

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **045722**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.12.20**

(51) Int. Cl. **C07K 14/705** (2006.01)  
**A61K 38/17** (2006.01)

(21) Номер заявки  
**202190240**

(22) Дата подачи заявки  
**2019.08.30**

**(54) ВАРИАНТЫ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА**

(31) **201821032765**

(32) **2018.08.31**

(33) **IN**

(43) **2021.08.09**

(86) **PCT/IB2019/057314**

(87) **WO 2020/044296 2020.03.05**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ЮНИКЕМ ЛАБОРАТОРИС  
ЛИМИТЕД (IN)**

(72) Изобретатель:  
**Сате Дхананджай, Кумар Судип (IN)**

(74) Представитель:  
**Сагитов В.Р. (RU)**

(56) DATABASE UniParc [Online] Uniprot;  
16 September 2015 (2015-09-16), XP002796218,  
accession no. UPI000657178A, Database accession  
no. UPI000657178A, sequence UPI000657178A  
WO-A1-2015/054507  
WO-A2-2010095143

HIRABAYASHI ANDK KASAI J: "Effect of  
amino acid substitution by site-directed mutagenesis  
on the carbohydrate recognition and stability of human  
14-kDa beta galactoside-binding lectin", JOURNAL  
OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 266, no. 35,  
1 January 1991 (1991-01-01), pages 23648-23653,  
XP008146159, ISSN: 0021-9258, whole document  
esp. abstract

LEONIDAS ET AL.: "Structural Basis for the  
Carbohydrate Recognition of the Sclerotium rolfisii  
Lectin", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY,  
ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM, vol.  
368, no. 4, 17 April 2007 (2007-04-17), pages  
1145-1161, XP022030023, ISSN: 0022-2836, DOI:  
10.1016/J.JMB.2007.02.092, whole document esp.  
pages 1155-1157

(57) Предлагается модифицированный белок лектина, имеющий по меньшей мере одну модификацию аминокислоты в последовательности аминокислот SEQ ID NO: 1 или в последовательности аминокислот, которая имеет по меньшей мере 60% гомологии с указанной последовательностью. Указанная модификация аминокислоты выбрана из одного или нескольких из следующего: по меньшей мере одной модификации аминокислоты в сайте связывания углеводов; по меньшей мере одной модификации аминокислоты на N-конце; по меньшей мере одной модификации аминокислоты в положении 76; или по меньшей мере одной модификации аминокислоты в положении 44 или 89. Модифицированный белок лектина не состоит из любой из последовательностей аминокислот SEQ ID NO: 2-4.

**B1****045722****045722****B1**

### Перекрестная ссылка на родственные заявки

В настоящей заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке Индии № 201821032765, поданной 31 августа 2018 г., содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

### Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее изобретение относится к модифицированному белку лектина и молекуле нуклеиновой кислоты, последовательность которой кодирует указанный модифицированный белок лектина. Настоящее изобретение также относится к рекомбинантному вектору, содержащему такую молекулу нуклеиновой кислоты, и к трансформированной клетке-хозяину, содержащей указанный рекомбинантный вектор. Кроме того, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей модифицированный белок лектина, к выявлению раковых клеток, диагностике и лечению рака у пациента. Настоящее изобретение также относится к способу получения рекомбинантного белка лектина *Sclerotium rolfsii*.

### Уровень техники

Лектины представляют собой высокоспецифичные углеводсвязывающие белки, макромолекулы которых обладают высокой специфичностью к углеводным компонентам других молекул. Лектины осуществляют распознавание на клеточном и молекулярном уровнях и играют многочисленные роли в процессах биологического распознавания, в которые вовлечены клетки, углеводы и белки. Они представляют собой двухвалентные или поливалентные углеводсвязывающие белки, которые связываются с гликопротеинами и осаждают их, а также агглютинируют эритроциты. Лектины, идентифицированные в организме животных, чаще всего способствуют протеканию клеточных взаимодействий, тогда как лектины растений, как известно, обеспечивают защиту от потенциальных хищников или патогенов.

Очищенные лектины играют важную роль в клинической практике, так как их применяют для определения групп крови. Определенные гликолипиды и гликопротеины эритроцитов человека можно идентифицировать с помощью лектинов. Многие лектины используются как биомаркеры для раннего выявления злокачественных образований, или как индукторы аутофагии, тогда как другие лектины также демонстрируют способность подавлять злокачественный рост посредством апоптоза. Из-за нерегулируемой пролиферации клеток определенные углеводные компоненты экспрессируются на раковых клетках как антигены. Лектины используют как средство для доставки лекарственных препаратов при лечении рака, так как они специфически связываются с клетками злокачественных опухолей. Кроме того, поскольку лектины также модулируют связанные с раком сигнальные пути, их потенциально можно применять как диагностические и терапевтические агенты.

Существует несколько антигенов, с которыми связываются лектины и которые были описаны на поверхности раковых клеток; большинство антигенов специфичны для определенного типа рака, и связывание лектина с этими антигенами может приводить к ингибированию злокачественного роста за счет индукции апоптоза раковых клеток. В настоящее время большинство коммерчески доступных лектинов получают из растений и других эукариот.

Лектин *Sclerotium rolfsii* (SRL) представляет собой лектин, который был выделен из склероциальных тел почвенного фитопатогенного гриба *S. rolfsii*. SRL специфичен к антигену Томсена-Фриденрейха (TF) и антигену Tn. Антиген TF представляет собой дисахарид (Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3GalNAc- $\alpha$ -Ser/Thr), для которого характерна сверхэкспрессия на поверхности клеток разных типов рака человека. Антиген Tn представляет собой моносахарид (GalNAc- $\alpha$ -). Было показано, что за счет своей специфичности к антигенам TF и Tn SRL связывается с клетками рака толстой кишки, рака яичников и лейкоэмическими клетками человека. Кристаллическая структура SRL была определена (Leonidas et al., J Mol Biol. 2007 May 11;368(4):1145-61), но экспериментальную валидацию сайтов связывания углеводов, идентифицированных по кристаллической структуре, не проводили.

Хотя лектины обладают множеством преимуществ при применении в качестве противоопухолевых средств, они также имеют множество ограничений, таких как недостаточная избирательность, нестабильное качество и эффективность, а также сложность масштабирования производства. Более того, во многих сообщениях указано, что лектины растительного происхождения связываются с разными гликановыми структурами и, соответственно, не обладают избирательностью, необходимой для многих применений. При применении растительных лектинов также характерна вариабельность между отдельными партиями. Качество продуктов зависит от методики получения растительного материала и от качества самого исходного растительного материала.

Выделение лектина из природных материалов неэффективно, так как полученный таким образом лектин недостаточно однороден по желаемым свойствам. Помимо этого, выделение белков из природных источников представляет собой дорогостоящий и сложный процесс. Методики, используемые для выделения натуральных лектинов, обычно обеспечивают очень низкий выход, особенно если белок присутствует в низких концентрациях. Кроме того, иногда они не позволяют различать изоформы одного и того же лектина. Таким образом, выделяемые лектины представляют собой смеси, что обуславливает большой диапазон изменчивости. В этом смысле получение рекомбинантных лектинов с помощью технологии рекомбинантных ДНК (рДНК) имеет преимущество, заключающееся в получении индивидуаль-

ных белков с лучшим и стабильным выходом, имеющих конкретные характеристики, со значительно меньшими временными затратами. В то же время, эти методики легко масштабируются.

Применение технологии рДНК позволяет вводить ген, отвечающий за продукцию интересующего белка, в подходящую клетку-хозяина. Это позволяет получать и выделять белок с меньшими затратами времени и усилий по сравнению с традиционными способами.

В WO 2010/095143 раскрыты варианты рекомбинантного лектина Rec-2 и Rec-3 полученные из нативной последовательности SRL путем замены 3 или 5 аминокислот соответственно. Есть сообщения, в которых описана кристаллическая структура этих вариантов (Peppas et al., Molecules. 2015 Jun 12;20(6):10848-65).

В WO 2014/203261 раскрыт вариант рекомбинантного лектина, полученный из нативной последовательности SRL путем замены 12 аминокислот.

Потребность в дополнительных вариантах лектина, обладающих альтернативными свойствами, оспаривается открытой. В частности, предпочтительно, чтобы лектины, предназначенные для применения в диагностике рака и в качестве терапевтических агентов, были растворимыми и стабильными без ущерба для их специфического сродства к злокачественным/раковым клеткам. Таким образом, существует потребность в новых рекомбинантных последовательностях лектина и эффективных способах получения рекомбинантных лектинов с достаточными уровнями экспрессии трансгена в соответствующих клетках-хозяевах и обладающих растворимостью и/или стабильностью, а также сохраняющих сродство к злокачественным клеткам.

Настоящее изобретение направлено на удовлетворение одной или нескольких из вышеуказанных потребностей.

### **Раскрытие изобретения**

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен модифицированный белок лектина, который содержит последовательность аминокислот, выбранную из:

- i) SEQ ID NO: 1; или
- ii) последовательности аминокислот, которая имеет по меньшей мере 60% гомологии с i), при этом аминокислотная последовательность i) или ii) содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты, выбранную из одного или нескольких пунктов от (a) до (d):
  - a) по меньшей мере одну модификацию аминокислоты в сайте связывания углеводов i) или ii);
  - b) по меньшей мере одну модификацию аминокислоты на N-конце i) или ii), при которой отщепление инициаторного метионина увеличено по сравнению с последовательностью аминокислот i);
  - c) по меньшей мере, одну модификацию аминокислоты, которая уменьшает образование димера модифицированного белка лектина по сравнению с белком лектина с SEQ ID NO: 1; или
  - d) по меньшей мере одну модификацию аминокислоты, которая уменьшает окисление модифицированного белка лектина по сравнению с белком лектина с SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный белок лектина не состоит из любой из последовательностей аминокислот SEQ ID NO: 2-4. В некоторых других вариантах осуществления модифицированный белок лектина оказывает цитотоксическое действие.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен модифицированный белок лектина, который содержит последовательность аминокислот, выбранную из:

- i) SEQ ID NO: 1; или
- ii) последовательности аминокислот, которая имеет по меньшей мере 60% гомологии с i), при этом аминокислотная последовательность i) или ii) содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты, выбранную из одного или нескольких пунктов от a) до d):
  - a) по меньшей мере одну модификацию аминокислоты в сайте связывания углеводов i) или ii); или
  - b) по меньшей мере одну модификацию аминокислоты на N-конце i) или ii),
  - c) по меньшей мере одну модификацию аминокислоты в положении 76; или
  - d) по меньшей мере одну модификацию аминокислоты в положении 44 или 89,
 при этом модифицированный белок лектина не состоит из любой из последовательностей аминокислот SEQ ID NO: 2-4.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен модифицированный белок лектина, который содержит последовательность аминокислот, выбранную из:

- i) SEQ ID NO: 1; или
- ii) последовательности аминокислот, которая имеет по меньшей мере 60% гомологии с i), при этом аминокислотная последовательность i) или ii) содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты, выбранную из одного или нескольких пунктов от (a) до (d):
  - a) по меньшей мере одну модификацию аминокислоты в сайте связывания углеводов i) или ii); или
  - b) по меньшей мере одну модификацию аминокислоты на N-конце i) или ii), при которой отщепление инициаторного метионина увеличено по сравнению с последовательностью аминокислот i);
  - c) по меньшей мере, одну модификацию аминокислоты, которая уменьшает образование димера

модифицированного белка лектина по сравнению с белком лектина с SEQ ID NO: 1, в положении 76; или d) по меньшей мере одну модификацию аминокислоты, которая уменьшает окисление модифицированного белка лектина по сравнению с белком лектина с SEQ ID NO: 1, в положении 44 или 89, при этом модифицированный белок лектина не состоит из любой из последовательностей аминокислот SEQ ID NO: 2-4.

Необязательно, модифицированный белок лектина согласно настоящему изобретению обладает биологической активностью.

В одном из вариантов осуществления модифицированный белок лектина содержит последовательность аминокислот, которая имеет по меньшей мере 70, 80, 90, 95, 97 или 99% гомологии с SEQ ID NO: 1.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложен модифицированный белок лектина, который содержит последовательность аминокислот, выбранную из:

i) SEQ ID NO: 1; или

ii) последовательности аминокислот, которая имеет по меньшей мере 60% гомологии с i),

где замена аминокислоты выбрана из одного или нескольких из:

a) замены аминокислоты в первичном сайте связывания углеводов, где заменяющая аминокислота выбрана из одного или нескольких из:

i) неполярной, полярной, кислой или основной аминокислоты в положении 27 и/или 28;

ii) неполярной аминокислоты в положении 47 и/или полярной аминокислоты в положении 48;

iii) неполярной аминокислоты в положении 70, полярной аминокислоты в положении 71 и/или неполярной аминокислоты в положении 72; и/или

iv) любой другой аминокислоты в положении 105,

b) замены аминокислоты во вторичном сайте связывания углеводов, где заменяющая аминокислота выбрана из одного или нескольких из:

i) неполярной аминокислоты в положении 77, неполярной аминокислоты в положении 78 и/или полярной аминокислота в положении 80;

ii) любой другой аминокислоты в положении 101;

iii) неполярной аминокислоты в положении 112; и/или полярной аминокислоты в положении 114.

В другом варианте осуществления модифицированный белок лектина содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты в сайте связывания углеводов i) или ii).

В определенных вариантах осуществления сайт связывания углеводов представляет собой первичный и/или вторичный сайт связывания углеводов.

В одном из вариантов осуществления первичный сайт связывания углеводов содержит положение, выбранное из одного или нескольких из: 27, 28, 47, 48, 70, 71, 72 и 105 в SEQ ID NO: 1 или соответствующего положения в последовательности, которая имеет по меньшей мере 60, 70, 80, 90, 95, 97 или 99% гомологии с указанной последовательностью.

В одном из таких вариантов осуществления положение модификации аминокислоты выбрано из одного или нескольких из:

i) 27 и/или 28;

ii) 47 и/или 48;

iii) 70, 71 и/или 72; и/или

iv) 105.

В другом варианте осуществления вторичный сайт связывания углеводов содержит положение, выбранное из одного или нескольких из: 77, 78, 80, 101, 112 и 114 в SEQ ID NO: 1 или соответствующего положения в последовательности, которая имеет по меньшей мере 60, 70, 80, 90, 95, 97 или 99% гомологии с указанной последовательностью.

В одном из таких вариантов осуществления положение модификации аминокислоты выбрано из одного или нескольких из:

i) 77, 78 и/или 80;

ii) 101;

iii) 112 и/или 114.

Еще в одном варианте осуществления модификация аминокислоты представляет собой замену аминокислоты, при которой заменяющая аминокислота замещает исходную аминокислоту. В одном из вариантов осуществления замена аминокислоты представляет собой консервативную или благоприятную замену аминокислоты.

В одном из вариантов осуществления замена аминокислоты в первичном сайте связывания углеводов выбрана из одного или нескольких из:

i) в положении 27: консервативной, благоприятной или неблагоприятной аминокислоты, где консервативная аминокислота является неполярной или кислой; благоприятная аминокислота является полярной или основной, и неблагоприятная аминокислота является неполярной;

ii) в положении 28: консервативной, благоприятной, нейтральной или неблагоприятной аминокислоты, где консервативная аминокислота является неполярной; благоприятная аминокислота является полярной, нейтральная аминокислота является кислой или основной, и неблагоприятная аминокислота

является полярной;

iii) в положении 47: неблагоприятной аминокислоты которая является основной или неполярной;

iv) в положении 48: неблагоприятной аминокислоты, которая является неполярной;

v) в положении 70: неблагоприятной аминокислоты, которая является неполярной;

vi) в положении 71: неблагоприятной аминокислоты, которая является неполярной;

vii) в положении 72: неблагоприятной аминокислоты, которая является неполярной; и/или

viii) в положении 105: консервативной, благоприятной, нейтральной или неблагоприятной аминокислота, где консервативная аминокислота является основной или неполярной; благоприятная аминокислота является полярной, нейтральная аминокислота является кислой, основной или полярной, и/или неблагоприятная аминокислота является полярной, неполярной или кислой.

В другом варианте осуществления замена аминокислоты во вторичном сайте связывания углеводов выбрана из одного или нескольких из:

i) в положении 77: неблагоприятной аминокислота, которая является неполярной;

ii) в положении 78: неблагоприятной аминокислота, которая является неполярной;

iii) в положении 80: неблагоприятной аминокислота, которая является неполярной;

iv) в положении 101: благоприятной, неблагоприятной или нейтральной аминокислота, где благоприятная аминокислота является полярной или основной, неблагоприятная аминокислота является неполярной, и нейтральная аминокислота является неполярной или кислой;

v) в положении 112: неблагоприятной аминокислота, которая является неполярной;

vi) в положении 114: неблагоприятной аминокислота, которая является полярной.

В одном из вариантов осуществления модифицированный белок лектина содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты на N-конце i) или ii), где N-конец содержит положение, выбранное из: 1 и/или 2 в SEQ ID NO: 1 или соответствующего положения в последовательности, которая имеет по меньшей мере 60, 70, 80, 90, 95, 97 или 99% гомологии с указанной последовательностью.

В одном из вариантов осуществления модификация аминокислоты представляет собой замену аминокислоты в положении 1, где заменяющая аминокислота не представляет собой треонин или валин. В других вариантах осуществления заменяющая аминокислота выбрана из аланина, глицина, пролина или серина. В некоторых других вариантах осуществления модификация аминокислоты представляет собой замену аминокислоты в положении 2, где заменяющая аминокислота является триптофаном.

В некоторых вариантах осуществления отщепление инициаторного метионина повышено или уменьшено по сравнению с контролем.

В другом варианте осуществления модификация аминокислоты в положении 76 представляет собой замену аминокислоты на неполярную аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления неполярная аминокислота выбрана из глицина, валина или лейцина.

В одном из вариантов осуществления модификация аминокислоты в положении 44 или 89 представляет собой замену аминокислоты на неполярную аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления модификация аминокислоты предпочтительно находится в положении 89. В некоторых вариантах осуществления неполярная аминокислота выбрана из лейцина, изолейцина или валина.

В другом варианте осуществления модифицированный белок лектина растворим, частично растворим или нерастворим и/или обладает цитотоксичностью. В некоторых вариантах осуществления модифицированный белок лектина обладает цитотоксичностью, которая составляет по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90% от цитотоксичности контроля. В альтернативном варианте осуществления модифицированный белок лектина обладает цитотоксичностью, которая, при выражении в процентах, составляет менее 10% от контроля, или не обладает цитотоксичностью. В другом альтернативном варианте осуществления модифицированный белок лектина обладает цитотоксичностью, которая, при выражении в процентах, по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% выше цитотоксичности контроля.

Еще в одном варианте осуществления модифицированный белок лектина имеет длину 500, 400, 300, 250, 200 или 150 аминокислот или менее.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, которая содержит модифицированный белок лектина и фармацевтически приемлемый разбавитель или вспомогательное вещество и, необязательно, дополнительный терапевтический ингредиент. Также предложен способ лечения рака у пациента, включающий введение пациенту модифицированного белка лектина или фармацевтической композиции, содержащей модифицированный белок лектина.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, которая содержит описанный выше модифицированный белок лектина и фармацевтически приемлемый разбавитель или вспомогательное вещество и, необязательно, дополнительный терапевтический ингредиент. Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ лечения рака у пациента, включающий введение пациенту описанного выше модифицированного белка лектина. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение пациенту описанной выше фармацевтической композиции.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложен модифицированный белок лек-

тина или фармацевтическая композиция, содержащая модифицированный белок лектина, для применения в лечении рака. Кроме того, предложен модифицированный белок лектина, применяемый для выявления раковых клеток, диагностики и/или лечения рака.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен описанный выше модифицированный белок лектина для применения в медицине. Альтернативно предложена описанная выше фармацевтическая композиция для применения в медицине. В некоторых вариантах осуществления описанные выше модифицированный белок лектина или фармацевтическая композиция предназначены для применения в лечении рака. Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен описанный выше модифицированный белок лектина, когда его применяют для выявления раковой клетки, диагностики и/или лечения рака.

Согласно одному из аспектов настоящего изобретения предложена молекула нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность нуклеотидов, кодирующую модифицированный белок лектина, который содержит последовательность аминокислот, выбранную из:

i) SEQ ID NO: 1; или

ii) последовательности аминокислот, которая имеет по меньшей мере 60% гомологии с i),

и при этом последовательность аминокислот i) или ii) содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты, выбранную из одного или нескольких пунктов от (a) до (d):

a) по меньшей мере одну модификацию аминокислоты в сайте связывания углеводов i) или ii);

b) по меньшей мере одну модификацию аминокислоты на N-конце i) или ii);

c) по меньшей мере одну модификацию аминокислоты в положении 76; или

d) по меньшей мере одну модификацию аминокислоты в положении 44 или 89,

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложена молекула нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность нуклеотидов, кодирующую модифицированный белок лектина, который содержит последовательность аминокислот, выбранную из:

i) SEQ ID NO: 1; или

ii) последовательности аминокислот, которая имеет по меньшей мере 60% гомологии с i),

и при этом последовательность аминокислот i) или ii) содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты, выбранную из одного или нескольких пунктов от (a) до (d):

a) по меньшей мере одну модификацию аминокислоты в сайте связывания углеводов i) или ii);

b) по меньшей мере одну модификацию аминокислоты на N-конце i) или ii), при которой отщепление инициаторного метионина увеличено по сравнению с последовательностью аминокислот i);

c) по меньшей мере одну модификацию аминокислоты, которая уменьшает образование димера модифицированного белка лектина по сравнению с белком лектина с SEQ ID NO: 1; или

d) по меньшей мере одну модификацию аминокислоты, которая снижает окисление модифицированного белка лектина по сравнению с белком лектина с SEQ ID NO: 1.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложена молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует описанный выше модифицированный белок лектина. В другом аспекте настоящего изобретения предложен рекомбинантный вектор, содержащий вставку молекулы такой нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления вектор, функционально связанный в направлении от 5' к 3': промотор, который функционирует в клетке-хозяине; описанная выше последовательность нуклеотидов, кодирующая модифицированный белок лектина; и сигнал терминации. В другом варианте осуществления рекомбинантный вектор способен реплицироваться, транскрибироваться, транслироваться и/или экспрессироваться в одноклеточном организме.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложена трансформированная клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты, описанную выше. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой бактерию *Escherichia coli* или дрожжевую клетку.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен рекомбинантный вектор, содержащий вставку молекулы нуклеиновой кислоты, которая содержит последовательность нуклеотидов, кодирующую модифицированный белок лектина, который содержит последовательность аминокислот, выбранную из:

i) SEQ ID NO: 1; или

ii) последовательности аминокислот, которая имеет по меньшей мере 60% гомологии с i),

и при этом последовательность аминокислот i) или ii) содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты, выбранную из одного или нескольких пунктов от (a) до (d):

a) по меньшей мере одну модификацию аминокислоты в сайте связывания углеводов i) или ii);

b) по меньшей мере одну модификацию аминокислоты на N-конце i) или ii);

c) по меньшей мере одну модификацию аминокислоты в положении 76; или

d) по меньшей мере одну модификацию аминокислоты в положении 44 или 89.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен рекомбинантный вектор, содержащий вставку молекулы нуклеиновой кислоты, которая содержит последовательность нуклеотидов, кодирующую модифицированный белок лектина, который содержит последовательность аминокислот, вы-

бранную из:

i) SEQ ID NO: 1; или  
 ii) последовательности аминокислот, которая имеет по меньшей мере 60% гомологии с i),  
 и при этом последовательность аминокислот i) или ii) содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты, выбранную из одного или нескольких пунктов от (a) до (d):

a) по меньшей мере одну модификацию аминокислоты в сайте связывания углеводов i) или ii);  
 b) по меньшей мере одну модификацию аминокислоты на N-конце i) или ii), при которой отщепление инициаторного метионина увеличено по сравнению с последовательностью аминокислот i);  
 c) по меньшей мере, одну модификацию аминокислоты, которая уменьшено образование димера модифицированного белка лектина по сравнению с белком лектина с SEQ ID NO: 1; или  
 d) по меньшей мере одну модификацию аминокислоты, которая снижает окисление модифицированного белка лектина по сравнению с белком лектина с SEQ ID NO: 1.

Согласно последнему аспекту настоящего изобретения предложен способ продуцирования рекомбинантного белка лектина *Sclerotium rolfsii*, включающий:

i) культивирование клетки-хозяина, содержащей описанный выше рекомбинантный вектор, который кодирует рекомбинантный белок лектина;  
 ii) экспрессию рекомбинантного белка лектина;  
 iii) выделение неочищенного рекомбинантного белка лектина из культуры.

#### **Краткое описание сопутствующих последовательностей**

SEQ ID NO: 1: представляет собой последовательность аминокислот нативного лектина *S. rolfsii*.

SEQ ID NO: 2: представляет собой вариант последовательности аминокислот нативного лектина *S. rolfsii* (представлен в WO 2010/095143 как Rec-2).

SEQ ID NO: 3: представляет собой вариант последовательности аминокислот нативного лектина *S. rolfsii* (представлен в WO 2010/095143 как Rec-3).

SEQ ID NO: 4: представляет собой вариант последовательности аминокислот нативного лектина *S. rolfsii* (представлен в WO 2014/203261).

#### **Подробное описание настоящего изобретения**

Определения.

В настоящем документе термин "белок" обозначает полимер из аминокислотных остатков.

В настоящем документе термин "лектин" обозначает углеводсвязывающий белок.

В настоящем документе термин "модифицированный белок лектина" обозначает полимер из аминокислотных остатков, который обладает углеводсвязывающей активностью и содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты.

В настоящем документе термин "аминокислота" обозначает встречающиеся в природе и синтетические аминокислоты, а также аналоги и миметики аминокислот, функции которых аналогичны функциям аминокислот, встречающихся в природе. Встречающиеся в природе аминокислоты кодируются генетическим кодом, к ним относятся протеиногенные аминокислоты. К встречающимся в природе аминокислотам также относятся аминокислоты, модифицированные после трансляции в клетках. К синтетическим аминокислотам относятся неканонические аминокислоты, такие как селеноцистеин и пирролизин. Обычно синтетические аминокислоты не являются протеиногенными.

В настоящем документе термин "модификация аминокислоты" обозначает добавление, делецию или замену аминокислоты в конкретном положении последовательности аминокислот. В одном из вариантов осуществления добавление аминокислоты обозначает добавление по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот в конкретном положении последовательности аминокислот. Процессы добавления, делеции или замены осуществляются согласно настоящему изобретению или способами, известными специалистам. В настоящем документе в одном из вариантов осуществления термин "модификация аминокислоты" обозначает одну или несколько модификаций, выбранных из ацетилирования, нитрования, гликирования и/или сульфирования.

В настоящем документе термин "замена аминокислоты" обозначает замену аминокислоты в конкретном положении последовательности аминокислот. Термин "замена аминокислоты" охватывает как консервативные, так и неконсервативные замены аминокислоты. При консервативной замене аминокислоты происходит замена на функционально схожую аминокислоту. Другими словами, аминокислота, которая заменяет исходную аминокислоту (то есть "заменяющая" аминокислота), обладает аналогичными биохимическими свойствами. При неконсервативной замене аминокислоты происходит замена на функционально отличную аминокислоту. Другими словами, аминокислота, которая заменяет исходную аминокислоту (то есть "заменяющая" аминокислота), имеет другие биохимические свойства. В одном из вариантов осуществления замена аминокислоты представляет собой "благоприятную" замену аминокислоты. Благоприятная замена аминокислоты сохраняет биологическую функцию и/или другое свойство модифицированного белка лектина. В другом варианте осуществления консервативные и благоприятные замены аминокислот осуществляют по результатам парного или множественного выравнивания последовательностей лектиновых белков. Консервативная замена - это замена на аминокислоту, которая максимально часто встречается в природных лектиновых белках в соответствующем положении, а бла-

гоприятная замена - это замена на аминокислоту, которая редко встречается в природных лектиновых белках в соответствующем положении. Ожидается, что замены обоих типов сохранят или повысят цитотоксичность модифицированного белка. В одном из вариантов осуществления биологическая функция представляет собой "цитотоксическое действие", как определено ниже. В одном из вариантов осуществления заменяющая аминокислота выбрана для благоприятной замены аминокислоты по результатам парного или множественного выравнивания последовательностей лектиновых белков, предпочтительно лектинов грибного происхождения.

Понятно, что аминокислоты могут быть поделены на группы в зависимости от разных биохимических свойств. Примеры включают: полярные, неполярные, кислые и основные аминокислоты. В одном из вариантов осуществления аминокислота, применяемая для модификации аминокислоты, представляет собой по меньшей мере одну, выбранную из группы, включающей, помимо прочего, полярные, неполярные, кислые основные, селеноцистеиновые, пирролизиновые и неканонические аминокислоты.

В настоящем документе термины "гомология" или "гомологичный" обозначают два или более упомянутых объекта, которые по меньшей мере частично идентичны в данной области или фрагменте. Области, фрагменты или домены гомологии или идентичности обозначают фрагменты двух или более упомянутых объектов, которые гомологичны или идентичны друг другу. Таким образом, если две последовательности идентичны по одному или нескольким фрагментам последовательностей, указанные фрагменты являются идентичными. Значительная степень гомологии означает, что молекула, которая структурно или функционально сохранена таким образом, что ее структура или функция по меньшей мере частично совпадает или предположительно совпадает с одной или несколькими структурами или функциями (например, биологическая функция или активность) указанной молекулы, с которой она имеет гомологию, либо значимого/соответствующего региона или фрагмента указанной молекулы.

В одном из вариантов осуществления процент "гомологии" двух последовательностей определяют с помощью алгоритма BLASTP с параметрами по умолчанию (Altschul et al. *Nucleic Acids Res.* 1997 Sep 1;25(17):3389-402). В частности, алгоритм BLAST доступен в сети Интернет по URL-адресу: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. В альтернативном варианте осуществления для глобального выравнивания последовательностей процент гомологии двух последовательностей определяют с помощью алгоритма EMBOSS Needle с параметрами по умолчанию. В частности, алгоритм EMBOSS Needle доступен в сети Интернет по URL-адресу: [https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss\\_needle/](https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/).

Если не указано иное, в настоящем документе термин "гомология" используется взаимозаменяемо с термином "идентичность последовательности".

В настоящем документе термин "соответствующее положение" обозначает одно и то же положение в двух или нескольких последовательностях. В одном из вариантов осуществления соответствующее положение определяют путем выравнивания последовательностей, по меньшей мере первой и второй последовательностей. Соответствующее положение по меньшей мере в первой и второй последовательностях совпадает по результатам выравнивания последовательностей и, следовательно, может быть идентифицировано. В одном из вариантов осуществления выравнивание последовательностей представляет собой попарное или множественное выравнивание последовательностей. В одном из вариантов осуществления выравнивание последовательностей выполняется с помощью алгоритма. В одном из вариантов осуществления применяются алгоритмы BLAST или EMBOSS Needle, как обсуждалось выше.

В настоящем документе термин "сайт связывания углеводов" обозначает аминокислотные остатки в составе белка лектина, которые вовлечены в распознавание и связывание углеводной структуры. В одном из вариантов осуществления сайт связывания углеводов участвует в распознавании и связывании антигена TF (дисахарид; Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3GalNAc- $\alpha$ -Ser/Thr) и/или антигена Tn (моносахарид; GalNAc- $\alpha$ -). В одном из вариантов осуществления "сайт связывания углеводов" обозначает "первичный сайт связывания углеводов" и/или "вторичный сайт связывания углеводов".

В настоящем документе термин "первичный сайт связывания углеводов" обозначает один или несколько аминокислотных остатков, которые вовлечены в распознавание и связывание конкретной углеводной структуры. В одном из вариантов осуществления конкретная углеводная структура представляет собой антиген TF. В одном из вариантов осуществления аминокислотные остатки, которые составляют первичный сайт связывания углеводов, выбраны из одного или нескольких положений 27, 28, 47, 48, 70, 71, 72 и/или 105 в SEQ ID NO: 1 или соответствующего положения в последовательности, которая имеет по меньшей мере 60% гомологии с указанной последовательностью. В одном из вариантов осуществления соответствующее положение определяют путем выравнивания последовательностей.

В настоящем документе термин "вторичный сайт связывания углеводов" обозначает один или несколько аминокислотных остатков, которые вовлечены в распознавание и связывание структуры конкретного углевода. В одном из вариантов осуществления конкретная углеводная структура представляет собой антиген Tn. В одном из вариантов осуществления аминокислотные остатки, которые составляют вторичный сайт связывания углеводов, выбраны из одного или нескольких положений 77, 78, 80, 101, 112 и/или 114 в SEQ ID NO: 1 или соответствующего положения в последовательности, которая имеет по меньшей мере на 60% гомологии с указанной последовательностью. В одном из вариантов осуществления соответствующее положение определяют путем выравнивания последовательностей.

В настоящем документе термин "цитотоксический действие" относится к веществу, которое убивает раковые клетки или подавляет их рост (то есть проявляет антипролиферативную активность). В одном из вариантов осуществления процент цитотоксичности вещества определяют с помощью теста с сульфородамино В (SRB), как подробно описано в примере 5. В одном из вариантов осуществления процент цитотоксичности по меньшей мере 20, 30, 40, 50 или 60% по результатам определения с помощью теста SRB свидетельствует о цитотоксическом действии. В одном из вариантов осуществления процент цитотоксичности модифицированного белка лектина составляет по меньшей мере 60, 70, 80 или 90% от цитотоксичности контроля. В одном из вариантов осуществления контроль представляет собой белок лектина с SEQ ID NO: 1, а в другом варианте осуществления контроль представляет собой SEQ ID NO: 2.

В настоящем документе термин "N-конец" обозначает аминокислотные остатки, которые расположены в начале последовательности аминокислот (то есть со стороны amino-конца). В одном из вариантов осуществления N-конец обозначает аминокислотные остатки, расположенные на первых 10 или 5% последовательности аминокислоты.

В настоящем документе термин "отщепление инициаторного метионина" обозначает отщепление N-концевого (инициаторного) метионина от последовательности аминокислот. В одном из вариантов осуществления отщепление инициаторного метионина катализируется ферментом метионинаминопептидазой (MAP). В одном из вариантов осуществления отщепление инициаторного метионина оценивают методами масс-спектрометрии или высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), известными специалисту в данной области.

В настоящем документе термин "повышенное отщепление инициаторного метионина" обозначает повышение уровня отщепления инициаторного метионина по сравнению с контролем. В одном из вариантов осуществления это обозначает повышение уровня отщепления инициаторного метионина по меньшей мере на 5, 10, 25 или 50% по сравнению с контролем. В одном из вариантов осуществления контроль представляет собой белок лектина с SEQ ID NO: 1, а в другом варианте осуществления контроль представляет собой SEQ ID NO: 2.

В настоящем документе термин "образование димера" обозначает образование олигомера, содержащего два мономера, которые идентичны или неидентичны друг другу. В одном из вариантов осуществления образование димера обозначает получение димера, состоящего из двух модифицированных белков лектина, согласно настоящему изобретению (идентичных или неидентичных). В альтернативном варианте осуществления образование димера обозначает получение димера, состоящего из модифицированного белка лектина, согласно настоящему изобретению, и альтернативного белка лектина, например, имеющего последовательность SEQ ID NO: 1. В одном из вариантов осуществления образование димера опосредуется дисульфидной связью между остатками цистеина в каждом мономере. В одном из вариантов осуществления остаток цистеина находится в положении 76 SEQ ID NO: 1 или соответствующем положении в последовательности аминокислот, которая гомологична указанной последовательности по меньшей мере на 60%. В одном из вариантов осуществления соответствующее положение определяют путем выравнивания последовательностей. В одном из вариантов осуществления уровень образования димера определяют любым из следующих методов: масс-спектрометрия, эксклюзионная хроматография и/или электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-ПААГ-электрофорез).

В настоящем документе термин "сниженное образование димера" обозначает снижение уровня образования димера по сравнению с контролем. В одном из вариантов осуществления "сниженное образование димера" обозначает снижение уровня образования димера по меньшей мере на 5, 10, 25 или 50% по сравнению с контролем. В одном из вариантов осуществления контроль представляет собой белок лектина с SEQ ID NO: 1, а в другом варианте осуществления контроль представляет собой SEQ ID NO: 2.

В настоящем документе термин "окисление" обозначает потерю электронов или повышение степени окисления. В одном из вариантов осуществления термин "окисление" обозначает окисление аминокислотного остатка, примеры которого включают метионин, цистеин, триптофан, тирозин и/или гистидин. В одном из вариантов осуществления термин "окисление" обозначает окисление остатка метионина до сульфоксида метионина. В одном из вариантов осуществления остаток метионина, который подвержен окислению, находится в положении 44 или 89 SEQ ID NO: 1 или в соответствующем положении в последовательности аминокислот, которая гомологична указанной последовательности по меньшей мере на 60%. В одном из вариантов осуществления соответствующее положение определяют путем выравнивания последовательностей. В одном из вариантов осуществления уровень окисления определяют с помощью масс-спектрометрии и/или обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ). Принято считать, что окисление влияет на экспрессию и активность белка. В одном из вариантов осуществления эффект окисления определяют по влиянию замены аминокислот, которые подвержены окислению, в положении 44 или 89 SEQ ID NO: 1 на экспрессию растворимых форм и/или активность белка лектина.

В настоящем документе термин "сниженное окисление" обозначает снижение уровня окисления по сравнению с контролем. В одном из вариантов осуществления "сниженное окисление" обозначает снижение уровня окисления по меньшей мере на 5, 10, 25 или 50% по сравнению с контролем.

В альтернативном варианте осуществления "сниженное окисление" обозначает усиление экспрессии растворимых форм и/или активности белка лектина. В одном из вариантов осуществления контроль представляет собой белок лектина с SEQ ID NO: 1, а в другом варианте осуществления контроль представляет собой SEQ ID NO: 2.

В настоящем документе термин "растворимый" обозначает модифицированный белок лектина, экспрессирующийся в растворимой или по меньшей мере в частично растворимой форме. В одном из вариантов осуществления растворимость модифицированного белка лектина определяют путем лизиса клетки-хозяина, которая экспрессирует модифицированный белок лектина, и последующего анализа надосадочного слоя и осадка жидкости, содержащей лизированные клетки, методом ДСН-ПААГ-электрофореза. Присутствие модифицированного белка лектина в собранной после лизиса клеток надосадочной жидкости свидетельствует о его растворимости. Присутствие модифицированного белка лектина в собранной после лизиса клеток надосадочной жидкости и осадке свидетельствует о его частичной растворимости. В одном из вариантов осуществления термин "растворимый" в настоящем документе обозначает модифицированный белок лектина, не формирующий тельца включения. При анализе описанным выше методом присутствие модифицированного белка лектина в осадке указывает на его экспрессию в виде телец включения.

В настоящем документе термин "молекула нуклеиновой кислоты" обозначает полимер из нескольких нуклеотидов. Молекулы нуклеиновых кислот могут представлять собой встречающиеся в природе нуклеиновые кислоты или искусственные нуклеиновые кислоты. В одном из вариантов осуществления молекула нуклеиновой кислоты представляет собой ДНК или ее производное. В альтернативном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты представляет собой РНК или ее производное.

В настоящем документе термин "нуклеотид" обозначает встречающиеся в природе нуклеотиды и синтетические аналоги нуклеотидов, которые распознаются клеточными ферментами.

В стремлении разработать новые лектины с измененными и/или улучшенными физико-химическими свойствами и/или биологической активностью авторы настоящего изобретения разработали несколько вариантов лектина с модификациями последовательности нативного лектина как в активных, так и в неактивных сайтах.

В одном из вариантов осуществления в настоящем изобретении предложены варианты рекомбинантного лектина, полученные на основе нативной последовательности лектина и проявляющие измененные свойства; предпочтительно обладающие специфичностью к цепям конкретных углеводов, обнаруживаемых исключительно на поверхности клеток определенных типов рака, и/или повышенной растворимостью и/или стабильностью по сравнению с нативным белком. Эти рекомбинантные лектины получают путем тщательно спланированных модификаций нативного лектина. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения нативный лектин относится к группе, включающей, в том числе, лектины грибного и растительного происхождения. Обычно нативный лектин получают из почвенного фитопатогенного гриба. В иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения фитопатогенный гриб представляет собой *S. rolfsii*. Предпочтительно, чтобы рекомбинантные лектины, полученные на основе последовательности аминокислот нативного лектина, обладали специфичностью к антигену Tn и/или антигену TF и, соответственно, связывались с клетками рака толстой кишки, рака яичников и лейкоэмическими клетками человека.

В общих чертах, настоящее изобретение относится к модифицированному белку лектина, последовательность аминокислот которого выбрана из SEQ ID NO: 1, или последовательности аминокислот, которая гомологична указанной последовательности по меньшей мере на 60%, тогда как модифицированный белок лектина содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты в SEQ ID NO: 1, или в последовательности аминокислот, которая гомологична указанной последовательности по меньшей мере на 60%. Последовательность SEQ ID NO: 1 соответствует последовательности лектина нативного *S. rolfsii* (как указано в WO 2010/095143). Модификация аминокислоты выбрана из одного или нескольких из следующего: модификация аминокислоты в сайте связывания углеводов SEQ ID NO: 1 или последовательности, которая гомологична указанной последовательности по меньшей мере на 60%; модификация аминокислоты на N-конце SEQ ID NO: 1 или последовательности, которая гомологична указанной последовательности по меньшей мере на 60%; модификация аминокислоты, которая снижает образование димера модифицированного белка лектина; и/или модификация аминокислоты, которая подавляет окисление.

Предпочтительно, чтобы модифицированный белок лектина не имел аминокислотную последовательность из следующей группы: SEQ ID NO: 2 (как представлена в WO 2010/095143 как рекомбинантный вариант Rec-2), SEQ ID NO: 3 (как представлена в WO 2010/095143 как рекомбинантный вариант Rec-3) или SEQ ID NO: 4 (как представлена в WO 2014/203261). SEQ ID NO: 2-4 представляют собой примеры последовательностей аминокислот, по меньшей мере 60% гомологичных SEQ ID NO: 1. В частности, SEQ ID NO: 2, 3 и 4 на 97,9, 96,5 и 91,5% гомологичны SEQ ID NO: 1 соответственно (как определено с помощью EMBOSS Needle).

Сайт связывания углеводов.

В первом варианте осуществления настоящего изобретения сайт связывания углеводов представля-

ет собой первичный сайт связывания углеводов, который включает положения аминокислот 27, 28, 47, 48, 70, 71, 72 и 105 в SEQ ID NO: 1 (как описано у Leonidas et al. 2007) или соответствующие положения последовательности, которая имеет по меньшей мере 60% гомологии с SEQ ID NO: 1. Первичный сайт связывания углеводов обладает специфичностью к антигену TF (Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3GalNAc- $\alpha$ -Ser/Thr), который экспрессируется на поверхности раковых клеток. В первом варианте осуществления модифицированный белок лектина содержит замену аминокислоты в одном или нескольких положениях первичного сайта связывания. В одном из вариантов осуществления модифицированный белок лектина содержит замену аминокислоты в одном или нескольких положениях, выбранных из: 27 и/или 28; 47 и/или 48; 70, 71 и/или 72; и/или 105.

Во втором варианте осуществления настоящего изобретения сайт связывания углеводов представляет собой вторичный сайт связывания углеводов, который включает аминокислотные положения 77, 78, 80, 101, 112 и 114 в SEQ ID NO: 1 (как описано у Leonidas et al. 2007) или соответствующие положения последовательности, которая имеет по меньшей мере 60% гомологии с SEQ ID NO: 1. Вторичный сайт связывания углеводов обладает специфичностью к антигену Tn (GalNAc- $\alpha$ -). Во втором варианте осуществления модифицированный белок лектина содержит замену аминокислоты в одном или нескольких положениях вторичного сайта связывания. В одном из вариантов осуществления модифицированный белок лектина содержит замену аминокислоты в одном или нескольких положениях, выбранных из: 77, 78 и/или 80; 101; и/или 112 и/или 114.

Предпочтительно, чтобы замена аминокислоты согласно первому и/или второму варианту осуществления была консервативной или благоприятной заменой аминокислоты. Консервативная замена аминокислоты означает, что заменяющая аминокислота (т.е. та, которая заменяет исходную аминокислоту) имеет биохимические свойства, аналогичные свойствам исходной аминокислоты. В одном из вариантов осуществления полярную аминокислоту заменяют на другую полярную аминокислоту; неполярную аминокислоту заменяют на другую неполярную аминокислоту; кислую аминокислоту заменяется на другую кислую аминокислоту; или основную аминокислоту заменяют на другую основную аминокислоту. Это также относится к замене на аминокислоту, которая наиболее часто встречается в природных лектиновых белках в соответствующих положениях, по результатам попарного или множественного выравнивания последовательностей лектиновых белков. В одном из вариантов осуществления модифицированный белок лектина содержит благоприятную замену аминокислоты, в результате чего модифицированный белок лектина сохраняет биологическую функцию и/или другие свойства модифицированного белка лектина. В предпочтительном варианте осуществления модифицированный белок лектина содержит благоприятную замену аминокислоты, в результате чего модифицированный белок лектина сохраняет цитотоксическое действие и/или является растворимым. В одном из вариантов осуществления аминокислотный остаток для благоприятной замены аминокислоты выбирается по результатам попарного или множественного выравнивания последовательностей природных лектиновых белков, предпочтительно грибного происхождения. Благоприятная замена - это замена на аминокислоту, которая редко встречается в природных лектиновых белках в соответствующих положениях. Не ограничиваясь теорией, можно полагать, что выбор аминокислотного остатка, который присутствует в соответствующем положении гомологичной последовательности, и его включение в модифицированный белок лектина с большей вероятностью обеспечит сохранение биологической функции и/или другого свойства (такого как цитотоксическое действие и/или растворимость) модифицированного белка лектина.

В альтернативном варианте осуществления замена аминокислоты согласно первому и/или второму варианту осуществления представляет собой неконсервативную или неблагоприятную замену аминокислоты. Неконсервативная или неблагоприятная замена аминокислоты означает, что заменяющая аминокислота (т.е. та, которая заменяет исходную аминокислоту) имеет биохимические свойства, отличные от свойств исходной аминокислоты. Например, полярную аминокислоту заменяют на неполярную аминокислоту или наоборот. Неконсервативная или неблагоприятная замена аминокислоты также обозначает замену на аминокислоту, которая не присутствует в соответствующих положениях других природных лектиновых белков по результатам попарного или множественного выравнивания последовательностей. В одном из вариантов осуществления неконсервативная или неблагоприятная замена аминокислоты изменяет цитотоксическое действие и/или растворимость модифицированного белка лектина по сравнению с контролем. В одном из вариантов осуществления измененное цитотоксическое действие и/или растворимость определяют относительно белка лектина с SEQ ID NO: 1, а в другом варианте осуществления цитотоксическое действие и/или растворимость определяют относительно белка лектина с SEQ ID NO 2.

В одном из вариантов осуществления заменяющая аминокислота в первичном сайте связывания углеводов выбрана из одного или нескольких из:

- a) в положении 27: консервативной, благоприятной или неблагоприятной аминокислоты, где консервативная аминокислота является неполярной или кислой; благоприятная является полярной или основной, а неблагоприятная является неполярной;
- b) в положении 28: консервативной, благоприятной, нейтральной или неблагоприятной аминокислоты, где консервативная аминокислота является неполярной; благоприятная является полярной, ней-

тральная является кислой или основной; и неблагоприятная является полярной;

- c) в положении 47: неблагоприятной аминокислота, которая является основной или неполярной;
- d) в положении 48: неблагоприятной аминокислота, которая является неполярной;
- e) в положении 70: неблагоприятной аминокислота, которая является неполярной;
- f) в положении 71: неблагоприятной аминокислота, которая является неполярной;
- g) в положении 72: неблагоприятной аминокислота, которая является неполярной; и/или
- h) в положении 105: консервативной, благоприятной, нейтральной или неблагоприятной аминокислота, где консервативная аминокислота является основной или неполярной; благоприятная аминокислота является полярной, нейтральная аминокислота является кислой, основной или полярной, и/или неблагоприятная аминокислота является полярной, неполярной или кислой.

В частности, заменяющая аминокислота в первичном сайте связывания углеводов выбрана из одного или нескольких из:

- a) глицин (Y27G), триптофан (Y27W), фенилаланин (Y27F), глутаминовая кислота (Y27E) или гистидин (Y27H) в положении 27; и/или глицин (A28G), триптофан (A28W), серии (A28S), аспарагиновая кислота (A28D) или гистидин (A28H) в положении 28;
- b) лейцин в положении 47 (S47L); и/или триптофан в положении 48 (G48W);
- c) изолейцин в положении 70 (H70I); триптофан в положении 71 (N71W); и/или глицин в положении 72 (Y72G); и
- d) фенилаланин (R105F), глутамин (R105Q), глутаминовая кислота (R105E), лейцин (R105L), лизин (R105K), аланин (R105A), серии (R105S), валин (R105V), изолейцин (R105I105), пролин (R105I105), метионин (R105M), глицин (R105G), треонин (R105T), тирозин (R105Y), триптофан (R105W), аспарагин (R105N), цистеин (R105C), аспарагиновая кислота (R105D) или гистидин (R105H) в положении 105.

В одном из вариантов осуществления заменяющая аминокислота во вторичном сайте связывания углеводов выбрана из одного или нескольких из:

- a) в положении 77: неблагоприятной аминокислота, которая является-неполярной;
- b) в положении 78: неблагоприятной аминокислота, которая является неполярной;
- c) в положении 80: неблагоприятной аминокислота, которая является неполярной;
- d) в положении 101: благоприятной, неблагоприятной или нейтральной аминокислота, где благоприятная аминокислота является полярной или основной, неблагоприятная аминокислота является является неполярной, и нейтральная аминокислота является неполярной или кислой;
- e) в положении 112: неблагоприятной аминокислота, которая является неполярной;
- f) в положении 114: неблагоприятной аминокислота, которая является полярной.

В частности, заменяющая аминокислота во вторичном сайте связывания углеводов выбрана из одного или нескольких из:

- a) фенилаланин в положении 77 (D77F), глицин в положении 78 (I78G) и триптофан в положении 80 (T80W);
- b) фенилаланин (R101F), глутамин (R101Q), метионин (R101M), глутаминовая кислота (R101E); и лизин (R101K) в положении 101;
- c) глицин в положении 112 (Y112G) и/или аспарагин в положении 114 (V114N).

Предпочтительно, чтобы модифицированный белок лектина, содержащий замену аминокислоты в соответствии с первым и/или вторым осуществлением, оказывал цитотоксическое действие. В одном из вариантов осуществления цитотоксическое действие определяют с помощью теста с SRB. В особенно предпочтительном варианте осуществления процент цитотоксичности модифицированного белка лектина выше проценту цитотоксичности контроля или аналогичен указанному проценту. В одном из вариантов осуществления контроль представляет собой белок лектина с SEQ ID NO: 1. В альтернативном варианте осуществления контроль представляет собой белок лектина с последовательностью, отличной от SEQ ID NO: 1. В одном из вариантов осуществления процент цитотоксичности модифицированного белка лектина соответствует увеличению на 20% по сравнению с контролем. В предпочтительном варианте осуществления он соответствует увеличению на 45%. В альтернативных вариантах реализации процент цитотоксичности модифицированного белка лектина соответствует увеличению по меньшей мере на 10, 20, 30, 40 или 50, 60, 70, 80, 90 или 100% по сравнению с указанным параметром контроля. Также предпочтительно, чтобы модифицированный белок лектина, содержащий замену аминокислоты в соответствии с первым и/или вторым вариантом осуществления, был растворимым или частично растворимым.

Модификация N-конца.

В третьем варианте осуществления настоящего изобретения модифицированный белок лектина содержит замену аминокислоты в положении 1 и/или 2 SEQ ID NO: 1 или соответствующем положении последовательности, которая гомологична указанной последовательности по меньшей мере на 60%. Предпочтительно, чтобы заменяющая аминокислота (т.е. та, которая заменяет исходную аминокислоту) в положении 1 представляет собой не валин и не треонин. В частности, предпочтительно, чтобы заменяющая аминокислота в положении 1 имела небольшую боковую цепь. Предпочтительно, заменяющая аминокислота выбрана из аланина, глицина, пролина или серина. В другом варианте осуществления заменяющая аминокислота в положении 2 представляет собой триптофан. В альтернативном варианте осуществле-

ствления заменяющая аминокислота в положении 2 представляет собой другую неполярную аминокислоту. В одном варианте осуществления модифицированный белок лектина содержит замены аминокислот, как определено выше, в положениях 1 и 2 SEQ ID NO: 1 или соответствующих положениях последовательности, которая гомологична указанной последовательности по меньшей мере на 60%. В предпочтительном варианте заменяющие аминокислоты в положениях 1 и 2 представляют собой аланин и триптофан соответственно.

Предпочтительно, чтобы последовательность аминокислот модифицированного белка лектина согласно третьему варианту осуществления усиливала расщепление N-концевого (инициаторного) метионина по сравнению с контролем. В одном из вариантов осуществления контроль представляет собой последовательность аминокислот SEQ ID NO: 1, а в другом варианте осуществления контроль представляет собой SEQ ID NO: 2. В одном из вариантов осуществления отщепление инициаторного метионина катализируется ферментом метионинаминопептидазой (МАР). Уровень отщепления инициаторного метионина определяют методом, известным специалисту в данной области; предпочтительно масс-спектрометрическим анализом или высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ). Не ограничиваясь теорией, полагают, что на степень отщепления инициаторного метионина под действием МАР влияет аминокислотный остаток в первом и/или втором положении после положения инициаторного метионина (например, положение 1 и/или 2 в SEQ ID NO: 1). В частности, полагают, что последовательность аминокислот, содержащая аминокислотный остаток с небольшой боковой цепью в первом положении после инициаторного метионина, повышает степень отщепления инициаторного метионина (как обсуждалось выше).

Кроме того, предпочтительно, чтобы модифицированный белок лектина согласно третьему варианту осуществления был растворимым и/или оказывал цитотоксическое действие. Более предпочтительно, чтобы модифицированный белок лектина был растворимым и оказывал цитотоксическое действие. В одном из вариантов осуществления цитотоксическое действие определяют с помощью теста с SRB. В одном из вариантов осуществления модифицированный белок лектина обладает процентом цитотоксичности, который составляет по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90% от цитотоксичности контроля. В другом варианте осуществления модифицированный белок лектина обладает процентом цитотоксичности, который составляет менее 10% от цитотоксичности контроля, или не обладает цитотоксичностью. В другом варианте осуществления процент цитотоксичности соответствует по меньшей мере 60, 70, 80 или 90% цитотоксичности белка лектина с SEQ ID NO: 1.

В третьем варианте осуществления замена аминокислоты на N-конце находится в положении, отличном от положения 1 и/или 2 SEQ ID NO: 1 или соответствующем положении в последовательности, которая гомологична указанной последовательности по меньшей мере на 60%. В одном из вариантов осуществления модифицированный белок лектина содержит замену аминокислоты на первых 10 или 5% последовательности аминокислот (не в положениях 1 и/или 2).

Сниженное образование димера.

Сообщается, что нативный белок *S. rolfssii* существует в виде мономера в кислой среде и образует димер при нейтральном или основном pH (Leonidas et al. 2007). Не ограничиваясь теорией, полагают, что остаток цистеина в положении 76 SEQ ID NO: 1 опосредует образование димера посредством формирования дисульфидной связи. В некоторых вариантах реализации предпочтительно снизить образование димера, чтобы присутствовала только одна форма белка (т.е. мономерная форма).

Таким образом, в четвертом варианте осуществления настоящего изобретения модифицированный белок лектина содержит замену аминокислоты в положении 76 SEQ ID NO: 1, или соответствующем положении последовательности, которая гомологична указанной последовательности по меньшей мере на 60%, в результате чего аминокислотный остаток в этом положении больше не представлен цистеином. В предпочтительном варианте осуществления заменяющая аминокислота (т.е. та, которая заменяет исходную аминокислоту) в положении 76 представляет собой глицин. В альтернативном варианте осуществления заменяющая аминокислота в положении 76 представляет собой другой неполярный аминокислотный остаток. В одном из вариантов осуществления заменяющая аминокислота выбирается по результатам выравнивания последовательностей лектиновых белков грибного происхождения, как показано на фиг. 6 у Leonidas et al. 2007 г. Таким образом, в одном из вариантов осуществления неполярная заменяющая аминокислота выбрана из валина или лейцина.

Модифицированный белок лектина, содержащий замену аминокислоты согласно четвертому варианту осуществления, обладает сниженной способностью к образованию димера по сравнению с белком лектина с SEQ ID NO: 1. В одном из вариантов осуществления уровень образования димера определяют методом масс-спектрометрии. В альтернативном варианте осуществления уровень образования димеров определяют методом эксклюзионной хроматографии или ДСН-ПААГ-электрофореза. Предпочтительно, чтобы модифицированный белок лектина согласно четвертому варианту осуществления был растворимым и/или оказывал цитотоксическое действие. Более предпочтительно, чтобы модифицированный белок лектина был растворимым и оказывал цитотоксическое действие. В одном из вариантов осуществления цитотоксическое действие определяют с помощью теста с SRB. В одном из вариантов осуществления модифицированный белок лектина обладает процентом цитотоксичности, который составляет по

меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90% от цитотоксичности контроля. В другом варианте осуществления модифицированный белок лектина обладает процентом цитотоксичности, который составляет менее 10% от цитотоксичности контроля, или не обладает цитотоксичностью. В другом варианте осуществления процент цитотоксичности составляет по меньшей мере 60, 80 или 90% от цитотоксичности контроля. В одном из вариантов осуществления контроль представляет собой белок лектина с SEQ ID NO: 1, а в другом варианте осуществления контроль представляет собой SEQ ID NO: 2.

В четвертом варианте осуществления замена аминокислоты, которая снижает образование димера, находится в положении, отличном от положения 76. Например, не ограничиваясь теорией, в одном из вариантов осуществления альтернативные связи, отличные от дисульфидной связи, способствуют образованию димера, и альтернативная замена аминокислоты используется для предотвращения формирования этих связей и, следовательно, снижения образования димера.

Сниженное окисление.

В пятом варианте осуществления настоящего изобретения модифицированный белок лектина содержит замену аминокислоты в положении 89 SEQ ID NO: 1 или в соответствующем положении в последовательности аминокислот, которая гомологична указанной последовательности по меньшей мере на 60%. В дополнительном варианте осуществления модифицированный белок лектина содержит замену аминокислоты в положении 44 и/или 89 SEQ ID NO: 1 или в соответствующем положении в последовательности аминокислот, которая гомологична указанной последовательности по меньшей мере на 60%. В предпочтительном варианте осуществления заменяющая аминокислота (т.е. та, которая заменяет исходную аминокислоту) в положении 89 представляет собой валин. В альтернативном варианте осуществления заменяющая аминокислота в положении 89 представляет собой другой неполярный аминокислотный остаток. В одном из вариантов осуществления заменяющая аминокислота выбирается по результатам выравнивания последовательностей лектиновых белков грибного происхождения, как показано на фиг. 6 у Leonidas et al. 2007 г. Таким образом, в одном из вариантов осуществления неполярный аминокислотный остаток выбран из лейцина или изолейцина. В другом варианте осуществления модифицированный белок лектина содержит замену аминокислоты в положении 44, как определено выше для положения 89. В одном из вариантов осуществления модифицированный белок лектина содержит замену аминокислоты в положениях 44 и 89, как определено выше.

Не ограничиваясь теорией, полагают, что остатки метионина в положениях 44 и/или 89 SEQ ID NO: 1 подвержены окислению, что приводит к образованию сульфоксида метионина в этих положениях. Окисление остатков метионина до сульфоксида метионина может нарушать биологическую активность лектина. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предпочтительно подавлять окисление белка лектина. Соответственно, для модифицированного белка лектина, содержащего замену аминокислоты, согласно пятому варианту осуществления, характерно сниженное окисление по сравнению с белком лектина с SEQ ID NO: 1. В одном из вариантов уровень окисления определяют методом масс-спектрометрии. В альтернативном варианте уровень окисления определяют методом ОФ-ВЭЖХ. Кроме того, предпочтительно чтобы модифицированный белок лектина согласно пятому варианту осуществления был растворимым и/или оказывал цитотоксическое действие. Более предпочтительно, чтобы модифицированный белок лектина был растворимым и оказывал цитотоксическое действие. В одном из вариантов осуществления цитотоксическое действие определяют с помощью теста с SRB. В одном из вариантов осуществления модифицированный белок лектина обладает процентом цитотоксичности, который составляет по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90% от цитотоксичности контроля. В другом варианте осуществления модифицированный белок лектина обладает процентом цитотоксичности, который составляет менее 10% от цитотоксичности контроля, или не обладает цитотоксичностью. В другом варианте осуществления процент цитотоксичности составляет по меньшей мере 60, 70 или 90% от цитотоксичности контроля. В одном из вариантов осуществления контроль представляет собой белок лектина с SEQ ID NO: 1, а в другом варианте осуществления контроль представляет собой SEQ ID NO: 2.

В пятом варианте осуществления замена аминокислоты, снижающая уровень окисления, находится в положении, отличном от положения 44 и/или 89. Например, не ограничиваясь теорией, в одном из вариантов осуществления присутствие альтернативных аминокислотных остатков, таких как остатки цистеина, триптофана, тирозина и гистидина, способствует окислению белка лектина. Таким образом, альтернативная замена аминокислоты используется для снижения уровня окисления на этих сайтах и, следовательно, для снижения уровня окисления белка в целом.

Другие варианты осуществления.

В описанных выше вариантах осуществления с первого по пятый модификация аминокислоты представляет собой замену аминокислоты. Однако в любом из вариантов осуществления с первого по пятый модификация аминокислоты не является заменой аминокислоты. В одном из вариантов осуществления модификация аминокислоты представляет собой добавление или делецию аминокислоты в определенном положении последовательности аминокислот. В одном из вариантов осуществления добавление аминокислоты представляет собой добавление по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот в конкретном положении последовательности аминокислот.

В описанных выше вариантах осуществления с первого по пятый предпочтительно, чтобы модифи-

цированный белок лектина оказывал цитотоксическое действие. В другом варианте осуществления, который имеет отношение к любому из вариантов осуществления с первого по пятый модифицированный лектин выполняет дополнительную биологическую функцию (помимо цитотоксического действия). В одном из вариантов осуществления биологическая функция относится к специфичности модифицированного белка лектина к антигену.

В описанных выше вариантах осуществления с первого по пятый модифицированный белок лектина может содержать модификацию аминокислоты в последовательности аминокислот, которая по меньшей мере на 60% гомологична SEQ ID NO: 1. В другом варианте осуществления, который имеет отношение к любому из вариантов осуществления с первого по пятый, последовательность аминокислот по меньшей мере на 70, 75, 80 или 85% гомологична последовательности SEQ ID NO: 1. Особенно предпочтительно, чтобы последовательность аминокислот была по меньшей мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99% гомологична последовательности аминокислот SEQ ID NO: 1.

Следует понимать, что модифицированный белок лектина может содержать комбинацию или множество любых аминокислотных модификаций, описанных выше в отношении вариантов осуществления с первого по пятый.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, которая содержит описанный выше модифицированный белок лектина. Кроме того, фармацевтическая композиция включает фармацевтически приемлемый разбавитель или вспомогательное вещество. Примеры разбавителей и вспомогательных веществ включают стерилизованную воду, физиологический раствор и фосфатный буфер. Фармацевтическая композиция в некоторых вариантах реализации также включает дополнительный терапевтический ингредиент.

С дополнительными подробностями о вспомогательных компонентах фармацевтической композиции можно ознакомиться в Remington's Pharmaceutical Sciences и Фармакопее США, 1984, Mack Publishing Company, Истон, Пенсильвания, США.

При применении модифицированный белок лектина, как объяснено выше (в дальнейшем "лекарственное средство"), вводят пациенту, нуждающемуся в лечении. В одном из вариантов осуществления адекватная доза лекарственного средства составляет 0,1-1 мг/кг. В одном из вариантов осуществления у пациента рак. В одном из вариантов осуществления рак выбран из рака яичников, лейкемии и/или рака толстой кишки. В принципе, можно использовать любой способ введения лекарственного средства. В одном из вариантов осуществления лекарственное средство вводят одним из следующих способов: инъекция, впрыскивание или ингаляция.

В одном из вариантов осуществления описанный выше модифицированный белок лектина применяют для выявления раковых клеток.

В одном из вариантов осуществления описанный выше модифицированный белок лектина применяют в способе диагностики; предпочтительно в способе диагностики рака.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеотидов, кодирующую описанный выше модифицированный белок лектина. В одном из вариантов осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит любое изменение последовательности нуклеотидов, включая, помимо прочего, замену, делецию и/или добавление.

Следует принимать во внимание, что из-за вырожденности генетического кода молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие конкретный модифицированный вариант лектина, могут иметь отличающиеся последовательности нуклеотидов. Например, все кодоны GCA, GCC, GCG и GCT кодируют аминокислоту аланин.

Молекулы нуклеиновой кислоты могут представлять собой ДНК, РНК или их производные.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к рекомбинантной молекуле ДНК, включающей вектор. Предпочтительно, чтобы вектор представлял собой плазмиду или вирусный вектор. В одном из вариантов осуществления предложен рекомбинантный вектор, содержащий вставку молекулы нуклеиновой кислоты, которая включает в себя последовательность нуклеотидов, кодирующую описанный выше модифицированный лектин. В другом варианте осуществления рекомбинантный вектор представляет собой экспрессионный вектор и содержит функционально связанные в направлении от 5' к 3': промотор, который функционирует в клетке-хозяине; структурную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую описанный выше модифицированный белок лектина; и терминирующий кодон.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предложен способ получения рекомбинантного белка лектина *Sclerotium rolfsii*, и, в частности, описанных выше модифицированных белков лектина. В одном из вариантов осуществления клонированные последовательности нуклеотидов кодируют модифицированные белки лектина, которые по последовательности аминокислот близки к нативному лектину, но обладают альтернативными свойствами. Альтернативно последовательности нуклеотидов, кодирующие модифицированные варианты лектина, можно синтезировать химическими или рекомбинантными методами и обеспечивать их экспрессию в подходящей клетке-хозяине для получения рекомбинантных белков. К подходящим клеткам-хозяевам относятся прокариотические клетки, а также как

низшие, так и высшие эукариотические клетки. Введение рекомбинантной молекулы в клетку-хозяина можно осуществлять способами, известными в данной области. В иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения подходящий хозяин представляет собой микробную клетку. В предпочтительном варианте осуществления микробная клетка выбрана из группы, в которую, помимо прочего, входят дрожжевые клетки, *Escherichia coli*, линии клеток насекомых и линии клеток млекопитающих.

Рекомбинантные белки, как описано выше, могут быть получены путем выделения из рекомбинантной клетки-хозяина в виде продукта экспрессии. Рекомбинантные белки согласно настоящему изобретению в одном из вариантов осуществления очищают традиционными методами, обычно традиционными хроматографическими методами. В другом иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения молекулярную массу рекомбинантных лектинов, определяют методом ДСН-ПААГ-электрофореза, она составляет приблизительно 16000 Да. Еще в одном иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения рекомбинантные лектины могут обладать специфичностью к группе крови, обычно к группам крови человека. Еще в одном иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения рекомбинантные белки могут обладать исключительной способностью распознавать антиген TF и его криптические формы.

Соответственно, хотя настоящее изобретение было описано с указанием иллюстративных вариантов осуществления, настоящее описание не предназначено для толкования в ограничивающем смысле. Разные модификации иллюстративных вариантов осуществления, а также других вариантов осуществления настоящего изобретения будут очевидны специалистам в данной области техники после отсылки к настоящему описанию. Поэтому предполагается, что настоящее изобретение будет охватывать любые модификации или варианты осуществления такого типа, которые подпадают под истинный объем изобретения.

### Примеры

Пример 1: сайт-направленный мутагенез.

Последовательность аминокислот нативного лектина *S. rolfsii* (SEQ ID NO: 1) была модифицирована в разных конкретных положениях, как представлено ниже в табл. 1, посредством сайт-направленного мутагенеза. Из клеток *E. coli* BL21 DE3 экстрагировали плазмиду, которая кодировала нативную последовательности аминокислот SRL, клонированную в векторе pET20b, и использовали ее как матрицу. ПЦР проводили в объеме реакционной смеси 50 мкл, куда входило 10 мкл 5-кратного реакционного буфера Q5, 1 мкл 10 мМ раствора дезоксирибонуклеозидтрифосфата (дНТФ), 2,5 мкл 10 мкМ раствора прямого праймера, 2,5 мкл 10 мкМ раствора обратного праймера, 0,5 мкл фермента ДНК-полимеразы высокого качества Q5 и 20 нг матрицы, общий объем доводили до 50 мкл добавлением дистиллированной воды.

Представляющий интерес ген амплифицировали путем ПЦР с этапом начальной денатурации при температуре 98°C продолжительностью 30 секунд, после которого следовали 35 циклов амплификации, каждый из которых состоял из этапа денатурации при температуре 98°C продолжительностью 30 секунд, этапа отжига при температуре 55°C продолжительностью 30 секунд, и этапа удлинения при температуре 72°C продолжительностью 30 секунд. В конце проводили дополнительный этап удлинения при температуре 72°C продолжительностью 5 минут. Все реакции ПЦР осуществляли на оборудовании Mastercycler Pro. Продукты ПЦР анализировали на 1,2% агарозных гелях с бромидом этидия (EtBr).

Таблица 1

Перечень праймеров, используемых для конструирования разных вариантов лектина, полученных на основе нативной последовательности SRL

a. Варианты клонов для эффективного отщепления инициаторного метионина

Вариант клона	Изменени е	Прямой праймер	Обратный праймер
ULLB-0005/001	TIS	ATATACATATGAGCTATAAAATTACCG	TATGCTAGTTAT TGCTCAGCGGT
ULLB-0005/002	TIA	ATATACATATGGCGTATAAAATTACCG	
ULLB-0005/003	TIP	ATATACATATGCCGTATAAAATTACCG	
ULLB-0005/004	TIG	ATATACATATGGGCTATAAAATTACCG	
ULLB-0005/005	TIA, Y2W	ATATACATATGGCGTGGAAATTACCG	

b. Варианты клонов для внесения изменений в первичный сайт связывания углеводов

Вариант клона	Изменение	Прямой праймер	Обратный праймер
ULLB-0005/008	Y27G, A28W	GTGTGGAAAGGCTGGAATGGCGGTAC	GTACCGCCATTCCAGCCTTTCCACAC
ULLB-0005/009	S47L, G48W	GATGGGTGGTCTGTGGACCAGCGG	CCGCTGGTCCACAGACCACCCATC
ULLB-0005/010	H70I, N71W, Y72G	CCTTTGGTGTGATTTGGGGCAAACGC TGGTG	CACCAGCGTTTGCSCCAAATCACACC AAAGG
ULLB-0005/011	R105F	CGAAGAAGCGTTTGAACGCCAG	CTGGCGTTCAAACGCTTCTTCG

## с. Варианты клонов для внесения изменений во вторичный сайт связывания углеводов

Вариант клона	Изменение	Прямой праймер	Обратный праймер
ULLB-0005/012	D77F, I78G, T80W	CTGGTGTTTTGGCGTGTGGAACCTGG CAGCGGATGAAAC	CAGGTTCCACACGCCAAAAACACCAGC GTTTATAATTATGC
ULLB-0005/013	R101F	GTCAGAAAAACTTTGAAGAAGCGC	GCGCTTCTCAAAGTTTTTCTGAC

Вариант клона	Изменение	Прямой праймер	Обратный праймер
ULLB-0005/014	Y112G, V114N	GGCCAGAACAATAATGCGAAAGGCC GTAAC	GTTCTGGCCGTTACTCAGCTGGCGTT C

## d. Варианты клонов для предотвращения образования димеров и окисления белков

Вариант клона	Измене ние	Прямой праймер	Обратный праймер
ULLB-0005/015	C76G	CGCTGGGGCGATATTGTGACC	GGTCACAATATCGCCCCAGCG
ULLB-0005/016	M89V	GAAACCGGCGTGGTTATTAATCAG	CTGATTAATAACCACGCCGGTTTC

Пример 2: расщепление путем рестрикции.

Продукты ПЦР (полученные из примера 1) или плазмиды расщепляли ферментами рестриктазами NdeI и BamHI, для чего использовали 500 нг продукта ПЦР/плазмиды, 1 мкл 10-кратного буфера Cut-Smart и по 1-2 единицы NdeI и BamHI до конечного объема 10 мкл. Реакционную смесь инкубировали при температуре 37°C от 45 минут до 1 часа. Результаты расщепления анализировали на 1,2% агарозном геле с бромидом этидия (EtBr).

Затем ДНК экстрагировали и очищали из агарозных гелей.

Пример 3: лигирование вектора pET и подтверждение трансформантов методом ПЦР колоний.

Реакцию лигирования с вектором pET проводили в смеси, содержащей 100 нг образца ДНК (продукт расщепления рестрикционным ферментом из примера 2), 50 нг расщепленного вектора pET, 1 мкл 10-кратного буфера для ДНК-лигазы T4 и 1 мкл фермент ДНК-лигазы T4 до конечного объема 10 мкл. Эту реакцию проводили при температуре 22°C в течение 1 часа.

Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* DH5 $\alpha$  при помощи теплового шока. Затем клетки высевали на чашки с агаром Лурия с добавлением канамицина и инкубировали в течение ночи при температуре 37°C. После этого трансформанты подвергали ПЦР для проверки целостности и отсутствия повреждений вставки с использованием прямого и обратного праймеров pET при следующих условиях ПЦР. Программа ПЦР включала этап начальной денатурации при температуре 95°C продолжительностью 10 минут, за которым следовали 35 циклов амплификации, каждый из которых состоял из этапа денатурации при температуре 95°C продолжительностью 30 секунд, этапа отжига при температуре 55°C продолжительностью 30 секунд и этапа удлинения при температуре 72°C продолжительностью 45 секунд. В конце проводили дополнительный этап удлинения при температуре 72°C продолжительностью 10 минут. ПЦР проводили в смеси, включающей бактериальную колонию (образец ДНК), 10 мкМ прямого праймера pET, 10 мкМ обратного праймера pET, 5 мкл 2-кратного мастер-микса EcpoTaq PLUS GREEN (Lucigen) и дистиллированную воду до конечного объема 10 мкл. Продукты ПЦР анализировали на 1,2% агарозном геле с EtBr.

Пример 4: экстракция плазмидной ДНК и анализ экспрессии.

Бульон Лурия с канамицином инокулировали положительными трансформантами с получением жидких культур, затем проводили экстракцию плазмидной ДНК из *E. coli*. Все подготовленные в рамках этой работы конструкции со вставками в векторы pET, были подтверждены секвенированием.

Вектор pET27b, содержащий каждую модифицированную последовательность нуклеотидов, кодирующую вариант лектина, применяли для трансформации клеток *E. coli* BL 21DE3 GOLD. Положительные клоны отбирали путем анализа экспрессии в среде для аутоиндукции. Уровень и объем экспрессии рекомбинантного лектина подтверждали методом ДСН-ПААГ-электрофореза. Глицериновые стоки положительных клонов готовили и помещали на хранение при температуре -80°C.

Глицериновый сток (40 мкл) инокулировали в 50 мл бульона Лурия (содержащего 20 мкг/мл канамицина) и инкубировали при температуре 37°C при 140 об/мин в течение 16 часов. 1% культуры инокулировали в 200 мл среды для продуцирования, содержащей 1% дрожжевого экстракта (мас./об.), 1,2% декстрозы (мас./об.), 0,3% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (мас./об.), 1,25% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (мас./об.), 0,5% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (мас./об.), 0,05% NaCl (мас./об.), 0,1% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (мас./об.) и 0,1% (об./об.) раствор следов металлов. Канамицин добавляли до конечной концентрации 20 мкг/мл. Флаконы инкубировали при температуре 37°C и 140 об/мин. Когда оптическая плотность культуры при длине волны 600 нм (ОП<sub>600</sub>) достигала 1,5, температуру сни-

жали до 18°C, и культуру дополнительно инкубировали в течение 1 часа. Затем культуру индуцировали добавлением 0,25 мМ изопропилтиогаляктозида (ИПТГ) и дополнительно инкубировали при температуре 18°C в течение 20 часов. В образцах культур до и после индукции анализировали экспрессию и растворимость белка с методом ДСН-ПААГ-электрофореза. Бульонную культуру центрифугировали при 9000 об/мин в течение 15 минут при температуре 15°C. Полученный осадок ресуспендировали в лизирующем буфере (25 мМ трис, 1 мМ ЭДТА, рН 8,0). Клетки лизировали гомогенизацией под высоким давлением 18000 фунтов на квадратный дюйм (124100 кПа). Лизат осветляли фильтрованием через полое волокно диаметром 0,1 мкм, предварительно выдержанное в лизирующем буфере.

Осветленный белковый раствор подвергали ионообменной хроматографии для очистки рекомбинантного лектина.

Пример 5: биоанализ - антипролиферативная активность очищенного лектина в отношении линии клеток рака яичников (РА-1).

Антипролиферативную активность вариантов очищенного рекомбинантного лектина определяли с помощью теста с сульфородамино В (SRB). Принято считать, что лектиновые белки оказывают цитотоксическое действие на клетки рака яичников линии РА-1 посредством связывания с антигенами TF/Тп; соответственно анализ также может предоставить данные о специфичности лектиновых белков. Антипролиферативная активность дополнительно свидетельствует о стабильности белка лектина, поскольку считается, что сохранение конформации белка необходимо для сохранения его активности. В этом тесте общую биомассу оценивали путем окрашивания клеточных белков с помощью SRB. SRB представляет собой ярко-розовый аминоксантовый краситель, который может образовывать электростатический комплекс с основными аминокислотными остатками белков клеток, фиксированных трихлоруксусной кислотой в слабокислой среде. Он может диссоциировать в мягкой щелочной среде, и его можно солиubilизировать для измерения. Он широко используется для скрининга токсичности лекарственных препаратов в отношении линий разных типов злокачественных и незлокачественных клеток. Клетки быстро промывали, фиксировали и окрашивали красителем. Затем связанный краситель высвобождали из клеток раствором трис-основания. Количество связанного красителя, высвободившегося из окрашенных клеток, было прямо пропорционально биомассе клеток, его можно измерять для определения степени цитотоксичности, вызываемой тестируемым материалом.

Цитотоксичность клеток мониторировали/измеряли, когда клетки находились в логарифмической фазе роста. Тесты проводили в конечном объеме 200 мкл с применением 200 мкл контрольного образца не содержащей клеток среды, который применяли как холостую пробу для определения оптической плотности. Разведения теста проводили в бессывороточной среде для снижения фоновых помех. Получаемое в результате разведение было в 10 раз выше желаемой концентрации.

В первый день клетки на первом этапе клетки трипсинизировали, их подсчет проводили методом исключения трипанового синего в камере Нойбауэра, после чего высевали в лунки плоскодонного 96-луночного планшета (планшет с темными стенками) при плотности 5000 клеток/лунку. Во второй день, после инкубации в течение ночи, среду в планшете обновляли добавлением среды в объеме 180 мкл/лунку, после чего клетки обрабатывали 20 мкл каждого тестируемого вещества в концентрациях 2,5-80 мкг/мл, общий объем в каждой лунке должен был составлять 200 мкл. Планшеты инкубировали со второго дня по четвертый. На пятый день клетки обрабатывали SRB. Затем планшеты анализировали под микроскопом в стерильных условиях.

Клетки фиксировали осторожным нанесением 50 мкл 50% раствора (холодного) трихлоруксусной кислоты (ТХК) поверх культуральной среды. После этапа фиксации планшеты не перемещали, чтобы избежать смещения клеток, приводящего к ошибкам. Затем эти планшеты инкубировали в течение 1 часа при температуре 4°C, после чего 4 раза промывали очищенной водой для удаления избытка фиксатора и белков сыворотки. Планшеты сушили на воздухе. Часть планшетов помещали на хранение при комнатной температуре для дальнейшего использования. Затем планшеты окрашивали добавлением 0,4% (50 мкл) раствора красителя SRB, который покрывал поверхность культуры в лунке, после чего инкубировали в течение 30 минут при температуре 28°C.

После этого краситель удаляли сливанием и промывали отмывающим раствором (1% уксусная кислота). Планшеты подвергали 5 циклам промывки до удаления несвязанного красителя. После этого планшеты дополнительно сушили на воздухе до исчезновения видимой влаги.

Для солиubilизации в лунки добавляли по 200 мкл буфера для солиubilизации SRB (10 мм Tris), т.е. в объеме, равном исходному объему лунки, после чего инкубировали при температуре 28°C в течение 5 минут. Затем планшет осторожно встряхивали в течение 5-10 минут для растворения красителя и измеряли оптическую плотность при 580 нм.

Пример 6: модификация аминокислот последовательности нативного лектина S. Rolfsii.

Последовательность нативного лектина модифицировали для изменения его физико-химических свойств, как описано ниже.

а) Повышение эффективности отщепления инициаторного метионина.

Высокий уровень экспрессии рекомбинантных белков в *E. coli* ограничивает отщепление N-концевого метионина (инициаторного метионина) ферментом метионинаминопептидазой (MAP), что

приводит к формированию смеси белков, содержащей Met-лектин и лектин, лишенный Met. Одним из важных факторов, влияющих на отщепление инициаторного метионина, являются аминокислоты, расположенные после остатка метионина. MAP расщепляет все белки с небольшими боковыми цепями на уровне остатка во втором положении (т.е. первого аминокислотного остатка после инициаторного метионина). Белки, у которых после инициаторного метионина расположены остатки валина или треонина, гораздо менее подвержены расщеплению под действием MAP, чем белки с аланином, глицином, пролином или серином в этом положении. Были сконструированы клоны для замены первой (треонин) и второй (тирозин) аминокислот N-конца последовательности нативного лектина на 4 разные аминокислоты (табл. 2) для оценки влияния на отщепление инициаторного метионина, растворимость, специфичность и биологическую активность. Изменения не оказали влияния на растворимость, специфичность и биологическую активность вариантов лектина.

Рекомбинантный лектин очистили от всех пяти вариантов последовательности нативного лектина, разработанных для эффективного отщепления метионина во встряхиваемой колбе. Все варианты последовательности нативного лектина, где треонин в положении 1 был заменен на аланин, глицин, серин или пролин, оказались растворимыми, их экспрессию была сопоставима с экспрессией контроля. Биологическая активность всех вариантов также была сопоставима с активностью контроля. Таким образом было установлено, что изменение первой и/или второй аминокислоты в последовательности лектина не оказывает влияния на экспрессию или биологическую активность по сравнению с контролем.

b) Предотвращение образования димеров и окисления белков.

Принято считать, что остатки цистеина, входящие в мономер лектина *S. rolfsii*, способствуют образованию димера путем формирования дисульфидной связи и, следовательно, могут оказывать влияние на специфичность и биологическую активность лектина. Принято считать, что остаток метионина в составе лектина *S. rolfsii* подвержен окислению в процессе очистки. Остатки цистеина и метионина в положениях 76 и 89 заменили посредством замены аминокислоты для предотвращения образования димера и окисления белка соответственно. Вариант последовательности нативного лектина ULLB-0005/015, в котором цистеин в положении 76 был заменен на глицин для предотвращения образования димера, экспрессировал рекомбинантный лектин в растворимой форме без изменения биологической активности по сравнению с контролем. Аналогично вариант ULLB-0005/016 последовательности нативного лектина, в которой метионин в положении 89 был заменен на валин для предотвращения окисления белка, экспрессировался в растворимой форме без изменения биологической активности по сравнению с контролем. Таким образом, замена цистеина и метионина в положениях 76 и 89 глицином и валином соответственно не влияет на экспрессию, растворимость, специфичность и биологическую активность лектина.

Таблица 2

Краткое описание клонов, разработанных для эффективного отщепления инициаторного метионина, предотвращения образования димеров и окисления белков

i. Внесены изменения для эффективного отщепления инициаторного метионина

Вариант клона	Изменение последовательности	Теоретическая мол. м. (Дальтон)	Теоретическая изоэлектрическая точка	Экспрессия	Биоанализ (РА-1) (% цитотоксичности)	Содержание метионина (Met) (%) (содержания)
Контроль	ТΥΚΙΤ.....	16044,73	6,47	Растворимый	31,6–58	7,31
ULLB-0005/001	SYKIT.....	16029,70	6,49	Растворимый	35,13	1,99
ULLB-0005/002	AYKIT.....	16013,70	6,57	Растворимый	33,47	9,32
ULLB-0005/003	PYKIT.....	16039,74	6,61	Растворимый	47,2	6,99
ULLB-0005/004	GΥKIT.....	15999,66	6,57	Растворимый	45	1,12
ULLB-0005/005	AWKIT.....	16036,74	6,57	Растворимый	34,29	15,6

## ii. Изменения, внесенные для предотвращения образования димеров и окисления белков

Вариант клона	Изменение последовательности	Теоретическая мол. м. (Дальтон)	Теоретическая изоэлектрическая точка (pI)	Экспрессия	Биоанализ (РА-1) (% цитотоксичности)
ULLB-0005/015	C76G	15997,64	6,47	Растворимый	30
ULLB-0005/016	M89V	16011,67	6,47	Растворимый	34
(Контроль)	НП	НП	6,47	Растворимый	31,6–58

Последовательность нативного лектина также модифицировали для изменения биологической активности, как описано ниже.

## с) Модификация первичного сайта связывания углеводов.

Первичный сайт связывания углеводов специфичен к антигену TF (Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3GalNAc- $\alpha$ -Ser/Thr), экспрессируемому в раковых клетках. Были внесены изменения в состав аминокислот первичных сайтов связывания углеводов, после чего проанализировали растворимость, специфичность и биологическую активность модифицированных белков лектина. Касательно влияния на специфичность и биологическую активность, оценивали цитотоксичность модифицированных белков лектина в отношении линии клеток рака яичников (РА-1). Модификации аминокислот, внесенные в первичный сайт связывания углеводов, представлены в табл. 3. Варианты последовательности нативного лектина ULLB-0005/008 (Y27G и A28W) и ULLB-0005/011 (R105F) экспрессировали растворимую форму рекомбинантного лектина; однако его биологическая активность была утрачена. Тогда как вариант ULLB-0005/010 (H70I, N71W и Y72G) экспрессировался как частично растворимый, его цитотоксичность была выше, чем цитотоксичность рекомбинантного лектина согласно варианту ULLB-0005/009 (S47L и G48W), который экспрессировался в виде телец включения. Таким образом, изменение первичного сайта связывания углеводов влияет на растворимость и биологическую активность лектина. Данные в этом примере демонстрируют, что остатки аминокислот в положениях 27, 28, 47, 48, 70, 71, 72 и 105 определяют свойства первичного сайта связывания углеводов. Был сделан вывод, что первичный сайт связывания углеводов вовлечен в связывание с антигеном TF, присутствующим на поверхности раковых клеток.

Таблица 3

Краткое описание клонов, разработанных для изменения первичных сайтов связывания углеводов

Вариант клона	Изменение последовательности аминокислот	Теоретическая молекулярная масса	Теоретическая изоэлектрическая точка	Экспрессия	Биоанализ (РА-1) (% цитотоксичности)
ULLB-0005/008	Y27G, A28W	16052,74	6,47	Растворимый	Нет активности
ULLB-0005/009	S47L, G48W	16198,97	6,47	Сформированные тельца включения	Нет активности
ULLB-0005/010	H70I, N71W, Y72G	15985,73	6,38	Частично растворимый	52
ULLB-0005/011	R105F	16034,72	6,16	Растворимый	Нет активности
Контроль	Непригодный	16044,73	6,47	Растворимый	31,6–58

## d) Модификация вторичного сайта связывания углеводов.

Был модифицирован вторичный сайт связывания углеводов, вовлеченный в связывание с GalNAc- $\alpha$ - (Tn-антигеном). Были внесены изменения в состав аминокислот вторичных сайтов связывания углеводов, после чего проанализировали растворимость, специфичность и биологическую активность модифицированных белков лектина. Оценивали влияние на специфичность и биологическую активность в отношении линии клеток рака яичников (РА-1). Модификации аминокислот, внесенные во вторичный сайт связывания углеводов, представлены в табл. 4. Она оказывает влияние на растворимость, специфичность и/или биологическую активность рекомбинантного лектина.

Для создания нескольких новых вариантов на основе последовательности нативного лектина вторичные сайты связывания были выбраны из 77, 78, 80, 101, 112 или 114, в них были внесены модификации путем замены D, I, T, R, Y и V на F, G, W, F, G и N соответственно. Варианты ULLB-0005/012 (D77F, I78G и T80W) и ULLB-0005/014 (Y112G и V114N), которые были разработаны для изменения вторичного сайта связывания углеводов, экспрессировали рекомбинантный лектин в форме телец включения и частично растворимый рекомбинантный лектин соответственно. Возможно, неблагоприятная замена аминокислот

кислоты в варианте ULLB-0005/012 способствовала экспрессии нерастворимой формы этого белка. Вариант ULLB-0005/013 продемонстрировал утрату антипролиферативной активности в отношении клеток линии PA-1, тогда как вариант ULLB-0005/014 продемонстрировал антипролиферативную активность, сопоставимую с антипролиферативной активностью контрольного клона в отношении клеток линии PA-1. Данные в этом примере демонстрируют, что остатки аминокислот в положениях 77, 78, 80, 101, 112 и 114 определяют свойства вторичного сайта связывания углеводов. Был сделан вывод, что внесение модификаций во вторичный сайт связывания углеводов влияет на растворимость, а также на биологическую активность лектина.

Таблица 4

Краткое описание клонов, разработанных для изменения вторичных сайтов связывания углеводов

Вариант клона	Изменение последовательности	Теоретическая молекулярная масса	Теоретическая изoeлектрическая точка	Экспрессия	Биоанализ (PA-1) (% цитотоксичности)
ULLB-0005/012	D77F, I78G, T80W	16104,82	6,90	Сформированные тельца включения	Не выполнена
ULLB-0005/013	R101F	16034,72	6,16	Растворимый	Нет активности
ULLB-0005/014	Y112G, V114N	15952,58	6,47	Частично растворимый	42,3
Контроль	Непригодный	16044,73	6,47	Растворимый	31,6–58

Пример 7: новый сайт-направленный мутагенез.

Так же как в примере 1, последовательность аминокислот варианта последовательности лектина SEQ ID NO: 2 была модифицирована в разных конкретных положениях, как указано ниже в табл. 5, методом сайт-направленного мутагенеза.

Таблица 5

Перечень праймеров, используемых для конструирования разных вариантов лектина, полученных на основе последовательности нативного лектина SEQ ID NO: 2

а. Варианты клонов для внесения изменений в первичный сайт связывания углеводов

Вариант клона	Изменение	Прямой праймер	Обратный праймер
ULLB-0005/026	Y27W	GTGTGGAAATGGGCGAATGGC	GCCATTCGCCCATTCCACAC
ULLB-0005/027	Y27F	GTGTGGAAATTTGCGAATGGC	GCCATTCGCAAATTTCCACAC
ULLB-0005/028	Y27E	GTGTGGAAAGAAGCGAATGGC	GCCATTCGCTTCTTTCCACAC
ULLB-0005/029	Y27H	GTGTGGAAACATGCGAATGGC	GCCATTCGCATGTTTCCACAC
ULLB-0005/030	A28S	GGAAATATAGCAATGGCGGTACC	GGTACCGCCATTGCTATATTTCC
ULLB-0005/031	A28G	GGAAATATGGCAATGGCGGTACC	GGTACCGCCATTGCCATATTTCC
ULLB-0005/032	A28D	GGAAATATGATAATGGCGGTACC	GGTACCGCCATTATCATATTTCC
ULLB-0005/033	A28H	GGAAATATCATAATGGCGGTACC	GGTACCGCCATTATGATATTTCC
ULLB-0005/018	R105Q	GAAGAAGCGCAGGAACGCCAG	CTGGCGTTCCTGCGCTTCTTC
ULLB-0005/019	R105E	GAAGAAGCGGAAGAACGCCAG	CTGGCGTTCCTCCGCTTCTTC
ULLB-0005/020	R105L	GAAGAAGCGCTGGAACGCCAG	CTGGCGTTCAGCGCTTCTTC
ULLB-0005/021	R105K	GAAGAAGCGAAAGAACGCCAG	CTGGCGTTCCTTCGCTTCTTC
ULLB-0005/034	R105A	GAAGAAGCGGCGGAACGCCAG	CTGGCGTTCGCCGCTTCTTC
ULLB-0005/035	R105S	GAAGAAGCGAGCGAACGCCAG	CTGGCGTTCGTCGCTTCTTC
ULLB-0005/036	R105V	GAAGAAGCGGTGGAACGCCAG	CTGGCGTTCACCGCTTCTTC
ULLB-0005/037	R105I	GAAGAAGCGATTGAACGCCAG	CTGGCGTTCATCGCTTCTTC
ULLB-0005/038	R105P	GAAGAAGCGCCGGAACGCCAG	CTGGCGTTCGCGCTTCTTC

ULLB-0005/039	R105M	GAAGAAGCGATGGAACGCCAG	CTGGCGTTCATCGCTTCTTC
ULLB-0005/040	R105G	GAAGAAGCGGGCGAACGCCAG	CTGGCGTTCGCCCCTTCTTC
ULLB-0005/041	R105T	GAAGAAGCGACCGAACGCCAG	CTGGCGTTCGGTTCGCTTCTTC
ULLB-0005/042	R105Y	GAAGAAGCGTATGAACGCCAG	CTGGCGTTCATACGCTTCTTC
ULLB-0005/043	R105W	GAAGAAGCGTGGGAACGCCAG	CTGGCGTTCACACGCTTCTTC
ULLB-0005/044	R105N	GAAGAAGCGAACGAACGCCAG	CTGGCGTTCGTTCGCTTCTTC
ULLB-0005/045	R105C	GAAGAAGCGTGCGAACGCCAG	CTGGCGTTCGCACGCTTCTTC
ULLB-0005/046	R105D	GAAGAAGCGGATGAACGCCAG	CTGGCGTTCATCCGCTTCTTC
ULLB-0005/047	R105H	GAAGAAGCGCATGAACGCCAG	CTGGCGTTCATGCGCTTCTTC

b. Варианты клонов для внесения изменений во вторичный сайт связывания углеводов

Вариант клона	Измене ние	Прямой праймер	Обратный праймер
ULLB-0005/022	R101Q	CAGAAAAACCAGGAAGAAGCGC	GCGCTTCTTCCTGGTTTTTCTG
ULLB-0005/023	R101M	CAGAAAAACATGGAAGAAGCGC	GCGCTTCTTCCATGTTTTTCTG
ULLB-0005/024	R101E	CAGAAAAACGAAGAAGAAGCGC	GCGCTTCTTCTCGTTTTTCTG
ULLB-0005/025	R101K	CAGAAAAACAAAGAAGAAGCGC	GCGCTTCTTCTTTGTTTTTCTG

Пример 8: модификации аминокислот варианта последовательности лектина SEQ ID NO: 2.

Последовательность нативного лектина модифицировали для изменения его физико-химических свойств, как описано ниже.

a. Модификация первичного сайта связывания углеводов.

Первичный сайт связывания углеводов специфичен к антигену TF (Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3GalNAc- $\alpha$ -Ser/Thr), экспрессируемому в раковых клетках. Были внесены изменения в состав аминокислот первичных сайтов связывания углеводов, после чего проанализировали растворимость, специфичность и биологическую активность модифицированных белков лектина. Касательно влияния на специфичность и биологическую активность, оценивали цитотоксичность модифицированных белков лектина в отношении линии клеток рака яичников (PA-1). Модификации аминокислот, внесенные в первичный сайт связывания углеводов, представлены в табл. 6. Варианты последовательности нативного лектина ULLB-0005/028 (Y27E), ULLB-0005/032 (A28D), ULLB-0005/018 (R105Q), ULLB-0005/035 (R105S), ULLB-0005/043 (R105W) и ULLB-0005/045 (R105C) экспрессировали рекомбинантный лектин в растворимой форме; однако его биологическая активность была утрачена. Варианты ULLB-0005/021 (R105K) ULLB-0005/047 (R105H) экспрессировались в растворимой форме, а цитотоксичность этого варианта была значительно выше, чем цитотоксичность других вариантов. Это может быть связано с основной природой замененной аминокислоты. Аналогичная консервативная замена в A28 неполярным гларгином (A28G-ULLB-0005/031) также приводила к экспрессии растворимой формы, а цитотоксичность этого варианта была значительно выше, чем цитотоксичность других вариантов. Варианты ULLB-0005/019 (R105E) и ULLB-0005/046 (R105D) экспрессировались в виде телец включения. Возможно, замена R105 кислыми аминокислотами способствовала экспрессии нерастворимой формы этого белка. Варианты ULLB-0005/034 (R105A), ULLB-0005/037 (R105I), ULLB-0005/038 (R105P) и ULLB-0005/041 (R105T) экспрессировались в виде растворимых форм и поэтому не были изменены по сравнению с контролем. Таким образом, изменение первичного сайта связывания углеводов влияет на растворимость и биологическую активность лектина. Данные в этом примере демонстрируют, что остатки аминокислот в положениях 27, 28 и 105 определяют свойства первичного сайта связывания углеводов. Был сделан вывод, что первичный сайт связывания углеводов вовлечен в связывание с антигеном TF, присутствующим на поверхности раковых клеток.

Таблица 6

Краткое описание клонов, разработанных для изменения первичных сайтов связывания углеводов

Вариант клона	Изменение последовательности аминокислот	Теоретическая молекулярная масса	Теоретическая изоэлектрическая точка	Экспрессия	Биоанализ (РА-1) (% цитотоксичности)
ULLB-0005/026	Y27W	16066,77	6,47	Растворимый	40
ULLB-0005/027	Y27F	16027,73	6,47	Растворимый	50
ULLB-0005/028	Y27E	16009,67	6,17	Растворимый	Нет активности
ULLB-0005/029	Y27H	16017,69	6,55	Растворимый	26
ULLB-0005/030	A28S	16059,73	6,47	Растворимый	43
ULLB-0005/031	A28G	16029,70	6,47	Растворимый	57
ULLB-0005/032	A28D	16087,74	6,17	Растворимый	Нет активности
ULLB-0005/033	A28H	16109,79	6,55	Растворимый	49
ULLB-0005/018	R105Q	16015,67	6,16	Растворимый	Нет активности
ULLB-0005/019	R105E	16016,66	5,91	Нерастворимый	Нет активности
ULLB-0005/020	R105L	16000,70	6,16	Растворимый	25,38
ULLB-0005/021	R105K	16015,72	6,47	Растворимый	53,99
ULLB-0005/034	R105A	15958,62	6,16	Растворимый	39,29
ULLB-0005/035	R105S	15974,62	6,16	Растворимый	Нет активности
ULLB-0005/036	R105V	15986,67	6,16	Растворимый	31,2
ULLB-0005/037	R105I	16000,70	6,16	Растворимый	37,89
ULLB-0005/038	R105P	15984,66	6,16	Растворимый	42,28
ULLB-0005/039	R105M	16018,73	6,16	Растворимый	54,48
ULLB-0005/040	R105G	15944,59	6,16	Растворимый	НО
ULLB-0005/041	R105T	15988,65	6,16	Растворимый	37,08
ULLB-0005/042	R105Y	16050,72	6,16	Растворимый	52,5
ULLB-0005/043	R105W	16073,75	6,16	Растворимый	Нет активности
ULLB-0005/044	R105N	16001,64	6,16	Растворимый	Не определено
ULLB-0005/045	R105C	15990,68	6,16	Растворимый	Нет активности
ULLB-0005/046	R105D	16002,63	5,90	Нерастворимый	Нет активности
ULLB-0005/047	R105H	16024,68	6,26	Растворимый	52
Контроль	Непригодный	16044,73	6,47	Растворимый	31,6–58

b. Модификация вторичного сайта связывания углеводов.

Был модифицирован вторичный сайт связывания углеводов, вовлеченный в связывание с GalNAc-

$\alpha$ - (Tn-антигеном). Были внесены изменения в состав аминокислот вторичных сайтов связывания углеводов, после чего проанализировали растворимость, специфичность и биологическую активность модифицированных белков лектина. Оценивали влияние на специфичность и биологическую активность в отношении линии клеток рака яичников (PA-1). Модификация аминокислоты, внесенная во вторичный сайт связывания углеводов, представлена в табл. 7. Она оказывает влияние на растворимость, специфичность и/или биологическую активность рекомбинантного лектина. Для получения нескольких новых вариантов на основе последовательности нативного лектина вторичный сайт связывания 101 модифицировали путем замены R на Q, M, E и K. Благоприятная и нейтральная замена в положении 101 привела к экспрессии растворимых вариантов ULLB-0005/022 (R101Q), ULLB-0005/023 (R101M), ULLB-0005/024 (R101E) и ULLB-0005/025 (R101K), которые продемонстрировали антипролиферативную активность в отношении клеток линии PA-1, сопоставимую с активностью контрольного клона. Данные в этом примере демонстрируют, что аминокислотные остатки в положении 101 определяют свойства вторичного сайта связывания углеводов. Был сделан вывод, что изменение вторичного сайта связывания углеводов приводит к экспрессии растворимой формы рекомбинантного лектина, биологическая активность которого сопоставима с биологической активностью контроля.

Таблица 7

Краткое описание клонов, разработанных для изменения вторичных сайтов связывания углеводов

Вариант клона	Изменение последовательности	Теоретическая молекулярная масса	Теоретическая изоэлектрическая точка	Экспрессия	Биоанализ (PA-1) (% цитотоксичности)
ULLB-0005/022	R101Q	16015,67	6,16	Растворимый	44,26
ULLB-0005/023	R101M	16018,73	6,16	Растворимый	32,18
ULLB-0005/024	R101E	16016,66	5,91	Растворимый	44,21
ULLB-0005/025	R101K	16015,72	6,47	Растворимый	38,35
Контроль	Непригодный	16044,73	6,47	Растворимый	31,6–58

#### Резюме последовательностей

SEQ ID NO. 1:

TYKITVRVYQTNPNFAFFHPVEKTVWKYANGGTWITDDQHVLTMGGSG  
TSGTLRFHADNGESFTATFGVHNYKRWCDIVTNLAADETGMVINQQYYYS  
QKNREEARERQLSNYEVKNAKEGNFELIV

SEQ ID NO. 2:

TYKITVRVYQTNPDFAFFHPVEKTVWKYANGGTWITDDQHVLTMGGSG  
TSGTLRFHADNGESFTATFGVHNYKRWCDIVTNLAADETGMVINQQYYYS  
QKNREEARIGSNYQNDVKNAGRNRI

SEQ ID NO. 3:

VYKITVRVYQTNPDFAFFHPVEKTVWKYANGGTWSITDDQHVLTMGGSG  
TSGTLRFHADNGESFTATFGVHNYKRWCDIVTNLAADETGMVINQQYYYS  
QKNREEARIGSNYQNDVKNAGRNRI

SEQ ID NO. 4:

VYKITVRVYQTNPDFAFFHPVEKTVWKYADGGTWSITDDQHVLTMGGSG  
TSGTLRFHADNGESFTATFGVHNDYKRWCDIVTDLAADETGMVINQEYYYS  
EKDREEARERQNSNYEVDKAKEGNFEIVYT

В этом описании упомянуты несколько подходов к организации процесса, оборудования и систем, которые являются компонентами этого уникального интегрированного изобретения, и понятно, что многие изменения и модификации описанного варианта осуществления могут быть внесены в пределах объема и сущности изобретения. Приведенные примеры иллюстрируют конкретные наглядные подходы настоящего изобретения. Эти подходы описаны достаточно подробно, чтобы дать возможность специалистам в данной области техники осуществить настоящее изобретение на практике, и следует понимать,

что квалифицированный специалист может выполнить модификации разных раскрытых подходов.

Если способы и этапы, описанные выше, соответствуют определенным событиям, происходящим в определенном порядке, специалисты в данной области техники поймут, что порядок определенных этапов может быть изменен и что такие модификации не противоречат принципам изобретения. Кроме того, где это возможно, определенные этапы могут осуществляться одновременно в рамках параллельного процесса, либо осуществляться последовательно.

#### Список последовательностей

<110> UNICHEM LABORATORIES LTD

<120> ВАРИАНТЫ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА

<130> IN201821032765

<150> IN 201821032765

<151> 2018-08-31

<160> 136

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 141

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Измененная последовательность

<400> 1

Thr Tyr Lys Ile Thr Val Arg Val Tyr Gln Thr Asn Pro Asn Ala Phe  
1 5 10 15

Phe His Pro Val Glu Lys Thr Val Trp Lys Tyr Ala Asn Gly Gly Thr  
20 25 30

Trp Thr Ile Thr Asp Asp Gln His Val Leu Thr Met Gly Gly Ser Gly  
35 40 45

Thr Ser Gly Thr Leu Arg Phe His Ala Asp Asn Gly Glu Ser Phe Thr  
50 55 60

Ala Thr Phe Gly Val His Asn Tyr Lys Arg Trp Cys Asp Ile Val Thr  
65 70 75 80

Asn Leu Ala Ala Asp Glu Thr Gly Met Val Ile Asn Gln Gln Tyr Tyr  
85 90 95

Ser Gln Lys Asn Arg Glu Glu Ala Arg Glu Arg Gln Leu Ser Asn Tyr  
100 105 110

Glu Val Lys Asn Ala Lys Gly Arg Asn Phe Glu Ile Val Tyr Thr Glu  
115 120 125

Ala Glu Gly Asn Asp Leu His Ala Asn Leu Ile Ile Gly  
130 135 140

<210> 2

<211> 141

045722

<212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Измененная последовательность

<400> 2

Thr Tyr Lys Ile Thr Val Arg Val Tyr Gln Thr Asn Pro Asp Ala Phe  
 1 5 10 15

Phe His Pro Val Glu Lys Thr Val Trp Lys Tyr Ala Asn Gly Gly Thr  
 20 25 30

Trp Thr Ile Thr Asp Asp Gln His Val Leu Thr Met Gly Gly Ser Gly  
 35 40 45

Thr Ser Gly Thr Leu Arg Phe His Ala Asp Asn Gly Glu Ser Phe Thr  
 50 55 60

Ala Thr Phe Gly Val His Asn Tyr Lys Arg Trp Cys Asp Ile Val Thr  
 65 70 75 80

Asn Leu Ala Ala Asp Glu Thr Gly Met Val Ile Asn Gln Gln Tyr Tyr  
 85 90 95

Ser Gln Lys Asn Arg Glu Glu Ala Arg Glu Arg Gln Leu Ser Asn Tyr  
 100 105 110

Gln Val Lys Asn Ala Lys Gly Arg Asn Phe Gln Ile Val Tyr Thr Glu  
 115 120 125

Ala Glu Gly Asn Asp Leu His Ala Asn Leu Ile Ile Gly  
 130 135 140

<210> 3  
 <211> 141  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Измененная последовательность

<400> 3

Val Tyr Lys Ile Thr Val Arg Val Tyr Gln Thr Asn Pro Asp Ala Phe  
 1 5 10 15

Phe His Pro Val Glu Lys Thr Val Trp Lys Tyr Ala Asn Gly Gly Thr  
 20 25 30

Trp Ser Ile Thr Asp Asp Gln His Val Leu Thr Met Gly Gly Ser Gly  
 35 40 45

Thr Ser Gly Thr Leu Arg Phe His Ala Asp Asn Gly Glu Ser Phe Thr  
 50 55 60

## 045722

Ala Thr Phe Gly Val His Asn Tyr Lys Arg Trp Cys Asp Ile Val Thr  
65 70 75 80

Asn Leu Ala Ala Asp Glu Thr Gly Met Val Ile Asn Gln Gln Tyr Tyr  
85 90 95

Ser Gln Lys Asn Arg Glu Glu Ala Arg Glu Arg Gln Leu Ser Asn Tyr  
100 105 110

Gln Val Lys Asn Ala Lys Gly Arg Asn Phe Gln Ile Val Tyr Thr Glu  
115 120 125

Ala Glu Gly Asn Asp Leu His Ala Asn Leu Ile Ile Gly  
130 135 140

<210> 4

<211> 141

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Измененная последовательность

<400> 4

Val Tyr Lys Ile Thr Val Arg Val Tyr Gln Thr Asn Pro Asp Ala Phe  
1 5 10 15

Phe His Pro Val Glu Lys Thr Val Trp Lys Tyr Ala Asp Gly Gly Thr  
20 25 30

Trp Ser Ile Thr Asp Asp Gln His Val Leu Thr Met Gly Gly Ser Gly  
35 40 45

Thr Ser Gly Thr Leu Arg Phe His Ala Asp Asn Gly Glu Ser Phe Thr  
50 55 60

Ala Thr Phe Gly Val His Asp Tyr Lys Arg Trp Cys Asp Ile Val Thr  
65 70 75 80

Asp Leu Ala Ala Asp Glu Thr Gly Met Val Ile Asn Gln Glu Tyr Tyr  
85 90 95

Ser Glu Lys Asp Arg Glu Glu Ala Arg Glu Arg Gln Asn Ser Asn Tyr  
100 105 110

Glu Val Lys Asp Ala Lys Gly Arg Asn Phe Glu Ile Val Tyr Thr Glu  
115 120 125

Ala Glu Gly Asn Asp Leu His Ala Asp Leu Ile Ile Gly  
130 135 140

<210> 5

<211> 141

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/001

&lt;400&gt; 5

Ser Tyr Lys Ile Thr Val Arg Val Tyr Gln Thr Asn Pro Asn Ala Phe  
 1 5 10 15

Phe His Pro Val Glu Lys Thr Val Trp Lys Tyr Ala Asn Gly Gly Thr  
 20 25 30

Trp Thr Ile Thr Asp Asp Gln His Val Leu Thr Met Gly Gly Ser Gly  
 35 40 45

Thr Ser Gly Thr Leu Arg Phe His Ala Asp Asn Gly Glu Ser Phe Thr  
 50 55 60

Ala Thr Phe Gly Val His Asn Tyr Lys Arg Trp Cys Asp Ile Val Thr  
 65 70 75 80

Asn Leu Ala Ala Asp Glu Thr Gly Met Val Ile Asn Gln Gln Tyr Tyr  
 85 90 95

Ser Gln Lys Asn Arg Glu Glu Ala Arg Glu Arg Gln Leu Ser Asn Tyr  
 100 105 110

Glu Val Lys Asn Ala Lys Gly Arg Asn Phe Glu Ile Val Tyr Thr Glu  
 115 120 125

Ala Glu Gly Asn Asp Leu His Ala Asn Leu Ile Ile Gly  
 130 135 140

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/001 Прямой праймер

&lt;400&gt; 6

atatacatat gagctataaa attaccg

27

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/001 Обратный праймер

&lt;400&gt; 7

tatgctagtt attgctcagc ggt

23

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 141

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/002

&lt;400&gt; 8

Ala Tyr Lys Ile Thr Val Arg Val Tyr Gln Thr Asn Pro Asn Ala Phe  
 1 5 10 15

Phe His Pro Val Glu Lys Thr Val Trp Lys Tyr Ala Asn Gly Gly Thr  
 20 25 30

Trp Thr Ile Thr Asp Asp Gln His Val Leu Thr Met Gly Gly Ser Gly  
 35 40 45

Thr Ser Gly Thr Leu Arg Phe His Ala Asp Asn Gly Glu Ser Phe Thr  
 50 55 60

Ala Thr Phe Gly Val His Asn Tyr Lys Arg Trp Cys Asp Ile Val Thr  
 65 70 75 80

Asn Leu Ala Ala Asp Glu Thr Gly Met Val Ile Asn Gln Gln Tyr Tyr  
 85 90 95

Ser Gln Lys Asn Arg Glu Glu Ala Arg Glu Arg Gln Leu Ser Asn Tyr  
 100 105 110

Glu Val Lys Asn Ala Lys Gly Arg Asn Phe Glu Ile Val Tyr Thr Glu  
 115 120 125

Ala Glu Gly Asn Asp Leu His Ala Asn Leu Ile Ile Gly  
 130 135 140

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/002 Прямой праймер

&lt;400&gt; 9

atatacatat ggcgtataaa attaccg

27

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/002 Обратный праймер

&lt;400&gt; 10

tatgctagtt attgctcagc ggt

23

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 141

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/003

&lt;400&gt; 11

Pro Tyr Lys Ile Thr Val Arg Val Tyr Gln Thr Asn Pro Asn Ala Phe  
1 5 10 15

Phe His Pro Val Glu Lys Thr Val Trp Lys Tyr Ala Asn Gly Gly Thr  
20 25 30

Trp Thr Ile Thr Asp Asp Gln His Val Leu Thr Met Gly Gly Ser Gly  
35 40 45

Thr Ser Gly Thr Leu Arg Phe His Ala Asp Asn Gly Glu Ser Phe Thr  
50 55 60

Ala Thr Phe Gly Val His Asn Tyr Lys Arg Trp Cys Asp Ile Val Thr  
65 70 75 80

Asn Leu Ala Ala Asp Glu Thr Gly Met Val Ile Asn Gln Gln Tyr Tyr  
85 90 95

Ser Gln Lys Asn Arg Glu Glu Ala Arg Glu Arg Gln Leu Ser Asn Tyr  
100 105 110

Glu Val Lys Asn Ala Lys Gly Arg Asn Phe Glu Ile Val Tyr Thr Glu  
115 120 125

Ala Glu Gly Asn Asp Leu His Ala Asn Leu Ile Ile Gly  
130 135 140

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/003 Прямой праймер

&lt;400&gt; 12

atatacatat gccgtataaa attaccg

27

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/003 Обратный праймер

&lt;400&gt; 13

tatgctagtt attgctcagc ggt

23

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 141

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/004

<400> 14

Gly Tyr Lys Ile Thr Val Arg Val Tyr Gln Thr Asn Pro Asn Ala Phe  
1 5 10 15

Phe His Pro Val Glu Lys Thr Val Trp Lys Tyr Ala Asn Gly Gly Thr  
20 25 30

Trp Thr Ile Thr Asp Asp Gln His Val Leu Thr Met Gly Gly Ser Gly  
35 40 45

Thr Ser Gly Thr Leu Arg Phe His Ala Asp Asn Gly Glu Ser Phe Thr  
50 55 60

Ala Thr Phe Gly Val His Asn Tyr Lys Arg Trp Cys Asp Ile Val Thr  
65 70 75 80

Asn Leu Ala Ala Asp Glu Thr Gly Met Val Ile Asn Gln Gln Tyr Tyr  
85 90 95

Ser Gln Lys Asn Arg Glu Glu Ala Arg Glu Arg Gln Leu Ser Asn Tyr  
100 105 110

Glu Val Lys Asn Ala Lys Gly Arg Asn Phe Glu Ile Val Tyr Thr Glu  
115 120 125

Ala Glu Gly Asn Asp Leu His Ala Asn Leu Ile Ile Gly  
130 135 140

<210> 15

<211> 27

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/004 Прямой праймер

<400> 15

atatacatat gggctataaa attaccg

27

<210> 16

<211> 23

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/004 Обратный праймер

<400> 16

tatgctagtt attgctcagc ggt

23

<210> 17

<211> 141

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/005

&lt;400&gt; 17

Ala Trp Lys Ile Thr Val Arg Val Tyr Gln Thr Asn Pro Asn Ala Phe  
 1 5 10 15

Phe His Pro Val Glu Lys Thr Val Trp Lys Tyr Ala Asn Gly Gly Thr  
 20 25 30

Trp Thr Ile Thr Asp Asp Gln His Val Leu Thr Met Gly Gly Ser Gly  
 35 40 45

Thr Ser Gly Thr Leu Arg Phe His Ala Asp Asn Gly Glu Ser Phe Thr  
 50 55 60

Ala Thr Phe Gly Val His Asn Tyr Lys Arg Trp Cys Asp Ile Val Thr  
 65 70 75 80

Asn Leu Ala Ala Asp Glu Thr Gly Met Val Ile Asn Gln Gln Tyr Tyr  
 85 90 95

Ser Gln Lys Asn Arg Glu Glu Ala Arg Glu Arg Gln Leu Ser Asn Tyr  
 100 105 110

Glu Val Lys Asn Ala Lys Gly Arg Asn Phe Glu Ile Val Tyr Thr Glu  
 115 120 125

Ala Glu Gly Asn Asp Leu His Ala Asn Leu Ile Ile Gly  
 130 135 140

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/005 Прямой праймер

&lt;400&gt; 18

atatacatat ggcgtggaaa attaccg

27

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/005 Обратный праймер

&lt;400&gt; 19

tatgctagtt attgctcagc ggt

23

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 141

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/008

&lt;400&gt; 20

Thr Tyr Lys Ile Thr Val Arg Val Tyr Gln Thr Asn Pro Asn Ala Phe  
1 5 10 15

Phe His Pro Val Glu Lys Thr Val Trp Lys Gly Trp Asn Gly Gly Thr  
20 25 30

Trp Thr Ile Thr Asp Asp Gln His Val Leu Thr Met Gly Gly Ser Gly  
35 40 45

Thr Ser Gly Thr Leu Arg Phe His Ala Asp Asn Gly Glu Ser Phe Thr  
50 55 60

Ala Thr Phe Gly Val His Asn Tyr Lys Arg Trp Cys Asp Ile Val Thr  
65 70 75 80

Asn Leu Ala Ala Asp Glu Thr Gly Met Val Ile Asn Gln Gln Tyr Tyr  
85 90 95

Ser Gln Lys Asn Arg Glu Glu Ala Arg Glu Arg Gln Leu Ser Asn Tyr  
100 105 110

Glu Val Lys Asn Ala Lys Gly Arg Asn Phe Glu Ile Val Tyr Thr Glu  
115 120 125

Ala Glu Gly Asn Asp Leu His Ala Asn Leu Ile Ile Gly  
130 135 140

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/008 Прямой праймер

&lt;400&gt; 21

gtgtggaag gctggaatgg csgtac

26

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/008 Обратный праймер

&lt;400&gt; 22

gtaccgccat tccagccttt ccasac

26

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 141

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/009

&lt;400&gt; 23

Thr Tyr Lys Ile Thr Val Arg Val Tyr Gln Thr Asn Pro Asn Ala Phe  
 1 5 10 15

Phe His Pro Val Glu Lys Thr Val Trp Lys Tyr Ala Asn Gly Gly Thr  
 20 25 30

Trp Thr Ile Thr Asp Asp Gln His Val Leu Thr Met Gly Gly Leu Trp  
 35 40 45

Thr Ser Gly Thr Leu Arg Phe His Ala Asp Asn Gly Glu Ser Phe Thr  
 50 55 60

Ala Thr Phe Gly Val His Asn Tyr Lys Arg Trp Cys Asp Ile Val Thr  
 65 70 75 80

Asn Leu Ala Ala Asp Glu Thr Gly Met Val Ile Asn Gln Gln Tyr Tyr  
 85 90 95

Ser Gln Lys Asn Arg Glu Glu Ala Arg Glu Arg Gln Leu Ser Asn Tyr  
 100 105 110

Glu Val Lys Asn Ala Lys Gly Arg Asn Phe Glu Ile Val Tyr Thr Glu  
 115 120 125

Ala Glu Gly Asn Asp Leu His Ala Asn Leu Ile Ile Gly  
 130 135 140

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/009 Прямой праймер

&lt;400&gt; 24

gatgggtgggt ctgtggacca gcgg

24

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/009 Обратный праймер

&lt;400&gt; 25

ccgctggtcc acagaccacc catc

24

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 141

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/010

<400> 26

Thr Tyr Lys Ile Thr Val Arg Val Tyr Gln Thr Asn Pro Asn Ala Phe  
1 5 10 15

Phe His Pro Val Glu Lys Thr Val Trp Lys Tyr Ala Asn Gly Gly Thr  
20 25 30

Trp Thr Ile Thr Asp Asp Gln His Val Leu Thr Met Gly Gly Ser Gly  
35 40 45

Thr Ser Gly Thr Leu Arg Phe His Ala Asp Asn Gly Glu Ser Phe Thr  
50 55 60

Ala Thr Phe Gly Val Ile Trp Gly Lys Arg Trp Cys Asp Ile Val Thr  
65 70 75 80

Asn Leu Ala Ala Asp Glu Thr Gly Met Val Ile Asn Gln Gln Tyr Tyr  
85 90 95

Ser Gln Lys Asn Arg Glu Glu Ala Arg Glu Arg Gln Leu Ser Asn Tyr  
100 105 110

Glu Val Lys Asn Ala Lys Gly Arg Asn Phe Glu Ile Val Tyr Thr Glu  
115 120 125

Ala Glu Gly Asn Asp Leu His Ala Asn Leu Ile Ile Gly  
130 135 140

<210> 27

<211> 31

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/010 Прямой праймер

<400> 27

ccttttggtgt gatttggggc aaacgctggt g

31

<210> 28

<211> 31

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/010 Обратный праймер

<400> 28

caccagcgtt tgccsaaat cacassaaag g

31

<210> 29

<211> 141

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/011

&lt;400&gt; 29

Thr Tyr Lys Ile Thr Val Arg Val Tyr Gln Thr Asn Pro Asn Ala Phe  
1 5 10 15

Phe His Pro Val Glu Lys Thr Val Trp Lys Tyr Ala Asn Gly Gly Thr  
20 25 30

Trp Thr Ile Thr Asp Asp Gln His Val Leu Thr Met Gly Gly Ser Gly  
35 40 45

Thr Ser Gly Thr Leu Arg Phe His Ala Asp Asn Gly Glu Ser Phe Thr  
50 55 60

Ala Thr Phe Gly Val His Asn Tyr Lys Arg Trp Cys Asp Ile Val Thr  
65 70 75 80

Asn Leu Ala Ala Asp Glu Thr Gly Met Val Ile Asn Gln Gln Tyr Tyr  
85 90 95

Ser Gln Lys Asn Arg Glu Glu Ala Phe Glu Arg Gln Leu Ser Asn Tyr  
100 105 110

Glu Val Lys Asn Ala Lys Gly Arg Asn Phe Glu Ile Val Tyr Thr Glu  
115 120 125

Ala Glu Gly Asn Asp Leu His Ala Asn Leu Ile Ile Gly  
130 135 140

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/011 Прямой праймер

&lt;400&gt; 30

сгаагаагсг тттгаагсгс аг

22

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/011 Обратный праймер

&lt;400&gt; 31

сгггсгттса аагсгттсгг сг

22

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 141

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/012

&lt;400&gt; 32

Thr Tyr Lys Ile Thr Val Arg Val Tyr Gln Thr Asn Pro Asn Ala Phe  
 1 5 10 15

Phe His Pro Val Glu Lys Thr Val Trp Lys Tyr Ala Asn Gly Gly Thr  
 20 25 30

Trp Thr Ile Thr Asp Asp Gln His Val Leu Thr Met Gly Gly Ser Gly  
 35 40 45

Thr Ser Gly Thr Leu Arg Phe His Ala Asp Asn Gly Glu Ser Phe Thr  
 50 55 60

Ala Thr Phe Gly Val His Asn Tyr Lys Arg Trp Cys Phe Gly Val Trp  
 65 70 75 80

Asn Leu Ala Ala Asp Glu Thr Gly Met Val Ile Asn Gln Gln Tyr Tyr  
 85 90 95

Ser Gln Lys Asn Arg Glu Glu Ala Arg Glu Arg Gln Leu Ser Asn Tyr  
 100 105 110

Glu Val Lys Asn Ala Lys Gly Arg Asn Phe Glu Ile Val Tyr Thr Glu  
 115 120 125

Ala Glu Gly Asn Asp Leu His Ala Asn Leu Ile Ile Gly  
 130 135 140

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 39

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/012 Прямой праймер

&lt;400&gt; 33

ctggtgtttt ggcgtgtgga acctggcagc ggatgaaac

39

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/012 Обратный праймер

&lt;400&gt; 34

caggttccac acgssaaaac accagcgttt ataattatgc

40

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 141

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/013

<400> 35

Thr Tyr Lys Ile Thr Val Arg Val Tyr Gln Thr Asn Pro Asn Ala Phe  
1 5 10 15

Phe His Pro Val Glu Lys Thr Val Trp Lys Tyr Ala Asn Gly Gly Thr  
20 25 30

Trp Thr Ile Thr Asp Asp Gln His Val Leu Thr Met Gly Gly Ser Gly  
35 40 45

Thr Ser Gly Thr Leu Arg Phe His Ala Asp Asn Gly Glu Ser Phe Thr  
50 55 60

Ala Thr Phe Gly Val His Asn Tyr Lys Arg Trp Cys Asp Ile Val Thr  
65 70 75 80

Asn Leu Ala Ala Asp Glu Thr Gly Met Val Ile Asn Gln Gln Tyr Tyr  
85 90 95

Ser Gln Lys Asn Phe Glu Glu Ala Arg Glu Arg Gln Leu Ser Asn Tyr  
100 105 110

Glu Val Lys Asn Ala Lys Gly Arg Asn Phe Glu Ile Val Tyr Thr Glu  
115 120 125

Ala Glu Gly Asn Asp Leu His Ala Asn Leu Ile Ile Gly  
130 135 140

<210> 36

<211> 24

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/013 Прямой праймер

<400> 36

gtcagaaaaa ctttgaagaа gcgc

24

<210> 37

<211> 24

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/013 Обратный праймер

<400> 37

gcgcttcttc aaagtttttc tgac

24

<210> 38

<211> 141

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/014

&lt;400&gt; 38

Thr Tyr Lys Ile Thr Val Arg Val Tyr Gln Thr Asn Pro Asn Ala Phe  
 1 5 10 15

Phe His Pro Val Glu Lys Thr Val Trp Lys Tyr Ala Asn Gly Gly Thr  
 20 25 30

Trp Thr Ile Thr Asp Asp Gln His Val Leu Thr Met Gly Gly Ser Gly  
 35 40 45

Thr Ser Gly Thr Leu Arg Phe His Ala Asp Asn Gly Glu Ser Phe Thr  
 50 55 60

Ala Thr Phe Gly Val His Asn Tyr Lys Arg Trp Cys Asp Ile Val Thr  
 65 70 75 80

Asn Leu Ala Ala Asp Glu Thr Gly Met Val Ile Asn Gln Gln Tyr Tyr  
 85 90 95

Ser Gln Lys Asn Arg Glu Glu Ala Arg Glu Arg Gln Leu Ser Asn Gly  
 100 105 110

Glu Asn Lys Asn Ala Lys Gly Arg Asn Phe Glu Ile Val Tyr Thr Glu  
 115 120 125

Ala Glu Gly Asn Asp Leu His Ala Asn Leu Ile Ile Gly  
 130 135 140

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/014 Прямой праймер

&lt;400&gt; 39

ggccagaaca aaaatgсgaа aggccgтаас

30

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/014 Обратный праймер

&lt;400&gt; 40

gttctggccg ttactcagct ggcgttc

27

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 141

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/015

&lt;400&gt; 41

Thr Tyr Lys Ile Thr Val Arg Val Tyr Gln Thr Asn Pro Asn Ala Phe  
 1 5 10 15

Phe His Pro Val Glu Lys Thr Val Trp Lys Tyr Ala Asn Gly Gly Thr  
 20 25 30

Trp Thr Ile Thr Asp Asp Gln His Val Leu Thr Met Gly Gly Ser Gly  
 35 40 45

Thr Ser Gly Thr Leu Arg Phe His Ala Asp Asn Gly Glu Ser Phe Thr  
 50 55 60

Ala Thr Phe Gly Val His Asn Tyr Lys Arg Trp Gly Asp Ile Val Thr  
 65 70 75 80

Asn Leu Ala Ala Asp Glu Thr Gly Met Val Ile Asn Gln Gln Tyr Tyr  
 85 90 95

Ser Gln Lys Asn Arg Glu Glu Ala Arg Glu Arg Gln Leu Ser Asn Tyr  
 100 105 110

Glu Val Lys Asn Ala Lys Gly Arg Asn Phe Glu Ile Val Tyr Thr Glu  
 115 120 125

Ala Glu Gly Asn Asp Leu His Ala Asn Leu Ile Ile Gly  
 130 135 140

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/015 Прямой праймер

&lt;400&gt; 42

cgctggggcg atattgtgac c

21

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/015 Обратный праймер

&lt;400&gt; 43

ggtcacaata tcgccccagc g

21

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 141

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/016

<400> 44

Thr Tyr Lys Ile Thr Val Arg Val Tyr Gln Thr Asn Pro Asn Ala Phe  
1 5 10 15

Phe His Pro Val Glu Lys Thr Val Trp Lys Tyr Ala Asn Gly Gly Thr  
20 25 30

Trp Thr Ile Thr Asp Asp Gln His Val Leu Thr Met Gly Gly Ser Gly  
35 40 45

Thr Ser Gly Thr Leu Arg Phe His Ala Asp Asn Gly Glu Ser Phe Thr  
50 55 60

Ala Thr Phe Gly Val His Asn Tyr Lys Arg Trp Cys Asp Ile Val Thr  
65 70 75 80

Asn Leu Ala Ala Asp Glu Thr Gly Val Val Ile Asn Gln Gln Tyr Tyr  
85 90 95

Ser Gln Lys Asn Arg Glu Glu Ala Arg Glu Arg Gln Leu Ser Asn Tyr  
100 105 110

Glu Val Lys Asn Ala Lys Gly Arg Asn Phe Glu Ile Val Tyr Thr Glu  
115 120 125

Ala Glu Gly Asn Asp Leu His Ala Asn Leu Ile Ile Gly  
130 135 140

<210> 45

<211> 24

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/016 Прямой праймер

<400> 45

gaaaccggcg tggttattaa tca

24

<210> 46

<211> 24

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/016 Обратный праймер

<400> 46

ctgattaata accacgscgg tttc

24

<210> 47

<211> 141

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/018

<400> 47

Thr Tyr Lys Ile Thr Val Arg Val Tyr Gln Thr Asn Pro Asp Ala Phe  
1 5 10 15

Phe His Pro Val Glu Lys Thr Val Trp Lys Tyr Ala Asn Gly Gly Thr  
20 25 30

Trp Thr Ile Thr Asp Asp Gln His Val Leu Thr Met Gly Gly Ser Gly  
35 40 45

Thr Ser Gly Thr Leu Arg Phe His Ala Asp Asn Gly Glu Ser Phe Thr  
50 55 60

Ala Thr Phe Gly Val His Asn Tyr Lys Arg Trp Cys Asp Ile Val Thr  
65 70 75 80

Asn Leu Ala Ala Asp Glu Thr Gly Met Val Ile Asn Gln Gln Tyr Tyr  
85 90 95

Ser Gln Lys Asn Arg Glu Glu Ala Gln Glu Arg Gln Leu Ser Asn Tyr  
100 105 110

Gln Val Lys Asn Ala Lys Gly Arg Asn Phe Gln Ile Val Tyr Thr Glu  
115 120 125

Ala Glu Gly Asn Asp Leu His Ala Asn Leu Ile Ile Gly  
130 135 140

<210> 48

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/018 Прямой праймер

<400> 48

гаагаагсгс аггаасгсса г

21

<210> 49

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/018 Обратный праймер

<400> 49

сггсггттсс тсггтттт с

21

<210> 50

<211> 141

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/019

<400> 50

Thr Tyr Lys Ile Thr Val Arg Val Tyr Gln Thr Asn Pro Asp Ala Phe  
1 5 10 15

Phe His Pro Val Glu Lys Thr Val Trp Lys Tyr Ala Asn Gly Gly Thr  
20 25 30

Trp Thr Ile Thr Asp Asp Gln His Val Leu Thr Met Gly Gly Ser Gly  
35 40 45

Thr Ser Gly Thr Leu Arg Phe His Ala Asp Asn Gly Glu Ser Phe Thr  
50 55 60

Ala Thr Phe Gly Val His Asn Tyr Lys Arg Trp Cys Asp Ile Val Thr  
65 70 75 80

Asn Leu Ala Ala Asp Glu Thr Gly Met Val Ile Asn Gln Gln Tyr Tyr  
85 90 95

Ser Gln Lys Asn Arg Glu Glu Ala Glu Glu Arg Gln Leu Ser Asn Tyr  
100 105 110

Gln Val Lys Asn Ala Lys Gly Arg Asn Phe Gln Ile Val Tyr Thr Glu  
115 120 125

Ala Glu Gly Asn Asp Leu His Ala Asn Leu Ile Ile Gly  
130 135 140

<210> 51

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/019 Прямой праймер

<400> 51

гаагаагсгг аагаасгсса г

21

<210> 52

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/019 Обратный праймер

<400> 52

сгггсгттсг тсггттсгг с

21

<210> 53

<211> 141

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/020

<400> 53

Thr Tyr Lys Ile Thr Val Arg Val Tyr Gln Thr Asn Pro Asp Ala Phe  
1 5 10 15

Phe His Pro Val Glu Lys Thr Val Trp Lys Tyr Ala Asn Gly Gly Thr  
20 25 30

Trp Thr Ile Thr Asp Asp Gln His Val Leu Thr Met Gly Gly Ser Gly  
35 40 45

Thr Ser Gly Thr Leu Arg Phe His Ala Asp Asn Gly Glu Ser Phe Thr  
50 55 60

Ala Thr Phe Gly Val His Asn Tyr Lys Arg Trp Cys Asp Ile Val Thr  
65 70 75 80

Asn Leu Ala Ala Asp Glu Thr Gly Met Val Ile Asn Gln Gln Tyr Tyr  
85 90 95

Ser Gln Lys Asn Arg Glu Glu Ala Leu Glu Arg Gln Leu Ser Asn Tyr  
100 105 110

Gln Val Lys Asn Ala Lys Gly Arg Asn Phe Gln Ile Val Tyr Thr Glu  
115 120 125

Ala Glu Gly Asn Asp Leu His Ala Asn Leu Ile Ile Gly  
130 135 140

<210> 54

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/020 Прямой праймер

<400> 54

гаагаагсгс тггаасгсса г

21

<210> 55

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/020 Обратный праймер

<400> 55

сггсгттсс агсгтттт с

21

<210> 56

<211> 141

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/021

&lt;400&gt; 56

Thr Tyr Lys Ile Thr Val Arg Val Tyr Gln Thr Asn Pro Asp Ala Phe  
1 5 10 15

Phe His Pro Val Glu Lys Thr Val Trp Lys Tyr Ala Asn Gly Gly Thr  
20 25 30

Trp Thr Ile Thr Asp Asp Gln His Val Leu Thr Met Gly Gly Ser Gly  
35 40 45

Thr Ser Gly Thr Leu Arg Phe His Ala Asp Asn Gly Glu Ser Phe Thr  
50 55 60

Ala Thr Phe Gly Val His Asn Tyr Lys Arg Trp Cys Asp Ile Val Thr  
65 70 75 80

Asn Leu Ala Ala Asp Glu Thr Gly Met Val Ile Asn Gln Gln Tyr Tyr  
85 90 95

Ser Gln Lys Asn Arg Glu Glu Ala Lys Glu Arg Gln Leu Ser Asn Tyr  
100 105 110

Gln Val Lys Asn Ala Lys Gly Arg Asn Phe Gln Ile Val Tyr Thr Glu  
115 120 125

Ala Glu Gly Asn Asp Leu His Ala Asn Leu Ile Ile Gly  
130 135 140

&lt;210&gt; 57

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/021 Прямой праймер

&lt;400&gt; 57

гаагаагсга аагаасгсса г

21

&lt;210&gt; 58

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/021 Обратный праймер

&lt;400&gt; 58

ctggcggttct ttcgcttctt c

21

&lt;210&gt; 59

&lt;211&gt; 141

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность



&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/023

&lt;400&gt; 62

Thr Tyr Lys Ile Thr Val Arg Val Tyr Gln Thr Asn Pro Asp Ala Phe  
1 5 10 15

Phe His Pro Val Glu Lys Thr Val Trp Lys Tyr Ala Asn Gly Gly Thr  
20 25 30

Trp Thr Ile Thr Asp Asp Gln His Val Leu Thr Met Gly Gly Ser Gly  
35 40 45

Thr Ser Gly Thr Leu Arg Phe His Ala Asp Asn Gly Glu Ser Phe Thr  
50 55 60

Ala Thr Phe Gly Val His Asn Tyr Lys Arg Trp Cys Asp Ile Val Thr  
65 70 75 80

Asn Leu Ala Ala Asp Glu Thr Gly Met Val Ile Asn Gln Gln Tyr Tyr  
85 90 95

Ser Gln Lys Asn Met Glu Glu Ala Arg Glu Arg Gln Leu Ser Asn Tyr  
100 105 110

Gln Val Lys Asn Ala Lys Gly Arg Asn Phe Gln Ile Val Tyr Thr Glu  
115 120 125

Ala Glu Gly Asn Asp Leu His Ala Asn Leu Ile Ile Gly  
130 135 140

&lt;210&gt; 63

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/023 Прямой праймер

&lt;400&gt; 63

сагаааааса tgгаагаагс gc

22

&lt;210&gt; 64

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/023 Обратный праймер

&lt;400&gt; 64

gсgcttcttc catgtttttc tg

22

&lt;210&gt; 65

&lt;211&gt; 141

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность



<220>

<223> ULLB-0005/025

<400> 68

Thr Tyr Lys Ile Thr Val Arg Val Tyr Gln Thr Asn Pro Asp Ala Phe  
1 5 10 15

Phe His Pro Val Glu Lys Thr Val Trp Lys Tyr Ala Asn Gly Gly Thr  
20 25 30

Trp Thr Ile Thr Asp Asp Gln His Val Leu Thr Met Gly Gly Ser Gly  
35 40 45

Thr Ser Gly Thr Leu Arg Phe His Ala Asp Asn Gly Glu Ser Phe Thr  
50 55 60

Ala Thr Phe Gly Val His Asn Tyr Lys Arg Trp Cys Asp Ile Val Thr  
65 70 75 80

Asn Leu Ala Ala Asp Glu Thr Gly Met Val Ile Asn Gln Gln Tyr Tyr  
85 90 95

Ser Gln Lys Asn Lys Glu Glu Ala Arg Glu Arg Gln Leu Ser Asn Tyr  
100 105 110

Gln Val Lys Asn Ala Lys Gly Arg Asn Phe Gln Ile Val Tyr Thr Glu  
115 120 125

Ala Glu Gly Asn Asp Leu His Ala Asn Leu Ile Ile Gly  
130 135 140

<210> 69

<211> 22

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/025 Прямой праймер

<400> 69

сагаааааса аагаагаагс гс

22

<210> 70

<211> 22

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/025 Обратный праймер

<400> 70

гсгсгггггггг тггггггггггг тг

22

<210> 71

<211> 141

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/026

<400> 71

Thr Tyr Lys Ile Thr Val Arg Val Tyr Gln Thr Asn Pro Asp Ala Phe  
1 5 10 15

Phe His Pro Val Glu Lys Thr Val Trp Lys Trp Ala Asn Gly Gly Thr  
20 25 30

Trp Thr Ile Thr Asp Asp Gln His Val Leu Thr Met Gly Gly Ser Gly  
35 40 45

Thr Ser Gly Thr Leu Arg Phe His Ala Asp Asn Gly Glu Ser Phe Thr  
50 55 60

Ala Thr Phe Gly Val His Asn Tyr Lys Arg Trp Cys Asp Ile Val Thr  
65 70 75 80

Asn Leu Ala Ala Asp Glu Thr Gly Met Val Ile Asn Gln Gln Tyr Tyr  
85 90 95

Ser Gln Lys Asn Arg Glu Glu Ala Arg Glu Arg Gln Leu Ser Asn Tyr  
100 105 110

Gln Val Lys Asn Ala Lys Gly Arg Asn Phe Gln Ile Val Tyr Thr Glu  
115 120 125

Ala Glu Gly Asn Asp Leu His Ala Asn Leu Ile Ile Gly  
130 135 140

<210> 72

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/026 Прямой праймер

<400> 72

gtgtggaat gggcgaatgg c

21

<210> 73

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/026 Обратный праймер

<400> 73

gccattcgcc catttccaca c

21

<210> 74

<211> 141

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/027

<400> 74

Thr Tyr Lys Ile Thr Val Arg Val Tyr Gln Thr Asn Pro Asp Ala Phe  
1 5 10 15

Phe His Pro Val Glu Lys Thr Val Trp Lys Phe Ala Asn Gly Gly Thr  
20 25 30

Trp Thr Ile Thr Asp Asp Gln His Val Leu Thr Met Gly Gly Ser Gly  
35 40 45

Thr Ser Gly Thr Leu Arg Phe His Ala Asp Asn Gly Glu Ser Phe Thr  
50 55 60

Ala Thr Phe Gly Val His Asn Tyr Lys Arg Trp Cys Asp Ile Val Thr  
65 70 75 80

Asn Leu Ala Ala Asp Glu Thr Gly Met Val Ile Asn Gln Gln Tyr Tyr  
85 90 95

Ser Gln Lys Asn Arg Glu Glu Ala Arg Glu Arg Gln Leu Ser Asn Tyr  
100 105 110

Gln Val Lys Asn Ala Lys Gly Arg Asn Phe Gln Ile Val Tyr Thr Glu  
115 120 125

Ala Glu Gly Asn Asp Leu His Ala Asn Leu Ile Ile Gly  
130 135 140

<210> 75

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/027 Прямой праймер

<400> 75

gtgtggaat ttgcgaatgg c

21

<210> 76

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/027 Обратный праймер

<400> 76

gccattcgca aatttccaca c

21

<210> 77

<211> 141

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/028

<400> 77

Thr Tyr Lys Ile Thr Val Arg Val Tyr Gln Thr Asn Pro Asp Ala Phe  
1 5 10 15

Phe His Pro Val Glu Lys Thr Val Trp Lys Glu Ala Asn Gly Gly Thr  
20 25 30

Trp Thr Ile Thr Asp Asp Gln His Val Leu Thr Met Gly Gly Ser Gly  
35 40 45

Thr Ser Gly Thr Leu Arg Phe His Ala Asp Asn Gly Glu Ser Phe Thr  
50 55 60

Ala Thr Phe Gly Val His Asn Tyr Lys Arg Trp Cys Asp Ile Val Thr  
65 70 75 80

Asn Leu Ala Ala Asp Glu Thr Gly Met Val Ile Asn Gln Gln Tyr Tyr  
85 90 95

Ser Gln Lys Asn Arg Glu Glu Ala Arg Glu Arg Gln Leu Ser Asn Tyr  
100 105 110

Gln Val Lys Asn Ala Lys Gly Arg Asn Phe Gln Ile Val Tyr Thr Glu  
115 120 125

Ala Glu Gly Asn Asp Leu His Ala Asn Leu Ile Ile Gly  
130 135 140

<210> 78

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/028 Прямой праймер

<400> 78

gtgtggaag aagcgaatgg c

21

<210> 79

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/028 Обратный праймер

<400> 79

gccattcgct tctttccaca c

21

<210> 80

<211> 141

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/029

<400> 80

Thr Tyr Lys Ile Thr Val Arg Val Tyr Gln Thr Asn Pro Asp Ala Phe  
1 5 10 15

Phe His Pro Val Glu Lys Thr Val Trp Lys His Ala Asn Gly Gly Thr  
20 25 30

Trp Thr Ile Thr Asp Asp Gln His Val Leu Thr Met Gly Gly Ser Gly  
35 40 45

Thr Ser Gly Thr Leu Arg Phe His Ala Asp Asn Gly Glu Ser Phe Thr  
50 55 60

Ala Thr Phe Gly Val His Asn Tyr Lys Arg Trp Cys Asp Ile Val Thr  
65 70 75 80

Asn Leu Ala Ala Asp Glu Thr Gly Met Val Ile Asn Gln Gln Tyr Tyr  
85 90 95

Ser Gln Lys Asn Arg Glu Glu Ala Arg Glu Arg Gln Leu Ser Asn Tyr  
100 105 110

Gln Val Lys Asn Ala Lys Gly Arg Asn Phe Gln Ile Val Tyr Thr Glu  
115 120 125

Ala Glu Gly Asn Asp Leu His Ala Asn Leu Ile Ile Gly  
130 135 140

<210> 81

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/029 Прямой праймер

<400> 81

gtgtggaaac atgcgaatgg c

21

<210> 82

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/029 Обратный праймер

<400> 82

gccattcgca tgtttccaca c

21

<210> 83

<211> 141

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/030

&lt;400&gt; 83

Thr Tyr Lys Ile Thr Val Arg Val Tyr Gln Thr Asn Pro Asp Ala Phe  
 1 5 10 15

Phe His Pro Val Glu Lys Thr Val Trp Lys Tyr Ser Asn Gly Gly Thr  
 20 25 30

Trp Thr Ile Thr Asp Asp Gln His Val Leu Thr Met Gly Gly Ser Gly  
 35 40 45

Thr Ser Gly Thr Leu Arg Phe His Ala Asp Asn Gly Glu Ser Phe Thr  
 50 55 60

Ala Thr Phe Gly Val His Asn Tyr Lys Arg Trp Cys Asp Ile Val Thr  
 65 70 75 80

Asn Leu Ala Ala Asp Glu Thr Gly Met Val Ile Asn Gln Gln Tyr Tyr  
 85 90 95

Ser Gln Lys Asn Arg Glu Glu Ala Arg Glu Arg Gln Leu Ser Asn Tyr  
 100 105 110

Gln Val Lys Asn Ala Lys Gly Arg Asn Phe Gln Ile Val Tyr Thr Glu  
 115 120 125

Ala Glu Gly Asn Asp Leu His Ala Asn Leu Ile Ile Gly  
 130 135 140

&lt;210&gt; 84

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/030 Прямой праймер

&lt;400&gt; 84

ggaaatatag caatggcgggt acc

23

&lt;210&gt; 85

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/030 Обратный праймер

&lt;400&gt; 85

ggtaccgcса ttgctatatt tcc

23

&lt;210&gt; 86

&lt;211&gt; 141

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/031

<400> 86

Thr Tyr Lys Ile Thr Val Arg Val Tyr Gln Thr Asn Pro Asp Ala Phe  
1 5 10 15

Phe His Pro Val Glu Lys Thr Val Trp Lys Tyr Gly Asn Gly Gly Thr  
20 25 30

Trp Thr Ile Thr Asp Asp Gln His Val Leu Thr Met Gly Gly Ser Gly  
35 40 45

Thr Ser Gly Thr Leu Arg Phe His Ala Asp Asn Gly Glu Ser Phe Thr  
50 55 60

Ala Thr Phe Gly Val His Asn Tyr Lys Arg Trp Cys Asp Ile Val Thr  
65 70 75 80

Asn Leu Ala Ala Asp Glu Thr Gly Met Val Ile Asn Gln Gln Tyr Tyr  
85 90 95

Ser Gln Lys Asn Arg Glu Glu Ala Arg Glu Arg Gln Leu Ser Asn Tyr  
100 105 110

Gln Val Lys Asn Ala Lys Gly Arg Asn Phe Gln Ile Val Tyr Thr Glu  
115 120 125

Ala Glu Gly Asn Asp Leu His Ala Asn Leu Ile Ile Gly  
130 135 140

<210> 87

<211> 23

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/031 Прямой праймер

<400> 87

ggaaatatgg caatggcgggt acc

23

<210> 88

<211> 23

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/031 Обратный праймер

<400> 88

ggtaccgcса ttgсcatatt tcc

23

<210> 89

<211> 141

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/032

&lt;400&gt; 89

Thr Tyr Lys Ile Thr Val Arg Val Tyr Gln Thr Asn Pro Asp Ala Phe  
1 5 10 15

Phe His Pro Val Glu Lys Thr Val Trp Lys Tyr Asp Asn Gly Gly Thr  
20 25 30

Trp Thr Ile Thr Asp Asp Gln His Val Leu Thr Met Gly Gly Ser Gly  
35 40 45

Thr Ser Gly Thr Leu Arg Phe His Ala Asp Asn Gly Glu Ser Phe Thr  
50 55 60

Ala Thr Phe Gly Val His Asn Tyr Lys Arg Trp Cys Asp Ile Val Thr  
65 70 75 80

Asn Leu Ala Ala Asp Glu Thr Gly Met Val Ile Asn Gln Gln Tyr Tyr  
85 90 95

Ser Gln Lys Asn Arg Glu Glu Ala Arg Glu Arg Gln Leu Ser Asn Tyr  
100 105 110

Gln Val Lys Asn Ala Lys Gly Arg Asn Phe Gln Ile Val Tyr Thr Glu  
115 120 125

Ala Glu Gly Asn Asp Leu His Ala Asn Leu Ile Ile Gly  
130 135 140

&lt;210&gt; 90

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/032 Прямой праймер

&lt;400&gt; 90

ggaaatatga taatggcggt acc

23

&lt;210&gt; 91

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/032 Обратный праймер

&lt;400&gt; 91

ggtaccgcса ttatcatatt tcc

23

&lt;210&gt; 92

&lt;211&gt; 141

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/033

<400> 92

Thr Tyr Lys Ile Thr Val Arg Val Tyr Gln Thr Asn Pro Asp Ala Phe  
1 5 10 15

Phe His Pro Val Glu Lys Thr Val Trp Lys Tyr His Asn Gly Gly Thr  
20 25 30

Trp Thr Ile Thr Asp Asp Gln His Val Leu Thr Met Gly Gly Ser Gly  
35 40 45

Thr Ser Gly Thr Leu Arg Phe His Ala Asp Asn Gly Glu Ser Phe Thr  
50 55 60

Ala Thr Phe Gly Val His Asn Tyr Lys Arg Trp Cys Asp Ile Val Thr  
65 70 75 80

Asn Leu Ala Ala Asp Glu Thr Gly Met Val Ile Asn Gln Gln Tyr Tyr  
85 90 95

Ser Gln Lys Asn Arg Glu Glu Ala Arg Glu Arg Gln Leu Ser Asn Tyr  
100 105 110

Gln Val Lys Asn Ala Lys Gly Arg Asn Phe Gln Ile Val Tyr Thr Glu  
115 120 125

Ala Glu Gly Asn Asp Leu His Ala Asn Leu Ile Ile Gly  
130 135 140

<210> 93

<211> 23

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/033 Прямой праймер

<400> 93

ggaaatatca taatggcgggt acc

23

<210> 94

<211> 23

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/033 Обратный праймер

<400> 94

ggtaccgcса ttatgatatt tcc

23

<210> 95

<211> 141

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/034

<400> 95

Thr Tyr Lys Ile Thr Val Arg Val Tyr Gln Thr Asn Pro Asp Ala Phe  
1 5 10 15

Phe His Pro Val Glu Lys Thr Val Trp Lys Tyr Ala Asn Gly Gly Thr  
20 25 30

Trp Thr Ile Thr Asp Asp Gln His Val Leu Thr Met Gly Gly Ser Gly  
35 40 45

Thr Ser Gly Thr Leu Arg Phe His Ala Asp Asn Gly Glu Ser Phe Thr  
50 55 60

Ala Thr Phe Gly Val His Asn Tyr Lys Arg Trp Cys Asp Ile Val Thr  
65 70 75 80

Asn Leu Ala Ala Asp Glu Thr Gly Met Val Ile Asn Gln Gln Tyr Tyr  
85 90 95

Ser Gln Lys Asn Arg Glu Glu Ala Ala Glu Arg Gln Leu Ser Asn Tyr  
100 105 110

Gln Val Lys Asn Ala Lys Gly Arg Asn Phe Gln Ile Val Tyr Thr Glu  
115 120 125

Ala Glu Gly Asn Asp Leu His Ala Asn Leu Ile Ile Gly  
130 135 140

<210> 96

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/034 Прямой праймер

<400> 96

гаагаагсгг сггаасгсса г

21

<210> 97

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/034 Обратный праймер

<400> 97

сгггсгттсс gccgcttctt с

21

<210> 98

<211> 141

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/035

<400> 98

Thr Tyr Lys Ile Thr Val Arg Val Tyr Gln Thr Asn Pro Asp Ala Phe  
1 5 10 15

Phe His Pro Val Glu Lys Thr Val Trp Lys Tyr Ala Asn Gly Gly Thr  
20 25 30

Trp Thr Ile Thr Asp Asp Gln His Val Leu Thr Met Gly Gly Ser Gly  
35 40 45

Thr Ser Gly Thr Leu Arg Phe His Ala Asp Asn Gly Glu Ser Phe Thr  
50 55 60

Ala Thr Phe Gly Val His Asn Tyr Lys Arg Trp Cys Asp Ile Val Thr  
65 70 75 80

Asn Leu Ala Ala Asp Glu Thr Gly Met Val Ile Asn Gln Gln Tyr Tyr  
85 90 95

Ser Gln Lys Asn Arg Glu Glu Ala Ser Glu Arg Gln Leu Ser Asn Tyr  
100 105 110

Gln Val Lys Asn Ala Lys Gly Arg Asn Phe Gln Ile Val Tyr Thr Glu  
115 120 125

Ala Glu Gly Asn Asp Leu His Ala Asn Leu Ile Ile Gly  
130 135 140

<210> 99

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/035 Прямой праймер

<400> 99

гаагаагсга гсгаасгсса г

21

<210> 100

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/035 Обратный праймер

<400> 100

ctggcggttcg ctcgcttctt c

21

<210> 101

<211> 141

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/036

<400> 101

Thr Tyr Lys Ile Thr Val Arg Val Tyr Gln Thr Asn Pro Asp Ala Phe  
1 5 10 15

Phe His Pro Val Glu Lys Thr Val Trp Lys Tyr Ala Asn Gly Gly Thr  
20 25 30

Trp Thr Ile Thr Asp Asp Gln His Val Leu Thr Met Gly Gly Ser Gly  
35 40 45

Thr Ser Gly Thr Leu Arg Phe His Ala Asp Asn Gly Glu Ser Phe Thr  
50 55 60

Ala Thr Phe Gly Val His Asn Tyr Lys Arg Trp Cys Asp Ile Val Thr  
65 70 75 80

Asn Leu Ala Ala Asp Glu Thr Gly Met Val Ile Asn Gln Gln Tyr Tyr  
85 90 95

Ser Gln Lys Asn Arg Glu Glu Ala Val Glu Arg Gln Leu Ser Asn Tyr  
100 105 110

Gln Val Lys Asn Ala Lys Gly Arg Asn Phe Gln Ile Val Tyr Thr Glu  
115 120 125

Ala Glu Gly Asn Asp Leu His Ala Asn Leu Ile Ile Gly  
130 135 140

<210> 102

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/036 Прямой праймер

<400> 102

гаагаагсгг тггаасгсса г

21

<210> 103

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/036 Обратный праймер

<400> 103

сггсггттсс асггтттт с

21

<210> 104

<211> 141

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/037

&lt;400&gt; 104

Thr Tyr Lys Ile Thr Val Arg Val Tyr Gln Thr Asn Pro Asp Ala Phe  
 1 5 10 15

Phe His Pro Val Glu Lys Thr Val Trp Lys Tyr Ala Asn Gly Gly Thr  
 20 25 30

Trp Thr Ile Thr Asp Asp Gln His Val Leu Thr Met Gly Gly Ser Gly  
 35 40 45

Thr Ser Gly Thr Leu Arg Phe His Ala Asp Asn Gly Glu Ser Phe Thr  
 50 55 60

Ala Thr Phe Gly Val His Asn Tyr Lys Arg Trp Cys Asp Ile Val Thr  
 65 70 75 80

Asn Leu Ala Ala Asp Glu Thr Gly Met Val Ile Asn Gln Gln Tyr Tyr  
 85 90 95

Ser Gln Lys Asn Arg Glu Glu Ala Ile Glu Arg Gln Leu Ser Asn Tyr  
 100 105 110

Gln Val Lys Asn Ala Lys Gly Arg Asn Phe Gln Ile Val Tyr Thr Glu  
 115 120 125

Ala Glu Gly Asn Asp Leu His Ala Asn Leu Ile Ile Gly  
 130 135 140

&lt;210&gt; 105

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/037 Прямой праймер

&lt;400&gt; 105

гаагаагсга ttгаасгсса г

21

&lt;210&gt; 106

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/037 Обратный праймер

&lt;400&gt; 106

ctggcggttca atcgcttctt c

21

&lt;210&gt; 107

&lt;211&gt; 141

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/038

<400> 107

Thr Tyr Lys Ile Thr Val Arg Val Tyr Gln Thr Asn Pro Asp Ala Phe  
1 5 10 15

Phe His Pro Val Glu Lys Thr Val Trp Lys Tyr Ala Asn Gly Gly Thr  
20 25 30

Trp Thr Ile Thr Asp Asp Gln His Val Leu Thr Met Gly Gly Ser Gly  
35 40 45

Thr Ser Gly Thr Leu Arg Phe His Ala Asp Asn Gly Glu Ser Phe Thr  
50 55 60

Ala Thr Phe Gly Val His Asn Tyr Lys Arg Trp Cys Asp Ile Val Thr  
65 70 75 80

Asn Leu Ala Ala Asp Glu Thr Gly Met Val Ile Asn Gln Gln Tyr Tyr  
85 90 95

Ser Gln Lys Asn Arg Glu Glu Ala Pro Glu Arg Gln Leu Ser Asn Tyr  
100 105 110

Gln Val Lys Asn Ala Lys Gly Arg Asn Phe Gln Ile Val Tyr Thr Glu  
115 120 125

Ala Glu Gly Asn Asp Leu His Ala Asn Leu Ile Ile Gly  
130 135 140

<210> 108

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/038 Прямой праймер

<400> 108

гаагаагсгс сггаасгсса г

21

<210> 109

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/038 Обратный праймер

<400> 109

сггсггтсгс гсгсггтсгг с

21

<210> 110

<211> 141

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/039

<400> 110

Thr Tyr Lys Ile Thr Val Arg Val Tyr Gln Thr Asn Pro Asp Ala Phe  
1 5 10 15

Phe His Pro Val Glu Lys Thr Val Trp Lys Tyr Ala Asn Gly Gly Thr  
20 25 30

Trp Thr Ile Thr Asp Asp Gln His Val Leu Thr Met Gly Gly Ser Gly  
35 40 45

Thr Ser Gly Thr Leu Arg Phe His Ala Asp Asn Gly Glu Ser Phe Thr  
50 55 60

Ala Thr Phe Gly Val His Asn Tyr Lys Arg Trp Cys Asp Ile Val Thr  
65 70 75 80

Asn Leu Ala Ala Asp Glu Thr Gly Met Val Ile Asn Gln Gln Tyr Tyr  
85 90 95

Ser Gln Lys Asn Arg Glu Glu Ala Met Glu Arg Gln Leu Ser Asn Tyr  
100 105 110

Gln Val Lys Asn Ala Lys Gly Arg Asn Phe Gln Ile Val Tyr Thr Glu  
115 120 125

Ala Glu Gly Asn Asp Leu His Ala Asn Leu Ile Ile Gly  
130 135 140

<210> 111

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/039 Прямой праймер

<400> 111

гаагаагсга тггаасгсса г

21

<210> 112

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/039 Обратный праймер

<400> 112

ctggcggttcc atcgcttctt c

21

<210> 113

<211> 141

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/040

<400> 113

Thr Tyr Lys Ile Thr Val Arg Val Tyr Gln Thr Asn Pro Asp Ala Phe  
1 5 10 15

Phe His Pro Val Glu Lys Thr Val Trp Lys Tyr Ala Asn Gly Gly Thr  
20 25 30

Trp Thr Ile Thr Asp Asp Gln His Val Leu Thr Met Gly Gly Ser Gly  
35 40 45

Thr Ser Gly Thr Leu Arg Phe His Ala Asp Asn Gly Glu Ser Phe Thr  
50 55 60

Ala Thr Phe Gly Val His Asn Tyr Lys Arg Trp Cys Asp Ile Val Thr  
65 70 75 80

Asn Leu Ala Ala Asp Glu Thr Gly Met Val Ile Asn Gln Gln Tyr Tyr  
85 90 95

Ser Gln Lys Asn Arg Glu Glu Ala Gly Glu Arg Gln Leu Ser Asn Tyr  
100 105 110

Gln Val Lys Asn Ala Lys Gly Arg Asn Phe Gln Ile Val Tyr Thr Glu  
115 120 125

Ala Glu Gly Asn Asp Leu His Ala Asn Leu Ile Ile Gly  
130 135 140

<210> 114

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/040 Прямой праймер

<400> 114

гаагаагсгг гсгаасгсса г

21

<210> 115

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/040 Обратный праймер

<400> 115

ctggcgttcg cccgcttctt c

21

<210> 116

<211> 141

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/041

<400> 116

Thr Tyr Lys Ile Thr Val Arg Val Tyr Gln Thr Asn Pro Asp Ala Phe  
1 5 10 15

Phe His Pro Val Glu Lys Thr Val Trp Lys Tyr Ala Asn Gly Gly Thr  
20 25 30

Trp Thr Ile Thr Asp Asp Gln His Val Leu Thr Met Gly Gly Ser Gly  
35 40 45

Thr Ser Gly Thr Leu Arg Phe His Ala Asp Asn Gly Glu Ser Phe Thr  
50 55 60

Ala Thr Phe Gly Val His Asn Tyr Lys Arg Trp Cys Asp Ile Val Thr  
65 70 75 80

Asn Leu Ala Ala Asp Glu Thr Gly Met Val Ile Asn Gln Gln Tyr Tyr  
85 90 95

Ser Gln Lys Asn Arg Glu Glu Ala Thr Glu Arg Gln Leu Ser Asn Tyr  
100 105 110

Gln Val Lys Asn Ala Lys Gly Arg Asn Phe Gln Ile Val Tyr Thr Glu  
115 120 125

Ala Glu Gly Asn Asp Leu His Ala Asn Leu Ile Ile Gly  
130 135 140

<210> 117

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/041 Прямой праймер

<400> 117

гаагаагсга ссгаасгсса г

21

<210> 118

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/041 Обратный праймер

<400> 118

ctggcgttcg gtcgcttctt c

21

<210> 119

<211> 141

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/042

&lt;400&gt; 119

Thr Tyr Lys Ile Thr Val Arg Val Tyr Gln Thr Asn Pro Asp Ala Phe  
 1 5 10 15

Phe His Pro Val Glu Lys Thr Val Trp Lys Tyr Ala Asn Gly Gly Thr  
 20 25 30

Trp Thr Ile Thr Asp Asp Gln His Val Leu Thr Met Gly Gly Ser Gly  
 35 40 45

Thr Ser Gly Thr Leu Arg Phe His Ala Asp Asn Gly Glu Ser Phe Thr  
 50 55 60

Ala Thr Phe Gly Val His Asn Tyr Lys Arg Trp Cys Asp Ile Val Thr  
 65 70 75 80

Asn Leu Ala Ala Asp Glu Thr Gly Met Val Ile Asn Gln Gln Tyr Tyr  
 85 90 95

Ser Gln Lys Asn Arg Glu Glu Ala Tyr Glu Arg Gln Leu Ser Asn Tyr  
 100 105 110

Gln Val Lys Asn Ala Lys Gly Arg Asn Phe Gln Ile Val Tyr Thr Glu  
 115 120 125

Ala Glu Gly Asn Asp Leu His Ala Asn Leu Ile Ile Gly  
 130 135 140

&lt;210&gt; 120

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/042 Прямой праймер

&lt;400&gt; 120

gaagaagcgt atgaacgcca g

21

&lt;210&gt; 121

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/042 Обратный праймер

&lt;400&gt; 121

ctggcggttca tacgcttctt c

21

&lt;210&gt; 122

&lt;211&gt; 141

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/043

<400> 122

Thr Tyr Lys Ile Thr Val Arg Val Tyr Gln Thr Asn Pro Asp Ala Phe  
1 5 10 15

Phe His Pro Val Glu Lys Thr Val Trp Lys Tyr Ala Asn Gly Gly Thr  
20 25 30

Trp Thr Ile Thr Asp Asp Gln His Val Leu Thr Met Gly Gly Ser Gly  
35 40 45

Thr Ser Gly Thr Leu Arg Phe His Ala Asp Asn Gly Glu Ser Phe Thr  
50 55 60

Ala Thr Phe Gly Val His Asn Tyr Lys Arg Trp Cys Asp Ile Val Thr  
65 70 75 80

Asn Leu Ala Ala Asp Glu Thr Gly Met Val Ile Asn Gln Gln Tyr Tyr  
85 90 95

Ser Gln Lys Asn Arg Glu Glu Ala Trp Glu Arg Gln Leu Ser Asn Tyr  
100 105 110

Gln Val Lys Asn Ala Lys Gly Arg Asn Phe Gln Ile Val Tyr Thr Glu  
115 120 125

Ala Glu Gly Asn Asp Leu His Ala Asn Leu Ile Ile Gly  
130 135 140

<210> 123

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/043 Прямой праймер

<400> 123

гаагаагсгт ггааасгсса г

21

<210> 124

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/043 Обратный праймер

<400> 124

сггсгттсс сасгтттт с

21

<210> 125

<211> 141

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/044

&lt;400&gt; 125

Thr Tyr Lys Ile Thr Val Arg Val Tyr Gln Thr Asn Pro Asp Ala Phe  
1 5 10 15

Phe His Pro Val Glu Lys Thr Val Trp Lys Tyr Ala Asn Gly Gly Thr  
20 25 30

Trp Thr Ile Thr Asp Asp Gln His Val Leu Thr Met Gly Gly Ser Gly  
35 40 45

Thr Ser Gly Thr Leu Arg Phe His Ala Asp Asn Gly Glu Ser Phe Thr  
50 55 60

Ala Thr Phe Gly Val His Asn Tyr Lys Arg Trp Cys Asp Ile Val Thr  
65 70 75 80

Asn Leu Ala Ala Asp Glu Thr Gly Met Val Ile Asn Gln Gln Tyr Tyr  
85 90 95

Ser Gln Lys Asn Arg Glu Glu Ala Asn Glu Arg Gln Leu Ser Asn Tyr  
100 105 110

Gln Val Lys Asn Ala Lys Gly Arg Asn Phe Gln Ile Val Tyr Thr Glu  
115 120 125

Ala Glu Gly Asn Asp Leu His Ala Asn Leu Ile Ile Gly  
130 135 140

&lt;210&gt; 126

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/044 Прямой праймер

&lt;400&gt; 126

гаагаагсга асгаасгсса г

21

&lt;210&gt; 127

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/044 Обратный праймер

&lt;400&gt; 127

ctggcgttcg ttcgcttctt c

21

&lt;210&gt; 128

&lt;211&gt; 141

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/045

<400> 128

Thr Tyr Lys Ile Thr Val Arg Val Tyr Gln Thr Asn Pro Asp Ala Phe  
1 5 10 15

Phe His Pro Val Glu Lys Thr Val Trp Lys Tyr Ala Asn Gly Gly Thr  
20 25 30

Trp Thr Ile Thr Asp Asp Gln His Val Leu Thr Met Gly Gly Ser Gly  
35 40 45

Thr Ser Gly Thr Leu Arg Phe His Ala Asp Asn Gly Glu Ser Phe Thr  
50 55 60

Ala Thr Phe Gly Val His Asn Tyr Lys Arg Trp Cys Asp Ile Val Thr  
65 70 75 80

Asn Leu Ala Ala Asp Glu Thr Gly Met Val Ile Asn Gln Gln Tyr Tyr  
85 90 95

Ser Gln Lys Asn Arg Glu Glu Ala Cys Glu Arg Gln Leu Ser Asn Tyr  
100 105 110

Gln Val Lys Asn Ala Lys Gly Arg Asn Phe Gln Ile Val Tyr Thr Glu  
115 120 125

Ala Glu Gly Asn Asp Leu His Ala Asn Leu Ile Ile Gly  
130 135 140

<210> 129

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/045 Прямой праймер

<400> 129

гаагаагсгт гсгаасгсса г

21

<210> 130

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/045 Обратный праймер

<400> 130

ctggcgttcg cacgcttctt c

21

<210> 131

<211> 141

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/046

<400> 131

Thr Tyr Lys Ile Thr Val Arg Val Tyr Gln Thr Asn Pro Asp Ala Phe  
1 5 10 15

Phe His Pro Val Glu Lys Thr Val Trp Lys Tyr Ala Asn Gly Gly Thr  
20 25 30

Trp Thr Ile Thr Asp Asp Gln His Val Leu Thr Met Gly Gly Ser Gly  
35 40 45

Thr Ser Gly Thr Leu Arg Phe His Ala Asp Asn Gly Glu Ser Phe Thr  
50 55 60

Ala Thr Phe Gly Val His Asn Tyr Lys Arg Trp Cys Asp Ile Val Thr  
65 70 75 80

Asn Leu Ala Ala Asp Glu Thr Gly Met Val Ile Asn Gln Gln Tyr Tyr  
85 90 95

Ser Gln Lys Asn Arg Glu Glu Ala Asp Glu Arg Gln Leu Ser Asn Tyr  
100 105 110

Gln Val Lys Asn Ala Lys Gly Arg Asn Phe Gln Ile Val Tyr Thr Glu  
115 120 125

Ala Glu Gly Asn Asp Leu His Ala Asn Leu Ile Ile Gly  
130 135 140

<210> 132

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/046 Прямой праймер

<400> 132

гаагаагсгг атгаасгсса г

21

<210> 133

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ULLB-0005/046 Обратный праймер

<400> 133

сггсггтсга тсггтттт с

21

<210> 134

<211> 141

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/047

&lt;400&gt; 134

Thr Tyr Lys Ile Thr Val Arg Val Tyr Gln Thr Asn Pro Asp Ala Phe  
 1 5 10 15

Phe His Pro Val Glu Lys Thr Val Trp Lys Tyr Ala Asn Gly Gly Thr  
 20 25 30

Trp Thr Ile Thr Asp Asp Gln His Val Leu Thr Met Gly Gly Ser Gly  
 35 40 45

Thr Ser Gly Thr Leu Arg Phe His Ala Asp Asn Gly Glu Ser Phe Thr  
 50 55 60

Ala Thr Phe Gly Val His Asn Tyr Lys Arg Trp Cys Asp Ile Val Thr  
 65 70 75 80

Asn Leu Ala Ala Asp Glu Thr Gly Met Val Ile Asn Gln Gln Tyr Tyr  
 85 90 95

Ser Gln Lys Asn Arg Glu Glu Ala His Glu Arg Gln Leu Ser Asn Tyr  
 100 105 110

Gln Val Lys Asn Ala Lys Gly Arg Asn Phe Gln Ile Val Tyr Thr Glu  
 115 120 125

Ala Glu Gly Asn Asp Leu His Ala Asn Leu Ile Ile Gly  
 130 135 140

&lt;210&gt; 135

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/047 Прямой праймер

&lt;400&gt; 135

gaagaagcgc atgaacgcca g

21

&lt;210&gt; 136

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ULLB-0005/047 Обратный праймер

&lt;400&gt; 136

ctggcgttca tgcgttctt c

21

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Модифицированный белок лектина, где указанный модифицированный белок лектина содержит последовательность аминокислот, выбранную из любой из следующих: SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 41; SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 59; SEQ ID NO: 62; SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 119 и SEQ ID NO: 134.

2. Модифицированный белок лектина по п.1 для лечения рака.

3. Модифицированный белок лектина по п.1 для выявления раковой клетки, диагностики и/или лечения рака.

4. Фармацевтическая композиция, содержащая модифицированный белок лектина по п.1 и фармацевтически приемлемый разбавитель или вспомогательное вещество и, необязательно, дополнительный терапевтический ингредиент.

5. Фармацевтическая композиция по п.4 для лечения рака.

6. Фармацевтическая композиция по п.4 для выявления раковой клетки, диагностики и/или лечения рака.

7. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность нуклеотидов, которая кодирует модифицированный белок лектина по п.1.

8. Рекombинантный вектор, содержащий вставку молекулы нуклеиновой кислоты по п.7.

9. Рекombинантный вектор по п.8, содержащий функционально связанные в направлении от 5' к 3': промотор, который функционирует в клетке-хозяине; последовательность нуклеотидов по п.7, кодирующую модифицированный белок лектина; и сигнал терминации.

10. Рекombинантный вектор по п.8 или 9, где указанный рекombинантный вектор способен реплицироваться, транскрибироваться, транслироваться и/или экспрессироваться в одноклеточном организме.

11. Трансформированная клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п.7 или рекombинантный вектор по любому из пп.8-10.

12. Трансформированная клетка-хозяин по п.11, где указанная клетка-хозяин представляет собой бактерию *Escherichia coli* или дрожжевую клетку.

13. Способ получения рекombинантного белка лектина *Sclerotium rolfsii*, включающий:

i) культивирование клетки-хозяина, содержащей рекombинантный вектор по любому из пп.8-10, который кодирует рекombинантный белок лектина;

ii) экспрессию рекombинантного белка лектина; и

iii) выделение неочищенного рекombинантного белка лектина из культуры.

