

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201900054** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.04.30

(22) Дата подачи заявки
2018.10.05

(51) Int. Cl. **C07K 14/005** (2006.01)
C07K 14/15 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)
C12N 15/48 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

(54) ГЛИКОПРОТЕИН GP51 ВИРУСА ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА, ТРАНЗИЕНТНО ПРОДУЦИРОВАННЫЙ В РАСТЕНИЯХ N.BENTHAMIANA С ПОМОЩЬЮ ВИРУСНОГО ВЕКТОРА, СОЗДАННОГО НА ОСНОВЕ ГЕНОМА ВККТ

(96) KZ2018/055 (KZ) 2018.10.05
(71) Заявитель:
**РЕСПУБЛИКАНСКОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
ПРЕДПРИЯТИЕ НА ПРАВЕ
ХОЗЯЙСТВЕННОГО ВЕДЕНИЯ
"НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР
БИОТЕХНОЛОГИИ" КОМИТЕТА
НАУКИ МИНИСТЕРСТВА
ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН (KZ)**

(72) Изобретатель:
**Манабаева Шуга Аскарровна, Жумабек
Айганым Турсынкызы, Раманкулов
Ерлан Мирхайдарович (KZ)**

(57) Изобретение относится к области молекулярной биотехнологии, в частности к способам генетической инженерии, и может быть использовано в ветеринарии для изготовления диагностических наборов, использующих взаимодействие антиген-антитело. Технической задачей изобретения является разработка технологии быстрого получения рекомбинантного антигена gp51 в растениях с помощью вирусного вектора, созданного на основе генома вируса кустистой карликовости томатов (ВККТ). При решении технической задачи синтезирован кодон-оптимизированный антиген, кодирующий gp51 ВЛКРС, для экспрессии в клетках растений N.benthamiana длиной 852 пары нуклеотидов. Разработана система транзientной экспрессии антигена gp51 ВЛКРС в растениях in planta с помощью Agrobacterium - опосредованной транзientной трансформации растений N.benthamiana. Белковая фракция растительных экстрактов изучена методом электрофоретического разделения белков в ПААГ, и экспрессия белков подтверждена с помощью вестерн-блот анализа с использованием специфических моноклональных антител к гистидину. Отработаны методы очистки и выделения рекомбинантного антигена gp51 и изучены иммунологические и иммунохимические характеристики рекомбинантного антигена gp51 ВЛКРС с помощью сывороток больных и здоровых животных, экспрессированного в растениях. Достижение технического результата позволяет продуцировать рекомбинантный антиген gp51 в растениях за короткий срок.

A1

201900054

201900054

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

«ГЛИКОПРОТЕИН GP51 ВИРУСА ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ТРАНЗИЕНТНО ПРОДУЦИРОВАННЫЙ В РАСТЕНИЯХ N.BENTAMIANA С ПОМОЩЬЮ ВИРУСНОГО ВЕКТОРА СОЗДАННОГО НА ОСНОВЕ ГЕНОМА ВККТ»

Изобретение относится к области молекулярной биотехнологии, в частности к способам генетической инженерии, также может быть использовано в ветеринарии для изготовления диагностических наборов, использующих взаимодействие антиген-антитело.

Важным аспектом предотвращения распространения лейкоза крупного рогатого скота является серологическая диагностика болезни. Основными диагностическими методами в программах по профилактике и ликвидации болезни считаются реакция иммунодиффузионной приципитации и иммуноферментный анализ.

Однако известно, что тест-системы, основанные на использовании нативных белков вируса лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС), имеют низкую специфичность и часто дают перекрестную реакцию с антителами к близкородственным вирусам. Основная причина такой низкой специфичности заключается в зараженности линии культур клеток различными вирусами.

Для получения рекомбинантного антигена gp51 ВЛКРС были разработаны системы экспрессии на основе *Escherichia coli* (Siakkou, H., R. Ulrich, A. Uelze, Mohring R., Rosenthal S. Immunological characterization of

BLV proteins synthesized in *E.coli* // Acta virologica. – 1990. – Vol. 34. –P.256–262, Мукантаев К.Н., Шустов А.В., Сыдыкнаби Ы., Байдосова Ш., Муканов К.К. Диагностические свойства синтезированного в *E.coli* рекомбинантного антигена gp51 вируса лейкоза крупного рогатого скота // Биотехнология. Теория и практика. – 2013. – №2. – С. 47-52), дрожжей (Legrain, M., D. Portetelle, J. Dumont, A. Burny, and F. Hilger. Biochemical and immunological characterization of the bovine leukemia virus (BLV) envelope glycoprotein (gp51) produced in *Saccharomyces cerevisiae* // Gene. – 1989. – Vol. 79. – P. 227–237) и клетках насекомых (Russo, S., Montermini, L., R. Berkovitz-Siman-Tov, W. Ponti, and G. Poli. Expression of bovine leukemia virus Env glycoprotein in insect cells by recombinant baculovirus // FEBS Letters. – 1998. – Vol. 436. – P. 11–16). Известно, что в бактериальной системе экспрессии эукариотические белки плохо процессируются. Кроме того, необходимым этапом является удаление бактериальных токсинов, присутствующих в данной системе. Дрожжи как эукариотический организм не имеют этих недостатков, но практический опыт показывает, что большое количество синтезируемого продукта теряется вследствие деградации целевого белка в среде. Кроме того, в дрожжах, особенно в *S.cerevisiae*, гликопротеины подвергаются гипергликозилированию, в результате которого формируются N-гликаны с очень высоким содержанием маннозы, которые кардинально отличаются от N-гликанов млекопитающих. Клетки млекопитающих дают высокий уровень продукции функциональных рекомбинантных белков с корректным N-гликозилированием и другими посттрансляционными модификациями. Однако данная система экспрессии требует дорогой инфраструктуры и компонентов сред.

Белок ВЛКРС gp51 является диагностически важным антигеном вируса. Большинство иммунодиффузионных и иммуноферментных тестов основаны на использовании гликопротеина gp51, так как антитела к нему появляются первыми (Devare S.G., Chander S., Samagh B.S., Stephenson J.R. Evaluation of radioimmuno- precipitation for the detection of bovine leukemia

virus infection in domestic cattle // The Journal of Immunology. – 1977. – Vol. 119. – P. 277-282).

К настоящему моменту создано множество различных векторных систем на основе вирусов растений различных семейств, которые широко используются как в фундаментальных, так и в прикладных исследованиях (Yusibov V., Rabindran S., Commandeur U., Twyman R.M., Fischer R. (2006) The potential of plant virus vectors for vaccine production. *Drugs R&D* 7: 203-217). Преимущества растений как систем транзientной экспрессии рекомбинантных белков иллюстрируются множеством примеров наработки в растительных тканях сложных функционально активных иммуноглобулинов (Roy G., Weisburg S., Rabindran S., Yusibov V. A novel two-component Tobacco mosaic virus-based vector system for high-level expression of multiple therapeutic proteins including a human monoclonal antibody in plants // *Virology*. – 2010. – Vol. 405. – P. 93-99; Sainsbury F., Sack M., Stadlmann J., Quendler H., Fischer R., Lomonossoff G.P. Rapid Transient Production in Plants by Replicating and Non-Replicating Vectors Yields High Quality Functional Anti-HIV Antibody // *PLoS One*. – 2010. – Vol. 5. – P. 1-9) и антигенов (Котляров Р.Ю. Вирусоподобные наноразмерные частицы-носители антигенов вирусов гриппа и краснухи: авторефер. ... канд. с-х. наук: 03.01.03 – Москва, 2010. – 24 с.; Avesani L, Falorni A, Tornielli GB, Marusic C, Porceddu A, Polverari A, Faleri C, Calcinaro F, Pezzotti M. Improved in planta expression of the human islet autoantigen glutamic acid decarboxylase (GAD65) // *Transgenic Research* – 2003. – Vol. 12. – P. 203-212). В то же время, до сих пор отсутствуют четкие критерии выбора оптимальной векторной системы для экспрессии того или иного целевого белка. В этой связи, интересным является применение генома вируса кустистой карликовости томатов (ВККТ) в качестве автономно реплицирующегося вектора для создания генно-инженерной конструкции, обеспечивающей транзientную экспрессию антигена в растениях.

В разработанной нами технологии для экспрессии гликопротеина gp51 ВЛКРС в растениях используется новый для данной задачи вектор на основе

ВККТ. Наличие в геноме ВККТ гена белка p19, ингибирующего посттранскрипционное умолкание генов (ПТУГ) и повышающего уровень экспрессии антигена gp51 ВЛКРС *in planta*, является существенным преимуществом данной векторной системы.

Аналог изобретения. Нами не найдено способа транзientной экспрессии гликопротеина gp51 ВЛКРС в клетках растений с использованием вирусного вектора созданного на основе генома вируса кустистой карликовости томата. Известен способ получения антигена ВЛКРС предусматривающий культивирование вирусосодержащих клеток с последующей их обработкой специальными методами (патент на изобретение №2020960 от 15 октября 1994, патент на изобретение №2185854 от 27 июля 2002, патент на изобретение US 8529909 B2 от 27 сентября 2009). Известны способы получения антигена вируса лейкоза с использованием фазовых систем декстран - полиэтиленгликоль (ПЭГ), сульфат декстрана - ПЭГ, сульфат декстрана - поливиниловый спирт, сульфат декстрана - метилцеллюлоза (Hammar L., Merza M., Malm K., Eriksson S., Morein B. The use of aqueous two-phase systems to concentrate and purify bovine leukemia virus outer envelope protein gp51. // Biotechnology and biochemistry. - 1989. - №11. - P. 296-306). Известны способы получения антигена ВЛКРС основной этап, которого заключается в том, что из крови получают концентрированный образец белков ВЛКРС путем центрифугирования при 20000-100000g, ресуспендируют его в буфере средней ионной силы с pH 7,0-7,8 (патент на изобретение №2282854 МПК: G01N от 27 августа 2006 г., патент на изобретение №0002564007 от 27 июля 2016 г.). Основным недостатком всех известных способов является то, что они трудоемки.

Из аналогичных изобретений также можно отметить способ получения рекомбинантного нуклеокапсидного белка вируса лейкоза крупного рогатого скота p24 путем плазмидной экспрессии гена в клетках *E.coli* (Хасенов Б.Б., Раманкулов Е.М., KZ A4 26721, 1-3 с), штамм микроорганизма *E.coli* BL21/E3.PET22/GP51 - продуцент рекомбинантного gp51 антигена вируса

лейкоза крупного рогатого скота (Мукантаев К.Н., Муканов К.К., Шустов А.В., Райымбек Г., Турсунов К.А., Бегалиева А.А., Раманкулов Е.М., KZ. В 30998). Недостаток данного способа: данная экспрессионная система относится к прокариотическому типу, эукариотические белки в ней плохо процессируются и продукция ограничивается простыми структурами (пептиды и небольшие белки), где посттрансляционные модификации полностью отсутствуют.

Отличие предлагаемого нами способа экспрессии рекомбинантных белков в клетках растений от аналогов заключается в применении вектора на основе вируса кустистой карликовости томатов. Наличие в геноме ВККТ гена белка p19, ингибирующего посттранскрипционное у молкание генов и повышающего уровень экспрессии целевых белков *in planta*, является существенным преимуществом данной векторной системы.

Вирус кустистой карликовости томатов относится к роду *Tombusviridae*. Геном ВККТ представляет собой РНК позитивной полярности длиной около 4800 нт. Геномная РНК ВККТ содержит пять протяжённых открытых рамок считывания и кодирует пять белков (рисунок 1): p33 и p92 отвечают за репликацию вируса, и транслируется непосредственно с геномной РНК. p41 - белок нуклеокапсида вируса, транслируется с субгеномной РНК1, и участвует в упаковке вирусного генома. Ген белка p19, известного как супрессора посттранскрипционного у молкание генов и белка p22, отвечающего за движение вируса транслируются с другой субгеномной РНК2.

Задача изобретения – получение рекомбинантного антигена gp51 в растениях с помощью вирусного вектора, созданного на основе генома ВККТ путем временной (транзистентной) экспрессии.

Технический результат заключается в получении кодон оптимизированной нуклеотидной последовательности рекомбинантного антигена gp51 с помощью химического синтеза *de novo* и создании вирусного

вектора на основе генома ВККТ, транзientно продуцирующего рекомбинантный антиген gp51 в растениях.

Достижения технического результата, позволяет экспрессировать рекомбинантный антиген gp51 в растениях за короткий срок.

Фактически задача решается путем:

1) дизайна и синтеза антигена gp51 ВЛКРС, модифицированный присоединением к нему аминокислотных последовательностей, повышающих его стабильность в растительной клетке и облегчающих очистку;

2) клонирования синтезированного антигена в вирусный вектор на основе генома ВККТ;

3) разработки протоколов инфицирования растения *Nicotiana benthamiana* рекомбинантным вирусным вектором и экспрессии в растениях рекомбинантного антигена gp51 ВЛКРС;

4) подтверждения факта экспрессии антигена gp51 с помощью вестерн-блот анализа, отработки методов очистки и выделения рекомбинантного антигена gp51 и получения препаративного количества очищенного рекомбинантного антигена gp51, экспрессированного в растениях;

5) изучение иммунологических и иммунохимических характеристик рекомбинантного антигена gp51 ВЛКРС;

Первым аспектом изобретения является синтез гена gp51 *de novo*. Дизайн олигонуклеотидных праймеров для получения нуклеотидной последовательности гена gp51 *de novo* проводят с использованием кодонов, оптимальных для его экспрессии в растениях. Для облегчения очистки из растительного материала gp51 также модифицируют посредством присоединения к белку короткой гексагистидиновой метки (6 x His) для очистки с помощью металло-аффинной хроматографии и на С-конец последовательности KDEL (сигнал локализации) для его удержания в эндоплазматическом ретикулуме.

Вторым аспектом изобретения является получение экспрессионного вирусного вектора, обеспечивающего продукцию в растениях рекомбинантного антигена gp51 ВЛКРС. Для этого упомянутый выше рекомбинантный антиген клонируют в вирусный вектор pT31 (Shamekova M., Mendoza M.R., Hsieh Y.C., Lindbo J., Omarov R.T. Scholthof H.B. Tombusvirus-based vector systems to permit over-expression of genes or that serve as sensors of antiviral RNA silencing in plants // Virology. 2014. V. 452. P. 159-162).

К третьему аспекту изобретения относится оптимизация условий инфицирования растений *N.benthamiana* рекомбинантным вирусным вектором, оптимизация протоколов выделения и очистки антигена gp51 и последующей экспрессией рекомбинантного антигена в растениях.

Четвертый аспект изобретения связан с подтверждением факта продукции в растениях антигена gp51 в результате вестерн блот анализа белкового препарата, выделенного из растений-продуцентов, а также с вязан с очисткой рекомбинантного антигена gp51 из растительной ткани *N.benthamiana*. Для очистки антигена gp51 из экстракта растительных клеток используют метод металло-аффинной хроматографии на Ni^{2+} -NTA-агарозе, осуществляя элюицию вручную линейным градиентом имидазола.

При этом подтверждается, что рекомбинантный антиген gp51, действительно, синтезируется в листьях растений-продуцентов и выявляются полосы с молекулярной массой 43 кДа, соответствовавшие расчетной массе гликозилированного белка.

Пятый аспект изобретения связан с изучением иммунологических и иммунохимических характеристик рекомбинантного антигена gp51, экспрессированного в растениях.

Осуществление изобретения.

Пример 1. Дизайн олигонуклеотидных праймеров для получения нуклеотидной последовательности антигена gp51 ВЛКРС *de novo*. Синтез последовательности антигена gp51 ВЛКРС *de novo*.

Дизайн олигонуклеотидных праймеров для получения нуклеотидной последовательности гена *gp51 de novo* проводят с использованием кодонов, оптимальных для его экспрессии в растениях. Для оптимизации кодонного состава гена *gp51* используют алгоритм OptimumGene, который учитывает различные факторы, влияющие на уровни экспрессии генов, такие как смещение кодонов, GC-состав, содержание CpG-динуклеотидов, вторичную структуру мРНК, тандемные повторы, сайты рестрикции, которые могут помешать клонированию, преждевременные сайты полиаденилирования, дополнительные минорные сайты связывания с рибосомой. Для облегчения очистки из растительного материала *gp51* модифицируют посредством присоединения к белку на N-конец короткой аминокислотной метки (6 x His) и на C-конец последовательности SEKDEL (сигнал локализации) для его удержания в эндоплазматическом ретикулуме (рисунок 1).

Дизайн олигонуклеотидных праймеров для получения нуклеотидной последовательности гена *gp51 de novo* проводят с помощью компьютерной программы Vector NTI 10.3.0. Для синтеза последовательностей ДНК, кодирующих ген *gp51* используют праймеры, перечисленные в таблице 1.

Таблица 1 - Олигонуклеотиды для синтеза *de novo* фрагментов гена, кодирующих *gp51*

PrimerID-gp51	Sequence(5'-3')	Length(nt)
gp_F1_1-67	gcggccgctatgcatcatcaccaccaccattggaggtgcagctttcattgggtaatcagcaatgga	67
gp_R2_48-114	ttggtcaatacttatagaaaacttggttcctgattataagcgggtcatccattgctgattacccaat	67
gp_F3_95-156	tttctataagtattgaccaaattcttgaagctcacaccaatcaccctttgtgctaagagc	62
gp_R4_137-198	aatcttagggatccattaactgaatcaagggtgtatcgagggtcttagcacaaaagggtg	62
gp_F5_179-240	ttaatggataccctaagatttattggcctcctccacagggcagacgtcgtttggcgcaaga	62
gp_R6_221-282	cacataagggcacctgggctcgcaatcataggtcaccatagctcttgccaaaacgacgtc	62
gp_F7_263-324	agcccaggtgcccttatgtggcgagacaggttgattgccgcattgggataacgcttca	62
gp_R8_305-371	agggataaaattgatgattcacataaaagaaccttgattgtgtgaagcgttatccaatgcg	67
gp_F9_352-418	aatcatcaaattttatccctgcatttgaaacagtgcatggtatcttcacttgacttgggaaattt	67

gp_R10_399-460	gaatcttatgcaagctaaaagtaattagaggatcatagcccaaatcccaagtcaaagtg	62
gp_F11_441-507	tttagcttgcataagattccagaccacctaaccagattttctcaactgaattcagattgggtt	67
gp_R12_488-549	tgccgtttgatttagcagcagtgcccatgatcttacggatggaacccaatctgaattcagtt	62
gp_F13_530-591	tgtctgctaaatcaaacggcaagagctttccctgattgcgccatttgctgggaacctagccca	62
gp_R14_572-633	tgaaatggtcttattatacaccaagatttctggagcccatggggctaggtcccagcaaa	62
gp_F15_614-675	tgtataataagaccatttcacatctggacctggactagctctccctgacgccagattttt	62
gp_R16_656-717	atgccatccttgagttgattgaatgaagacgtattaacccaaaaaatctgggcgtcaggga	62
gp_F17_698-764	atacaactcaaggatggcatcacccatcacaaaggctgctgttcaatgtttctcaaggaatgctct	67
gp_R18_745-806	cttcagtgagagattaactagggaaataggtggcaggagcagagcattaccttgagaaac	62
gp_F19_787-852	ctctccactgcaagctcagcacctccaacacgagtcggaagcgaaaaagatgaacttaaacgggt	66
gp_F_1-34	ggcgcggccgctatgcacatcaccaccaccatt	34
gp_R_852-826	accggtttagagttcatcttttcgcttcggac	33

Кодон-оптимизированные фрагменты ДНК, кодирующие *gp51*, которые состоят из 852 пар нуклеотидов, синтезируют *de novo* методом двухраундовой полимеразной цепной реакции (ПЦР). На первом раунде проводят амплификацию со смесью внутренних праймеров *gp_F1_1-67* +... *gp_F19_787-852*. Продукты первого раунда используют в качестве матрицы для амплификации в ПЦР второго раунда с парой фланкирующих праймеров *gp_F_1-34* и *gp_R_852-826*. Результаты ПЦР второго раунда показаны на рисунке 2.

Последовательность гена *gp51* клонируют в плазмиду *E. coli* с использованием вектора pUC58, штамма *E.coli* XL-Blue, питательной среды SOC с соответствующими антибиотиками. Продукт амплификации второго раунда, содержащий полную нуклеотидную последовательность гена *gp51* обрабатывают смесью рестриктаз *NotI* и *AgeI*. В этом же эксперименте готовится вектор для клонирования. В качестве векторной молекулы используют плазмиду pUC58, которую обрабатывают рестриктазами *NotI* и *AgeI* в присутствии фосфатазы SAP. Подготовленный вектор смешивают со

вставкой и обрабатывают лигазой, после чего лигазными смесями трансформируют в компетентные клетки XL-Blue методом температурного шока. Из выросших клонов-трансформантов выбирают 8 клонов, которые используют для выделения плазмидной ДНК. В результате данных процедур получают ДНК плазмиды pUC58/GP51, несущую вставку целевого гена gp51 (рисунок 3).

Клоны анализируют на наличие гена gp51 с помощью рестрикции. Рестрикционный анализ клонов pUC58/GP51 подтверждает положительные результаты клонирования гена gp51.

Проводят секвенирование плазмидных ДНК из этих клонов, и выбирают клон, в котором последовательности, целевого гена имеют правильную структуру. Секвенирование проводят с использованием наборов Big Dye 3.1 на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3100 (4337455, Applied Biosystems, США).

Пример 2. Клонирование антигена gp51 в вирусный вектор pT31 под контролем промотора 35S вируса мозаики цветной капусты (CaMV)

Для создания вирусного вектора pT-GP51 на основе генома ВККТ из плазмиды pUC58/GP51 целевой ген gp51 вырезают с помощью рестриктаз *NotI* и *AgeI*. Выделяют ДНК из агарозного геля с использованием MinElute Gel Extraction Kit (28604, QIAGEN, Германия). Очищенный фрагмент, ген gp51 в последующем клонируют в вирусный вектор, обработанный *NotI* и *AgeI*, созданный на основе генома ВККТ. Клонирование целевого гена gp51, проводят, как описано в лабораторном руководстве.

Сконструированный таким образом вирусный вектор pT-GP51 несущий полные кодирующие последовательности генома ВККТ с геном гликопротеина gp51, помещают непосредственно за эукариотическим промотором 35S вируса мозаики цветной капусты CaMV и перед эукариотическим терминатором, что обеспечивает его транскрипцию в эукариотическом геноме (рисунок 4).

Отбор нужных клонов проводят с помощью анализа рестрикционными энзимами и электрофореза в 1% агарозном геле.

Результат рестрикционного анализа позволяет выявить клон рТ-GP51 с геном gp51 длиной 852 п.н.

Трансфекцию вирусного вектора рТ-GP51, в штамм *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 проводят с помощью электропорации. Клоны анализируют на наличие рекомбинантной плазмиды с помощью ПЦР. В результате получают штамм *A. tumefaciens*, несущий вирусный вектор рТ-GP51 содержащий полный геном ВККТ с геном gp51, которые используют для агробактериальной инокуляции растений в условиях *in planta*.

Пример 3. Инфильтрация растений с помощью суспензии *A. tumefaciens* несущую рекомбинантную конструкцию рТ-GP51 в условиях *in planta*

Семена *N. benthamiana* проращивают в горшках, содержащие стандартную почву, при 16 ч фотопериоде (освещение люминесцентными лампами 5кЛк), при температуре воздуха 28-30 °С и 70% относительной влажности воздуха. Затем 2-х недельные проростки рассаживают в отдельные горшки, спустя 4-5 недель, когда растения достигают оптимальной стадии развития, их используют для агроинфильтрации. Для инфильтрации растений используют штамм *A. tumefaciens* LBA4404 несущий вирусный вектор рТ-GP51. Трансформацию клеток *A. tumefaciens* с вирусным вектором рТ-GP51 проводят с помощью электропорации. Колонии проверяют с помощью ПЦР на наличие генома ВККТ. Далее отбирают одноклеточные колонии с рТ-GP51 культивируют в среде Luria-Bertani (LB) и инкубируют на качалке при 28 °С с соответствующими антибиотиками, при перемешивании 220 rpm в течение 24 часов. Далее 20 мл LB с антибиотиками инокулируют 3-мя мл ночной культуры и подращивают клетки при тех же условиях до оптической плотности 0,5-0,6 о.е. при длине волны 500 нм. Суспензию клеток центрифугируют в течение 10 минут при 3700 rpm 4 °С. Осадок ресуспендируют в буфере MMA (10 mM MES pH = 5.5, 10 mM MgCl₂

и 100 мМ ацетосирингон), инкубируют минимум один час при комнатной температуре, после чего используют для инфильтрации листьев растений. Заполнение мезофильной ткани листа табака с бактериальной культурой видно с образованием темно-зеленого сектора. Для того чтобы пропитался весь лист необходимо несколько точек инфильтрации. Инокулированные растения держат при комнатной температуре около сутки в защищенном от прямых солнечных лучей месте. Мониторинг экспрессии гена *gr51* проводят через 3 дня после инфильтрации.

Пример 4. Изучение белковой фракции растительных экстрактов методом электрофоретического разделения белков в ПААГ и получение очищенного рекомбинантного антигена *gr51*, экспрессированного в растениях

Электрофоретические и иммунохимические методы анализа белков являются одними из наиболее широко применяемых в практике современных исследований белков и полипептидов растений. Наиболее широко при этом применяются электрофоретический анализ денатурированных белков в полиакриламидном геле и вестерн блот анализ для выявления индивидуальных белков в полипептидном спектре. Для изучения *gr51* из растений *N.Benthamiana* методом электрофоретического разделения белков в ПААГ и методом вестерн блот анализа инфильтрированные листья измельчают в жидком азоте. В течение 1 часа при постоянном перемешивании растворимые растительные белки экстрагируют в буфере А (20 мМ фосфатный буфер pH = 7.4, 300 мМ хлорид натрия, 1 мМ ЭДТА, 0,4 мМ фенилметилсульфонил флуорид, 1 мМ имидазол) в пропорции 100 мг листьев на 100 мкл буфера и осаждают клеточный дебрис при 14,000g, 45 мин при температуре +4 °C. Нерастворимые белки содержащие антиген *gr51* экстрагируют в течение 1 часа в буфере В (20 мМ фосфатный буфер pH = 7.4, 1 мМ ЭДТА, 300 мМ хлорид натрия, 1 мМ имидазол, 1 мМ меркаптоэтанол), в присутствии сильного денатуранта, такого как 8 М мочевины. Центрифугирование проводят при скорости 14,000g , 45 мин при температуре

+4 °C. Полученный таким образом лизат фильтруют через нейлоновый фильтр с диаметром пор 0.22 мкм и подвергают металло-аффинной хроматографии на Ni²⁺-NTA-агарозе. Рекомбинантный антиген gp51 очищают на колонке HisTrap™ HP(17-5247-01, GE Healthcare, Швеция). Элюцию проводят вручную линейным градиентом имидазола 50-300 мМ. Ренатурацию рекомбинантного белка gp51 проводят с помощью диализа против однократного натрий-фосфатного буферного раствора (1 x PBS) с pH = 7.4, при температуре +4 °C в течение 20-48 часов.

Экспрессию белка gp51 в растительных экстрактах проверяют методом вестерн блот анализа, с помощью специфических моноклональных антител к полигистидину, поскольку белок модифицируют посредством присоединения к нему короткой гексагистидиновой метки (6 x His). Для этого анализа белки прогоняют в полиакриламидном геле, затем переносят на нитроцеллюлозную мембрану и блокируют в растворе обезжиренного молока (7%). Гибридизацию проводят с первичными моноклональными антителами к полигистидину, продуцированными в мышах (46-0284, Invitrogen, USA). Визуализируют с помощью фосфатного буфера, содержащего 5-бром-4-хлор-3-индолил фосфат (66 µl) и нитро синий тетразол (33 µl) (B6149, N5514, Sigma-Aldrich, USA) (рисунок 5).

Результаты вестерн блот анализа с помощью специфических моноклональных антител к полигистидину подтверждают экспрессию gp51 в клетках *N.benthamiana*.

Пример 5. Определение диагностических свойств рекомбинантного антигена gp51 ВЛКРС, полученного путем транзientной экспрессии в растениях

Для изучения иммунологических характеристик рекомбинантного антигена gp51 ВЛКРС экспрессированного в растениях *N.benthamiana* применяют непрямой вариант твердофазного иммуноферментного анализа на иммунологических полистироловых планшетах, иммобилизованных рекомбинантным антигеном в концентрации 2.5 мг/мл в 0,05 М

бикарбонатном буфере рН = 9.5 при 4 °С в течение 12 часов. Отрицательным контролем в данном случае служат сыворотки здоровых животных. В качестве положительного контроля используют рекомбинантный антиген р24, экспрессированный в клетках *E.coli* [Хасенов Б.Б., Султанкулов Б.М., Кожахметов С.С., Ахметов С.Б., Раманкулов Е.М., Муканов К.К.. Получение рекомбинантного антигена вируса лейкоза крупного рогатого скота р24 //Биотехнология. Теория и практика. №2, 2011. С. 50-56.]. Для того чтобы определить рабочий титр антител крупного рогатого скота больных лейкозом иммуноферментным методом ставят эксперимент с разведением проб сывороток начиная с 1:100 до 1:800 (таблица 2,3).

Таблица 2 –Определения титра антител иммуноферментным методом

№ п/п	Титрование сыворотки			
	1:100	1:200	1:400	1:800
Сыворотка 2	1,362	0,868	0,608	0,409
Сыворотка 38	1,729	1,392	0,926	0,675
Сыворотка 19	1,291	0,811	0,524	0,339
Сыворотка 27	1,795	1,165	0,767	0,497
Сыворотка 17	1,413	1,065	0,714	0,402
Сыворотка 12	1,722	1,144	0,673	0,498
Сыворотка 11	0,828	0,617	0,455	0,326
Сыворотка 20	1,385	0,922	0,723	0,426
Сыворотка 25	0,088	0,079	0,075	0,064
Сыворотка 4	1,329	0,872	0,636	0,388
Сыворотка 31	1,341	0,723	0,468	0,284
Сыворотка 26	1,673	1,307	0,985	0,711
Сыворотка 39	1,548	1,072	0,808	0,499
Сыворотка 32	1,612	0,042	1,012	0,786
Сыворотка 5	1,001	0,716	0,519	0,330
Сыворотка 15	1,123	1,049	0,869	0,630
Сыворотка 34	1,352	0,975	1,036	0,943
Сыворотка 41	1,284	0,858	0,57	0,368
Сыворотка 13	0,613	0,364	0,227	0,138
Сыворотка 14	1,390	0,678	0,300	0,043
Сыворотка 35	1,438	0,979	0,693	0,495
Сыворотка 30	1,179	0,892	0,605	0,433
Сыворотка 21	0,867	0,569	0,266	0,043
Сыворотка 6	0,934	0,597	0,293	0,044

Таблица 3 – Определение оптической плотности gp51 иммуноферментным методом

№ п/п	GP 51 (1 мкг/мл)		GP 51 (2,5мкг/мл)	
	I	II	I	II
К -	0,083	0,087	0,091	0,091
Сыворотка 30	1,845	1,850	1,989	1,982
Сыворотка 9	2,019	2,015	2,033	2,035
Сыворотка 26	1,866	1,939	1,916	1,939
Сыворотка 38	2,039	2,009	2,028	2,066
Сыворотка 7	1,734	1,741	1,747	1,754
Сыворотка 32	1,954	2,018	2,054	2,017
Сыворотка 39	1,968	1,828	1,950	1,941
Сыворотка 12	1,979	1,946	2,062	2,051
Сыворотка 41	1,774	1,771	2,001	1,853
Сыворотка 16	1,817	1,779	1,987	1,863
Сыворотка 17	1,825	1,811	1,904	1,730
Сыворотка 2	1,671	1,586	1,86	1,804
Сыворотка 10	1,978	2,009	2,054	2,055
Сыворотка 15	1,960	1,986	2,020	2,022
Сыворотка 20	1,862	1,812	1,949	1,999
Сыворотка 5	2,034	2,004	2,061	1,996
Сыворотка 19	1,833	1,835	1,953	1,949
Сыворотка 4	1,837	1,911	1,900	1,917
Сыворотка 31	1,810	1,868	1,753	1,807
Сыворотка 27	2,012	1,980	2,045	1,976
Сыворотка 34	1,882	1,870	1,967	2,008
Сыворотка 35	1,853	1,691	1,852	1,843
Сыворотка 13	1,736	1,877	1,859	1,812

Чувствительность иммуноферментного анализа оценивают исследованием проб сывороток от больных животных, диагноз которых был подтвержден коммерческим набором для иммуноферментной диагностики лейкоза (Ingezim BVL Compac 2.0.) (таблица 4).

Таблица 4 – Анализ проб сывороток КРС методом ИФА

ВЛКРС инфекция	rGP51 результат ИФА		Всего	Чувствительность	Специфичность
	+	-			
Положительные	23	0	23	$23/24 \cdot 100 =$	$11/12 \cdot 100 =$

сыворотки				95,8%	91,6%
Отрицательные сыворотки	1	11	12		
Всего	24	11	35		

Для подтверждения результатов иммуноблота изучают иммунохимические характеристики рекомбинантного gp51 антигена ВЛКРС. Для этого полоски нитроцеллюлозной мембраны с рекомбинантным антигеном gp51 блокируют бычьим сывороточным альбумином (1%) в натрий-фосфатном буфере, содержащем Tween 20 (PBST) pH = 7.4 при 37 °C в течение 2 часов. После 3-хкратно отмывают полоски в PBST и инкубируют при 4 °C 10 часов в сыворотках больных с ВЛКРС и здоровых животных, разведенных 1:50 в PBST. В качестве вторичных антител используют поликлональные кроличьи антитела против иммуноглобулинов КРС IgG, меченные пероксидазой хрена в бычьем сывороточном альбумине (1%) в разведении 1:5000 и инкубируют в течение 2 часов. Визуализацию результатов реакции проводят с помощью хромогена 4-хлор-1-нафтола (рисунок 6).

Таким образом, на основании данных вестерн блот анализа, а также иммуноблота можно рекомендовать использование в качестве готового диагностического препарата рекомбинантный антиген gp51 транзientно продуцированный в растениях *N.benthamiana*, очищенный с помощью металло-аффинной хроматографии на Ni²⁺-NTA-агарозе. Кроме того, на основе этих данных можно рекомендовать использовать разработанную технологию получения диагностического антигена gp51 ВЛКРС в растениях для создания диагностической тест системы для эффективной диагностики ЛКРС.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Рекомбинантный гликопротеин gp51 вируса лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) транзientно продуцированный в растениях *N.benthamiana*, отличающиеся тем, что синтез кодон оптимизированного и модифицированного гена, кодирующий рекомбинантный антиген gp51 проводят *de novo*, для облегчения очистки из растительного материала gp51 модифицируют посредством присоединения к белку на N-конец короткой аминокислотной метки (6 x His) и на C-конец последовательности KDEL для его удержания в эндоплазматическом ретикулуме, экспрессионный вирусный вектор получают на основе генома вируса кустистой карликовости томатов, продуцируют с помощью *Agrobacterium*-опосредованной транзientной экспрессии *in planta* в растениях *N.benthamiana*, факт экспрессии гена, кодирующий антиген gp51 подтверждают методом иммуноферментного анализа и иммуноблоттинга, используя сыворотки больных и здоровых животных ВЛКРС.

**«ГЛИКОПРОТЕИН GP51 ВИРУСА ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО
РОГАТОГО СКОТА ТРАНЗИЕНТНО ПРОДУЦИРОВАННЫЙ В
РАСТЕНИЯХ N.ВЕНТАМИАНА С ПОМОЩЬЮ ВИРУСНОГО
ВЕКТОРА СОЗДАННОГО НА ОСНОВЕ ГЕНОМА ВККТ»**

Not	
Ala Ala Ala Met His His His His His His Trp Arg Cys Ser Leu Ser Leu Gly Asn Gln Gln Trp Met Thr Ala Tyr Asn Gln Glu Ala Lys Phe Ser Ile	
1 GCGGCCGCTA TGCATCATCA CCACCACCAT TGGAGGTGCA GTCTTTCATT GGGTAATCAG CAATGGATGA CCGCTTATAA TCAGGAAGCC AAGTTTCTA	
CGCCGGCGAT ACGTAGTAGT GGTGGTGGTA ACCTCCACGT CAGAAAAGTAA CCCATTAGTC GTTACCTACT GCGGAATATT AGTCCTTCGG TTCAAAAGAT	
Ile Ser Ile Asp Gln Ile Leu Glu Ala His Asn Gln Ser Pro Phe Cys Ala Lys Ser Pro Arg Tyr Thr Leu Asp Ser Val Asn Gly Tyr Pro Lys Ile Tyr	
101 TAAGTATTGA CCAAATTCCT GAAGCTCACA ACCAATCACC CTTTGTGCT AAGAGCCCTC GATACACCCT TGATTCACTT AATGGATACC CTAAGATTTA	
ATTGATAACT GGTITTAAGAA CTTCGAGTGT TGGTTAGTGG GAAAACACGA TTCTCGGGAG CTATGTGGGA ACTAAGTCAA TTACCTATGG GATTCTAAAT	
Tyr Trp Pro Pro Pro Gln Gly Arg Arg Arg Phe Gly Ala Arg Ala Met Val Thr Tyr Asp Cys Glu Pro Arg Cys Pro Tyr Val Gly Ala Asp Arg Phe Asp	
201 TTGGCTCTCT CCACAGGGCA GACGTCGTTT TGGCGCAAGA GCTATGGTGA CCTATGATTG CGAGCCCAGG TGCCCTTATG TGGCGCAGA CAGGTTTGAT	
AACCGGAGGA GGTGTCCCGT CTGCAGCAAA ACCGCGTTCT CGATACCACT GGATACTAAC GCTCGGGTCC ACGGGAATAC ACCCGCGTCT GTCCAAACTA	
Cys Pro His Trp Asp Asn Ala Ser Gln Ala Asn Gln Gly Ser Phe Tyr Val Asn His Gln Ile Leu Ser Leu His Leu Lys Gln Cys His Gly Ile Phe Thr	
301 TGCCCGCATT GGGATAACGC TTCACAAGCA AATCAAGGTT CTTTTATGT GAATCATCAA ATTTTATCCC TGCATTTGAA ACAGTGTGAT GGTATCTTCA	
ACGGGCGTAA CCTATTGCG AAGTGTTCGT TTAGTTCCAA GAAAATACA CTTAGTAGTT TAAATAGGG ACGTAACTT TGTCACAGTA CCATAGAAGT	
Thr Leu Thr Trp Glu Ile Trp Gly Tyr Asp Pro Leu Ile Thr Phe Ser Leu His Lys Ile Pro Asp Pro Pro Gln Pro Asp Phe Pro Gln Leu Asn Ser Asp	
401 CTTTGACTTG GGAATTTGG GGCTATGATC CTCTAATTAC TTTTAGCTTG CATAAGATTG CAGACCCACC TCAACCAGAT TTTCTCAAC TGAATTCAGA	
GAAACTGAAC CCTTTAAACC CCGATACTAG GAGATTAATG AAAATCGAAC GTATTCTAAG GTCTGGGTGG AGTTGGTCTA AAAGGAGTTG ACTTAAGTCT	
Asp Tyr Val Pro Ser Val Arg Ser Trp Ala Leu Leu Leu Asn Gln Thr Ala Arg Ala Phe Pro Asp Cys Ala Ile Cys Trp Glu Pro Ser Pro Pro Trp Ala	
501 TTGGGTTCCT TCCGTAAGAT CATGGGCACT GCTGCTAAAT CAAACGGCAA GAGCTTTCCC TGATTGCGCC ATTTGCTGGG AACCTAGCCC ACCATGGGCT	
AACCCAAGGT AGGCATTCTA GTACCCGTGA CGACGATTTA GTTGGCGTT CTCGAAAGGG ACTAACGCGG TAAACGACCC TTGGATCGGG TGGTACCCGA	
Pro Glu Ile Leu Val Tyr Asn Lys Thr Ile Ser Ser Ser Gly Pro Gly Leu Ala Leu Pro Asp Ala Gln Ile Phe Trp Val Asn Thr Ser Ser Phe Asn Thr	
601 CCAGAAATCT TGGTGATATAA TAAGACCATT TCATCATCTG GACCTGGACT AGCTCTCCCT GACGCCCAGA TTTTGTGGT TAATACGTCT TCATTCAATA	
GGTCTTTAGA ACCACATATT ATTCTGGTAA AGTAGTAGAC CTGGACCTGA TCGAGAGGGA CTGCGGGTCT AAAAAACCCA ATTATGCAGA AGTAACTTAT	
Thr Thr Gln Gly Trp His His Pro Ser Gln Arg Leu Leu Phe Asn Val Ser Gln Gly Asn Ala Leu Leu Leu Pro Pro Ile Ser Leu Val Asn Leu Ser Thr	
701 CAACTCAAGG ATGGCATCAC CCATCACAAG GGTGCTGTT CAATGTTTCT CAAGGTAATG CTCTGCTCCT GCCACCTATT TCCCTAGTTA ATCTCTCCAC	
GTGAGTTCC TACCGTAGTG GGTAGTGTTC CCGACGACAA GTTACAAAGA GTTCCATTAC GAGACGAGGA CGGTGGATAA AGGGATCAAT TAGAGAGGTG	
Agel	
Thr Ala Ser Ser Ala Pro Pro Thr Arg Val Arg Lys Asp Glu Leu Thr Gly	
801 TGCAAGCTCA GCACCTCCAA CACGAGTCCG AAAAGATGAA CTCTAAACCG GT	
ACGTTCGAGT CGTGGAGGTT GTGCTCAGGC TTTTCTACTT GAGATTTGCC CA	

Рисунок 1 - Аминокислотная и кодон-оптимизированная нуклеотидная
последовательность гена gp51

**«ГЛИКОПРОТЕИН GP51 ВИРУСА ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО
РОГАТОГО СКОТА ТРАНЗИЕНТНО ПРОДУЦИРОВАННЫЙ В
РАСТЕНИЯХ N.BENTAMIANA С ПОМОЩЬЮ ВИРУСНОГО
ВЕКТОРА СОЗДАННОГО НА ОСНОВЕ ГЕНОМА ВККТ»**

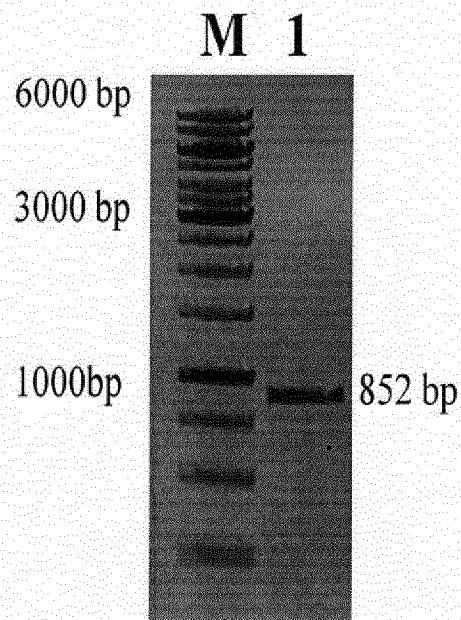


Рисунок 2 – Электрофореграмма продукта *de novo* синтеза гена gp51 из олигонуклеотидных праймеров методом ПЦР

**«ГЛИКОПРОТЕИН GP51 ВИРУСА ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО
РОГАТОГО СКОТА ТРАНЗИЕНТНО ПРОДУЦИРОВАННЫЙ В
РАСТЕНИЯХ N.BENTAMIANA С ПОМОЩЬЮ ВИРУСНОГО
ВЕКТОРА СОЗДАННОГО НА ОСНОВЕ ГЕНОМА ВККТ»**

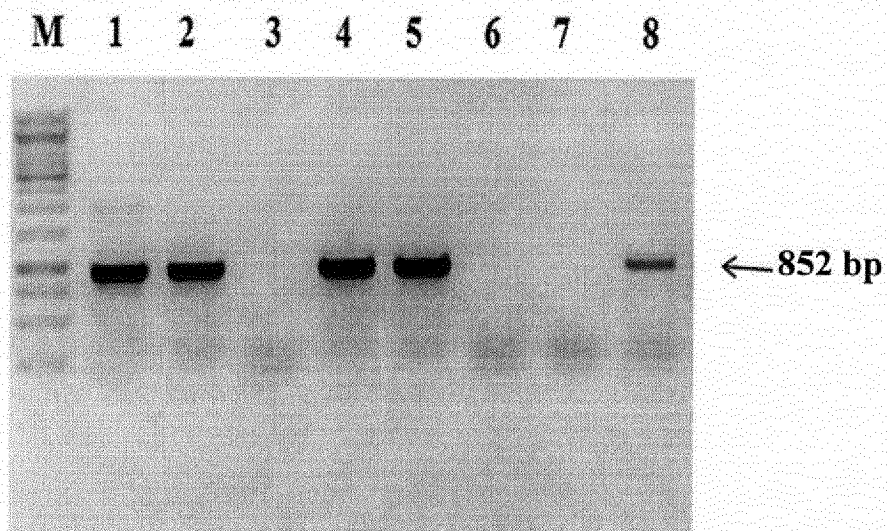


Рисунок 3 - Электрофореграмма продуктов ПЦР мониторинга
клонов pUC58/GP51

**«ГЛИКОПРОТЕИН GP51 ВИРУСА ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО
РОГАТОГО СКОТА ТРАНЗИЕНТНО ПРОДУЦИРОВАННЫЙ В
РАСТЕНИЯХ N.BENTAMIANA С ПОМОЩЬЮ ВИРУСНОГО
ВЕКТОРА СОЗДАННОГО НА ОСНОВЕ ГЕНОМА ВККТ»**

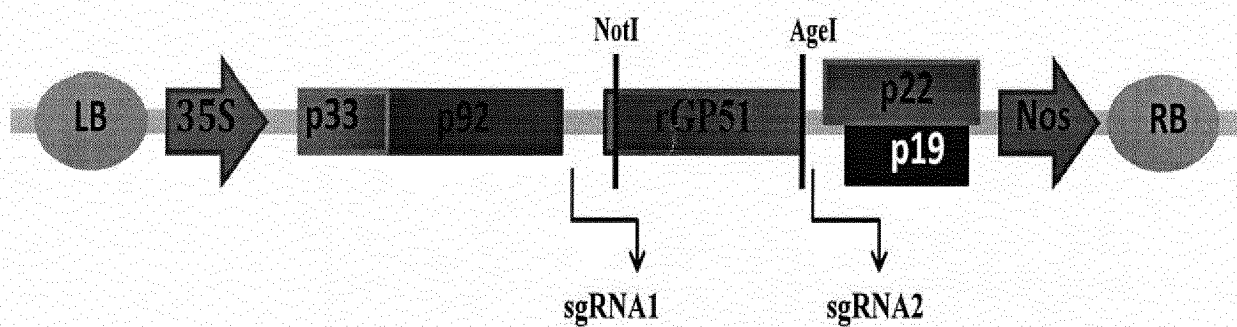


Рисунок 4 - Экспрессионная кассета вектора pT-GP51

**«ГЛИКОПРОТЕИН GP51 ВИРУСА ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО
РОГАТОГО СКОТА ТРАНЗИЕНТНО ПРОДУЦИРОВАННЫЙ В
РАСТЕНИЯХ N.BENTAMIANA С ПОМОЩЬЮ ВИРУСНОГО
ВЕКТОРА СОЗДАННОГО НА ОСНОВЕ ГЕНОМА ВККТ»**

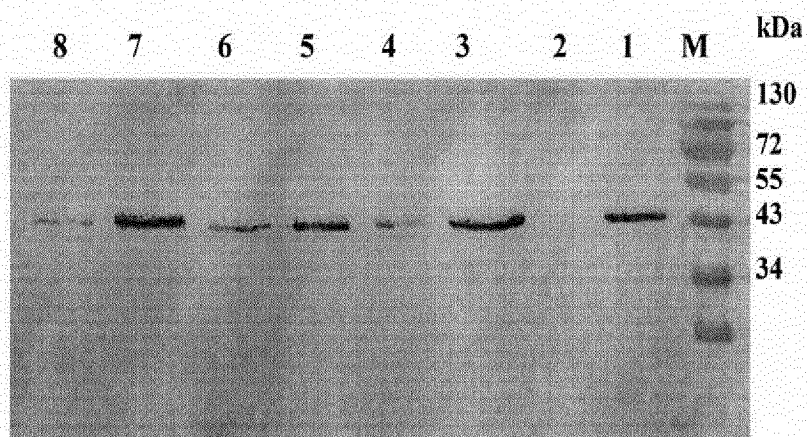


Рисунок 5 - Анализ экспрессии антигена gpr51 с помощью специфических моноклональных антител к полигистидину

**«ГЛИКОПРОТЕИН GP51 ВИРУСА ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО
РОГАТОГО СКОТА ТРАНЗИЕНТНО ПРОДУЦИРОВАННЫЙ В
РАСТЕНИЯХ N.BENTAMIANA С ПОМОЩЬЮ ВИРУСНОГО
ВЕКТОРА СОЗДАННОГО НА ОСНОВЕ ГЕНОМА ВККТ»**

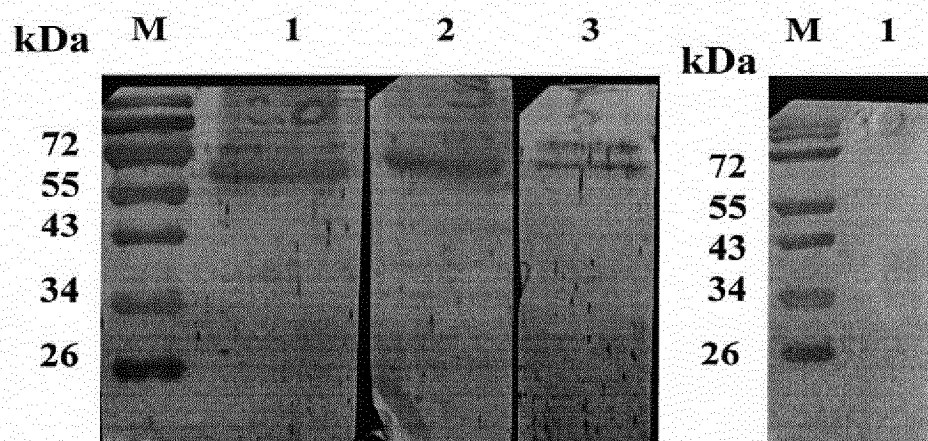


Рисунок 6 - Иммуноблот антигена ggr51 с сывороткой от больных и здорового животного

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ
ПОИСКЕ(статья 15(3) ЕАПК и правило 42
Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

201900054

Дата подачи: 05 октября 2018 (05.10.2018)		Дата испрашиваемого приоритета:	
Название изобретения: Гликопротеин GP51 вируса лейкоза крупного рогатого скота транзистентно продуцированный в растениях N.Bentamiana с помощью вирусного вектора созданного на основе генома ВККТ			
Заявитель: РЕСПУБЛИКАНСКОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ НА ПРАВЕ ХОЗЯЙСТВЕННОГО ВЕДЕНИЯ "НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР БИОТЕХНОЛОГИИ" КОМИТЕТА НАУКИ МИНИСТЕРСТВА ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН			
☐ Некоторые пункты формулы не подлежат поиску (см. раздел I дополнительного листа) ☐ Единство изобретения не соблюдено (см. раздел II дополнительного листа)			
А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:			
МПК: см. дополнит.лист		СПК: см. дополнит.лист	
Согласно Международной патентной классификации (МПК) или национальной классификации и МПК			
Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:			
Минимум просмотренной документации (система классификации и индексы МПК) C07K 14/005, 14/15, C12N 21/00, 15/48, 15/86, 15/63, 15/82			
Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в область поиска:			
В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ			
Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей		Относится к пункту №
X	ZHUMABEK Aiganym T. et al. Transient expression of a bovine leukemia virus envelope glycoprotein in plants by a recombinant TBSV vector. Journal of Virological Methods, 2018, vol. 255, pp. 1-7, реферат, с. 2		1
A	GIUSEPPE De Antonio et al. Expression of the Bovine Leukemia Virus Envelope Glycoprotein (gp51) by Recombinant Baculovirus and Its Use in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 2004, vol. 11, No. 1, pp. 147-151, реферат		1
A	US 8529909 B2 (INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII) 10.09.2013, реферат, формула		1
☐ последующие документы указаны в продолжении графы В			
☐ данные о патентах-аналогах указаны в приложении			
* Особые категории ссылочных документов:			
"А" документ, определяющий общий уровень техники "Е" более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее "О" документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д. "Р" документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета "D" документ, приведенный в евразийской заявке			
"I" более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения "X" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности "Y" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории "&" документ, являющийся патентом-аналогом "L" документ, приведенный в других целях			
Дата действительного завершения патентного поиска:		5 ноября 2019 (05.11.2019)	
Наименование и адрес Международного поискового органа:		Уполномоченное лицо :	
Федеральный институт промышленной собственности РФ, 125993, Москва, Г-59, ГСП-3, Бережковская наб., д. 30-1. Факс: (499) 243-3337, телетайп: 114818 ПОДАЧА		 А.Н. Банченко Телефон № (499) 240-25-91	

КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

МПК: *C07K 14/005 (2006.01)*
C07K 14/15 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)
C12N 15/48 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

СПК: *C07K 14/005 (2013-01)*
C07K 14/15 (2013-01)
C12P 21/00 (2013-01)
C12N 15/86 (2013-01)
C12N 15/63 (2013-01)
C12N 15/8203 (2013-01)