - продуцент фолликулостимулирующего гормона человека» также означает линию клеток, которые способна секретировать фолликулостимулирующий гормон человека в количестве не менее чем 1 мкг/мл при концентрации клеток 1-2 млн/мл, более предпочтительно не менее чем 10 мкг/мл при концентрации клеток 1-2 млн/мл при культивировании в суспензионной культуре в бессывороточной среде. Указанный фолликулостимулирующий гормон человека секретируется указанными клетками в культуральную жидкость.

Среди клеток млекопитающих предпочтительно использование клеток китайского хомячка (*Cricetulus griseus*), предпочтительно клеток яичника (CHO). В качестве примера предпочтительных клеток яичника китайского хомячка может быть приведена линия CHO-S (Invitrogen, США; кат. № R800-07) (1. Puck, T. (1958) J. Exp. Med. 108, 945. 2.

Deaven, L.L. and Petersen, D.F. (1973) Chromosoma 41, 129. 3. D'Anna, J.A. (1996) Methods in Cell Science 18, 115. 4. D'Anna, J.A. et al. (1997) Radiation Research 148, 260. 5. Schifferli, K. et al. (1999) Focus 21, 16. 6. Ciccarone, V. et al. (1999) Focus 21, 54). Круг сублиний CHO не ограничен каким-либо образом, например могут быть использованы сублинии CHO CHOZN DHFR, CHO DUKXB11, CHO DG-44 и подобные им.

Конкретным примером линии для получения продуцента фолликулостимулирующего гормона человека согласно настоящему изобретению является линия CHO-S, но спектр линий клеток не ограничивается ей.

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

- Данные по видовой принадлежности: китайский хомячок *Cricetulus griseus*, яичник.
- Контроль видовой идентичности: кариологический, изоферментный (ЛДГ и Г6ФДГ).
- Маркерные признаки и методы их оценки: иммунологические, цитогенетические, биохимические, физиологические:

- Морфология: эпителиоподобная.

- Происхождение, вид клеток: стабильная диплоидная суспензионная клеточная линия CHO-S (Invitrogen, США; кат. № R800-07), адаптированная к бессывороточной ростовой среде, выделена в виде отдельного субклона из клеточной линии CHO K1.

- Признаки опухолевого роста *in vivo*, *in vitro*: отсутствуют.

- Онкогены: отсутствуют.

- Морфология клеточной линии: при анализе в световой микроскоп, культура представлена суспензией круглых клеток с овальным ядром, содержащих небольшие эндосомы, время удвоения 16-18 часов.

- Культуральные свойства, маркерные признаки: клетки адаптированы к росту в среде ProCHO 4 (Lonza, Швейцария) без добавления сыворотки, с добавлением L-глутамина 8 мМ.

- Рекомендуемые условия для замораживания: замораживать клетки при плотности $\geq 2,0 \times 10^6$ живых клеток/мл; ростовая среда, 10% ДМСО.

- Рекомендуемые условия для культивирования: клетки культивируют в колбах Эрленмеера с рабочим объемом 30 мл, 125 мл или 500 мл на орбитальном шейкере при 120-140 об/мин в увлажненной атмосфере при 5% CO₂ при температуре 37°C.

Пассирование клеток производят каждые 2-3 дня путем разбавления суспензии клеток свежей средой с кратностью 1:4-1:8. Плотность посева $0,2-0,3 \times 10^6$ клеток/мл, максимальная плотность $3,0 \times 10^6$ клеток/мл.

Трансформация клеток линии CHO-S плазмидами p1.1-FSH-AIB (длина 13222 пар оснований, SEQ ID NO:1, Фиг.1) и p1.2-Hygro-B-chain (длина 12811 пар оснований, SEQ ID NO:4, Фиг.2) с последующей селекцией, аплификацией трансгена, кодируемого плазмидой p1.1-FSH-AIB, и клонированием приводит к получению клеточных линий-продуцентов рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона человека.

Линия-продуцент C-P1.3-FSH-G4 обеспечивает синтез и секрецию рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона человека в количестве 36,5 мкг фолликулостимулирующего гормона на 1 мл среды при концентрации клеток 1,55 млн/мл при культивировании в суспензионной культуре в бессывороточной среде. Линия-продуцент C-P1.3-FSH-G4 депонирована во Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов (ВКПМ) под регистрационным номером ВКПМ Н-140.

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

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

Питательная среда, используемая для культивирования, может быть как синтетической, так и натуральной при условии, что указанная среда содержит источники углерода, азота, незаменимые аминокислоты, нуклеозиды, незаменимые липиды, минеральные добавки, инсулин и, если необходимо, соответствующее количество питательных добавок, требующихся для роста клеток. В качестве источника углерода могут использоваться различные углеводы, такие как глюкоза или сахароза и другие

органические соединения. В качестве источника азота может использоваться аминокислота глутамин или ее дипептиды или природные источники азота, такие как соевый гидролизат. В качестве минеральных добавок могут использоваться фосфат калия, сульфат магния, хлорид натрия, сульфат железа, сульфат марганца, хлорид кальция и подобные им соединения. В качестве витаминов могут использоваться тиамин, дрожжевой экстракт и т.п.

Для получения фармацевтически пригодного фолликулостимулирующего гормона человека предпочтительно использование бессывороточной питательной среды для культивирования.

Выращивание может осуществляться в аэробных условиях, предпочтительно с повышенным содержанием CO_2 (8%), таких как перемешивание культуральной жидкости в колбах, при температуре в пределах от 20 до 40°C, предпочтительно в пределах от 34 до 38°C. Обычно выращивание в течение от 24 часов до 20 дней приводит к накоплению целевого рекомбинантного белка в культуральной среде. После выращивания твердые остатки, такие как клетки и их фрагменты, могут быть удалены из культуральной жидкости методом центрифугирования, а затем целевой белок может быть выделен и очищен методами хроматографии и/или концентрирования.

Особенности созданных экспрессионных плазмид, линии клеток и результаты практического применения изобретения приведены на следующих фигурах.

Краткое описание фигур

На Фигуре 1 показана карта экспрессионной плазмиды p1.1-FSH-AIB (длина 13222 пар оснований). Используются следующие обозначения: pUC origin - область начала репликации плазмиды pUC; bla - открытая рамка считывания бета-лактамазы, обеспечивающей устойчивость к ампициллину; bla promoter - прокариотический промотор гена bla; EBV TR - участок терминального повтора вируса Эпштейна-Барр человека; 5' CNEF функциональный промотор гена фактора элонгации 1 альфа китайского хомячка, фланкированный 5' НТО этого гена; transcription start - точка начала транскрипции; 3' CNEF функциональный терминатор и сигнал полиаденилирования гена фактора элонгации 1 альфа китайского хомячка, фланкированный 3' НТО этого гена; pA - сигнал полиаденилирования; EMCV IRES - внутренний сайт связывания рибосом вируса энцефаломиокардита (EMCV) дикого типа; art EMCV IRES - аттенуированный внутренний сайт связывания рибосом вируса энцефаломиокардита (EMCV); DHFR - открытая рамка считывания дигидрофолатредуктазы мыши для селективного отбора и амплификации в эукариотических клетках; Kozak - область, кодирующая последовательность Козак для кэп-зависимой инициации трансляции, FSH-A-chain - ОРС альфа-субъединицы ФСГ; FSH-B-chain - ОРС бета-субъединицы ФСГ, stop - блок стоп-кодона. Стрелками указаны направления транскрипции генов, в скобках указаны номера первого и последнего нуклеотидов фрагментов. Курсивом выделены сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции, в скобках указаны номера нуклеотидов в точках разрезания.

На Фигуре 2 показана карта экспрессионной плазмиды p1.2-Hygro-B-chain (длина 12811 пар оснований). Используются обозначения аналогично фигуре 1, а также SV40 promoter - область промотора вируса SV40; SV40pA, terminator - терминатор и сигнал полиаденилирования вируса SV40; hygB - ОРС гена устойчивости к гигромицину.

На Фигуре 3 показана карта экспрессионного вектора p1.1. Используются обозначения аналогично фигуре 1.

На Фигуре 4 показана карта экспрессионного вектора p1.2-Hygro. Используются обозначения аналогично фигуре 2.

На Фигуре 5 показана схема получения плазмид p1.1-FSH-AIB и p1.2-Hygro-B-chain. Обозначения: сплошной линией обозначены стадии рестрикции-лигирования, названия использованных эндонуклеаз рестрикции указаны курсивом.

На Фигуре 6 показана электрофореграмма препаратов ФСГ, полученных после хроматографической очистки ФСГ из кондиционированной культуральной среды при помощи сорбентов Capto MMC и Blue Sepharose. Обозначения: М - маркер, MMC1, MMC2, MMC3-элюаты с колонки CaptoMMC (первая, вторая и третья порции соответственно), BS_FF - проскок с колонки Blue Sepharose (первая порция), BS_EL - элюат с колонки Blue Sepharose (первая порция). +DTT - пробы с добавленным DTT, прогретые 3 мин 75°C, -DTT - пробы без прогрева и добавления DTT.

Молекулярная масса полос маркера указана в кДа, положение гетеродимера ФСГ и мономеров цепей указаны звездочками.

На Фигуре 7 показана зависимость веса яичников крыс от дозы введенного п/к исследуемого препарата ФСГ. Размер групп - 5 особей, по 1 инъекции в день в течение трех дней, контрольная группа получала инъекции физиологического раствора, объем инъектированных растворов одинаков во всех группах (300 мкл/животное).

Практическая применимость настоящего изобретения иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1. Дизайн, получение и верификация последовательности ДНК конструкций, кодирующих альфа- и бета-субъединицы фолликулостимулирующего гормона человека pUC57-Kan-AIB и pUC57-Kan-BIA

Для расчета синтетической ДНК, кодирующей ОРС цепей ФСГ, были использованы природные последовательности гена, в силу того что по имеющимся литературным данным оптимизация кодонов и другие манипуляции с кодирующей последовательностью могут приводить к снижению уровней экспрессии целевых генов <http://www.freepatentsonline.com/y2012/0034655.html>.

В качестве источника последовательности природного гена использованы данные из публичной базы данных GenBank. Для ОРС бета-субъединицы - NM_000510.2 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/66528900>) (приведенные варианты транскрипции кодируют одинаковую рамку считывания), для ОРС альфа-субъединицы - NM_000735.3 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_000735.3 (использовали транскрипционный вариант 2, имеющий длину, совпадающую с указанной для фоллитропина альфа).

Фрагменты ДНК, кодирующие цепи альфа- и бета-субъединицы фолликулостимулирующего гормона человека, а также содержащие между ОРС субъединиц внутренний сайт связывания рибосом вируса EMCV (IRES), были синтезированы по заказу (Genscript, США). Были созданы два варианта сборки синтетического гена - «альфа-цепь ФСГ-IRES-бета-цепь ФСГ» («AIB») и «бета-цепь ФСГ-IRES-альфа-цепь ФСГ» («BIA»), фланкированные адапторными сайтами узнавания эндонуклеаз рестрикции, для последующего субклонирования.

Для получения плазмиды pUC57-Kan-FSH-AIB синтетический фрагмент FSH-AIB (Genscript, США) был клонирован в плазмиду pUC57-Kan (GENEWIZ, Inc., США).

Для получения плазмиды pUC57-Kan-FSH-BIA синтетический фрагмент FSH-BIA (Genscript, США) был клонирован в плазмиду pUC57-Kan (GENEWIZ, Inc., США).

Конструкции, содержащие ОРС цепей в плазмидном векторе pUC57-Kan, были трансформированы в клетки Top10 (F⁻ mcrAΔ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacZX15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galUgalKrrpsL (Str^R) endA1 nupG) (Invitrogen, Великобритания). Для этого к 200 мкл замороженной суспензии клеток E.coli добавляли 5 мкл лигазной смеси, инкубировали на льду 30 минут для сорбции плазмидной ДНК,

нагревали до 42°C на 60 секунд и инкубировали на льду 5 минут. После чего добавляли 800 мкл питательного бульона SOC (20 г/л триптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 0,5 г/л NaCl, 250 mM KCl, 10 mM MgC₂) и инкубировали при 37°C в течение 60 минут. После инкубации переносили суспензию на чашку Петри с твердой агаризованной средой 2хYT-агар (16 г/л триптона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л NaCl, 18 г/л агара), содержащей канамицин в концентрации 30 мкг/мл, и помещали в термостат на 37°C на 18 часов. Отдельные клоны трансформантов инокулировали в 5 мл питательного бульона LB с добавлением канамицина в концентрации 30 мкг/мл, наращивали 18 часов при 37°C и выделяли плазмидную ДНК набором реактивов "WizardPlusSVMinipreps" («Promega», США) по протоколу производителя. Полностью секвенировали области вставки полученных плазмид с праймеров M13f и M13rev (SEQ ID NO:13 и 14) с использованием набора BigDye® Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (AppliedBiosystems, США) и капиллярного секвенатора ABI PRISM 3730 Genetic Analyzer (AppliedBiosystems, США), анализ данных вели при помощи программы Chromas 1.45 (Technelysium Pty Ltd, Australia).

Полученные плазмиды, содержащие гены цепей альфа и бета фолликулостимулирующего гормона человека и сайт внутренней инициации трансляции EMCV, использовали для получения экспрессионных конструкций.

Пример 2. Создание экспрессионных конструкций p1.1-FSH-AIB и p1.1-FSH-BIA, кодирующих альфа- и бета-субъединицы фолликулостимулирующего гормона человека

На базе плазмидного вектора p1.1, описанного в российской патентной заявке 2011146243 (Фиг.3, SEQ ID NO:5), созданы экспрессионные конструкции для трицистронной экспрессии генов альфа- и бета-субъединиц фолликулостимулирующего гормона человека и ОРС дигидрофолатредуктазы мыши. Схема клонирования плазмиды p1.1-FSH-AIB приведена на Фиг.5. Плазида p1.1-FSH-BIA была получена аналогичным способом.

Плазмиды pUC57-Kan-FSH-AIB и pUC57-Kan-FSH-BIA расщепляли эндонуклеазами AbsI («СибЭнзим», Россия) и NheI (Fermentas, Литва) и переносили фрагменты, содержащие ОРС обеих цепей ФСГ, интактный IRES EMCV и участок консенсусной последовательности Козак, в вектор p1.1, рестрицированный теми же эндонуклеазами, с образованием плазмид p1.1-FSH-AIB и p1.1-FSH-BIA.

Рестрикцию проводили по инструкции производителя ферментов. Продукты рестрикции смешивали в соотношении 5:1 с буфером для нанесения «6x Loading dye» («Fermentas», Литва) и проводили разделение в 1% агарозном геле с добавлением бромистого этидия (0,4 мкг/мл). Для выделения ДНК полосу, визуализированную при помощи УФ-лампы, вырезали из агарозного геля, помещали в пробирку объемом 1,5 мл, после чего проводили выделение ДНК набором реактивов "Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System" («Promega», США) согласно протоколу производителя.

Лигирование очищенных фрагментов проводили ДНК-лигазой фага T4 (Fermentas, Литва) по методике производителя фермента. Полученной лигазной смесью трансформировали, как описано в Примере 1, клетки E.coli штамма Top 10 (Invitrogen, Великобритания) и высевали на чашку Петри с твердой агаризованной средой 2хYT-агар (16 г/л триптона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л NaCl, 18 г/л агара), содержащей ампициллин в концентрации 100 мкг/мл, и помещали в термостат на 37°C на 18 часов.

Отбор клонов E.coli проводился методом ПЦР с клонов с использованием праймеров SQ-FA-R (SEQ ID NO:6), SQ-FB-R (SEQ ID NO:7), SQ-FB-F (SEQ ID NO:8), SQ-FA-F (SEQ ID NO:9). ПЦР с колоний E.coli проводили с использованием набора реактивов «ScreenMix-HS» (ЗАО Евроген, Россия), по методике производителя, помещая образцы

бактериальных клонов в пробирки с 10 мкл готовой смеси для ПЦР. Продукты ПЦР анализировали электрофорезом в 1% агарозном геле, позитивные клоны наращивали в 5 мл среды LB с добавлением ампициллина в концентрации 50 мкг/мл 18 часов при 37°C и выделяли плазмидную ДНК набором реактивов "WizardPlusSVMinipreps"

5 («Promega», США) по протоколу производителя.

Области открытых рамок цепей ФСГ в полученной плазмиде p1.1-FSH-AIB были полностью отсекуены, как описано выше, с использованием праймеров SQ-FA-R (SEQ ID NO:6), SQ-FB-R (SEQ ID NO:7), SQ-FB-F (SEQ ID NO:8), SQ-FA-F (SEQ ID NO:9), 5CH6-F (SEQ ID NO:10), мутации в кодирующих областях не выявлены.

10 Полученная экспрессионная конструкция для трицистронной экспрессии цепей альфа и бета фолликулостимулирующего гормона человека и ОРС дигидрофолатредуктазы мыши p1.1-FSH-AIB имеет размер 13222 п.о. и содержит уникальные сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции NheI (I), AgeI (2396), AscI (5464), PvuI (6857), BstBI (11863), AbsI (11894), XbaI (12080).

15 Области открытых рамок цепей ФСГ в полученной плазмиде p1.1-FSH-BIA были также полностью отсекуены, мутации в кодирующих областях не выявлены.

Данные конструкции предназначены для трансфекции эукариотических клеток генами альфа- и бета-субъединиц фолликулостимулирующего гормона человека с последующим

20 отбором и амплификацией по сцепленному признаку DHFR⁺. Она сообщает клеткам-реципиентам следующие фенотипические признаки: при трансформации прокариот - устойчивость к ампициллину, карбенициллину; при трансфекции эукариот - устойчивость к отсутствию гипоксантина и тимидина, ограниченная устойчивость к метотрексату, увеличивающаяся при селективном отборе, экспрессия рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона человека. Созданные генетические конструкции

25 использовали для получения линии клеток - продуцента ФСГ.

Пример 3. Создание экспрессионной конструкции p1.2-Hygro-FSH-B-chain, кодирующей бета-субъединицу фолликулостимулирующего гормона человека.

30 На базе плазмидного вектора p1.2-Hygro (рис.4, SEQ ID NO:11) для гетерологичной экспрессии рекомбинантных белков в клетках млекопитающих создана экспрессионная конструкция для моноцистронной экспрессии индивидуальной цепи бета-субъединицы в векторе, содержащем ген устойчивости к антибиотику гигромицину. Схема клонирования приведена на Фиг.5.

35 Плазмиду pUC57-Kan-FSH-BIA расщепляли эндонуклеазами AbsI и SpeI («СибЭнзим», Россия) и переносили фрагмент, содержащий ОРС бета-субъединицы ФСГ и участок консенсусной последовательности Козак, в вектор p1.2-Hygro, рестрицированный эндонуклеазами AbsI («СибЭнзим», Россия) и NheI (Fermentas, Литва), с образованием плазмиды p1.2-Hygro-FSH-B-chain.

40 Рестриктию проводили по инструкции производителя ферментов. Продукты рестрикции выделяли из 1% агарозного геля, как описано в Примере 1, набором реактивов "Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System" («Promega», США) по протоколу производителя. Лигирование очищенных фрагментов проводили ДНК-лигазой фага T4 (Fermentas, Литва) по методике производителя фермента. Полученной лигазной смесью трансформировали, как описано в Примере 1, клетки E.coli штамма Top10 (Invitrogen, Великобритания) и высевали на чашку Петри с твердой агаризованной

45 средой 2хYT-agar (16 г/л триптона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л NaCl, 18 г/л агара), содержащей ампициллин в концентрации 100 мкг/мл, и помещали в термостат на 37°C на 18 часов. Отбор клонов E.coli вели методом ПЦР с клонов с использованием праймеров SQ-FB-R, SQ-FB-F (SEQ ID NO:7-8) и набора реактивов «ScreenMix-HS» (ЗАО

Евроген, Россия), по методике производителя, помещая образцы бактериальных клонов в пробирки с 10 мкл готовой смеси для ПЦР, с последующим электрофорезом в 1% агарозном геле. Позитивные клоны наращивали в 5 мл среды LB с добавлением ампициллина в концентрации 50 мкг/мл 18 часов при 37°C и выделяли плазмидную ДНК набором реактивов "Wizard® Plus SV Minipreps" («Promega», США) по протоколу производителя. Область открытой рамки бета-цепи ФСГ полученной плазмиды была полностью отсекарована, как описано выше, с использованием праймеров SQ-FB-R (SEQ ID NO:7), SQ-FB-F (SEQ ID NO:8), 5CH6-F (SEQ ID NO:10), 3CH1-R (SEQ ID NO:12), мутаций не выявлено.

Полученная экспрессионная конструкция для моноцистронной экспрессии индивидуальной цепи бета-субъединицы в векторе, содержащем кассету устойчивости к гигромицину p1.2-Hygro-B-chain, имеет размер 12811 п.о. и содержит уникальные сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции AgeI (1209), KpnI (4143), NdeI (5120), PsiI (5844), SalI (5962), SmaI (10487), FseI (11171), AbsI (12404). Данная конструкция предназначена для трансфекции эукариотических клеток геном бета-субъединицы фолликулостимулирующего гормона человека с последующим отбором по признаку $hygro^+$. Она сообщает клеткам-реципиентам следующие фенотипические признаки: при трансформации прокариот - устойчивость к ампициллину, карбенициллину; при трансфекции эукариот - устойчивость к гигромицину, экспрессия бета-субъединицы рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона человека. Созданную генетическую конструкцию использовали для получения линии клеток - продуцента ФСГ. Схематическая карта приведена на Фиг.2.

Пример 4. Препаративное выделение плазмидной ДНК для трансфекций и получение стабильно трансфицированных популяций клеток CHO DG-44/p1.1-FSH-AIB и CHO DG-44/p1.1-FSH-BIA

Плазмидные ДНК для трансфекций нарабатывали в клетках *Escherichia coli* штамма Top10, трансформированных экспрессионными конструкциями. Клетки культивировали в 50-150 мл среды LB в течение 16 ч и выделяли плазмиды с использованием набора GeneJet™ Midi по протоколу фирмы-производителя (Fermentas, Литва). При получении стабильно трансфицированных линий клеток использовали линейаризованные плазмиды. Плазмиды p1.1-FSH-AIB и p1.1-FSH-BIA расщепляли эндонуклеазой PvuI (Fermentas, Литва). Продукты рестрикции осаждали этанолом, осадки ДНК растворяли в стерильной воде.

Полученным препаратом очищенной плазмиды p1.1-FSH-AIB или p1.1-FSH-BIA были трансфицированы клетки CHO DG-44, содержащие повреждения обоих копий гена дигидрофолатредуктазы и неспособные расти в отсутствие гипоксантина и тимидина. К препарату плазмиды p1.1-FSH-AIB или p1.1-FSH-BIA перед трансфекцией добавляли 5% (по массе) плазмиды pEGFP-N2 (Clontech, США), кодирующей зеленый флуоресцентный белок под контролем эукариотического промотора. Эффективность трансфекций, измеренная как доля флуоресцирующих клеток, составила 6%.

Концентрация секретированного ФСГ составила около 35 нг/мл (в предположении удельной активности ФСГ 6 МЕ/мкг). Популяцию транзигентно трансфицированных клеток использовали для определения условий получения стабильно трансфицированных популяций. Для этого проводили культивацию в присутствии 0,2; 0,5; 1 мкМ селекционного агента метотрексата (MTX). Во всех случаях через 18 дней были получены постоянно делящиеся культуры с жизнеспособностью более 85%, уровни продукции ФСГ приведены в Таблице 1.

Таблица 1				
Продуктивность стабильно трансфицированных популяций CHO DG-44				
Концентрация метотрексата в среде, мкМ	Концентрация ФСГ в среде по ИФА, в МЕ/мл	Концентрация ФСГ, мг/л	Плотность культуры, тыс. клеток/мл	Уровень секреции ФСГ мкг/млн клеток/мл*
0,2	3,6	0,61	955	0,64
0,5	3,2	0,53	535	1,00
1	22,7	3,78	1675	2,25

* - уровень секреции оценен по конечной точке в предположении равной скорости деления клеток.

Также было установлено, что плаزمида p1.1-FSH-BIA является нестабильной и модифицируется в клетках путем делеции участка бета-цепи, продукции ФСГ в этом случае не наблюдалось.

Пример 5. Получение первичных поликлональных популяций клеток линии CHO-S, стабильно трансфицированных плазмидой p1.1-FSH-AIB

Клетки линии CHO-S (Invitrogen, Ltd., США), содержащие интактный ген дигидрофолатредуктазы, культивировали в безбелковой среде ProCHO 4 (Lonza, Швейцария) с добавлением 8 мМ L-глутамин (Invitrogen, Ltd., США). Клетки выращивали в стерильных одноразовых колбах Эрленмеера (30 мл суспензии в колбах вместимостью 125 мл) на орбитальной качалке при 130 об/мин в атмосфере, содержащей 5% углекислого газа при температуре 37°C. Подсчет плотности клеточной суспензии и доли живых клеток проводили в счетной камере Горяева при окрашивании трипановым синим. Пассирование культуры проводили по достижении плотности 1,8 млн кл./мл, посевная концентрация 0,3 млн кл./мл. За 48 часов и 24 ч до трансфекции клетки дополнительно пассировали до посевной концентрации 0,5 млн кл./мл.

Трансфекцию линейаризованной плазмиды p1.1-FSH-AIB в клетки CHO-S проводили электропорацией. Для этого $1,5 \times 10^7$ клеток ресуспендировали в 700 мкл трансфекционного буфера Gene Pulser (BioRad). В полученную суспензию добавляли 30 мкг линейаризованной плазмидной ДНК. Трансфекцию проводили в аппарате Gene Pulser Xcell (BioRad) и кювете с зазором между электродами 4 мм одним импульсом длиной 20 мс при постоянном напряжении 200 В. После электротрансформации клетки переносили в 30 мл среды ProCHO 5 (Lonza, Швейцария) в колбе Эрленмеера и растили при перемешивании 48 ч. Эффективность трансфекции, измеренная для контрольной популяции, трансфицированной в тех же условиях смесью плазмид p1.1-FSH-AIB и pEGFP-N2 (95:5 по массе) составила 18%, концентрация ФСГ в среде - 130 нг/мл. После выращивания в неселективной среде в течение 48 ч культуру разделили на три равные порции (по 4×10^6 клеток) и культивировали отдельно с добавлением различных концентраций селекционного агента метотрексата (0,5 мкМ, 1 мкМ и 2 мкМ).

Вели культивирование в селекционной среде с периодическим пассированием культур в течение 22 дней. Во всех трех случаях были получены делящиеся популяции клеток с жизнеспособностью более 90%, концентрация секретируемого гетеродимера ФСГ приведена в Таблице 2.

Было установлено, что популяция клеток CHO-S, трансфицированных плазмидой p1.1-FSH-AIB и подвергнутых селекции в присутствии 1 мкМ метотрексата (код популяции C-AIB-1K), обладает максимальной продуктивностью, существенно превосходящей продуктивность известных из уровня техники клональных продуцентов ФСГ. Копийность трансгена, т.е. количество копий экспрессионной плазмиды в гаплоидном геноме продуцентов, для популяции C-AIB-1K составила 50 ± 8 шт. при определении методом количественного ПЦР.

Таблица 2

Продуктивность стабильно трансфицированных популяций CHO-S

Концентрация метотрексата в среде, мкМ	Концентрация ФСГ в среде по ИФА, в МЕ/мл	Концентрация ФСГ, мГ/л	Плотность культуры, тыс. клеток/мл	Уровень секреции ФСГ мкг/млн клеток/мл*
0,5	34,2	5,7	1900	3,00
1	28,3	4,7	935	5,04
2	13,2	2,2	825	2,66

* - уровень секреции оценен по конечной точке в предположении равной скорости деления клеток.

Пример 6. Амплификация целевого гена под действием возрастающих концентраций метотрексата

Амплификацию целевого гена в геноме клеток отобранной поликлональной популяции С-АІВ-1К проводили в суспензионной культуре, добавляя в культуральную среду метотрексат в возрастающих концентрациях до момента падения жизнеспособности культуры. При обнаружении падения жизнеспособности культуру вели при постоянной концентрации метотрексата до восстановления жизнеспособности >85%, после чего концентрацию метотрексата удваивали. Процесс амплификации считали законченным, когда жизнеспособность клеток переставала восстанавливаться после 15 суток культивирования. Пассирование проводили, как указано в Примере 5. Ход амплификации и показатели продуктивности культуры приведены в Таблице 3.

Таблица 3

Динамика секреции ФСГ при амплификации целевого гена.

Код популяции	Концентрация метотрексата, мкМ	Время культивирования с указанной концентрацией метотрексата, дней	Уровень секреции ФСГ мкг/млн клеток/мл*
С-АІВ-1К	1	1	5,0
С-АІВ-1К	1	15	5,8
С-АІВ-2К	2	15	6,8
С-АІВ-4К	4	15	8,0
С-АІВ-8К	8	15	10,1

* - уровень секреции оценен по конечной точке в предположении равной скорости деления.

Продуктивность клеток была увеличена приблизительно в два раза в результате продолжительного культивирования в присутствии возрастающих концентраций метотрексата.

Пример 7. Получение популяции клеток CHO-S, стабильно трансфицированных плазмидами p1.1-FSH-AIB и p1.2-Hygro-FSH-B-chain

Для кондиционированной культуральной среды, полученной от популяции клеток С-АІВ-8К, определяли относительный уровень секреции цепей ФСГ при помощи иммуноблоттинга с моноклональными антителами к обеим цепям (данные не приводятся). Установили, что бета-цепь ФСГ присутствует в культуральной среде только в составе гетеродимера, а альфа-цепь распределена между гетеродимером и свободным мономером, при этом большая часть альфа-цепи присутствует в культуральной среде в виде мономера. Предположили, что эффективность трансляции области открытой рамки считывания бета-субъединицы в плазмиде p1.1-FSH-AIB снижена относительно области открытой рамки считывания альфа-субъединицы, то есть эффективность реинициации трансляции EMCV IRES дикого типа для открытой рамки считывания бета-цепи ФСГ ниже 100%. Для компенсации недостаточного уровня экспрессии бета-цепи в популяции С-АІВ-8К в клетки ввели дополнительный ген бета-цепи ФСГ, кодируемый плазмидой p1.2-Hygro-FSH-B-chain. Трансфекцию проводили, как указано в Примере 5. p1.2-Hygro-FSH-B-chain расщепляли эндонуклеазой CsiI (СибЭнзим, Россия) по протоколу производителя фермента. Эффективность трансфекции

составила 25%, через 48 ч после трансфекции изменений в уровне секреции гетеродимера ФСГ не наблюдалось.

Через 48 часов к культуре добавили селекционный антибиотик гигромицин В (Invitrogen, Ltd., США) в концентрации 750 мкг/мл, концентрацию метотрексата на весь период селекции гигромицином сохраняли на уровне 8 мкМ. Пассирования культуры проводили по достижении плотности 1,2 тыс. кл./мл, но не позднее чем через пять суток после начала культивации. Через 24 дня после трансфекции была получена стабильная культура с долей живых клеток 82%, после чего концентрация гигромицина была понижена до нетоксичной - 250 мкг/мл. Продуктивность клеток в полученной популяции С-А1В-8К-Всн составила 23,5 мкг/млн кл./мл. Максимальная концентрация секретированного ФСГ для популяции С-А1В-8К-Всн составила 81 мкг/мл при культивировании в течение 12 дней без пересева, удельная продуктивность - 4,7 пг/клетка/день, время удвоения культуры - 31 ч. Видимое при иммуноблоттинге распределение цепей ФСГ между мономером и гетеродимером осталось без изменений, но наблюдаемая доля альфа-цепи в составе мономера уменьшилась (данные не приводятся).

Таким образом, в результате введения дополнительных копий гена бета-цепи ФСГ общая продуктивность клеток была удвоена, при этом общий уровень экспрессии альфа-цепи ФСГ продолжал превышать уровень экспрессии бета-цепи. Полученная поликлональная популяция была использована для получения клональных линий-продуцентов ФСГ.

Пример 8. Получение клональной линии-продуцента ФСГ человека С-Р1.3-FSH-G4

Перед клонированием клетки популяции С-А1В-8К-Всн культивировали в течение 6 дней без метотрексата и гигромицина, а также пересевали за 48 и 24 часа до посева в лунки планшетов. Клонирование осуществляли методом предельных разведений (0,5 клетки на лунку) в 96-луночных планшетах, по 200 мкл среды на лунку в культуральной среде EXCELL-CHO (Sigma), с добавлением 8 мМ глутамина, 2 мМ гипоксантина (Gibco) и 2 мМ тимидина (Gibco) при 37°C, 5% CO₂. Планшеты инкубировали в течение 20 дней, после чего отмечали лунки с единственными колониями и продолжали инкубацию в течение еще 4 дней. Эффективность клонирования составила 29%, было получено и проанализировано 330 моноклональных колоний в 12 культуральных 96-луночных планшетах. Отобранные клоны с максимальной продуктивностью были переведены на культивирование в среде Lonza 5 и последовательно пересевались в лунки 48-, 24-, 6-луночных планшетов. В результате культивирования отобранных клонов в суспензионных условиях с перемешиванием культуры были отобраны 8 клонов с продуктивностью от 13 до 36 мкг ФСГ/млн клеток/мл и временем удвоения не более 40 ч. Среди них была выбрана основная моноклональная линия С-Р1.3-FSH-G4, при культивировании которой в суспензионной культуре в бессывороточной среде Lonza 5 активность фолликулостимулирующего гормона человека составляла 36,5 мкг/мл (по данным ИФА) при концентрации клеток 1,55 млн/мл и времени роста 3 дня, измеренная удельная продуктивность не менее 10 пг/клетка/день.

Пример 9. Выделение целевого белка из супернатанта культуры линии С-Р1.3-FSH-G4

Препаративное культивирование линии С-Р1.3-FSH-G4 вели в перемешиваемых колбах Эрленмейера с использованием бессывороточной среды Pro CHO 5 с добавлением 8 мМ L-глутамина. Проводили посев культуры на плотности 0,3 млн кл./мл и вели рост культуры в течение 12 дней без смены среды.

Кондиционированную культуральную среду отделяли от клеток и дебриса

центрифугированием. Далее pH культуральной жидкости доводили до 5,5 при помощи концентрированной соляной кислоты. Подкисленную культуральную жидкость наносили на уравновешенную колонку с сорбентом Capto MMC (GE Healthcare, США). Колонку промывали раствором 50 mM натрий-фосфатного буфера pH 5,5 и 100 mM NaCl и элюировали ФСГ раствором 50 mM натрий-фосфатного буфера pH 6,0 и 400 mM NaCl. К элюату добавляли 40% по объему раствора 250 mM Tris-HCl pH 8,5, полученный нейтрализованный раствор наносили на колонку с сорбентом Blue Sepharose FF (GE Healthcare), колонку промывали раствором, содержащим 0,3 M NaCl. ФСГ элюировали раствором, содержащим 4 M NaCl. Результаты гель-электрофореза фракций элюата и промывки колонок приведены на Фигуре 6. Полученный раствор очищенного рекомбинантного ФСГ обессоливали и концентрировали при помощи ультрафильтрации в ячейке для концентрирования VivaSpin6 (Sartorius, Германия) с мембраной из полиэфирсульфона, порог отсечения 10 кДа. Общий выход продукта составил более 50% (измерение концентрации по ИФА), чистота по денситометрии электрофореграммы не менее 90%. Приведенный метод очистки не включает стадии разделения изоформ ФСГ с различным зарядом N-связанных олигосахаридов, получаемый препарат обогащен щелочными формами, обладающими повышенной активностью в тестах *in vitro* и пониженной активностью в тестах *in vivo*.

Пример 10. Измерение биологической активности очищенного рекомбинантного ФСГ

20 неполовозрелых самок крыс WISTAR возрастом в диапазоне 19-28 дней, различающихся по возрасту не более чем на 3 дня и с различиями по массе, не превышающими 10 г между самой крупной и самой легкой особью в каждой группе, были сгруппированы в 4 группы по 5 крыс. В пределах каждой из 4 групп особям были проведены подкожные инъекции растворов, содержащих 0 мкг, 0,11 мкг, 0,22 мкг и 0,44 мкг очищенного ФСГ в физиологическом растворе (все растворы с добавлением 20 МЕ хорионического гонадотропина человека). Инъекции были повторены в группах через 24 и 48 часов после первой инъекции, всего 3 инъекции. Объем инъекции составлял 300 мкл на особь.

Через 24 ч после последней инъекции, животных подвергли эвтаназии в CO₂-камере, отделяли яичники, удаляли постороннюю жидкость и ткань, после чего немедленно взвешивали по отдельности и попарно от каждой особи. Результаты взвешивания приведены на Фиг.7. Было установлено, что очищенный ФСГ, секретированный полученной линией-продуцентом, вызывал дозозависимый прирост массы яичников крыс, при этом удельная активность полученного препарата очищенного ФСГ, не фракционированного по изоформам заряда, составляла около 7 МЕ/мкг (расчет по методу Steelman-Pohley в сравнении со стандартом рекомбинантного ФСГ, данные для стандарта не приводятся), что сравнимо с удельной активностью известных лекарственных препаратов ФСГ (4-13 МЕ/мкг).

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

Формула изобретения

1. Плазмида для экспрессии в клетках яичника китайского хомячка (СНО) рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) человека, в следующей последовательности по существу состоящая из области начала репликации плазмиды

pUC, открытой рамки считывания бета-лактамазы (bla) и прокариотического промотора гена bla; участка терминального повтора вируса Эпштейн-Барр человека (EBVTR), функционального промотора и первого интрона гена фактора элонгации 1 альфа китайского хомячка, фланкированного 5' нетранслируемой областью этого гена; последовательности Козак; открытой рамки считывания, кодирующей альфа-субъединицу ФСГ человека с блоком стоп-кодонов; внутреннего сайта связывания рибосом (IRES) вируса энцефаломиокардита (EMCV); открытой рамки считывания, кодирующей бета-субъединицу ФСГ человека с блоком стоп-кодонов; аттенюированного внутреннего сайта связывания рибосом (IRES) вируса энцефаломиокардита (EMCV); открытой рамки считывания дигидрофолатредуктазы (DHFR), экспрессирующейся в составе трицистронной мРНК вместе с геном, кодирующим альфа- и бета-субъединицы ФСГ человека; и функционального терминатора гена фактора элонгации 1 альфа китайского хомячка, фланкированного 3' нетранслируемой областью этого гена.

2. Плазмида по п. 1, отличающаяся тем, что открытые рамки считывания, кодирующие альфа- и бета-субъединицы ФСГ человека, кодируют альфа- и бета-субъединицы ФСГ человека, последовательности аминокислот которых приведены в SEQ ID NO: 2 и 3 соответственно.

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

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

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

6. Плазмида для экспрессии в клетках яичника китайского хомячка (СНО) бета-субъединицы рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) человека, в следующей последовательности по существу состоящая из области начала репликации плазмиды pUC; открытой рамки считывания бета-лактамазы (bla) и прокариотического промотора гена bla; участка терминального повтора вируса Эпштейн-Барр человека (EBVTR); функционального промотора гена фактора элонгации 1 альфа китайского хомячка, фланкированного 5' нетранслируемой областью этого гена; последовательности Козак; открытой рамки считывания гена, кодирующего бета-субъединицу ФСГ человека с блоком стоп-кодонов; функционального терминатора гена фактора элонгации 1 альфа китайского хомячка, фланкированного 3' нетранслируемой областью этого гена; промотора вируса SV40; гена устойчивости к гигромицину; и функционального терминатора вируса SV40.

7. Плазмида по п. 6, отличающаяся тем, что открытая рамка считывания гена, кодирующего бета-субъединицу ФСГ человека, кодирует бета-субъединицу ФСГ человека, последовательность аминокислот которой приведена в SEQ ID NO: 3.

8. Плазмида по п. 6, отличающаяся тем, что участок терминального повтора вируса Эпштейн-Барр человека (EBVTR) представляет собой фрагмент конкатемера терминального повтора EBVTR.

9. Плазмида по п. 6, отличающаяся тем, что указанной плазмидой является pl.2-Hygro FSH-B-chain, представленная в Перечне последовательностей под номером SEQ ID NO: 4.

10. Клетка СНО - продуцент рекомбинантного ФСГ человека, трансформированная

плазмидой по пп. 1-5.

11. Клетка по п. 10, дополнительно трансформированная плазмидой по пп. 6-9.

12. Клетка по п. 11, отличающаяся тем, что указанной клеткой является клетка линии
яичника китайского хомячка C-P1.3-FSH-G4, депонированная во Всероссийской
Коллекции Промышленных Микроорганизмов (ВКПМ) под регистрационным номером
ВКПМ Н-140.

13. Способ получения рекомбинантного ФСТГ человека, включающий следующие
стадии:

- культивирование в питательной среде клеток линии по п. 10 или 11; и
- выделение полученного рекомбинантного белка из культуральной жидкости.

14. Способ по п. 13, отличающийся тем, что культивируют клетки линии яичника
китайского хомячка C-P1.3-FSH-G4, депонированные во Всероссийской Коллекции
Промышленных Микроорганизмов (ВКПМ) под регистрационным номером ВКПМ
Н-140.

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

SEQUENCE LISTING

<110> Общество с ограниченной ответственностью "АйВиФарма"

<120> Плазмида для экспрессии рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) человека, плазмида для экспрессии рекомбинантной бета-субъединицы ФСГ человека, моноклональная линия клеток млекопитающего - продуцент ФСГ человека и способ получения указанного гормона.

<130> FSH

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 13222

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> expression plasmid

<220>

<221> CDS

<222> (4088)..(4438)

<223> Human FSH alpha-chain

<220>

<221> CDS

<222> (5010)..(5399)

<223> Human FSH beta-chain

<400> 1

cacgttggtgc atagaaacag atgcaggcaa aacatccaca catataaaac aaaaaattaa 60

aaccaataaa actcctaaac ttttggtctt tcttgaatct tcaatccctc aggttatgaa 120

ataatcattt atgcagtcaa aaatttgcca ttcttggtgc cagggtgtggt gatgattcgg 180

ggaagcagaa gcaggcagat ctctgtgaat gaggccagcc tgggtctacaa agtgagtccc 240

aggacagtca ggctgtttac acagagaaac cttgaaaaaa aaaagataat atgtactgtt 300

gtattacccc aatatataag gctaaaccat tagaagcaca aactgtttaa gtacggaaaa 360

taatattctag tgtggtacag ttactactac tataatacac taatatagct gtgggaaact 420

agttccaaag atgaattact aaccagtgtt tccaaggaaa taaatgaaag cagagagatt	480
agttctattg ctagtgtttc attttcgtat atttcttaca atttctcttg ttacaaatag	540
gcactagggt atcaagataa ttttaacgac tggtgagaa ccctagaaaa tctctgtgaa	600
aaagggattt gtgaaatgag agagggtaat gtggccatta tagaaaaggc ttttgtgtgc	660
cttgcatgca tagaccctgt gtttgatctc ttaacaccct ccttgaccag aaaaagcttc	720
tgtggataga aaatgattag ttatatatac ttttagggaa acgtagtctt ggattctttg	780
gttacaatta acagaattaa gtgcaaaca agccagaaac ctctgataa atgagaaaac	840
ctgctttag aaggttgtaa ggctctgtaa tataggaatt aggagaaaag aaacctgtgt	900
ggtggggcac gtctgtaatc ccagcattgg gaagtagagg tagaagatta gaaatcaaag	960
gccagcctca gcaacacagt gagtttgagg ccaccctgaa ctacatcagg ttctgtctcc	1020
tttctttttt ttttttttct tttctttttt tggtttctct gtgtagtttt ggagcctatc	1080
ctggcactag ctctgaagag caggctggcc togaactcag agatcagcca gcctctgctg	1140
ggattaaagg tatgcaccac caacgcccc ggttttgtct caaacaaca aaaataacat	1200
caggaggtgg tgagagggt cagtggcac aggcattctc tgcaaagcct gactctgagt	1260
tggatccttt agagctacat ggttgaggga agagaactga ctctggaag gtgtcctctg	1320
gtccccacac atagctatac acagcatgtg cattcacaca cactaaataa tgctattttt	1380
aaaaaatta aaaacaaca cagtttgggg tgtgaaaact agaactagat aataggtaag	1440
aatcaagtat catgtaaatt tgctttcaac tcatccaaa atttgtttta tatttcagtt	1500
ttttccttc ctagcttgac tgtggagtct tgtccggaag caaatagttc ctttgcat	1560
cccacatgtg gacaccggac agtaggtcct caaatgctcc ttattagggt ggttcaataa	1620
tatcaattgt ttgttactag gcagtgatgt tgtacatctg gaggagatct cttgagccca	1680
taatcaggtt attaggaata aatactctaa ggctaaaaat gtagcttagt gataagagt	1740
cttgccctgg gtgctgagac cctcggttcc atctccaca ccccatattc cattacaaaa	1800

taccttttca ccgtccctag cattaagaaa caaaacaaca aagaagtttt tctttcttct	1860
gagatcctgc ccggagaggc atttaaaact ggccagggcc aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1920
aaaaaaaaaga aaagaaaaca ggctagggcc ggcatggtgg cgcacgcctt taatcccagc	1980
acgcaggagg cagaggcagg gcggatctct gtgagtttga ggtcagcctg gtctacctag	2040
tgagtttcag ggcacccagg gctaaagaga ctgtctcaaa aacaaaacag ccacacaatc	2100
agaaccacag caaaacgcag ttatgatcct tggaactgta ggaatgacaa gcatttaa	2160
aataggacga gccatttttg agaagctctg atttcacaag tgtcagggat gggctctggg	2220
cgagtaagat tgctaagtct ggccctctaa tgagaccacg tggagttgat tagattcttt	2280
tcatgttcct cgtgctctat caaataactg tacccaaata cacacacaca cacacacaca	2340
caatgcgcgc acacacaaaa tcctttttta gcttaagaag ccagaaatca gaagtaaagc	2400
taactgtggg acttaagtat tattctgaac ggaactccca gggcgtgaag cgcgcttcag	2460
gcttcagag aagcagctgg cgctggatgg aatgaacaa gaggccagca caggggcaga	2520
tccgtcgagc tctcgccac cgagctgagc ccttaggttc tggggctggg aagggtccct	2580
aggattgtgc acctctcccg cgggggacaa gcagggggat ggcggggctg acgtcgggag	2640
gtggcctcca cggaagga caccggatc tcgacacagc cttggcagtg gagtcaggaa	2700
gggtagggac agattctgga cgccctcttg gccagctcct caccgcccc ccccgactg	2760
gagccgagag taattcatac aaaaggagg atcgcttcg cccctggga tcccaggac	2820
cgtcgctaaa ttctggccgg cctcccagcc cggaaccgt gtgcccgccc agcggggcg	2880
gaggagcctg cgctagggc ggatcgcggg tcggcgggag agcacaagc cacagtcccc	2940
ggcggtgggg gaggggcgcg ctgagcgggg gcccgggagc cagcggggg caaactggga	3000
aagtgggtgc gtgtgctggc tccgccctct tcccagggg gggggagaac ggtataaaag	3060
tcgggtagtc gcgttggacg ttctttttcg caacgggttt gccgtcagaa cgcaggtgag	3120
tggcggtgtt ggccctccgc ggcccggtc cctcctttg agcggggtcg gaccgctg	3180
cggtgtcgt cgcccggtc tctctcgag cgttccgc ctggatggc ggctgtcgg	3240

RU 2 560 596 C2

gagggcgagg gggggaggcc tggcggcggc cccggagcct cgcctcgtgt cgggcgtgag	3300
gcctagcgtg gcttcgccc cgcgcgtgc caccgggcc gcgctttgct gtctgcccg	3360
ctgccctcga ttgectgcc gcggcccggg ccaacaaagg gagggcgtgg agctggctgg	3420
tagggagccc cgtagtccgc atgtcgggca gggagagcgg cagcagtcgg gggggggacc	3480
gggcccggcc gtccgcagc acatgtccga cgcgcctgg acgggtagcg gcctgtgtcc	3540
tgataaggcg gcggggcggg gggttttaga tgccgggttc aggtggcccc ggggtcccgc	3600
ccggtctggc cagtaccccg tagtggctta gctccgagga gggcgaggcc cggccggccg	3660
gcaccagttg cgtgcgcgga aagatggccg ctcccgggcc ctgtagcaag gagctcaaaa	3720
tggaggacgc ggcagcccgg cggagcgggg cgggtgagtc acccacacaa aggaagagg	3780
ccttgcccct cgcgggccgc tgcttctgt gaccccgtagg tgtaccggcc gcacttcagt	3840
cacccgggc gctctttcgg agcaccgctg gcctccgctg ggggagggga tctgtcta	3900
ggcgttgag tttgctcaca tttggtggg ggagactgta gccaggccag cctggccatg	3960
aaagtaattc ttggaatttg ccattttga gtttgagcg aagctgattg acaaagctgc	4020
ttagccgttc aaaggatttc ttcgaacttt tttttaagg tgttgtaaa acctcgaggc	4080
cgccacc atg gat tac tac aga aaa tat gca gct atc ttt ctg gtc aca	4129
Met Asp Tyr Tyr Arg Lys Tyr Ala Ala Ile Phe Leu Val Thr	
1 5 10	
ttg tcg gtg ttt ctg cat gtt ctc cat tcc gct cct gat gtg cag gat	4177
Leu Ser Val Phe Leu His Val Leu His Ser Ala Pro Asp Val Gln Asp	
15 20 25 30	
tgc cca gaa tgc acg cta cag gaa aac cca ttc ttc tcc cag ccg ggt	4225
Cys Pro Glu Cys Thr Leu Gln Glu Asn Pro Phe Phe Ser Gln Pro Gly	
35 40 45	
gcc cca ata ctt cag tgc atg ggc tgc tgc ttc tct aga gca tat ccc	4273
Ala Pro Ile Leu Gln Cys Met Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro	
50 55 60	
act cca cta agg tcc aag aag acg atg ttg gtc caa aag aac gtc acc	4321
Thr Pro Leu Arg Ser Lys Lys Thr Met Leu Val Gln Lys Asn Val Thr	

RU 2 560 596 C2

65	70	75	
tca gag tcc act tgc tgt gta gct aaa tca tat aac agg gtc aca gta			4369
Ser Glu Ser Thr Cys Cys Val Ala Lys Ser Tyr Asn Arg Val Thr Val			
80	85	90	
atg ggg ggt ttc aaa gtg gag aac cac acg gcg tgc cac tgc agt act			4417
Met Gly Gly Phe Lys Val Glu Asn His Thr Ala Cys His Cys Ser Thr			
95	100	105	110
tgt tat tat cac aaa tct taa tagactagtc ccccccccta acgttactgg			4468
Cys Tyr Tyr His Lys Ser			
115			
ccgaagccgc ttggaataag gccggtgtgc gtttgtctat atgttatattt ccaccatatt			4528
gccgtctttt ggcaatgtga ggccccggaa acctggccct gtcttcttga cgagcattec			4588
taggggtctt tccccctctg ccaaaggaat gcaaggtctg ttgaatgtcg tgaaggaagc			4648
agttcctctg gaagcttctt gaagacaaac aacgtctgta gcgacccttt gcaggcagcg			4708
gaacccccca cctggcgaca ggtgcctctg cggccaaaag ccacgtgtat aagatacacc			4768
tgcaaaggcg gcacaacccc agtgccacgt tgtgagttgg atagttgtgg aaagagtcaa			4828
atggctctcc tcaagcgtat tcaacaaggg gctgaaggat gcccagaagg taccocattg			4888
tatgggatct gatctggggc ctcggtgcac atgctttaca tgtgtttagt cgagggtaaa			4948
aaacgtctag gccccccgaa ccacggggac gtgggttttcc tttgaaaaac acgatgataa			5008
t atg aag aca ctc cag ttt ttc ttc ctt ttc tgt tgc tgg aaa gca atc			5057
Met Lys Thr Leu Gln Phe Phe Phe Leu Phe Cys Cys Trp Lys Ala Ile			
120	125	130	
tgc tgc aat agc tgt gag ctg acc aac atc acc att gca ata gag aaa			5105
Cys Cys Asn Ser Cys Glu Leu Thr Asn Ile Thr Ile Ala Ile Glu Lys			
135	140	145	
gaa gaa tgt cgt ttc tgc ata agc atc aac acc act tgg tgt gct ggc			5153
Glu Glu Cys Arg Phe Cys Ile Ser Ile Asn Thr Thr Trp Cys Ala Gly			
150	155	160	
tac tgc tac acc agg gat ctg gtg tat aag gac cca gcc agg ccc aaa			5201
Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Leu Val Tyr Lys Asp Pro Ala Arg Pro Lys			
165	170	175	180

RU 2 560 596 C2

atc cag aaa aca tgt acc ttc aag gaa ctg gta tac gaa aca gtg aga	5249
Ile Gln Lys Thr Cys Thr Phe Lys Glu Leu Val Tyr Glu Thr Val Arg	
185 190 195	
gtg ccc ggc tgt gct cac cat gca gat tcc ttg tat aca tac cca gtg	5297
Val Pro Gly Cys Ala His His Ala Asp Ser Leu Tyr Thr Tyr Pro Val	
200 205 210	
gcc acc cag tgt cac tgt ggc aag tgt gac agc gac agc act gat tgt	5345
Ala Thr Gln Cys His Cys Gly Lys Cys Asp Ser Asp Ser Thr Asp Cys	
215 220 225	
act gtg cga ggc ctg ggg ccc agc tac tgc tcc ttt ggt gaa atg aaa	5393
Thr Val Arg Gly Leu Gly Pro Ser Tyr Cys Ser Phe Gly Glu Met Lys	
230 235 240	
gaa taa tagctagcgg ccgcgcagtt aacgcgcgcc ctctccctcc ccccccccta	5449
Glu	
245	
acgttactgg ccgaagccgc ttggaataag gccggtgtgc gtttgtctat atgttatatt	5509
ccaccatatt gccgtctttt ggcaatgtga gggcccgga acctggccct gtcttcttga	5569
cgagcattcc taggggtctt tcccctctcg ccaaaggaat gcaaggtctg ttgaatgtcg	5629
tgaaggaagc agttcctctg gaagcttctt gaagacaaac aacgtctgta gcgacccttt	5689
gcaggcagcg gaacccccca cctggcgaca ggtgcctctg cggccaaaag ccacgtgtat	5749
aagatacacc tgcaaaggcg gcacaacccc agtgccacgt tgtgagttgg atagttgtgg	5809
aaagagtcaa atggctctcc tcaagcgtat tcaacaagg gctgaaggat gcccagaagg	5869
taccccattg tatgggatct gatctggggc ctcggtacac atgctttaca tgtgtttagt	5929
cgaggttaaa aaaacgtcta ggcccccgga accacgggga cgtggttttc ctttgaaaaa	5989
cacgatgata atatggccac aagatctgcc accatggttc gaccattgaa ctgcatcgtc	6049
gccgtgtccc aaaatatggg gattggcaag aacggagacc taccctggcc tccgctcagg	6109
aacgagttca agtacttcca aagaatgacc acaacctctt cagtggaagg taaacagaat	6169
ctggtgatta tgggtaggaa aacctggttc tccattcctg agaagaatcg acctctaaag	6229

gacagaatta atatagttct cagtagagaa ctcaaagaac caccacgagg agtcattttt	6289
cttgccaaaa gtttgatga tgccttaaga cttattgaac aaccggaatt ggcaagtaaa	6349
gtagacatgg tttggatagt cggaggcagt tctgtttacc aggaagccat gaatcaacca	6409
ggccacctca gactctttgt gacaaggatc atgcaggaat ttgaaagtga cacgtttttc	6469
ccagaaattg atttggggaa atataaactt ctcccagaat acccaggcgt cctctctgag	6529
gtccaggagg aaaaaggcat caagtataag tttgaagtct acgagaagaa agactaatct	6589
agcatattac ccctaacacc tgccacccca gtcttaatca gtggtggaag aacggctctca	6649
gaactgtttg tctcaattgg ccatttaagt ttaatagtga aagactggtt aatgataaca	6709
atgcatcgga aaaccttcag gaggaagga gaatgttttg tggaacattt ttgtgtgtgt	6769
ggcagtttta agttattagt tttcaaaatc agtacttttt aatggaaaca acttgaccaa	6829
aaatctgtca cagaattttg agaccatta aaatacaagt ttaatgagaa gtctgtctct	6889
gttaatgctg aagtcattac taagtgtta gcttagcaag gtatgtggat gccattttgt	6949
gttccaaggg attggactgt tcatcaggac ccagagctga gtttcaaggg ctcaagagat	7009
ggcttattac ctgtgggtgt cttgaagggt ctggttgga caaattagga atgttttttg	7069
cagacatggt gactaccott catctgggtg agttcagttg atttgtcttg agcctttggg	7129
gtttacacaa gtaaatgaca tcatacagtt agtgtattgt tagtgaatat taatatatga	7189
ggcaggcttt gctctagcaa ttttagaact agttttcagg aaagggttca tcttgtgcat	7249
tggatgtttg attctatcac ttagagttta aactgaaagt gctcaagagg ttttatttag	7309
gctgggatat aaataagcct ttctgtagct tgtaatggtg tcaggaattt aaaaggccat	7369
ctggggcaca aagattaagc agaaaaggta gaagggtgaga ttgggggact ttgagtactt	7429
cacacacttt aatgtgtgag tgcttttagtg catatagtac aactgccaga taagggcac	7489
cacatctgat tgtttgaag gcacottgtg gtttctggga attcagaatt gggagaaaaa	7549
gtgctcccaa ccgctgaagc ccttggtaat ctgcagggtg tttatttagc aggagataag	7609
gacaaaaagt tatagtgtgg agttggttga gttggtagat gtcattacaa cagggtgtct	7669

RU 2 560 596 C2

taaattgggt taggagtcac tttgaaatac ctggggccata agcaaagtgg cattttccacc	7729
tttcaggaga aactggtaca cttatccatt ctatagtgcg tgcttgttca attgggctga	7789
tgactaaacc ggtgactaaa ggtttgtcag tataaatgga tgggttgtag gcagacggtg	7849
aggaattact atacctgcaa ggagtcattg cctgatctgc ctggaaaggg gcaggattga	7909
gtctcagaag gtgtacacca taggatatgg aaaaatttgt cacgcctagc attcaactta	7969
gtggtgtagc gccacctact ggcactttaa aagcttagca tagaggagca tgtgtgttag	8029
gagctcggtt gggatccagg gcctcaagggt ttgcatgtaa ataaaagccc ttaccaaaat	8089
taactacata ccagcataca tcagtccttt agtggtgaaa aacagaagtg aaagctaata	8149
tatatagtgc ttgctttatt taagtctagc tgattacgtg tttggttgcc agtgtgacta	8209
gtctggagtt gaatttgtcc tcagacacgt aaaatggaat ttgggattca caaactcta	8269
gtatgaggga cctaattggc tgtaccaggc acaaactgtg ctataaacta cacaaaacga	8329
aggaatttac aggaattagg aaggatttct taacattaaa acattatggg cattttaaaa	8389
aaagctttga caggatttct ttgtcatggc tgtcctggag ctagtgtgtg agaccaggct	8449
gggctgaaat cttgtctgcc tgcttggtt ggacactttt ttattatgta tacaacattc	8509
tgcttccatg tatatctgca cattagaaga cggcaccaga tctcctaag gatggttgtg	8569
agccaccatg tggttgctgg gaattgaact caggacctct ggaagagcag tgctcttaac	8629
ctctgagcca tctccagccc cagcttgggc acatttttaa tggctgggaa atcaaacccc	8689
ctaggccttc tgtcagtaat gaagggtttt tggctaccga gagtaggatt taaggttatt	8749
cggagctgca ggtctgcctc agtgcagggt tgggagtcca gcatcttaga aaatgcagtg	8809
aagccaagct gagctatatt ttgtttaaaa aaaaaataag tgggtaaagt gctgctgagc	8869
ctgatgacca agctgggaca caagtagaag aacataggcc aatgctctat attaaaagca	8929
tgggtcattt ttaatgctct tgagaaggct atgcctacac tactctcagc caccgcagcg	8989
tgtttaaatt aaactagttt ggaaattttc tttgggggta agctatttaa cctagtgcct	9049

RU 2 560 596 C2

tggcaggtat actactgaac tctcctcctc attccttttt gttttttaag aatttcagtc	9109
aggctcaggc agcccttaaa cttgtgatta agcctgagaa cagttacgat tatgagccta	9169
ttagtatacc gatcaatatg tgaatTTTTT tgggatgggg gtcaggcctc cctgcctccc	9229
aaatactggg actaaaggct gcaccaccac aacctggctc ttgaaatact tttctacatt	9289
ttttgggggg catgggtggg agagcagggt ttctctgtat tagccctggc tctcctggaa	9349
ctctgtagac caggctattc ttgagctcag attagcctgt ctctgcctcc taaattctgg	9409
gattaaaggt gtgtgctact gctgcctggc tacaaagaca tttttttttt tcttaaatTT	9469
aaaaacaaaa gtggttcttt tagaagggtg gttggtgttg gcacatactc caagcactca	9529
ggttttgagt ttgtcccagg aatgaagact gcattactgc cgccctccc tggtaagggc	9589
tacacagaga aatcctatTT ggagcctgtc ctggtaactc gctctgtaga ccaggctggc	9649
ctcgaactca agagaaccac ctgcctctga atgctgggtat taagggcagg caccaccaac	9709
accagccta aaaaatgtct tttttttaaa gatttttttt ttttttttta cagaataaac	9769
attctgttta caatattctg cttctatgta tatctgcaca ctagaagagg gcacccgac	9829
tcataatgga tggttgtgag ccaccaagtg gttgctggga attgaactca gaacctctgg	9889
aagagcagtc agtgctctta acctctgagc catctctcca gcccctaaaa atggctcttg	9949
agatagggtc tcaagtagtt tgagactgag ttggctatat aaacaaggct ggcacatagc	10009
accatgtaca gctgggttta gtttacatgg ggtgtttttg tctctggagg caggaggatc	10069
at ttgagcat agggagttaa tagtgaggtc atgttttata tactcttctg aattgagaac	10129
taagctgatg caaagcaagt ttgactgaag aagtccagtt tatgagaaca aggggtgaaa	10189
ctaattgtgc aaagatggcc ttgcatgtgt tttagatgat gaccagtc cttgggaatt	10249
actggatgtg taagacctat atcttgacag gagtgaacag tgtcttatag gtccatatg	10309
aaagaaatga gacataccca ttttgtttcc cctaagaatt cacttttctt aacctggttc	10369
atgctattta ggttatttta cttgcaaata ctaggggtgt cccttaccca gtattgctta	10429
tgtggcacca aagtcactca ctcccatgat ttgcaagtct ctgggaactt ccatgacaac	10489

ctagaatagc aactcaaata cattttctca gtaccaatth tgaagaaaa atattttgca	10549
aaatagctgt atggatgggt actaaatagt gaggttatct ccagaaggcc tatgaagaat	10609
taaggttgag ttcagttgag ttcagcagca agtttaaggt tcatccattt ttgtacagt	10669
ttttcctatt acggttaagt ttttgctgc aggaatatct gtaccacatg cttgctggt	10729
acctatatcg gccagaagag ggctttggat cctctggact tgaattacag atgggtatta	10789
gccaccattt aggtgctggg aattgaaacc aagtcctctg gaagaacagc aagtgactcg	10849
acgtccggag ctcaggcgcg ccatggctct tccgcttctt cgctcactga ctcgctgcgc	10909
tcggtcggtt ggctgcggcg agcggtatca gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc	10969
acagaatcag gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg	11029
aaccgtaaaa aggccgcgtt gctggcggtt tccatagcg tccgcccccc tgacgagcat	11089
cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaaccgca caggactata aagataccag	11149
gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgacctgcc gcttaccgga	11209
tacctgtcgg cctttctccc ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg	11269
tatctcagtt cgggtgtagg cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga accccccgtt	11329
cagccccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac	11389
gaattatcgc cactggcagc agccactggg aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc	11449
ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct aactacggct aactagaag aacagtattt	11509
ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa gatttggtag ctcttgatcc	11569
ggcaaaaaa ccaccgctgg tagcggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga	11629
aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc tttctacgg ggtctgacgc tcagtgaac	11689
gaaaactcac gttaagggat tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc	11749
cttttaaatt aaaaatgaag ttttaaata atctaaagta tatatgagta aacttggtct	11809
gacagttacc aatgcttaat cagtgggca cctatctcag cgatctgtct atttcgttca	11869

RU 2 560 596 C2

tccatagttg cctgactccc cgtcgtgtag ataactacga tacgggaggg cttaccatct	11929
ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac ccacgctcac cggctccaga tttatcagca	11989
ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc	12049
atccagtcta ttaattgttg ccgggaagct agagtaagta gttcgccagt taatagtttg	12109
cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcatc gtggtgtcac gctcgtcgtt tggatatggc	12169
tcattcagct ccggttccca acgatcaagg cgagttacat gatccccat gttgtgcaaa	12229
aaagcggtta gtccttcggt tcctccgacg gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtgtta	12289
tcactcatgg ttatggcagc actgcataat tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc	12349
ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag tcattctgag aatagtgtat gggcgacgcg	12409
agttgctctt gccggcgctc aatacgggat aataccgcgc cacatagcag aactttaaaa	12469
gtgctcatca ttggaaaacg ttcttcgggg cgaaaactct caaggatctt accgctgttg	12529
agatccagtt cgatgtaacc cactcgtgca cccaactgat cttcagcatc ttttactttc	12589
accagcgttt ctgggtgagc aaaaacagga aggcaaaatg ccgcaaaaaa gggaataagg	12649
gcgacacgga aatgttgaat actcatactc ttcctttttc aatattattg aagcatttat	12709
cagggttatt gtctcatgag cggatacata tttgaatgta tttagaaaaa taaacaaata	12769
ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg ccacctgcat ctcatcacgg tcacgcatgg	12829
ctgcgcccgc gcagcgcccc ccgaccccc cccgatcccc ggaacgccag ccgccatcca	12889
ccgccgcgag cccccggagc ccgcggaccc cgaccccccg ccgctcgccc gccgttgccg	12949
cgctctctgc gggggggcta gggggccgcg gggggaaggc cacgccccct ccaacttttc	13009
caggaatgcg cggcatgacc cgccccccc atgaccgcgc aacaccccc cgatgcccc	13069
cgggggtctt tcctgggggg cctttgtcag ggttgccgtg gtcaccacg ggccccttg	13129
ccacgcttgc ctgggtcacc ccggagcccc gggtcacggt tgccggggtc agccctggg	13189
cgcttcttca cgctccattg ccatgcagaa ttc	13222

RU 2 560 596 C2

<210> 2
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Human FSH alpha-chain

<400> 2
 Met Asp Tyr Tyr Arg Lys Tyr Ala Ala Ile Phe Leu Val Thr Leu Ser
 1 5 10 15
 Val Phe Leu His Val Leu His Ser Ala Pro Asp Val Gln Asp Cys Pro
 20 25 30
 Glu Cys Thr Leu Gln Glu Asn Pro Phe Phe Ser Gln Pro Gly Ala Pro
 35 40 45
 Ile Leu Gln Cys Met Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro
 50 55 60
 Leu Arg Ser Lys Lys Thr Met Leu Val Gln Lys Asn Val Thr Ser Glu
 65 70 75 80
 Ser Thr Cys Cys Val Ala Lys Ser Tyr Asn Arg Val Thr Val Met Gly
 85 90 95
 Gly Phe Lys Val Glu Asn His Thr Ala Cys His Cys Ser Thr Cys Tyr
 100 105 110
 Tyr His Lys Ser
 115

<210> 3
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Human FSH betya-chain

<400> 3
 Met Lys Thr Leu Gln Phe Phe Phe Leu Phe Cys Cys Trp Lys Ala Ile
 1 5 10 15
 Cys Cys Asn Ser Cys Glu Leu Thr Asn Ile Thr Ile Ala Ile Glu Lys
 20 25 30
 Glu Glu Cys Arg Phe Cys Ile Ser Ile Asn Thr Thr Trp Cys Ala Gly
 35 40 45
 Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Leu Val Tyr Lys Asp Pro Ala Arg Pro Lys

RU 2 560 596 C2

50	55	60
Ile Gln Lys Thr Cys Thr Phe Lys Glu Leu Val Tyr Glu Thr Val Arg		
65	70	75 80
Val Pro Gly Cys Ala His His Ala Asp Ser Leu Tyr Thr Tyr Pro Val		
	85	90 95
Ala Thr Gln Cys His Cys Gly Lys Cys Asp Ser Asp Ser Thr Asp Cys		
	100	105 110
Thr Val Arg Gly Leu Gly Pro Ser Tyr Cys Ser Phe Gly Glu Met Lys		
	115	120 125
Glu		

<210> 4
 <211> 12811
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> exprssion plasmid

<400> 4	
ctagcatatt acccctaaca cctgccaccc cagtcttaat cagtgggtgga agaacggtct	60
cagaactggt tgtctcaatt ggccatttaa gtttaatagt gaaagactgg ttaatgataa	120
caatgcatcg gaaaaccttc aggaggaaag gagaatgttt tgtggaacat ttttgtgtgt	180
gtggcagttt taagttatta gttttcaaaa tcagtacttt ttaatggaaa caacttgacc	240
aaaaatctgt cacagaatth tgagaccocat taaaatacaa gtttaatgag aagtctgtct	300
ctgttaatgc tgaagtcatt actaagtgc tagcttagca aggtatgtgg atgcccattt	360
gtgttccaag ggattggact gttcatcagg acccagagct gagtttcaag ggctcaagag	420
atggcttatt acctgtgggt gtcttgaagg ttctgggttg gacaaattag gaatgttttt	480
ggcagacatg gtgactacct tcactctgggt gagttcagtt gatttgcatt gagccttttg	540
ggtttacaca agtaaatgac atcatacagt tagtgtattg ttagtgaata ttaatatatg	600

aggcaggcctt tgctctagca attttagaac tagttttcag gaaaggggtc atcttgtgca	660
ttggatgttt gattctatca cttagagttt aaactgaaag tgctcaagag gttttattta	720
ggctgggata taaataagcc tttctgtagc ttgtaatggt atcaggaatt taaaaggcca	780
tctggggcac aaagattaag cagaaaaggt agaaggtgag attgggggac tttgagtact	840
tcacacactt taatgtgtga gtgcttttagt gcatatagta caactgccag ataaggcat	900
ccacatctga ttgtttggaa ggcaccttgt ggtttctggg aattcagaat tgggagaaaa	960
atgctcccaa ccgctgaagc ccttggtaat ctgcagggtg tttatttagc aggagataag	1020
gacaaaaagt tatagtgtgg agttgggtga gttggtagat gtcattacaa cagggtgtct	1080
taaattgggt taggagtcac tttgaaatac ctgggccata agcaaagtgg cattttcacc	1140
tttcaggaga aactggtaca cttatccatt ctatagtga tgcttgttca attgggctga	1200
tgactaaacc ggtgactaaa ggtttgtcag tataaatgga tgggtttag gcagacggtg	1260
aggaattact atacctgcaa ggagtcattg cctgatctgc ctggaaagg gcaggattga	1320
gtctcagaag gtgtacacca taggatatgg aaaaatttgt cacgcctagc attcaactta	1380
gtggtgtagc gccacctact ggcactttaa aagcttagca tagaggagca tgtgtgttag	1440
gagctcggat gggatccagg gcctcaaggt ttgcatgtaa ataaaagccc tttaccaa	1500
taactacata ccagcataca tcagtccttt agtgttgaaa aacagaagt aaagctaata	1560
tatatagtgc ttgctttatt taagtctagc tgattacgtg tttggttgc agtgtgacta	1620
gtctggagtt gaatttgtcc tcagacacgt aaaatggaat ttgggattca caaactcta	1680
gtatgaggga cctaattgcc tgtaccaggc acaaactgt ctataaacta cacaaaacga	1740
aggaatttac aggaattagg aaggtattct taacattaaa acattatggg cattttaaaa	1800
aaagctttga caggatttct ttgtcatggc tgtcctggag ctagtgtgt agaccaggct	1860
gggctgaaat cttgtctgcc tgctggctt ggacactttt ttattatgta tacaacattc	1920
tgcttccatg tatatctgca cattagaaga cggcaccaga tctcctaag gatggtgtg	1980
agccaccatg tggttgctgg gaattgaact caggacctct ggaagagcag tgctcttaac	2040

RU 2 560 596 C2

ctctgagcca tctccagccc cagcttgggc acatttttaa tggctgggaa atcaaacccc	2100
ctaggccttc tgtcagtaat gaagggcttt tggctaccga gagtaggatt taaggttatt	2160
cggagctgca ggtctgcctc agtgcagggt tgggagtgca gcatcttaga aaatgcagt	2220
aagccaagct gagctatatt ttgtttaaaa aaaaaataag tgggtaaagt gctgctgagc	2280
ctgatgacca agctgggaca caagtagaag aacataggcc aatgctctat attaaaagca	2340
tgggtcattt ttaatgctct tgagaaggct atgcctacac tactctcagc caccgcagcg	2400
tgtttaaatt aaactagttt ggaaattttc ttgggggta agctatttaa cctagtgcct	2460
tggcagggtat actactgaac tctcctcctc attccttttt gttttttaag aatttcagtc	2520
aggtcaggc agcccttaaa cttgtgatta agcctgagaa cagttacgat tatgagccta	2580
ttagtatacc gatcaatatg tgaatttttt tgggatgggg gtcaggcctc cctgcctccc	2640
aaatactggg actaaaggct gcaccaccac aacctggctc ttgaaatact tttctacatt	2700
ttttgggggg catgggtggg agagcagggt ttctctgtat tagccctggc tctcctggaa	2760
ctctgtagac caggctattc ttgagctcag attagcctgt ctctgcctcc taaattctgg	2820
gattaaaggt gtgtgctact gctgcctggc tacaaagaca tttttttttt tcttaaattt	2880
aaaaacaaaa gtggttcttt tagaagggtg gttggtgttg gcacatactc caagcactca	2940
ggttttgagt ttgtcccagg aatgaagact gcattactgc cggccctccc tggtaagggc	3000
tacacagaga aatcctattt ggagcctgtc ctggtaaact gctctgtaga ccaggctggc	3060
ctcgaactca agagaaccac ctgcctctga atgctggtat taagggcagg caccaccaac	3120
accagccta aaaaatgtct tttttttaa gatttttttt ttttttttta cagaataaac	3180
attctgttta caatattctg cttctatgta tatctgcaca ctagaagagg gcacccgac	3240
tcataatgga tgggtgtgag ccaccaagtg gttgctggga attgaactca gaacctctgg	3300
aagagcagtc agtgctctta acctctgagc catctctcca gcccctaaaa atggctcttg	3360
agatagggtc tcaagtagtt tgagactgag ttggctatat aaacaaggct ggcacatagc	3420

accatgtaca gctgggttta gtttacatgg ggtgtttttg tctctggagg caggaggatc	3480
at ttgagcat agggagttaa tagtgaggtc atgttttatc tactcttctg aattgagaac	3540
taagctgatg caaagcaagt ttgactgaag aagtccagtt tatgagaaca agggtgga	3600
cta atgtgtc aaagatggcc ttgcatgtgt tttagatgat gaccagtc cttgggaatt	3660
actggatgtg taagacctat atcttgacag gagtgaacag tgtcttatag gtcctatatg	3720
aaagaaatga gacataccca tttgttttcc cctaagaatt cacttttcct aacctggttc	3780
atgctattta gggtatttta cttgcaa atc ctaggggtgct cccttacc ca gtattgctta	3840
tgtggcacca aagtcactca ctccatgat ttgcaagtct ctgggaactt ccatgacaac	3900
ctagaatagc aactcaaata cat tttctca gtaccaattt tgaagaaaaa atattttgca	3960
aaatagctgt atggatgggt actaaatagt gaggttatct ccagaaggcc tatgaagaat	4020
taaggttgag ttcagttgag ttcagcagca agtttaaggt tcatccattt ttgtacagtg	4080
tttctctatt acggtaagtg ttttgctgc aggaatatct gtaccacatg cttgcctggt	4140
acctatatcg gccagaagag ggctttggat cctctggact tgaattacag atgggtatta	4200
gccaccattt aggtgctggg aattgaaacc aagtcctctg gaagaacagc aagtgactcg	4260
acgtccggag ctcaggcgcg cctgtggaat gtgtgtcagt taggggtgag aaagtcccca	4320
ggctccccag caggcagaag tatgcaaagc atgcatctca attagtcagc aaccaggtgt	4380
ggaaagtccc caggctcccc agcaggcaga agtatgcaaa gcatgcatct caattagtca	4440
gcaaccatag tcccgcctt aactccgcc atccgcctt taactccgcc cagttccgcc	4500
cattctccgc cccatggctg actaattttt tttatttatg cagaggccga ggccgcctct	4560
gcctctgagc tattccagaa gtagtgagga ggcttttttg gaggcctagg cttttgcaaa	4620
aagctcccg gagcttgtat atccattttt ggatctgatc agcacgtgat gaaaaagcct	4680
gaactcaccg cgacgtctgt cgagaagttt ctgatcgaaa agttcgacag cgtctccgac	4740
ctgatgcagc tctcgaggg cgaagaatct cgtgctttca gcttcgatgt aggagggcgt	4800
ggatatgtcc tgcgggtaaa tagctgcgcc gatgggtttt acaaagatcg ttatgtttat	4860

cggcactttg catcggccgc gctcccatt cccgaagtgc ttgacattgg ggaattcagc	4920
gagagcctga cctattgcat ctcccgcctg gcacaggggtg tcacgttgca agacctgcct	4980
gaaaccgaac tgcccgtctg tctgcagccg gtgcgggagg ccatggatgc gatcgctgcg	5040
gccgatctta gccagacgag cgggttcggc ccattcggac cgcaaggaat cgggtcaatac	5100
actacatggc gtgatttcat atgcgcgatt gctgatcccc atgtgtatca ctggcaaact	5160
gtgatggacg acaccgtcag tgcgtccgtc ggcagggctc tcgatgagct gatgctttgg	5220
gccgaggact gcccgaagt cgggcacctc gtgcacgcgg atttcggctc caacaatgct	5280
ctgacggaca atggccgcat aacagcggtc attgactgga gcgaggcgat gttcggggat	5340
tccaatacag aggtcgccaa catcttcttc tggaggccgt ggttggttg tatggagcag	5400
cagacgcgt acttcgagcg gaggcattcc gagcttgacg gatcgccgcg gctccgggcg	5460
tatatgctcc gcattggtct tgaccaactc tatcagagct tggttgacgg caatttcgat	5520
gatgcagctt gggcgaggg tcgatgcgac gcaatcgctc gatccggagc cgggactgct	5580
gggcgtacac aaatcgcccg cagaagcgcg gccgtctgga ccgatggctg tgtagaagta	5640
ctcgccgata gtggaaaccg acgccccagc actcgctcca gggcaaagga atagcacgtg	5700
ctacgagatt tcgattccac cgcgccttc tatgaaaggc tgggttcgg aatcgtttc	5760
cgggacgccg gctggatgat cctccagcgc ggggatctca tgctggagtt ctgcgccac	5820
cccaacttgt ttattgcagc ttataatggt tacaataaa gcaatagcat cacaatttc	5880
acaaataaag catttttttc actgcattct agttgtggtt tgtccaaact catcaatgta	5940
tcttatcatg tctgtatacc gtcgacctct aggcgcgcca tggctcttc gcttcctgc	6000
tcactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg	6060
cggtaatacgt gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaag	6120
gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgttttc cataggctcc	6180
gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aaccgcacag	6240

gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga	6300
ccttgccgct taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc ggaagcgtg gcgctttctc	6360
atagctcacg ctgtaggtat ctcaattcgg tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg	6420
tgacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttata cggtaactat cgtcttgagt	6480
ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca	6540
gagcgaggta tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca	6600
ctagaagaac agtatttggt atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc ggaaaaagag	6660
ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cggttttttt gtttgcaagc	6720
agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggg	6780
ctgacgctca gtggaacgaa aactcacggt aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa	6840
ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaaa aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat	6900
atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga	6960
tctgtctatt tcgttcatcc atagttgcct gactccccgt cgtgtagata actacgatac	7020
gggagggcct accatctggc ccagtgctg caatgatacc gcgagacca cgctcaccgg	7080
ctccagattt atcagcaata aaccagccag ccggaagggc cgagcgaga agtggtcctg	7140
caactttatc cgcctccatc cagtctatta attgttgccg ggaagctaga gtaagtagtt	7200
cgccagttaa tagtttgccg aacgttggtg ccattgctac aggcacgtg gtgtcacgct	7260
cgctggttgg tatggcttca ttcagctccg gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat	7320
cccccatggt gtgcaaaaaa ggggttagct ccttcgggtc tccgatcgtt gtcagaagta	7380
agttggccgc agtggttatca ctcatggta tggcagcact gcataattct cttactgtca	7440
tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat	7500
agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc oggcgtcaat acgggataat accgcgccac	7560
atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa	7620
ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tgtaaccac tcgtgcaccc aactgatctt	7680

cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg caaaatgccg	7740
caaaaaaggg aataagggcg acacggaaat gttgaatact catactcttc ctttttcaat	7800
attattgaag catttatcag ggttattgtc toatgagcgg atacatattt gaatgtattt	7860
agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca cttttccccg aaaagtgcc a cctgcatctc	7920
atcacgggtca cgcattggctg cgcccgcgca ggcggcccg acccccccc gatccccgga	7980
acgccagccg ccatccaccg ccgcgagccc cgggagcccg cggaccccg cccccgcg	8040
ctcgcccgcc gttgcgccgc tctctgcggg ggggctaggg ggccgcgggg ggaaggccac	8100
gccccctcca ctttttccag gaatgcgcgg catgaccgcg ccccccatg acccgccaac	8160
accccccgga tgcccccg gggtctttcc tggggggcct ttgtcagggt tgccgtgtgc	8220
accacgggc cccttgcca cgcttgccg ggtcaccgc gagccccgg tcacgtttgc	8280
cggggtcagc cctggggcgc ttcttcacgc tccattgcca tgcagaattc cacgttgtgc	8340
atagaaacag atgcaggcaa aacatccaca catataaac aaaaaattaa aaccaataaa	8400
actcctaaac ttttggctt tcttgaatct tcaatccctc aggttatgaa ataatcattt	8460
atgcagtcaa aaatttgcca ttcttggtgc cagggtgtgt gatgattcgg ggaagcagaa	8520
gcaggcagat ctctgtgaat gaggccagcc tgggtctacaa agtgagtccc aggacagtca	8580
ggcctgttac acagagaaac cttgaaaaa aaaagataat atgtactgtt gtattacccc	8640
aatatataag gctaaaccat tagaagcaca aactgttaa gtacggaaaa taatatctag	8700
tgtggtacag ttactactac tataatacac taatatagct gtgggaaact agttccaaag	8760
atgaattact aaccagtgtt tccaaggaaa taaatgaaag cagagagatt agttctattg	8820
ctagtgtttc attttcgtat atttcttaca atttctcttg ttacaaatag gcactagggt	8880
atcaagataa ttttaacgac tggctgagaa ccctagaaaa tctctgtgaa aaagggattt	8940
gtgaaatgag agagggtaat gtggccatta tagaaaaggc ttttgtgtgc cttgcatgca	9000
tagaccctgt gtttgatctc ttaacaccct ccttgaccag aaaaagcttc tgtggataga	9060

aatgattag ttatatatac ttttagggaa acgtagttct ggattctttg gttacaatta	9120
acagaattaa gtgcaaaaca agccagaaac ctcttgataa atgagaaaac ctgcttgtag	9180
aaggttgtaa ggctctgtaa tataggaatt aggagaaaag aaacctgtgt ggtggggcac	9240
gtctgtaatc ccagcattgg gaagtagagg tagaagatta gaaatcaaag gccagcctca	9300
gcaacacagt gagtgtgagg ccacctgaa ctacatcagg ttctgtctcc tttctttttt	9360
ttttttttct tttctttttt tggtttctct gtgtagtttt ggagcctatc ctggcactag	9420
ctctgaagag caggctggcc tcgaactcag agatcagcca gcctctgctg ggattaaagg	9480
tatgcaccac caacgcccc ggttttgtct caaacaaca aaaataacat caggaggtgg	9540
tgagagggct cagtggtcac aggcattctc tgcaaagcct gactctgagt tggatccttt	9600
agagctacat ggttgaggga agagaactga ctctggaag gtgtcctctg gtccccacac	9660
atagctatac acagcatgtg cattcacaca cactaaataa tgctattttt aaaaaatta	9720
aaaacaaca cagtttgggt tgtgaaaact agaactagat aataggtag aatcaagtat	9780
catgtaaatt tgctttcaac tcatccaaa atttgtttta tatttcagtt ttttctctc	9840
ctagcttgac tgtggagtct tgtccggaag caaatagttc ctttgagat cccacatgtg	9900
gacaccggac agtaggtcct caaatgctcc ttattaggtt ggttcaataa tatcaattgt	9960
ttgttactag gcagtgatgt tgtacatctg gaggagatct cttgagccca taatcaggtt	10020
attaggaata aatactctaa ggctaaaaat gtagcttagt gataagagt cttgcctggt	10080
gtgctgagac cctcggttcc atctccaca ccccatattc cattacaaa taccttttca	10140
ccgtccctag cattaagaaa caaaacaaca aagaagtttt tctttcttct gagatcctgc	10200
ccggagaggc atttaaaact ggccagggcc aaaaaaaaa aaaaaaaag aaaaaaaga	10260
aaagaaaaca ggctagggcc ggcatggtgg cgacgcctt taatcccagc acgcaggagg	10320
cagaggcagg gcggtctct gtgagtttga ggtagcctg gtctacctag tgagtttcag	10380
ggcaccagc gctaaagaga ctgtctcaaa aacaaaacag ccacacaatc agaaccacag	10440
caaacgcag ttatgatcct tggaaactgta ggaatgaca gcatttaaat aataggacga	10500

gccatttttg agaagctctg atttcacaag tgtcagggat gggctctggg cgagtaagat 10560

tgctaagtct ggcctctaaa tgagaccacg tggagttgat tagattcttt tcatgttctt 10620

cgtgctctat caaataactg tacccaaata cacacacaca cacacacaca caatgcgcgc 10680

acacacaaaa tcctttttta gcttaagaag cccagaatca gaagtaaagc taactgtggg 10740

acttaagtat tattctgaac ggaactccca gggcgtgaag cgcgcttcag gcttccagag 10800

aagcagctgg cgctggatgg aatgaaccaa gaggccagca caggggcaga tccgtcgagc 10860

tctcggccac cgagctgagc ccttaggttc tggggctggg aagggtccct aggattgtgc 10920

acctctcccg cgggggacaa gcagggggat ggcggggctg acgtcgggag gtggcctcca 10980

cggaaggga caccggatc tcgacacagc cttggcagtg gagtcaggaa gggtagggac 11040

agattctgga cgccctcttg gccagctcct caccgcccc ccccgactg gagccgagag 11100

taattcatatc aaaaggagg atcgctctcg cccctgggaa tcccaggagc cgtcgctaaa 11160

ttctggccgg cctcccagcc cggaaccgct gtgcccgccc agcgcggcgg gaggagcctg 11220

cgcttagggc ggatcgcggg tcggcgggag agcacaagcc cacagtcccc gcggtgggg 11280

gaggggcgcg ctgagcgggg gcccgggagc cagcgcgggg caaactggga aagtgggtgc 11340

gtgtgctggc tccgccctct tcccagggt gggggagaac ggtataaaag tgcgtagtc 11400

gcgttgagc ttctttttcg caacgggttt gccgtcagaa cgcaggtgag tggcggtgt 11460

ggcctccgcg ggcccgggct cctcctttg agcggggtcg gaccgccgtg cgggtgtcgt 11520

cgcccgggct tctctgcgag cgttcccgcc ctggatggcg ggctgtgcgg gagggcgagg 11580

gggggaggcc tggcgcggc cccggagcct cgcctcgtgt cgggcgtgag gcctagcgtg 11640

gcttccgccc cgcgcgtgc caccgcggcc gcgctttgct gtctgcccg ctgccctcga 11700

ttgcctgccc gcggcccggg ccaacaaagg gagggcgtgg agctggctgg tagggagccc 11760

cgtagtccgc atgtcgggca gggagagcgg cagcagtcgg gggggggacc gggcccgc 11820

gtcccgcagc acatgtccga cgccgcctgg acgggtagcg gcctgtgtcc tgataaggcg 11880

RU 2 560 596 C2

gcccggcggt gggttttaga tgccgggttc aggtggcccc gggccccggc ccggtctggc 11940

cagtaccccg tagtggttta gctccgagga gggcgaggcc cgcccgcccg gcaccagttg 12000

cgtgcgcgga aagatggccg ctcccgggcc ctgtagcaag gagctcaaaa tggaggacgc 12060

ggcagcccg cgagcgggg cgggtgagtc acccacacaa aggaagagg ccttgcccct 12120

cgccggccgc tgcttctgt gaccccggtg tgtaccggcc gcacttcagt cccccgggc 12180

gctctttcgg agcaccgctg gcctccgctg ggggagggga tctgtctaata ggcgttgag 12240

tttgctcaca tttggtgggt ggagactgta gccaggccag cctggccatg aaagtaattc 12300

ttggaatttg cccattttga gtttgagcg aagctgattg acaaagctgc ttagccgttc 12360

aaaggtattc ttcgaacttt ttttttaagg tgttgtgaaa acctcgaggc cgccaccatg 12420

aagacactcc agtttttctt ccttttctgt tgctggaaag caatctgctg caatagctgt 12480

gagctgacca acatcaccat tgcaatagag aaagaagaat gtcgtttctg cataagcatc 12540

aacaccactt ggtgtgctgg ctactgctac accagggatc tgggtgtataa ggaccagcc 12600

aggcccaaaa tccagaaaac atgtaccttc aaggaactgg tatacgaaac agtgagagtg 12660

cccggctgtg ctcccatgc agattccttg tatacatacc cagtggccac ccagtgtcac 12720

tgtggcaagt gtgacagcga cagcactgat tgtactgtgc gaggcctggg gccagctac 12780

tgctcctttg gtgaaatgaa agaataatag a 12811

<210> 5

<211> 11909

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> expression vector

<400> 5

tcgacgtccg gagctcaggc ggcgccatggc tcttcgcgtt cctcgctcac tgactcgctg 60

cgctcggtcg ttcggctgcg gcgagcggtg tcagctcact caaaggcggg aatacggtta 120

tccacagaat caggggataa cgcaggaaag aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc 180

RU 2 560 596 C2

aggaaccgta aaaagccgc gttgctggcg tttttccata ggctccgccc cctgacgag	240
catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac	300
caggcgtttc cccctggaag ctccctcgctg cgctctctctg ttccgaccct gccgcttacc	360
ggatacctgt ccgcctttct ccttcggga agcgtggcg tttctcatag ctacgctgt	420
aggtatctca gttcgggtga ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc	480
gttcagccc accgctgcgc cttatccggt aactatcgctc ttgagtcctaa cccggttaaga	540
cacgacttat cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta	600
ggcgggtgcta cagagttctt gaagtgggtg cctaactacg gctacactag aagaacagta	660
tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa aaagagttgg tagctcttga	720
tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg ttttttgtt gcaagcagca gattacgcgc	780
agaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggtctga cgctcagtgg	840
aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc atgagattat caaaaaggat cttcacctag	900
atccttttaa attaaaaatg aagtttttaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaacttgg	960
tctgacagtt accaatgctt aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg tctatttcgt	1020
tcatccatag ttgctgact ccccgctcgctg tagataacta cgatacggga gggcttacca	1080
tctggcccca gtgctgcaat gataccgcga gaccacgct caccggtcc agatttatca	1140
gcaataaacc agccagccgg aagggccgag cgcagaagtg gtcctgcaac tttatccgcc	1200
tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa gctagagtaa gtagttcgcc agttaatagt	1260
ttgcgcaacg ttgttgccat tgctacaggc atcgtggtgt cacgctcgctc gtttggtatg	1320
gcttcattca gctccggttc ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catgttgtgc	1380
aaaaaagcgg ttagctcctt cggctcctcg atcgttgtca gaagtaagtt ggccgcagtg	1440
ttatcactca tggttatggc agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga	1500
tgcttttctg tgactggtga gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg tatgcggcga	1560

RU 2 560 596 C2

ccgagttgct cttgcccggc gtcaatacgg gataataccg cgccacatag cagaacttta	1620
aaagtgetca tcattggaaa acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg	1680
ttgagatcca gttcgatgta acccaactcg gcacccaact gatcttcagc atcttttact	1740
ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaaa aaagggaata	1800
agggcgacac ggaaatgttg aataactcata ctcttccttt ttcaatatta ttgaagcatt	1860
tatcaggggtt attgtctcat gagcggatac atatttgaat gtatttagaa aaataaacia	1920
ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaaa gtgccacctg catctcatca cggtcacgca	1980
tggtgcgcc cgcgacgac ccccgaccc ccccgatc cccggaacgc cagccgccat	2040
ccacgccccg cagcccccg agcccgcgga ccccgaccc cgcgcgctcg cccgcggtg	2100
cgcgcgtctc tgcggggggg ctagggggcc gcggggggaa ggccacgccc cctccacttt	2160
ttccaggaat gcgcggcatg acccgcccc cccatgaccc gccaacaccc ccccgatgcc	2220
ccccgggggt ctttcttggg gggcctttgt caggggtgcc tgtgtcacc acgggcccct	2280
tggccacgct tgcctgggtc accccggagc cccgggtcac gtttgccggg gtcagccctg	2340
gggcgcttct tcacgtcca ttgccatgca gaattccacg ttgtgcatag aaacagatgc	2400
aggcaaaaaca tccacacata taaaacaaaa aattaaaacc aataaaactc ctaaactttt	2460
ggtctttctt gaatcttcaa tccctcaggt tatgaaataa tcatttatgc agtcaaaaat	2520
ttgccattct tgttgccagg tgtggtgatg attcggggaa gcagaagcag gcagatctct	2580
gtgaatgagg ccagcctggc ctacaaagtg agtcccagga cagtcaggcc tgttacacag	2640
agaaaccttg aaaaaaaaaa gataatatgt actgttgtat taccocaata tataaggcta	2700
aaccattaga agcacaacac tgttaagtac ggaaaataat atctagtgtg gtacagttac	2760
tactactata atacactaat atagctgtgg gaaactagtt ccaaagatga attactaacc	2820
agtgtttcca aggaaataaa tgaaagcaga gagattagtt ctattgctag tgtttcattt	2880
tcgtatatatt cttacaattt ctcttggtac aaataggcac tagggatatca agataatttt	2940
aacgactggc tgagaacct agaaaatctc tgtgaaaaag ggatttgtga aatgagagag	3000

ggtaatgtgg ccattataga aaaggctttt gtgtgccttg catgcataga cctgtgtttt	3060
gatctcttaa caccctcctt gaccagaaaa agcttctgtg gatagaaaat gattagttat	3120
atatactttt agggaaacgt agttctggat tctttgggta caattaacag aattaagtgc	3180
aaacaaagcc agaaacctcc tgataaatga gaaaacctgc ttgtagaagg ttgtaaggct	3240
ctgtaataata ggaattagga gaaaagaaac ctgtgtgggtg gggcacgtct gtaatcccag	3300
cattgggaag tagaggtaga agattagaaa tcaaaggcca gcctcagcaa cacagtgagt	3360
ttgaggccac cctgaactac atcaggttct gtctcctttc tttttttttt tttcttttc	3420
tttttttggt ttctctgtgt agttttggag cctatcctgg cactagctct gaagagcagg	3480
ctggcctcga actcagagat cagccagcct ctgctgggat taaaggtatg caccaccaac	3540
gccccagggt ttgtctcaaa caaacaaaaa taacatcagg aggtggtgag agggctcagt	3600
ggtcacaggc attctctgca aagcctgact ctgagttgga tccttttagag ctacatgggt	3660
gaggaagag aactgactcc tggaagggtg cctctggtcc ccacacatag ctatacacag	3720
catgtgcatt cacacacact aaataatgct atttttaaaa aaattaaaaa caacaacagt	3780
ttgggttggtg aaaactagaa ctagataata ggtaagaatc aagtatcatg taaatttgct	3840
ttcaactcat cccaaaattt gttttatatt tcagttttt tccttcctag cttgactgtg	3900
gagtcttggtc cggaagcaaa tagttccttt gcagatccca catgtggaca ccggacagta	3960
ggtcctcaaa tgctccttat taggttggtt caataatata aattgtttgt tactaggcag	4020
tgatgttgta catctggagg agatctcttg agcccataat caggttatta ggaataaata	4080
ctctaaggct aaaaatgtag cttagtata agagtgttg cctggtgtgc tgagaccctc	4140
ggttccatct ccacaacccc atattccatt acaaaatacc ttttcaccgt ccctagcatt	4200
aagaaacaaa acaacaaaga agtttttctt tcttctgaga tcctgcccgg agaggcattt	4260
aaaactggcc agggccaaaa aaaaaaaaaa aaaaagaaaa aaaagaaaag aaaacaggct	4320
agggccggca tgggtggcga cgcctttaat cccagcacgc aggaggcaga ggcagggcgg	4380

atctctgtga gtttgaggtc agcctggtct acctagttag tttcaggcca cccagggcta	4440
aagagactgt ctcaaaaaca aaacagccac acaatcagaa ccacagcaaa acgcagttat	4500
gatccttgga actgtaggaa tgacaagcat ttaaataata ggacgagcca tttttgagaa	4560
gctctgattt cacaagtgtc agggatgggc tctgggcgag taagattgct aatgctggcc	4620
tctaaatgag accacgtgga gttgattaga ttcttttcat gttcctcgtg ctctatcaaa	4680
taactgtacc caaatacaca cacacacaca cacacacaat gcgcgcacac acaaaatcct	4740
tttttagctt aagaagccca gaatcagaag taaagctaac tgtgggactt aagtattatt	4800
ctgaacggaa ctcccagggc gtgaagcgcg cttcaggctt ccagagaagc agctggcgct	4860
ggatggaatg aaccaagagg ccagcacagg ggcagatccg tcgagctctc ggccaccgag	4920
ctgagccctt aggttctggg gctgggaagg gtccctagga ttgtgcacct ctcccgcggg	4980
ggacaagcag gggatggcgg ggctgacgtc gggagggtggc ctccacggga agggacaccc	5040
ggatctcgac acagccttgg cagtggagtc aggaagggtg ggacagattc tggacgccct	5100
cttggccagt cctcacgcc ccacccccga tggagccgag agtaattcat acaaaaggag	5160
ggatgcctt cgccctggg aatcccaggg accgtcgcta aattctggcc ggccctccag	5220
cccgaaccg ctgtgccgc ccagcgcggc gggaggagcc tgcgcctagg gcggatcgcg	5280
ggtcggcggg agagcacaag cccacagtcc ccggcggtgg gggagggcg cgctgagcgg	5340
gggcccggga gccagcgcgg ggcaactgg gaaagtggg tcgtgtgctg gctccgccct	5400
cttcccagg gtgggggaga acggtataaa agtgcggtag tcgcgttgga cgttcttttt	5460
cgcaacgggt ttgccgtcag aacgcagggt agtggcgggt gtggcctccg cgggcccg	5520
ctccctcctt tgagcggggt cggaccgccg tgcgggtgtc gtcggccggg cttctctgcg	5580
agcgttcccg cctggatgg cgggctgtgc gggagggcga gggggggag cctggcggcg	5640
gccccggagc ctgcctcgt gtcgggcgtg aggcctagcg tggcttccgc ccgcgcgct	5700
gccaccgcgg ccgcgctttg ctgtctgcc ggtgccctc gattgcctgc ccgcggccc	5760
ggccaacaaa gggagggcgt ggagctggct ggtagggagc ccgtagtcc gcatgtcggg	5820

RU 2 560 596 C2

cagggagagc ggcagcagtc ggggggggga ccgggcccgc ccgtcccgca gcacatgtcc	5880
gacgccgcct ggacgggtag cggcctgtgt cctgataagg cggccgggcg gtgggtttta	5940
gatgccgggt tcaggtggcc ccgggtcccg gcccggtctg gccagtaccc cgtagtggct	6000
tagctccgag gagggcgagg cccgccgcgc cggcaccagt tgcgtgcgcg gaaagatggc	6060
cgctcccggg ccctgtagca aggagctcaa aatggaggac gcggcagccc ggcggagcgg	6120
ggcgggtgag tcacccacac aaaggaagag ggccttgccc ctgcgcggcc gctgcttcct	6180
gtgaccccggt ggtgtaccgg ccgcacttca gtcaccccg gcgctctttc ggagcaccgc	6240
tggcctccgc tgggggaggg gatctgtcta atggcgttgg agtttgctca catttggtgg	6300
gtggagactg tagccaggcc agcctggcca tgaaagtaat tcttggaatt tgcccatttt	6360
gagtttgag cgaagctgat tgacaaagct gcttagccgt tcaaaggat tcttcgaact	6420
ttttttttaa ggtgttgtga aaacctcgag gtacgtatcg cgaaagctag cggccgcgca	6480
gttaacgccg cccctctccc tcccccccc ctaacgttac tggccgaagc cgcttggaat	6540
aaggccggtg tgcgtttgtc tatatgttat tttccaccat attgccgtct tttggcaatg	6600
tgagggcccg gaaacctggc cctgtcttct tgacgagcat tcctaggggt ctttcccctc	6660
tcgccaaagg aatgcaaggc ctgttgaatg tcgtgaagga agcagttcct ctggaagctt	6720
cttgaagaca aacaacgtct gtagcgaccc tttgcaggca gcggaacccc ccacctggcg	6780
acaggtgcct ctgcggccaa aagccacgtg tataagatac acctgcaaag gcggcacaac	6840
cccagtgcc cgttgtgagt tggatagttg tggaaagagt caaatggctc tcctcaagcg	6900
tattcaacaa ggggctgaag gatgccaga aggtacccca ttgtatggga tctgatctgg	6960
ggcctcggtc cacatgcttt acatgtgttt agtcgaggtt aaaaaaacgt ctaggccccc	7020
cgaaccacgg ggacgtgggt ttcctttgaa aaacacgatg ataatatggc cacaagatct	7080
gccaccatgg ttcgaccatt gaactgcac gtcgcgctgt cccaaaatat ggggattggc	7140
aagaacggag acctaccctg gcctccgctc aggaacgagt tcaagtactt ccaaagaatg	7200

accacaacct cttcagtgga aggtaaacag aatctggtga ttatgggtag gaaaacctgg	7260
ttctccattc ctgagaagaa tcgacctcta aaggacagaa ttaatatagt tctcagtaga	7320
gaactcaaag aaccaccacg aggagctcat tttcttgcca aaagtttga tgatgcctta	7380
agacttattg aacaaccgga attggcaagt aaagtagaca tggtttgat agtcggaggc	7440
agttctgttt accaggaagc catgaatcaa ccaggccacc tcagactctt tgtgacaagg	7500
atcatgcagg aatttgaaag tgacacgttt tcccagaaa ttgatttggg gaaatataaa	7560
cttctcccag aatacccagg cgtcctctct gaggtccagg aggaaaaagg catcaagtat	7620
aagtttgaag tctacgagaa gaaagactaa tctagcatat taccctaac acctgccacc	7680
ccagtcttaa tcagtgggtg aagaacggtc tcagaactgt ttgtctcaat tggccattta	7740
agtttaatag tgaaagactg gttaatgata acaatgcac ggaaaacctt caggaggaaa	7800
ggagaatgtt ttgtggaaca tttttgtgtg tgtggcagtt ttaagttatt agttttcaaa	7860
atcagtactt tttaatggaa acaacttgac caaaaatctg tcacagaatt ttgagaccca	7920
ttaaaataca agtttaatga gaagtctgtc tctgttaatg ctgaagtcac tactaagtgc	7980
ttagcttagc aaggatatgt gatgcccatt tgtgttccaa gggattggac tgttcatcag	8040
gaccagagc tgagtttcaa gggctcaaga gatggcttat tacctgtggg tgtcttgaag	8100
gttctggttg ggacaaatta ggaatgtttt tggcagacat ggtgactacc cttcatctgg	8160
gtgagttcag ttgatttgtc ttgagccttt ggggtttaca caagtaaatg acatcataca	8220
gttagtgtat tgttagtgaa tattaatata tgaggcaggc tttgctctag caattttaga	8280
actagtttctc aggaaagggc tcactctgtg cattggatgt ttgattctat cacttagagt	8340
ttaaactgaa agtgctcaag aggttttatt taggctggga tataaataag ctttctgtga	8400
gcttgtaatg gtatcaggaa tttaaaaggc catctggggc acaaagatta agcagaaaag	8460
gtagaagggtg agattggggg actttgagta cttcacacac tttaatgtgt gagtgcctta	8520
gtgcatatag tacaactgcc agataagggc atccacatct gattgttttg aaggcacctt	8580
gtggtttctg ggaattcaga attgggagaa aatgctccc aaccgctgaa gcccttggtg	8640

RU 2 560 596 C2

atctgcaggg tgtttattta gcaggagata aggacaaaaa gttatagtgt ggagttgggt	8700
gagttggtag atgtcattac aacagggtggt cttaaattgg gttaggagtc actttgaaat	8760
acctgggcca taagcaaagt ggcattttca cctttcagga gaaactggta cacttatcca	8820
ttctatagtg catgcttggt caattgggct gatgactaaa ccggtgacta aaggtttgtc	8880
agtataaatg gatgggttgt aggacagcgg tgaggaatta ctatacctgc aaggagtcac	8940
tgctgatct gcttgaaag ggcaggatt gagtctcaga aggtgtacac cataggatat	9000
ggaaaaattt gtcacgccta gcattcaact tagtggtgta gcgccaccta ctggcacttt	9060
aaaagcttag catagaggag catgtgtgtt aggagctcgg atgggatcca gggcctcaag	9120
gtttgcatgt aaataaaagc cctttaccaa attaaactaca taccagcata catcagtcct	9180
ttagtgttga aaaacagaag tgaaagctaa tatatatagt gcttgcttta tttaagtcta	9240
gctgattacg tgtttggttg ccagtgtgac tagtctggag ttgaatttgt cctcagacac	9300
gtaaaatgga atttgggatt cacaacactc tagtatgagg gacctaattgg cctgtaccag	9360
gcacaaacgt gtctataaac tacacaaaac gaaggaattt acaggaatta ggaaggattt	9420
cttaacatta aaacattatg ggcattttta aaaaagcttt gacaggattt ctttgtcatg	9480
gctgtcctgg agctagtgtg gtagaccagg ctgggctgaa atcttgtctg cctgcctggc	9540
ttggacactt ttttattatg tatacaacat tctgcttcca tgtatatctg cacattagaa	9600
gacggcacca gatctcctaa tggatggttg tgagccacca tgtggttgct gggaattgaa	9660
ctcaggacct ctggaagagc agtgctctta acctctgagc catctccagc cccagcttgg	9720
gcacattttt aatggctggg aaatcaaacc ccctaggcct tctgtcagta atgaagggt	9780
tttggtacc gagagtagga tttaagggtta ttcggagctg caggctctgc tcagtgcagg	9840
tttgggagtc cagcatctta gaaaatgcag tgaagccaag ctgagctata ttttgtttaa	9900
aaaaaaaaata agtgggtaaa gtgctgctga gcctgatgac caagctggga cacaagtaga	9960
agaacatagg ccaatgctct atattaaaag catgggtcat ttttaatgct cttgagaagg	10020

ctatgcctac actactctca gccaccgcag cgtgtttaa ttaaactagt ttggaaattt	10080
tctttggggg taagctattt aacctagtgc cttggcaggt atactactga actctcctcc	10140
tcattccttt ttgtttttta agaatttcag tcaggctcag gcagccctta aacttgtgat	10200
taagcctgag aacagttacg attatgagcc tattagtata ccgatcaata tgtgaatttt	10260
tttgggatgg gggtcaggcc tccctgcctc ccaaatactg ggactaaagg ctgcaccacc	10320
acaacctggc tcttgaaata cttttctaca ttttttgggg ggcatgggtg ggagagcagg	10380
gtttctctgt attagccctg gctctcctgg aactctgtag accaggctat tcttgagctc	10440
agattagcct gtctctgcct cctaaattct gggattaaag gtgtgtgcta ctgctgcctg	10500
gctacaaaga catTTTTTTT tttcttaa ataaaaa aagtggttct tttagaaggg	10560
tggttggtgt tggcacatac tccaagcact caggttttga gtttgtcca ggaatgaaga	10620
ctgcattact gccgcccctc cctggtaagg gctacacaga gaaatcctat ttggagcctg	10680
tcttggtaac tcgctctgta gaccaggctg gctcgaact caagagaacc acctgcctct	10740
gaatgctggt attaaggga ggcaccacca acaccagcc taaaaaatgt ctttttttta	10800
aagatTTTTT tttttttttt tacagaataa acattctgtt tacaatatc tgcttctatg	10860
tatatctgca cactagaaga gggcaccgca tctcataatg gatggttgag agccaccaag	10920
tggttgctgg gaattgaact cagaacctct ggaagagcag tcagtgtctt taacctctga	10980
gccatctctc cagcccctaa aaatggctct tgagataggg tctcaagtag tttgagactg	11040
agttggctat ataaacaagg ctggcacata gcaccatgta cagctgggtt tagtttacat	11100
ggggtgtttt tgtctctgga ggcaggagga tcatttgagc ataggagtt aatagtgag	11160
tcattgttta tctactcttc tgaattgaga actaagctga tgcaaagcaa gtttgactga	11220
agaagtccag tttatgagaa caagggtgga aactaatgtg tcaaagatgg ccttgcatgt	11280
gttttagatg atgaccagct cacttgggaa ttactggatg tgtaagacct atatcttgac	11340
aggagtgaac agtgtcttat aggtcctata tgaaagaaat gagacatacc cttttgttt	11400
cccctaagaa ttcacttttc ctaacctggg tcattgctatt taggttattt tacttgcaaa	11460

RU 2 560 596 C2

tcctaggggtg ctcccttacc cagtattgct tatgtggcac caaagtcact cactcccatg	11520
atttgcaagt ctctgggaac ttccatgaca acctagaata gcaactcaaa tacattttct	11580
cagtaccaat tttgaagaaa aaatatatttg caaaatagct gtatggatgg gtactaaata	11640
gtgagggttat ctccagaagg cctatgaaga attaagggtg agttcagttg agttcagcag	11700
caagtttaag gttcatccat tttgtacag tgttttccta ttacggtaag tgttttgcct	11760
gcaggaatat ctgtaccaca tgcttgctg gtacctatat cggccagaag agggctttgg	11820
atcctctgga cttgaattac agatgggtat tagccaccat ttaggtgctg ggaattgaaa	11880
ccaagtcctc tggaagaaca gcaagtgac	11909

<210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 6	
tcttgacct tagtgagtg	20

<210> 7
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 7	
acaatcagtg ctgtcgct	18

<210> 8
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 8

gcccacaaatc cagaaaac

18

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 9

cacgctacag gaaaaccc

18

<210> 10

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 10

gccgctgctt cctgtgac

18

<210> 11

<211> 12424

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> expression vector

<400> 11

ccgtcgacct ctaggcgcgc catggctott ccgcttcttc gctcactgac tcgctgcgct

60

cggtcgttcg gctgcggcga gcggtatcag ctcaactcaaa ggccgtaata cggttatcca

120

cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga

180

accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct ccgccccct gacgagcatc

240

acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaaccgcac aggactataa agataccagg	300
cgtttcccc tggaagctcc ctggtgcgct ctctgttcc gacctgccg cttaccggat	360
acctgtccgc ttttctccct tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca cgctgtaggt	420
atctcagttc ggtgtaggtc gttcgctcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccggtc	480
agcccgaccg ctgcgcctta tccggtaact atcgtcttga gtccaaccg gtaagacacg	540
acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg	600
gtgctacaga gttcttgaag tgggtggcta actacggcta cactagaaga acagtatttg	660
gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg	720
gcaaacaaac caccgctggc agcggttttt ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa	780
aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct tttctacggg gtctgacgct cagtggaacg	840
aaaactcacg ttaagggatt ttggtcatga gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc	900
ttttaaatta aaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat atatgagtaa acttggtctg	960
acagttacca atgcttaatc agtgaggcac ctatctcagc gatctgtcta ttcggttcat	1020
ccatagttgc ctgactcccc gtcgtgtaga taactacgat acgggagggc ttaccatctg	1080
gccccagtgc tgcaatgata ccgcgagacc cacgctcacc ggctccagat ttatcagcaa	1140
taaaccagcc agccggaagg gccgagcgca gaagtggctc tgcaacttta tccgcctcca	1200
tccagtctat taattgttgc cgggaagcta gagtaagtag ttcgccagtt aatagtttgc	1260
gcaacgttgt tgccattgct acaggcatcg tgggtgcacg ctgctcgttt ggtatggctt	1320
cattcagctc cggttcccaa cgatcaaggc gagttacatg atcccccatg ttgtgcaaaa	1380
aagcggttag ctcttcggc cctccgatcg ttgtcagaag taagttggcc gcagtgttat	1440
cactcatggc tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt catgccatcc gtaagatgct	1500
tttctgtgac tgggtgagtac tcaaccaagt cattctgaga atagtgtatg cggcgaccga	1560
gttgcctctg cccggcgcta ataccggata ataccgcgc acatagcaga actttaaaag	1620

tgctcatcat tggaaaacgt tcttcggggc gaaaactctc aaggatctta ccgctgttga	1680
gatccagttc gatgtaaccc actcgtgcac ccaactgac ttcagcatct ttactttca	1740
ccagcgtttc tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaaatgc cgcaaaaaag ggaataagg	1800
cgacacggaa atgttgaata ctcatctct tcctttttca atattattga agcatttato	1860
agggttattg tctcatgagc ggatacatat ttgaatgtat ttagaaaaat aaacaaatag	1920
gggttccgag cacatttccc cgaaaagtgc cacctgcac tcatcacggt cagcatggc	1980
tgcgcccgcg cagcgcccc cgaccccccg cgatccccg gaacgccagc cgccatccac	2040
cgcccgagc ccccgagcc cgggacccc gacccccgc cgctcgccc cggttgcgc	2100
gctctctgcg ggggggctag ggggcgcgc ggggaaggcc acgccccctc cactttttcc	2160
aggaatgcgc ggcatgacc gccccccca tgaccgcca acaccccccg gatgcccc	2220
gggggtcttt cctggggggc ctttgtcagg gttgcctgtg tcaccacgg gcccttggc	2280
cacgcttgcc tgggtcacc cgagccccg ggtcacgtt gccggggtca gccctgggc	2340
gcttcttcac gctccattgc catgcagaat tccacgttgt gcatagaaac agatgcaggc	2400
aaaacatcca cacatataaa acaaaaaatt aaaaccaata aaactcctaa acttttggc	2460
tttcttgaat cttcaatccc tcaggttatg aaataatcat ttatgcagtc aaaaatttc	2520
cattcttgtt gccaggtgtg gtgatgattc ggggaagcag aagcaggcag atctctgtga	2580
atgaggccag cctggtctac aaagtgagtc ccaggacagt caggcctgtt acacagagaa	2640
acctgaaaa aaaaaagata atatgtactg ttgtattacc ccaatatata aggctaaacc	2700
attagaagca caacactgtt aagtacggaa aataatatct agtgtggtac agttactact	2760
actataatac actaatatag ctgtgggaaa ctagttccaa agatgaatta ctaaccagt	2820
ttccaagga aataaatgaa agcagagaga ttagttctat tgctagtgtt tcattttcgt	2880
atatttttta caatttctct tgttaciaat aggcactagg gtatcaagat aattttaacg	2940
actggctgag aaccctagaa aatctctgtg aaaaagggat ttgtgaaatg agagagggt	3000
atgtggccat tatagaaaag gcttttgtgt gccttgcag catagaccct gtgtttgatc	3060

tcttaacacc ctccttgacc agaaaaagct tctgtggata gaaaatgatt agttatatat	3120
acttttaggg aaacgtagtt ctggattctt tggttacaat taacagaatt aagtgcaaac	3180
aaagccagaa acctcctgat aaatgagaaa acctgcttgt agaaggttgt aaggctctgt	3240
aatataggaa ttaggagaaa agaaacctgt gtggtggggc acgtctgtaa tcccagcatt	3300
gggaagtaga ggtagaagat tagaaatcaa aggccagcct cagcaacaca gtgagtttga	3360
ggccaccctg aactacatca ggttctgtct cctttctttt tttttttttt cttttctttt	3420
tttggtttct ctgtgtagtt ttggagccta tcctggcact agctctgaag agcaggctgg	3480
cctcgaactc agagatcagc cagcctctgc tgggattaaa ggtatgcacc accaacgccc	3540
caggttttgt ctcaaacaaa caaaaataac atcaggaggt ggtgagaggg ctcagtggtc	3600
acaggcattc tctgcaaagc ctgactctga gttggatcct ttagagctac atggttgagg	3660
gaagagaact gactcctgga aggtgtcctc tgggtccccc acatagctat acacagcatg	3720
tgcattcaca cacactaaat aatgctattt ttaaaaaaat taaaaacaac aacagtttgg	3780
gttgtgaaaa ctagaactag ataataggta agaatcaagt atcatgtaaa tttgctttca	3840
actcatccca aaatttgttt tatatttcag tttttttcct tcctagcttg actgtggagt	3900
cttgtccgga agcaaatagt tcctttgcag atcccacatg tggacaccgg acagtaggtc	3960
ctcaaatgct ccttattagg ttggttcaat aatatcaatt gtttgttact aggcagtgat	4020
gttgtacatc tggaggagat ctcttgagcc cataatcagg ttattaggaa taaatactct	4080
aaggctaaaa atgtagctta gtgataagag tgcttgccctg gtgtgctgag accctcggtt	4140
ccatctccac aaccccatat tccattacaa aatacctttt caccgtccct agcattaaga	4200
aacaaaacaa caaagaagtt tttctttctt ctgagatcct gcccgagag gcatttaaaa	4260
ctggccaggg ccaaaaaaaaa aaaaaaaaaa agaaaaaaaa gaaaagaaaa caggctaggg	4320
cggcatggt ggcgcacgcc tttaatccca gcacgcagga ggcagaggca gggcgatct	4380
ctgtgagttt gaggtcagcc tggctacct agtgagtttc agggcaccca gggctaaaga	4440

gactgtctca aaaacaaaac agccacacaa tcagaaccac agcaaaacgc agttatgatc	4500
cttggaactg taggaatgac aagcatttaa ataataggac gagccatttt tgagaagctc	4560
tgatttcaca agtgtcaggg atgggctctg ggcgagtaag attgctaatt ctggcctcta	4620
aatgagacca cgtggagttg attagattct tttcatgttc ctctgtctct atcaaataac	4680
tgtacccaaa tacacacaca cacacacaca cacaatgcgc gcacacacaa aatccttttt	4740
tagcttaaga agcccagaat cagaagtaaa gctaactgtg ggacttaagt attattctga	4800
acggaactcc cagggcgtga agcgcgcttc aggcttccag agaagcagct ggcgctggat	4860
ggaatgaacc aagaggccag cacaggggca gatccgtcga gctctcgcc accgagctga	4920
gcccttaggt tctggggctg ggaagggctc ctaggattgt gcacctctcc cgcgggggac	4980
aagcaggggg atggcggggc tgacgtcggg aggtggcctc cacgggaagg gacacccgga	5040
tctcgacaca gccttggcag tggagtcagg aagggtagg acagattctg gacgccctct	5100
tggccagctc ctaccgccc ccccccgac tggagccgag agtaattcat acaaaaggag	5160
ggatcgcctt cgcccctggg aatcccagg accgtcgcta aattctggcc ggcctcccag	5220
cccgaaccg ctgtgccgc ccagcgcggc gggaggagcc tgcgcctagg gcggatcgcg	5280
ggtcggcggg agagcacaag cccacagtc ccggcggtgg gggagggcg cgctgagcgg	5340
gggcccgga gccagcgcg ggcaaactgg gaaagtggg tcgtgtgctg gctccgccct	5400
cttcccagg gtgggggaga acggtataaa agtgcggtag tcgcgttga cgttcttttt	5460
cgcaacgggt ttgccgtcag aacgcaggtg agtggcgggt gtggcctccg cgggcccg	5520
ctccctcctt tgagcggggt cggaccgccc tgcgggtgtc gtcggccggg cttctctgcg	5580
agcgttccc ccctggatgg cgggctgtgc gggagggcga ggggggagg cctggcggcg	5640
gccccggagc ctgcctcgt gtcgggcgtg aggcctagcg tggcttcgc cccgcgcgt	5700
gccaccgcg ccgcgctttg ctgtctgcc ggctgccctc gattgcctgc ccgcggccc	5760
ggccaacaaa gggagggcgt ggagctggct ggtagggag cccgtagtcc gcatgtcggg	5820
cagggagagc ggcagcagtc ggggggggga ccgggccgc ccgtcccga gcacatgtcc	5880

RU 2 560 596 C2

gacgcgcgcct ggacgggtag cggcctgtgt cctgataagg cggccgggcg gtgggtttta	5940
gatgccgggt tcaggtggcc ccgggtcccg gcccggtctg gccagtacc ctagtggct	6000
tagctccgag gagggcgagg ccgcgccgcc cggcaccagt tgcgtgcgcg gaaagatggc	6060
cgtccccggg cctgtagca aggagctcaa aatggaggac gggcagccc ggcgagcgg	6120
ggcgggtgag tcaccacac aaaggaagag ggccttgccc ctgcgggcc gctgcttct	6180
gtgaccccgt ggtgtaccgg cgcacttca gtcaccccg gcgctcttc ggagcacgc	6240
tggcctccgc tgggggagg gatctgtcta atggcgttg agtttgctca catttggtg	6300
gtggagactg tagccaggcc agcctggcca tgaaagtaat tcttggaatt tgccatttt	6360
gagtttgag cgaagctgat tgacaaagct gcttagccgt tcaaaggtat tcttcgaact	6420
tttttttaaa ggtgttgta aaacctcgag gtacgtatcg cgaaagctag catattacc	6480
ctaacacctg ccacccagc cttaatcagt ggtggaagaa cggctctcaga actgtttgtc	6540
tcaattggcc atttaagttt aatagtgaag gactggttaa tgataacaat gcatcgaaa	6600
accttcagga ggaaaggaga atgttttggt gaacattttt gtgtgtgtgg cagttttaag	6660
ttattagttt tcaaaatcag tactttttta tggaacaac ttgacaaaa atctgtcaca	6720
gaattttgag acccattaaa atacaagttt aatgagaagt ctgtctctgt taatgctgaa	6780
gtcattacta agtgcttagc ttagcaagg atgtggatgc ccatttggt tccaaggat	6840
tggactgttc atcaggacc agagctgagt ttcaagggt caagagatgg cttattacct	6900
gtgggtgtct tgaagttct ggttgggaca aattaggaat gtttttgga gacatggtga	6960
ctacctcat ctgggtgagt tcagttgatt tgtcttgagc ctttggggt tacacaagta	7020
aatgacatca tacagttagt gtattgtag tgaatattaa tatatgaggc aggctttgct	7080
ctagcaattt tagaactagt tttcaggaaa gggttcatct tgtgcattgg atgtttgatt	7140
ctatcactta gagtttaaac tgaaagtgc caagaggttt tatttaggct gggatataaa	7200
taagcctttc tgtagcttgt aatggtatca ggaatttaaa aggccatctg gggcacaag	7260

RU 2 560 596 C2

attaagcaga aaaggtagaa ggtgagattg ggggactttg agtacttcac acactttaat	7320
gtgtgagtgc tttagtgcac atagtacaac tgccagataa gggcatccac atctgattgt	7380
ttggaaggca ccttgtggtt tctgggaatt cagaattggg agaaaaatgc tcccaaccgc	7440
tgaagccctt ggtaatctgc aggggtgtta tttagcagga gataaggaca aaaagttata	7500
gtgtggagtt ggttgagttg gtagatgtca ttacaacagg tggctctaaa ttgggttagg	7560
agtcactttg aaatacctgg gccataagca aagtggcatt ttcacctttc aggagaaact	7620
ggtacactta tccattctat agtgcattgt tgttcaattg ggctgatgac taaaccggtg	7680
actaaagggt tgtagctata aatggatggg ttgtaggcag acggtgagga attactatac	7740
ctgcaaggag tcattgcttg atctgcttgg aaaggggcag gattgagtct cagaagggtg	7800
acaccatagg atatggaaaa atttgtcacg cctagcattc aacttagtgg tgtagcgcca	7860
cctactggca ctttaaaagc ttagcataga ggagcatgtg tgttaggagc tcggatggga	7920
tccagggcct caaggtttgc atgtaaataa aagcccttta ccaaattaac tacataccag	7980
catacatcag tccttttagt ttgaaaaaca gaagtgaag ctaatatata tagtgcttgc	8040
tttatttaag tctagctgat tacgtgtttg gttgccagtg tgactagtct ggagttgaat	8100
ttgtcctcag acacgtaaaa tggaatttgg gattcacac actctagtat gagggaccta	8160
atggcctgta ccaggcacia acgtgtctat aaactacaca aaacgaagga atttacagga	8220
attaggaagg tattcttaac attaaaacat tatgggcatt ttaaaaaaag ctttgacagg	8280
atttctttgt catggctgtc ctggagctag ttgtgtagac caggctgggc tgaaatcttg	8340
tctgcctgcc tggcttggac acttttttat tatgtataca acattctgct tccatgtata	8400
tctgcacatt agaagacggc accagatctc ctaatggatg gttgtgagcc accatgtggt	8460
tgctgggaat tgaactcagg acctctggaa gagcagtgtc cttaacctct gagccatctc	8520
cagccccagc ttgggcacat ttttaatggc tgggaaatca aacccctag gccttctgtc	8580
agtaatgaag ggcttttggc taccgagagt aggatttaag gttattcgga gctgcaggtc	8640
tgctcagtg caggtttggg agtccagcat cttagaaaat gcagtgaagc caagctgagc	8700

RU 2 560 596 C2

tatatatttgt ttaaaaaaaaa aataagtggg taaagtgctg ctgagcctga tgaccaagct	8760
gggacacaag tagaagaaca taggccaatg ctctatatatta aaagcatggg tcatttttta	8820
tgctcttgag aaggctatgc ctacactact ctcagccacc gcagcgtgtt taaattaaac	8880
tagtttgga attttctttg ggggtaagct atttaaccta gtgccttggc aggtatacta	8940
ctgaactctc ctctcattc ctttttgttt ttttaagaatt tcagtcaggc tcaggcagcc	9000
cttaaacttg tgattaagcc tgagaacagt tacgattatg agcctattag tataccgatc	9060
aatatgtgaa tttttttggg atgggggtca ggcctccctg cctcccaaact actgggacta	9120
aaggctgcac caccacaacc tggtcttga aatacttttc tacatttttt ggggggcatg	9180
ggggggagag caggggtttct ctgtattagc cctggctctc ctggaactct gtagaccagg	9240
ctattcttga gctcagatta gcctgtctct gcctcctaaa ttctgggatt aaaggtgtgt	9300
gctactgctg cctggctaca aagacatttt tttttttctt aaatttaaaa acaaaagtgg	9360
ttcttttaga aggggtggtg gtgttggcac atactccaag cactcagggt ttgagtttgt	9420
cccaggaatg aagactgcat tactgccgcc cctccctggt aagggtaca cagagaaatc	9480
ctatttgag cctgtcctgg taactcctc tgtagaccag gctggcctcg aactcaagag	9540
aaccacctgc ctctgaatgc tggattaag ggcaggcacc accaacacc agcctaaaaa	9600
atgtcttttt tttaaagatt tttttttttt tttttacaga ataaacattc tgtttacaat	9660
attctgcttc tatgtatata tgcacactag aagagggcac ccgatctcat aatggatggt	9720
tgtgagccac caagtgggtg ctgggaattg aactcagaac ctctggaaga gcagtcagt	9780
ctcttaacct ctgagccatc tctccagccc ctaaaaatgg ctcttgagat agggctctca	9840
gtagtttgag actgagttgg ctatataaac aaggctggca catagcacca tgtacagctg	9900
ggtttagttt acatggggtg tttttgtctc tggaggcagg aggatcattt gagcataggg	9960
agttaatagt gaggtcatgt tttatctact cttctgaatt gagaactaag ctgatgcaaa	10020
gcaagtttga ctgaagaagt ccagtttatg agaacaaggg tggaaactaa tgtgtcaaa	10080

RU 2 560 596 C2

atggccttgc atgtgtttta gatgatgacc cagtcacttg ggaattactg gatgtgtaag	10140
acctatatct tgacaggagt gaacagtgtc ttataggtcc tatatgaaag aaatgagaca	10200
taccattttt gtttcccta agaattcact tttcctaacc tggttcatgc tatttaggtt	10260
attttacttg caaatcctag ggtgctccct taccagtat tgcttatgtg gcaccaaagt	10320
cactcactcc catgatttgc aagtctctgg gaacttccat gacaacctag aatagcaact	10380
caaatacatt ttctcagtac caattttgaa gaaaaaatat ttgcaaaat agctgtatgg	10440
atgggtacta aatagtgagg ttatctccag aaggcctatg aagaattaag gttgagttca	10500
gttgagttca gcagcaagtt taaggttcat ccatttttgt acagtgtttt cctattacgg	10560
taagtgtttt gcctgcagga atatctgtac cacatgcttg cctggtacct atacggcca	10620
gaagagggct ttggatctc tggacttgaa ttacagatgg gtattagcca ccatttaggt	10680
gctgggaatt gaaaccaagt cctctggaag aacagcaagt gactcgacgt ccggagctca	10740
ggcgcgctg tggaatgtgt gtcagttagg gtgtggaaag tccccaggct cccagcagg	10800
cagaagtatg caaagcatgc atctcaatta gtcagcaacc aggtgtggaa agtccccagg	10860
ctccccagca ggcagaagta tgcaaagcat gcatctcaat tagtcagcaa ccatagtccc	10920
gcccctaact ccgccatcc cgcccctaac tccgccagt tccgccatt ctccgcccc	10980
tggtgacta atttttttta tttatgcaga ggccgaggcc gcctctgcct ctgagctatt	11040
ccagaagtag tgaggaggct tttttggagg cctaggcttt tgcaaaaagc tcccgggagc	11100
ttgtatatcc attttcggat ctgatcagca cgtgatgaaa aagcctgaac tcaccgcgac	11160
gtctgtcgag aagtttctga tcgaaaagtt cgacagcgtc tccgacctga tgcagctctc	11220
ggagggcgaa gaatctctg ctttcagctt cgatgtagga gggcgtggat atgtcctgcg	11280
ggtaaatagc tgcgcgatg gtttctacaa agatcgttat gtttatcggc actttgcac	11340
ggccgcgctc ccgattccgg aagtgcttga cattggggaa ttcagcgaga gcctgaccta	11400
ttgcatctcc cgccgtgcac aggggtgcac gttgcaagac ctgcctgaaa ccgaactgcc	11460
cgctgttctg cagccggtcg cggaggccat ggatgcgac gctgcggccg atcttagcca	11520

RU 2 560 596 C2

gacgagcggg ttcggcccat tcggaccgca aggaatcggg caatacacta catggcgtga	11580
tttcatatgc gcgattgtcg atccccatgt gtatcaactgg caaactgtga tggacgacac	11640
cgtcagtgcg tccgtcgcgc aggctctcga tgagctgatg ctttgggccc aggactgccc	11700
cgaagtccgg cacctcgtgc acgcggattt cggtccaac aatgtcctga cggacaatgg	11760
ccgcataaca gcggtcattg actggagcga ggcgatgttc ggggattccc aatacgaggt	11820
cgccaacatc ttcttctgga ggccgtgggt ggcttgtatg gagcagcaga cgcgctactt	11880
cgagcggagg catccggagc ttgcaggatc gccgcggctc cgggcgtata tgctccgcat	11940
tggtcttgac caactctatc agagcttggg tgacggcaat ttcgatgatg cagcttgggc	12000
gcaggggtcga tgcgacgcaa tcgtccgatc cggagccggg actgtcgggc gtacacaaat	12060
cgcccgacga agcgcggccg tctggaccga tggctgtgta gaagtactcg ccgatagtgg	12120
aaaccgacgc ccagcactc gtccgagggc aaaggaatag cacgtgctac gagatttoga	12180
ttccaccgcc gccttctatg aaaggttggg ctccggaatc gttttccggg acgccggctg	12240
gatgatcttc cagcgcgggg atctcatgct ggagttcttc gccacccca acttgtttat	12300
tgcagcttat aatggttaca aataaagcaa tagcatcaca aatttcacaa ataaagcatt	12360
tttttactg cattctagtt gtggtttgtc caaactcatc aatgtatctt atcatgtctg	12420
tata	12424

<210> 12

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 12

acaaacagtt ctgagaccg

19

<210> 13

<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 13
gttttcccag tcacgac

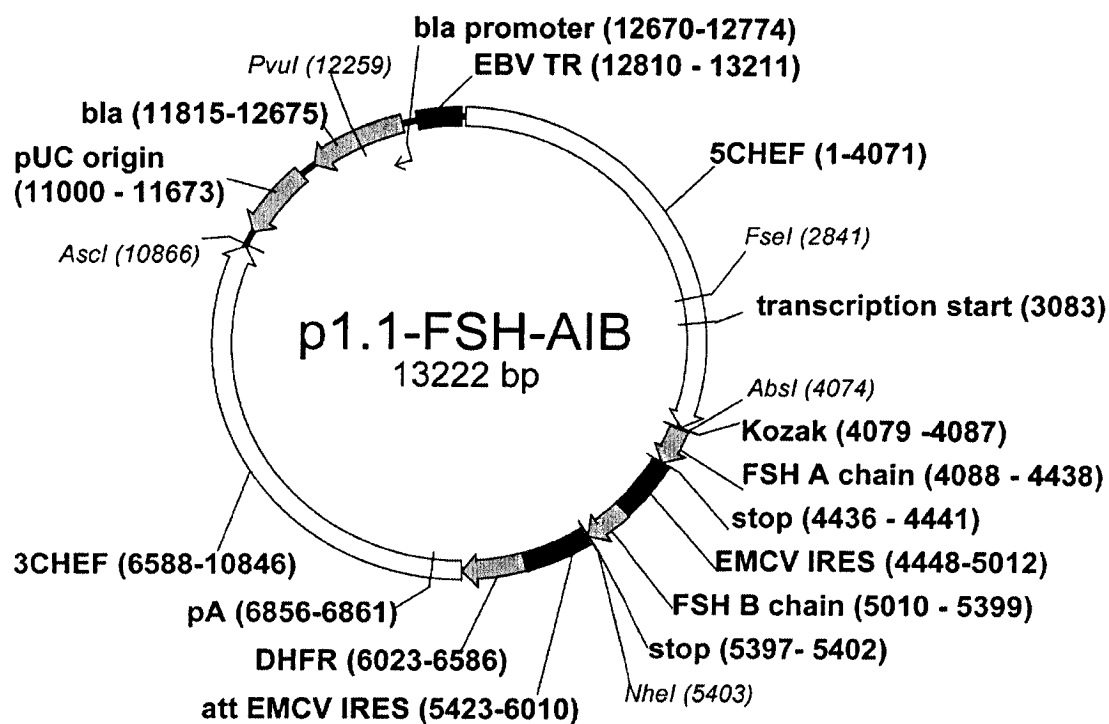
17

<210> 14
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

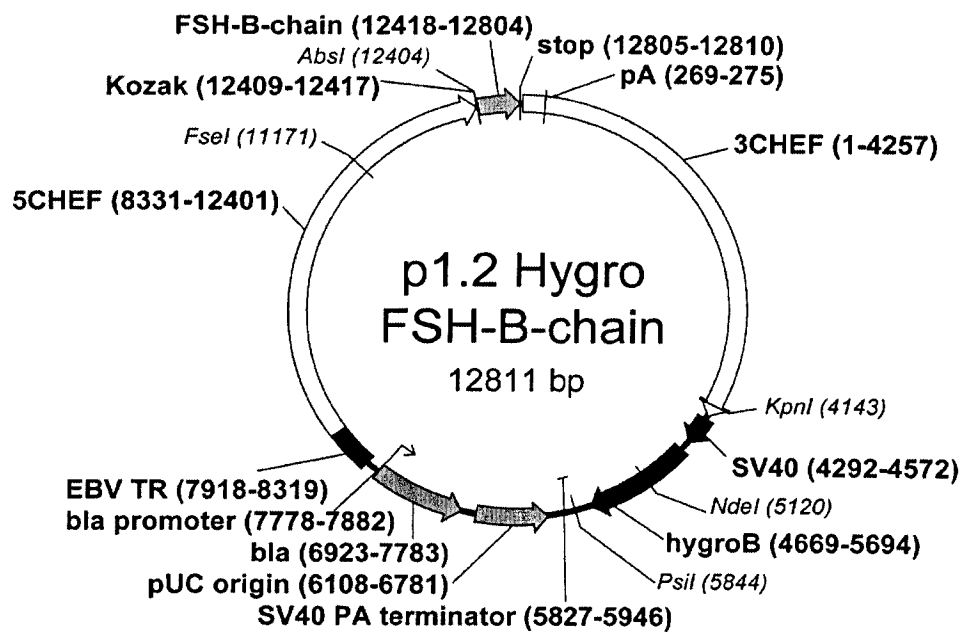
<220>
<223> primer

<400> 14
caggaaacag ctatgac

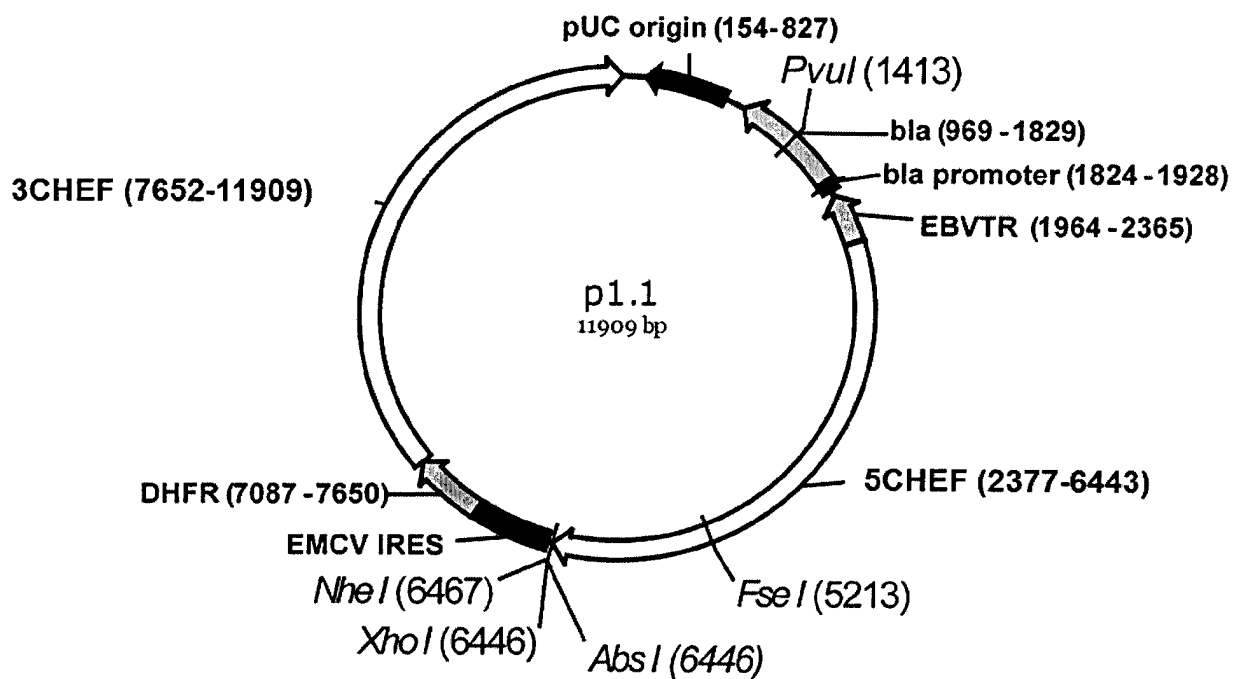
17



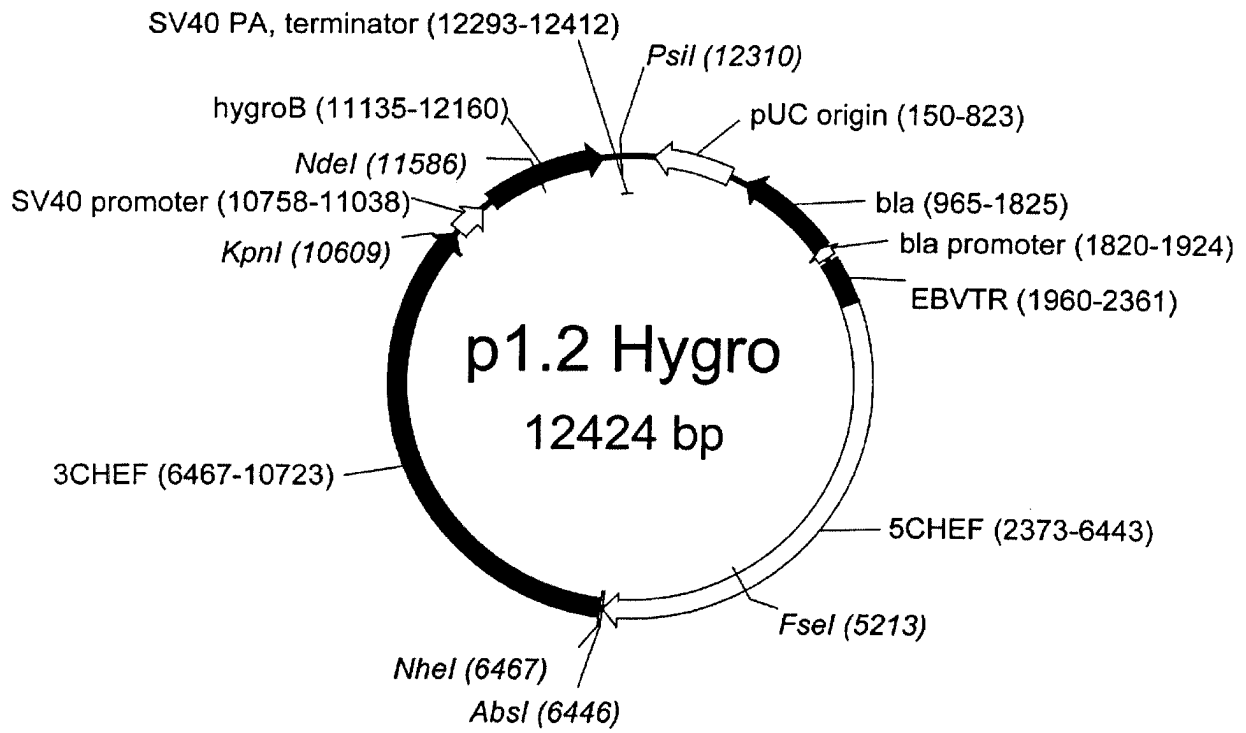
Фиг.1



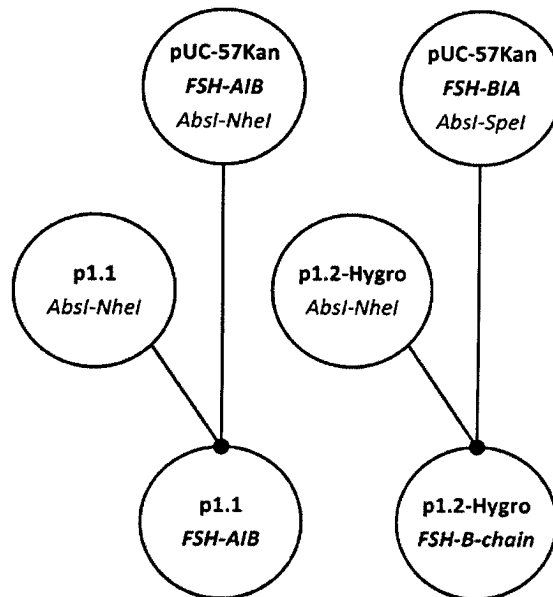
Фиг. 2



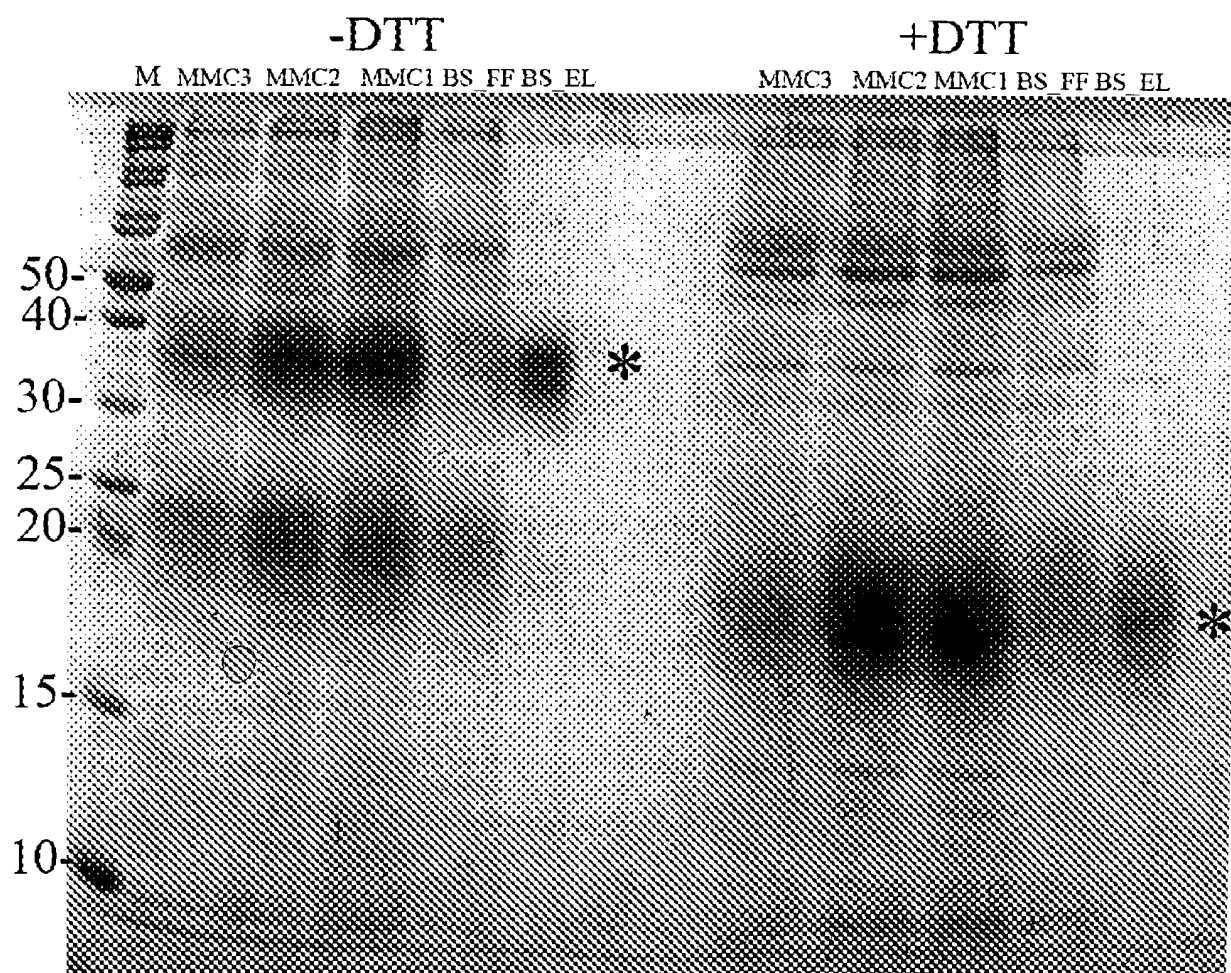
Фиг. 3



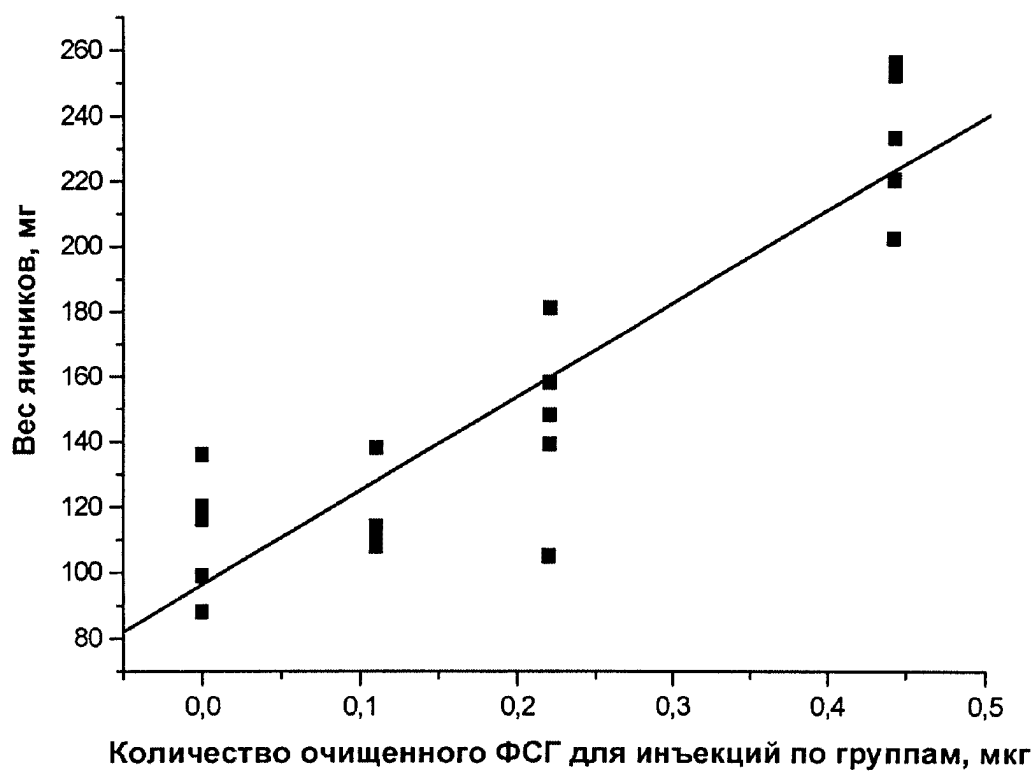
Фиг.4



Фиг.5



Фиг.6



Фиг. 7