



(51) МПК  
*C12N 5/071* (2010.01)  
*C12Q 1/6811* (2018.01)  
*C12Q 1/6876* (2018.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

*C12N 5/0662* (2021.02); *C12Q 1/6811* (2021.02); *C12Q 1/6876* (2021.02); *C12N 2506/45* (2021.02); *C12N 2533/52* (2021.02); *C12Q 2600/158* (2021.02)

(21)(22) Заявка: 2019116152, 15.11.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
15.11.2017

Дата регистрации:  
25.10.2021

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
16.11.2016 AU 2016904679

(43) Дата публикации заявки: 17.12.2020 Бюл. № 35

(45) Опубликовано: 25.10.2021 Бюл. № 30

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: 17.06.2019

(86) Заявка РСТ:  
AU 2017/051254 (15.11.2017)

(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2018/090084 (24.05.2018)

Адрес для переписки:  
191036, Санкт-Петербург, а/я 24,  
"НЕВИНПАТ"

(72) Автор(ы):

**СЛУКВИН Игорь (US),  
ХЕЙ Дерек (US),  
ДРАЙЕР Диана (US)**

(73) Патентообладатель(и):

**СИНАТА ТЕРАПЬЮТИКС ЛИМИТЕД  
(AU)**

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: KURODA T., et al., **Highly Sensitive  
In Vitro Methods for Detection of Residual  
Undifferentiated Cells in Retinal Pigment  
Epithelial Cells Derived from Human iPSC Cells**,  
17.05.2012, PLoS ONE, Vol.7, Is.5, e37342. TANO  
K., et al., **A Novel In Vitro Method for Detecting  
Undifferentiated Human Pluripotent Stem Cells  
as Impurities in Cell Therapy** (см. прод.)

(54) Анализ плюрипотентных стволовых клеток

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к области клеточной биологии и медицины, в частности к способу выявления остаточных, недифференцированных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC) в культуре клеток, дифференцировавшихся из iPSC. Для осуществления способа согласно изобретению сначала культивируют указанные клетки на субстрате, покрытом ламинином-521 и E-кадгеринном, в среде, содержащей ингибитор Rho-ассоциированной протеинкиназы, содержащей суперспираль (ROCK). Затем

проводят количественное измерение в культивируемых клетках экспрессии маркера остаточных, недифференцированных iPSC. Далее сравнивают экспрессию маркера в культивируемых клетках с экспрессией маркера в контрольной культуре клеток, содержащей известную долю iPSC. Делают вывод об отсутствии остаточных, недифференцированных iPSC в культивируемых клетках или на присутствие их в меньшей доле, чем известная доля iPSC в контрольной культуре клеток в случае, когда в культуре клеток обнаруживают

более низкую экспрессию маркера, чем экспрессия маркера в контрольной культуре клеток. Настоящее изобретение также раскрывает набор для осуществления указанного способа, а также способ изготовления терапевтической композиции и способ лечения или предупреждения состояний, при которых полезен иммуномодулирующий эффект. Настоящее изобретение позволяет

получить улучшенный способ выявления остаточных, недифференцированных PSC в культуре клеток, происходящих от iPSC, подлежащий применению в контроле качества при производстве терапевтических композиций, содержащих клетки, происходящие от iPSC. 4 н. и 18 з.п. ф-лы, 14 ил., 8 табл., 13 пр.

(56) (продолжение):

Products Using a Highly Efficient Culture System, 27.10.2014, PLoS ONE, Vol.9, Is.10, e110496. WO 2013041961 A1, 28.03.2013. WO 2014037807 A2, 13.03.2014. RU 2015100900 A, 10.08.2016.

R U 2 7 5 8 0 0 6 C 2

R U 2 7 5 8 0 0 6 C 2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*C12N 5/071* (2010.01)  
*C12Q 1/6811* (2018.01)  
*C12Q 1/6876* (2018.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*C12N 5/0662* (2021.02); *C12Q 1/6811* (2021.02); *C12Q 1/6876* (2021.02); *C12N 2506/45* (2021.02); *C12N 2533/52* (2021.02); *C12Q 2600/158* (2021.02)

(21)(22) Application: **2019116152**, 15.11.2017(24) Effective date for property rights:  
15.11.2017Registration date:  
25.10.2021

Priority:

(30) Convention priority:  
16.11.2016 AU 2016904679

(43) Application published: 17.12.2020 Bull. № 35

(45) Date of publication: 25.10.2021 Bull. № 30

(85) Commencement of national phase: 17.06.2019

(86) PCT application:  
AU 2017/051254 (15.11.2017)(87) PCT publication:  
WO 2018/090084 (24.05.2018)Mail address:  
191036, Sankt-Peterburg, a/ya 24, "NEVINPAT"

(72) Inventor(s):

**SLUKVIN Igor (US),**  
**KHEJ Derek (US),**  
**DRAJER Diana (US)**

(73) Proprietor(s):

**SINATA THERAPYUTIKS LIMITED (AU)**

(54) **ANALYSIS OF PLURIPOTENT STEM CELLS**

(57) Abstract:

FIELD: cell biology; medicine.

SUBSTANCE: present invention relates to the field of cell biology and medicine, in particular to a method for detecting residual, undifferentiated induced pluripotent stem cells (hereinafter – iPSC) in the culture of cells differentiated from iPSC. To implement the method according to the invention, the specified cells are first cultivated on substrate coated with laminin-521 and E-cadherin in a medium containing a Rho-associated protein kinase (ROCK) inhibitor containing super-spiral. Then, quantitative measurement of the expression of a marker of residual, undifferentiated iPSC is carried out in cultivated cells. Next, the expression of the marker in cultivated cells is compared

with the expression of a marker in a control cell culture containing a known proportion of iPSC. It is concluded that there are no residual, undifferentiated iPSC in cultivated cells or that they are present in a smaller proportion than the known proportion of iPSC in the control cell culture in the case when a lower expression of the marker is detected in the cell culture than the expression of the marker in the control cell culture. The present invention also discloses a set for implementing the specified method, as well as a method for producing a therapeutic composition and a method for treating or preventing conditions in which an immunomodulatory effect is useful.

EFFECT: present invention allows one to obtain an

improved method for detecting residual, undifferentiated  
PSC in the cell culture originating from iPSC, which is  
to be used in quality control in the production of

therapeutic compositions containing cells originating  
from iPSC.

22 cl, 14 dwg, 8 tbl, 13 ex

R U 2 7 5 8 0 0 6 C 2

R U 2 7 5 8 0 0 6 C 2

## ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Данное изобретение относится к способу выявления остаточных, недифференцированных плюрипотентных стволовых клеток (PSC) в культуре клеток, дифференцировавшихся из PSC.

### 5 ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Плюрипотентные стволовые клетки (PSC), в частности человеческие PSC, которые включают эмбриональные стволовые клетки (ESC) и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC), дают возможность разработки новых терапевтических продуктов на основе клеток.

10 Дифференцированные производные iPSC имеют терапевтическую эффективность в целом ряде приложений, связанных с заболеваниями (например, цирроз, болезнь Паркинсона, возрастная макулодегенерация, ишемическая болезнь сердца, диабет, болезнь «трансплантат против хозяина»).

Однако применение в клинических испытаниях терапевтических композиций, 15 содержащих клетки, происходящие от PSC, создает несколько вызовов, в частности, присутствие остаточных недифференцированных PSC в конечном продукте, которые имеют известный потенциал в отношении образования опухолей. Такой вызов является особенно уместным в отношении терапий, для которых требуются высокие дозы дифференцированных клеток, происходящих из PSC.

20 Соответственно, существует потребность в способе или в улучшенном способе выявления остаточных, недифференцированных PSC в культуре клеток, происходящих от PSC, подлежащем применению в контроле качества при производстве терапевтических композиций, содержащих клетки, происходящие от PSC.

Любые публикации, упомянутые в данном описании изобретения, являются 25 включенными сюда посредством ссылки. Однако, если здесь дается ссылка на любую публикацию, такая ссылка не составляет допущения того, что данная публикация образует часть обычного общего знания в данной области в Австралии или в любой другой стране.

### КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

30 Авторы данного изобретения удовлетворили эту потребность контроля качества в изготовлении терапевтических композиций, содержащих клетки, происходящие от PSC, посредством разработки способа выявления остаточных, недифференцированных PSC в культуре клеток, происходящих от PSC. Данный способ основывается на протоколе культивирования клеток для размножения сделанных одиночными, 35 недифференцированных PSC для увеличения чувствительности (истинно позитивные) и специфичности (истинно негативные) в отношении остаточных, недифференцированных PSC.

Соответственно, в первом аспекте предложен способ выявления остаточных, недифференцированных плюрипотентных стволовых клеток (PSC) в культуре клеток, 40 дифференцировавшихся из PSC, включающий:

культивирование указанных клеток на субстрате, покрытом ламинином-521 и E-кадгерином, в среде, содержащей ингибитор Rho-ассоциированной протеинкиназы, содержащей суперспираль (ROCK);

45 количественное измерение в культивируемых клетках экспрессии маркера остаточных, недифференцированных PSC; и

сравнение экспрессии маркера в культивируемых клетках с экспрессией маркера в контрольной культуре клеток, содержащей известную долю PSC,

где более низкая экспрессия маркера в культуре клеток, чем экспрессия маркера в

контрольной культуре клеток, указывает на отсутствие остаточных, недифференцированных PSC в культивируемых клетках или на присутствие остаточных, недифференцированных PSC в культивируемых клетках в меньшей доле, чем известная доля PSC в контрольной культуре клеток.

5 Авторы данного изобретения предлагают то, что согласно данному способу предложено улучшенное средство контроля качества, и он представляет собой важный вклад в безопасность и, следовательно, прогресс терапий, основанных на клетках, происходящих от PSC.

10 Соответственно, в одном воплощении данный способ дополнительно включает приготовление культуры клеток, в которой остаточные, недифференцированные PSC отсутствуют или присутствуют в меньшей доле, чем известная доля, в виде терапевтической композиции. Данный способ может дополнительно включать лечение или предупреждение состояния у субъекта посредством введения данному субъекту терапевтической композиции.

15 Согласно второму аспекту предложен способ изготовления терапевтической композиции, включающий приготовление в виде композиции для терапевтического введения субъекту культуры клеток, в которой остаточные, недифференцированные PSC отсутствуют или присутствуют в меньшей доле, чем известная доля, при выявлении способом по первому аспекту.

20 Согласно третьему аспекту предложен способ лечения или предупреждения состояния у субъекта, включающий введение субъекту:

культуры клеток, в которой остаточные, недифференцированные PSC отсутствуют или присутствуют в меньшей доле, чем известная доля, при выявлении способом по первому аспекту; или

25 терапевтической композиции, изготовленной способом по второму аспекту. Согласно альтернативной форме третьего аспекта предложено применение культуры клеток, в которой остаточные, недифференцированные PSC отсутствуют или присутствуют в меньшей доле, чем известная доля при изготовлении лекарственного средства, такого как терапевтическая композиция, для лечения или предупреждения состояния у субъекта, где остаточные, недифференцированные PSC в культуре клеток, дифференцированных из PSC, выявляют способом по первому аспекту.

Согласно другой альтернативной форме третьего аспекта предложена:

культура клеток, в которой остаточные, недифференцированные PSC отсутствуют или присутствуют в меньшей доле, чем известная доля, при выявлении способом по

35 первому аспекту; или

терапевтическая композиция, изготовленная способом по второму аспекту, для применения в лечении или предупреждении состояния у субъекта.

Состояние, подлежащее предупреждению или лечению, может представлять собой следующие: кисты кости, новообразования кости, переломы, дефекты хряща,

40 остеоартрит, повреждение связки, незавершенный остеогенез, остеонекроз, остеопороз, апластическая анемия, реакция «трансплантат против хозяина» (GvHD),

миелодиспластический синдром, диабет типа 1, диабет типа 2, аутоиммунный гепатит, цирроз печени, печеночная недостаточность, дилатационная кардиомиопатия, сердечная недостаточность, инфаркт миокарда, ишемия миокарда, болезнь Крона, язвенный

45 колит, ожоги, буллезный эпидермолиз, красная волчанка, ревматоидный артрит, болезнь Шегрена, системный склероз, бронхолегочная дисплазия, хроническое обструктивное заболевание дыхательных путей, эмфизема, легочный фиброз, боковой амиотрофический склероз (ALS), болезнь Альцгеймера, травма мозга, атаксия, остеохондроз,

множественная системная атрофия, рассеянный склероз, болезнь Паркинсона, пигментная дистрофия сетчатки, болезнь Ромберга, травма спинного мозга, инсульт, мышечная дистрофия, ишемия конечности, повреждение почки, волчаночный нефрит, эндометриоз и осложнения трансплантации костного мозга или солидных органов.

5 Согласно четвертому аспекту предложен набор для выявления остаточных, недифференцированных PSC в культуре клеток, дифференцировавшихся из PSC, содержащий:

ламинин-521; и E-кадгерин; и ингибитор ROCK.

10 В одном воплощении данный набор используют согласно способу по первому аспекту.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

Фиг. 1 представляет собой пример аминокислотной последовательности  $\alpha$  цепи человеческого ламинина-521 (SEQ ID NO: 1).

15 Фиг. 2 представляет собой пример аминокислотной последовательности  $\beta$  цепи человеческого ламинина-521 (SEQ ID NO: 2).

Фиг. 3 представляет собой пример аминокислотной последовательности  $\gamma$  цепи человеческого ламинина-521 (SEQ ID NO: 3).

Фиг. 4 представляет собой пример аминокислотной последовательности человеческого E-кадгерина (SEQ ID NO: 4).

20 Фиг. 5 представляет собой пример кодирующей нуклеотидной последовательности человеческого LIN28 (LIN28A) (SEQ ID NO: 5).

Фиг. 6 представляет собой пример кодирующей нуклеотидной последовательности человеческого OCT4 (POU5F1) (SEQ ID NO: 6).

25 Фиг. 7 представляет собой пример кодирующей нуклеотидной последовательности человеческого SOX2 (SEQ ID NO: 7).

Фиг. 8 представляет собой пример кодирующей нуклеотидной последовательности человеческого FOXD3 (SEQ ID NO: 8).

Фиг. 9 представляет собой пример кодирующей нуклеотидной последовательности человеческого NANOG (SEQ ID NO: 9).

30 Фиг. 10 представляет собой пример кодирующей нуклеотидной последовательности человеческого PODXL (SEQ ID NO: 10).

Фиг. 11 представляет собой пример кодирующей нуклеотидной последовательности человеческого REX1 (ZFP42) (SEQ ID NO: 11).

35 Фиг. 12 представляет собой пример кодирующей нуклеотидной последовательности человеческого SSEA1 (FUT4) (SEQ ID NO: 12).

Фиг. 13 представляет собой пример кодирующей нуклеотидной последовательности человеческого DPPA2 (SEQ ID NO: 13).

Фиг. 14 представляет собой пример кодирующей нуклеотидной последовательности человеческого DPPA3 (SEQ ID NO: 14).

### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

40 В данном документе раскрыт способ выявления остаточных, недифференцированных PSC в культуре клеток, происходящих от PSC, где клетки, происходящие от PCS, предназначены для терапевтического введения субъекту. Соответственно, согласно изобретению предложен улучшенный способ контроля качества и минимизации риска, например, риска образования опухоли из таких остаточных, недифференцированных PSC.

Данный способ основывается на конкретных условиях культуры для размножения недифференцированных PSC при условиях, которые поддерживают клональный рост

PSC, затем на количественном измерении экспрессии гена, который высоко экспрессируется в PSC, но не экспрессируется или только минимально экспрессируется в клетках, происходящих от PSC, которые подверглись дифференциации. Культуральные условия могут селективно поддерживать размножение PSC на уровне одной клетки. В одном воплощении PSC могут культивироваться при условиях, которые поддерживают рост PSC из суспензии одиночных клеток. Такие культуральные условия известны в данной области и включают ламинин-521 и E-кадгерин, как здесь описано, а также имеющиеся в продаже системы, которые включают набор культуральной среды Cellartis DEF-CS для клонирования единичных клеток iPSC, среду Gibco™ StemFlex™ и среду для клонирования PluriQ™ G9™ в сочетании с ростом одиночных клеток на витронектине.

Экспрессия маркера в опытной культуре на уровне или ниже уровня экспрессии маркера в контрольной культуре с известной долей недифференцированных PSC указывает на то, что опытная культура содержит меньшую долю недифференцированных PSC, чем контрольная культура.

Важно то, что данный способ может выявлять остаточные недифференцированные PSC в культуре клеток, происходящих от PSC, при меньших долях общего числа клеток, например, 0,001% или 10 млн-1.

Если в данном описании изобретения не определено иначе, используемые здесь технические и научные термины, имеют такое же значение, которое обычно понятно специалисту в области, к которой принадлежит данное изобретение, и посредством ссылки на опубликованные тексты.

Следует отметить то, что термин в единственном числе относится к одному или более чем одному, например, понятно то, что «молекула» представляет собой одну или более чем одну молекулу. Термины в единственном числе, «один или более чем один» и «по меньшей мере один», как таковые, могут использоваться в данном документе взаимозаменяемо.

В формуле изобретения, которая следует далее, и в описании изобретения, за исключением случаев, когда контекст требует иного из-за прямо оговоренной формулировки или необходимого подразумеваемого, слово «содержать» или вариации, такие как «содержит» или «содержащий», используются во включительном смысле, т.е. для определения присутствия заявленной характеристики, но не для исключения присутствия или добавления дополнительных характеристик в разных воплощениях данного изобретения.

Термин «примерно» в том виде, в котором он здесь используется, рассматривает целый ряд значений для данного числа плюс/минус 25% от значения данного числа. В других воплощениях термин «примерно» рассматривает целый ряд значений для данного числа плюс/минус 20%, плюс/минус 15%, плюс/минус 10% или плюс/минус 5% от значения данного числа. Например, в одном воплощении фраза «примерно 3 грамма» указывает значение от 2,7 до 3,3 грамма (т.е. 3 грамма плюс/минус 10%) и тому подобное.

Аналогичным образом, в других воплощениях периоды времени могут варьировать на плюс/минус 25%, плюс/минус 20%, плюс/минус 15%, плюс/минус 10% или плюс/минус 5% от данного периода времени. Например, «одни сутки» могут включать период от примерно 18 до примерно 30 часов. Указанные периоды времени, которые представляют собой периоды в много суток, могут представлять собой кратные единицы «одних суток», как, например, двое суток могут охватывать период от примерно 36 до примерно 60 суток и тому подобное. В других воплощениях вариация времени может быть уменьшена, например, где: сутки 1 представляют собой 24 плюс/минус 3 часа от суток



0; сутки 2 представляют собой 48 плюс/минус 3 часа от суток 0; сутки 3 представляют собой 72 плюс/минус 3 часа от суток 0; сутки 4 представляют собой 96 плюс/минус 3 часа от суток 0; сутки 5 представляют собой 120 плюс/минус 3 часа от суток 0 и так далее. В некоторых воплощениях примерно 3 суток представляют собой 3 суток плюс/минус 1 сутки, и примерно 5 суток представляют собой 5 суток плюс/минус 1 сутки.

Термин «плюрипотентная стволовая клетка» или «PSC» в том виде, в котором он здесь используется, относится к клетке, которая имеет способность бесконечно воспроизводиться и дифференцироваться в любой другой тип клетки. Имеются два главных типа плюрипотентных стволовых клеток: эмбриональные стволовые клетки (ESC) и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC).

Термин «эмбриональная стволовая клетка» или «ESC» в том виде, в котором он здесь используется, относится к клетке, выделенной из пяти-семисуточного эмбриона, подаренного по согласию пациентов, которые завершили терапию на основе оплодотворения *in vitro* и имеют излишек эмбрионов. Применению ESC в некоторой степени препятствовали этические опасения о выделении клеток из человеческих эмбрионов.

Человеческие PSC, подходящие для изготовления терапевтической композиции, включают человеческие ESC H1 и H9.

Термин «индуцированная плюрипотентная стволовая клетка» или «iPSC» в том виде, в котором он здесь используется, относится к ESC-подобной клетке, полученной из взрослых клеток. iPSC имеют очень сходные характеристики с ESC, но с ними избегаются этические опасения, связанные с ESC, так как iPSC не происходят из эмбрионов. Вместо этого iPSC типично происходят из полностью дифференцированных клеток взрослых, которые были «перепрограммированы» обратно в плюрипотентное состояние.

Человеческие iPSC, подходящие для изготовления терапевтической композиции, включают iPSC 19-9-7T, MIRJT6i-mND1-4 и MIRJT7i-mND2-0, происходящие от фибробластов, и iPSC BM1 19-9, происходящие от одноядерных клеток костного мозга. Другие подходящие iPSCs могут быть приобретены у Cellular Dynamics International (CDI; Nasdaq: ICEL) из Madison, WI, США.

Термин «осуществление дифференциации» в том виде, в котором он здесь используется, относится к процессу изменения клетки от одного типа клетки до другого, в частности, когда менее специализированный тип клетки становится более специализированным типом клетки.

Термин «происходящий из» в том виде, в котором он здесь используется, может охватывать «осуществление дифференциации» PSC до другого типа клетки.

Соответственно, «недифференцированная PSC» представляет собой PSC, которая не дифференцировалась до другого типа клетки. В том, что касается настоящего раскрытия, недифференцированные PSC присутствуют в популяции дифференцированных в иных отношениях PSC.

Термин «среда» или его множественное число - «среды» - в том виде, в котором он здесь используется, относится к жидкости или гелю, разработанным для поддержки роста, включающего размножение и дифференциацию клеток. Такой рост, включающий размножение и дифференциацию клеток *in vitro*, называется «культивированием» клеток или «культурой» клеток.

Однако клетки не могут бесконечно сохраняться в культуре, благодаря возрастающей концентрации токсичных метаболитов, снижающейся концентрации питательных веществ и, для делящихся клеток, возрастающему числу клеток. Термин «пассирование» в том виде, в котором он здесь используется, относится к способу получения новой

клеточной культуры с освеженными концентрациями питательных веществ, отсутствием токсичных метаболитов и, возможно, меньшей плотностью клеток, чем в исходной культуре.

5 Число пассажей для культуры клеток, например, культуры клеток, происходящих от PSC, подлежащих тестированию настоящим способом, может составлять 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25. Предпочтительно число пассажей составляет 10 или меньше. Более предпочтительно число пассажей составляет 5 или 6. В одном воплощении клетки, происходящие от PSC, претерпели 5 пассажей перед тем, как быть подвергнутыми настоящему способу.

10 В одном воплощении клетка, происходящая из PSC, представляет собой мезенхимную стволовую (или стромальную) клетку (MSC).

В одном воплощении клетка, происходящая от ESC, представляет собой MSC.

В предпочтительном воплощении клетка, происходящая от iPSC, представляет собой MSC, которая также может называться iPSC-MSC.

15 Термин «мезенхимная стволовая клетка» или «MSC» в том виде, в котором он здесь используется, относится к конкретному типу стволовой клетки, которая может быть выделена из широкого спектра тканей, включающих костный мозг, жировую ткань (жир), плаценту и кровь пуповины. MSC могут дифференцироваться в клетки кости (остеоциты), клетки хряща (хондроциты), жировые клетки (адипоциты) и другие виды  
20 клеток соединительной ткани, такие как клетки в сухожилиях.

Согласно настоящему раскрытию MSC могут быть образованы из PSC посредством примитивных мезодермальных клеток *EMH*in-KDR+APLNR+PDGFRальфа+ с потенциалом мезенхимоангиобластов (MCA). Термин «примитивные мезодермальные клетки *EMH*in-KDR+APLNR+PDGFRальфа+ с потенциалом мезенхимоангиобластов (MCA)» относится к клетке, экспрессирующей типичные гены первичной полоски и боковой пластинки/внеэмбриональной мезодермы. Данные клетки имеют потенциал к образованию колоний мезенхимоангиобластов (MCA) и гемангиобластов в бессывороточной среде в ответ на FGF2. Термин *EMH*in- обозначает отсутствие экспрессии CD31, VE-кадгериновых эндотелиальных маркеров, мезенхимных/  
30 эндотелиальных маркеров CD73 и Cd105 и маркеров гематопоетической линии CD43 и CD45.

Термин «мезенхима» или «мезенхимный» в том виде, в котором он здесь используется, относится к эмбриональной соединительной ткани, которая происходит из мезодермы, и которая дифференцируется в гематопоетическую ткань (лимфатическую и кровеносную системы) и соединительную ткань, такую как кость и хрящ. Однако MSC не  
35 дифференцируются в гематопоетические клетки.

MSC секретируют биоактивные молекулы, такие как цитокины, хемокины и факторы роста, и имеют способность модулировать иммунную систему. Было показано то, что MSC облегчают регенерацию и осуществляют воздействия на иммунную систему, не  
40 полагаясь на пересадку. Другими словами, сами MSC не обязательно могут становиться включенными в хозяина - скорее они могут оказывать их эффекты и затем устраняться в пределах короткого периода времени. Однако MSC могут быть пересажены в поврежденные ткани после введения и миграции.

MSC в настоящее время находятся в клинических испытаниях для лечения  
45 многочисленных состояний, заболеваний и расстройств, включая болезнь «трансплантат против хозяина».

Считается, что способность MSC оказывать иммуномодулирующие/  
иммунодепрессивные эффекты, в частности, посредством подавления T-клеток, является

центральной для терапевтических эффектов MSC при широком спектре состояний, заболеваний и расстройств, включающих болезнь «трансплантат против хозяина», иммунные расстройства, включающие аутоиммунные расстройства, сердечно-сосудистые расстройства, ортопедические расстройства и отторжение трансплантированных

5 солидных органов. Некоторые конкретные примеры включают следующие: кисты кости, новообразования кости, переломы, дефекты хряща, остеоартрит, повреждение связки, незавершенный остеогенез, остеонекроз, остеопороз, апластическая анемия, миелодиспластический синдром, диабет типа 1, диабет типа 2, аутоиммунный гепатит, цирроз печени, печеночная недостаточность, дилатационная кардиомиопатия, сердечная

10 недостаточность, инфаркт миокарда, ишемия миокарда, болезнь Крона, язвенный колит, ожоги, буллезный эпидермолиз, красная волчанка, ревматоидный артрит, болезнь Шегрена, системный склероз, бронхолегочная дисплазия, хроническое обструктивное заболевание дыхательных путей, эмфизема, легочный фиброз, боковой амиотрофический склероз (ALS), болезнь Альцгеймера, травма мозга, атаксия, остеохондроз,

15 множественная системная атрофия, рассеянный склероз, болезнь Паркинсона, пигментная дистрофия сетчатки, болезнь Ромберга, травма спинного мозга, инсульт, мышечная дистрофия, ишемия конечности, повреждение почки, волчаночный нефрит, эндометриоз и осложнения трансплантации костного мозга или солидного органа.

Полагают, что MSC выполняют критически важную роль в заживлении ран, и было

20 показано то, что они являются эффективными в лечении повреждения ткани и дегенеративных заболеваний, включающих заболевания в пищеварительной системе, например, цирроз печени и печеночная недостаточность, в скелетно-мышечной системе, в периодонтальной ткани, при диабетической критической ишемии конечностей, при остеонекрозе, при заболеваниях, связанных с ожогами, при инфаркте миокарда, при

25 повреждении роговицы, в мозге, в спинном мозге, в легких и при лечении последствий воздействия радиации.

MSC показали терапевтические результаты при иммунных расстройствах, включающих болезнь «трансплантат против хозяина», системную красную волчанку (SLE), болезнь Крона, множественную системную атрофию, рассеянный склероз,

30 боковой амиотрофический склероз и инсульт.

Было показано то, что MSC оказывают иммунодепрессивные активности против Т-клеток, В-клеток, дендритных клеток, макрофагов и клеток-природных киллеров. Не желая быть связанными теорией, лежащие в основе механизмы могут включать иммунодепрессивные медиаторы, например, оксид азота, индоламин 2,3, диоксигеназу,

35 простагландин E2, белок гена 6, индуцируемого фактором некроза опухолей, CCL-2 и лиганд 1 программируемой смерти. Данные медиаторы экспрессируются на низком уровне, пока не происходит стимуляции, например, воспалительными цитокинами, такими как IFN $\gamma$  (интерферон-гамма), TNF $\alpha$  (фактор некроза опухолей-альфа) и IL-17 (интерлейкин-17).

40 MSC, происходящие из iPSC (iPSC-MSC) имеют уникальное преимущество над MSC, полученными прямым способом, т.е. происходящими из таких тканей, как костный мозг, кровь пуповины, жировая ткань, так как размножение iPSC *in vitro* может обеспечивать фактически неограниченную поставку MSC.

iPSC-MSC могут быть получены согласно Примеру 1.

45 PSC способны дифференцироваться в любой тип клеток любой из эндодермы, эктодермы и мезодермы. PSC подвергаются дифференциации в мультипотентные клетки-предшественники, которые дифференцируются далее в функциональные клетки. Следовательно, приведенное выше описание MSC является примерным, и его не следует

истолковывать как ограничивающее, и другие примеры клеток, происходящих от PSC, могут включать: гематопоэтические стволовые клетки, которые дают все типы клеток крови, включая эритроциты, В-лимфоциты, Т-лимфоциты, природные клетки- киллеры, нейтрофилы, базофилы, эозинофилы, моноциты, макрофаги и тромбоциты; природные 5 стволовые клетки в мозгу, которые дают три его главных типа клеток, представляющих собой нервные клетки (нейроны) и две категории ненейронных клеток - астроциты и олигодендроциты; эпителиальные стволовые клетки в выстилке пищеварительного тракта, которые дают всасывающие клетки, бокаловидные клетки, клетки Панета и энтероэндокринные клетки; и стволовые клетки кожи, которые встречаются в базальном 10 слое эпидермиса, давая кератиноциты, и которые встречаются у основания волосяных фолликулов и дают как волосяной фолликул, так и эпидермис.

Термин «субстрат» в том виде, в котором он здесь используется, представляет собой любое вещество, подходящее для культивирования PSC и/или клеток, происходящих от PSC. Примеры включают пластмассовую культуральную посуду, такую как чашки, 15 многоруночные планшеты и флаконы.

Все белки, описанные в данном документе, известны специалисту в данной области и имеются в продаже.

Ламинин-521 представляет собой гетеротримерный белок, секретируемый человеческими PSC. Ламинин-521 содержит пять  $\alpha$  цепей, две  $\beta$  цепи и одну  $\gamma$  цепь (т.е. 20  $\alpha 5\beta 2\gamma 1$ ). В одном воплощении  $\alpha$  цепь,  $\beta$  цепь и  $\gamma$  цепь имеют аминокислотные последовательности, представленные SEQ ID NO: 1, 2 и 3 (Фиг. 1, 2 и 3) соответственно.

Е-кадгерин представляет собой кальций-зависимый белок клеточной адгезии, ассоциированный с функцией эпителиальных клеток. В одном воплощении человеческий Е-кадгерин имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 25 4 (Фиг. 4).

При осуществлении настоящего способа субстрат может быть покрыт ламинином-521 с использованием примерно 0,1 мкг/мл, 0,2 мкг/мл, 0,3 мкг/мл, 0,4 мкг/мл, 0,5 мкг/мл, 0,6 мкг/мл, 0,7 мкг/мл, 0,8 мкг/мл, 0,9 мкг/мл, 1 мкг/мл, 2 мкг/мл, 3 мкг/мл, 4 мкг/мл, 5 мкг/мл, 6 мкг/мл, 7 мкг/мл, 8 мкг/мл, 9 мкг/мл или 10 мкг/мл, и/или примерно 0,1 30 мкг/см<sup>2</sup>, 0,2 мкг/см<sup>2</sup>, 0,3 мкг/см<sup>2</sup>, 0,4 мкг/см<sup>2</sup>, 0,5 мкг/см<sup>2</sup>, 0,6 мкг/см<sup>2</sup>, 0,7 мкг/см<sup>2</sup>, 0,8 мкг/см<sup>2</sup>, 0,9 мкг/см<sup>2</sup>, 1 мкг/см<sup>2</sup>, 2 мкг/см<sup>2</sup>, 3 мкг/см<sup>2</sup>, 4 мкг/см<sup>2</sup>, 5 мкг/см<sup>2</sup>, 6 мкг/см<sup>2</sup>, 7 мкг/см<sup>2</sup>, 8 мкг/см<sup>2</sup>, 9 мкг/см<sup>2</sup> или 10 мкг/см<sup>2</sup>.

Субстрат может быть покрыт Е-кадгерином с использованием примерно 0,1 мкг/мл, 0,2 мкг/мл, 0,3 мкг/мл, 0,4 мкг/мл, 0,5 мкг/мл, 0,6 мкг/мл, 0,7 мкг/мл, 0,8 мкг/мл, 0,9 мкг/мл, 1 мкг/мл, 2 мкг/мл, 3 мкг/мл, 4 мкг/мл, 5 мкг/мл, 6 мкг/мл, 7 мкг/мл, 8 мкг/мл, 9 мкг/мл или 10 мкг/мл, и/или примерно 0,01 мкг/см<sup>2</sup>, 0,05 мкг/см<sup>2</sup>, 0,1 мкг/см<sup>2</sup>, 0,2 мкг/см<sup>2</sup>, 0,25 мкг/см<sup>2</sup>, 0,3 мкг/см<sup>2</sup>, 0,4 мкг/см<sup>2</sup>, 0,5 мкг/см<sup>2</sup>, 0,6 мкг/см<sup>2</sup>, 0,7 мкг/см<sup>2</sup>, 0,8 мкг/см<sup>2</sup>, 0,9 мкг/см<sup>2</sup>, 1 мкг/см<sup>2</sup>, 2 мкг/см<sup>2</sup>, 3 мкг/см<sup>2</sup>, 4 мкг/см<sup>2</sup>, 5 мкг/см<sup>2</sup>, 6 мкг/см<sup>2</sup>, 7 мкг/см<sup>2</sup>, 8 мкг/см<sup>2</sup>, 9 мкг/см<sup>2</sup> или 10 мкг/см<sup>2</sup>. 35

В предпочтительном воплощении субстрат покрыт ламинином-521 с использованием 10 мкг/мл и 2 мкг/см<sup>2</sup> и Е-кадгерином с использованием 1,1 мкг/мл и 0,22 мкг/см<sup>2</sup>.

Rho-ассоциированная протеинкиназа, содержащая суперспираль (ROCK), участвует, главным образом, в регуляции формы и движения клеток, посредством действия на цитоскелет. Таким образом, «ингибитор ROCK» ингибирует данную функцию, и для 45 настоящих целей «ингибитор ROCK» увеличивает выживание iPSC.

В одном воплощении ингибитор ROCK представляет собой Y27632 (CAS No: 129830-38-2). Другими примерами ингибиторов ROCK, которые можно использовать в настоящем способе, являются AS 1892802 (CAS No: 928320-12-1), фасудила гидрохлорид

(CAS No: 105628-07-7), GSK 269962 (CAS No: 850664-21-0), GSK 429286 (CAS No: 864082-47-3), H 1152 дигидрохлорид (CAS No: 871543-07-6), глицил-H 1152 дигидрохлорид (CAS No: 913844-45-8), HA 1100 гидрохлорид (CAS No: 155558-32-0), OXA 06 дигидрохлорид, RKI 1447 дигидрохлорид, SB 772077B дигидрохлорид (CAS No: 607373-46-6), SR 3677 дигидрохлорид (CAS No: 1072959-67-1) и TC-S 7001 (CAS No: 867017-68-3).

Концентрация ингибитора ROCK, в которой культивируются клетки, может составлять, например, примерно 0,1 мкМ, 0,5 мкМ, 1 мкМ, 2 мкМ, 3 мкМ, 4 мкМ, 5 мкМ, 6 мкМ, 7 мкМ, 8 мкМ, 9 мкМ, 10 мкМ, 11 мкМ, 12 мкМ, 13 мкМ, 14 мкМ, 15 мкМ, 16 мкМ, 17 мкМ, 18 мкМ, 19 мкМ, 20 мкМ, 25 мкМ, 30 мкМ, 40 мкМ, 50 мкМ, 60 мкМ, 70 мкМ, 80 мкМ, 90 мкМ или 100 мкМ.

Предпочтительно ингибитор ROCK представляет собой Y27632, и концентрация Y27632, в которой культивируются клетки, составляет примерно 10 мкМ.

Согласно настоящему способу для культивирования клеток на субстрате, покрытом ламинином-521 и E-кадгерином, в среде, содержащей ингибитор Rho- ассоциированной протеинкиназы, содержащей суперспираль (ROCK), клетки должны быть посеяны на субстрат. Плотность посева клеток на субстрате может составлять примерно  $1 \times 10^2$  клеток/см<sup>2</sup>,  $2 \times 10^2$  клеток/см<sup>2</sup>,  $3 \times 10^2$  клеток/см<sup>2</sup>,  $4 \times 10^2$  клеток/см<sup>2</sup>,  $5 \times 10^2$  клеток/см<sup>2</sup>,  $6 \times 10^2$  клеток/см<sup>2</sup>,  $7 \times 10^2$  клеток/см<sup>2</sup>,  $8 \times 10^2$  клеток/см<sup>2</sup>,  $9 \times 10^2$  клеток/см<sup>2</sup>,  $1 \times 10^3$  клеток/см<sup>2</sup>,  $2 \times 10^3$  клеток/см<sup>2</sup>,  $3 \times 10^3$  клеток/см<sup>2</sup>,  $4 \times 10^3$  клеток/см<sup>2</sup>,  $5 \times 10^3$  клеток/см<sup>2</sup>,  $6 \times 10^3$  клеток/см<sup>2</sup>,  $7 \times 10^3$  клеток/см<sup>2</sup>,  $8 \times 10^3$  клеток/см<sup>2</sup>,  $9 \times 10^3$  клеток/см<sup>2</sup>,  $1 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup>,  $2 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup>,  $3 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup>,  $4 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup>,  $5 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup>,  $6 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup>,  $7 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup>,  $8 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup>,  $9 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup>,  $1 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>,  $2 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>,  $3 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>,  $4 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>,  $5 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>,  $6 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>,  $7 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>,  $8 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>,  $9 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>,  $1 \times 10^6$  клеток/см<sup>2</sup>,  $2 \times 10^6$  клеток/см<sup>2</sup>,  $3 \times 10^6$  клеток/см<sup>2</sup>,  $4 \times 10^6$  клеток/см<sup>2</sup>,  $5 \times 10^6$  клеток/см<sup>2</sup>,  $6 \times 10^6$  клеток/см<sup>2</sup>,  $7 \times 10^6$  клеток/см<sup>2</sup>,  $8 \times 10^6$  клеток/см<sup>2</sup>,  $9 \times 10^6$  клеток/см<sup>2</sup>. В некоторых воплощениях плотность посева может составлять примерно  $1,1 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup>,  $1,2 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup>,  $1,3 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup>,  $1,4 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup>,  $1,5 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup>,  $1,6 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup>,  $1,7 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup>,  $1,8 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup> или  $1,9 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup>. В предпочтительном воплощении плотность посева составляет примерно  $1,3 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup>.

Как часть настоящего способа клетки могут культивироваться в течение примерно 1 суток, 2 суток, 3 суток, 4 суток, 5 суток, 6 суток, 7 суток, 8 суток, 9 суток, 10 суток или более перед количественным измерением экспрессии маркера в культивируемых клетках. Предпочтительно клетки культивируются в течение примерно 5 суток перед количественным измерением экспрессии маркера в культивируемых клетках.

Как часть настоящего способа клетки могут культивироваться в присутствии ингибитора ROCK в течение примерно 1 суток, 2 суток, 3 суток, 4 суток, 5 суток, 6 суток, 7 суток, 8 суток, 9 суток, 10 суток или более перед количественным измерением экспрессии маркера в культивируемых клетках.

После культивирования клеток в присутствии ингибитора ROCK клетки можно далее культивировать в отсутствие ингибитора ROCK перед количественным измерением экспрессии маркера в культивируемых клетках. В одном воплощении клетки далее культивируются в отсутствие ингибитора ROCK в течение примерно 1 суток, 2 суток,

3 суток, 4 суток, 5 суток, 6 суток, 7 суток, 8 суток, 9 суток, 10 суток или более перед количественным измерением экспрессии маркера в культивируемых клетках.

В предпочтительном воплощении клетки культивируются в присутствии ингибитора ROCK в течение примерно 3 суток, затем культивируются далее в отсутствие ингибитора ROCK в течение примерно 2 суток перед количественным измерением экспрессии маркера в культивируемых клетках.

В заключение, было продемонстрировано то, что размножение клеток, происходящих из PSC, таких как MSC, на субстрате, таком как пластмассовая культуральная посуда, покрытом ламинином-521 и E-кадгерином, поддерживает размножение ставших единичными, недифференцированных PSC, которые находятся в популяции клеток, происходящих из PSC, тогда как ингибитор ROCK одновременно увеличивает выживание PSC.

Термин «экспрессия маркера» в том виде, в котором он здесь используется, относится к гену, который экспрессируется в остаточных, недифференцированных PSC, но не экспрессируется или экспрессируется только с более низкими уровнями в клетках, происходящих от PSC. Такой ген может быть кодирующим или не кодирующим, например, мРНК, микроРНК или не кодирующую РНК.

Маркеры, экспрессия которых может быть количественно измерена согласно настоящему способу, включают LIN28 (LIN28A), OCT4 (POU5F1), SOX2, FOXD3, NANOG, PODXL (изоформы белка которого, выявляют антителами TRA-1-60 и TRA-1-81), REX1 (ZFP42), SSEA1 (FUT4), SSEA4, DPPA2 и DPPA3. Предпочтительно экспрессией маркера является экспрессия LIN28. Ген LIN28 кодирует белок LIN28, который представляет собой РНК-связывающий белок, который стимулирует плюрипотентность и высоко экспрессируется в PSC, но демонстрирует понижающую регуляцию в ответ на дифференциацию.

«Экспрессию маркера» можно количественно измерять как экспрессию белка или мРНК. Предпочтительно экспрессия маркера количественно измеряется как экспрессия мРНК.

Белок-маркер может быть количественно измерен способами, включающими гель-электрофорез (например, вестерн-блоттинг или двухмерный гель-электрофорез), денситометрию, флуоресценцию, люминесценцию, радиоактивность, чипы и/или масс-спектрометрию.

Маркерную мРНК можно количественно измерять способами, включающими гель-электрофорез (например, нозерн-блоттинг), денситометрию, флуоресценцию, люминесценцию, радиоактивность, чипы и/или полимеразную цепную реакцию (ПЦР). ПЦР обычно основывается на обратной транскрипции с получением маркерной кДНК из маркерной мРНК.

Предпочтительно экспрессия маркера количественно измеряется с использованием ПЦР. Предпочтительно экспрессия маркера количественно измеряется с использованием количественной ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией (кПЦР-РВ).

Предпочтительно кПЦР-РВ представляет собой кПЦР-РВ в реальном времени, в которой мРНК подвергается обратной транскрипции до матрицы - кДНК, и матрица - кДНК - экспоненциально амплифицируется и количественно измеряется посредством флуоресценции в реальном времени.

Количественное измерение экспрессии маркера может быть относительным или абсолютным.

В одном воплощении количественное измерение экспрессии маркера является относительным и основывается на измерении цикла количественного измерения (Cq),

который представляет собой цикл, где флуоресцентный сигнал пересекает порог для анализов кПЦР-РВ. С<sub>q</sub> обратно пропорционален экспрессии мРНК.

Относительное количественное измерение экспрессии маркера основывается на сравнении экспрессии маркера в опытной культуре клеток с экспрессией маркера в одной или более чем одной контрольной культуре (т.е. контроли).

«Контрольная культура» может представлять собой позитивный контроль или негативный контроль. Когда контрольная культура представляет собой позитивный контроль, данная контрольная культура клеток содержит PSC. Предпочтительно такая контрольная культура содержит известную долю PSC. То есть, в контрольную культуру «добавлен внутренний стандарт» с известной долей недифференцированных PSC, обеспечивая, посредством этого, сравнение между опытной культурой и контрольной культурой. В данном воплощении количественное измерение может быть и относительным (например, применение С<sub>q</sub> в качестве единицы количественного измерения), и абсолютным (например, применение С<sub>q</sub> к известному количеству). Это также может называться полуколичественным. Таким образом, меньшая экспрессия маркера в культуре тестируемых клеток, чем экспрессия маркера в контрольной культуре клеток показывает отсутствие остаточных, недифференцированных PSC в культивируемых клетках. В качестве альтернативы, меньшая экспрессия маркера в культуре тестируемых клеток, чем экспрессия маркера в контрольной культуре клеток показывает присутствие остаточных, недифференцированных PSC в культивируемых клетках, но присутствие в меньшей доле, чем известная доля PSC в контрольной культуре клеток.

Известная доля PSC в контрольной культуре клеток может составлять 0,000001%, 0,000005%, 0,00001%, 0,00005%, 0,0001%, 0,0005%, 0,0006%, 0,0007%, 0,0008%, 0,0009%, 0,001%, 0,002%, 0,003%, 0,004%, 0,005%, 0,006%, 0,007%, 0,008%, 0,009% или 0,01% от общего числа клеток. В предпочтительном воплощении известная доля PSC в контрольной культуре составляет 0,001% от общего числа клеток.

В некоторых воплощениях экспрессия маркера «нормируется», что компенсирует внутри- и межклеточные вариации (вариации от образца к образцу и от измерения к измерению). Нормированные данные являются особенно полезными при количественном измерении экспрессии гена с использованием кПЦР-РВ. Специалисту в данной области будут известны разные способы нормирования, включающие нормирование к одному или более чем одному подвергающемуся повышающей регуляции или конститутивному гену «домашнего хозяйства», например, GAPDH (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа), ACTB (актин В), LDHA (лактатдегидрогеназа А), NONO (октамерсвязывающий белок, не содержащий домен POU), PGK1 (фосфоглицераткиназа) или PPIH (пептидилпролилизомераза H), и нормирование к общей РНК. В одном воплощении экспрессия маркера нормируется к экспрессии GAPDH.

Для ПЦР требуются нуклеотидные праймеры. Специалисту в данной области будет понятно, как конструировать праймеры для ПЦР и кПЦР-РВ, и комбинации праймер/зонд для кПЦР-РВ. Праймеры для некоторых генов имеются в продаже. Комбинации праймер/зонд для некоторых генов также имеются в продаже. Например, имеются в продаже следующие анализы для экспрессии генов TaqMan®, все с каталожным № 4331182: анализ человеческого LIN28 (LIN28A) Hs00702808\_s1; анализ человеческого OCT4 (POU5F1) Hs04260367\_gH; анализ человеческого SOX2 Hs01053049\_s1; анализ человеческого FOXD3 Hs00255287\_s1; анализ человеческого NANOG Hs04399610\_g1; анализ человеческого PODXL (изоформы белка которого выявляются антителами TRA-

1-60 и TRA-1-81) Hs01574644; анализ человеческого REX1 (ZFP42) Hs01938187\_s1; анализ человеческого SSEA1 (FUT4) Hs01106466\_s1; анализ человеческого DPPA2 Hs00414515\_m1 и анализ человеческого DPPA3 Hs01931905\_g1.

Комбинации праймеров или праймеров/зондов могут быть легко сконструированы специалистом в данной области с использованием инструмента, доступного онлайн, например, комбинации праймеров/зондов могут быть сконструированы на заказ с использованием такого инструмента, как Custom TaqMan<sup>®</sup> Assay Design Tool или инструмент GenScript Real-time PCR (TaqMan<sup>®</sup>) Primer Design. Праймеры могут быть сконструированы с использованием таких инструментов как Primer3Plus или PrimerQuest Tool. Данные инструменты являются лишь примерами, и значительно больше легко доступно специалисту в данной области.

Альтернативно или дополнительно, комбинации праймеров или праймеров/зондов могут быть легко сконструированы на основе основных принципов, которые включают следующие соображения.

ПЦР включает цикл: денатурирования двухцепочечной ДНК-мишени; отжига праймеров с комплементарными областями одноцепочечной ДНК; элонгации ДНК посредством действия ДНК-полимеразы; и повторение часто около 50 циклов. Данные стадии являются температурочувствительными и обычно проводятся при 94°C, 60°C и 70°C соответственно. Хорошая конструкция праймеров является важной для успешных реакций. Важные соображения при конструировании включают:

1. длину праймера, часто 18-22 п.о.;
2. температуру плавления праймера (T<sub>m</sub>), часто в интервале 52-58°C;
3. температуру отжига праймера (T<sub>a</sub>);
4. содержание GC, часто 40-60%;
5. GC-кламп, т.е. основания G или C, расположенные в пределах последних пяти оснований от 3'-конца праймеров;
6. вторичные структуры праймера и матрицы, т.е. межмолекулярные или внутримолекулярные взаимодействия, например, шпильки, димеры с самим собой или перекрестные димеры;
7. двухнуклеотидные повторы;
8. длинные тяжи одного вида основания;
9. стабильность 3'-конца;
10. перекрестная гомология/специфичность;
11. длина ампликона, часто около 100 п.о. для кПЦР-РВ и около 500 п.о. для стандартной ПЦР;
12. T<sub>m</sub> продукта;
13. T<sub>m</sub> пары праймеров, часто меньше 5°C.

T<sub>m</sub> праймера может быть рассчитана следующим образом:  
 $T_m(K) = \{\Delta H / \Delta S + R \ln(C)\}$ , или  $T_m(^{\circ}C) = \{\Delta H / \Delta S + R \ln(C)\} - 273,15$ , где  
 $\Delta H$  (ккал/моль): H представляет собой энтальпию, и  $\Delta H$  представляет собой изменение энтальпии

$\Delta S$  (ккал/моль): S представляет собой энтропию, и  $\Delta S$  представляет собой изменение энтропии.

$\Delta S$  (солевая поправка) =  $\Delta S (1M NaCl) + 0,368 \times N \times \ln([Na+])$ , где  
 N представляет собой число пар нуклеотидов в праймере (длина праймера -1)  
 [Na+] представляет собой солевой эквивалент в mM  
 Расчет [Na+]:

[Na+] = концентрация одновалентного иона +4 × свободный Mg<sup>2+</sup>.



Та праймера может быть рассчитана следующим образом:

$$T_a = 0,3 \times T_m (\text{праймер}) + 0,7 T_m (\text{продукт}) - 14,9$$

Типичные кодирующие нуклеотидные последовательности для человеческого LIN28 (LIN28A), человеческого OCT4 (POU5F1), человеческого SOX2, человеческого FOXD3, человеческого NANOG, человеческого PODXL, человеческого REX1 (ZFP42), человеческого SSEA1 (FUT4), человеческого DPPA2 и человеческого DPPA3 предоставлены на Фиг. 5-14 и в SEQ ID NO: 5-14 соответственно. Данные последовательности могут быть использованы специалистом в данной области для конструирования праймеров и комбинаций праймер/зонд.

кПЦР-РВ основана на флуоресценции для количественного измерения экспрессии генов, например, экспрессии маркера. Такая флуоресценция может включать (1) неспецифичный флуоресцентный краситель, который внедряется в любую двухцепочечную ДНК, т.е. амплифицированный ПЦР-продукт, или (2) специфичный в отношении последовательности олигонуклеотидный зонд, меченный флуоресцентным репортером, который флуоресцирует только после гибридизации зонда с комплементарной ему последовательностью. Одним примером первого типа флуоресценции является SYBR® Green (CAS No. 163795-75-3). Обычно второй тип содержит гаситель, ковалентно присоединенный к 3'-концу зонда, который гасит флуоресцентный репортер, пока гаситель не высвобождается от зонда во время амплификации.

В одном воплощении способ выявления остаточных, недифференцированных PSC в культуре клеток, дифференцированных из PSC, раскрытый в данном документе, может дополнительно включать получение сообщения, описывающего долю остаточных, недифференцированных PSC, выявленных в культуре клеток, происходящих из PSC.

В одном воплощении способ выявления остаточных, недифференцированных PSC в культуре клеток, дифференцированных из PSC, раскрытый в данном документе, может дополнительно включать приготовление культуры клеток, происходящих от PSC, в которой остаточные, недифференцированные PSC отсутствуют или присутствуют в меньшей доле, чем известная доля в терапевтической композиции для введения субъекту. Данный способ может дополнительно включать лечение или предупреждение состояния у субъекта посредством введения данному субъекту культуры клеток, происходящих от PSC, в которой остаточные, недифференцированные PSC отсутствуют или присутствуют в меньшей доле, или терапевтической композиции, содержащей такие клетки, происходящих от PSC. Данное состояние может представлять собой следующие: кисты кости, новообразования кости, переломы, дефекты хряща, остеоартрит, повреждение связки, незавершенный остеогенез, остеонекроз, остеопороз, апластическая анемия, болезнь «трансплантат против хозяина», миелодиспластический синдром, диабет типа 1, диабет типа 2, аутоиммунный гепатит, цирроз печени, печеночная недостаточность, дилатационная кардиомиопатия, сердечная недостаточность, инфаркт миокарда, ишемия миокарда, болезнь Крона, язвенный колит, ожоги, буллезный эпидермолиз, красная волчанка, ревматоидный артрит, болезнь Шегрена, системный склероз, бронхолегочная дисплазия, хроническое обструктивное заболевание дыхательных путей, эмфизема, легочный фиброз, боковой амиотрофический склероз (ALS), болезнь Альцгеймера, травма мозга, атаксия, остеохондроз, множественная системная атрофия, рассеянный склероз, болезнь Паркинсона, пигментная дистрофия сетчатки, болезнь Ромберга, травма спинного мозга, инсульт, мышечная дистрофия, ишемия конечности, повреждение почки, волчаночный нефрит, эндометриоз и осложнения трансплантации костного мозга или солидного органа.

Термин «состояние» в том виде, в котором он здесь используется, включает состояние, заболевание или расстройство, и их симптом.

Термин «терапевтическая композиция» в том виде, в котором он здесь используется, относится к клеткам, происходящим от PSC, как здесь описано, которые были  
5 приготовлены для введения субъекту. Предпочтительно терапевтическая композиция является стерильной. Это легко осуществляется фильтрованием через мембраны для стерилизующего фильтрования. Предпочтительно терапевтическая композиция является апирогенной.

Термин «приготовление» в том виде, в котором он здесь используется, относится к  
10 смешиванию культуры клеток, в которой остаточные, недифференцированные PSC отсутствуют или присутствуют в меньшей доле, чем известная доля, с возможными фармацевтически приемлемыми носителями, эксципиентами или стабилизаторами и поддержанию жизнеспособности клеток. Приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы являются нетоксичными для субъектов-реципиентов при используемых  
15 дозировках и концентрациях, и могут включать: буферы, такие как фосфатный, цитратный и на основе других органических кислот; антиоксиданты, включающие аскорбиновую кислоту и метионин; низкомолекулярные (меньше, чем примерно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон;  
20 аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включающие глюкозу, маннозу или декстрины; хелаторы, такие как EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота); сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионные  
25 поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, PLURONICS™ или полиэтиленгликоль (PEG).

Приготовленная в виде препарата фармацевтическая композиция также может содержать другие активные соединения, как необходимо для конкретного показания, которое лечат, предпочтительно соединения с дополняющими активностями, которые  
30 не оказывают вредного влияния друг на друга. Данная композиция может содержать цитотоксический агент, цитокин и/или агент, ингибирующий рост. Такие молекулы подходящим образом присутствуют в комбинации в количествах, которые являются эффективными для намеченной цели.

Клетки, происходящие от PSC, в которых остаточные, недифференцированные PSC  
35 отсутствуют или присутствуют в меньшей доле, чем известная доля, или терапевтическая композиция, содержащая такие клетки, происходящие от PSC, могут вводиться до, во время или после наличия состояния. В одном воплощении клетки, происходящие от PSC, или терапевтическая композиция вводятся во время воспаления. Клетки, происходящие из PSC, могут вводиться (а) в качестве предупредительной меры, (б) как  
40 только было диагностировано состояние, (в) когда другие лечения не имели успеха и/или (г) когда состояние развилось до заранее определенной степени тяжести.

В одном воплощении клетки, происходящие из PSC, в которых остаточные, недифференцированные PSC отсутствуют или присутствуют в меньшей доле, чем известная доля, или терапевтическая композиция, содержащая такие клетки,  
45 происходящие от PSC, предварительно обрабатывают до введения. Предварительная обработка может осуществляться фактором роста или посредством редактирования генов, например, где фактор роста может примировать клетки, происходящие от PSC, и редактирование генов может придавать новое терапевтическое свойство клеткам,

происходящим из PSC.

5 Специалисту в данной области будет понятно то, что точный способ введения субъекту терапевтически эффективного количества клеток, происходящих из PSC, в которых остаточные, недифференцированные PSC отсутствуют или присутствуют в  
10 меньшей доле, чем известная доля, или терапевтической композиции, содержащей такие клетки, происходящие из PSC, будет осуществляться по решению лечащего врача со ссылкой на состояние, подлежащее лечению или предупреждению. На способ введения, включающий дозировку, комбинацию с другими агентами, расписание и частоту введения, и тому подобное может влиять диагноз вероятной восприимчивости субъекта  
15 на лечение клетками, происходящими из PSC, или терапевтической композицией, а также состояние и история заболевания субъекта.

Клетки, происходящие из PSC, в которых остаточные, недифференцированные PSC отсутствуют или присутствуют в меньшей доле, чем известная доля, будут приготовлены, дозированы и введены способом, согласующимся с надлежащей медицинской практикой.  
15 Факторы для рассмотрения в данном контексте включают конкретное состояние, которое лечат или предупреждают, конкретного субъекта, которого лечат, клинический статус субъекта, место введения, способ введения, схему введения, возможные побочные эффекты и другие факторы, известные практикующим врачам. Терапевтически эффективное количество клеток, происходящих из PSC, в которых остаточные,  
20 недифференцированные PSC отсутствуют или присутствуют в меньшей доле, чем известная доля, или терапевтической композиции, содержащей такие клетки, происходящие из PSC, подлежащее введению, будет определяться такими соображениями.

Клетки, происходящие из PSC, в которых остаточные, недифференцированные PSC отсутствуют или присутствуют в меньшей доле, чем известная доля, или терапевтическая  
25 композиция, содержащая такие клетки, происходящие из PSC, могут вводиться системно или периферически, например, путями, включающими внутривенный (в.в.), внутриартериальный, внутримышечный, внутрибрюшинный, интрацеребральный, подкожный (п.к.), внутрисуставной, интрасиновиальный, подбололочечный,  
30 внутрикоронарный, трансэндокардиальный, хирургическую имплантацию, местный и ингаляцию (например, внутрилегочную). Наиболее предпочтительно клетки, происходящие из PSC, или терапевтическая композиция вводится в.в. Клетки, происходящие из PSC, или терапевтическая композиция может вводиться в комбинации с каркасом биосовместимого вещества.

35 Термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству клеток, происходящих из PSC, в которых остаточные, недифференцированные PSC отсутствуют или присутствуют в меньшей доле, чем известная доля, или терапевтической композиции, содержащей такие клетки, происходящие от PSC, которое является эффективным для лечения состояния у субъекта.

40 Термины «лечить», «осуществление лечения» или «лечение» относятся как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или предупредительным мерам, где целью является предупреждение или уменьшение интенсивности состояния, заболевания или расстройства у субъекта, или замедление (ослабление) прогрессирования состояния, заболевания или расстройства у субъекта. Субъекты, нуждающиеся в лечении,  
45 включают субъектов уже с состоянием, заболеванием или расстройством, а также субъектов, у которых состояние, заболевание или расстройство подлежит предупреждению.

Термины «осуществление предупреждения», «предупреждение», «предупредительный»

или «профилактический» относятся к предотвращению появления или к препятствованию, защите от появления состояния, заболевания или расстройства, включая ненормальность или симптом. Субъект, нуждающийся в предупреждении, может быть склонным к развитию состояния, заболевания или расстройства.

5 Термин «уменьшать интенсивность» или «уменьшение интенсивности» относится к уменьшению, ослаблению или устранению состояния, заболевания или расстройства, включая ненормальность или симптом. Субъект, нуждающийся в лечении, уже может иметь состояние, заболевание или расстройство, или может быть склонен к тому, чтобы  
10 иметь состояние, заболевание или расстройство, или может представлять собой того, у кого состояние, заболевание или расстройство подлежит предупреждению.

Термин «субъект» в том виде, в котором он здесь используется, относится к млекопитающему. Млекопитающее может представлять собой примата, в частности, человека, или может быть домашним, содержащимся в зоопарке животным или животным-спутником. Хотя, в частности, и рассматривается то, что способ и  
15 образующиеся в результате его MSC или популяция MSC, раскрытые в данном документе, подходят для медицинского лечения человека, они также применимы для ветеринарного лечения, включающего лечение домашних животных, таких как лошади, крупный рогатый скот и овцы, животных-спутников, таких как собаки и кошки, или животных, содержащихся в зоопарке, таких как кошачьи, псовые, полорогие жвачные  
20 и копытные.

Также здесь раскрыта культура клеток, в которой остаточные, недифференцированные PSC отсутствуют или присутствуют в меньшей доле, чем известная доля, при выявлении способом по первому аспекту.

Также здесь раскрыта терапевтическая композиция, изготовленная способом по  
25 второму аспекту.

Также здесь раскрыт набор для выявления остаточных, недифференцированных плюрипотентных стволовых клеток (PSC) в культуре клеток, дифференцированных из PSC, содержащий:

ламинин-521; и  
30 E-кадгерин; и  
ингибитор ROCK.

В одном воплощении ингибитор ROCK представляет собой раскрытый здесь ингибитор ROCK.

В одном воплощении данный набор дополнительно содержит праймеры ПЦР и,  
35 возможно, зонд ПЦР для количественного измерения в культивируемых клетках экспрессии маркера остаточных, недифференцированных PSC. Праймеры и зонд ПЦР являются специфичными в отношении маркера остаточных, недифференцированных PSC. В одном воплощении праймеры и/или зонд ПЦР представляют собой раскрытые здесь праймеры и/или зонд ПЦР.

40 В одном воплощении данный набор содержит готовую к применению композицию для ПЦР, возможно кПЦР-РВ, именуемую «мастер-микс», содержащую компоненты для ПЦР, за исключением матрицы ДНК и праймеров, и, возможно, зонд. Данные компоненты могут включать буфер, дезоксинуклеотидтрифосфаты (дНТФ), Mg<sup>2+</sup> и полимеразу. Мастер-миксы имеются в продаже, например, мастер-микс 2X TaqMan®  
45 GE.

В другом воплощении данный набор дополнительно содержит среду. В одном воплощении данная среда представляет собой раскрытую здесь среду. В одном воплощении данная среда содержит ингибитор ROCK.

В другом воплощении данный набор дополнительно содержит субстрат. Такой субстрат подходит для культивирования клеток, дифференцированных из PSC, в которых подлежат выявлению остаточные, недифференцированные PSC. Предпочтительно данным субстратом является пластмассовая культуральная посуда, такая как чашка, 5 многолуночный планшет или колба. В одном воплощении субстрат покрыт ламинином-521 и E-кадгерином.

В одном воплощении набор содержит инструкцию по применению данного набора в способе, включающем:

10 культивирование клеток на субстрате, покрытом ламинином-521 и E-кадгерином, в среде, содержащей ингибитор ROCK;

количественное измерение экспрессии маркера в культивируемых клетках; и сравнение экспрессии маркера в культивируемых клетках с экспрессией маркера в контрольной культуре клеток, содержащей известную долю PSC,

15 где меньшая экспрессия маркера в культуре клеток, чем экспрессия маркера в контрольной культуре клеток показывает отсутствие остаточных, недифференцированных PSC в культивируемых клетках или присутствие остаточных, недифференцированных PSC в культивируемых клетках в меньшей доле, чем известная доля PSC в контрольной культуре клеток.

20 В одном воплощении набор содержит инструкцию по применению данного набора согласно способу по первому аспекту.

В другом воплощении набор используют согласно способу по первому аспекту. Это может указываться термином «при использовании».

25 В предпочтительном воплощении iPSC-MSC культивируются в течение 3 суток в среде E8, содержащей 10 мкМ Y27632, ингибитор ROCK, затем культивируются в течение 2 суток в отсутствие ингибитора ROCK, и экспрессия LIN28 количественно измеряется кПЦР-PB и нормируется к экспрессии GAPDH, обеспечивая выявление 0,001% остаточных, недифференцированных iPSC.

Другие определения, которые могут помочь в понимании настоящего раскрытия, в частности, примеров, включают следующие.

30 а) Анализ экспрессии генов (GE) TaqMan® (20×): тип анализа кПЦР-PB в реальном времени, доступный от Life Technologies, который разработан с использованием патентованных программного обеспечения и реактивов Applied Biosystems®. Данные анализы используют для количественного измерения специфических мРНК в образце и доступны в виде предварительно разработанных или сделанных на заказ анализов. 35 Анализы GE TaqMan® предоставляют в виде 20× смеси геноспецифичных праймеров и зонда.

1) Зонд FAM™/MGB-NFQ: флуоресцентная репортерная молекула (FAM: 6-карбоксифлуоресцеин), ковалентно присоединенная к 5'-концу зонда TaqMan®. MGB-NFQ представляет собой связыватель малой бороздки-нефлуоресцентную молекулу-гаситель, ковалентно присоединенную к 3'-концу зонда TaqMan®. Во время 40 амплификации зонд отщепляется, высвобождая репортер от гасителя. Образующийся флуоресцентный сигнал является пропорциональным концентрации мРНК в образце. Вместо FAM™ доступны другие флуоресцентные красители. VIC® обычно используется для эндогенных контрольных генов, используемых для нормирования, таких как 45 GAPDH.

б) 2× мастер-микс TaqMan® GE: содержит ДНК-полимеразу AmpliTaq Gold®, UP (ультрачистая) для активации горячего старта, смесь дНТФ с дТТФ/дУТФ и урацил-ДНК-гликозилазой (UDG) для минимизации переходящего загрязнения ПЦР, и

пассивный внутренний контроль на основе патентованного красителя ROX™.

в) кДНК: комплементарная ДНК, которая подвергается обратной транскрипции от мРНК с использованием обратной транскриптазы (ОТ).

г) мРНК: матричная РНК.

5 д) гДНК: геномная ДНК.

е) матрица: нуклеиновая кислота-мишень (например, кДНК), намеченная для амплификации посредством ПЦР.

ж) Общая РНК: сложная смесь видов РНК, включающая мРНК (~1-5%), рибосомальную РНК (рРНК) (~80%), транспортную РНК (тРНК) и микро РНК (миРНК).

10 Точная композиция варьирует, в зависимости от типа клеток.

з) РНКаза: рибонуклеаза - класс ферментов, которые разрушают РНК, и которые очень трудно инактивировать.

и) Эндогенный контрольный ген: ген позитивного контроля, который экспрессируется во всех типах образцов. GAPDH: глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа представляет собой обычный эндогенный контрольный ген, используемый для нормирования.

15 й) Ген-мишень: интересующий ген, который дифференциально экспрессируется в стволовых клетках по сравнению с дифференцированными клетками (например, в iPSC по сравнению с iPSC-MSC), такой как LIN28.

к) плюс ОТ и минус ОТ мастер-миксы: содержат необходимые реактивы для обратной транскрипции образцов общей РНК. Минус ОТ представляет собой негативный контроль, содержащий общую РНК, но не содержащий обратную транскриптазу. Образцы минус ОТ анализируют на загрязнение образцов общей РНК посредством гДНК.

25 л) Реакционные смеси плюс/минус ОТ: комбинация плюс/минус ОТ мастер-микса с каждым образцом общей РНК или контролем для обратной транскрипции.

м) Смесь для амплификации кДНК: комбинация 2× мастер-микса TaqMan® GE с каждой реакционной смесью плюс/минус ОТ.

н) Смесь для анализа GE (например, смесь для анализа LIN28 или GAPDH): комбинация 20× анализа TaqMan® GE с каждой смесью для амплификации кДНК для кПЦР-РВ в реальном времени.

о) Нематричный контроль (NTC): тип негативного контроля (NEG), в котором общая РНК заменяется водой в реакции кДНК плюс/минус ОТ. Используется для выявления загрязнения реактивов матрицами нуклеиновых кислот.

п) SNP: однонуклеотидный полиморфизм.

35 р) Cq: цикл количественного измерения (например, Cq(X) представляет собой цикл, где флуоресцентный сигнал пересекает пороговое значение для анализов кПЦР в реальном времени и кПЦР-РВ. Cq обратно связан с концентрацией мРНК. По мере увеличения Cq концентрация мРНК снижается и наоборот. «Cq(50)» показывает то, что было проведено 50 циклов. «Нет Cq(50)» показывает то, что за 50 циклов не было получено значение Cq.

#### ПРИМЕРЫ Пример 1 - получение iPSC-MSC Материалы

Таблица 1. Реактивы

Описание	Продавец / кат. № или № ссылки
Базовая среда DMEM/F12	Invitrogen / A1516901

	<b>Описание</b>	<b>Продавец / кат. № или № ссылки</b>
	Добавка E8	Invitrogen / A1517101
	витронектин	Life Technologies / A14700
5	коллаген IV	Sigma / C5533
	Ингибитор ROCK H-1152	EMD Millipore / 555550
	Ингибитор ROCK Y27632 дигидрохлорид	Tocris / 1254
	FGF2 (фактор роста фибробластов 2)	Waisman Biomanufacturing / WC-FGF2-FP
10	человеческий эндотелиальный-SFM	Life Technologies / 11111-044
	среда для размножения гематopoэтических стволовых клеток stemline II	Sigma / S0192
	GLUTAMAX	Invitrogen / 35050-061
	инсулин	Sigma / I9278
15	хлорид лития (LiCl)	Sigma / L4408
	раствор коллагена I	Sigma / C2249
	фибронектин	Life Technologies / 33016-015
	DMEM/F12	Invitrogen / 11330032
20	рекомбинантный человеческий BMP4	Peptotech / 120-05ET
	активин A	Peptotech / 120-14E
	среда Дульбекко, модифицированная по способу Исков (IMDM)	Invitrogen / 12200036
	Питательная смесь Хэма F12	Invitrogen / 21700075
25	бикарбонат натрия	Sigma / S5761
	L-аскорбиновой кислоты 2-фосфат Mg <sup>2+</sup>	Sigma / A8960
	1-тиоглицерин	Sigma / M6145
	селенит натрия	Sigma / S5261
	заменяемые аминокислоты	HyClone / SH30853.01
30	химически определенный липидный концентрат	Invitrogen / 11905031
	вода уровня качества для пересадки эмбриона	Sigma / W1503
	поливиниловый спирт (PVA)	MP Bio / 151-941-83
35	голо-трансферрин	Sigma / T0665
	ES-CULT M3120	Stem Cell Technologies / 03120
	бессывороточная среда для размножения STEMSPAN (SFEM)	Stem Cell Technologies / 09650
	L-аскорбиновая кислота	Sigma / A4544
40	PDGF-BB (фактор роста тромбоцитов-BB)	Peptotech / 110-14B

Реактивы, перечисленные в Таблице 1, известны специалисту в данной области и имеют принятые составы, например, IMDM и F12 Хэма. GLUTAMAX содержит дипептид L-аланил-L-глутамин, обычно поставляемый в концентрации 200 мМ в 0,85% NaCl. GLUTAMAX высвобождает L-глутамин при расщеплении культивируемыми клетками связи данного дипептида. Химически определенный липидный концентрат содержит 2 мг/л арахидоновой кислоты, 220 мг/л холестерина, 70 мг/л DL-альфа- токоферола ацетата, 10 мг/л линолевой кислоты, 10 мг/л линоленовой кислоты, 10 мг/л миристиновой кислоты, 10 мг/л олеиновой кислоты, 10 мг/л пальмитиновой кислоты, 10 мг/мл

пальмитоолеиновой кислоты, 90 г/л плуроника F-68, 10 мг/л стеариновой кислоты, 2,2 г/л TWEEN 80<sup>®</sup> и этиловый спирт. H-1152 и Y27632 являются высокоэффективными проницаемыми в клетку селективными ингибиторами ROCK (Rho-ассоциированная серин/треониновая протеинкиназа, образующая суперспираль).

Таблица 2. Среда IF6S (концентрация 10×)

10× IF6S	Количество	Конечная концентрация
IMDM	1 упаковка, порошок для 1 л	5×
питательная смесь Хэма F12	1 упаковка, порошок для 1 л	5×
бикарбонат натрия	4,2 г	21 мг/мл
L-аскорбиновой кислоты 2-фосфат Mg <sup>2+</sup>	128 мг	640 мкг/мл
1-тиоглицерин	80 мкл	4,6 мМ
селенит натрия (0,7 мг/мл)	24 мкл	84 нг/мл
GLUTAMAX	20 мл	10×
заменяемые аминокислоты	20 мл	10×
химически определенный липидный концентрат	4 мл	10×
вода уровня качества для пересадки эмбриона	до 200 mL	NA (не применимо)

Таблица 3. Среда IF9S (1× концентрация; на основе IF6S)

IF9S	Количество	Конечная концентрация
IF6S	5 мл	1×
поливиниловый спирт (PVA; 20 мг/мл)	25 мл	10 мг/мл
голотрансферрин (10,6 мг/мл)	50 мкл	10,6 мкг/мл
инсулин	100 мкл	20 мкг/мл
вода уровня качества для пересадки эмбриона	До 50 мл	NA

Таблица 4. Среда для дифференциации (1× концентрация; на основе IF9S)

Среда для дифференциации	Количество	Конечная концентрация
IF9S	36 мл	1×
FGF2	1,8 мкг	50 нг/мл
LiCl (2M)	36 мкл	2 мМ
BMP4 (100 мкг/мл)	18 мкл	50 нг/мл
Активин А (10 мг/мл)	5,4 мкл	1,5 нг/мл

Таблица 5. Мезенхимная колониеобразующая среда (1× концентрация)

M-CFM	Количество	Конечная концентрация
ES-CULT M3120	40 мл	40%
STEMSPAN SFEM	30 мл	30%
человеческий эндотелиальный-SFM	30 мл	30%
GLUTAMAX	1 мл	1×
L-аскорбиновая кислота (250 мМ)	100 мкл	250 мкл
LiCl (2M)	50 мкл	1 мМ
1-тиоглицерин (100 мМ)	100 мкл	100 мкл
FGF2	600 нг	20 нг/мл



Таблица 6. Мезенхимная бессывороточная среда для размножения (1× концентрация)

<b>M-SFEM</b>	<b>Количество</b>	<b>Конечная концентрация</b>
человеческий эндотелиальный-SFM	5 л	50%
STEMLINE II HSFM	5 л	50%
GLUTAMAX	100 мл	1×
1-тиоглицерин	87 мкл	100 мкМ
FGF2	100 мкг	10 нг/мл

#### Способ

1. Размораживали iPSC в полной среде E8 (базальная среда DMEM/F12 плюс добавка E8) плюс 1 мкМ N1152 на пластмассовой посуде, покрытой витронектином (0,5 мкг/см<sup>2</sup>). Инкубировали пересаженные на чашки iPSC при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub> (нормоксические).

2. Проводили три пассажа размноженных iPSC в полной среде E8 (без ингибитора ROCK) на пластмассовой посуде, покрытой витронектином (0,5 мкг/см<sup>2</sup>), и инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub> (нормоксические) до инициации процесса дифференциации.

3. Отбирали и высевали iPSC в виде одиночных клеток/маленьких колоний в плотности 5×10<sup>3</sup> клеток/см<sup>2</sup> на пластмассовую посуду, покрытую коллагеном IV (0,5 мкг/см<sup>2</sup>), в полной среде E8 плюс 10 мкМ Y27632 и инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub> (нормоксические) в течение 24 ч.

4. Заменяли полную среду E8 плюс 10 мкМ Y27632 средой для дифференциации и инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> (гипоксические) в течение 48 ч.

5. Отбирали колониеобразующие клетки из прикрепленной культуры в среде для дифференциации в виде суспензии одиночных клеток, переносили в суспензионную культуру с M-CFM и инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub> (нормоксические) в течение 12 суток.

6. Отбирали и высевали колонии (пассаж 0) на пластмассовую посуду, покрытую фибронектином/коллагеном I (0,67 мкг/см<sup>2</sup> фибронектина, 1,2 мкг/см<sup>2</sup> коллагена I) в M-SFEM и инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub> (нормоксические) в течение 3 суток.

7. Отбирали колонии и высевали в виде одиночных клеток (пассаж 1) в плотности 1,3×10<sup>4</sup> клеток/см<sup>2</sup> на пластмассовую посуду, покрытую фибронектином/коллагеном I, в M-SFEM и инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub> (нормоксические) в течение 3 суток.

8. Отбирали и высевали в виде одиночных клеток (пассаж 2) в плотности 1,3×10<sup>4</sup> клеток/см<sup>2</sup> на пластмассовую посуду, покрытую фибронектином/коллагеном I, в M-SFEM и инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub> (нормоксические) в течение 3 суток.

9. Отбирали и высевали в виде одиночных клеток (пассаж 3) в плотности 1,3×10<sup>4</sup> клеток/см<sup>2</sup> на пластмассовую посуду, покрытую фибронектином/коллагеном I, в M-SFEM и инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub> (нормоксические) в течение 3 суток.

10. Отбирали и высевали в виде одиночных клеток (пассаж 4) в плотности 1,3×10<sup>4</sup> клеток/см<sup>2</sup> на пластмассовую посуду, покрытую фибронектином/коллагеном I, в M-SFEM и инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub> (нормоксические) в течение 3 суток.

11. Отбирали и высевали в виде одиночных клеток (пассаж 5) в плотности  $1,3 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup> на пластмассовую посуду, покрытую фибронектином/коллагеном I, в M-SFEM и инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub> (нормоксические) в течение 3 суток.

12. Отбирали пассаж 5 (P5) iPSC-MSC в виде одиночных клеток и замораживали конечный продукт.

**Пример 2 - количественное измерение остаточных недифференцированных стволовых клеток посредством кПЦР-РВ**

### 1) ЦЕЛЬ

Данный типичный протокол описывает количественное измерение остаточных, недифференцированных iPSC посредством анализов экспрессии генов TagMan® (кПЦР-РВ). Несмотря на то, что в качестве примера приводится выявление недифференцированных iPSC среди iPSC-MSC с использованием экспрессии LIN28, данный протокол, в общем, применим к культуре клеток, происходящих от PSC, с использованием любого маркера PSC, дифференциально экспрессируемого в PSC, но не экспрессируемого в клетках, происходящих от PSC. Данный протокол предназначен для контроля качества клеток, происходящих от PSC, предназначенных для приготовления в виде терапевтической композиции.

### 2) МАТЕРИАЛЫ

а) Материалы для протокола для культуры размножения iPSC-MSC с ламинином-521/Е-кадгеринном:

i) Человеческий рекомбинантный ламинин-521 - LN521™, Biolamina, каталожный № LN521-03.

ii) Е-кадгерин, человеческий, рекомбинантный, Advanced BioMatrix, каталожный № 5085-0.1MG.

iii) Фосфатно-солевой буфер Дульбекко (1×) с Mg<sup>2+</sup> и Ca<sup>2+</sup> (DPBS++) (6 × 500 мл), Corning/Mediatech, каталожный № 21-030-CV или эквивалентный.

iv) Фосфатно-солевой буфер Дульбекко HyClone™ без Mg<sup>2+</sup> и Ca<sup>2+</sup>, раствор, (DPBS-), GE Healthcare Life Sciences, каталожный № SH30028 или эквивалентный.

v) Ингибитор ROCK Y27632, Sigma-Aldrich, каталожный № Y0503-1MG или Y0503-5MG

vi) Питательная среда 8™ (набор), Thermo Fisher Scientific, каталожный № A1517001.

(1) Базовая питательная среда 8™ (500 мл)

(2) Питательная добавка 8™ (Витронектин) (10 мл)

vii) Фермент TrypLE™ (1×), без фенолового красного (100 мл), Thermo Fisher Scientific, каталожный № 12563011.

viii) Диметилсульфоксид (DMSO), Sigma-Aldrich, каталожный № D2650.

ix) 75 см<sup>2</sup> прямоугольный флакон для культуры клеток со скошенным горлышком и вентилируемой крышкой Falcon®, Corning Life Sciences, каталожный №353136 или эквивалентный.

x) Скребок для клеток Falcon® с 25 см ручкой и 1,8 см лезвием, стерильный, Corning Life Sciences, каталожный № 353086 или эквивалентный.

xi) 0,4%-ный трипановый синий HyClone™, Thermo Fisher Scientific, каталожный № SV30084 или эквивалентный.

xii) Гемоцитометр с покровным стеклом, Reichert Right Line или эквивалентный.

б) Мини набор RNeasy® Protect Cell (50): QIAGEN®, каталожный № 74624. Состоит из двух продуктов QIAGEN®:

i) Реактив RNeasy® Protect Cell (коробка 1 из 2): разработан для культивируемых или

сортированных клеток. Может быть добавлен непосредственно к клеткам в культуральную среду. Останавливает картины экспрессии генов, давая немедленную стабилизацию общей РНК. Образцы можно хранить при 4°C, -20°C или архивировать при -80°C.

5 ii) Мини набор RNeasy® *Plus* (коробка 2 из 2): разработан для выделения общей РНК из целого ряда типов образцов. «*Plus*» указывает на то, что данный набор содержит колонки для устранения геномной ДНК (гДНК) и связанных с ней реактивов.

в) QIAshredder (50): каталожный № 79654 QIAGEN®. Требуется для гомогенизации клеточных лизатов для выделения РНК.

10 г) Набор ДНКазы, не содержащей РНКазы (50 препаратов), QIAGEN®, каталожный № 79254. Для обработки на мембране ДНКазой с использованием наборов для очистки РНК QIAGEN®.

д) Этанол (96-100%): Fisher BioReagents, уровень качества для молекулярной биологии, абсолютный (мера крепости 200), 100 мл, каталожный № BP2818100 Fisher Scientific  
15 или эквивалентный. Требуется для мини набора RNeasy® *Plus* от QIAGEN®.

е) ДНКазы UltraPure™/дистиллированная вода, не содержащая РНКазы, Life Technologies, каталожный № 10977-015 или эквивалентный.

ж) β-Меркаптоэтанол (β-МЕ) 14,3 М, Thermo Fisher Scientific, каталожный № BP176-100 или эквивалентный. Требуется для мини набора RNeasy® *Plus* от QIAGEN® для  
20 инактивации РНКаз.

з) Порошок для контроля биологически опасных жидкостей Safetec Green-Z™, Thermo Fisher Scientific, каталожный № 19-023-901. Для удаления реактива RNAprotect® Cell, который является опасным для окружающей среды.

и) Реактив для удаления загрязнений RNase AWAY™ (250 мл), Life Technologies, каталожный № 10328-011 или эквивалентный. Нанести готовый для применения раствор на поверхности, такие как лабораторные столы, пипетки, стеклянная или пластмассовая посуда. Промыть водой Milli-Q для устранения загрязнения РНКазой и ДНК.

й) Высокоэффективный набор RNA-to-cDNA™ (50): Thermo Fisher Scientific, каталожный № 4387406.

30 к) Ингибитор РНКазы SUPERase-In™: Thermo Fisher Scientific, каталожный № AM2694.

л) Мастер-микс для экспрессии генов TaqMan® (2×): Thermo Fisher Scientific, каталожный № 4369016 (1 упаковка, 5 мл: 200 × 50 мкл реакции).

м) Вода уровня качества для ПЦР-РВ Ambion®: Thermo Fisher Scientific, каталожный № AM9935 (10 × 1,5 мл) (предпочтительная) или эквивалентная. Примечание: AM9935  
35 является автоклавированной, фильтрованной на мембране и не обработанной DEPC. AM9935 тестируется на загрязнение прокариотической (16S рРНК) и эукариотической (18S рРНК) геномной ДНК посредством ПЦР в реальном времени. Она является сертифицированной, не содержащей РНКазы, не содержащей ДНКазы и не содержащей геномную ДНК.

40 н) Анализ(ы) экспрессии генов TaqMan®, который(рые) содержит(жат) 20×, готовую к применению смесь праймеров и зонда FAM/MGB-NFG в TE. FAM представляет собой самый обычный флуоресцентный репортер. (1× - 250 нМ зонд TaqMan плюс 900 нМ каждый ПЦР-праймер (прямой и обратный)). Каталожные номера, приведенные ниже, относятся к размеру анализа, изготовленного на заказ. Светочувствительные.

45 Предпочтительно хранить в виде аликвот для одноразового применения при -20°C в 1,5 мл антипригарных пробирках Ambion®.

и) Сделанные на заказ анализы экспрессии генов TaqMan® (20×, одна пробирка), Thermo Fisher Scientific, сделанные по заказу. (Заметьте то, что сделанные на заказ

анализы могут быть заказаны только с зондами FAM-MGB).

(1) Каталожный № 4331348 (маленький - 360 реакций по 20 мкл для кПЦР-РВ).

(2) Каталожный № 4332078 (средний - 750 реакций по 20 мкл для кПЦР-РВ).

ii) Сделанные на заказ анализы экспрессии гена LIN28 TaqMan®, Thermo Fisher Scientific; каталожный №: 4331348; ID анализа: AIVI48S; название анализа: LIN28. кПЦР-РВ; масштаб: малый: 360 реакций; сделанные на заказ. Это сконструированный по заказу анализ с известными последовательностями праймеров и зондов, как раскрыто в Kuroda, et al. (PLoS ONE 7, 1-9 (2012) *Highly Sensitive In Vitro Methods for Detection of Residual Undifferentiated Cells in Retinal Pigment Epithelial Cells Derived from Human iPS Cells*). Последовательность зонда LIN28 (5'→3') CGCATGGGGTTTCGGCTTCCTGTCC (SEQ ID NO: 14); последовательность прямого праймера LIN28 (5'→3') CACGGTGCGGGCATCTG (SEQ ID NO: 15); последовательность обратного праймера LIN28 (5'→3') CCTTCCATGTGCAGCTTACTC (SEQ ID NO: 16).

iii) Анализы эндогенного контроля TaqMan®: данные анализы были предварительно разработаны и могут быть инвентаризированы. Эндогенные контроли доступны с зондами FAM-MGB или VIC-MGB. Предпочтительно выбирают зонд VIC-MGB для отличия контрольного анализа от различающего анализа.

(1) Анализ экспрессии генов GAPDH (глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа) (символ гена: GAPDH, hCG2005673), Life Technologies; каталожный №: 4448489; ID анализа: Hs02758991\_g1 (зонд VIC-MGB); сделан на заказ. Анализ «наилучшего покрытия» был выбран из многих предварительно разработанных анализов GAPDH. Данный анализ охватывает интрон и, следовательно, не должен выявлять геномную ДНК.

o) Антипригарные, не содержащие РНКаз микроцентрифужные пробирки Ambion® (1,5 мл): Life Technologies; каталожный № AM12450. Примечание: 1,5 мл пробирки AM12450 имеют поверхность со слабым связыванием и являются сертифицированными, не содержащими РНКаз и не содержащими ДНКаз. Предпочтительно используются для хранения аликвот сделанного на заказ анализа GE TaqMan® (20×) и получения кДНК.

п) 1,5 мл микроцентрифужные пробирки с закручивающейся крышкой (Sarstedt 72.692.005): Fisher Scientific, каталожный № 50809238 или эквивалентный; коническое дно, стерильные с собранной крышкой с O-кольцом. Предпочтительно используются для получения амплификационных смесей кДНК. Винтовая крышка с наружной резьбой предотвращает образование аэрозолей, которые, в противном случае, могли бы вызвать загрязнение ПЦР.

р) Белые, 96-луночные окантованные ПЦР-планшеты с твердыми стенками и низким профилем: Bio-Rad, каталожный № HSP-9655. Белый планшет будет уменьшать фоновый шум и увеличивать флуоресцентный сигнал по сравнению с прозрачными 96-луночными планшетами и пробирками. Для данной процедуры не следует использовать полосатые пробирки.

с) Адгезивные запечатывающие средства Microseal 'B' (100): Bio-Rad, каталожный № MSB-1001. Это рекомендованное оптически прозрачное запечатывающее средство для твердотенных 96-луночных планшетов.

т) Запечатывающий ролик: Bio-Rad, каталожный № MSR-1001. Используется для запечатывания твердотенного 96-луночного планшета адгезивным запечатывающим средством Microseal 'B'.

у) Выявляющая система ПЦР в реальном времени Bio-Rad CFX96 с программой Bio-Rad CFX (ID 0394) или эквивалентной.

- ф) Микроцентрифуга Eppendorf MiniSpin Plus (ID 0569) или эквивалентная.  
 ц) Спектрофотометр, работающий в УФ (ультрафиолетовая) - видимой области Nanodrop 2000 (ID 0504), или эквивалентный.

### 3) МЕТОДИКА

5 а) **Получение конечного продукта iPSC-MSC P5 (1 флакон) для анализа кПЦР-РВ с использованием селективного размножения остаточных недифференцированных iPSC**

і) Данная методика селективно размножает недифференцированные iPSC на фоне iPSC-MSC для того, чтобы увеличивать чувствительность кПЦР-РВ в отношении остаточных недифференцированных iPSC.

10 іі) **Получение сред для культуры клеток:**

(1) Получение полной среды E8 (E8CM):

(а) Разморозить добавку E8 в течение ночи при 2-8°C.

(б) Удалить 10 мл базальной среды E8 из 500 мл бутылки.

15 (в) Добавить 10 мл добавки E8 к 490 мл базальной среды E8. Хорошо смешать и хранить при 2-8°C. Срок хранения составляет 2 недели после приготовления.

(2) Получение E8CM плюс 10 мкМ среды Y27632:

(а) Приготовить 10 мМ Y27632 посредством добавления 312 мкл DPBS - (без Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup>) к 1 мг Y27632. Аликвотировать и заморозить при -20°C.

20 (б) Добавить 1 мкл 10 мМ Y27632 в каждый мл E8CM для достижения конечной концентрации 10 мкМ Y27632 (например, 75 мкл 10 мМ Y27632 в 75 мл E8CM). Хранить при 4°C. Срок хранения составляет 2 недели после приготовления.

ііі) **Приготовление замораживающей среды (E8CM плюс 20% DMSO):**

25 (1) Приготовить 10 мл замораживающей среды следующим образом: объединить 8 мл E8CM с 2 мл DMSO. Перенести в 4°C для охлаждения перед применением.

(2) Добавить 1 мкл 10 мМ Y27632 в каждый мл E8CM для достижения конечной концентрации 10 мкМ Y27632 (например, 75 мкл 10 мМ Y27632 в 75 мл E8CM). Хранить при 4°C. Срок хранения составляет 2 недели после приготовления.

іііі) **Приготовление покрытия ламинин-521/Е-кадгерин (в DPBS++):**

30 (1) Разморозить ламинин-521 и Е-кадгерин в течение ночи при 2-8°C.

(2) Приготовить вещество покрытия (30 мл, требующихся для 2 × флакона T75):

Вещество	Конц.	Объем/см <sup>2</sup>	T75 – требующийся объем
DPBS++	1×	180 мкл	13,5 мл
Ламинин-521	100 мкг/мл	20 мкл	1,5 мл
Е-Кадгерин	500 мкг/мл	0,444 мкл	33,3 мкл

35 (3) Покрыть культуральную посуду (2 × флакона T75) и хранить при 2-8°C в течение по меньшей мере ночи до применения (срок хранения 1 месяц). Убедиться в том, что раствор покрытия покрывает всю культуральную область.

в) **Приготовление культуры для размножения**

40 (1) Минимум за 1 час до посева удалить вещество покрытия из флаконов и добавить 15 мл E8CM плюс 10 мкМ Y27632/T75. Дать уравновеситься при 37°C.

(2) Разморозить iPSC-MSC P5 на водяной бане при 37°C.

(3) Перенести содержимое флакона в 15 мл пробирку, содержащую 9 мл E8CM плюс 10 мкМ Y27632.

45 (4) Центрифугировать при 200 g в течение 5 минут.

(5) Отсосать супернатант и ресуспендировать осадок в 5 мл E8CM плюс 10 мкМ Y27632.

(6) Подсчитать клетки с использованием гемоцитометра. Оценочная концентрация

$5 \times 10^6$  клеток/5 мл -  $1 \times 10^6$  клеток/мл. Предложенное разведение в трипановом синем составляет 1:2. Рассчитать процент жизнеспособности.

(7) Рассчитать число клеток, требующееся для посева в каждый флакон T75 в плотности  $1,3 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup> или  $1 \times 10^5$  клеток/T75).

(8) Засеять флаконы, покрытые ламином-521/Е-кадгерином, рассчитанным числом клеток.

(9) Подпитывать клетки по следующей схеме: (а) Сутки 1 - нет подпитки.

(б) Сутки 2 - подпитать каждый флакон T75 15 мл E8CM плюс 10 мкМ Y27632. (в)

Сутки 3 - нет подпитки.

(г) Сутки 4 и 5 - подпитать каждый флакон T75 15 мл E8CM (без Y27632).

(10) Ежедневно проверять культуры на признаки микробного загрязнения (например, мутность). Отбрасывать любые загрязненные культуры и начинать заново со стадии 3) а).

**vi) Сбор (сутки 6 после посева)**

(1) Примечания: клетки трудно отделять от культуральной посуды, покрытой ламином-521/Е-кадгерином. Применение клеточных скребков рекомендуется для отделения всех клеток. Средняя плотность сбора составляет  $4 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup> или  $3 \times 10^6$  клеток/флакон T75. При сборе недостаточного числа клеток из одного флакона T75 (меньше  $2 \times 10^6$  клеток) может потребоваться сбор со второго T75.

(2) Отсосать ростовую среду и промыть флакон 10 мл DPBS--.

(3) Добавить во флакон T75 8 мл TrypLE. Инкубировать при 37°C в течение 15 минут.

(4) Решительно постучать по флакону для того, чтобы выбить клетки и перенести в 50 мл коническую пробирку (приблизительно 8 мл).

(5) Добавить во флакон 8 мл E8CM плюс 10 мкМ Y27632, всасывать в пипетку и выпускать из нее, и объединить с клеточной суспензией в 50 мл пробирке (всего 16 мл).

(6) Добавить во флакон 8 мл E8CM плюс 10 мкМ Y27632 и использовать стерильный одноразовый скребок для клеток для аккуратного соскабливания клеток. Собрать клетки посредством промывки средой соскобленной поверхности и объединить с клеточной суспензией (всего 24 мл).

(7) Повторить соскабливание после добавления во флакон дополнительных 8 мл E8CM плюс 10 мкМ Y27632. Собрать суспензию клеток, как описано выше (всего 32 мл).

(8) Центрифугировать клетки при 200 g в течение 10 минут. Отсосать супернатант.

(9) Ресуспендировать клеточный осадок в E8CM плюс 10 мкМ Y27632 и подсчитать клетки. Предложенный ресуспензионный объем составляет 2 мл с оценочной концентрацией  $3 \times 10^6$  клеток/2 мл -  $1,5 \times 10^6$  клеток/мл. Предложенное разведение в трипановом синем составляет 1:2. Для точного подсчета может потребоваться диссоциация на одиночные клетки с использованием наконечника 1 мл пипетки.

(а) Подсчитать клетки с использованием гемоцитометра.

(б) Требуемая процентная доля жизнеспособности составляет 70% или более.

Требуемый выход составляет  $2 \times 10^6$  клеток или более.

(10) Центрифугировать клетки при 200 g в течение 10 минут. Отсосать супернатант.

(11) Ресуспендировать клеточный осадок в E8CM при  $2 \times 10^6$  клеток/мл.

**vii) Заморозить клетки до анализа**

(1) Добавить равный объем замораживающей среды COLD (E8CM с 20% DMSO) для получения конечной концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл.

(2) Добавить 1 мл клеточной суспензии в каждый криофлаконт.

(3) Немедленно перенести криофлаконы в холодильник на  $-80^{\circ}\text{C}$ . (4) Перенести на следующие сутки в емкость с жидким азотом.

**б) Получение реактивов для набора RNeasy® Plus Mini:**

5 i) Получение промывочного раствора буфера RPE от QIAGEN®:

(1) Добавить 100% этанол, как указано на бутылки, в концентрат буфера RPE (т.е. 44 мл для набора RNeasy® Protect Cell Mini на 50 препаратов).

ii) Приготовление 70%-ного этанола:

10 (1) Объединить 7 мл 100%-ного этанола с 3 мл воды, не содержащей нуклеаз. Срок хранения - один месяц после приготовления.

iii) Получение лизирующего буфера для выделения общей РНК:

(1) Добавить 10 мкл  $\beta$ -меркаптоэтанола ( $\beta$ -МЕ) на 1 мл буфера RLT Plus до применения, используя химический вытяжной шкаф.

15 iv) Получение ДНКазы, не содержащей РНКаз, для набора ДНКазы, не содержащей РНКаз, от QIAGEN®:

(1) Добавить указанное количество воды, не содержащей РНКаз (т.е. 550 мкл) к лиофилизированной ДНКазе с использованием стерильной иглы и шприца. Осторожно ресуспендировать ДНКазу посредством переворачивания. Не встряхивать. Хранить разведенную ДНКазу при  $-20^{\circ}\text{C}$  в 20 мкл аликвотах, предпочтительно в антипригарных микроцентрифужных пробирках, не содержащих РНКаз, от Ambion®. Срок хранения разведенной ДНКазы составляет девять месяцев после приготовления. Хранить остальные компоненты набора при  $2-8^{\circ}\text{C}$ .

**в) Получение культивируемых клеток для выделения общей РНК с использованием реактива для клеток RNeasy Protect®**

25 i) Реактив для клеток RNeasy Protect® немедленно стабилизирует общую РНК в обработанных клетках, сохраняя профиль экспрессии генов. Данный реактив добавляют непосредственно к клеткам, в присутствии среды или без нее. Также могут быть приготовлены замороженные клетки в DMSO с использованием модифицированного протокола.

30 (1) Рекомендованное число клеток составляет  $1-2 \times 10^6$  клеток на общий минипрепарат РНК. Оно может увеличиваться до максимум  $5 \times 10^6$  клеток на минипрепарат без изменения объема реактивов. Для большего числа клеток обработайте многие минипрепараты или используйте методику для препаратов РНК среднего размера, следуя протоколу изготовителя.

(2) Используйте отношение 1 мл образца к 5 мл реактива для клеток RNeasy Protect®.

ii) Приготовьте подходящее число 15 мл пробирок, содержащих 5 мл реактива для клеток RNeasy Protect®.

40 iii) Замороженные клетки: поместить флаконы с замороженными клетками на сухой лед для предотвращения оттаивания. Не размораживать клетки до добавления реактивов. Обработать один флакон за раз для максимизации защиты РНК.

(1) Перенести ~750 мкл реактива для клеток RNeasy Protect® из одной 15 мл пробирки в криофлаконт с замороженными клетками, содержащий ~1 мл замораживающей среды. Довести объемы, как необходимо для других сценариев. Не переполнять.

45 (a) Использовать высококачественные наконечники пипеток с малым удерживанием для предотвращения потерь при пипетировании.

(2) Немедленно встряхнуть смесь в течение ~10 секунд. Быстро перенести частично оттаявшую смесь обратно в ту же самую 15 мл пробирку, содержащую реактив для клеток RNeasy Protect®.

(3) Повторять стадии 3) в) iii) (1) и 3) в) iii) (2), пока смесь полностью не оттает. На это уйдет 3-4 повтора.

(4) Хорошо перемешать посредством встряхивания, пока образец не станет гомогенным.

5 iv) Немедленно перейти к выделению общей РНК или хранить полученные образцы в реактиве для клеток RNeasy Protect<sup>®</sup>. Хранить образцы при 2-8°C в течение вплоть до 4 недель или архивировать при -20°C или -80°C.

г) **Приготовление клеточных лизатов для выделения общей РНК.**

10 i) При нахождении в замороженном состоянии разморозить клеточную смесь RNeasy Protect<sup>®</sup> при комнатной температуре без смешивания.

ii) Центрифугировать клеточную смесь RNeasy Protect<sup>®</sup> в течение 5 минут при 4000 об./мин (Sorvall ID 0018 или эквивалентная) для сбора клеток и любого осадка, который возможно образовался. Должен образоваться видимый белый осадок.

15 iii) Удалить столько супернатанта, сколько возможно, в контейнер для отходов. Постучать по пробирке или встряхнуть для разрыхления осадка. Это очень важно для полной солиubilизации на следующей стадии.

(1) Добавить 350 мкл свежеприготовленного буфера RLT Plus плюс β- меркаптоэтанол к осадку. Энергично встряхивать в течение 1-2 минут, пока осадок полностью не растворится. При необходимости данный лизат можно хранить при -80°C. Разморозить 20 при комнатной температуре и встряхнуть перед применением.

д) **Выделение общей РНК с использованием набора QIAGEN<sup>®</sup> RNeasy<sup>®</sup> Plus Mini.**

Все стадии проводятся при комнатной температуре. Выделить общую РНК из следующих криоконсервированных образцов. Разводить в 30 мкл воды, не содержащей нуклеаз.

25 №1: iPSC-MSC (неразмноженные) (контрольная культура)

№2: iPSC-MSC (размноженные) (контрольная культура)

№3: iPSC-MSC плюс 0,001% внутреннего стандарта iPSC (неразмноженные) (контрольная культура)

30 №4: iPSC-MSC плюс 0,001% внутреннего стандарта iPSC (размноженные) (контрольная культура)

№5: iPSC-MSC P5 конечный продукт (неразмноженные)

№6: iPSC-MSC P5 конечный продукт (размноженные)

35 i) Перенести лизат в QIAshredder. Центрифугировать на полной скорости в течение 2 минут для приложения усилия сдвига и гомогенизации лизата. На дне пробирки для сбора может образоваться тонкий круглый осадок.

ii) Перенести гомогенизированный лизат в собранную центрифугируемую колонку gDNA Eliminator, избегая любого осажденного вещества. Центрифугировать на полной скорости в течение 30 секунд. При необходимости, повторять, пока весь лизат не пройдет через центрифугируемую колонку.

40 iii) Добавить 350 мкл 70%-ного этанола в элюат и хорошо перемешать пипетированием. Не центрифугировать. Немедленно перенести данную смесь в собранную центрифугируемую колонку RNeasy<sup>®</sup> с любым осадком, который возможно образовался.

45 iv) Осторожно закрыть крышку и центрифугировать на полной скорости в течение 15 секунд. Отбросить элюат из пробирки для сбора. РНК теперь связана с центрифугируемой колонкой RNeasy<sup>®</sup>.

v) Обработка ДНКазой на мембране:

(1) Для максимального удаления геномной ДНК связавшуюся РНК обрабатывают



ДНКазой, не содержащей РНКаз.

(а) Добавить 350 мкл буфера RW1 в центрифугируемую колонку. Осторожно закрыть крышку и центрифугировать на полной скорости в течение 15 секунд. Отбросить элюат из пробирки для сбора.

5 (б) Для каждого образца объединить 20 мкл разведенной ДНКазы, 140 мкл буфера RDD и 2 мкл SUPERase. In™. Осторожно смешать пипетированием и объединить все в одной пробирке. Не встряхивать.

(в) Отобрать пипеткой 80 мкл смеси ДНКазы непосредственно в центр мембраны RNeasy®. Инкубировать при комнатной температуре в течение 20 минут.

10 (г) Добавить 350 мкл буфера RW1 в центрифугируемую колонку. Осторожно закрыть крышку и центрифугировать на полной скорости в течение 15 секунд. Отбросить элюат из пробирки для сбора.

15 vi) Добавить 500 мкл буфера RPE в центрифугируемую колонку. Осторожно закрыть крышку и центрифугировать на полной скорости в течение 15 секунд. Отбросить элюат из пробирки для сбора.

vii) Повторить промывку добавлением 500 мкл буфера RPE в центрифугируемую колонку. Осторожно закрыть крышку и центрифугировать на полной скорости в течение 2 минут.

viii) Перенести центрифугируемую колонку в свежую 2 мл пробирку для сбора.

20 Центрифугировать на полной скорости в течение 1 минуты для удаления любого остаточного промывочного раствора.

ix) Перенести центрифугируемую колонку в 1,5 мл пробирку для сбора. Добавить 30 мкл воды, не содержащей РНКаз, непосредственно на мембрану. Осторожно закрыть крышку и центрифугировать на полной скорости в течение 1 минуты для элюции РНК.

25 х) Отбросить центрифугируемую колонку и закрыть крышкой пробирку. Пометить пробирку датой и ID (идентификационный номер) образца.

xi) Нормировать объем каждого образца общей РНК до 30 мкл.

(1) Установить пипетку 10-100 мкл на 30 мкл и измерить объем элюата.

30 (2) Если объем меньше, чем 30 мкл, добавить воду, не содержащую нуклеаз, из набора RNeasy® до конечного объема 30 мкл.

(3) Образец теперь нормирован по отношению к исходному числу клеток.

xii) Определить общую концентрацию РНК для каждого образца с использованием Nanodrop 2000.

35 (1) Очистить основание образца водой Milli-Q до запуска программы для удаления любого потенциального загрязнения от предыдущего использования.

(2) Как только запускается программа, снять отметку с поля поправка на фон 340 нм.

(3) Очистить прибор водой Milli-Q.

40 (4) Проанализировать образец воды Milli-Q для убеждения в том, что фон равен нулю. Если необходимо, повторно очистить основание образца водой Milli-Q.

(5) Определить общую концентрацию РНК каждого образца с использованием одного определения.

(6) Рассчитать общий выход РНК и выход на клетку.

45 (7) Рассчитать объем 1,0-2,0 мкг общей РНК для каждого образца. (Максимум 2,0 мкг общей РНК может быть подвергнуто обратной транскрипции на реакцию кДНК).

(8) Концентрация общей РНК должна составлять 100 нг/мкл или более для удовлетворения требования 1 мкг общей РНК на 10 мкл (максимальный объем) для обратной транскрипции. Повторно выделить общую РНК из свежего флакона с

клетками, если необходимо.

Ожидаемый выход общей РНК на  $1 \times 10^6$  криоконсервированных iPSC-MSC составляет ~5-10 мкг. Это эквивалентно ~5-10 пг общей РНК на клетку.

xiii) Перейти к синтезу кДНК или хранить общую РНК при  $-20^\circ\text{C}$  в течение вплоть до 1 года.

**е) Получение кДНК с использованием высокоэффективного набора RNA-to-cDNA™**

i) Для каждого образца общей РНК приготовить кДНК плюс/минус ОТ с использованием 1 мкг общей РНК / 22 мкл ОТ. Включить контроли H<sub>2</sub>O (NTC) плюс/минус ОТ (N равно 14).

ii) Разморозить компоненты набора на льду.

iii) Приготовить один плюс ОТ и один минус ОТ мастер-микс на льду, в зависимости от числа образцов общей РНК, подлежащих анализу. Образцы минус ОТ служат в качестве негативных контролей, не имеющих обратной транскриптазы. Включить контроли H<sub>2</sub>O (NTC) плюс/минус ОТ посредством замены общей РНК водой уровня качества для ПЦР-ОТ.

iv) Получить индивидуальные реакционные смеси плюс/минус ОТ на льду для каждого образца общей РНК.

(1) Максимальный объем общей ДНК составляет 10 мкл на 22 мкл плюс/минус ОТ. Объем общей РНК будет варьировать, в зависимости от концентрации общей РНК.

(2) Рассчитать объем воды уровня качества для ПЦР-ОТ для каждой пробирки путем вычитания объема общей РНК из 10 мкл.

(3) Перенести пипеткой подходящий объем воды уровня качества для ПЦР-ОТ в каждую пробирку. Использовать 10 мкл для контролей с H<sub>2</sub>O плюс/минус ОТ.

(4) Добавить подходящий объем общей РНК в каждую пробирку.

(5) Добавить 12 мкл плюс ОТ или минус ОТ мастер-микса в каждую пробирку и осторожно смешивать пипетированием.

v) Инкубировать при  $37^\circ\text{C}$  в течение 60 минут.

vi) Инактивировать нагреванием при  $95^\circ\text{C}$  в течение 5 минут.

vii) Кратковременно центрифугировать пробирки для сбора кДНК.

viii) Измерить объем кДНК с использованием калиброванной пипетки на 10-100 мкл.

(1) Установить объем пипетки на реакционный объем кДНК (20-22 мкл) и измерить объем кДНК.

(2) Довести объем кДНК до 100 мкл водой, не содержащей нуклеаз. Это разбавит ингибиторы и даст достаточное количество кДНК для многих анализов кПЦР-РВ.

ix) Смешать посредством встряхивания и кратковременно осадить образцы центрифугированием.

x) Перейти к кПЦР-РВ или хранить при  $-20^\circ\text{C}$ .

**ж) кПЦР-РВ (анализы экспрессии генов TaqMan®)**

i) Для каждой кДНК (N равно 14) амплифицировать 50 нг кДНК (эквивалентов общей РНК) на 20 мкл кПЦР-РВ для LIN28 и GAPDH (N равно 3 для каждого). Провести кПЦР-РВ с использованием 50 циклов. (Файл протокола: TaqMan qRT-PCR Assays Cq (50).prcl).

ii) Приготовить смесь для амплификации кДНК для каждой кДНК плюс ОТ и минус ОТ, в зависимости от числа повторов и числа анализов GE TaqMan®, подлежащих проведению.

(1) Рекомендованное максимальное количество кДНК на реакцию составляет 100 нг (эквивалентов общей РНК).

iii) Приготовить смесь для анализа GE для каждой кДНК, в зависимости от числа анализов GE TaqMan® и повторов. Одна смесь для анализа GE будет получена для каждой кДНК и каждого анализа GE TaqMan®, подлежащего проведению.

iv) Перенести 20 мкл каждой смеси для анализа GE в белый планшет CFX96 и запечатать оптическим приспособлением для запечатывания планшетов.

v) Центрифугировать планшет при 400 об./мин в течение 1 минуты в центрифуге с адаптером для планшетов (ID #0018) для сбора содержимого на дне лунок.

vi) Осторожно поместить планшет в термоциклер, будучи осторожным, чтобы не встряхивать содержимое лунок.

vii) Запрограммировать систему выявления ПЦР в реальном времени Bio-Rad CFX96 с использованием программы Bio-Rad CFX Manager™ на присоединенном компьютере со следующими параметрами термоциклирования:

(1) 2 минуты при 50,0°C (инкубация UNG; требуется для оптимальной активности урацил-N-гликозилазы; деградирует ранее амплифицированные ПЦР- продукты с включением дУТФ с уменьшением загрязнения ПЦР).

(2) 10 минут при 95°C (горячий старт: AmpliTaq Gold®, активация полимеразы UP).

(3) [15 секунд при 95°C (денатурация) плюс 1 минута при 60°C (отжиг/элонгация) плюс считывание планшета] - повторить 49 раз за 50 циклов (амплификация и выявление в реальном времени).

viii) Установить объем образца 20 мкл.

ix) Оценочное время прогона должно составлять 01:59:00 ч.

x) Считать все лунки и все каналы во время прогона для убеждения в том, что во время прогона отбираются все данные.

(1) Установки предварительного просмотра, расположенные выше схемы планшета, должны быть следующими:

(a) Флуорофоры: FAM, HEX, тexasский красный, Cy5, Quasar 705 (VIC может быть добавлен позднее)

(б) Тип планшета: BR белый

(в) Способ сканирования: все каналы

xi) Все лунки должны быть помечены «Unk», указывая то, что программа рассматривает все лунки как неизвестные во время прогона. Реальная схема планшета будет установлена после завершения прогона.

xii) Нажмите Next для перехода к вкладке Start Run. Введите идентификационную информацию о прогоне в разделе Notes.

xiii) Нажмите на кнопку Start Run для начала кПЦР-РВ.

### з) Анализ данных

i) Окно анализа данных будет открыто в конце прогона.

(1) Данные кПЦР-РВ приводятся в виде значений Cq (т.е. Cq(50)).

ii) Нажмите на кнопку Plate Setup сверху, на правой стороне окна.

(1) Выберите View/Edit Plate. Следуйте руководству по загрузке планшета для установки для планшета информации об образце.

(a) Очистите любые пустые лунки.

(б) Не ставьте метку «Exclude Wells in Analysis». Должны быть проанализированы все данные.

(2) Нажмите на ОК и сохраните файл.

iii) Нажмите на вкладку Quantification около верхней части окна.

iv) Отметьте следующие установки:

(1) Способ определения Cq: один порог

(2) Установка фонового уровня: аппроксимация кривой с вычитанием фона

(3) Способ анализа: флуорофор

v) Генерировать отчет из меню Tools со следующими разделами и ассоциированными подразделами: Header, Run Setup, Quantification и QC Parameters.

5 (1) Снимите выделение с опций Gene Expression, Allelic Discrimination и End Point, так как данные разделы не являются релевантными.

vi) Экспортировать данные для анализа посредством выбора Export > "Export All Data Sheets to Excel". Это будет давать данные в формате крупноформатной таблицы.

vii) Анализировать данные с использованием крупноформатной таблицы.

10 (1) Сообщить «N/A» (не доступно) в виде «Нет Cq(50)».

(2) Рассчитать средн. Cq(50) и % относительного стандартного отклонения (RSD или коэффициент вариации (CV)) для каждого набора данных LIN28 и GAPDH плюс/минус ОТ.

(3) Нормировать средн. значения Cq(50) посредством вычитания средн. Cq(50) GAPDH 15 (N равно 3) из средн. Cq(50) LIN28 (N равно 3).

(4) Рассчитать средн. Cq(50) GAPDH и %RSD для всех образцов.

(5) Сравнить нормированные средн. значения Cq(50) образцов №2 (iPSC-MSC (размноженные) и №4 (iPSC-MSC плюс 0,001% внутреннего стандарта iPSC (размноженные)). Сравнить нормированные средн. значения Cq(50) образцов №4 (iPSC-MSC 20 плюс 0,001% внутреннего стандарта iPSC (размноженные)) и №6 (конечный продукт - iPSC-MSC P5 (размноженные)).

#### 4) КРИТЕРИИ ПРИНЯТИЯ

а) Нормированное средн. значение Cq(50) образца №2 (iPSC-MSC (размноженные)) должно быть больше, чем нормированное средн. значение Cq(50) образца №4 (iPSC-MSC 25 плюс 0,001% внутреннего стандарта iPSC (размноженные)). Это демонстрирует то, что 0,001% внутреннего стандарта iPSC (размноженные) может быть выявлено выше фона.

*Таблица 7. Ожидаемые средн. норм. значения Cq(50) для контрольных культур для конечного продукта iPSC-MSC P5.*

30

№ образца	Внутренний стандарт	Размножение	Ожидаемое средн. норм. Cq(50)*
1	Нет	Нет	15,16 ± 0,29
2	Нет	Да	19,85 ± 0,17
3	0,001% iPSC	Нет	14,93 ± 0,06
4	0,001% iPSC	Да	13,86 ± 0,07

35

40 \* Норм. Cq(50) LIN28 = (Cq(50) LIN28 - Cq(50) GAPDH) +/- станд. отклон. (N равно 3×3)

б) %RSD Cq(50) GAPDH для всех образцов должен составлять 5% или меньше. %RSD для всех средних значений Cq(50) и нормированных значений Cq(50) должен составлять 5% или меньше.

45

в) Контроли H<sub>2</sub>O (NTC) (плюс/минус ОТ) не должны давать выявляемый амплификационный сигнал в пределах 50 циклов амплификации для всех повторностей.

и) Если любому из контролей H<sub>2</sub>O (NTC) (плюс/минус ОТ) приписывается значение Cq(50), повторите анализы кПЦР-РВ TaqMan® со стадии 2) ж). Это указывает на загрязнение реактивов матричной ДНК.

**Пример 3 - результаты протокола, проведенного согласно Примеру 2**

*Таблица 8. Средн. норм. значения Cq(50) протокола, проведенного согласно Примеру 2, для контрольных культур и конечного продукта - iPSC-MSC P5.*

№ образца	Описание	Средн. норм. Cq(50): iPSC-MSC-P5		
		Культура 1	Культура 2	Культура 3
1	iPSC-MSC (неразмноженные) (контрольная культура)	15,23	15,33	14,73
2	iPSC-MSC (размноженные) (контрольная культура)	19,97	21,51	20,53
3	iPSC-MSC плюс 0,001% внутренний стандарт iPSC (неразмноженные) (контрольная культура)	14,90	15,02	14,69
4	iPSC-MSC плюс 0,001% внутренний стандарт iPSC (размноженные) (контрольная культура)	14,30	14,20	13,99
5	iPSC-MSC P5 конечный продукт (неразмноженные)	15,97	15,42	14,09
6	iPSC-MSC P5 конечный продукт (размноженные)	20,46	21,06	20,72

**Пример 4 - количественное измерение остаточных, недифференцированных стволовых клеток посредством кПЦР-РВ**

Данный пример описывает количественное измерение остаточных, недифференцированных iPSC по существу посредством протокола Примера 2, но LIN28 заменяют на OCT4 (POU5F1). Предполагаемые результаты согласуются с Примером 2, Таблицей 7 и Примером 3, Таблицей 8.

**Пример 5 - количественное измерение остаточных, недифференцированных стволовых клеток посредством кПЦР-РВ**

Данный пример описывает количественное измерение остаточных, недифференцированных iPSC по существу посредством протокола Примера 2, но LIN28 заменяют на SOX2. Предполагаемые результаты согласуются с Примером 2, Таблицей 7 и Примером 3, Таблицей 8.

**Пример 6 - количественное измерение остаточных, недифференцированных стволовых клеток посредством кПЦР-РВ**

Данный пример описывает количественное измерение остаточных, недифференцированных iPSC по существу посредством протокола Примера 2, но LIN28 заменяют на FOXD3. Предполагаемые результаты согласуются с Примером 2, Таблицей

7 и Примером 3, Таблицей 8.

**Пример 7 - количественное измерение остаточных, недифференцированных стволовых клеток посредством кПЦР-РВ**

5 Данный пример описывает количественное измерение остаточных, недифференцированных iPSC по существу посредством протокола Примера 2, но LIN28 заменяют NANOG. Предполагаемые результаты согласуются с Примером 2, Таблицей 7 и Примером 3, Таблицей 8.

**Пример 8 - количественное измерение остаточных, недифференцированных стволовых клеток посредством кПЦР-РВ**

10 Данный пример описывает количественное измерение остаточных, недифференцированных iPSC по существу посредством протокола Примера 2, но LIN28 заменяют PODXL. Предполагаемые результаты согласуются с Примером 2, Таблицей 7 и Примером 3, Таблицей 8.

**Пример 9 - количественное измерение остаточных, недифференцированных стволовых клеток посредством кПЦР-РВ**

15 Данный пример описывает количественное измерение остаточных, недифференцированных iPSC по существу посредством протокола Примера 2, но LIN28 заменяют на REX1 (ZFP42). Предполагаемые результаты согласуются с Примером 2, Таблицей 7 и Примером 3, Таблицей 8.

**Пример 10 - количественное измерение остаточных, недифференцированных стволовых клеток посредством кПЦР-РВ**

20 Данный пример описывает количественное измерение остаточных, недифференцированных iPSC по существу посредством протокола Примера 2, но LIN28 заменяют на SSEA1 (FUT4). Предполагаемые результаты согласуются с Примером 2, Таблицей 7 и Примером 3, Таблицей 8.

**Пример 11 - количественное измерение остаточных, недифференцированных стволовых клеток посредством кПЦР-РВ**

30 Данный пример описывает количественное измерение остаточных, недифференцированных iPSC по существу посредством протокола Примера 2, но LIN28 заменяют на SSEA4. Предполагаемые результаты согласуются с Примером 2, Таблицей 7 и Примером 3, Таблицей 8.

**Пример 12 - количественное измерение остаточных, недифференцированных стволовых клеток посредством кПЦР-РВ**

35 Данный пример описывает количественное измерение остаточных, недифференцированных iPSC по существу посредством протокола Примера 2, но LIN28 заменяют на DPPA2. Предполагаемые результаты согласуются с Примером 2, Таблицей 7 и Примером 3, Таблицей 8.

**Пример 13 - количественное измерение остаточных, недифференцированных стволовых клеток посредством кПЦР-РВ**

40 Данный пример описывает количественное измерение остаточных, недифференцированных iPSC по существу посредством протокола Примера 2, но LIN28 заменяют на DPPA3. Предполагаемые результаты согласуются с Примером 2, Таблицей 7 и Примером 3, Таблицей 8.

#### СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

45

#### SEQUENCE LISTING

<110> Cynata Therapeutics Limited  
 <120> PLURIPOTENT STEM CELL ASSAY  
 <130> P104383.PCT

<150> AU 2016904679  
 <151> 2016-11-16  
 <160> 14  
 <170> PatentIn version 3.5  
 5 <210> 1  
 <211> 3695  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> laminin-521 alpha chain  
 10 Met Ala Lys Arg Leu Cys Ala Gly Ser Ala Leu Cys Val Arg Gly Pro  
 1 5 10 15  
 Arg Gly Pro Ala Pro Leu Leu Leu Val Gly Leu Ala Leu Leu Gly Ala  
 20 25 30  
 Ala Arg Ala Arg Glu Glu Ala Gly Gly Gly Phe Ser Leu His Pro Pro  
 15 35 40 45  
 Tyr Phe Asn Leu Ala Glu Gly Ala Arg Ile Ala Ala Ser Ala Thr Cys  
 50 55 60  
 Gly Glu Glu Ala Pro Ala Arg Gly Ser Pro Arg Pro Thr Glu Asp Leu  
 65 70 75 80  
 20 Tyr Cys Lys Leu Val Gly Gly Pro Val Ala Gly Gly Asp Pro Asn Gln  
 85 90 95  
 Thr Ile Arg Gly Gln Tyr Cys Asp Ile Cys Thr Ala Ala Asn Ser Asn  
 100 105 110  
 Lys Ala His Pro Ala Ser Asn Ala Ile Asp Gly Thr Glu Arg Trp Trp  
 25 115 120 125  
 Gln Ser Pro Pro Leu Ser Arg Gly Leu Glu Tyr Asn Glu Val Asn Val  
 130 135 140  
 Thr Leu Asp Leu Gly Gln Val Phe His Val Ala Tyr Val Leu Ile Lys  
 145 150 155 160  
 30 Phe Ala Asn Ser Pro Arg Pro Asp Leu Trp Val Leu Glu Arg Ser Met  
 165 170 175  
 Asp Phe Gly Arg Thr Tyr Gln Pro Trp Gln Phe Phe Ala Ser Ser Lys  
 180 185 190  
 Arg Asp Cys Leu Glu Arg Phe Gly Pro Gln Thr Leu Glu Arg Ile Thr  
 35 195 200 205  
 Arg Asp Asp Ala Ala Ile Cys Thr Thr Glu Tyr Ser Arg Ile Val Pro  
 210 215 220  
 Leu Glu Asn Gly Glu Ile Val Val Ser Leu Val Asn Gly Arg Pro Gly  
 225 230 235 240  
 40 Ala Met Asn Phe Ser Tyr Ser Pro Leu Leu Arg Glu Phe Thr Lys Ala  
 245 250 255  
 Thr Asn Val Arg Leu Arg Phe Leu Arg Thr Asn Thr Leu Leu Gly His  
 260 265 270  
 Leu Met Gly Lys Ala Leu Arg Asp Pro Thr Val Thr Arg Arg Tyr Tyr  
 45 275 280 285  
 Tyr Ser Ile Lys Asp Ile Ser Ile Gly Gly Arg Cys Val Cys His Gly  
 290 295 300  
 His Ala Asp Ala Cys Asp Ala Lys Asp Pro Thr Asp Pro Phe Arg Leu

RU 2758006 C2

	305				310					315					320	
	Gln	Cys	Thr	Cys	Gln	His	Asn	Thr	Cys	Gly	Gly	Thr	Cys	Asp	Arg	Cys
					325					330					335	
	Cys	Pro	Gly	Phe	Asn	Gln	Gln	Pro	Trp	Lys	Pro	Ala	Thr	Ala	Asn	Ser
5					340					345					350	
	Ala	Asn	Glu	Cys	Gln	Ser	Cys	Asn	Cys	Tyr	Gly	His	Ala	Thr	Asp	Cys
					355					360					365	
	Tyr	Tyr	Asp	Pro	Glu	Val	Asp	Arg	Arg	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Leu	Asp
					370					375					380	
10	Gly	Thr	Tyr	Gln	Gly	Gly	Gly	Val	Cys	Ile	Asp	Cys	Gln	His	His	Thr
	385									390					395	400
	Thr	Gly	Val	Asn	Cys	Glu	Arg	Cys	Leu	Pro	Gly	Phe	Tyr	Arg	Ser	Pro
					405					410					415	
	Asn	His	Pro	Leu	Asp	Ser	Pro	His	Val	Cys	Arg	Arg	Cys	Asn	Cys	Glu
15					420					425					430	
	Ser	Asp	Phe	Thr	Asp	Gly	Thr	Cys	Glu	Asp	Leu	Thr	Gly	Arg	Cys	Tyr
					435					440					445	
	Cys	Arg	Pro	Asn	Phe	Ser	Gly	Glu	Arg	Cys	Asp	Val	Cys	Ala	Glu	Gly
					450					455					460	
20	Phe	Thr	Gly	Phe	Pro	Ser	Cys	Tyr	Pro	Thr	Pro	Ser	Ser	Ser	Asn	Asp
	465									470					475	480
	Thr	Arg	Glu	Gln	Val	Leu	Pro	Ala	Gly	Gln	Ile	Val	Asn	Cys	Asp	Cys
					485					490					495	
	Ser	Ala	Ala	Gly	Thr	Gln	Gly	Asn	Ala	Cys	Arg	Lys	Asp	Pro	Arg	Val
25					500					505					510	
	Gly	Arg	Cys	Leu	Cys	Lys	Pro	Asn	Phe	Gln	Gly	Thr	His	Cys	Glu	Leu
					515					520					525	
	Cys	Ala	Pro	Gly	Phe	Tyr	Gly	Pro	Gly	Cys	Gln	Pro	Cys	Gln	Cys	Ser
					530					535					540	
30	Ser	Pro	Gly	Val	Ala	Asp	Asp	Arg	Cys	Asp	Pro	Asp	Thr	Gly	Gln	Cys
	545									550					555	560
	Arg	Cys	Arg	Val	Gly	Phe	Glu	Gly	Ala	Thr	Cys	Asp	Arg	Cys	Ala	Pro
					565					570					575	
	Gly	Tyr	Phe	His	Phe	Pro	Leu	Cys	Gln	Leu	Cys	Gly	Cys	Ser	Pro	Ala
35					580					585					590	
	Gly	Thr	Leu	Pro	Glu	Gly	Cys	Asp	Glu	Ala	Gly	Arg	Cys	Leu	Cys	Gln
					595					600					605	
	Pro	Glu	Phe	Ala	Gly	Pro	His	Cys	Asp	Arg	Cys	Arg	Pro	Gly	Tyr	His
					610					615					620	
40	Gly	Phe	Pro	Asn	Cys	Gln	Ala	Cys	Thr	Cys	Asp	Pro	Arg	Gly	Ala	Leu
	625									630					635	640
	Asp	Gln	Leu	Cys	Gly	Ala	Gly	Gly	Leu	Cys	Arg	Cys	Arg	Pro	Gly	Tyr
					645					650					655	
	Thr	Gly	Thr	Ala	Cys	Gln	Glu	Cys	Ser	Pro	Gly	Phe	His	Gly	Phe	Pro
45					660					665					670	
	Ser	Cys	Val	Pro	Cys	His	Cys	Ser	Ala	Glu	Gly	Ser	Leu	His	Ala	Ala
					675					680					685	
	Cys	Asp	Pro	Arg	Ser	Gly	Gln	Cys	Ser	Cys	Arg	Pro	Arg	Val	Thr	Gly



RU 2758 006 C2

	690		695		700														
	Leu	Arg	Cys	Asp	Thr	Cys	Val	Pro	Gly	Ala	Tyr	Asn	Phe	Pro	Tyr	Cys			
	705					710					715				720				
	Glu	Ala	Gly	Ser	Cys	His	Pro	Ala	Gly	Leu	Ala	Pro	Val	Asp	Pro	Ala			
5					725					730					735				
	Leu	Pro	Glu	Ala	Gln	Val	Pro	Cys	Met	Cys	Arg	Ala	His	Val	Glu	Gly			
				740					745				750						
	Pro	Ser	Cys	Asp	Arg	Cys	Lys	Pro	Gly	Phe	Trp	Gly	Leu	Ser	Pro	Ser			
			755					760					765						
10	Asn	Pro	Glu	Gly	Cys	Thr	Arg	Cys	Ser	Cys	Asp	Leu	Arg	Gly	Thr	Leu			
	770					775						780							
	Gly	Gly	Val	Ala	Glu	Cys	Gln	Pro	Gly	Thr	Gly	Gln	Cys	Phe	Cys	Lys			
	785					790					795				800				
	Pro	His	Val	Cys	Gly	Gln	Ala	Cys	Ala	Ser	Cys	Lys	Asp	Gly	Phe	Phe			
15					805						810				815				
	Gly	Leu	Asp	Gln	Ala	Asp	Tyr	Phe	Gly	Cys	Arg	Ser	Cys	Arg	Cys	Asp			
				820							825			830					
	Ile	Gly	Gly	Ala	Leu	Gly	Gln	Ser	Cys	Glu	Pro	Arg	Thr	Gly	Val	Cys			
				835					840				845						
20	Arg	Cys	Arg	Pro	Asn	Thr	Gln	Gly	Pro	Thr	Cys	Ser	Glu	Pro	Ala	Arg			
	850						855						860						
	Asp	His	Tyr	Leu	Pro	Asp	Leu	His	His	Leu	Arg	Leu	Glu	Leu	Glu	Glu			
	865					870						875			880				
	Ala	Ala	Thr	Pro	Glu	Gly	His	Ala	Val	Arg	Phe	Gly	Phe	Asn	Pro	Leu			
25					885						890				895				
	Glu	Phe	Glu	Asn	Phe	Ser	Trp	Arg	Gly	Tyr	Ala	Gln	Met	Ala	Pro	Val			
				900							905				910				
	Gln	Pro	Arg	Ile	Val	Ala	Arg	Leu	Asn	Leu	Thr	Ser	Pro	Asp	Leu	Phe			
				915						920				925					
30	Trp	Leu	Val	Phe	Arg	Tyr	Val	Asn	Arg	Gly	Ala	Met	Ser	Val	Ser	Gly			
	930						935						940						
	Arg	Val	Ser	Val	Arg	Glu	Glu	Gly	Arg	Ser	Ala	Thr	Cys	Ala	Asn	Cys			
	945					950						955			960				
	Thr	Ala	Gln	Ser	Gln	Pro	Val	Ala	Phe	Pro	Pro	Ser	Thr	Glu	Pro	Ala			
35					965							970			975				
	Phe	Ile	Thr	Val	Pro	Gln	Arg	Gly	Phe	Gly	Glu	Pro	Phe	Val	Leu	Asn			
				980						985				990					
	Pro	Gly	Thr	Trp	Ala	Leu	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Gly	Val	Leu	Leu	Asp			
				995				1000						1005					
40	Tyr	Val	Val	Leu	Leu	Pro	Ser	Ala	Tyr	Tyr	Glu	Ala	Ala	Leu	Leu				
	1010						1015						1020						
	Gln	Leu	Arg	Val	Thr	Glu	Ala	Cys	Thr	Tyr	Arg	Pro	Ser	Ala	Gln				
	1025						1030						1035						
	Gln	Ser	Gly	Asp	Asn	Cys	Leu	Leu	Tyr	Thr	His	Leu	Pro	Leu	Asp				
45							1040						1045		1050				
	Gly	Phe	Pro	Ser	Ala	Ala	Gly	Leu	Glu	Ala	Leu	Cys	Arg	Gln	Asp				
	1055						1060						1065						
	Asn	Ser	Leu	Pro	Arg	Pro	Cys	Pro	Thr	Glu	Gln	Leu	Ser	Pro	Ser				

RU 2758 006 C2

	1070		1075		1080
	His Pro Pro Leu Ile Thr Cys Thr Gly Ser Asp Val Asp Val Gln				
	1085		1090		1095
	Leu Gln Val Ala Val Pro Gln Pro Gly Arg Tyr Ala Leu Val Val				
5	1100		1105		1110
	Glu Tyr Ala Asn Glu Asp Ala Arg Gln Glu Val Gly Val Ala Val				
	1115		1120		1125
	His Thr Pro Gln Arg Ala Pro Gln Gln Gly Leu Leu Ser Leu His				
	1130		1135		1140
10	Pro Cys Leu Tyr Ser Thr Leu Cys Arg Gly Thr Ala Arg Asp Thr				
	1145		1150		1155
	Gln Asp His Leu Ala Val Phe His Leu Asp Ser Glu Ala Ser Val				
	1160		1165		1170
	Arg Leu Thr Ala Glu Gln Ala Arg Phe Phe Leu His Gly Val Thr				
15	1175		1180		1185
	Leu Val Pro Ile Glu Glu Phe Ser Pro Glu Phe Val Glu Pro Arg				
	1190		1195		1200
	Val Ser Cys Ile Ser Ser His Gly Ala Phe Gly Pro Asn Ser Ala				
	1205		1210		1215
20	Ala Cys Leu Pro Ser Arg Phe Pro Lys Pro Pro Gln Pro Ile Ile				
	1220		1225		1230
	Leu Arg Asp Cys Gln Val Ile Pro Leu Pro Pro Gly Leu Pro Leu				
	1235		1240		1245
	Thr His Ala Gln Asp Leu Thr Pro Ala Met Ser Pro Ala Gly Pro				
25	1250		1255		1260
	Arg Pro Arg Pro Pro Thr Ala Val Asp Pro Asp Ala Glu Pro Thr				
	1265		1270		1275
	Leu Leu Arg Glu Pro Gln Ala Thr Val Val Phe Thr Thr His Val				
	1280		1285		1290
30	Pro Thr Leu Gly Arg Tyr Ala Phe Leu Leu His Gly Tyr Gln Pro				
	1295		1300		1305
	Ala His Pro Thr Phe Pro Val Glu Val Leu Ile Asn Ala Gly Arg				
	1310		1315		1320
	Val Trp Gln Gly His Ala Asn Ala Ser Phe Cys Pro His Gly Tyr				
35	1325		1330		1335
	Gly Cys Arg Thr Leu Val Val Cys Glu Gly Gln Ala Leu Leu Asp				
	1340		1345		1350
	Val Thr His Ser Glu Leu Thr Val Thr Val Arg Val Pro Lys Gly				
	1355		1360		1365
40	Arg Trp Leu Trp Leu Asp Tyr Val Leu Val Val Pro Glu Asn Val				
	1370		1375		1380
	Tyr Ser Phe Gly Tyr Leu Arg Glu Glu Pro Leu Asp Lys Ser Tyr				
	1385		1390		1395
	Asp Phe Ile Ser His Cys Ala Ala Gln Gly Tyr His Ile Ser Pro				
45	1400		1405		1410
	Ser Ser Ser Ser Leu Phe Cys Arg Asn Ala Ala Ala Ser Leu Ser				
	1415		1420		1425
	Leu Phe Tyr Asn Asn Gly Ala Arg Pro Cys Gly Cys His Glu Val				

RU 2758 006 C2

	1430		1435		1440
	Gly Ala Thr Gly Pro Thr Cys		Glu Pro Phe Gly Gly		Gln Cys Pro
	1445		1450		1455
5	Cys His Ala His Val Ile Gly		Arg Asp Cys Ser Arg		Cys Ala Thr
	1460		1465		1470
	Gly Tyr Trp Gly Phe Pro Asn		Cys Arg Pro Cys Asp		Cys Gly Ala
	1475		1480		1485
	Arg Leu Cys Asp Glu Leu Thr		Gly Gln Cys Ile Cys		Pro Pro Arg
	1490		1495		1500
10	Thr Ile Pro Pro Asp Cys Leu		Leu Cys Gln Pro Gln		Thr Phe Gly
	1505		1510		1515
	Cys His Pro Leu Val Gly Cys		Glu Glu Cys Asn Cys		Ser Gly Pro
	1520		1525		1530
	Gly Ile Gln Glu Leu Thr Asp		Pro Thr Cys Asp Thr		Asp Ser Gly
15	1535		1540		1545
	Gln Cys Lys Cys Arg Pro Asn		Val Thr Gly Arg Arg		Cys Asp Thr
	1550		1555		1560
	Cys Ser Pro Gly Phe His Gly		Tyr Pro Arg Cys Arg		Pro Cys Asp
	1565		1570		1575
20	Cys His Glu Ala Gly Thr Ala		Pro Gly Val Cys Asp		Pro Leu Thr
	1580		1585		1590
	Gly Gln Cys Tyr Cys Lys Glu		Asn Val Gln Gly Pro		Lys Cys Asp
	1595		1600		1605
	Gln Cys Ser Leu Gly Thr Phe		Ser Leu Asp Ala Ala		Asn Pro Lys
25	1610		1615		1620
	Gly Cys Thr Arg Cys Phe Cys		Phe Gly Ala Thr Glu		Arg Cys Arg
	1625		1630		1635
	Ser Ser Ser Tyr Thr Arg Gln		Glu Phe Val Asp Met		Glu Gly Trp
	1640		1645		1650
30	Val Leu Leu Ser Thr Asp Arg		Gln Val Val Pro His		Glu Arg Gln
	1655		1660		1665
	Pro Gly Thr Glu Met Leu Arg		Ala Asp Leu Arg His		Val Pro Glu
	1670		1675		1680
	Ala Val Pro Glu Ala Phe Pro		Glu Leu Tyr Trp Gln		Ala Pro Pro
35	1685		1690		1695
	Ser Tyr Leu Gly Asp Arg Val		Ser Ser Tyr Gly Gly		Thr Leu Arg
	1700		1705		1710
	Tyr Glu Leu His Ser Glu Thr		Gln Arg Gly Asp Val		Phe Val Pro
	1715		1720		1725
40	Met Glu Ser Arg Pro Asp Val		Val Leu Gln Gly Asn		Gln Met Ser
	1730		1735		1740
	Ile Thr Phe Leu Glu Pro Ala		Tyr Pro Thr Pro Gly		His Val His
	1745		1750		1755
	Arg Gly Gln Leu Gln Leu Val		Glu Gly Asn Phe Arg		His Thr Glu
45	1760		1765		1770
	Thr Arg Asn Thr Val Ser Arg		Glu Glu Leu Met Met		Val Leu Ala
	1775		1780		1785
	Ser Leu Glu Gln Leu Gln Ile		Arg Ala Leu Phe Ser		Gln Ile Ser

RU 2758 006 C2

	1790		1795		1800
	Ser Ala Val Phe Leu Arg Arg		Val Ala Leu Glu Val Ala Ser Pro		
	1805		1810		1815
	Ala Gly Gln Gly Ala Leu Ala		Ser Asn Val Glu Leu Cys Leu Cys		
5	1820		1825		1830
	Pro Ala Ser Tyr Arg Gly Asp		Ser Cys Gln Glu Cys Ala Pro Gly		
	1835		1840		1845
	Phe Tyr Arg Asp Val Lys Gly		Leu Phe Leu Gly Arg Cys Val Pro		
	1850		1855		1860
10	Cys Gln Cys His Gly His Ser		Asp Arg Cys Leu Pro Gly Ser Gly		
	1865		1870		1875
	Val Cys Val Asp Cys Gln His		Asn Thr Glu Gly Ala His Cys Glu		
	1880		1885		1890
	Arg Cys Gln Ala Gly Phe Val		Ser Ser Arg Asp Asp Pro Ser Ala		
15	1895		1900		1905
	Pro Cys Val Ser Cys Pro Cys		Pro Leu Ser Val Pro Ser Asn Asn		
	1910		1915		1920
	Phe Ala Glu Gly Cys Val Leu		Arg Gly Gly Arg Thr Gln Cys Leu		
	1925		1930		1935
20	Cys Lys Pro Gly Tyr Ala Gly		Ala Ser Cys Glu Arg Cys Ala Pro		
	1940		1945		1950
	Gly Phe Phe Gly Asn Pro Leu		Val Leu Gly Ser Ser Cys Gln Pro		
	1955		1960		1965
	Cys Asp Cys Ser Gly Asn Gly		Asp Pro Asn Leu Leu Phe Ser Asp		
25	1970		1975		1980
	Cys Asp Pro Leu Thr Gly Ala		Cys Arg Gly Cys Leu Arg His Thr		
	1985		1990		1995
	Thr Gly Pro Arg Cys Glu Ile		Cys Ala Pro Gly Phe Tyr Gly Asn		
	2000		2005		2010
30	Ala Leu Leu Pro Gly Asn Cys		Thr Arg Cys Asp Cys Thr Pro Cys		
	2015		2020		2025
	Gly Thr Glu Ala Cys Asp Pro		His Ser Gly His Cys Leu Cys Lys		
	2030		2035		2040
	Ala Gly Val Thr Gly Arg Arg		Cys Asp Arg Cys Gln Glu Gly His		
35	2045		2050		2055
	Phe Gly Phe Asp Gly Cys Gly		Gly Cys Arg Pro Cys Ala Cys Gly		
	2060		2065		2070
	Pro Ala Ala Glu Gly Ser Glu		Cys His Pro Gln Ser Gly Gln Cys		
	2075		2080		2085
40	His Cys Arg Pro Gly Thr Met		Gly Pro Gln Cys Arg Glu Cys Ala		
	2090		2095		2100
	Pro Gly Tyr Trp Gly Leu Pro		Glu Gln Gly Cys Arg Arg Cys Gln		
	2105		2110		2115
	Cys Pro Gly Gly Arg Cys Asp		Pro His Thr Gly Arg Cys Asn Cys		
45	2120		2125		2130
	Pro Pro Gly Leu Ser Gly Glu		Arg Cys Asp Thr Cys Ser Gln Gln		
	2135		2140		2145
	His Gln Val Pro Val Pro Gly		Gly Pro Val Gly His Ser Ile His		

RU 2758 006 C2

	2150		2155		2160
	Cys Glu Val Cys Asp His Cys Val Val Leu Leu Leu Asp Asp Leu				
	2165		2170		2175
	Glu Arg Ala Gly Ala Leu Leu Pro Ala Ile His Glu Gln Leu Arg				
5	2180		2185		2190
	Gly Ile Asn Ala Ser Ser Met Ala Trp Ala Arg Leu His Arg Leu				
	2195		2200		2205
	Asn Ala Ser Ile Ala Asp Leu Gln Ser Gln Leu Arg Ser Pro Leu				
	2210		2215		2220
10	Gly Pro Arg His Glu Thr Ala Gln Gln Leu Glu Val Leu Glu Gln				
	2225		2230		2235
	Gln Ser Thr Ser Leu Gly Gln Asp Ala Arg Arg Leu Gly Gly Gln				
	2240		2245		2250
	Ala Val Gly Thr Arg Asp Gln Ala Ser Gln Leu Leu Ala Gly Thr				
15	2255		2260		2265
	Glu Ala Thr Leu Gly His Ala Lys Thr Leu Leu Ala Ala Ile Arg				
	2270		2275		2280
	Ala Val Asp Arg Thr Leu Ser Glu Leu Met Ser Gln Thr Gly His				
	2285		2290		2295
20	Leu Gly Leu Ala Asn Ala Ser Ala Pro Ser Gly Glu Gln Leu Leu				
	2300		2305		2310
	Arg Thr Leu Ala Glu Val Glu Arg Leu Leu Trp Glu Met Arg Ala				
	2315		2320		2325
	Arg Asp Leu Gly Ala Pro Gln Ala Ala Ala Glu Ala Glu Leu Ala				
25	2330		2335		2340
	Ala Ala Gln Arg Leu Leu Ala Arg Val Gln Glu Gln Leu Ser Ser				
	2345		2350		2355
	Leu Trp Glu Glu Asn Gln Ala Leu Ala Thr Gln Thr Arg Asp Arg				
	2360		2365		2370
30	Leu Ala Gln His Glu Ala Gly Leu Met Asp Leu Arg Glu Ala Leu				
	2375		2380		2385
	Asn Arg Ala Val Asp Ala Thr Arg Glu Ala Gln Glu Leu Asn Ser				
	2390		2395		2400
	Arg Asn Gln Glu Arg Leu Glu Glu Ala Leu Gln Arg Lys Gln Glu				
35	2405		2410		2415
	Leu Ser Arg Asp Asn Ala Thr Leu Gln Ala Thr Leu His Ala Ala				
	2420		2425		2430
	Arg Asp Thr Leu Ala Ser Val Phe Arg Leu Leu His Ser Leu Asp				
	2435		2440		2445
40	Gln Ala Lys Glu Glu Leu Glu Arg Leu Ala Ala Ser Leu Asp Gly				
	2450		2455		2460
	Ala Arg Thr Pro Leu Leu Gln Arg Met Gln Thr Phe Ser Pro Ala				
	2465		2470		2475
	Gly Ser Lys Leu Arg Leu Val Glu Ala Ala Glu Ala His Ala Gln				
45	2480		2485		2490
	Gln Leu Gly Gln Leu Ala Leu Asn Leu Ser Ser Ile Ile Leu Asp				
	2495		2500		2505
	Val Asn Gln Asp Arg Leu Thr Gln Arg Ala Ile Glu Ala Ser Asn				

RU 2758 006 C2

	2510		2515		2520
	Ala Tyr Ser Arg Ile Leu Gln	Ala Val Gln Ala Ala	Glu Asp Ala		
	2525		2530		2535
	Ala Gly Gln Ala Leu Gln Gln	Ala Asp His Thr Trp	Ala Thr Val		
5	2540		2545		2550
	Val Arg Gln Gly Leu Val Asp	Arg Ala Gln Gln Leu	Leu Ala Asn		
	2555		2560		2565
	Ser Thr Ala Leu Glu Glu Ala	Met Leu Gln Glu Gln	Gln Arg Leu		
	2570		2575		2580
10	Gly Leu Val Trp Ala Ala Leu	Gln Gly Ala Arg Thr	Gln Leu Arg		
	2585		2590		2595
	Asp Val Arg Ala Lys Lys Asp	Gln Leu Glu Ala His	Ile Gln Ala		
	2600		2605		2610
	Ala Gln Ala Met Leu Ala Met	Asp Thr Asp Glu Thr	Ser Lys Lys		
15	2615		2620		2625
	Ile Ala His Ala Lys Ala Val	Ala Ala Glu Ala Gln	Asp Thr Ala		
	2630		2635		2640
	Thr Arg Val Gln Ser Gln Leu	Gln Ala Met Gln Glu	Asn Val Glu		
	2645		2650		2655
20	Arg Trp Gln Gly Gln Tyr Glu	Gly Leu Arg Gly Gln	Asp Leu Gly		
	2660		2665		2670
	Gln Ala Val Leu Asp Ala Gly	His Ser Val Ser Thr	Leu Glu Lys		
	2675		2680		2685
	Thr Leu Pro Gln Leu Leu Ala	Lys Leu Ser Ile Leu	Glu Asn Arg		
25	2690		2695		2700
	Gly Val His Asn Ala Ser Leu	Ala Leu Ser Ala Ser	Ile Gly Arg		
	2705		2710		2715
	Val Arg Glu Leu Ile Ala Gln	Ala Arg Gly Ala Ala	Ser Lys Val		
	2720		2725		2730
30	Lys Val Pro Met Lys Phe Asn	Gly Arg Ser Gly Val	Gln Leu Arg		
	2735		2740		2745
	Thr Pro Arg Asp Leu Ala Asp	Leu Ala Ala Tyr Thr	Ala Leu Lys		
	2750		2755		2760
	Phe Tyr Leu Gln Gly Pro Glu	Pro Glu Pro Gly Gln	Gly Thr Glu		
35	2765		2770		2775
	Asp Arg Phe Val Met Tyr Met	Gly Ser Arg Gln Ala	Thr Gly Asp		
	2780		2785		2790
	Tyr Met Gly Val Ser Leu Arg	Asp Lys Lys Val His	Trp Val Tyr		
	2795		2800		2805
40	Gln Leu Gly Glu Ala Gly Pro	Ala Val Leu Ser Ile	Asp Glu Asp		
	2810		2815		2820
	Ile Gly Glu Gln Phe Ala Ala	Val Ser Leu Asp Arg	Thr Leu Gln		
	2825		2830		2835
	Phe Gly His Met Ser Val Thr	Val Glu Arg Gln Met	Ile Gln Glu		
45	2840		2845		2850
	Thr Lys Gly Asp Thr Val Ala	Pro Gly Ala Glu Gly	Leu Leu Asn		
	2855		2860		2865
	Leu Arg Pro Asp Asp Phe Val	Phe Tyr Val Gly Gly	Tyr Pro Ser		

RU 2758 006 C2

	2870		2875		2880
	Thr Phe Thr Pro Pro Pro	Leu Leu Arg Phe Pro	Gly Tyr Arg Gly		
	2885	2890	2895		
5	Cys Ile Glu Met Asp Thr	Leu Asn Glu Glu Val	Val Ser Leu Tyr		
	2900	2905	2910		
	Asn Phe Glu Arg Thr Phe	Gln Leu Asp Thr Ala	Val Asp Arg Pro		
	2915	2920	2925		
	Cys Ala Arg Ser Lys Ser	Thr Gly Asp Pro Trp	Leu Thr Asp Gly		
	2930	2935	2940		
10	Ser Tyr Leu Asp Gly Thr	Gly Phe Ala Arg Ile	Ser Phe Asp Ser		
	2945	2950	2955		
	Gln Ile Ser Thr Thr Lys	Arg Phe Glu Gln Glu	Leu Arg Leu Val		
	2960	2965	2970		
	Ser Tyr Ser Gly Val Leu	Phe Phe Leu Lys Gln	Gln Ser Gln Phe		
15	2975	2980	2985		
	Leu Cys Leu Ala Val Gln	Glu Gly Ser Leu Val	Leu Leu Tyr Asp		
	2990	2995	3000		
	Phe Gly Ala Gly Leu Lys	Lys Ala Val Pro Leu	Gln Pro Pro Pro		
	3005	3010	3015		
20	Pro Leu Thr Ser Ala Ser	Lys Ala Ile Gln Val	Phe Leu Leu Gly		
	3020	3025	3030		
	Gly Ser Arg Lys Arg Val	Leu Val Arg Val Glu	Arg Ala Thr Val		
	3035	3040	3045		
	Tyr Ser Val Glu Gln Asp	Asn Asp Leu Glu Leu	Ala Asp Ala Tyr		
25	3050	3055	3060		
	Tyr Leu Gly Gly Val Pro	Pro Asp Gln Leu Pro	Pro Ser Leu Arg		
	3065	3070	3075		
	Arg Leu Phe Pro Thr Gly	Gly Ser Val Arg Gly	Cys Val Lys Gly		
	3080	3085	3090		
30	Ile Lys Ala Leu Gly Lys	Tyr Val Asp Leu Lys	Arg Leu Asn Thr		
	3095	3100	3105		
	Thr Gly Val Ser Ala Gly	Cys Thr Ala Asp Leu	Leu Val Gly Arg		
	3110	3115	3120		
	Ala Met Thr Phe His Gly	His Gly Phe Leu Arg	Leu Ala Leu Ser		
35	3125	3130	3135		
	Asn Val Ala Pro Leu Thr	Gly Asn Val Tyr Ser	Gly Phe Gly Phe		
	3140	3145	3150		
	His Ser Ala Gln Asp Ser	Ala Leu Leu Tyr Tyr	Arg Ala Ser Pro		
	3155	3160	3165		
40	Asp Gly Leu Cys Gln Val	Ser Leu Gln Gln Gly	Arg Val Ser Leu		
	3170	3175	3180		
	Gln Leu Leu Arg Thr Glu	Val Lys Thr Gln Ala	Gly Phe Ala Asp		
	3185	3190	3195		
	Gly Ala Pro His Tyr Val	Ala Phe Tyr Ser Asn	Ala Thr Gly Val		
45	3200	3205	3210		
	Trp Leu Tyr Val Asp Asp	Gln Leu Gln Gln Met	Lys Pro His Arg		
	3215	3220	3225		
	Gly Pro Pro Pro Glu Leu	Gln Pro Gln Pro Glu	Gly Pro Pro Arg		

RU 2758 006 C2

	3230		3235		3240
	Leu Leu	Leu Gly Gly	Leu Pro	Glu Ser Gly Thr	Ile Tyr Asn Phe
	3245		3250		3255
5	Ser Gly	Cys Ile Ser	Asn Val	Phe Val Gln Arg	Leu Leu Gly Pro
	3260		3265		3270
	Gln Arg	Val Phe Asp	Leu Gln	Gln Asn Leu Gly	Ser Val Asn Val
	3275		3280		3285
	Ser Thr	Gly Cys Ala	Pro Ala	Leu Gln Ala Gln	Thr Pro Gly Leu
	3290		3295		3300
10	Gly Pro	Arg Gly Leu	Gln Ala	Thr Ala Arg Lys	Ala Ser Arg Arg
	3305		3310		3315
	Ser Arg	Gln Pro Ala	Arg His	Pro Ala Cys Met	Leu Pro Pro His
	3320		3325		3330
15	Leu Arg	Thr Thr Arg	Asp Ser	Tyr Gln Phe Gly	Gly Ser Leu Ser
	3335		3340		3345
	Ser His	Leu Glu Phe	Val Gly	Ile Leu Ala Arg	His Arg Asn Trp
	3350		3355		3360
	Pro Ser	Leu Ser Met	His Val	Leu Pro Arg Ser	Ser Arg Gly Leu
	3365		3370		3375
20	Leu Leu	Phe Thr Ala	Arg Leu	Arg Pro Gly Ser	Pro Ser Leu Ala
	3380		3385		3390
	Leu Phe	Leu Ser Asn	Gly His	Phe Val Ala Gln	Met Glu Gly Leu
	3395		3400		3405
25	Gly Thr	Arg Leu Arg	Ala Gln	Ser Arg Gln Arg	Ser Arg Pro Gly
	3410		3415		3420
	Arg Trp	His Lys Val	Ser Val	Arg Trp Glu Lys	Asn Arg Ile Leu
	3425		3430		3435
	Leu Val	Thr Asp Gly	Ala Arg	Ala Trp Ser Gln	Glu Gly Pro His
	3440		3445		3450
30	Arg Gln	His Gln Gly	Ala Glu	His Pro Gln Pro	His Thr Leu Phe
	3455		3460		3465
	Val Gly	Gly Leu Pro	Ala Ser	Ser His Ser Ser	Lys Leu Pro Val
	3470		3475		3480
35	Thr Val	Gly Phe Ser	Gly Cys	Val Lys Arg Leu	Arg Leu His Gly
	3485		3490		3495
	Arg Pro	Leu Gly Ala	Pro Thr	Arg Met Ala Gly	Val Thr Pro Cys
	3500		3505		3510
	Ile Leu	Gly Pro Leu	Glu Ala	Gly Leu Phe Phe	Pro Gly Ser Gly
	3515		3520		3525
40	Gly Val	Ile Thr Leu	Asp Leu	Pro Gly Ala Thr	Leu Pro Asp Val
	3530		3535		3540
	Gly Leu	Glu Leu Glu	Val Arg	Pro Leu Ala Val	Thr Gly Leu Ile
	3545		3550		3555
45	Phe His	Leu Gly Gln	Ala Arg	Thr Pro Pro Tyr	Leu Gln Leu Gln
	3560		3565		3570
	Val Thr	Glu Lys Gln	Val Leu	Leu Arg Ala Asp	Asp Gly Ala Gly
	3575		3580		3585
	Glu Phe	Ser Thr Ser	Val Thr	Arg Pro Ser Val	Leu Cys Asp Gly



RU 2758 006 C2

```

3590          3595          3600
Gln Trp  His Arg Leu Ala Val  Met Lys Ser Gly Asn  Val Leu Arg
3605          3610          3615
Leu Glu  Val Asp Ala Gln Ser  Asn His Thr Val Gly  Pro Leu Leu
5  3620          3625          3630
Ala Ala  Ala Ala Gly Ala Pro  Ala Pro Leu Tyr Leu  Gly Gly Leu
3635          3640          3645
Pro Glu  Pro Met Ala Val Gln  Pro Trp Pro Pro Ala  Tyr Cys Gly
3650          3655          3660
10 Cys Met  Arg Arg Leu Ala Val  Asn Arg Ser Pro Val  Ala Met Thr
3665          3670          3675
Arg Ser  Val Glu Val His Gly  Ala Val Gly Ala Ser  Gly Cys Pro
3680          3685          3690
Ala Ala
15  3695
<210>  2
<211> 1811
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
20 <400> laminin-521 beta chain
Met Glu Leu Thr Ser Arg Glu Arg Gly Arg Gly Gln Pro Leu Pro Trp
1          5          10          15
Glu Leu Arg Leu Gly Leu Leu Leu Ser Val Leu Ala Ala Thr Leu Ala
20          25          30
25 Gln Ala Pro Ala Pro Asp Val Pro Gly Cys Ser Arg Gly Ser Cys Tyr
35          40          45
Pro Ala Thr Gly Asp Leu Leu Val Gly Arg Ala Asp Arg Leu Thr Ala
50          55          60
Ser Ser Thr Cys Gly Leu Asn Gly Pro Gln Pro Tyr Cys Ile Val Ser
30 65          70          75          80
His Leu Gln Asp Glu Lys Lys Cys Phe Leu Cys Asp Ser Arg Arg Pro
85          90          95
Phe Ser Ala Arg Asp Asn Pro His Ser His Arg Ile Gln Asn Val Val
100          105          110
35 Thr Ser Phe Ala Pro Gln Arg Arg Ala Ala Trp Trp Gln Ser Glu Asn
115          120          125
Gly Ile Pro Ala Val Thr Ile Gln Leu Asp Leu Glu Ala Glu Phe His
130          135          140
Phe Thr His Leu Ile Met Thr Phe Lys Thr Phe Arg Pro Ala Ala Met
40 145          150          155          160
Leu Val Glu Arg Ser Ala Asp Phe Gly Arg Thr Trp His Val Tyr Arg
165          170          175
Tyr Phe Ser Tyr Asp Cys Gly Ala Asp Phe Pro Gly Val Pro Leu Ala
180          185          190
45 Pro Pro Arg His Trp Asp Asp Val Val Cys Glu Ser Arg Tyr Ser Glu
195          200          205
Ile Glu Pro Ser Thr Glu Gly Glu Val Ile Tyr Arg Val Leu Asp Pro
210          215          220

```

RU 2758 006 C2

Ala Ile Pro Ile Pro Asp Pro Tyr Ser Ser Arg Ile Gln Asn Leu Leu  
 225 230 235 240  
 Lys Ile Thr Asn Leu Arg Val Asn Leu Thr Arg Leu His Thr Leu Gly  
 245 250 255  
 5 Asp Asn Leu Leu Asp Pro Arg Arg Glu Ile Arg Glu Lys Tyr Tyr Tyr  
 260 265 270  
 Ala Leu Tyr Glu Leu Val Val Arg Gly Asn Cys Phe Cys Tyr Gly His  
 275 280 285  
 Ala Ser Glu Cys Ala Pro Ala Pro Gly Ala Pro Ala His Ala Glu Gly  
 10 290 295 300  
 Met Val His Gly Ala Cys Ile Cys Lys His Asn Thr Arg Gly Leu Asn  
 305 310 315 320  
 Cys Glu Gln Cys Gln Asp Phe Tyr Arg Asp Leu Pro Trp Arg Pro Ala  
 325 330 335  
 15 Glu Asp Gly His Ser His Ala Cys Arg Lys Cys Glu Cys His Gly His  
 340 345 350  
 Thr His Ser Cys His Phe Asp Met Ala Val Tyr Leu Ala Ser Gly Asn  
 355 360 365  
 Val Ser Gly Gly Val Cys Asp Gly Cys Gln His Asn Thr Ala Gly Arg  
 20 370 375 380  
 His Cys Glu Leu Cys Arg Pro Phe Phe Tyr Arg Asp Pro Thr Lys Asp  
 385 390 395 400  
 Leu Arg Asp Pro Ala Val Cys Arg Ser Cys Asp Cys Asp Pro Met Gly  
 405 410 415  
 25 Ser Gln Asp Gly Gly Arg Cys Asp Ser His Asp Asp Pro Ala Leu Gly  
 420 425 430  
 Leu Val Ser Gly Gln Cys Arg Cys Lys Glu His Val Val Gly Thr Arg  
 435 440 445  
 Cys Gln Gln Cys Arg Asp Gly Phe Phe Gly Leu Ser Ile Ser Asp Arg  
 30 450 455 460  
 Leu Gly Cys Arg Arg Cys Gln Cys Asn Ala Arg Gly Thr Val Pro Gly  
 465 470 475 480  
 Ser Thr Pro Cys Asp Pro Asn Ser Gly Ser Cys Tyr Cys Lys Arg Leu  
 485 490 495  
 35 Val Thr Gly Arg Gly Cys Asp Arg Cys Leu Pro Gly His Trp Gly Leu  
 500 505 510  
 Ser His Asp Leu Leu Gly Cys Arg Pro Cys Asp Cys Asp Val Gly Gly  
 515 520 525  
 Ala Leu Asp Pro Gln Cys Asp Glu Gly Thr Gly Gln Cys His Cys Arg  
 40 530 535 540  
 Gln His Met Val Gly Arg Arg Cys Glu Gln Val Gln Pro Gly Tyr Phe  
 545 550 555 560  
 Arg Pro Phe Leu Asp His Leu Ile Trp Glu Ala Glu Asp Thr Arg Gly  
 565 570 575  
 45 Gln Val Leu Asp Val Val Glu Arg Leu Val Thr Pro Gly Glu Thr Pro  
 580 585 590  
 Ser Trp Thr Gly Ser Gly Phe Val Arg Leu Gln Glu Gly Gln Thr Leu  
 595 600 605

RU 2758 006 C2

	Glu	Phe	Leu	Val	Ala	Ser	Val	Pro	Lys	Ala	Met	Asp	Tyr	Asp	Leu	Leu
	610						615					620				
	Leu	Arg	Leu	Glu	Pro	Gln	Val	Pro	Glu	Gln	Trp	Ala	Glu	Leu	Glu	Leu
	625					630					635					640
5	Ile	Val	Gln	Arg	Pro	Gly	Pro	Val	Pro	Ala	His	Ser	Leu	Cys	Gly	His
					645					650					655	
	Leu	Val	Pro	Lys	Asp	Asp	Arg	Ile	Gln	Gly	Thr	Leu	Gln	Pro	His	Ala
				660					665					670		
	Arg	Tyr	Leu	Ile	Phe	Pro	Asn	Pro	Val	Cys	Leu	Glu	Pro	Gly	Ile	Ser
10			675				680						685			
	Tyr	Lys	Leu	His	Leu	Lys	Leu	Val	Arg	Thr	Gly	Gly	Ser	Ala	Gln	Pro
	690					695							700			
	Glu	Thr	Pro	Tyr	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Leu	Ile	Asp	Ser	Leu	Val	Leu
	705					710					715					720
15	Leu	Pro	Arg	Val	Leu	Val	Leu	Glu	Met	Phe	Ser	Gly	Gly	Asp	Ala	Ala
				725						730					735	
	Ala	Leu	Glu	Arg	Gln	Ala	Thr	Phe	Glu	Arg	Tyr	Gln	Cys	His	Glu	Glu
				740					745					750		
	Gly	Leu	Val	Pro	Ser	Lys	Thr	Ser	Pro	Ser	Glu	Ala	Cys	Ala	Pro	Leu
20			755						760					765		
	Leu	Ile	Ser	Leu	Ser	Thr	Leu	Ile	Tyr	Asn	Gly	Ala	Leu	Pro	Cys	Gln
	770						775						780			
	Cys	Asn	Pro	Gln	Gly	Ser	Leu	Ser	Ser	Glu	Cys	Asn	Pro	His	Gly	Gly
	785					790					795					800
25	Gln	Cys	Leu	Cys	Lys	Pro	Gly	Val	Val	Gly	Arg	Arg	Cys	Asp	Leu	Cys
					805					810					815	
	Ala	Pro	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Phe	Gly	Pro	Thr	Gly	Cys	Gln	Ala	Cys	Gln
				820					825					830		
	Cys	Ser	His	Glu	Gly	Ala	Leu	Ser	Ser	Leu	Cys	Glu	Lys	Thr	Ser	Gly
30			835						840					845		
	Gln	Cys	Leu	Cys	Arg	Thr	Gly	Ala	Phe	Gly	Leu	Arg	Cys	Asp	Arg	Cys
	850						855						860			
	Gln	Arg	Gly	Gln	Trp	Gly	Phe	Pro	Ser	Cys	Arg	Pro	Cys	Val	Cys	Asn
	865					870					875					880
35	Gly	His	Ala	Asp	Glu	Cys	Asn	Thr	His	Thr	Gly	Ala	Cys	Leu	Gly	Cys
				885						890					895	
	Arg	Asp	His	Thr	Gly	Gly	Glu	His	Cys	Glu	Arg	Cys	Ile	Ala	Gly	Phe
				900					905					910		
	His	Gly	Asp	Pro	Arg	Leu	Pro	Tyr	Gly	Gly	Gln	Cys	Arg	Pro	Cys	Pro
40			915						920					925		
	Cys	Pro	Glu	Gly	Pro	Gly	Ser	Gln	Arg	His	Phe	Ala	Thr	Ser	Cys	His
	930						935					940				
	Gln	Asp	Glu	Tyr	Ser	Gln	Gln	Ile	Val	Cys	His	Cys	Arg	Ala	Gly	Tyr
	945					950					955					960
45	Thr	Gly	Leu	Arg	Cys	Glu	Ala	Cys	Ala	Pro	Gly	His	Phe	Gly	Asp	Pro
				965						970					975	
	Ser	Arg	Pro	Gly	Gly	Arg	Cys	Gln	Leu	Cys	Glu	Cys	Ser	Gly	Asn	Ile
				980					985						990	

RU 2758 006 C2

	Asp	Pro	Met	Asp	Pro	Asp	Ala	Cys	Asp	Pro	His	Thr	Gly	Gln	Cys	Leu
			995					1000						1005		
	Arg	Cys	Leu	His	His	Thr	Glu	Gly	Pro	His	Cys	Ala	His	Cys	Lys	
		1010					1015					1020				
5	Pro	Gly	Phe	His	Gly	Gln	Ala	Ala	Arg	Gln	Ser	Cys	His	Arg	Cys	
		1025					1030					1035				
	Thr	Cys	Asn	Leu	Leu	Gly	Thr	Asn	Pro	Gln	Gln	Cys	Pro	Ser	Pro	
		1040					1045					1050				
10	Asp	Gln	Cys	His	Cys	Asp	Pro	Ser	Ser	Gly	Gln	Cys	Pro	Cys	Leu	
		1055					1060					1065				
	Pro	Asn	Val	Gln	Gly	Pro	Ser	Cys	Asp	Arg	Cys	Ala	Pro	Asn	Phe	
		1070					1075					1080				
	Trp	Asn	Leu	Thr	Ser	Gly	His	Gly	Cys	Gln	Pro	Cys	Ala	Cys	His	
		1085					1090					1095				
15	Pro	Ser	Arg	Ala	Arg	Gly	Pro	Thr	Cys	Asn	Glu	Phe	Thr	Gly	Gln	
		1100					1105					1110				
	Cys	His	Cys	Arg	Ala	Gly	Phe	Gly	Gly	Arg	Thr	Cys	Ser	Glu	Cys	
		1115					1120					1125				
20	Gln	Glu	Leu	His	Trp	Gly	Asp	Pro	Gly	Leu	Gln	Cys	His	Ala	Cys	
		1130					1135					1140				
	Asp	Cys	Asp	Ser	Arg	Gly	Ile	Asp	Thr	Pro	Gln	Cys	His	Arg	Phe	
		1145					1150					1155				
	Thr	Gly	His	Cys	Ser	Cys	Arg	Pro	Gly	Val	Ser	Gly	Val	Arg	Cys	
		1160					1165					1170				
25	Asp	Gln	Cys	Ala	Arg	Gly	Phe	Ser	Gly	Ile	Phe	Pro	Ala	Cys	His	
		1175					1180					1185				
	Pro	Cys	His	Ala	Cys	Phe	Gly	Asp	Trp	Asp	Arg	Val	Val	Gln	Asp	
		1190					1195					1200				
30	Leu	Ala	Ala	Arg	Thr	Gln	Arg	Leu	Glu	Gln	Arg	Ala	Gln	Glu	Leu	
		1205					1210					1215				
	Gln	Gln	Thr	Gly	Val	Leu	Gly	Ala	Phe	Glu	Ser	Ser	Phe	Trp	His	
		1220					1225					1230				
	Met	Gln	Glu	Lys	Leu	Gly	Ile	Val	Gln	Gly	Ile	Val	Gly	Ala	Arg	
		1235					1240					1245				
35	Asn	Thr	Ser	Ala	Ala	Ser	Thr	Ala	Gln	Leu	Val	Glu	Ala	Thr	Glu	
		1250					1255					1260				
	Glu	Leu	Arg	Arg	Glu	Ile	Gly	Glu	Ala	Thr	Glu	His	Leu	Thr	Gln	
		1265					1270					1275				
40	Leu	Glu	Ala	Asp	Leu	Thr	Asp	Val	Gln	Asp	Glu	Asn	Phe	Asn	Ala	
		1280					1285					1290				
	Asn	His	Ala	Leu	Ser	Gly	Leu	Glu	Arg	Asp	Arg	Leu	Ala	Leu	Asn	
		1295					1300					1305				
	Leu	Thr	Leu	Arg	Gln	Leu	Asp	Gln	His	Leu	Asp	Leu	Leu	Lys	His	
		1310					1315					1320				
45	Ser	Asn	Phe	Leu	Gly	Ala	Tyr	Asp	Ser	Ile	Arg	His	Ala	His	Ser	
		1325					1330					1335				
	Gln	Ser	Ala	Glu	Ala	Glu	Arg	Arg	Ala	Asn	Thr	Ser	Ala	Leu	Ala	
		1340					1345					1350				

RU 2758 006 C2

	Val	Pro	Ser	Pro	Val	Ser	Asn	Ser	Ala	Ser	Ala	Arg	His	Arg	Thr
	1355						1360					1365			
	Glu	Ala	Leu	Met	Asp	Ala	Gln	Lys	Glu	Asp	Phe	Asn	Ser	Lys	His
	1370						1375					1380			
5	Met	Ala	Asn	Gln	Arg	Ala	Leu	Gly	Lys	Leu	Ser	Ala	His	Thr	His
	1385						1390					1395			
	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Asp	Ile	Asn	Glu	Leu	Val	Cys	Gly	Ala	Pro
	1400						1405					1410			
10	Gly	Asp	Ala	Pro	Cys	Ala	Thr	Ser	Pro	Cys	Gly	Gly	Ala	Gly	Cys
	1415						1420					1425			
	Arg	Asp	Glu	Asp	Gly	Gln	Pro	Arg	Cys	Gly	Gly	Leu	Ser	Cys	Asn
	1430						1435					1440			
	Gly	Ala	Ala	Ala	Thr	Ala	Asp	Leu	Ala	Leu	Gly	Arg	Ala	Arg	His
	1445						1450					1455			
15	Thr	Gln	Ala	Glu	Leu	Gln	Arg	Ala	Leu	Ala	Glu	Gly	Gly	Ser	Ile
	1460						1465					1470			
	Leu	Ser	Arg	Val	Ala	Glu	Thr	Arg	Arg	Gln	Ala	Ser	Glu	Ala	Gln
	1475						1480					1485			
20	Gln	Arg	Ala	Gln	Ala	Ala	Leu	Asp	Lys	Ala	Asn	Ala	Ser	Arg	Gly
	1490						1495					1500			
	Gln	Val	Glu	Gln	Ala	Asn	Gln	Glu	Leu	Gln	Glu	Leu	Ile	Gln	Ser
	1505						1510					1515			
	Val	Lys	Asp	Phe	Leu	Asn	Gln	Glu	Gly	Ala	Asp	Pro	Asp	Ser	Ile
	1520						1525					1530			
25	Glu	Met	Val	Ala	Thr	Arg	Val	Leu	Glu	Leu	Ser	Ile	Pro	Ala	Ser
	1535						1540					1545			
	Ala	Glu	Gln	Ile	Gln	His	Leu	Ala	Gly	Ala	Ile	Ala	Glu	Arg	Val
	1550						1555					1560			
30	Arg	Ser	Leu	Ala	Asp	Val	Asp	Ala	Ile	Leu	Ala	Arg	Thr	Val	Gly
	1565						1570					1575			
	Asp	Val	Arg	Arg	Ala	Glu	Gln	Leu	Leu	Gln	Asp	Ala	Arg	Arg	Ala
	1580						1585					1590			
	Arg	Ser	Trp	Ala	Glu	Asp	Glu	Lys	Gln	Lys	Ala	Glu	Thr	Val	Gln
	1595						1600					1605			
35	Ala	Ala	Leu	Glu	Glu	Ala	Gln	Arg	Ala	Gln	Gly	Ile	Ala	Gln	Gly
	1610						1615					1620			
	Ala	Ile	Arg	Gly	Ala	Val	Ala	Asp	Thr	Arg	Asp	Thr	Glu	Gln	Thr
	1625						1630					1635			
40	Leu	Tyr	Gln	Val	Gln	Glu	Arg	Met	Ala	Gly	Ala	Glu	Arg	Ala	Leu
	1640						1645					1650			
	Ser	Ser	Ala	Gly	Glu	Arg	Ala	Arg	Gln	Leu	Asp	Ala	Leu	Leu	Glu
	1655						1660					1665			
	Ala	Leu	Lys	Leu	Lys	Arg	Ala	Gly	Asn	Ser	Leu	Ala	Ala	Ser	Thr
	1670						1675					1680			
45	Ala	Glu	Glu	Thr	Ala	Gly	Ser	Ala	Gln	Gly	Arg	Ala	Gln	Glu	Ala
	1685						1690					1695			
	Glu	Gln	Leu	Leu	Arg	Gly	Pro	Leu	Gly	Asp	Gln	Tyr	Gln	Thr	Val
	1700						1705					1710			

RU 2758 006 C2

Lys Ala Leu Ala Glu Arg Lys Ala Gln Gly Val Leu Ala Ala Gln  
 1715 1720 1725  
 Ala Arg Ala Glu Gln Leu Arg Asp Glu Ala Arg Asp Leu Leu Gln  
 1730 1735 1740  
 5 Ala Ala Gln Asp Lys Leu Gln Arg Leu Gln Glu Leu Glu Gly Thr  
 1745 1750 1755  
 Tyr Glu Glu Asn Glu Arg Ala Leu Glu Ser Lys Ala Ala Gln Leu  
 1760 1765 1770  
 Asp Gly Leu Glu Ala Arg Met Arg Ser Val Leu Gln Ala Ile Asn  
 10 1775 1780 1785  
 Leu Gln Val Gln Ile Tyr Asn Thr Cys Gln Lys Ser Ser Trp Pro  
 1790 1795 1800  
 Gly Arg Ala Pro Asn Lys Pro Val  
 1805 1810  
 15 <210> 3  
 <211> 1609  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> laminin-521 gamma chain  
 20 Met Arg Gly Ser His Arg Ala Ala Pro Ala Leu Arg Pro Arg Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Leu Trp Pro Val Leu Ala Val Leu Ala Ala Ala Ala Ala Gly Cys  
 20 25 30  
 Ala Gln Ala Ala Met Asp Glu Cys Thr Asp Glu Gly Gly Arg Pro Gln  
 25 35 40 45  
 Arg Cys Met Pro Glu Phe Val Asn Ala Ala Phe Asn Val Thr Val Val  
 50 55 60  
 Ala Thr Asn Thr Cys Gly Thr Pro Pro Glu Glu Tyr Cys Val Gln Thr  
 65 70 75 80  
 30 Gly Val Thr Gly Val Thr Lys Ser Cys His Leu Cys Asp Ala Gly Gln  
 85 90 95  
 Pro His Leu Gln His Gly Ala Ala Phe Leu Thr Asp Tyr Asn Asn Gln  
 100 105 110  
 Ala Asp Thr Thr Trp Trp Gln Ser Gln Thr Met Leu Ala Gly Val Gln  
 35 115 120 125  
 Tyr Pro Ser Ser Ile Asn Leu Thr Leu His Leu Gly Lys Ala Phe Asp  
 130 135 140  
 Ile Thr Tyr Val Arg Leu Lys Phe His Thr Ser Arg Pro Glu Ser Phe  
 145 150 155 160  
 40 Ala Ile Tyr Lys Arg Thr Arg Glu Asp Gly Pro Trp Ile Pro Tyr Gln  
 165 170 175  
 Tyr Tyr Ser Gly Ser Cys Glu Asn Thr Tyr Ser Lys Ala Asn Arg Gly  
 180 185 190  
 Phe Ile Arg Thr Gly Gly Asp Glu Gln Gln Ala Leu Cys Thr Asp Glu  
 45 195 200 205  
 Phe Ser Asp Ile Ser Pro Leu Thr Gly Gly Asn Val Ala Phe Ser Thr  
 210 215 220  
 Leu Glu Gly Arg Pro Ser Ala Tyr Asn Phe Asp Asn Ser Pro Val Leu

RU 2758 006 C2

	225				230					235				240		
	Gln	Glu	Trp	Val	Thr	Ala	Thr	Asp	Ile	Arg	Val	Thr	Leu	Asn	Arg	Leu
					245					250				255		
	Asn	Thr	Phe	Gly	Asp	Glu	Val	Phe	Asn	Asp	Pro	Lys	Val	Leu	Lys	Ser
5				260					265					270		
	Tyr	Tyr	Tyr	Ala	Ile	Ser	Asp	Phe	Ala	Val	Gly	Gly	Arg	Cys	Lys	Cys
				275					280					285		
	Asn	Gly	His	Ala	Ser	Glu	Cys	Met	Lys	Asn	Glu	Phe	Asp	Lys	Leu	Val
				290					295					300		
10	Cys	Asn	Cys	Lys	His	Asn	Thr	Tyr	Gly	Val	Asp	Cys	Glu	Lys	Cys	Leu
	305								310					315		320
	Pro	Phe	Phe	Asn	Asp	Arg	Pro	Trp	Arg	Arg	Ala	Thr	Ala	Glu	Ser	Ala
				325										330		335
	Ser	Glu	Cys	Leu	Pro	Cys	Asp	Cys	Asn	Gly	Arg	Ser	Gln	Glu	Cys	Tyr
15				340										345		350
	Phe	Asp	Pro	Glu	Leu	Tyr	Arg	Ser	Thr	Gly	His	Gly	Gly	His	Cys	Thr
				355										360		365
	Asn	Cys	Gln	Asp	Asn	Thr	Asp	Gly	Ala	His	Cys	Glu	Arg	Cys	Arg	Glu
				370										375		380
20	Asn	Phe	Phe	Arg	Leu	Gly	Asn	Asn	Glu	Ala	Cys	Ser	Ser	Cys	His	Cys
	385													390		395
	Ser	Pro	Val	Gly	Ser	Leu	Ser	Thr	Gln	Cys	Asp	Ser	Tyr	Gly	Arg	Cys
				405										410		415
	Ser	Cys	Lys	Pro	Gly	Val	Met	Gly	Asp	Lys	Cys	Asp	Arg	Cys	Gln	Pro
25				420										425		430
	Gly	Phe	His	Ser	Leu	Thr	Glu	Ala	Gly	Cys	Arg	Pro	Cys	Ser	Cys	Asp
				435										440		445
	Pro	Ser	Gly	Ser	Ile	Asp	Glu	Cys	Asn	Ile	Glu	Thr	Gly	Arg	Cys	Val
				450										455		460
30	Cys	Lys	Asp	Asn	Val	Glu	Gly	Phe	Asn	Cys	Glu	Arg	Cys	Lys	Pro	Gly
	465													470		475
	Phe	Phe	Asn	Leu	Glu	Ser	Ser	Asn	Pro	Arg	Gly	Cys	Thr	Pro	Cys	Phe
				485										490		495
	Cys	Phe	Gly	His	Ser	Ser	Val	Cys	Thr	Asn	Ala	Val	Gly	Tyr	Ser	Val
35				500										505		510
	Tyr	Ser	Ile	Ser	Ser	Thr	Phe	Gln	Ile	Asp	Glu	Asp	Gly	Trp	Arg	Ala
				515										520		525
	Glu	Gln	Arg	Asp	Gly	Ser	Glu	Ala	Ser	Leu	Glu	Trp	Ser	Ser	Glu	Arg
				530										535		540
40	Gln	Asp	Ile	Ala	Val	Ile	Ser	Asp	Ser	Tyr	Phe	Pro	Arg	Tyr	Phe	Ile
	545													550		555
	Ala	Pro	Ala	Lys	Phe	Leu	Gly	Lys	Gln	Val	Leu	Ser	Tyr	Gly	Gln	Asn
				565										570		575
	Leu	Ser	Phe	Ser	Phe	Arg	Val	Asp	Arg	Arg	Asp	Thr	Arg	Leu	Ser	Ala
45				580										585		590
	Glu	Asp	Leu	Val	Leu	Glu	Gly	Ala	Gly	Leu	Arg	Val	Ser	Val	Pro	Leu
				595										600		605
	Ile	Ala	Gln	Gly	Asn	Ser	Tyr	Pro	Ser	Glu	Thr	Thr	Val	Lys	Tyr	Val

RU 2758 006 C2

	610		615		620														
	Phe	Arg	Leu	His	Glu	Ala	Thr	Asp	Tyr	Pro	Trp	Arg	Pro	Ala	Leu	Thr			
	625					630					635					640			
	Pro	Phe	Glu	Phe	Gln	Lys	Leu	Leu	Asn	Asn	Leu	Thr	Ser	Ile	Lys	Ile			
5					645					650					655				
	Arg	Gly	Thr	Tyr	Ser	Glu	Arg	Ser	Ala	Gly	Tyr	Leu	Asp	Asp	Val	Thr			
				660					665					670					
	Leu	Ala	Ser	Ala	Arg	Pro	Gly	Pro	Gly	Val	Pro	Ala	Thr	Trp	Val	Glu			
				675					680					685					
10	Ser	Cys	Thr	Cys	Pro	Val	Gly	Tyr	Gly	Gly	Gln	Phe	Cys	Glu	Met	Cys			
	690						695						700						
	Leu	Ser	Gly	Tyr	Arg	Arg	Glu	Thr	Pro	Asn	Leu	Gly	Pro	Tyr	Ser	Pro			
	705					710						715				720			
	Cys	Val	Leu	Cys	Ala	Cys	Asn	Gly	His	Ser	Glu	Thr	Cys	Asp	Pro	Glu			
15					725					730					735				
	Thr	Gly	Val	Cys	Asn	Cys	Arg	Asp	Asn	Thr	Ala	Gly	Pro	His	Cys	Glu			
				740					745					750					
	Lys	Cys	Ser	Asp	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Asp	Ser	Thr	Ala	Gly	Thr	Ser	Ser			
				755				760					765						
20	Asp	Cys	Gln	Pro	Cys	Pro	Cys	Pro	Gly	Gly	Ser	Ser	Cys	Ala	Val	Val			
	770						775						780						
	Pro	Lys	Thr	Lys	Glu	Val	Val	Cys	Thr	Asn	Cys	Pro	Thr	Gly	Thr	Thr			
	785					790						795				800			
	Gly	Lys	Arg	Cys	Glu	Leu	Cys	Asp	Asp	Gly	Tyr	Phe	Gly	Asp	Pro	Leu			
25					805					810					815				
	Gly	Arg	Asn	Gly	Pro	Val	Arg	Leu	Cys	Arg	Leu	Cys	Gln	Cys	Ser	Asp			
				820					825				830						
	Asn	Ile	Asp	Pro	Asn	Ala	Val	Gly	Asn	Cys	Asn	Arg	Leu	Thr	Gly	Glu			
				835				840					845						
30	Cys	Leu	Lys	Cys	Ile	Tyr	Asn	Thr	Ala	Gly	Phe	Tyr	Cys	Asp	Arg	Cys			
	850						855						860						
	Lys	Asp	Gly	Phe	Phe	Gly	Asn	Pro	Leu	Ala	Pro	Asn	Pro	Ala	Asp	Lys			
	865					870					875				880				
	Cys	Lys	Ala	Cys	Asn	Cys	Asn	Leu	Tyr	Gly	Thr	Met	Lys	Gln	Gln	Ser			
35					885					890					895				
	Ser	Cys	Asn	Pro	Val	Thr	Gly	Gln	Cys	Glu	Cys	Leu	Pro	His	Val	Thr			
				900					905					910					
	Gly	Gln	Asp	Cys	Gly	Ala	Cys	Asp	Pro	Gly	Phe	Tyr	Asn	Leu	Gln	Ser			
				915				920					925						
40	Gly	Gln	Gly	Cys	Glu	Arg	Cys	Asp	Cys	His	Ala	Leu	Gly	Ser	Thr	Asn			
	930						935						940						
	Gly	Gln	Cys	Asp	Ile	Arg	Thr	Gly	Gln	Cys	Glu	Cys	Gln	Pro	Gly	Ile			
	945					950					955				960				
	Thr	Gly	Gln	His	Cys	Glu	Arg	Cys	Glu	Val	Asn	His	Phe	Gly	Phe	Gly			
45					965					970					975				
	Pro	Glu	Gly	Cys	Lys	Pro	Cys	Asp	Cys	His	Pro	Glu	Gly	Ser	Leu	Ser			
				980					985					990					
	Leu	Gln	Cys	Lys	Asp	Asp	Gly	Arg	Cys	Glu	Cys	Arg	Glu	Gly	Phe	Val			



RU 2758 006 C2

	995					1000					1005				
	Gly	Asn	Arg	Cys	Asp	Gln	Cys	Glu	Glu	Asn	Tyr	Phe	Tyr	Asn	Arg
	1010						1015					1020			
5	Ser	Trp	Pro	Gly	Cys	Gln	Glu	Cys	Pro	Ala	Cys	Tyr	Arg	Leu	Val
	1025						1030					1035			
	Lys	Asp	Lys	Val	Ala	Asp	His	Arg	Val	Lys	Leu	Gln	Glu	Leu	Glu
	1040						1045					1050			
	Ser	Leu	Ile	Ala	Asn	Leu	Gly	Thr	Gly	Asp	Glu	Met	Val	Thr	Asp
	1055						1060					1065			
10	Gln	Ala	Phe	Glu	Asp	Arg	Leu	Lys	Glu	Ala	Glu	Arg	Glu	Val	Met
	1070						1075					1080			
	Asp	Leu	Leu	Arg	Glu	Ala	Gln	Asp	Val	Lys	Asp	Val	Asp	Gln	Asn
	1085						1090					1095			
15	Leu	Met	Asp	Arg	Leu	Gln	Arg	Val	Asn	Asn	Thr	Leu	Ser	Ser	Gln
	1100						1105					1110			
	Ile	Ser	Arg	Leu	Gln	Asn	Ile	Arg	Asn	Thr	Ile	Glu	Glu	Thr	Gly
	1115						1120					1125			
	Asn	Leu	Ala	Glu	Gln	Ala	Arg	Ala	His	Val	Glu	Asn	Thr	Glu	Arg
	1130						1135					1140			
20	Leu	Ile	Glu	Ile	Ala	Ser	Arg	Glu	Leu	Glu	Lys	Ala	Lys	Val	Ala
	1145						1150					1155			
	Ala	Ala	Asn	Val	Ser	Val	Thr	Gln	Pro	Glu	Ser	Thr	Gly	Asp	Pro
	1160						1165					1170			
25	Asn	Asn	Met	Thr	Leu	Leu	Ala	Glu	Glu	Ala	Arg	Lys	Leu	Ala	Glu
	1175						1180					1185			
	Arg	His	Lys	Gln	Glu	Ala	Asp	Asp	Ile	Val	Arg	Val	Ala	Lys	Thr
	1190						1195					1200			
	Ala	Asn	Asp	Thr	Ser	Thr	Glu	Ala	Tyr	Asn	Leu	Leu	Leu	Arg	Thr
	1205						1210					1215			
30	Leu	Ala	Gly	Glu	Asn	Gln	Thr	Ala	Phe	Glu	Ile	Glu	Glu	Leu	Asn
	1220						1225					1230			
	Arg	Lys	Tyr	Glu	Gln	Ala	Lys	Asn	Ile	Ser	Gln	Asp	Leu	Glu	Lys
	1235						1240					1245			
35	Gln	Ala	Ala	Arg	Val	His	Glu	Glu	Ala	Lys	Arg	Ala	Gly	Asp	Lys
	1250						1255					1260			
	Ala	Val	Glu	Ile	Tyr	Ala	Ser	Val	Ala	Gln	Leu	Ser	Pro	Leu	Asp
	1265						1270					1275			
	Ser	Glu	Thr	Leu	Glu	Asn	Glu	Ala	Asn	Asn	Ile	Lys	Met	Glu	Ala
	1280						1285					1290			
40	Glu	Asn	Leu	Glu	Gln	Leu	Ile	Asp	Gln	Lys	Leu	Lys	Asp	Tyr	Glu
	1295						1300					1305			
	Asp	Leu	Arg	Glu	Asp	Met	Arg	Gly	Lys	Glu	Leu	Glu	Val	Lys	Asn
	1310						1315					1320			
45	Leu	Leu	Glu	Lys	Gly	Lys	Thr	Glu	Gln	Gln	Thr	Ala	Asp	Gln	Leu
	1325						1330					1335			
	Leu	Ala	Arg	Ala	Asp	Ala	Ala	Lys	Ala	Leu	Ala	Glu	Glu	Ala	Ala
	1340						1345					1350			
	Lys	Lys	Gly	Arg	Asp	Thr	Leu	Gln	Glu	Ala	Asn	Asp	Ile	Leu	Asn

RU 2758 006 C2

	1355		1360		1365
	Asn Leu Lys Asp Phe Asp Arg Arg Val Asn Asp Asn Lys Thr Ala				
	1370		1375		1380
	Ala Glu Glu Ala Leu Arg Lys Ile Pro Ala Ile Asn Gln Thr Ile				
5	1385		1390		1395
	Thr Glu Ala Asn Glu Lys Thr Arg Glu Ala Gln Gln Ala Leu Gly				
	1400		1405		1410
	Ser Ala Ala Ala Asp Ala Thr Glu Ala Lys Asn Lys Ala His Glu				
	1415		1420		1425
10	Ala Glu Arg Ile Ala Ser Ala Val Gln Lys Asn Ala Thr Ser Thr				
	1430		1435		1440
	Lys Ala Glu Ala Glu Arg Thr Phe Ala Glu Val Thr Asp Leu Asp				
	1445		1450		1455
	Asn Glu Val Asn Asn Met Leu Lys Gln Leu Gln Glu Ala Glu Lys				
15	1460		1465		1470
	Glu Leu Lys Arg Lys Gln Asp Asp Ala Asp Gln Asp Met Met Met				
	1475		1480		1485
	Ala Gly Met Ala Ser Gln Ala Ala Gln Glu Ala Glu Ile Asn Ala				
	1490		1495		1500
20	Arg Lys Ala Lys Asn Ser Val Thr Ser Leu Leu Ser Ile Ile Asn				
	1505		1510		1515
	Asp Leu Leu Glu Gln Leu Gly Gln Leu Asp Thr Val Asp Leu Asn				
	1520		1525		1530
	Lys Leu Asn Glu Ile Glu Gly Thr Leu Asn Lys Ala Lys Asp Glu				
25	1535		1540		1545
	Met Lys Val Ser Asp Leu Asp Arg Lys Val Ser Asp Leu Glu Asn				
	1550		1555		1560
	Glu Ala Lys Lys Gln Glu Ala Ala Ile Met Asp Tyr Asn Arg Asp				
	1565		1570		1575
30	Ile Glu Glu Ile Met Lys Asp Ile Arg Asn Leu Glu Asp Ile Arg				
	1580		1585		1590
	Lys Thr Leu Pro Ser Gly Cys Phe Asn Thr Pro Ser Ile Glu Lys				
	1595		1600		1605
	Pro				
35	<210> 4				
	<211> 555				
	<212> PRT				
	<213> Homo sapiens				
	<400> E-cadherin				
40	Met Asp Trp Val Ile Pro Pro Ile Ser Cys Pro Glu Asn Glu Lys Gly				
	1 5 10 15				
	Pro Phe Pro Lys Asn Leu Val Gln Ile Lys Ser Asn Lys Asp Lys Glu				
	20 25 30				
	Gly Lys Val Phe Tyr Ser Ile Thr Gly Gln Gly Ala Asp Thr Pro Pro				
45	35 40 45				
	Val Gly Val Phe Ile Ile Glu Arg Glu Thr Gly Trp Leu Lys Val Thr				
	50 55 60				
	Glu Pro Leu Asp Arg Glu Arg Ile Ala Thr Tyr Thr Leu Phe Ser His				

RU 2758 006 C2

	65				70					75				80		
	Ala	Val	Ser	Ser	Asn	Gly	Asn	Ala	Val	Glu	Asp	Pro	Met	Glu	Ile	Leu
					85					90				95		
	Ile	Thr	Val	Thr	Asp	Gln	Asn	Asp	Asn	Lys	Pro	Glu	Phe	Thr	Gln	Glu
5				100				105					110			
	Val	Phe	Lys	Gly	Ser	Val	Met	Glu	Gly	Ala	Leu	Pro	Gly	Thr	Ser	Val
			115					120					125			
	Met	Glu	Val	Thr	Ala	Thr	Asp	Ala	Asp	Asp	Asp	Val	Asn	Thr	Tyr	Asn
			130					135					140			
10	Ala	Ala	Ile	Ala	Tyr	Thr	Ile	Leu	Ser	Gln	Asp	Pro	Glu	Leu	Pro	Asp
	145							150					155			160
	Lys	Asn	Met	Phe	Thr	Ile	Asn	Arg	Asn	Thr	Gly	Val	Ile	Ser	Val	Val
				165							170					175
	Thr	Thr	Gly	Leu	Asp	Arg	Glu	Ser	Phe	Pro	Thr	Tyr	Thr	Leu	Val	Val
15				180							185					190
	Gln	Ala	Ala	Asp	Leu	Gln	Gly	Glu	Gly	Leu	Ser	Thr	Thr	Ala	Thr	Ala
			195					200					205			
	Val	Ile	Thr	Val	Thr	Asp	Thr	Asn	Asp	Asn	Pro	Pro	Ile	Phe	Asn	Pro
			210					215					220			
20	Thr	Thr	Tyr	Lys	Gly	Gln	Val	Pro	Glu	Asn	Glu	Ala	Asn	Val	Val	Ile
	225							230					235			240
	Thr	Thr	Leu	Lys	Val	Thr	Asp	Ala	Asp	Ala	Pro	Asn	Thr	Pro	Ala	Trp
				245							250					255
	Glu	Ala	Val	Tyr	Thr	Ile	Leu	Asn	Asp	Asp	Gly	Gly	Gln	Phe	Val	Val
25				260							265					270
	Thr	Thr	Asn	Pro	Val	Asn	Asn	Asp	Gly	Ile	Leu	Lys	Thr	Ala	Lys	Gly
			275								280					285
	Leu	Asp	Phe	Glu	Ala	Lys	Gln	Gln	Tyr	Ile	Leu	His	Val	Ala	Val	Thr
			290										300			
30	Asn	Val	Val	Pro	Phe	Glu	Val	Ser	Leu	Thr	Thr	Ser	Thr	Ala	Thr	Val
	305												315			320
	Thr	Val	Asp	Val	Leu	Asp	Val	Asn	Glu	Ala	Pro	Ile	Phe	Val	Pro	Pro
				325									330			335
	Glu	Lys	Arg	Val	Glu	Val	Ser	Glu	Asp	Phe	Gly	Val	Gly	Gln	Glu	Ile
35				340							345					350
	Thr	Ser	Tyr	Thr	Ala	Gln	Glu	Pro	Asp	Thr	Phe	Met	Glu	Gln	Lys	Ile
			355										365			
	Thr	Tyr	Arg	Ile	Trp	Arg	Asp	Thr	Ala	Asn	Trp	Leu	Glu	Ile	Asn	Pro
			370										380			
40	Asp	Thr	Gly	Ala	Ile	Ser	Thr	Arg	Ala	Glu	Leu	Asp	Arg	Glu	Asp	Phe
	385												395			400
	Glu	His	Val	Lys	Asn	Ser	Thr	Tyr	Thr	Ala	Leu	Ile	Ile	Ala	Thr	Asp
				405									410			415
	Asn	Gly	Ser	Pro	Val	Ala	Thr	Gly	Thr	Gly	Thr	Leu	Leu	Leu	Ile	Leu
45				420									425			430
	Ser	Asp	Val	Asn	Asp	Asn	Ala	Pro	Ile	Pro	Glu	Pro	Arg	Thr	Ile	Phe
			435										440			445
	Phe	Cys	Glu	Arg	Asn	Pro	Lys	Pro	Gln	Val	Ile	Asn	Ile	Ile	Asp	Ala

RU 2758 006 C2

	450		455		460															
	Asp	Leu	Pro	Pro	Asn	Thr	Ser	Pro	Phe	Thr	Ala	Glu	Leu	Thr	His	Gly				
	465					470					475				480					
	Ala	Ser	Ala	Asn	Trp	Thr	Ile	Gln	Tyr	Asn	Asp	Pro	Thr	Gln	Glu	Ser				
5					485					490				495						
	Ile	Ile	Leu	Lys	Pro	Lys	Met	Ala	Leu	Glu	Val	Gly	Asp	Tyr	Lys	Ile				
				500					505					510						
	Asn	Leu	Lys	Leu	Met	Asp	Asn	Gln	Asn	Lys	Asp	Gln	Val	Thr	Thr	Leu				
			515					520						525						
10	Glu	Val	Ser	Val	Cys	Asp	Cys	Glu	Gly	Ala	Ala	Gly	Val	Cys	Arg	Lys				
			530					535						540						
	Ala	Gln	Pro	Val	Glu	Ala	Gly	Leu	Gln	Ile	Pro									
	545					550					555									
	<210>	5																		
15	<211>	4024																		
	<212>	DNA																		
	<213>	Homo sapiens																		
	<400>	LIN28 (LIN28A) coding																		
	caccgctatt	gtgcg	ggggga	agatg	tagca	gcttcttctc	cgaaccaacc	ctttgccttc											60	
20	ggacttctcc	ggggccagca	gccgccc	gac	caggggccc	gggccacggg	ctcagccgac												120	
	gaccatgggc	tccgtgtcca	accagcagtt	tgcaggtggc	tgcgccaagg	cggcagaaga													180	
	ggcgccc	gag	gcgccc	aggacgcggc	ccgggcggcg	gacgagcctc	agctgctgca												240	
	cggtgcgggc	atctgtaagt	ggttcaacgt	gcgcatgggg	ttcggcttcc	tgtccatgac													300	
	cgccccgcgc	ggggtcgcgc	tcgaccccc	agtggatgtc	tttgtgcacc	agagtaagct													360	
25	gcacatggaa	gggttccgga	gcttgaagga	gggtgaggca	gtggagttca	cctttaagaa													420	
	gtcagccaag	ggtctggaat	ccatccgtgt	caccggacct	ggtggagtat	tctgtattgg													480	
	gagtgagagg	cggccaaaag	gaaagagcat	gcagaagcgc	agatcaaaag	gagacaggtg													540	
	ctacaactgt	ggaggtctag	atcatcatgc	caaggaatgc	aagctgccac	cccagcccaa													600	
	gaagtgccac	ttctgccaga	gcacagcca	tatggtagcc	tcatgtccgc	tgaaggccca													660	
30	gcagggccct	agtgcacagg	gaaagccaac	ctactttcga	gaggaagaag	aagaaatcca													720	
	cagccctacc	ctgctcccgc	aggcacagaa	ttgagccaca	atgggtgggg	gctattcttt													780	
	tgctatcagg	aagttttgag	gagcagggcag	agtggagaaa	gtgggaatag	ggtgcattgg													840	
	ggctagttgg	cactgccatg	tatctcaggc	ttgggttcac	accatcacc	tttcttcct													900	
	ctaggtgggg	ggaaagggg	agtcaaagga	actccaacca	tgctctgtcc	aaatgcaagt													960	
35	gaggggttctg	ggggcaacca	ggagggggga	atcacccctac	aacctgcata	ctttgagtct													1020	
	ccatccccag	aatttccagc	ttttgaaagt	ggcctggata	gggaagttgt	tttcctttta													1080	
	aagaaggata	tataataatt	cccattgccag	agtgaaatga	ttaagtataa	gaccagattc													1140	
	atggagccaa	gccactacat	tctgtggaag	gagatctctc	aggagtaagc	attgtttttt													1200	
	tttcacatct	tgtatcctca	taccactttt	tgggataggg	tgctggcagc	tgtccaagc													1260	
40	aatgggtaat	gatgatggca	aaaaggggtg	ttgggggaac	agctgcagac	ctgctgctct													1320	
	atgctcacc	ccgccccatt	ctggggccaat	gtgattttat	ttatttgctc	ccttggtatc													1380	
	tgcaccttgg	gtcccacttt	ctccaggatg	ccaactgcac	tagctgtgtg	cgaatgacgt													1440	
	atcttgtgca	ttttaacttt	ttttccttaa	tataaatatt	ctggttttgt	atttttgtat													1500	
	attttaaatct	aaggccctca	tttctgcac	tgtgttctca	ggtacatgag	caatctcagg													1560	
45	gatagccagc	agcagctcca	ggtctgcgca	gcaggaatta	ctttttgttg	tttttgccac													1620	
	cgtggagagc	aactatgttg	agtgcacagc	ctattgaact	acctcatttt	tgccaataag													1680	
	agctggcttt	tctgccatag	tgtcctcttg	aaacccccctc	tgccctgaaa	atgttttatg													1740	
	ggagactagg	ttttaactgg	gtggccccat	gacttgattg	ccttctactg	gaagattggg													1800	

aattagtcta aacaggaaat ggtggtacac agaggctagg agaggctggg cccggtgaaa 1860  
aggccagaga gcaagccaag attaggtgag ggttgtctaa tcctatggca caggacgtgc 1920  
tttacatctc cagatctggt cttcaccaga ttaggttagg cctaccatgt gccacagggg 1980  
gtgtgtgtgt ttgtaaaact agagttgcta aggataagtt taaagaccaa taccctgtga 2040  
5 cttaatcctg tgctgtcgag ggatggatat atgaagtaag gtgagatcct taacctttca 2100  
aaattttcgg gttccaggga gacacacaag cgagggtttt gtggtgcctg gagcctgtgt 2160  
cctgccctgc tacagtagtg attaatagtg tcatggtagc taaaggagaa aaaggggggt 2220  
tcgtttacac gctgtgagat caccgcaaac ctaccttact gtgttgaaac gggacaaatg 2280  
caatagaacg cattgggtgg tgtgtgtctg atcctgggtt cttgtctccc ctaaagtctg 2340  
10 ccccccaagt tactgtatth gtctgggctt tgtaggactt cactacgttg attgctaggt 2400  
ggcctagttt gtgtaaatat aatgtattgg tctttctccg tgttctttgg gggttttgtt 2460  
tacaaaacttc tttttgtatt gagagaaaaa tagccaaagc atctttgaca gaaggttctg 2520  
caccaggcaa aaagatctga aacattagtt tggggggccc tcttcttaa gtggggatct 2580  
tgaaccatcc tttcttttgt attccccttc ccctattacc tattagacca gatcttctgt 2640  
15 cctaaaaact tgtcttctac cctgccctct tttctgttca cccccaaaag aaaacttaca 2700  
caccacaca catacacatt tcatgcttgg agtgtctcca caactcttaa atgatgatg 2760  
caaaaatact gaagctagga aaaccctcca tccctgttc ccaacctcct aagtcaagac 2820  
cattaccatt tctttctttc tttttttttt ttttttaaaa tggagtctca ctgtgtcacc 2880  
caggctggag tgcagtgcca tgatcggctc actgcagcct ctgcctcttg ggttcaagtg 2940  
20 attctcctgc ctcagcctcc tgagtagctg ggatttcagg caccgccac actcagctaa 3000  
tttttgtatt ttttagtagag acgggggttt accatgttgt ccaggctggg ctggaactcc 3060  
tgacctcagg tgatctgccc accttggctt cccaaagtgc tgggattaca ggcatgagcc 3120  
accatgctgg gccaaaccatt tcttgggtga ttcattgcaa acaacttaaga cactgctgta 3180  
gcccaggcgc ggtggctcac acctgtaatc ccagcacttt ggaaggctga ggcgggcgga 3240  
25 tcacaaggtc acgagttcaa aactatcctg gccaacacag tgaacccccg tctctactaa 3300  
aatacaaaaa aattagccgg gtgtgggtgg gcatgccttt agtcctagct attcaggagg 3360  
ctgaggcagg ggaatcgctt gaaccgcaga ggagaggtt gcagtgagct gagatcgac 3420  
cactgcactc cagcctgggt acagagcaag actctgtctc aaacaaaaca aaacaaaaca 3480  
aaaacacact actgtattht ggatggatca aacctcctta attttaattt ctaatcctaa 3540  
30 agtaaagaga tgcaattggg ggccttccat gtagaaagtg gggtcaggag gccaaagaaag 3600  
ggaatatgaa tgtatatcca agtcactcag gaacttttat gcaggtgcta gaaactttat 3660  
gtcaaagtgg ccacaagatt gtttaatagg agacgaacga atgtaactcc atgtttactg 3720  
ctaaaaacca aagctttgtg taaaatcttg aatttatggg gcgggagggt aggaaagcct 3780  
gtacctgtct gtttttttcc tgatccttht ccctcattcc tgaactgcag gagactgagc 3840  
35 ccctttgggc tttggtgacc ccatcactgg ggtgtgttta tttgatgggt gatthttgctg 3900  
tactgggtac ttcctttccc atthttcta atthttttaa cacaagctga ctcttccctt 3960  
cccttctcct ttccttggga aaatacaatg aataaataaa gacttattgg tacgcaaact 4020  
gtca 4024  
<210> 6  
40 <211> 1430  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens  
<400> OCT4 (POU5F1) coding  
agagaggggt tgagtagtcc cttcgcaagc cctcatttca ccaggcccc ggcttggggc 60  
45 gccttctctc cccatggcgg gacacctggc ttcggatttc gccttctcgc ccctccagg 120  
tggtggagggt gatgggccag gggggccgga gccgggctgg gttgatctc ggacctggct 180  
aagcttccaa ggccctctg gagggccagg aatcggggcc ggggttgggc caggctctga 240  
ggtgtggggg attcccccat gccccccgcc gtatgagttc tgtgggggga tggcgactg 300

	tgggccccag	gttggagtgg	ggctagtgcc	ccaaggcggc	ttggagacct	ctcagcctga	360
	gggcgaagca	ggagtccggg	tggagagcaa	ctccgatggg	gcctccccgg	agccctgcac	420
	cgtcaccctt	ggtgccgtga	agctggagaa	ggagaagctg	gagcaaaacc	cggaggagtc	480
	ccaggacatc	aaagctctgc	agaaaagaact	cgagcaatth	gccaagctcc	tgaagcagaa	540
5	gaggatcacc	ctgggatata	cacaggccga	tgtggggctc	accctggggg	ttctatttgg	600
	gaaggtattc	agccaaacga	ccatctgccg	ctttgaggct	ctgcagctta	gcttcaagaa	660
	catgtgtaag	ctgcggccct	tgtctcagaa	gtgggtggag	gaagctgaca	acaatgaaaa	720
	tcttcaggag	atatgcaaa	cagaaaccct	cgtgcaggcc	cgaagagaa	agcgaaccag	780
	tatcgagaac	cgagtgagag	gcaacctgga	gaatttgttc	ctgcagtgcc	cgaaaccac	840
10	actgcagcag	atcagccaca	tgcgccagca	gcttgggctc	gagaaggatg	tggctccagat	900
	gtggttctgt	aaccggcgcc	agaagggcaa	gcgatcaagc	agcgactatg	cacaacgaga	960
	ggatthttgag	gctgctgggt	ctcctttctc	agggggacca	gtgtcctttc	ctctggcccc	1020
	agggccccat	tttggtagcc	caggctatgg	gagccctcac	ttactgcac	tgtactcctc	1080
	ggtccctttc	cctgaggggg	aagcctttcc	ccctgtctcc	gtcaccactc	tgggctctcc	1140
15	catgcattca	aactgaggtg	cctgcccttc	taggaatggg	ggacaggggg	aggggaggag	1200
	ctagggaaag	aaaacctgga	gtttgtgcca	gggtttttgg	gattaagttc	ttcattcact	1260
	aaggaaggaa	ttgggaacac	aaagggtggg	ggcaggggag	tttggggcaa	ctggttggag	1320
	ggaaggtgaa	gttcaatgat	gctcttgatt	ttaatccac	atcatgtatc	acttttttct	1380
	taaataaaga	agcctggggac	acagtagata	gacacactta	aaaaaaaaaa		1430
20	<210>	7					
	<211>	2520					
	<212>	DNA					
	<213>	Homo sapiens					
	<400>	SOX2 coding					
25	ggatggttgt	ctattaactt	gttcaaaaaa	gtatcaggag	ttgtcaaggc	agagaagaga	60
	gtgtttgcaa	aagggggaaa	gtagtttgct	gcctctttaa	gactaggact	gagagaaaga	120
	agaggagaga	gaaagaaagg	gagagaagtt	tgagccccag	gcttaagcct	ttcaaaaaaa	180
	taataataac	aatcatcggc	ggcggcagga	tgggccagag	gaggagggaa	gcgctthttt	240
	tgatcctgat	tccagtttgc	ctctctcttt	ttttccccc	aattattctt	cgctgattt	300
30	tctctcggga	gccctgcgct	cccgcacacc	ccgcccgcct	cccctctctc	tctccccccg	360
	cccgcggggc	ccccaaagtc	ccggccgggc	cgagggctcg	cggccgcccg	cgggcccggc	420
	ccgcgcacag	cgcccgcgat	tacaacatga	tggagacgga	gctgaagccg	ccgggcccgc	480
	agcaaacttc	ggggggcggc	ggcggcaact	ccaccgcggc	ggcggccggc	ggcaaccaga	540
	aaaacagccc	ggaccgcgtc	aagcggccca	tgaatgcctt	catggtgtgg	tcccgcgggc	600
35	agcggcgcaa	gatggcccag	gagaaccccc	agatgcacaa	ctcggagatc	agcaagcgcc	660
	tgggcgccga	gtggaaactt	ttgtcggaga	cggagaagcg	gccgttcatc	gacgaggcta	720
	agcggctgcg	agcgtctcac	atgaaggagc	accgggatta	taaataccgg	ccccggcgga	780
	aaaccaagac	gctcatgaag	aaggataagt	acacgctgcc	cggcgggctg	ctggcccccg	840
	gcggcaatag	catggcgagc	ggggtcgggg	tgggcgcccg	cctgggcgcg	ggcgtgaacc	900
40	agcgcgatga	cagttacgcg	cacatgaacg	gctggagcaa	cggcagctac	agcatgatgc	960
	aggaccagct	gggctacccg	cagcaccggg	gcctcaatgc	gcacggcgca	gcgcagatgc	1020
	agcccatgca	ccgctacgac	gtgagcgccc	tgcagtacaa	ctccatgacc	agctcgcaga	1080
	cctacatgaa	cggtctgccc	acctacagca	tgtcctactc	gcagcagggc	acccttgcca	1140
	tggctcttgg	ctccatgggt	tcggtggtca	agtccgaggc	cagctccagc	ccccctgtgg	1200
45	ttacctcttc	ctcccactcc	agggcgccct	gccaggccgg	ggacctccgg	gacatgatca	1260
	gcatgtatct	ccccggcgcc	gaggtgccgg	aaccggccgc	cccagcaga	cttccatgt	1320
	cccagcacta	ccagagcggc	ccggtgcccg	gcacggccat	taacggcaca	ctgccctct	1380
	cacacatgtg	agggccggac	agcgaactgg	aggggggaga	aattttcaaa	gaaaaacgag	1440

ggaaatggga ggggtgcaaa agaggagagt aagaaacagc atggagaaaa cccggtacgc 1500  
 tcaaaaagaa aaaggaaaaa aaaaaatccc atcaccaca gcaaatgaca gctgcaaaag 1560  
 agaacaccaa tcccatccac actcacgcaa aaaccgcat gccgacaaga aaacttttat 1620  
 gagagagatc ctggacttct ttttggggga ctatttttgt acagagaaaa cctggggagg 1680  
 5 gtggggaggg cgggggaatg gaccttgtat agatctggag gaaagaaagc tacgaaaaac 1740  
 tttttaaag ttctagtggg acggtaggag ctttgcagga agtttgcaa agtctttacc 1800  
 aataatattt agagctagtc tccaagcgac gaaaaaatg ttttaattt tgcaagcaac 1860  
 ttttgtacag tatttatcga gataaacatg gcaatcaaaa tgtccattgt ttataagctg 1920  
 agaatttgcc aatatttttc aaggagaggc ttcttgctga attttgattc tgcagctgaa 1980  
 10 atttaggaca gttgcaaacg tgaaaagaag aaaattattc aaatttggac attttaattg 2040  
 tttaaaaatt gtacaaaagg aaaaaattag aataagtact ggcgaaacct ctctgtggtc 2100  
 ttgtttaaaa agggcaaaaag ttttagactg tactaaattt tataacttac tgttaaaagc 2160  
 aaaaatggcc atgcaggttg acaccgttg taatttataa tagcttttgt tcatcccaa 2220  
 ctttccattt tgttcagata aaaaaacca tgaaattact gtgtttgaaa tattttctta 2280  
 15 tggtttgtaa tatttctgta aatttattgt gatattttaa ggttttccc ctttatttt 2340  
 ccgtagttgt attttaaaag attcggctct gtattatttg aatcagctcg ccgagaatcc 2400  
 atgtatatat ttgaactaat atcatcctta taacaggtac attttcaact taagttttta 2460  
 ctccattatg cacagtttga gataaataaa tttttgaaat atggacactg aaaaaaaaa 2520  
 <210> 8  
 20 <211> 2078  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> FOXD3 coding  
 atgaccctct ccggcgccgg cagcgccagc gacatgtccg gccagacggt gctgacggcc 60  
 25 gaggacgtgg acatcgatgt ggtggcgag ggcgacgac ggctggaaga gaaggacagc 120  
 gacgcagggt gcgatagccc cgcggggccg ccggagctgc gcctggacga ggcgacgag 180  
 gtgccccgg cggcaccoca tcacggacag cctcagccgc cccaccagca gccctgaca 240  
 ttgcccgaag aggcggcccg agccggggcc ggaccggggg gcgacgtggg cgcgccggag 300  
 gcggacggct gcaaggcgcg tgttggcggc gaggagggcg gcgagcgcg cggcgggcct 360  
 30 ggcgcgggca gcggttcggc gggaggcctg gccccgagca agcccaagaa cagcctagt 420  
 aagccgcctt actcgtacat cgcgctcatc accatggcca tcctgcagag cccgcagaag 480  
 aagctgacc tgagcggcat ctgcgagttc atcagcaacc gcttccccta ctacaggag 540  
 aagttccccg cctggcagaa cagcatccgc cacaacctc cactcaacga ctgcttcgtc 600  
 aagatcccc gcgagccggg caaccgggc aagggaact actggaccet ggaccgcag 660  
 35 tccgaggaca tgttcgacaa cggcagcttc ctgcggcgcc ggaaacgctt caagcgccac 720  
 cagcaggagc acctgcgca gcagacggcg ctcatgatgc agagcttcgg cgcttacagc 780  
 ctggcgggcg cggccggcgc cgcgggacc tacggccgcc cctacggcct gcacctgcg 840  
 gcggcgccg gtgcctattc gcaccggca gcggcgcgcg ccgcggtgc tgcggcgcg 900  
 ctccagtacc cgtacgcgct gccccggtg gcaccggtgc tgctcccgc tgtgccgctg 960  
 40 ctgccctcgg gcgagctggg ccgcaaagcg gccgccttcg gctcacagct cggcccgggc 1020  
 ctgcagctgc agctcaatag cctgggcgcc gccgcggccg ctgcgggac agcgggcgcc 1080  
 gcgggacca ccgcgtcgct catcaagtcc gagcaagcg cgcggccgct gttcagcatc 1140  
 gagaacatca taggtggggg ccccgcggt cctgggggct cggcggtggg cgctggggtc 1200  
 gccggcgca ctgggggttc agggggcggc agcacggcg agtcgtttct gcggccacc 1260  
 45 gggaccgtgc agtcggcagc gctcatggcc accaccaac cgctgtcgct gagccggacg 1320  
 actgccacca tcgcgccat tcttagcgtg cactctccg gacagtttct gcagcccga 1380  
 gcctcgccg ccgcccgtgc tgcggccgcc gctcaagca aatggccggc gcaatagga 1440  
 cgcgccaatg gccgggacc aggggtccggc ggcgccctcg agcaacaaat gcacctccag 1500

gctgcgcgcc ctgtcccaag cccgggtcccg gtcccgctgc ccaatcctgg actctgcctc 1560  
 tccccaatTT cctttcccct gagccccca cgcctacct cgcgcgccctc catcccctcg 1620  
 cgcacaccta agctggtcga gcaaaactcac cgcgcgccccg ccgggggatag ctttccatac 1680  
 aggtaaaacc gaaaaccgaa ttttccaaaa atgcacccccg acggcgccctg ctcttagtac 1740  
 5 cgtgggggatg ggagggaaat tctttgtata tttttgtaa aaaattattg actttccttt 1800  
 tgggggttttt atttttttta gaaaaaaca attccgtaga ttttagagctc tgaactttca 1860  
 ttttttttga aggttactc tccgaagttt tatctgagaa aagaatgat agagacgttg 1920  
 ggagatTTta aatataaaaa attttcaaaa aggcaaaaag tgtcattcta ttataaaagt 1980  
 ctgtttatat atgaatgaat atatatggta ttctaaatgt tattccatcg tgttgtacac 2040  
 10 aactttgtaa ataaatTTtt aaaatgccaa aaaaaaaaa 2078  
 <210> 9  
 <211> 2103  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 15 <400> NANOG coding  
 ttcattataa atctagagac tccaggattt taacgttctg ctggactgag ctggttgcct 60  
 catgttatta tgcaggcaac tcactttatc ccaatttctt gatacttttc cttctggagg 120  
 tcctatttct ctaacatctt ccagaaaagt cttaaagctg ccttaacctt ttttccagtc 180  
 cacctcttaa attttttctt cctcttctc tatactaaca tgagtgtgga tccagcttgt 240  
 20 ccccaaagct tgccttgctt tgaagcatcc gactgtaaag aatcttcacc tatgcctgtg 300  
 atttgtgggc ctgaagaaaa ctatccatcc ttgcaaatgt cttctgctga gatgcctcac 360  
 acggagactg tctctcctct tccttctctc atggatctgc ttattcagga cagccctgat 420  
 tcttccacca gtcccaaagg caaacaaccc acttctgcag agaagagtgat cgcaaaaaag 480  
 gaagacaagg tcccgggtcaa gaaacagaag accagaactg tgttctctc caccagctg 540  
 25 tgtgtactca atgatagatt tcagagacag aaatacctca gcctccagca gatgcaagaa 600  
 ctctccaaca tcctgaacct cagctacaaa caggtgaaga cctggttcca gaaccagaga 660  
 atgaaatcta agaggtggca gaaaaacaac tggccgaaga atagcaatgg tgtgacgcag 720  
 aaggcctcag cacctacctt ccccgacctt tactcttctt accaccaggg atgcctggtg 780  
 aaccgcactg ggaaccttcc aatgtggagc aaccagacct ggaacaattc aacctggagc 840  
 30 aaccagacct agaacaatcca gtcctggagc aaccactcct ggaacactca gacctggtgc 900  
 acccaatcct ggaacaatca ggcctggaac agtcccttct ataactgtgg agaggaatct 960  
 ctgcagtcct gcatgcagtt ccagccaaat tctcctgcc a gtgacttggga ggctgccttg 1020  
 gaagctgctg ggggaaggcct taatgtaata cagcagacca ctaggatttt tagtactcca 1080  
 caaacatgg atttattcct aaactactcc atgaacatgc aacctgaaga cgtgtgaaga 1140  
 35 tgagtgaaac tgatattact caatttcagt ctggacactg gctgaaatcct tcctctcccc 1200  
 tcctcccac cctcatagga tttttcttgt ttggaaacca cgtggttctgg tttccatgat 1260  
 gcccatccag tcaatctcat ggaggggtgga gtatggttgg agcctaataca gcgaggtttc 1320  
 tttttttttt tttttcctat tggatcttcc tggagaaaat actttttttt tttttttttt 1380  
 tgaacggag tcttgcctg tgcgccaggc tggagtgcag tggcgcggtc ttggctcact 1440  
 40 gcaagctccg tctcccgggt tcacgccatt ctctgcctc agcctcccga gcagctggga 1500  
 ctacaggcgc ccgccacct gcccggttaa tttttgtat ttttagtaga gacgggggtt 1560  
 cactgtgtta gccaggatgg tctcgatctc ctgacctgt gatccacctg cctcggcctc 1620  
 cctaacagct gggatTTtaca ggcgtgagcc accgcgccct gcctagaaaa gacattttta 1680  
 taaccttggc tgccgtctct ggctatagat aagtagatct aatactagtt tggatatctt 1740  
 45 tagggTTtag aatctaacct caagaataag aaatacaagt acaaattggg gatgaagatg 1800  
 tattcgtatt gtttgggatt gggaggcttt gcttattttt taaaaactat tgaggtaaag 1860  
 ggTTaagctg taacatactt aattgatTTt ttaccgTTTT tggctctgTT ttgctatatc 1920  
 ccctaatttg ttggTTgtgc taatctTTgt agaaagaggt ctcgattttg ctgcatcgta 1980



	atgacatgag	tactgcttta	gttggtttaa	gttcaaatga	atgaaacaac	tatttttctct	2040
	ttagttgatt	ttaccctgat	ttcaccgagt	gtttcaatga	gtaaataatac	agcttaaaca	2100
	taa						2103
	<210>	10					
5	<211>	6007					
	<212>	DNA					
	<213>	Homo sapiens					
	<400>	PODXL coding					
	agccgcgcag	acgccgcca	ggacgcagcc	gccgccgccc	ccgctcctct	gccactggct	60
10	ctgcgccccca	gccccgctct	gctgcagcgg	cagggaggaa	gagccgccgc	agcgcgactc	120
	gggagccccg	ggccacagcc	tggcctccgg	agccaccac	aggcctcccc	gggcggcgcc	180
	cacgctccta	ccgcccggac	gcgcggatcc	tccgccggca	ccgcagccac	ctgctcccgg	240
	cccagaggcg	acgacacgat	gcgctgcgcg	ctggcgctct	cggcgctgct	gctactgttg	300
	tcaacgccgc	cgctgctgcc	gtcgtcgccg	tgcgccgcgc	cgtcgccctc	ccagaatgca	360
15	accagacta	ctacggactc	atctaacaaa	acagcaccga	ctccagcatc	cagtgtcacc	420
	atcatggcta	cagatacagc	ccagcagagc	acagtcccca	cttccaaggc	caacgaaatc	480
	ttggcctcgg	tcaaggcgac	cacccttggg	gtatccagtg	actcaccggg	gactacaacc	540
	ctggctcagc	aagtctcagg	cccagtcaac	actaccgtgg	ctagaggagg	cggctcaggc	600
	aaccctacta	ccaccatcga	gagccccaa	agcacaaaa	gtgcagacac	cactacagtt	660
20	gcaacctcca	cagccacagc	taaacctaac	accacaagca	gccagaatgg	agcagaagat	720
	acaacaaact	ctggggggaa	aagcagccac	agtgtgacca	cagacctcac	atccactaag	780
	gcagaacatc	tgacgacccc	tcaccctaca	agtccactta	gcccccgaca	accacttctg	840
	acgcatcctg	tggccacccc	aacaagctcg	ggacatgacc	atcttatgaa	aatttcaagc	900
	agttcaagca	ctgtggctat	ccctggctac	accttcacaa	gcccggggat	gaccaccacc	960
25	ctactagaga	cagtgtttca	ccatgtcagc	caggctggtc	ttgaactcct	gacctcgggt	1020
	gatctgcccc	ccttggcctc	ccaaagtgtc	gggattacag	cgtcacgggt	tatctcgcaa	1080
	agaactcaac	agacctccag	tcagatgcca	gccagctcta	cggccccttc	ctcccaggag	1140
	acagtgcagc	ccacgagccc	ggcaacggca	ttgagaacac	ctaccctgcc	agagaccatg	1200
	agctccagcc	ccacagcagc	atcaactacc	caccgatacc	ccaaaacacc	ttctcccact	1260
30	gtggctcatg	agagtaactg	ggcaaaagtgt	gaggatcttg	agacacagac	acagagtgag	1320
	aagcagctcg	tcctgaacct	cacaggaaac	accctctgtg	cagggggcgc	ttcggatgag	1380
	aaattgatct	cactgatatg	ccgagcagtc	aaagccacct	tcaaccgggc	ccaagataag	1440
	tgcggcatac	ggctggcatc	tgttccagga	agtcagaccg	tggtcgtcaa	agaaatcact	1500
	attcacacta	agctccctgc	caaggatgtg	tacgagcggc	tgaaggacaa	atgggatgaa	1560
35	ctaaaggagg	caggggtcag	tgacatgaag	ctaggggacc	aggggccacc	ggaggaggcc	1620
	gaggaccgct	tcagcatgcc	cctcatcatc	accatcgtct	gcatggcatc	attcctgctc	1680
	ctcgtggcgg	ccctctatgg	ctgctgccac	cagcgcctct	cccagaggaa	ggaccagcag	1740
	cggctaacag	aggagctgca	gacagtggag	aatggttacc	atgacaacc	aacactggaa	1800
	gtgatggaga	cctcttctga	gatgcaggag	aagaaggtgg	tcagcctcaa	cggggagctg	1860
40	ggggacagct	ggatcgtccc	tctggacaac	ctgaccaagg	acgacctgga	tgaggaggaa	1920
	gacacacacc	tctagtccgg	tctgccgggtg	gcctccagca	gcaccacaga	gctccagacc	1980
	aaccacccca	agtgccgtht	ggatggggaa	gggaaagact	ggggaggagg	agtgaactcc	2040
	gaggggtgtc	ccctcccaat	ccccccaggg	ccttaatttt	tcccttttca	acctgaacaa	2100
	atcacattct	gtccagattc	ctcttgtaaa	ataaccctact	agtgcctgag	ctcagtgctg	2160
45	ctggatgatg	agggagatca	agaaaaagcc	acgtaaggga	ctttatagat	gaactagtgg	2220
	aatcccttca	ttctgcagtg	agattgccga	gacctgaaga	gggtaagtga	cttgcccaag	2280
	gtcagagcca	cttggtgaca	gagccaggat	gagaacaaag	attccatttg	caccatgcca	2340
	cactgctgtg	ttcacatgtg	ccttccgtcc	agagcagtcc	cgggcagggg	tgaaactcca	2400

	gcaggtggct	gggctggaaa	ggagggcag	gctacatcct	ggctcgggtg	gatctgacga	2460
	cctgaaagtc	cagctcccaa	gttttccttc	tcctacccca	gcctcgtgta	cccatcttcc	2520
	caccctctat	gttcttacct	ctccctacac	tcagtgtttg	ttcccactta	ctctgtcctg	2580
	gggcctctgg	gattagcaca	ggttattcat	aaccttgaac	cccttgttct	ggattcggat	2640
5	tttctcacat	ttgcttcgtg	agatgggggc	ttaaccaca	caggtctccg	tgcgtgaacc	2700
	aggctctgctt	aggggacctg	cgtgcagggtg	aggagagaag	gggacctcg	agtccaggct	2760
	ggtatctcag	ggcagctgat	gaggggtcag	caggaacact	ggccattgc	ccctggcact	2820
	ccttgacagag	gccaccacg	atcttctttg	ggcttccatt	tccaccagg	actaaaatct	2880
	gctgtagcta	gtgagagcag	cgtgttcctt	ttgtttgtca	ctgctcagct	gatgggagt	2940
10	attccctgag	accagtatg	aaagagcagt	ggctgcagga	gaggccttcc	cggggccccc	3000
	catcagcgat	gtgtcttcag	agacaatcca	ttaaagcagc	caggaaggac	aggctttccc	3060
	ctgtatatca	taggaaactc	agggacattt	caagttgctg	agagttttgt	tatagttgtt	3120
	ttctaaccaca	gccctccact	gccaaaggcc	aaaagctcag	acagttggca	gacgtccagt	3180
	tagctcatct	cactcactct	gattctcctg	tgccacagga	aaagagggcc	tggaaagcgc	3240
15	agtgcacgct	gggtgcacga	agggcagcct	gggggacaga	ctggttgagg	aacgtcccac	3300
	tgtcctggcc	tggagctagg	ccttgctggt	cctcttctct	gtgagcctag	tggggctgct	3360
	gcggttctct	tgcagtttct	ggtggcatct	caggggaaca	caaagctatg	tctattcccc	3420
	aatataggac	ttttatgggc	tcggcagtta	gctgccatgt	agaaggctcc	taagcagtgg	3480
	gcatggtgag	gtttcatctg	attgagaagg	gggaatcctg	tgtggaatgt	tgaactttcg	3540
20	ccatggctctc	catcgttctg	ggcgtaaatt	ccctgggatc	aagtaggaaa	atgggcagaa	3600
	ctgcttaggg	gaatgaaatt	gccatttttc	gggtgaaacg	ccacacctcc	agggctctaa	3660
	gagtcaggct	ccggctgtag	tagctctgat	gaaataggct	atccactcgg	gatggcttac	3720
	tttttaaaag	ggtaggggga	ggggctgggg	aagatctgtc	ctgcaccatc	tgccctaattc	3780
	cttctcaca	gtctgtagcc	atctgatatc	ctaggggaaa	aggaaggcca	ggggttcaca	3840
25	tagggcccca	gagagtttcc	caggagttag	agggatgcga	ggctaacaag	ttccaaaaac	3900
	atctgccccg	atgctctagt	gtttggagg	gggcaggatg	gagaacagt	cctgtttggg	3960
	ggaaaacagg	aaatcttggt	aggcttgagt	gaggtgtttg	cttccttctt	gcccagcget	4020
	gggttctctc	caccagtag	gttttctggt	gtggtcccgt	gggagaggcc	agactggatt	4080
	attcctcctt	tgctgatcct	gggtcacact	tcaccagcca	gggcttttga	cggagacagc	4140
30	aaataggcct	ctgcaaatca	atcaaaagg	gcaaccctat	ggcctcttgg	agacagatga	4200
	tgactggcaa	ggactagaga	gcaggagtgc	ctggccagg	cggctctgac	tctcctgact	4260
	ctccatcgct	ctgtccaagg	agaacccgga	gaggctctgg	gctgattcag	aggttactgc	4320
	tttatattcg	tccaaactgt	gttagtctag	gcttaggaca	gcttcagaat	ctgacacctt	4380
	gccttgctct	tgccaccagg	acacctatgt	caacaggcca	aacagccatg	catctataaa	4440
35	ggctcatcatc	ttctgccacc	tttactgggt	tctaaatgct	ctctgataat	tcagagagca	4500
	ttgggtctgg	gaagaggtaa	gaggaacact	agaagctcag	catgacttaa	acaggttgta	4560
	gcaaagacag	tttatcatca	gctctttcag	tggtaaactg	tggtttcccc	aagctgcaca	4620
	ggaggccaga	aaccacaagt	atgatgacta	ggaagcctac	tgtcatgaga	gtggggagac	4680
	aggcagcaaa	gcttatgaag	gaggtacaga	atattctttg	cgttgtaaga	cagaatacgg	4740
40	gtttaatcta	gtctaggcac	cagatttttt	tcccgttga	taaggaaagc	tagcagaaag	4800
	tttatttaaa	ccacttcttg	agctttatct	tttttgacaa	tatactggag	aaactttgaa	4860
	gaacaagttc	aaactgatac	atatacacat	atttttttga	taatgtaa	acagtgacca	4920
	tgttaacctc	ccctgcactg	ctttaagtga	acatactttg	aaaaagcatt	atgttagctg	4980
	agtgatggcc	aagttttttc	tctggacag	aatgtaaagt	tcttactgga	aatgacaagt	5040
45	ttttgcttga	tttttttttt	taaacaaaaa	atgaaatata	acaagacaaa	cttatgataa	5100
	agtatttgct	ttgtagatca	ggtgttttgt	tttgtttttt	taatttttaa	atgcaacctt	5160
	gccccctccc	cagcaaagtc	acagctccat	ttcagtaaag	ggtggagtca	atatgctctg	5220
	gttggcaggc	aaccctgtag	tcattggagaa	aggtatttca	agatctagtc	caatcttttt	5280

	ctagagaaaa	agataatctg	aagctcacia	agatgaagtg	acttcctcaa	aatcacatgg	5340
	ttcaggacag	aaacaagatt	aaaacctgga	tccacagact	gtgcgctca	gaaggaataa	5400
	tcggtaaatt	aagaattgct	actcgaaggt	gccagaatga	cacaaaggac	agaattcctt	5460
	tcccagttgt	taccctagca	aggctagggg	gggcatgaac	acaaacataa	gaactgggtct	5520
5	tctacacttt	ctctgaatca	tttaggttta	agatgtaagt	gaacaattct	ttctttctgc	5580
	caagaaacaa	agttttggat	gagcttttat	atatggaact	tactccaaca	ggactgaggg	5640
	accaaggaaa	catgatgggg	gaggcagaga	gggcaagagt	aaaactgtag	catagctttt	5700
	gtcacggtca	ctagctgatc	cctcaggtct	gctgcaaaca	cagcatggag	gacacagatg	5760
	actctttggg	gttgggtctt	ttgtctgcag	tgaatgttca	acagtttgcc	caggaactgg	5820
10	gggatcatat	atgtcttagt	ggacaggggt	ctgaagtaca	ctggaattta	ctgagaaact	5880
	tgtttgtaaa	aactatagtt	aataattatt	gcattttctt	acaaaaatat	atthttgaaa	5940
	attgtatact	gtcaattaaa	gtgtttttgt	gtaaactggg	tcaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	6000
	aaaaaaa						6007
	<210>	11					
15	<211>	2660					
	<212>	DNA					
	<213>	Homo sapiens					
	<400>	REX1 (ZFP42)					
	agttttctct	ttgttttacg	tttgggagga	ggtggcattg	gaaatagcag	agtgcttcgc	60
20	ggtaacaggg	gttggagtgc	aatggtgtga	tctcagctca	ctgcaacccc	tgctcccag	120
	gctccagcga	tcctcccacc	tcagcctcct	gaatagctga	ccaccagcac	actaggcaaa	180
	cccacccccc	tcacggcctc	ccttgggaat	tcagacctaa	ccatcgctga	gctgaaacaa	240
	atgtactgag	gctggagcct	gtgtgaacag	aacagaagag	gccttcactc	tagtagtgct	300
	cacagtccag	caggtgtttg	ctgaagacag	cttactcaga	tactactgct	ctggaggtgg	360
25	ttgatataat	ctggtgtaaa	ccttcaagaa	gggcacaggc	aggaaaacat	gagccagcaa	420
	ctgaagaaac	gggcaaagac	aagacaccag	aaaggcctgg	gtggaagagc	ccccagtggg	480
	gctaagccca	ggcaaggcaa	gtcaagccaa	gacctgcagg	cggaaataga	acctgtcagc	540
	gcggtgtggg	ccttatgtga	tggtatgtg	tgctatgagc	ctggccctca	ggctctcgga	600
	ggggatgatt	tctcagactg	ttacatagaa	tgctgcataa	ggggtgagtt	ttctcaaccc	660
30	atcctggaag	aggactcact	ttttgagtcc	ttggaatacc	taaagaaagg	atcagaacaa	720
	cagctttctc	aaaaggtttt	cgaagcaagc	tcccttgaat	gttctttgga	atacatgaaa	780
	aaaggggtaa	agaaagagct	tccacaaaaa	atagttggag	agaattcgct	tgagtattct	840
	gagtacatga	caggcaagaa	gcttccgcct	ggaggaatac	ctggcattga	cctatcagat	900
	cctaaacagc	tcgcagaatt	tgctagaaa	aagcccccca	taaataaaga	atatgacagt	960
35	ctgagcgcga	tcgcttgtcc	tcagagtgga	tgacttagga	agttgaggaa	tagagctgcc	1020
	ctgagaaagc	atctcctcat	tcatggtccc	cgagaccacg	tctgtgcgga	atgtgggaaa	1080
	gcgttcggtg	agagctcaaa	actaaagaga	catttctctg	ttcatactgg	agagaagccg	1140
	tttcggtgca	cttttgaagg	gtgcggaaa	cgcttctctc	tggactttaa	tttgcgtacg	1200
	cacgtgcgca	tccacacggg	ggagaaacgt	ttcgtgtgtc	cctttcaagg	ctgcaacagg	1260
40	aggtttattc	agtcaaataa	cctgaaagcc	cacatcctaa	cgcatgcaaa	tacgaacaag	1320
	aatgaacaag	agggaagta	gtcctccaac	aggatgaagc	agattaacag	aagagtgatc	1380
	agtgacaaac	atgcctcatt	gattattggt	tctaggaagg	aatttctaaa	tcaatattgc	1440
	aacccccaaa	gcggttataa	tttgggtgta	ctaagatgct	cctacacttt	gtgataccgt	1500
	tttaaggaca	tgggtgcattt	ttttttcttt	tatttgtttt	atttagaact	ttttttattt	1560
45	gttttattta	gaactttgtg	tgttcttaaa	gtgtgcttcc	aacaggaagg	tcagtgataa	1620
	atthttcaaaa	gcataaacctt	caatatatta	tctgttggtg	tattggatat	aagacttatt	1680
	ttcatgtact	ataaataatga	aaataacttt	gattthttaa	tgtgtagttt	ccatttctta	1740
	gcttttgcct	tttaaatthta	tacttcagcc	aggcatagtg	actgatgcct	gtaatcccaa	1800

	cactttggtg	ggaggccaaa	gcaggaggat	agcttgaggc	caggagttcc	agaccagcct	1860
	gggcaacata	gtgagatcct	gtctctacaa	aaaaatttgt	ttttatttgt	atztatatat	1920
	ttttatTTTT	gtttttggtg	gtaggcgtct	cgctctgtca	cccaggctgg	agtctagtgt	1980
	cgTgatcttg	gctcactgca	acctccacct	cccgggttca	agtgattctc	tggcctcagc	2040
5	ctcccaagta	gctgggacta	caggtgtgtg	tcaccacgcc	cggctaattt	ttgtattttt	2100
	agtagagatg	gggtttcacc	atgttgGCCa	ggtagtctc	aaactcctga	cctccagtga	2160
	tctgcccacc	tcggcctccc	aaagtgtctg	gattacaggt	gtgagccact	gtgcctggcc	2220
	ccccacaaca	tgtttaaact	tagctaggcc	tggttgcata	cgctgtgtt	cccagctact	2280
	caggaggctg	aagcaggagg	atagcttgag	cccaggagtt	tgaggctaca	gtgagctgtg	2340
10	attgcaccac	tgtactccag	actggataac	agcaagagcc	catcttttaa	aaaaagtaaa	2400
	aattaaaaat	atacttcatg	gttcatgtca	tagccctaga	gaatgaaaaa	tttgacgtag	2460
	atagtcaata	aatgaatcag	tagttaaata	ttccttaaag	tcaactgtat	ttcattgtga	2520
	tttttgtttt	ctttttatca	ttgtatcaaa	ctatatggaa	atcatatggt	tagatgtgat	2580
	tatttgataa	tgttagtcca	tttgaatcca	ttttagatat	ttcacaatta	aagaatatga	2640
15	aacttcagaa	aaaaaaaaaa					2660
	<210>	12					
	<211>	6063					
	<212>	DNA					
	<213>	Homo sapiens					
20	<400>	SSEA1 (FUT4) coding					
	aatccctccc	tccggcgggc	gtcgtggcg	ggtggctagg	cccaacggca	ggaagccgac	60
	gctatcctcc	gttccgcggc	gccgggtccg	ccttccgtct	gttctagggc	ctgctcctgc	120
	gcggcagctg	ctttagaagg	tctcgagcct	cctgtacctt	cccagggatg	aaccgggcct	180
	tcctctgga	aggcgagggt	tcgggccaca	gtgagcgagg	gccagggcgg	tgggcgcgcg	240
25	cagagggaaa	ccgatcagt	tgagagagaa	tcaagagtag	cggatgaggc	gcttgtgggg	300
	cgcgggcccg	aagccctcgg	gcgcgggctg	ggagaaggag	tgggcggagg	cgccgcagga	360
	ggctcccggg	gcctggtcgg	gccggctggg	ccccgggcgc	agtggaagaa	agggacgggc	420
	ggtgcccggg	tgggcgtcct	ggccagctca	ccttgccctg	gcggctcgcc	ccgcccggca	480
	cttgggagga	gcagggcagg	gcccgcggcc	tttgatttct	gggaccgcc	ccttccattc	540
30	ccgggccagc	ggcgagcggc	agcgacggct	ggagccgcag	ctacagcatg	agagccgggtg	600
	ccgctcctcc	acgcctgcgg	acgcgtggcg	agcggaggca	gcgctgcctg	ttcgcgcat	660
	gggggcaacc	tggggctcgc	cgacggcggc	ggcgggcggg	cggcgcgggt	ggcgccgagg	720
	ccgggggctg	ccatggaccg	tctgtgtgct	ggcggccgcc	ggcttgacgt	gtacggcgct	780
	gatcacctac	gcttgctggg	ggcagctgcc	gccgctgccc	tgggcgtcgc	caaccccgtc	840
35	gcgaccggtg	ggcgtgctgc	tgtggtggga	gcccttcggg	gggcgcgata	gcgccccgag	900
	gccgccccct	gactgccggc	tgcgcttcaa	catcagcggc	tgccgctgc	tcaccgaccg	960
	cgcgctctac	ggagaggctc	aggccgtgct	tttccaccac	cgcgacctcg	tgaaggggcc	1020
	ccccgactgg	ccccgcct	ggggcatcca	ggcgacact	gccgaggagg	tggatctgcg	1080
	cgTgttgGac	tacgaggagg	cagcggcggc	ggcagaagcc	ctggcgacct	ccagccccag	1140
40	gcccccgggc	cagcgtggg	tttgatgaa	cttcgagtcg	ccctcgact	ccccggggct	1200
	gcgaagcctg	gcaagtaacc	tcttcaactg	gacgctctcc	taccgggagg	actcggacgt	1260
	ctttgtgcct	tatggctacc	tctaccccag	aagccacccc	ggcgaccgc	cctcaggcct	1320
	ggccccgcca	ctgtccagga	aacaggggct	ggtggcatgg	gtggtgagcc	actgggacga	1380
	gcgccaggcc	cgggtccgct	actaccacca	actgagccaa	catgtgaccg	tggacgtgtt	1440
45	cggccggggc	gggcccgggc	agccggtgcc	cgaaattggg	ctcctgcaca	cagtggcccg	1500
	ctacaagttc	tacctggctt	tcgagaactc	gcagcacctg	gattatatca	ccgagaagct	1560
	ctggcgcaac	gcgttgctcg	ctggggcggg	gccggtgggt	ctgggcccag	accgtgccaa	1620
	ctacgagcgc	tttgtgcccc	gcggcgcctt	catccacgtg	gacgacttcc	caagtgcctc	1680

	ctccctggcc	togtacctgc	ttttcctcga	ccgcaacccc	gcggtctatc	gccgctactt	1740
	ccactggcgc	cggagctacg	ctgtccacat	cacctccttc	tgggacgagc	cttggtgccg	1800
	ggtgtgccag	gctgtacaga	gggctgggga	ccggcccaag	agcatacggg	acttggccag	1860
	ctggttcgag	cgggtgaagcc	gcgctcccct	ggaagcgacc	caggggaggc	caagttgtca	1920
5	gctttttgat	cctctactgt	gcatctcctt	gactgccgca	tcatgggagt	aagttcttca	1980
	aacacccatt	tttgctctat	gggaaaaaaaa	cgatttacca	attaatatta	ctcagcacag	2040
	agatgggggc	ccggtttcca	tattttttgc	acagctagca	attgggctcc	ctttgctget	2100
	gatgggcatc	attgttttagg	ggtgaaggag	ggggttcttc	ctcaccttgt	aaccagtgca	2160
	gaaatgaaat	agcttagcgg	caagaagccg	ttgaggcggg	ttcctgaatt	tccccatctg	2220
10	ccacaggcca	tattttgtggc	ccgtgcagct	tccaaatctc	atacacaact	gttccccgatt	2280
	cacgtttttc	tggaccaagg	tgaagcaaat	ttgtggttgt	agaaggagcc	ttgttgggtg	2340
	agagtgggag	gactgtggct	gcaggtggga	ctttgttgtt	tggattcctc	acagccttgg	2400
	ctcctgagaa	aggtgaggag	ggcagtccaa	gaggggcccg	tgacttcttt	cacaagtact	2460
	atctgttccc	ctgtcctgtg	aatggaagca	aagtgtgga	ttgtccttgg	aggaaactta	2520
15	agatgaatac	atgcgtgtac	ctcactttac	ataagaaatg	tattcctgaa	aagctgcatt	2580
	taaatacaagt	cccaaattca	ttgacttagg	ggagttcagt	atttaataaa	accctatgga	2640
	gaatttatcc	ctttacaatg	tgaatagtca	tctcctaatt	tgtttcttct	gtctttatgt	2700
	ttttctataa	cctggatttt	ttaaatacata	ttaaaattac	agatgtgaaa	ataaagcaga	2760
	agcaaccttt	ttccctcttc	ccagaaaacc	agtctgtgtt	tacagacaga	agagaaggaa	2820
20	gccatagtgt	cacttccaca	caattattta	tttcatgtct	ttactggacc	tgaattttaa	2880
	actgcaatgc	cagtcctgca	ggagtgtctg	cattaccctc	tgcagaacag	tgaagggtat	2940
	tgactacat	tatggaatca	tgcaaaagga	aaaaaagttt	catgatatct	gttgttggca	3000
	gtttttgttt	atctctgaca	gttttttagt	aaatgttttag	atcctcagaa	ctacattagt	3060
	gcctactatt	aacttactct	gtctcttgtt	aaaggctaaa	tctgcgcttc	tccctgggtgc	3120
25	cagcaggttc	ccctcacagt	caatgcagtg	gtatagcata	tcctcacatt	tctagtgcc	3180
	ttgagactgt	gctatggaac	caatcttgaa	catacatgca	ttgacttgac	aagttactga	3240
	gtaagcagca	tattcagcag	gtgccactac	atgcctactc	tgccagacac	tgagcctggg	3300
	gccctagggg	agatagagaa	ttatacaagg	caaagtccct	ctctttaggg	ctcttacaat	3360
	ctatcacttc	caaaaagtaa	atgggtgactg	ataaaacaat	tggcagaacc	tgtttgatta	3420
30	ctgtgacagt	cttaatgata	ccataaatca	atattagaaa	gctagttagc	ttaaagcctg	3480
	aaataatggg	agttttctcc	tccacttatt	agaataagga	ccctcagtga	ctaattattg	3540
	tgggtagggg	caagattaac	tagttttata	cagagttctg	ctgtaaatag	tcatttttga	3600
	tttgattagt	gcagttctct	gaatcataaa	gcaagtttta	cctctctgta	catgtttttg	3660
	cagacatact	tgaaaagctc	acttaaatct	aggtgcttca	attcactttc	ttgagaggac	3720
35	aaatgaaaag	ctgtggagaa	aatgtcctca	ttaaagtatt	aaagtgtggg	cagaattaca	3780
	attacaaagt	gccagccacc	gaataaagat	aaaagttcag	ttcttaaaat	gagtttttat	3840
	gagataacag	tcagtgatct	tgggtgtacc	gggattccac	atggggcagt	gggaaagagt	3900
	tcaggttttg	aaggtaacct	agtttagatt	tgaattccag	ctatgtgaca	ttgggtaaat	3960
	tagtagtagt	cctgagcctc	agcgtcctca	tctataaaat	gactggcgaa	aatacttcac	4020
40	aagctcattt	tgagcacttt	aggaagtaag	tgaagtacc	taaaatagca	ggcacccaat	4080
	tgatgatatt	atatcttctc	tctttgcttg	cagtgatctc	aggatgtcct	catatctatt	4140
	tataggtcta	aaattatata	ttaaggatat	ttgtagaata	aattaaaagg	ataatctaaa	4200
	tcaccattta	gattaagcct	gacttgcaaa	ctaggaagaa	gcacctaggc	tttctttgaa	4260
	aatatttttt	tggttcgttt	tggtaaagct	ctataaattg	gtatctatta	ttttaccaat	4320
45	tttttttttag	tattaagtcc	atttagaact	aaccatatta	tttatggaat	aattagcatg	4380
	aggaagggtat	aattgcattt	tttttttttt	gagacggagt	cttgactgtg	agccccagct	4440
	ggactgcagt	ggcgtgatct	tggctcactg	caacctccgc	ctcccagggt	caagcgattc	4500
	tctgcctca	gcctcccag	cagctgagac	tacaggcgcc	tgccaccacg	cctggccaat	4560

	tttttgtatt	tttagtagag	actgcgtttc	accatggttg	gcaggctggt	cttgaactcc	4620
	tgacctgtg	atccacctgc	ctcggcctct	cagagagctg	ggattacagg	tgtgagccgc	4680
	cgtgcccagc	cattgcattt	ttattcacat	acacattggt	aatgtggaac	aatttaacac	4740
	taatctcatc	agagagcgag	atgaatgtgg	caattgctca	ttttattttg	catatattaa	4800
5	attgagtagg	ttcagctcta	acatacctta	agaaaaatgc	atatcgggtgc	actgtatgta	4860
	tttcaaaatg	cctttcctat	gattgtcatg	tcctccttta	aggcttttcc	ctcaaattta	4920
	ttacaaattt	agtattttta	gtacttgatg	actctaatta	catgaatgca	cctggaatga	4980
	catttgtaac	agaagacggt	ctgacttgct	ttcagtattc	acaagttctt	tccagtttcc	5040
	aagtcttttc	ctagcagtaa	tttaggggag	acagaggagt	ttcatgtaaa	gagcatgcag	5100
10	tttgaggatca	gaacctgggt	atgactctgt	ggccttgatg	aagcaagtta	cttaaactct	5160
	tgagtttttag	ctttctcctt	tacaatgcat	gaatgcctat	ccccctacaa	aacaaagatt	5220
	aaatgtgatg	atgtatgcc	agggtgctttg	tatattgtaa	agtgtctatat	aattataaga	5280
	tgttctaaat	tttcaaggat	ctaaaccagg	gattggcaaa	cgtttttcca	gggagtaaat	5340
	attttacgct	ttgcatatat	aatttatgga	ggtggtgaga	ggatagatta	gacacttgaa	5400
15	gtactcagga	tagtgcctgg	catgtaggaa	gcacctggaa	aatattcgct	gtgattacca	5460
	tcagtccatt	ttaccgagga	aggagccaag	gtccaggccc	actgaaggac	ttgcataaca	5520
	ttacaatagc	agtggcagaa	ccagccatgc	ttctgcaaat	cacaacctct	ttgagcctct	5580
	gtcacctgaa	ctgcaaaatg	agtgggttag	acaaaatcat	ctgttgggac	ctcctagttc	5640
	cacgtgctat	cattctacta	actggcacc	taaggttgaa	agtgtctatc	tgctttccaa	5700
20	tgtggcttcc	ttacagtctg	gaactgacaa	tatgcaggag	cagtaaactg	gcagaaaacc	5760
	aggaatcaga	gaaagaaaat	ataatttaac	tttaaagatg	taaattatat	atatagtata	5820
	ttatatatat	ttttaaagct	ttatatgcct	caaatatcag	ggaaaggagc	caagtccttg	5880
	gtattttagtt	tgggtgaatac	ttgcattgaa	tacatgtcaa	gatgtcaagt	catttttgaa	5940
	tgtgtctcag	ggatttctat	gctacacatt	cttttaacaa	atcaagtatt	tatgtacaca	6000
25	tgttcagatt	ttttgacaaa	atgattaata	taatgagatg	gaaaatgaaa	aaaaaaaaaa	6060
	aaa						6063
	<210>	13					
	<211>	1393					
	<212>	DNA					
30	<213>	Homo sapiens					
	<400>	DPPA2 coding					
	agccctttgt	ttatggcctg	atctagctaa	ggcttctaga	cttcaggagc	ttaagaatcg	60
	tccggagggc	tgggcgtggc	ggtgcaggcc	tgtagtccca	cccactccga	aggctgcgga	120
	gggaggatca	acttgagtct	gggaactcag	ccaggaattc	aagaccagcc	tgggcaacac	180
35	agtgaggccc	cctaccacaca	tcctctccgt	ccccgcaatc	tccttccatc	ccagggtggt	240
	gctgaaaatg	tcagatgcaa	atitggatag	cagcaagaag	aatttcttgg	agggggaagt	300
	agatgatgag	gaaagtgtga	ttttgacact	ggtgccagtt	aaagatgacg	caaatatgga	360
	acaaatggaa	ccaagcgttt	cttcaacttc	tgatgtcaaa	ctggagaagc	ctaagaaata	420
	caatccaggt	catctacttc	aaacaaatga	gcaatttaca	gctccacaaa	aagctagatg	480
40	caaaatacca	gcccttcocct	tgccgacat	tttgctccc	attaataagg	tgtgtcggga	540
	cactttgcgg	gactggtgtc	aacaactcgg	tttgagtact	aatggcaaga	aatcgaagt	600
	ttatctgagg	cttcataggc	atgcttacc	tgaacaacgg	caagatatgc	ctgaaatgtc	660
	acaagagacc	agattacagc	gatgttcgag	gaaacgcaag	gcagtgacca	agagagcaag	720
	gcttcagaga	agttatgaga	tgaatgagag	agcagaagag	accaatacag	ttgaagtgat	780
45	aacttcagca	ccgggagcca	tgttggcatc	atgggcaaga	attgctgcaa	gagctgttca	840
	gcctaaggct	ttgaattcat	gttccattcc	tgtttctggt	gaggcctttt	tgatgcaagc	900
	ctctggcgtc	agggtggtg	tgggtccatg	cagacttctc	tcggcagaca	caaaggggtg	960
	ggtacgcctg	cagtttcatg	caggctcaggc	ctgggtgcct	accactcaca	ggaggatgat	1020

	ttctctcttc ttgttacctg cctgcatttt cccatcccca ggcatagaag ataatatggt	1080
	atgccccgac tgtgctaaga ggaataagaa gatgatgaaa agattaatga cagtagagaa	1140
	gtagcagcaa cctgtttgaa tacaatgtac taaaggaggg atgtactttc agatcatgta	1200
	acctattacg aaggagtgga agaggagaca atttgaatga atcctcatga tctacaaaac	1260
5	aaaatcatag tgactaggac tccacagtga agatggttga ctagtgacac agccccatct	1320
	aaagaatccc tttctgtatg tctgaaaacc cattaataaata aagtcactgc aattggcctt	1380
	gtaaaaaaaaa aaa	1393
	<210> 14	
	<211> 1079	
10	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> DPPA3 coding	
	tggagctccg gttttcagcc tctttccggg ctacctggta gcaatttgag gctctgtcat	60
	cagtttctgc tacgtttcaa agatcctgga gaagcctagt gttgtgtcaa gacgccgatg	120
15	gacccatcac agtttaatcc aacctacatc ccagggtctc cacaaatgct caccgaagaa	180
	aattcccggg acgattcagg ggcctctcaa atctcctccg agacgttgat aaagaacctt	240
	agtaacttga ctatcaacgc tagtagcgaa tctgtttccc ctctatcgga agctttactc	300
	cgtcgagagt ctgtaggagc agcagtcctc agggaaatcg aagatgagtg gctttacagc	360
	aggagaggag taagaacatt gctgtctgtg cagagagaaa agatggcaag attgagatac	420
20	atgttactcg gcggagttcg tacgcatgaa agaagaccaa caacaagga gcctaaggga	480
	gttaagaagg aatcaagacc attcaaatgt ccctgcagtt tctgcgtgtc taatggatgg	540
	gatccttctg agaatgctag aatagggaaat caagacacca agccacttca gccataaatc	600
	ttattcttgc accttttttt cttggtagta attttatata gcaggttgag aaagctactc	660
	tatgctagta tagactatac accaataatt ttgataatga gttctaggat gtatttttct	720
25	tgtatctttt tcttcctact atgatactag taattcataa gggatctgtg taatctgaat	780
	gtatttgaat aacttttagct ctactgtttg atttgacca aagaagccaa gatgatataa	840
	gtattcccat gtgtcttaga agcccaaagt cagtgagatg aaaccaaca tcaagaaatt	900
	gaagcaaagt tacttatgga taaagaaagc attaggtagt tgggctatag cataattaga	960
	ttttctggct ttcaaaaatt tggattgcaa tcacagcaa ctttgttatt tttacagttt	1020
30	tcagtacaaa agtgtttata tagaaacaat aaagttgaca tttgagtacc ttttaaaaa	1079

## (57) Формула изобретения

1. Способ выявления остаточных, недифференцированных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC) в культуре клеток, дифференцировавшихся из iPSC, включающий:

культивирование указанных клеток на субстрате, покрытом ламинином-521 и E-кадгерином, в среде, содержащей ингибитор Rho-ассоциированной протеинкиназы, содержащей суперспираль (ROCK);

количественное измерение в культивируемых клетках экспрессии маркера остаточных, недифференцированных iPSC; и

сравнение экспрессии маркера в культивируемых клетках с экспрессией маркера в контрольной культуре клеток, содержащей известную долю iPSC,

где более низкая экспрессия маркера в культуре клеток, чем экспрессия маркера в контрольной культуре клеток, указывает на отсутствие остаточных,

недифференцированных iPSC в культивируемых клетках или на присутствие остаточных, недифференцированных iPSC в культивируемых клетках в меньшей доле, чем известная доля iPSC в контрольной культуре клеток.

2. Способ по п. 1, где экспрессия маркера представляет собой экспрессию LIN28,

OCT4, SOX2, FOXD3, NANOG, PODXL, REX1, SSEA1, SSEA4, DPPA2 или DPPA3.

3.Способ по п. 1 или 2, где ингибитор ROCK представляет собой Y27632.

4.Способ по п. 3, где клетки культивируют в примерно 10 мкМ Y27632.

5.Способ по любому из пп. 1-4, включающий культивирование клеток в среде, содержащей ингибитор ROCK, в течение примерно 3 суток.

6.Способ по п. 5, дополнительно включающий культивирование клеток в среде, не содержащей ингибитор ROCK, в течение примерно 2 суток после культивирования в среде, содержащей ингибитор ROCK.

7.Способ по любому из пп. 1-6, где экспрессию маркера количественно измеряют полимеразной цепной реакцией (ПЦР).

8.Способ по п. 7, где ПЦР представляет собой количественную ПЦР в реальном времени (кПЦР-РВ).

9.Способ по п. 8, где кПЦР-РВ включает зонд, состоящий из 5'→3' последовательности CGCATGGGGTTCGGCTTCCTGTCC (SEQ ID NO: 15), праймер, состоящий из 5'→3' последовательности CACGGTGCGGGCATCTG (SEQ ID NO: 16), и праймер, состоящий из 5'→3' последовательности CCTTCCATGTGCAGCTTACTC (SEQ ID NO: 17).

10.Способ по любому из пп. 1-9, где экспрессия маркера нормализована.

11.Способ по п. 10, где экспрессия маркера нормализована по отношению к экспрессии GAPDH.

12.Способ по любому из пп. 1-11, где известная доля составляет 0,001%.

13.Способ по любому из пп. 1-12, где клетки представляют собой мезенхимные стволовые клетки (MSC).

14.Способ по п. 13, где MSC культивируют в полной среде E8.

15.Способ по любому из пп. 1-14, дополнительно включающий приготовление в виде терапевтической композиции культуры клеток, в которой остаточные, недифференцированные iPSC отсутствуют или присутствуют в меньшей доле, чем известная доля.

16.Способ по любому из пп. 1-15, дополнительно включающий введение субъекту культуры клеток, в которой остаточные, недифференцированные iPSC отсутствуют или присутствуют в меньшей доле, чем известная доля, или терапевтической композиции.

17.Способ изготовления терапевтической композиции для терапевтического введения субъекту, содержащей культуру клеток, дифференцировавшихся из iPSC, в которой остаточные, недифференцированные iPSC отсутствуют или присутствуют в меньшей доле, чем известная доля, включающий

культивирование указанных клеток на субстрате, покрытом ламинином-521 и E-кадгерином, в среде, содержащей ингибитор ROCK;

количественное измерение в культивируемых клетках экспрессии маркера остаточных, недифференцированных iPSC;

сравнение экспрессии маркера в культивируемых клетках с экспрессией маркера в контрольной культуре клеток, содержащей известную долю iPSC, где более низкая экспрессия маркера в культуре клеток, чем экспрессия маркера в контрольной культуре клеток, указывает на отсутствие остаточных, недифференцированных iPSC в культивируемых клетках или на присутствие остаточных, недифференцированных iPSC в культивируемых клетках в меньшей доле, чем известная доля iPSC в контрольной культуре клеток, и

приготовление культуры клеток, в которой остаточные, недифференцированные iPSC отсутствуют или присутствуют в меньшей доле, чем известная доля, в виде



терапевтической композиции.

18. Способ лечения или предупреждения состояния, при котором полезны иммуномодулирующие эффекты, у субъекта, где состояние выбрано из кист кости, новообразований кости, переломов, дефектов хряща, остеоартрита, повреждения связки, незавершенного остеогенеза, остеонекроза, остеопороза, апластической анемии, реакции «трансплантат против хозяина» (GvHD), миелодиспластического синдрома, диабета типа 1, диабета типа 2, аутоиммунного гепатита, цирроза печени, печеночной недостаточности, дилатационной кардиомиопатии, сердечной недостаточности, инфаркта миокарда, ишемии миокарда, болезни Крона, язвенного колита, ожогов, буллезного эпидермолиза, красной волчанки, ревматоидного артрита, болезни Шегрена, системного склероза, бронхолегочной дисплазии, хронического обструктивного заболевания дыхательных путей, эмфиземы, легочного фиброза, бокового амиотрофического склероза (ALS), болезни Альцгеймера, травмы головного мозга, атаксии, остеохондроза, множественной системной атрофии, рассеянного склероза, болезни Паркинсона, пигментной дистрофии сетчатки, болезни Ромберга, травмы спинного мозга, инсульта, мышечной дистрофии, ишемии конечности, повреждения почки, волчаночного нефрита, эндометриоза и осложнений трансплантации костного мозга или солидных органов, включающий

культивирование клеток, дифференцировавшихся из iPSC, на субстрате, покрытом ламинином-521 и E-кадгерином, в среде, содержащей ингибитор ROCK;

количественное измерение в культивируемых клетках экспрессии маркера остаточных, недифференцированных iPSC;

сравнение экспрессии маркера в культивируемых клетках с экспрессией маркера в контрольной культуре клеток, содержащей известную долю iPSC, где более низкая экспрессия маркера в культуре клеток, чем экспрессия маркера в контрольной культуре клеток, указывает на отсутствие остаточных, недифференцированных iPSC в культивируемых клетках или на присутствие остаточных, недифференцированных iPSC в культивируемых клетках в меньшей доле, чем известная доля iPSC в контрольной культуре клеток, и

введение указанному субъекту:

культуры клеток, дифференцировавшихся из iPSC, в которой остаточные, недифференцированные iPSC отсутствуют или присутствуют в меньшей доле, чем известная доля, или

культуры клеток, дифференцировавшихся из iPSC, в которой остаточные, недифференцированные iPSC отсутствуют или присутствуют в меньшей доле, чем известная доля, приготовленной в виде терапевтической композиции.

19. Набор для выявления остаточных, недифференцированных iPSC в культуре клеток, дифференцировавшихся из iPSC, содержащий:

ламинин-521; и

E-кадгерин; и

ингибитор ROCK.

20. Набор по п. 19, дополнительно содержащий праймеры ПЦР и, возможно, зонд ПЦР для количественного измерения в культивируемых клетках экспрессии маркера остаточных, недифференцированных iPSC.

21. Набор по п. 19 или 20, дополнительно содержащий среду, возможно содержащую ингибитор ROCK.

22. Набор по любому из пп. 19-21, дополнительно содержащий субстрат, возможно покрытый ламинином-521 и E-кадгерином.

MAKRLCAGSALCVRGPRGPAPLLLVGLLALLGAARAREEAGGGFSLHPPYFNLAEGARIAASATCGEAPARGSPR  
PTEDLYCKLVGGPVAGGDPNQTIRGQYCDICTAANSNKAHPASNAIDGTERWWQSPPLSRGLEINEVNVTLDLGQ  
VFHVAYVLKIFANSRPRDLWVLESMDFGRTYQPWFQFASSKRDCLERFQPQTLERITRDDAAICTEYSRIVPL  
ENGEIVVSLVNGRPGAMNFSYSPLLREFTKATNVRLRFLRNTLLGHLMGKALRDPVTRRYYSIKDISIGGRC  
VCHGHADACDAKPTDFRLQCTCQHNTCGGTCDRCPCGFNQPPWKATANSANEQCSNCYGHATDCYDPEVD  
RRRASQSLDGTYYGGGVCIDCQHHTTGVNCRCLPGFYRSNPHPLDSPHVCRRCNCESDFTDGTCEDLTGRCYCR  
PNFSGERCDVCAEGFTGFPSYPTSSSNDTREQVLPAGQIVNDCSAAGTQGNACRKDRVGRCLCKPNFQGT  
CELCAPGFYGPQCPCQSSPGVADDRCDPDTGQCRCRVGFEGATCDRCAPGYFHFFLCQLCGCSFAGTLEPGCD  
EAGRCLCQPEFAGPHCDRCRPGYHGFNCQACTCDPRGALDQLCGAGGLCRCRPGYGTACQECSPGFHGFPSCV  
PCHCSAEGSLHAACDPRSGQCSRPRVTGLRCDTCEVPGAYNFYCEAGSCHPAGLAPVDPALPEAVPCMCRAHV  
EGPSCDRCKPGFVGLSPSNPEGCTRCSCDLRGTGGVAECQPGTQCFCCKPHVCGQACASCKDGFGLDQADYFG  
CRSCRCDIGGALGQSCPEPRTGVCRCRPNTQGPTESEPARDHYLPDLHHLRLELEEAATPEGHAVRFGFNPLEFEN  
FSWRGYAQMAPVQPRIVARLNLTSPLDFWLVRFRYVNRGAMSVSGRVSVREGRSATCANCTAQSQVAFPPSTEP  
AFITVPRGRGFEFVNLNPGTAWALRVEAEGVLLDYVLLPSAYEAAALLQLRVTEACTYRPSAQSSGDNCLLYTHL  
LLDGFPSAAGLEALCRQDNSLRPCPTQLSPSHPLITCTGSDVDVQLQVAVPQPGRYALVVEISPSSSLFQRNAAA  
VAVHTPQRAPQQGLLSLHPCLYSTLCRGTARDTQDHLAVFHLDEASVRLTAEQARFFLHGVTLVPIEEFSPFV  
EPVRSICISSHGAFGPNAAACLSRFPKPPQPIILRDCQVIPLPPGLPLTHAQDLTAMSPAGPRPRPPTAVDPDA  
EPTLLREPOATVVFTHVPTLGRYAFLLHGYQFAHPTFPVEVLINAGRVWQGHANASFCPHGYGCRTLVCEGQA  
LLDVTHSELTVTRVPKGRWLWLDYVLLVVPENVYSFGYLREEPLDKSYDFISHCAAQGYHLSPSSSLFQRNAAA  
SLSLFYNNGARPCGCHEVGATGPTCEPFGGQCPCHAHVIGRDCSRCATGYWGFPCNCRPCDCGARLCEDELTCQIC  
PPRTIPDCLLQCPQTFGCHPLVGCCECNCSPGPIQELTDPCTDTSQGCKCRPNVTGRRCDTCSPGFHGYPRCR  
PCDCHEAGTAPGCDPLTGQCYCKENVQGPCKDQCSLGTFSLDAANPKGCTRCFCFGATERCRSSSYTRQEFVDM  
EGVWLLSADRQVVPHERQPGTEMLRADLRHVPEAVPEAFPELYWQAPPVSYLGDRVSSYGGTLRLYELHSETQRGDV  
FVPMESRPDVVLQGNQMSITFLEPAYPTPGHVHRGQLQVLEGNFRHTETRNTVSREELMMVLASLEQLQIRALFS  
QISSAVFRRRVALEVASPAGQALANVELCLCPASVYRSDSCQECAPGFYRDVKGFLFGRVPCQCHGHSRDRCLP  
GSGVVCVDCQHNTGGAHCERCQAGFVSSRDDPSAPCVS CPCPLSVPSNNAEAGCVLRGGRTQCLCKPGYAGASCR  
CAPGFFGNPLVLGSSCPCDCSNGNDPNLLFSDCDPLTGACRGCLRHTTGPRCEICAPGFYGNALLPNCNTRCDC  
TPCGTEACDPHSGHCLCKAGVTGRRCDRCQEGHFGFDGCGGCRPCACGPAAGSECHPQSGQCHCRPGTMTGPQCR  
ECAPGYWGLPEQGCRRQCPCGGRCDPHTGRCNCPGLSGERCDCQSQHQPVPVPGGFVGHSHICEVCDHCVVLLL  
DDLERAGALLPAIHEQLRGINASSMAWARLHRLNLSIADLQSQLRSLGPRHETAQQLEVLQSTSLGQDARRL  
GGQAVQTRDQASQLLAGTEATLGHAKTLLAAITRAVDRTLSELMSTGHLGLANASAPSGEQLLRLTAEVERLLWE  
MRARDLGAQAAAEALAAQRLARVQEQQLSSLWEEENQALATQTRDRLAQHEAGLMDLREALNRAVDATREAQE  
LNSRNQERLEEAALQRKQELSRDNATLQATLHAARDTLASVFRLLHSLDQAKEELERLAASLDGARTPLLQRMQTF  
SPAGSKRLVEAAEAHAQQLGQLALNLSIIIDVNDQRLTQRAIEASNAYSRI LQAVQAEDAAGQALQADHTW  
ATVVRQGLVDRAQQLLANSTALEEAMLQEQQRLGVLVWAAALQGARTQLRDVRAKQDQLEAHIQAAQAMLAMDTDET  
SKKIAHAKAVAAEAQDTATRVQSQQLQAMQENVERWQGYEGLRGQDLGQAVLDAGHSVSTLEKTLPQLLAKLSIL  
ENRGVHNASLALSASIGRVRELIQAARGAASKVKVPMKFNRSRSGVQLRTPRDLADLAAYTALKFYLQGPPEPEPGQ  
GTEDRFVVMYMGSRQATGDMGVSLRDKKVHWVYQLGEAGPAVLSIDEDIGEQFAAVSLDRTLQFGHMSVTVRQ  
IQETKGDTPVAPGAEGLLNLRPDDFVYVGGYPTFTFPPLLRFPYRGCIEMDTLNEEVVSLYNFERTFQLDTAV  
DRPCARSKSTGDPWLTGDSYLDGTGFARISFDSQISTTKRFEQELRLVSYSGVLFLLKQSQFLCLAVQEGSLVL  
LYDFGAGLKKAVLPQPPPPLTSASKAIQVFLGGSRRKRVLRVERATVYSVEQDNDLELADAYYLGVPDPDQLPP  
SLRRLFPPTGGSVRGCVKGIKALGKYVDLKRNLNTTGVSACTADLLVGRAMTFHGHGFLRLALSNAVPLTGNVYS  
FGFHSQDSALLYRASPDGLCQVSLQQGRVSLQLLRTEVKTQAGFADGAPHYVAFYSNATGVWLYVDDQLQOMK  
PHRGPPPELQPEPEPPRLLGLPESGTIYNFSGCISNVFVQRLLGPRVFDLQQLGSVNVSTGAPALQAQT  
PGLGPRGLQATARKASRRSRQPARHPACMLPPLHRTTRDSYQFGGSLSSHLEFVGI LARHRNWPSSMHVLPSS  
RGLLFTARLRPGSPSLALFLSNGHFVAQMEGLGTRLRAQSRQSRPGRWHKVSVRWEKNRILLVTDGARAWSQE  
GPHRQHQAHEHPQHTLVFGGLPASSHSSKLPVTVGFSGCVKRLRLHGRPLGAPTRMAGVTPCILGPLEAGLFFP  
GSGGVITLDPGATLPDVGLEVRPLAVTGLIFHLGQARTPPYLQVTEKQVLLRADDGAGEFSTSVTRPSVL  
CDGQWHR LAVMKS GNVLRLLEVDAQSNHTVGPLLAAAAGAPAPLYLGLLPEPMAVQPPWPAYCGCMRRLAVNRSPV  
AMTRSVEVHGAVGASGCPAA

Фиг. 1

MELTSRERGRGQPLPWE LRLGLLLSVLAATLAQAPAPDVPGCSRGSCYPATGDLVGRADRLTASSTCGLNGPQP  
 YCIVSHLQDEKKCFLCDSSRRPFSARDNPHSHRIQNVVTSFAPQRRAAWQSENGI PAVTIQLDLEAEFHFTHLIM  
 TFKTRPAAMLVERSADFGRTWHVYRYFSYDCGADFPVPLAPPRHWDVVCESTRYSEIEPSTEGEVIVYRVLDP  
 IPIPDYSSRIQNLKLTNLRVNLTRLHTLGDNLDDPREIREKYYALYELVVRGNCFCYGHASECAPAPGAPA  
 HAEGMVHGACICKHNTRGLNCEQCQDFYRDLRWRPAEDGHSACRCKCECHGHTHSCHEFDMAVYLASGNVSGGVCD  
 GCQHTAGRHCLECRPFYRDPKDLRDPVAVCRSCDCDPMGSDGGRCDSDHDDPALGLVSGQCRCKEHLVGTTRCQ  
 QCRDGFGLSISDRGLGCRRCCQCNARGTVPGSTPCDPNSGSCYCKRLVTGRGCDRCLPGHWGLSHDLLGCRPCDCD  
 VGGALDPQCDEGTGQCHCRQHVMVGRRCBQVQPGYFRPFLDHLIWEAEDTRGQVLDVVERLVTPEGTPSWTGSGFV  
 RLQEGQTLFELVASVPKAMDYDLLRLLEPQVPEQWAELELIVQRPVPAHSLCGHLVPKDDRIQGTLPQHARYL  
 IFPNVCLPFI SYKHLHLKLVRTGGSAQPEPYPYSGPGLLIDSLVLLPRVLVLEMFSGGDAALERQATFERYQCH  
 EELVPSKTSPEACAPLLISLSTLIYNGALPCQCNPQGSLSSECNPHGGQCLCKPGVVGRRCDLQAPGYGFGP  
 TGCQACQCSHEGALSSICEKTSQCCLRTGAFGLRCDRCQRGQWGFPSRCPCVCNGHADECNHTHTGACLGRDHT  
 GGEHCERCIAFGHGDPRLPYGGQCRPCPEGPGSQRHFATSCHQDEYSQQIVCHCRAGYTGRLCEACAPGHFGD  
 PSRPGGRQCLCECSGNIDPMDPDACDPHTGQCLRLHHTEGPHCAHCKPGFHGQAARQSCCHRCTLNLLGNTPQC  
 PSDQCHCDPSSGQCPCLPNVQGPSCDRCAPNFNLTSGHGCQPCACHPSRARGPTCNEFTGQCHCRAGFGGRT  
 SECQELHWGDPGLQCHACDCDSRGIDTPQCHRFTGHCSRPGVSGVRCDQCARGESGIFPACHPHACFGDWDV  
 VQDLAARTQRLEQRAQELQQTGVLGAFESSFWMQEKLGIVQGVGARNTSAASTAQLVEATEELRREIGEATEH  
 LTQLEADLTDVQDENFNANHALSGLERDRLALNLTLRQLDQHLDDLKHSNFLGAYDSIRHAHSQSAEAERANT  
 ALAVPSPVNSASARHRTEALMDAQKEDFNKSHMANQRALGKLSAHTHTLSLTDINELVCGAPGDAPCATSPCGG  
 AGCRDEDQPRCGGLSCNGAAATADLALGRARHTQAE LQRALAEAGGSI LSRVAETRRQASAEQQRAQAALDKANA  
 SRGQVEQANQELQELIQSVKDFLNQEGADPDSIEMVATRVLELSIPASAEQIQHLGAGIAERVRS LADVDAI LAR  
 TVGDVRRAEQLLQDARRARSWAEDKQKQAE TVQAALAEAQAQGI AQGAI RGA VADTRDTEQTL YQVQERMAGAE  
 RALSSAGERARQLDALLEALKKRAGNSLAASTAEETAGSAQGRAQEAELLRGPLGDQYQTVKALAERKAQGV  
 AAQARAEQLRDEARDLLQAAQDKLQRLQEQLEGTYEENERALESKAAQLDGLLEARMRSVLQAINLQVQIYNCTCQKS  
 SWPGRAPNKPV

**Фиг. 2**

MRGSHRAAPALRPRGRLWVPLAVLAAAAAGCAQAAMDECTDEGGRPQRCMPEFVNAAFNVTVVATNTCGTPPEE  
 YCVQTVGTVTKSCHLCDAGQPHLQHGAAFLTDYNNQADTTWWQSQTMLAGVQY PSSHINLTLHLGKAFDITVYRL  
 KFHTSRPESFAIYKRTREDGPIWIPYQYSGSCENTYSKANRGFI RTGGDEQQALCDE FSDISPLTGGNVAFTL  
 EGRPSAYNFDNSPVLQEWVTATDIRVTLNRLNTFGDEVFNDPKVLKSYYYAISDFAVGGRCKCNGHASECMKNEF  
 DKLVCNCKHNTYGVDCCKLPFFNDRPWRRAATAESASECLPCDCNGRSQECYFDPELYRSTGHGGHCTNQCNDTD  
 GAHCERCRENFFRLGNNEACSSCHCS PVGSLSTQCDSYGRCSCKPGVMGDKCDRCQPGFHSLTEAGCRPCSCDPS  
 GSIDEENIETGRVCVCKDNVEGFNCERCKPGFFNLESSNPRGCTPCFCFGHSSVCTNAVGYSVYSISSTFQIDEDG  
 WRAEQRDGEASELEWSSERQDI AVISDSYFPRIYFIAPAKFLGKQVLSYQGNLSFSFRVDRDRTRLSAEDLVLEGA  
 GLRVSVPLLAQGNISYSEETTVKYVFRLEATDY PWRPALTPFEFQKLLNNTLSIKIRGTYSEERSAGYLDVTLAS  
 ARPGPGVPATWVESCTCPVYGGQFCMEMCLSGYRRET PNLGPYSPCVLACNGHSETCDPETGVCNCRDNTAGPH  
 CEKCSQDYGDSYTAGTSSDCQPCPCPGGSSCAVVPKTKEVVCTNCPGTGTRKRCLEDDGYFGDPLGRNGPVRCL  
 RLCCQSDNIDPNAVGNCRNLTGECLKCIYNTAGFYCDRCKDGGFNGPLAPNPADKCKACNCNLYGTMKQQSSCNP  
 VTGQCECLPHVTGQDCGACDPGFYNLQSGQGCERCDCALGSTNGQCDIRTGQCECQPGITGQHCECEVNHFGF  
 GPEGCKPCDCHPEGSLSLQCKDDGRCECREGFVGNRCDCQCEENYFYNRSWPGCQCEPACYRLVKDKVADHRVKLQ  
 ELES LIANLGTGDEMVTDQAFEDRLKEAEREVMDLLREAOVVKDQVQNLMDRLQRVNNTLSQISRLQNI RNTIE  
 ETGNLAEQARAHVENTERLIEIASRELEKAKVAAANVSVTQPESTGDPNNMTLLAEARKLAERHKQEAADDIVRV  
 AKTANDTSTEAYNLLRRLTAGENQTA FEIEELNRKYEQAKNISQDLEKQAAARVHEEAKRAGDKAVEIYASVAQLS  
 PLDSETLENEANNIKMAENLEQLIDQKLDYEDLREDMRGKELEVKNLLEKKGTEQQTADQLLARADAALAE  
 EAAKGRDITLQEAANDILNLLKDFDRRVNDNKTAEEALRKIPAINQITITEANEKTRAQALGSAADATEAKNK  
 AHEAERIASAVQKNATSTKAEAEERTFAEVTDLDNEVNMLKQLQEAKELEKRRKQDDADQDMMMAGMASQAAQEA  
 INARKAKNSVTSLLSINDLLEQLGQLDVTDLNKLNEIEGTLNKAKDEMKVSDLDKRVSDLENEAKKQEAAIMDY  
 NRDIEEIMKDIRNLEDIRKTLPSGCFNTPSIEKP

**Фиг. 3**

MDWVIPPISCPENEGKPFKPNLVQIKSNKDKGKVFYSITGQGADTPPVGVFIERETGWLKVTEPLDRERIATY  
 TLFSSHAVSSNGNAVEDPMEILITVTDQNDNKPEFTQEVFKGSVMEGALPGTSVMEVTATDADDDVNTYNAAIAYT  
 ILSQDPELPDKNMFITINRNTGIVSVVTTGLDRESFPTYTLVVQAADLQGEGLSTTATAVITVTDNTDNPPIFNPT  
 TYKQVPEANENVITTLKVTDADAPNTPAWEAVYI LNDDGGQFVVTNPNVNDGILKTAKGLDFEAKQYI LK  
 VAVTNVVPFEVSLTSTATVTVDVLDVNEAPIFVPEKRVESDFGVGQEITSYTAQEPDTFMEQKITYRIWRD  
 TANWLEINPDTGAI STRAELDREDFEHVKNSTY TALI IATDNGSPVATGTGTL LLLI LSDVNDNAPIPEPRTIFFC  
 ERNEPKQVINI IDADLPNTSPFTAELTHGASANWTIQYNDPTQESI I LKPKMALEVGDYKINLLKMDNQNKDQV  
 TTLEVSVCDEGAAGVCRKAQVPEAGLQIP

**Фиг. 4**

CACCGCTATTGTGCGGGGAAGATGTAGCAGCTTCTCTCCGAACCAACCCTTTGCCTTCGGACTTCTCC  
 GGGGCCAGCAGCCGCCGACAGGGGCCCGGGGCCACGGGCTCAGCCGACGACCATGGGCTCCGTGTCCA  
 ACCAGCAGTTTGCAGGTGGCTGCGCCAAGGCCGCGAAGAGGGCGCCCGAGGAGGCCCGGAGACCGCGG  
 CCGGGCGGGGACGAGCCTCAGCTGCTGCACGGTGCGGGCATCTGTAAGTGGTTCAACGTGCGCATGGG  
 TTCGGCTTCTGTCCATGACCGCCCGCGGGGTCGCGCTCGACCCCAAGTGGATGTCTTTGTGCACC  
 AGAGTAAGCTGCACATGGAAGGTTCCGGAGCTTGAAGGAGGTTGAGGCAGTGGAGTTCACCTTTAAGAA  
 GTCAGCCAAGGGTCTGGAATCCATCCGTGTCACCGGACCTGGTGGAGTATTCTGTATTGGGAGTGAGAGG  
 CGGCCAAAAGGAAGAGCATGCAGAAGCGCAGATCAAAGGAGACAGGTGTACAACCTGTGGAGGTCTAG  
 ATCATCATGCCAAGGAATGCAAGCTGCCACCCAGCCCAAGAGTGCCACTTCTGCCAGAGCATCAGCCA  
 TATGGTAGCCTCATGCATGCTGTAAGGCCAGCAGGGCCCTAGTGCACAGGGAAGGCCAACCTACTTTCGA  
 GAGGAAGAAGAAATCCACAGCCCTACCCTGCTCCCGAGGACACAGAAATGAGCCACAATGGTGGGG  
 GCTATTCTTTTGTATCAGGAAGTTTGGAGGAGCAGGCAGAGTGGAGAAATGGGAATAGGGTGCATTGG  
 GGCTAGTTGGCACTGCCATGTATCTCAGGCTTGGGTTTACACCATCACCTTTCTTCCCTCTAGGTGGGG  
 GGAAGGGTGGTCAAGGAACCTCAACCATGCTCTGTCAAATGCAAGTGAAGGTTCTGGGGCAACCA  
 GGAGGGGGGAATCACCTACAACCTGCATACTTTGAGTCTCCATCCCAGAAATTTCCAGCTTTTGAAGT  
 GGCTGGATAGGAAGTTGTTTTCTTTTAAAGAAGGATATATAAATAATCCCATGCCAGAGTGAATGA  
 TTAAGTATAAGACCAGATTCATGGAGCAAGCCACTACATTTCTGTGAAGGAGATCTCTCAGGAGTAAGC  
 ATGTTTTTTTTTGCACATCTTGTATCTTATACCCACTTTTGGGATAGGGTGTGCAGCTGTCTTCAAC  
 AATGGGTAATGATGATGGCAAAAAGGGTGTGGGGGAACAGCTGCAGACCTGCTGCTCTATGCTCACCC  
 CCGCCCATCTGGGCAATGTGATTTTATTTTATTTGCTCCCTGGATACGCACCTGGGTCCCCTTT  
 CTCAGGATGCCAACTGCACTAGCTGTGTGCGAATGACGTATCTTGTGCATTTTAACTTTTTTCTTAA  
 TATAAATATCTGGTTTTGTATTTTTGTATATTTAATCTAAGGCCCTCATTTCTGCAGCTGTCTTCAAC  
 GGTACATGAGCAATCTCAGGGATAGCCAGCAGCAGCTCCAGGTCTGCGCAGCAGGAATTAATTTTTGTG  
 TTTTTGCCACCGTGGAGAGCAACTATTTGGAGTGCACAGCCTATTGAACTACCTCATTTTTGCCAATAAG  
 AGCTGGCTTTTCTGCCATAGTGTCTTGAACCCCTCTGCCTTGAAGTGTATTTATGGGAGACTAGG  
 TTTTAACTGGGTGGCCCATGACTTGATGCTTCTACTGGAAGATGGGAATTAGTCTAAACAGGAAAT  
 GGTGGTACACAGAGGCTAGGAGAGGCTGGGCCCGGTGAAAAGGCCAGAGCAAGCCAAGATTAGGTGAG  
 GGTGTCTAATCCTATGGCACAGGACCTGCTTACATCTCCAGATCTGTTCTTACCAGATTAGGTTAGG  
 CCTACCATGTGCCACAGGGTGTGTGTGTTTTGTAATACTAGATTTGCTAAGGATAAGTTTAAAGACCAA  
 TACCCCTGACTTAATCCTGTGCTGTCGAGGGATGGATATATGAAGTAAGGTGAGATCCTTAACTTTCA  
 AAATTTTGGGTTCCAGGGAGACACACAAGCGAGGGTTTTGTGGTGCCTGGAGCCTGTGTCTGCCCTGC  
 TACAGTAGTGAATAAGTGTGATGGTAGCTAAAGGAGAAAAGGGGGTTTCTGTTTACACGCTGTGAGAT  
 CACCGAAACCTACTTACTGTGTTGAAACGGGACAAATGCAATAGAACGCATTGGGTGGTGTGTCTG  
 ATCCTGGTCTTGTCTCCCTTAAATGCTGCCCCCAAGTACTGTATTTGTCTGGCTTTGGGACTT  
 CACTACGTTGATTGCTAGGTGGCCTAGTTTGTGTAATAATAATGTATTGGTCTTCTCCGTGTTCTTTGG  
 GGTTTTTTTTACAAACTTCTTTTGTATTGAGAGAAAAATAGCCAAAGCATCTTTGACAGAAAGTTCTG  
 CACAGGCAAAAAGATCTGAAACATTAGTTTGGGGGCCCTCTTCTTAAAGTGGGATCTTGAACCATCC  
 TTTCTTTTGTATTCCCTTCCCTATTACCTATTAGACCAGATCTTCTGTCTAAAAAATTTGCTTCTAC  
 CCTGCCCTCTTTTCTGTTCACCCCAAAAGAAAATACACACCCACACATACACATTTTATGCTTGG  
 AGTGTCTCCACAATCTTAAATGATGTATGCAAAAATACTGAAGCTAGGAAAACCTCCATCCCTTGTTC  
 CCAACCTCCTAAGTCAAGACCATACCATTTCTTTCTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATGGAGTCTCA  
 CTGTGTCAACAGGCTGGAGTGCAGTGGCATGATCGGCTCACTGCAGCCTCTGCCTCTTGGGTTCAAGTG  
 ATTCTCCTGCCTCAGCCTCCTGAGTAGCTGGGATTTAGGCACCCGCCACTCAGCTAATTTTTGTATT  
 TTTAGTAGAGACGGGGTTTACCATGTTGTCCAGGCTGGTCTGGAACCTCCTGACCTCAGGTGATCTGCC  
 ACCTTGGCTTCCCAAAGTGTGGGATTACAGGCATGAGCCACCATGCTGGCCAACCATTTCTTGGTGT  
 TTCATGCCAAACACTTAAAGACTGCTGTAGCCAGGCGGGTGGCTCACACCTGTAATCCAGCACTTT  
 GGAAGGCTGAGGCGGGGGATCACAAGTCAAGGTCACAGTTCAAACATATCCTGGCCAACACAGTGAAGCCCG  
 TCTCTACTAAAAACAAAAAATAGCCGGGTGTGGTGGTGCATGCCTTTAGTCTTAGCTATTAGGAGG  
 CTGAGGCAAGGGAATCGCTTGAACCCGAGAGGCGAGGTTGCAGTGCAGTGCAGTGCAGTGCAGTGCAGT  
 CAGCCTGGTTACAGAGCAAGACTCTGTCTCAAACAAAACAAAACAAAACAAAACAAAACACTACTGTATTT  
 GGATGGATCAAACCTCCTAATTTTAAATTTCTAATCCTAAAGTAAAGAGATGCAATTTGGGGCCTTCCAT  
 GTAGAAGTGGGTGAGGAGGCAAGAAAGGAATATGAATGTATATCAAAGTCACTCAGGAACCTTTAT  
 GCAGGTGTAGAACTTTATGTCAAAGTGGCCACAAGATTGTTTAAATAGGAGACGAACGAATGTAACCTC  
 ATGTTTACTGCTAAAAACCAAAGCTTTGTGTAATACTTGAATTTATGGGGCGGGAGGTTAGGAAAGCCT  
 GTACCTGTCTGTTTTTTCTGATCCTTTTCCCTCATCTCTGAACTGCAGGAGACTGAGCCCTTTGGGC  
 TTTGGTGACCCCATCACTGGGGTGTGTTTATTTGATGGTTGATTTTGTCTACTGGGTACTTCTTTCC  
 ATTTTCTAATCATTTTTTAAACAAGCTGACTTCCCTTCCCTTCTCTTCCCTGGGAAAATACAAT  
 AATAAATAAGACTTATTGGTACGCAACTGTCA

Фиг. 5

AGAGAGGGGTTGAGTAGTCCCTTCGCAAGCCCTCATTTACCAGGCCCCCGGCTTGGGGCCCTTCCTTC  
 CCCATGGCGGGACACCTGGCTTCGGATTTCCGCTTCTCGCCCCCTCCAGGTGGTGGAGGTGATGGGCCAG  
 GGGGGCCGAGCCGGCTGGGTTGATCCTCGGACCTGGCTAAGCTTCCAAGGCCCTCCTGGAGGGCCAGG  
 AATCGGGCCGGGGTTGGGCCAGGCTCTGAGGTGTGGGGGATTCCCCATGCCCCCGCCGTATGAGTTC  
 TGTGGGGGGATGGCGTACTGTGGGCCCCAGGTTGGAGTGGGGCTAGTGCCCCAAGGCGGCTTGGAGACCT  
 CTCAGCCTGAGGGCAGCAGGAGTGGGGTGGAGAGCAACTCCGATGGGGCTCCCCGGAGCCCTGCAC  
 CGTCACCCTGGTGCCTGAAGCTGGAGAAGGAGAAGCTGGAGCAAAACCCGGAGGAGTCCCAGGACATC  
 AAAGCTCTGCAGAAAGAACTCGAGCAATTTGCCAAGCTCCTGAAGCAGAAAGAGGATCACCTGGGATATA  
 CACAGGCCGATGTGGGGCTCACCTGGGGTTCTATTTGGGAAGGTATTACGCCAAACGACCATCTGCCG  
 CTTTGGAGGCTCTGAGGCTTAGCTTCAAGAACATGTGAAGCTGCGGCCCTTGTGCAGAAAGTGGTGGAG  
 GAACTGACAAACAAATGAAAATCTTCAAGAGATATGCAAAGCAGAAACCCCTCGTGCAGGCCCGAAAGAGAA  
 AGCGAACAGTATCGAGAACCGAGTGGAGGCAACCTGGAGAATTTGTCTGCAGTGCCCGAAACCCAC  
 ACTGCAGCAGATCAGCCACATCGCCAGCAGCTTGGGCTCGAGAAGGATGTGGTCCGAGTGTGGTCTGT  
 AACCGGCCGACGAGGGCAAGCGATCAAGCAGCGACTATGCACAACGAGAGGATTTGAGGCTGCTGGG  
 CTCCTTTCTCAGGGGACCAGTGTCTTTCTCTGGCCCCAGGGCCCCATTTGGTACCCAGGCTATGG  
 GAGCCCTCACTTCACTGCACTGACTCCTCGTCCCTTTCCCTGAGGGGGAAGCCCTTCCCCCTGTCTCC  
 GTCACCCTCTGGGCTCTCCCATGCATTTCAAAGTGGAGTGCCTGCCCTTCTAGGAATGGGGGACAGGGG  
 AGGGGAGGACTAGGGAAAGAAAACCTGGAGTTTGTGCCAGGGTTTGGGATTAAGTTCTTCATTCAGT  
 AAGGAAGGAATTTGGGAACACAAAGGGTGGGGCAGGGGAGTTTGGGGCAACTGGTTGGAGGGAAGGTGAA  
 GTTCAATGATGCTTGTATTTAATCCACATCATGTATCACTTTTCTTAAATAAAGAACCTGGGAC  
 ACAGTAGATAGACACACTTAAAAA

**Фиг. 6**

GGATGGTGTCTATTAACTTGTTCAAAAAGTATCAGGAGTTGTCAAGGCAGAGAAGAGAGTGTTCGAA  
 AAGGGGAAAGTAGTTTGTGCTCCTTTAAGACTAGGACTGAGAGAAAGAGAGGAGAGAAAGAAAGG  
 GAGAGAAGTTTGGAGCCAGGCTTAAGCCTTTCCAAAAATAATAAACAATCATCGGCGGGCGGAGGA  
 TCGGCCAGAGGAGGAGGGAAGCGCTTTTGGATCCTGATTCAGTTTGCCTCTCTTTTTCCTTTTCC  
 AATTAATCTTCGCTGATTTTCTCGCGGAGCCCTGCGCTCCCGACACCCCGCCGCTCCCTCCTCC  
 TCTCCCCCGCCCGGGCCCCCAAGTCCCGGCCGGCCGAGGGTCCGGCGCCGCCGGCGGGCCGGG  
 CCGCGCACAGCGCCGCATGTACAACATGATGGAGACGGAGCTGAAGCCGCGGGCCCGCAGCAAACTC  
 GGGGGCCGGCGGGCAACTCCACCGCGGGCGGGCCGGCAACCCAGAAAAACAGCCGGAGCGGCTC  
 AAGCGCCCATGAATGCCTTCAATGGTGTGGTCCCGGGCAGCGGGCAAGATGGCCAGGAGAACCCCA  
 AGATGCACAACCTCGAGATCAGCAAGCGCCTGGGCGCCGAGTGGAACTTTTGTGCGGAGACGGAGAAGCG  
 GCGCTTCAACGAGGCTAAGCGGCTGCGAGCGCTGCACATGAAGGAGCACCCGGATTATAAATACCGG  
 CCGCGGGGAAAACCAAGACGCTCATGAAGAAGGATAAGTACACGCTGCCCGGGGGCTGCTGGCCCCG  
 GCGCAATAGCATGGCAGCGGGGTGGGGTGGGCGCCGGCTGGGCGGGGCGTGAACCAGCGCATGGA  
 CAGTTACCGGCACATGAACGGCTGGAGCAACGGCAGCTACAGCATGATGCAGGACAGCTGGGCTACCCG  
 CAGCACCCGGCCCTCAATGCGCACGGCGCAGCGCAGATGCAGCCCATGCACCGCTACGACGTGAGCGCC  
 TGCACTCAACTCCATGACCACTCGCAGACTACATGAACGGCTCGCCACCTACAGCATGTCTCACTC  
 GCAGCAGGACCCCTGGCATGGCTCTTGGTCCATGGGTTGGTGGTCAAGTCCGAGGCGAGCTCCAGC  
 CCCCCTGTGGTTACCTCTTCTCCCACTCCAGGGCGCCCTGCCAGGCCGGGACCTCCGGGACATGATCA  
 GCAATGATCTCCCGGGCGCCGAGGTGCGGGAACCCCGCGCCCGCCAGCAGACTTACATGTCCAGCACTA  
 CCAAGCGGCCCGGTGCCGGCACGGCCATTAAACGGCACACTGCCCTCTCACACATGTGAGGGCCGGAC  
 AGCGAAGTGGAGGGGGAGAAATTTCAAAGAAAACGAGGGAAATGGGAGGGGTGCAAAAAGAGGAGAGT  
 AAGAAAACAGCATGGAGAAAACCCGGTACGCTCAAAAAGAAAAGGAAAAAATCCCATCACCCACA  
 GCAATGACAGCTGCAAAAGAGAACCAATCCCATCCACACTCAGCAAAAACCGGATGCCGACAAGA  
 AAATTTTATGAGAGAGATCCTGGACTTCTTTTGGGGACTATTTTGTACAGAGAAAACCTGGGGAGG  
 GTGGGAGGGCGGGGAATGGACCTTGTATAGATCTGGAGGAAAGAAAGTACGAAAAACTTTTAAAAG  
 TTCTAGTGGTACGGTAGGAGCTTTCAGGAAGTTTGCAAAAGTCTTTACCAATAATATTAGAGCTAGTC  
 TCCAAGCGACGAAAAAATGTTTAAATATTTGCAAGCAACTTTGTACAGTATTTATCGAGATAAACATG  
 GCAATCAAAATGTCCATGTTTATAAGCTGAGAATTTGCCAATATTTTCAAGGAGAGGCTTCTTGTGTA  
 ATTTTATGATCTGCAGCTGAAATTTAGGACAGTTGCAACCTGAAAAGAAAGAAATATTCAAATTTGGAC  
 ATTTTAAATGTTTAAAAATTTGTAACAAAAGAAAAATTAGAATAAGTACTGGCGAACCATCTCTGTGGT  
 TTGTTTAAAAAGGGCAAAAGTTTGTAGCTGTACTAAATTTTATAACTTACTGTAAAAAGCAAAATGGCC  
 ATGAGGTTGACACCGTTGGTAATTTATAATAGCTTTTGTTCGATCCCAACTTCCATTTTGTTCAGATA  
 AAAAAAGCATGAAATTAAGTGTGTTGAAATATTTCTTATGGTTTGAATATTTCTGTAATTTATTTGT  
 GATATTTTAAAGTTTCCCCCTTATTTTCCGTAGTTGTATTTTAAAAGATTCCGGCTCTGTATTTTGT  
 AATCAGTCTGCCGAGAAATCCATGTATATATTTGAACTAATATCATCCTTATAACAGGTACATTTTCAACT  
 TAAGTTTTTACTCCATATGCACAGTTTGGAGATAAATAAATTTTGAATATGGACACTGAAAAA

**Фиг. 7**

ATGACCTCTCCGGCGGGCAGCGCCAGCGACATGTCCGGCCAGACGGTGTGACGGCCGAGGACGTGG  
 ACATCGATGTGGTGGGCGAGGGCGACGACGGGCTGGAAGAGAAGGACAGCGACGCGAGTTGCGATAGCCC  
 CGCGGGGGCCCGGAGCTGCGCTGGACGAGCGGGACGAGGTGCCCGGGCGGCACCCATCACGGACAG  
 CCTCAGCCGCCCCACCAGCAGCCCTGACATTGCCAAGGAGGGCGGGCGGAGCCGGGGCCGACCGGGGG  
 GCGACGTGGGCGCGCCGAGGCGGACGGCTGCAAGGGCGGTGTTGGCGGCAGGAGGGCGGGCGCGAGCGG  
 CGCGGGCCCTGGCGGGGACGGCTTGGCGGGAGGCTGGCCCGAGCAAGCCCAAGAACAGCCTAGTG  
 AAGCCGCTTACTCGTACATCGCGCTCATCCATGGCCATCCTGCAGAGCCCGCAGAAAGCTGACCC  
 TGAGCGGCATCTGCGAGTTCATCAGCAACCGCTTCCCTACTACAGGGAGAAGTCCCGCCTGGCAGAA  
 CAGCATCCGCCACAACCTCTCACTCAACGACTGCTTCGTCAAGATCCCCCGCAGCCGGGCAACCCGGGC  
 AAGGGCAACTACTGGACCCCTGGACCCGAGTCCGAGGACATGTTGACACAAGGCAGCTTCTGCGGCGCC  
 GGAACCGTTCAGCGCCACCAGCAGGAGCACCTGCGCGAGCAGAGGGCGCTCATGATGCAGAGCTTCGG  
 CGCTTACAGCCTGGCGGGCGGGCGCGCCGCGGGACCTACGGCCGCCCCCTACGGCCTGCACCTGCG  
 GCGGGCGGGTGCCTATTCGCACCCGGCAGCGGGCGGGCGGGCGGGCTGCTGCGGGCGGCTCCAGTACC  
 CGTACGCGCTGCGCGCGGTGGCACCCGCTGCTGCCCTCCCGCTGTGCCGTGCTGCCCTCGGGCGAGCTGG  
 CCGCAAAGCGGGCGCTTCGGCTCACAGCTCGGCCCGGGCTGCAGCTGCAGCTCAATAGCCTGGGCGCC  
 GCGCGGGCGCTGCGGGCACAGCGGGCGCGGGGACCCACCGCTCGCTCATCAAGTCCGAGCCAAAGCG  
 CGCGGCCGCTGCTCAGCATCGAGAACATCATAGGTGGGGCCCCCGGGCTCCTGGGGCTCGGCGGTGGG  
 CGTGGGCTCGCGGGCGGCACTGGGGTTCAGGGGGCGGCGAGCACGGCGCAGTCTTCTGCGGCCACCC  
 GGGACCGTGCAGTCCGGCAGCGCTCATGGCCACCCACCAACCGCTGTGCTGAGCCGGACGACTGCCACCA  
 TCCGCGCCATCTTAGCGTGCACCTCCCGGACAGTTCCTGCAGCCCGCAGCCTCGGCCGCGCGCGCTGC  
 TGGCGCGCGCTCAAGCCAAATGGCCGGCGCAATAGGGACCGCCAAATGGCCGGGACCCAGGGTCCGGC  
 GCGGGCTCGAGCAACAAATGCACCTCCAGGTGCGCGCCCTGTCCCAAGCCCGTCCCGTCCCGCTGC  
 CCAATCCTGGACTCTGCCTCTCCCAATTTCTTTCCCTGAGCCCCAACGCCTACCTTCCGCGGCTC  
 CATCCCTCGCGCACCTAAGCTGGTGCAGCAACTCACCGCGCCCGCGGGGATAGCTTTCCATAC  
 AGGTAACCCGAAACCGAATTTCCAAAAATGCACCCGACGGCGCTGCTTATGATCCGTTGGGATG  
 GGAGGAAATCTTTGTATATATTTGTAATAAAATATTGACTTTCTTTGGGGTTTTTATTTTTTAA  
 GAAAAACAAATCCGTAGATTTAGAGCTCTGAATTTTATTTTTTTGAAGTTCACTCTCCGAAGTTT  
 TATCTGAGAAAAGATGTATAGAGACGTTGGGAGATTTAATATAAAAAATTTTCAAAAAGGCAAAAAG  
 TGTATCTATATAAAAAGTCTGTTTATATATGAATGAATATATGATTTCTAAATGTTATTCATCG  
 TGTGTACASAACTTTGTAATAAAATTTTAAATGCCAAAAAAA

**Фиг. 8**

TTСATATAAATСТАGAGACTCCAGGATTTТАACGTTCTGCTGGACTGAGCTGGTTGCCTCATGTTATTA  
 TGCAGGCAACTCACTTTATCCCAATTTCTTGATACTTTCTCTCTGGAGGCTCCTATTTCTСТАACATCTT  
 CСAGAAAAGTCTТАAAGCTGCCTТАACCTTTTTCAGTCCACCTCTТАAATTTTTCTCTCTCTCTCT  
 ТАТАСТАACATGAGTGTGGATCCAGCTTGTCCCAAAGCTTGCCTTGTCTTGAAGCATCCGACTGТАAAG  
 ААТСТТАССТТАGCTGTGATTTGTGGCCTGAAGAAAATATCCATCCTTGCAATGTCTTCTGCTGA  
 GATGCCTCACACGGAGACTGTCTCTCTCTCTCTCTCTCCTCCTGGATCTGCTTATTСAGСACGCCCTGAT  
 TCTTCCACCAGTCCCAAAGGCAACCAACCCACTTCTGCAGAGAAGAGTGTСGCAAAAAAGGAAGCAAGG  
 TCCCGGTCAAGAAACAGAAAGACCAGAACTGTGTTCTTCCACCCAGCTGTGTGACTCAATGATAGATT  
 TСAGAGACAGAAATACCTCAGCCTCCAGCAGATGCAAGAACTCTCCAACATCCTGAACCTCAGCTACAAA  
 CAGGTGAAGACCTGGTTCCAGAACСAGAGAATGAAATCTAAGAGGTGGCAGAAAAACAACCTGGCCGAAGA  
 АТАGСАATGGTGTGACGСAGAAAGCCCTCAGCACCTACCTACCCAGCCTTТАCTCTCTACCACСAGGG  
 ATGCTTGGTGAACCCGACTGGGAACCTTCCAATGTGGAGCAACСAGACCTGGAAСAATTAACCTGGAGC  
 AACСAGACCCAGAACTCCAGTCTGGAGCAACCACTCTGGAACTCAGACCTGGTGACCCCAATCT  
 GGAACAATCAGGCTGGAACTGCTTCTATAACTGTGGAGAGGAATCTCTGCAGTCTGCATGCAGTT  
 CСAGCСAAATTTCTCTGCCAGTGACTTGGAGGCTGCCTTGGAGCTGCTGGGAAGGCCTTAATGТАATA

**Фиг. 9**



ACTAAAATCTGCTGTAGCTAGTGAGAGCAGCGTGTTCCTTTTGTGTGTTCACTGCTCAGCTGATGGGAGTG  
 ATTCCTGAGACCCAGTATGAAAGAGCAGTGGCTGCAGGAGAGGCCCTCCCGGGCCCCCATCAGCGAT  
 GTGTCTTTCAGAGACAATCCATTAAAGCAGCCAGGAAGGACAGGCTTCCCTGTATATCATAGGAAATC  
 AGGGACATTTCAAGTTGCTGAGAGTTTTGTTATAGTTGTTTTCTAACCCAGCCCTCCACTGCCAAAGGCC  
 AAAAGCTCAGACAGTTGGCAGACGTCAGTTAGCTCATCTCACTCACTCTGATTCCTGTGCCACAGGA  
 AAAGAGGGCCTGGAAGCGCAGTGCATGCTGGGTGCATGAAGGGCAGCCTGGGGGACAGACTGTTGTGGG  
 AACGTCCCCTGTCTGGCCTGGAGCTAGGCCTTGCTGTTCCCTTCTCTGTGAGCCTAGTGGGGCTGCT  
 GCGGTTCTTTCAGTTTCTGGTGGCATCTCAGGGGAACACAAAGCTATGTCTATTCCTCAATATAGGAC  
 TTTTATGGGCTCGGCAGTTAGCTGCCATGTAGAAGGCTCCTAAGCAGTGGGCATGGTGAGGTTTCATCTG  
 ATTGAGAAGGGGAATGCTGTGTGGAATGTTGAACTTTCGCCATGGTCCATCGTCTGGGCGTAAATG  
 CCCTGGGATCAAGTAGGAAAATGGGCAGAACTGCTTAGGGGAATGAAATGCCATTTTTCGGGTAAAACG  
 CCACACCTCCAGGGCTTAAAGAGTCAGGCTCCGGCTGTAGTAGCTCTGATGAAATAGGCTATCCACTCGG  
 GATGGCTTACTTTTTAAAGGGTAGGGGGAGGGGCTGGGGAAGATCTGTCTGCACCATCTGCCTAATTC  
 CTTCTCACAGTCTGTAGCCATCTGATATCCTAGGGGAAAAGGAAGGCCAGGGGTTACATAGGGGCCCA  
 GCGAGTTTCCAGGAGTTAGAGGGATGCGAGGCTAACAAAGTTCCAAAAACATCTGCCCCGATGCTCTAGT  
 GTTTGGAGGTGGCAGGATGGAGAACAGTGCCTGTTTGGGGGAAAACAGGAAATCTTGTAGGCTTGAGT  
 GAGGTGTTTGCTTCTTCTGCCCAGCGCTGGGTCTCTCCACCCAGTAGGTTTTCTGTGTGGTCCCCTG  
 GGGAGAGCCAGACTGGATTATTCCTCCTTTGCTGATCCTGGGTCACACTTCACCAGCCAGGGCTTTTGA  
 CGGAGACAGCAATAGGCCTCTGCAATCAATCAAAGGCTGCAACCCATGGCCTCTGGAGACAGATGA  
 TGACTGGCAAGGACTAGAGAGCAGGAGTGCCTGGCCAGGTCGGTCTGACTCTCCTGACTCTCCATCGCT  
 CTGTCCAAGGAGAACCCGGAGAGGCTCTGGGCTGATTCAGAGGTTACTGCTTATATTCGTCCAAACTGT  
 GTTAGTCTAGGCTTAGGACAGCTTCAAGTCTGACACCTTGCCCTTGGCTTTGCCACCAGGACACCTATGT  
 CAACAGGCCAAACAGCCATGCATCTATAAAGGTCATCATCTTCTGCCACCTTACTGGGTTCTAAATGCT  
 CTCTGATAATTCAGAGAGCATGGGCTCTGGGAAGAGGTAAGAGGAACACTAGAAGCTCAGCATGACTTAA  
 ACAGGTTGTAGCAAAGACAGTTTATCATCAGCTCTTTCAGTGGTAAACTGTGGTTTTCCCAAGCTGCACA  
 GGAGGCCAGAAAACCAAGTATGATGACTAGGAAGCCTACTGTGATGAGAGTGGGAGACAGGCAGCAAAA  
 GCTTATGAAGGAGGTACAGAATATTCCTTTCGCTTGTAAAGACAGAATACGGGTTTAACTAGTCTAGGCAC  
 CAGATTTTTTCCCGCTTGATAAGGAAAGCTAGCAGAAAGTTATTTAAACCACTCTTGGAGCTTATCT  
 TTTTTGACAATATACTGGAGAACTTTGAAGAACAAGTTCAAACCTGATACATATACACATATTTTTTTGA  
 TAATGTAATAACAGTGACCATGTAAACCTACCTGCCTGCTTTAAGTGAACATACTTTGAAAAAGCATT  
 ATGTTAGCTGAGTGATGGCCAAGTTTTTCTCTGGACAGGAATGTAATGTCTTACTGGAATGACAAGT  
 TTTTGCTTGATTTTTTTTTTAAACAAAAATGAAATATAACAAGCAAACTTATGATAAAGTATTTGTC  
 TTGTAGATCAGGTGTTTTGTTTTGTTTTTAAATTTAAATGCAACCCCTGCCCTCCCCAGCAAAGTC  
 ACAGCTCCATTTTCAGTAAAGGTTGGAGTCAATATGCTCTGGTTGGCAGGCAACCCGTGATGTCATGGAGAA  
 AGGTATTTCAAGATCTAGTCCATCTTTTTCTAGAGAAAAGATAATCTGAAGCTCACAAAGATGAAGTG  
 ACTTCTCAAATCACATGGTTCAGGACAGAAAACAAGATTTAAACCTGGATCCACAGACTGTGCGCCTCA  
 GAAGGAATAATCGGTAATTAAGAATTGCTACTCGAAGGTGCCAGAATGACACAAAGGACAGAATTCCTT  
 TCCCAGTTGTACCCCTAGCAAGGCTAGGGAGGGCATGAACACAAACATAAGAACTGGTCTTCTACACTTT  
 CTCTGAATCATTTAGGTTAAGATGTAAGTGAACAATCTTCTTTCTGCCAAGAAACAAAGTTTTGGAT  
 GAGCTTTTATATATGGAACCTTACTCCAACAGGACTGAGGGACCAAGGAAACATGATGGGGGAGGCAGAGA  
 GGGCAAGAGTAAAACCTGAGCATAGCTTTTGTACCGGTCACTAGCTGATCCCTCAGGCTGCTGCAACA  
 CAGCATGGAGGACACAGATGACTCTTTGGTGTGGTCTTTTTGTCTGCAGTGAATGTTCAACAGTTTGGC  
 CAGGAACTGGGGATCATATATGCTTAGTGGACAGGGCTGGAAGTACACTGGAATTTACTGAGAACT  
 TGTTTGTAAAACTATAGTTAATAATATTGCATTTCTTACAAAAATATATTTGGAAAAATGTATACT  
 GTCAATTAAGTGTTTTTGTGTAACCTGGTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

**Фиг. 10 (продолжение)**







AGTGGCAGAACCAGCCATGCTTCTGCAAAATCACAACCTCTTTGAGCCTCTGTCACCTGAACTGCAAAATG  
 AGTGGGTTAGACAAAATCATCTGTTGGGACCTCCTAGTTCACCGTGTATCATTTCTACTAACTGGCACCC  
 TAAGGTTGAAAGTGCTTATCTGCTTTCCAATGTGGCTTCTTACAGTCTGGAACTGACAATATGCAAGGAG  
 CAGTAACTGGCAGAAAACCAGGAATCAGAGAAAAGAAAATAAATTTAACTTTAAAGATGTAATTTATAT  
 ATATAGTATATATATATATATATTTTTAAAGCTTTATATGCCTCAAATATCAGGGAAAAGGAGCCAAAGTCTTG  
 GTATTTAGTTTGGTGAATACTTGCATTGCAATGCAATCATGTCAAGATGTCAAGTCAATTTTTGAATGTGTCTCAG  
 GGATTTCTATGCTACACATTTCTTTAACAATCAAGTATTTATGTACACATGTTTCAAGATTTTTTGACAAA  
 ATGATTAATAATGAGATGGAAAATGAAAAAAAAAAAAAAAA

**Фиг. 12 (продолжение)**

AGCCSTTTGTTTTATGGCCTGATCTAGCTAAGCTTCTAGACTTCAGGAGCTTAAGAATCGTCCGGAGGGC  
 TGGGCGTGGGCGTGCAGGCTGTAGTCCCACCCACTCCGAAGGCTGCGGAGGGAGGATCAACTTGAGTCT  
 GGGAACTCAGCCAGGAATCAAGACCCAGCCTGGGCACACAGTGAAGCCCTACCCACATCCTCTCCGT  
 CCCCAGCAATCTCCTCCATCCAGGGTGTGCTGAAAATGTCAAGTCAAAATTTGGATAGCAGCAAGAAG  
 AATTTCTTGGAGGGGGAAGTAGATGATGAGGAAAGTGTGATTTTGACACTGGTGCCAGTTAAAGATGACG  
 CAAATATGGAACAAATGGAACCAAGCCTTTCTTCAACTTCTGATGTCAAATGGAGAAGCCTAAGAAATA  
 CAAATCCAGGTCACTACTTCAAACAATGAGCAATTTACAGCTCCACAAAAGCTAGATGCAAAATACCA  
 GCCCTTCCCTTGGCAGCAATTTTGCCTCCATTAATAAGGTGTGTGGGACACTTTGCGGACTGGTGTG  
 AACAACTCGGTTTGAAGTACTAATGGCAAGAAAATCGAAGTTTATCTGAGGCTTCATAGGCATGCTTACCC  
 TGAACAACGGCAAGATATGCTTCAAATGTCAACAAGAGACCAGATTTACAGCGATGTTGAGGAAACGCAAG  
 GCAGTGACCAAGAGAGCAAGGCTTCAAGAGAATTTATGAGATGAATGAGAGAGCAGAAGAGACCAATACAG  
 TTGAAGTGATAACTTCAGCACCGGGAGCCATGTTGGCATCATGGGCAAGAATGCTGCAAGAGCTGTTCA  
 GCCTAAGCTTTGAATTCATGTTCCATTCCTGTTTCTGTTGAGGCTTTTTGATGCAAGCCTCTGGCGTC  
 AGTGGTGTGTGGTCCATGGCAGACTTCTCTGGCAGACAAAAGGTTGGGTACGCCCTGCAGTTTCATG  
 CAGGTCAAGCCTGGGTGCCTACCCTCACAGGAGGATGATTTCTCTCTTCTGTTACCTGCCTGCATTTT  
 CCCATCCCAGGCATAGAAGATAAATATGTTATGCCCCGACTGTGCTAAGAGGAATAAGAAGATGATGAAA  
 AGATTAATGACAGTAGAGAAGTAGCAGCAACCTGTTTGAATACAATGTAATAAGGAGGGATGACTTTT  
 AGATCATGTAACCTATTACGAAGGAGTGAAGAGGAGACAATTTGAATGAATCCTCATGATCTACAAAAC  
 AAAATCATAGTGAAGACTCCACAGTGAAGATGGTTGACTAGTGACACAGCCCCATCTAAAGAAATCCC  
 TTTCTGTATGCTGAAAACCCATTAATAAAGTCACTGCAATTTGGCCTTTGAAAAAAAAAAAA

**Фиг. 13**

TGGAGCTCCGGTTTTTCAGCCTCTTCCGGGCTACCTGGTAGCAATTTGAGGCTCTGTATCAGTTTCTGC  
 TACGTTTTCAAAGATCCTGGAGAAGCCTAGTGTGTGTCAAGACGCCGATGGACCCATCACAGTTTTAATCC  
 AACCTACATCCCAGGGTCTCCACAAATGCTCACCAGAAAATTTCCGGGACGATTCAGGGGCTCTCAA  
 ATCTCCTCCGAGACGTTGATAAAGAACCCTTAGTAACTTACTATCAACGCTAGTAGCGAATCTGTTTTCC  
 CTCTATCGGAAGCTTTACTCCGTCGAGAGTCTGTAGGAGCAGCAGTCTCAGGGAAATCGAAGATGAGTG  
 GCTTTACAGCAGGAGAGGAGTAAGAACATTTGCTGTCTGTGCAAGAGAAAAGATGGCAAGATGAGATAC  
 ATGTTACTCGGCGGAGTTCGTACGCATGAAAGAAGACCACAAAACAGGAGCCTAAGGGAGTTAAGAAGG  
 AATCAAGACCATTCAAATGCTCCTGCAGTTTCTGCGTGTCTAATGGATGGGATCCTTCTGAGAATGCTAG  
 AATAGGGAAATCAAGACACCAAGCCACTTCAGCCATAAATCTTATCTTGCACCTTTTTTTCTTGGTAGTA  
 ATTTTTATATAGCAGGTTGAGAAAAGCTACTCTATGCTAGTATAGACTATACCAATAATTTTTGATAATGA  
 GTTCTAGGATGATTTTTCTTGTATCTTTTTCTTCCACTATGATACTAGTAATTCATAAGGGATCTGTG  
 TAATCTGAATGATTTGAATAACTTTAGCTTACTGTTGATTTGACCCAAAAGAAGCCAAAGATGATATAA  
 GTATTTCCATGTGTCTTAGAAGCCCAAAGTCAAGTGAAGTGAACCCAAACATCAAGAAATTAAGCAAAGT  
 TACTTATGGATAAAGAAGCAATTAGGTAGTTGGGCTATAGCATAATTAGATTTTTCTGGCTTTCAAAAAT  
 TGGATGCAATCACAGCAAATTTGTTATTTTTACAGTTTTTCAAGTACAAAAGTGTATATAGAAAACAA  
 AAGTTGACATTTGAGTACCTTTAAAAA

**Фиг. 14**