



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2014134753/10, 26.08.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
26.08.2014

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 26.08.2014

(43) Дата публикации заявки: 20.03.2016 Бюл. № 8

(45) Опубликовано: 10.07.2016 Бюл. № 19

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2290434 C1, 27.12.2006. База
данных Dbfetch последовательность
AAH41514, размещена 24.03.2005. (см. прод.)

Адрес для переписки:

119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, 1,
Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, Центр трансфера
технологий

(72) Автор(ы):

Парфенова Елена Викторовна (RU),
Шевченко Евгений Константинович (RU),
Макаревич Павел Игоревич (RU),
Цоколаева Зоя Ивановна (RU),
Болдырева Мария Александровна (RU),
Ткачук Всеволод Арсеньевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова" (МГУ)
(RU)

(54) ГЕН PDGF-V α pt ТРОМБОЦИТАРНОГО ФАКТОРА РОСТА ЧЕЛОВЕКА

(57) Реферат:

Изобретение относится к области
биотехнологии, конкретно к технологии
получения генно-инженерных конструкций для
экспрессии трансгенов в клетках млекопитающих,
и может быть использовано для рекомбинантной
продукции тромбоцитарного фактора роста

человека. Для эффективной экспрессии в клетках
млекопитающих оптимизирован ген
тромбоцитарного фактора роста человека (PDGF-
V), последовательность нуклеотидов которого
представлена на фиг. 1. 3 ил., 1 пр.

```

1 ATGAATCGCTGC TGGGCGCTCTTC CTGTCTCTGTC TGCTACCTGCGT CTGGTCAGCGCC
1 ATGAACCGCTGT TGGGCACGTTTT CTGTCTCTGTC TGCTATCTGCGA CTGGTGCTGCT
M N R C W A L F L S L C C Y L R L V S A
61 GAGGGGACCCC ATTCCCGAGGAG CTTTATGAGATG CTGAGTGACCAC TCGATCCGCTCC
61 GAAGGCGACCCT ATCCCGAGGAG CTGTACGAGATG CTGTCTGATCAC AGTATCCGATCA
E G D P I P E E L Y E M L S D H S I R S
121 TTTGATGATCTC CAACGCTGCTG CACGGAGACCCC GGAGAGGAAGAT GGGGCCGAGTTG
121 TTCCAGCATCTG CAGAGGCTGCTG CATGGAGACCCA GGGGAGGAAGAT GGGGCAGAACTG
F D D L Q R L L H G D P G E E D G A E L
181 GACCTGAACATG ACCCGCTCCAC TCTGGAGGCGAG CTGGAGAGCTTG GCTCGTGGAAGA
181 GACCTGAACATG ACACGCAGCCAC TCCGGCGGAGAG CTGGAATCTCTG GCCCGAGGCAGG
D L N M T R S H S G G E L E S L A R G R
241 AGGAGCTGGGT TCCCTGACCAIT GCTGAGCCGGCC ATGATCGCCGAG TGCAAGACGCGC
241 AGAAGCCTGGGA TCCCTGACTATC GCCGAGCCCGCT ATGATTGCAGAA TGCAAGACCAGG
R S L G S L T I A E P A M I A E C K T R
301 ACCGAGGTGTTT GAGATCTCCCGG CGCCTCATAGAC CGCACCAACGCC AACTTCTGTTG
301 ACAGAGGTGTTT GAAATCTCCCGG CGCCTGATTGAT AGAACCAACGCT AATTTTCTGGTG
T E V F E I S R R L I D R T N A N F L V
361 TGGCCGCCCTGT GTGGAGGTGCAG CGCTGCTCCGGC TGCTGCAACAAC CGCAACGTGCAG
361 TGGCCACCTTGC GTGGAGGTCCAG CGGTGTAGCGGC TGCTGTAACAAT AGGAATGTGCAG
W P P C V E V Q R C S G C C N N R N V Q
421 TGCCGCCCCACC CAGGTGCAGCTG CGACCTGTCCAG GTGAGAAAGATC GAGATTGTGCGG
421 TGTAGACCCACA CAGGTCCAGCTG CGACCTGTGCAG GTCGCAAAATC GAAATTGTGCGC
C R P T Q V Q L R P V Q V R K I E I V R
481 AAGAAGCCAATC TTTAAGAAGGCC ACGGTGACGCTG GAAGACCACCTG GCATGCAAGTGT
481 AAGA AACCTATC TTTAAGAAAGCC ACTGTACCCCTG GAGGACCATCTG GCTTGCAAGTGT
K K P I F K K A T V T L E D H L A C K C
541 GAGACAGTGGCA GCTGCACGGCCT GTGACCCGAAGC CCGGGGGGTTC CAGGAGCAGCGA
541 GAAACTGTGGCA GCTGCACGACCT GTCACCCGATCT CCAGGAGGAAGT CAGGAGCAGAGA
E T V A A A R P V T R S P G G S Q E Q R
601 GCCAAAACGCCC CAAACTCGGGTG ACCATTGGGACG GTGCGAGTCCGC CGGCCCCCAAG
601 GCCAAAACACCC CAGACTCGGGTG ACCATTAGAACA GTGCGGGTCCGA AGGCCACCCAAG
A K I P Q T R V T I R T V R V R R P P K
661 GGCAAGCACCGG AAATTCAAGCAC ACGCATGACAAG ACGGCACTGAAG GAGACCTTGGGA
661 GGAAAACACAGA AAGTTTAAGCAC ACTCACGACAAG ACCGCACTGAAG GAGACACTGGGG
G K H R K F K H T H D K T A L K E T L G
721 GCCTAG
721 GCATAA
A *

```

Фиг.1

(56) (продолжение):

PLEMONS J.M. ET AL., PDGF-B producing cells and PDGF-B gene expression in normal gingival and cyclosporine A-induced gingival overgrowth, J. Periodontol., 1996, v.67, n.3, p.264-270. .



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 590 704** (13) **C2**
(51) Int. Cl.
C12N 15/27 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2014134753/10, 26.08.2014

(24) Effective date for property rights:
26.08.2014

Priority:

(22) Date of filing: 26.08.2014

(43) Application published: 20.03.2016 Bull. № 8

(45) Date of publication: 10.07.2016 Bull. № 19

Mail address:

119991, Moskva, GSP-1, Leninskie gory, 1,
Moskovskij gosudarstvennyj universitet imeni M.V.
Lomonosova, TSentr transfera tekhnologij

(72) Inventor(s):

Parfenova Elena Viktorovna (RU),
Shevchenko Evgenij Konstantinovich (RU),
Makarevich Pavel Igorevich (RU),
TSokolaeva Zoya Ivanovna (RU),
Boldyreva Mariya Aleksandrovna (RU),
Tkachuk Vsevolod Arsenevich (RU)

(73) Proprietor(s):

Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Moskovskij gosudarstvennyj
universitet imeni M.V. Lomonosova" (MGU)
(RU)

(54) GENE PDGF-B α pt PLATELET GROWTH FACTOR

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology, specifically to production of genetically engineered structures for expression of transgenes in cells of mammals, and can be used for recombinant production of platelet-derived growth factor.

EFFECT: for effective expression in cells of mammals optimised gene of platelet growth factor (PDGF-B), sequence of nucleotides which is presented in Figure 1.

1 cl, 3 dwg, 1 ex

```

1 ATGAATCGCTGC TGGGCGCTCTTC CTGTCCTCTGC TGCTACCTGCGT CTGGTAGCGCC
1 ATGAACGCTGT TGGGCACTGTTT CTGTCCTCTGC TGCTATCTGCGA CTGGTGCTGCT
M N R C W A L F L S L C C Y L R L V S A
61 GAGGGGGACCCC ATTCCGAGGAG CTTTATGAGATG CTGAGTGACCACT TCGATCCGCTCC
61 GAAGGGGACCTT ATCCCGAGGAG CTGTAGGAGATG CTGTGTGATCAC AGTATCGATCA
E G D P I P E E I V E N L S D H S I R S
121 TTGTATGATCTC CAACGCTGCTG CACGGAGACCCC GGAGAGGAAGAT GGGGCGAGTTG
121 TTGACGACTCG CAGAGGCTGCTG CATGGAGACCCA GGGGAGGAAGAT GGGGCGAGACTG
F D D L Q R L L H G D P G E E D G A E L
181 GACCTGAACATG ACCCGTCCCACT TCTGGAGGCGAG CTGGAGAGCTTG GCTCGTGAAGA
181 GACCTGAACATG ACACCGACCCAC TCCTGGGAGGAG CTGGAATCTCTG GCGGAGGCGAGG
D L N M T R S H S G G E L E S L A R Q R
241 AGGAGGCTGGGT TCCCTGACCACT GCTGAGCGCGCC ATGATCGCGAG TCGAAGACGCGC
241 AGAAGGCTGGGA TCCCTGACTATC GCGGAGCGCCCT ATGATTCGAGAA TCGAAGACGAGG
R S L G S L T I A E P A M I A E C K T R
301 ACCGAGGTGTTT GAGATCTCCCGG CGCTCATAGAC CGCACCAACGCC AACTTCTGGTG
301 ACAGAGGTGTTT GAAATCTCCCGG CGCTCATAGAT AGAACAACGCT AATTCTTGGTG
T E V F E I S R B I D R T S A N F L V
361 TGGCGCCCTGT GTGAGGTGACG AGCGTCTCCGCG TCTGCAACAA CCGAACGTGCGAG
361 TGGCGCCCTGT GTGAGGTGACG AGCGTCTCCGCG TCTGCAACAA CCGAACGTGCGAG
W P P C V E V Q R C S G C C N N R N V Q
421 TGGCGCCCACT CAGGTGACGCTG CGACTGTCCAG GTGAGAAAGATC GAGATTGTGCGG
421 TGTAGACCCACA CAGGTGACGCTG CGACTGTCCAG GTTCCGCAAAATC GAAATTGTGCGG
C R P T Q V Q L R P V Q V R K I E I V R
481 AAGAAAGCAATC TTTAAGAGGCC ACGGTGACGCTG GAAGACCACTG GCATGCAAGTGT
481 AAGAAAGCAATC TTTAAGAAAGCC ACTGTGACGCTG GAAGACCACTG GCTTGCAGTGT
K K P I F R K A T V T L E D H L A C K C
541 GAGACAGTGGCA GCTGACGCGCT GTGACCCGAAG CCGGGGGGTTC CAGGAGACGCGA
541 GAAACTGTGGCA GCTGACGACCT GTGACCCGATCT CCAGGAGGAAGT CAGGAGACGAGA
E T V A A A R P V T R S P G G S Q E Q R
601 GCCAAACGCCC CAAACTCGGGTG ACCATTGCGAG GTGCGAGTCCG CCGGCCCCCAAG
601 GCCAAACACCC CAGACTCGGGTG ACCATTGAGACA GTGCGGGTCCGA AGGCCACCCAAAG
A K T P Q T R V T I R T V R V R R P P K
661 GGCAAGCAGCGG AAATTAAGCAC ACGCATGACAAG CCGGCACTGAAG GAGACCTTTGGA
661 GGAACACAGA AAGTTTAAGCAC ACTCACGACAAG ACCGCACTGAAG GAGACACTGGG
G K H R K F K H T H D K T A L K E T L G
721 GCCTAG
721 GCATAA
A

```

Фиг. 1

Изобретение относится к области биотехнологии, технологии получения генно-инженерных конструкций для экспрессии трансгенов в клетках млекопитающих *in vitro* и *in vivo* с целью их применения в клеточной инженерии и в генной терапии. Изобретение представляет собой модифицированную последовательность гена В-полипептидной цепи тромбоцитарного фактора роста (PDGF-B) человека, включаемого в состав генно-инженерных векторов в качестве одного из фрагментов.

Тромбоцитарные факторы роста представляют собой группу ростовых факторов, играющих важную роль в эмбриогенезе, а также в процессах репарации и регенерации поврежденных тканей. Они стимулируют пролиферативную и миграционную активность мезенхимальных клеток, являются кофактором других ростовых факторов, стимулируют секреторную активность клеток, продукцию ими белков внеклеточного матрикса, таких как фибронектин, коллаген, протеогликаны. Эти свойства делают тромбоцитарные факторы роста привлекательными для использования в различных биотехнологиях, в том числе генной и клеточной терапии, при производстве биотрансплантатов.

Тромбоцитарные факторы роста являются димерами, состоящими из полипептидных цепей, связанных дисульфидными связями. Существуют четыре гена PDGF, кодирующие PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C и PDGF-D полипептидные цепи (Linda Fredriksson, Hong Li, Ulf Eriksson. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 15 (2004) 197-204). PDGF-B экспрессируется в эндотелиальных клетках, мегакариocyтах и нейронах (Hellström M, Kalén M, Lindahl P, Abramsson A, Betsholtz C. *Development* 1999; 126:3047-55). Он является одним из важнейших факторов ангиогенеза. PDGF-BB стимулирует миграцию перицитов и гладкомышечных клеток в места образования новых сосудов и тем самым способствует стабилизации вновь сформированных капилляров (Banfi A. von Degenfeld G. Gianni-Barrera R. Rednato S. Merchant MJ. McDonald DM. Blau HM. *FASEB J.* 2012 Jun; 26(6):2486-97; Gaengel K., Genové G., Armulik A., Betsholtz C. (2009) *Arterioscler. Thromb. Vase. Biol.* 29, 630-638).

Перспективы генной терапии в лечении заболеваний, связанных с нарушением кровоснабжения, продемонстрированы как в экспериментальных, так и в клинических исследованиях (Ylä-Herttuala S., Rissanen T.T., Vajanto I., Hartikainen J.J. *Am. Coll. Cardiol.*, 2007, vol. 49, pp. 1015-1026; Banfi A. von Degenfeld G. Gianni-Barrera R. Rednato S. Merchant MJ, McDonald DM. Blau HM. *FASEB J.* 2012 Jun; 26(6):2486-97).

Технической задачей, решаемой авторами настоящего изобретения, является создание модифицированной последовательности гена PDGF-B, которая при ее включении в состав генно-инженерного вектора позволяла бы достичь более высокого уровня экспрессии соответствующего белка в клетках, трансфицированных данным вектором.

Технический результат достигался модификацией природной последовательности гена PDGF-B, в основе которой лежала вырожденность генетического кода. Последовательность модифицировали таким образом, чтобы триплеты нуклеотидов, кодирующие некоторые из аминокислот белковой последовательности тромбоцитарного фактора роста, встречались в генах человека наиболее часто. При этом использовали опубликованные в открытых источниках данные по частотам встречаемости кодонов (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>).

На Фиг. 1 представлена последовательность нуклеотидов гена PDGF-B_{opt} (средние строки) в сравнении с последовательностью нуклеотидов природного гена PDGF-B (верхние строки). Показана также последовательность аминокислот кодируемого белкового продукта - тромбоцитарного фактора роста человека (нижние строки). Серым фоном в последовательности гена PDGF-B_{opt} выделены триплеты нуклеотидов, отличные от таковых в природной последовательности.

На Фиг. 2 приведена функциональная карта плазмиды pVAX1-PDGF-Bopt.

На Фиг. 3 представлены результаты количественного определения белка PDGF-BB человека в среде культивирования клеток линии HEK293-T, трансфицированных плазмидами pVAX1, pVAX1-PDGF-B, pVAX1-PDGF-Bopt.

Синтез оптимизированного гена PDGF-Bopt и конструирование плазмиды осуществляли с помощью стандартной технологии и оборудования, применяемых для решения подобных задач в генной инженерии (Watson J.D., Gilman M., Witkowski J., Zoller M. - Recombinant DNA, Scientific American Books, New York, 1992).

Дизайн оптимизированной последовательности нуклеотидов, кодирующей тромбоцитарный фактор роста человека, проводили на основе базы данных частоты встречаемости кодонов у разных организмов, доступной на веб-сайте <http://www.kazusa.or.jp/codon/>. Среди триплетов нуклеотидов, кодирующих аминокислоты белковой последовательности природного гена PDGF-B, выявляли такие, которые редко встречаются в генах человека. Выявленные редкие триплеты, а также соседние с ними триплеты заменяли на триплеты, кодирующие ту же аминокислоту, но при этом встречающиеся в генах человека наиболее часто. Благодаря вырожденности генетического кода все аминокислоты природного гена тромбоцитарного фактора роста человека остались неизмененными. Полученная последовательность нуклеотидов представлена на Фиг. 1.

Плазмиду, несущую оптимизированный ген PDGF-Bopt, получали методом генно-инженерного конструирования, как описано ниже на примере плазмиды pVAX1-PDGF-Bopt.

Химически синтезировали следующие олигонуклеотиды:

OPT-2T (5'- TCTGCGACTGGTGTCTGCTGAAGGCGACCCTATCCCCGAGGAGCTGTAC
GAGATGCTGTCTGATCACAGTATCCGA)

OPT-3T (5'- TCATTCGACGATCTGCAGAGGCTGCTGCATGGAGACCCAGGGGAGGAA
GATGGGGCAGAACTGGACCTGAACATGA)

OPT-4T (5'- CACGCAGCCACTCCGGCGGAGAGCTGGAATCTCTGGCCCGAGGCAGGA
GAAGCCTGGGATCCCTGACTATCGCCGAG)

OPT-5T (5'- CCCGCTATGATTGCAGAATGCAAGACCAGGACAGAGGTGTTGAAATC
TCCCGGCGCCTGATTGATAGAACCAACGC)

OPT-6T (5'- TAATTTTCTGGTGTGGCCACCTTGCGTGGAGGTCCAGCGGTGTAGCGG
CTGCTGTAACAATAGGAATGTGCAGTGTA)

OPT-7T (5'- GACCCACACAGGTCCAGCTGCGACCTGTGCAGGTCCGCAAAATCGAAA
TTGTGCGCAAGAAACCTATCTTTAAGAAA)

OPT-8T (5'- GCCACTGTCACCCTGGAGGACCATCTGGCTTGCAAGTGTGAAACT
GTGGCAGCTGCACGACCTGTCACCCGATCTCC)

OPT-9T (5'- AGGAGGAAGTCAGGAGCAGAGAGCCAAAACACCCCAGACTCGGGT
GACCATTAGAACAGTGCGGGTCCGAAGGCCAC)

OPT-10T (5'- CCAAGGGAAAACACAGAAAGTTTAAGCACACTCACGACAAGACCG
CACTGAAGGAGACACTGGGGGCATAAGATATC)

Смешивали их (по 2 мкМ каждого) в лигазном буфере и кинировали. После инактивации киназы полученную смесь (смесь 1) смешивали с равным объемом смеси 2, представляющей собой следующие синтезированные олигонуклеотиды (также по 2

мкМ) в лигазном буфере:

OPT-1T (5'- GAATTCGGCATTCGGGTAAGCCACCATGAA
CCGCTGTTGGGCACTGTTTCTGTCTCTGTGCTGCTA)

OPT-1B (5'- GACACCAGTCGCAGATAGCAGCACAGAGAC)

OPT-2B (5'- CAGATCGTCGAATGATCGGATACTGTGATC)

OPT-3B (5'- CGGAGTGGCTGCGTGTTCATGTTTCAGGTCCA)

OPT-4B (5'- TGCAATCATAGCGGGCTCGGCGATAGTCAG)

OPT-5B (5'- CACACCAGAAAATTAGCGTTGGTTCTATCA)

OPT-6B (5'- GGACCTGTGTGGGTCTACACTGCACATTCC)

OPT-7B (5'- CAGGGTGACAGTGGCTTTCTTAAAGATAGG)

OPT-8B (5'- TCCTGACTTCCTCCTGGAGATCGGGTGACA)

OPT-9B (5'- TGTGTTTTCCCTTGGGTGGCCTTCGGACCC)

Прогрели на 95°C в течение 1 мин и давали медленно остыть до комнатной температуры для медленного отжига олигонуклеотидов. Далее полученную смесь разводили в 5 раз 1х лигазным буфером и ставили реакцию лигирования на ночь. На следующий день лигазную смесь разводили в 5 раз и подвергали ее ПЦР со следующими концевыми праймерами:

OPT-DIR (5'- CGGAGAATTCGGCATTCGGGTAAGTGT)

OPT-REV (5'- TGACGATATCTTATGCCCCCAGTGTC)

Разделение и идентификацию продуктов реакции осуществляли методом электрофореза в 1,5% агарозном геле. Далее вырезали из геля основную полосу, соответствующую целевому продукту реакции, проводили экстракцию ДНК и клонировали ее в коммерчески доступную плазмиду pVAX1, расщепленную рестриктазами EcoR1 и EcoRV, с получением плазмиды pVAX1-PDGF-Bopt. Встраивание последовательности оптимизированного PDGF-B и ее идентичность подтверждали рестриктным анализом и секвенированием.

Эффективность заявляемого изобретения иллюстрируется следующим примером.

Пример. Клетки HEK293T, культивируемые в 6-луночной плашке в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, трансфицировали плазмидой pVAX1-PDGF-Bopt, несущей оптимизированный ген тромбоцитарного фактора роста человека (PDGF-Bopt), или контрольными плазмидами pVAX1-PDGF-B (кодирует природный ген тромбоцитарного фактора роста человека) и pVAX1 (пустая плазида). Для трансфекции клеток в одной лунке плашки брали 2,5 мкг ДНК и 7,5 мкл реагента Lipofectamine 2000 (Invitrogen), процедуру проводили в соответствии с протоколом производителя. Через 24 ч после трансфекции культуральную среду заменяли на свежую и инкубировали клетки в течение 48 часов. Концентрацию гомодимера тромбоцитарного фактора роста человека В (PDGF-BB) в среде культивирования клеток определяли методом иммуноферментного анализа с использованием набора реагентов Human PDGF-BB Quantikine ELISA Kit (R&D Systems) в соответствии с протоколом производителя.

Результаты измерений представлены на Фиг. 3, где отражена средняя концентрация гомодимера тромбоцитарного фактора роста ВВ (PDGF-BB) в среде культивирования клеток линии HEK293T, трансфицированных плазмидой pVAX1, pVAX1-PDGF-B или

плазмидой pVAX1-PDGF-Opt.

Иммуноферментный анализ показал, что в условиях эксперимента концентрация PDGF-BB в среде культивирования клеток, трансфицированных вектором с оптимизированной последовательностью гена PDGF, составляла $1129 \pm 233,3$ нг/мл, что в 4,01 раза выше, чем в группе «pVAX1-PDGF-B» ($281,4 \pm 34,8$ нг/мл). Концентрация белка в группе «pVAX1» была ниже порога чувствительности метода.

Формула изобретения

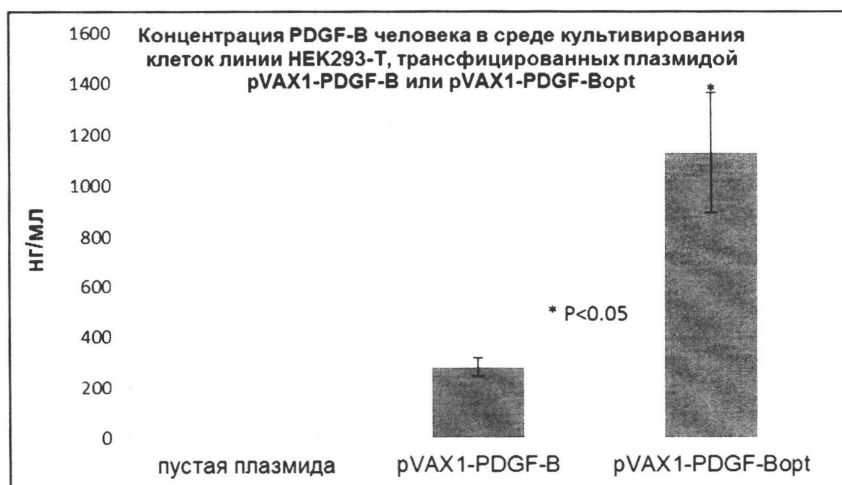
Ген тромбоцитарного фактора роста человека, оптимизированный для экспрессии в клетках млекопитающих, который представлен последовательностью нуклеотидов, приведенной на Фиг. 1.

```

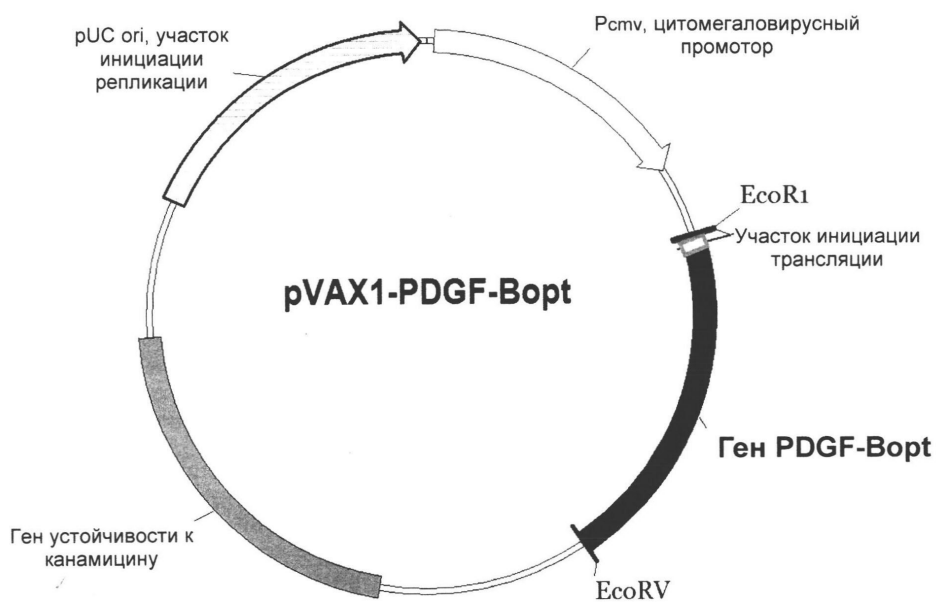
1 ATGAATCGCTGC TGGGCGCTCTTC CTGTCTCTCTGC TGCTACCTGCGT CTGGTCAGCGCC
1 ATGAACCGCTGT TGGGCACTGTTT CTGTCTCTGTGC TGCTATCTGCGA CTGGTGTCTGCT
M N R C W A L F L S L C C Y L R L V S A
61 GAGGGGGACCCC ATCCCGAGGAG CTTTATGAGATG CTGAGTGACCAC TCGATCCGCTCC
61 GAAGGCGACCC ATCCCGAGGAG CTGTACGAGATG CTGTCTGATCAC AGTATCCGATCA
E G D P I P E E L Y E M L S D H S I R S
121 TTIGATGATCTC CAACGCCCTGCTG CACGGAGACCCC GGAGAGGAAGAT GGGGCCGAGTTG
121 TTGACGATCTG CAGAGGCTGCTG CATGGAGACCCA GGGGAGGAAGAT GGGGCAGAACTG
F D D L Q R L L H G D P G E E D G A E L
181 GACCTGAACATG ACCCGCTCCAC TCTGGAGGCGAG CTGGAGAGCTTG GCTCGTGAAGA
181 GACCTGAACATG ACACGCAGCCAC TCCGGCGGAGAG CTGGAATCTCTG GCCCGAGGCAGG
D L N M T R S H S G G E L E S L A R G R
241 AGGAGCGCTGGT TCCCTGACCATT GCTGAGCCGCC ATGATCGCCGAG TGCAAGACGCGC
241 AGAAGCCTGGGA TCCCTGACTATC GCCGAGCCCGCT ATGATTGCAGAA TGCAAGACCAGG
R S L G S L T I A E P A M I A E C K T R
301 ACCGAGGTGTTT GAGATCTCCCGG CGCCTCATAGAC CGCACCAACGCC AACTTCCTGGTG
301 ACAGAGGTGTTT GAAATCTCCCGG CGCCTGATTGAT AGAACCAACGCT AATTTTCTGGTG
T E V F E I S R R L I D R T N A N F L V
361 TGGCCGCCCTGT GTGGAGGTGCAG CGCTGCTCCGGC TGCTGCAACAAC CGCAACGTGCAG
361 TGGCCACCTTGC GTGGAGGTCCAG CGGTGTAGCGGC TGCTGTAACAAT AGGAATGTGCAG
W P P C V E V Q R C S G C C N N R N V Q
421 TGCCGCCCCACC CAGGTGCAGCTG CGACCTGTCCAG GTGAGAAAAGATC GAGATTGTGCGG
421 TGTAGACCCACA CAGGTCCAGCTG CGACCTGTGCAG GTCCGCAAAATC GAAATTGTGCGC
C R P T Q V Q L R P V Q V R K I E I V R
481 AAGAAGCCAATC TTAAAGAAGGCC ACGGTGACGCTG GAAGACCACCTG GCATGCAAGTGT
481 AAGAAACCTATC TTAAAGAAAGCC ACTGTACCCCTG GAGGACCATCTG GCTTGC AAGTGT
K K P I F K K A T V T L E D H L A C K C
541 GAGACAGTGGCA GCTGCACGGCCT GTGACCCGAAGC CCGGGGGGTTCC CAGGAGCAGCGA
541 GAAACTGTGGCA GCTGCACGACCT GTCACCCGATCT CCAGGAGGAAGT CAGGAGCAGAGA
E T V A A A R P V T R S P G G S Q E Q R
601 GCCAAAACGCCC AAACTCGGGTG ACCATTTCGACG GTGCGAGTCCGC CGGCCCCCAAG
601 GCCAAAACACCC CAGACTCGGGTG ACCATTAGAACA GTGGGGTCCGA AGGCCACCCAAG
A K T P Q T R V T I R T V R V R R P P K
661 GGCAAGCACCGG AAATTCAAGCAC ACGCATGACAAG ACGGCACTGAAG GAGACCTTGGG
661 GGAAACACAGA AAGTTTAAGCAC ACTCACGACAAG ACCGCACTGAAG GAGACACTGGGG
G K H R K F K H T H D K T A L K E T L G
721 GCCTAG
721 GCATAA
A *

```

Фиг.1



Фиг. 2



Фиг. 3