



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2012145332/10, 24.10.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
24.10.2012

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 24.10.2012

(45) Опубликовано: 10.04.2014 Бюл. № 10

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: FANNESTOCK S.R. et.al. Protease-deficient *Bacillus subtilis* host strains for production of Staphylococcal protein A., Appl Environ Microbiol. 1987 Feb;53(2):379-84. RU 2060276 C1, 20.05.1996. WO8601825 A1, 27.03.1986. . . . .

Адрес для переписки:

420008, г.Казань, ул. Кремлевская, 18, ФГАОУ ВПО КФУ, патентно-лицензионный отдел, И.А. Назмиеву

(72) Автор(ы):

Шарипова Маргарита Рашидовна (RU),  
Балабан Нелли Павловна (RU),  
Ризванов Альберт Анатольевич (RU),  
Марданова Айслу Миркасымовна (RU),  
Каримова Мадина Рафаэлевна (DE),  
Шагимарданова Елена Ильясовна (RU),  
Тойменцева Анна Александровна (RU),  
Чулунцэцэг Нямсурэн (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Казанский (Приволжский) федеральный университет" (ФГАОУ ВПО КФУ) (RU)

(54) ШТАММ БАКТЕРИЙ *BACILLUS PUMILUS* МК-10 С НИЗКОЙ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, а именно к микроорганизмам и ферментам, и представляет собой штамм бактерий *Bacillus pumilus* МК-10 ВКПМ В-10742. данный штамм получают от исходного штамма бактерий *Bacillus pumilus* 3-19 путем инактивирования гена

мажорной сериновой протеазы на хромосоме. Изобретение позволяет расширить ассортимент штаммов бактерий, используемых в качестве реципиента с низкой протеолитической активностью при производстве гетерологичных белков. 2 з.п.ф-лы, 3 ил., 1 табл., 1 пр.

RU 2 510 821 C1

RU 2 510 821 C1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2012145332/10, 24.10.2012

(24) Effective date for property rights:  
24.10.2012

Priority:

(22) Date of filing: 24.10.2012

(45) Date of publication: 10.04.2014 Bull. № 10

Mail address:

420008, g.Kazan', ul. Kremlevskaja, 18, FGAOU  
VPO KFU, patentno-litsenzionnyj otdel, I.A.  
Nazmievu

(72) Inventor(s):

Sharipova Margarita Rashidovna (RU),  
Balaban Nelli Pavlovna (RU),  
Rizvanov Al'bert Anatol'evich (RU),  
Mardanova Ajslu Mirkasymovna (RU),  
Karimova Madina Rafaehlevna (DE),  
Shagimardanova Elena Il'jasovna (RU),  
Tojmentseva Anna Aleksandrovna (RU),  
Chuluntsehtsehg Njamsurehn (RU)

(73) Proprietor(s):

Federal'noe gosudarstvennoe avtonomnoe  
obrazovatel'noe uchrezhdenie vysshego  
professional'nogo obrazovanija "Kazanskij  
(Privolzhsnij) federal'nyj universitet" (FGAOU  
VPO KFU) (RU)

(54) **STRAIN OF BACTERIA BACILLUS PUMILUS MK-10 WITH LOW PROTEOLYTIC ACTIVITY AND ITS APPLICATION**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention relates to field of biotechnology, namely to microorganisms and ferments, and represents strain of bacteria *Bacillus pumilus* MK-10 All-Russian collection of industrial microorganisms B-10742. Claimed strain is obtained from initial strain of bacteria *Bacillus pumilus* 3-19 by inactivation of

gene of major serine protease on chromosome.

EFFECT: invention makes it possible to extend assortment of bacteria stains, applied as recipient with low proteolytic activity in production of heterologous proteins.

3 cl, 3 dwg, 1 tbl, 1 ex

Заявленное техническое решение (предлагаемый штамм) относится к области биотехнологии, а именно к микроорганизмам и ферментам. Может быть использовано в микробиологической промышленности и генетической инженерии.

Наличие дефекта по генам доминирующих протеаз или дефицит таких генов у бактерий делает их (бактерии) универсальными продуцентами рекомбинантных белков, например, - применяемых для производства лекарственных препаратов со стабильными свойствами.

Известен штамм бактерий *Bacillus brevis* 31-ОК [1] с низкой протеолитической активностью, полученный путем спонтанной мутации после трансформации штамма *Bacillus brevis* HPD31 плазмидой pNU2OOhGH, несущей ген гормона роста человека. Недостатком [1] является зависимость продуктивности штамма по синтезу экзоферментов от состава питательной среды. Требуется специфическая питательная среда с обязательным добавлением, например, полипептона P1 - в концентрации до 2%, отсутствие которого существенно снижает выход продукции ферментов. Эта зависимость сужает перечень применяемых для культивирования штамма (*Bacillus brevis* 31-ОК) питательных сред, что в свою очередь существенно ограничивает область применения этого штамма в качестве производителя рекомбинантных белков, например, в производстве лекарственных препаратов.

Известен полученный путем многократного УФ (ультрафиолетового) облучения дефектный по протеазам штамм бактерий *Bacillus amyloliquefaciens* A50-32 [2], обладающий 0,3% протеазной активностью. Недостатком штамма бактерий *Bacillus amyloliquefaciens* A50-32 [2] является наличие неконтролируемых и непредсказуемых мутаций, например регуляторной мутации. Эти мутации оказывают плеiotропный (множественный) эффект на синтез экзоферментов. Из-за этого недостатка (неконтролируемых и непредсказуемых мутаций) продукты жизнедеятельности штамма (экзоферменты), например те, которые используют для производства лекарственных препаратов, нестабильны по свойствам и действию, что существенно ограничивает область применения аналога.

Наиболее близким по существу предлагаемому штамму (прототипом) является протеазо-дефицитный штамм бактерий *Bacillus subtilis* GX4924 [3] с направленной инактивацией гена субтилизина (сокращенное название гена - apr). Недостатком прототипа [3] является наличие «помехи» в геноме указанного штамма бактерий - гена другой мажорной нейтральной протеазы (сокращенное название гена - prg), доля которой составляет до 54% в общем протеолитическом пуле ферментов (продуктов жизнедеятельности прототипа). Наличие протеазы, выступающей помехой, вызывает дополнительную деградацию рекомбинантных полипептидов, количественно ограничивающих синтез полезных экзоферментов, снижает количество и качество получаемого продукта, например, применяемого в фармацевтике для производства лекарственных препаратов в форме ферментативных добавок, например, для лечения недостаточности экзокринной функции поджелудочной железы.

Заявленное техническое решение поясняется Фиг.1 - 3 и таблицей, на которых представлены:

На Фиг.1 представлена схема поэтапного создания тройной рекомбинирующей конструкции, состоящей из левой (L), правой (R) фланкирующей областей гена aprVp *Bacillus pumilus* 3-19 и гена резистентности к антибиотику эритромицину erm (E) с использованием плазмиды pGEM-T.

На Фиг.2. представлена схема интеграции тройной рекомбинирующей конструкции, инактивирующей ген aprVp в геном *Bacillus pumilus* 3-19. Обозначения: aprVp - ген

субтилизиноподобной протеазы, erm - ген резистентности к антибиотику эритромицину, волнистой линией обозначены хромосома *Bacillus pumilus* 3-19 и хромосома *Bacillus pumilus* МК-10, пунктирной линией обозначен путь интеграции. На Фиг.3. представлены колонии исходного штамма *Bacillus pumilus* 3-19 (контроль) и нокаутированного/

5 протеазо-негативного штамма *Bacillus pumilus* МК-10 (опыт) на 2% молочном агаре.

Целью предлагаемого изобретения является получение штамма-реципиента бактерий вида *Bacillus pumilus* с низкой протеолитической активностью для производства чистых гомологичных и рекомбинантных белков, повышение чистоты используемых в полезных целях продуктов жизнедеятельности бактерий.

10 Цели достигают тем, что в качестве реципиента с низкой протеолитической активностью применяют штамм бактерий *Bacillus pumilus* МК-10 ВКПМ В-10742, получаемый от исходного штамма бактерий *Bacillus pumilus* 3-19 путем инактивирования гена мажорной сериновой протеазы на хромосоме. Штамм бактерий *Bacillus pumilus* МК-10 ВКПМ В-10742 используют в качестве реципиента с низкой протеолитической

15 активностью. Штамм бактерий применяют для производства гомологичных белков *Bacillus pumilus*. Штамм бактерий применяют для производства гетерологичных белков рода *Bacillus*.  
Предлагаемый штамм *Bacillus pumilus* МК-10 получают, например, описанным далее путем. С применением известных компьютерных программ, например программного

20 обеспечения Oligo Calc [4], известным путем [5] конструируют олигонуклеотидные праймеры с использованием общедоступной базы данных NCBI (National Center for Biotechnology Information - Национальный центр биотехнологической информации) [6]. Последовательности гена субтилизиноподобной протеазы (aprVp) и гена резистентности к антибиотику эритромицину (erm) используют, например, из общедоступной базы

25 данных NCBI. Последовательности праймеров приведены в таблице.

Таблица	
Праймеры, используемые для получения штамма <i>Bacillus pumilus</i> МК-10	
Название праймера	Последовательность праймера
30 Sub left up	5' GAAGTCAAACAACGGGTGCC 3'
Sub left low	5' GAATACCAACATGACGAATCCCCACGTTGTAATCAAGGACC 3'
Sub right up	5' GGGCACTCTAATAACTACCAAAATTGGTGTCTTGGGGTCG 3'
Sub right low	5' AGAGAGGGATCCGAGAGGCAGGGGTGACGTCTTTTC 3'
Em up	5' GGGATTCGTCATGTTGGTATTC 3'
Em low	5' ATGGTAGTTATTAGAGTGCCC 3'
35 SP6	5' GATTTAGGTGACACTATAG 3'
T7	5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'

Дальнейшие действия показаны на Фиг.1. Методом полимеразно-цепной реакции (далее по тексту - ПЦР) проводят амплификацию левого (L) и правого (R) фланкирующих участков гена aprVp с геномной ДНК штамма бактерий *Bacillus pumilus* 3-19 при использовании олигонуклеотидных пар Sub left up/Sub left low и Sub right up/Sub right low соответственно. ПЦР для получения гена erm проводят с плазмиды pCS9 с использованием праймеров Em up/Em low. В результате нарабатывают амплификаты одинарных конструкций (с длиной, например, ~1 kb или одной килобазы).

45 Затем амплификаты одинарных конструкций используют как сырье и путем ПЦР получают двойные конструкции: левый фланкирующий регион aprVp+erm (LE) и правый фланкирующий регион aprVp+erm (ER). При этом в ПЦР используют олигонуклеотидные пары Sub left up/Em low (LE) и Em up/Sub right low (ER) соответственно. Продукты амплификации (двойные конструкции), электрофоретически соответствующие ожидаемой

длине (продуктов амплификации) в ~2 kb, выделяют из агарозного геля, например - с использованием набора реактивов фирмы Fermentas (Литва).

Полученные двойные конструкции (LE и ER) клонируют в плазмиду pGEM-T Easy (Promega, США) путем лигирования по липким T-концам плазмиды и A-концам амплификатов. Лигазной смесью трансформируют известный штамм бактерий *Escherichia coli* XL-1 Blue. Трансформацию проводят, например, по известной методике [7]. Суспензию трансформированных клеток высевают на чашки с агаризованной средой, содержащей 5-бromo-4-хлоро-3-индоил-бета-D-галактопиранозид, например, в концентрации 40 mg/ml, изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид, например, в концентрации 32 mg/ml и ампициллин, например, в концентрации 20 mg/ml. Используют, например, реактивы фирмы Fermentas (Литва). После инкубации трансформантов в течение 24 часов при плюс 37°C на чашках образуются белые (содержащие LE и ER клонированные конструкции) и синие (не содержащие конструкций) колонии бактериальных клеток.

Отбирают белые колонии бактерий, с которых проводят ПЦР-скрининг с фланкирующих праймеров (T7, SP6) на наличие вставки в плазмиде pGEM-T Easy длиной (продукта амплификации) в ~2 kb. Из положительных (содержащих продукт амплификации) колоний бактерий путем щелочного лизиса выделяют плазмиды pGEMTE-LE и pGEMTE-ER со вставками LE и ER соответственно.

Проводят реакцию амплификации и получают тройную рекомбинирующую конструкцию (LER). Для этого используют плазмиды pGEMTE-LE и pGEMTE-ER в качестве матрицы и праймеры Sub left up/Sub right low. Продукт реакции амплификации, соответствующий электрофоретически ожидаемой длине в ~3 kb, очищают из агарозного геля, например, с использованием набора фирмы Fermentas (Литва).

Заключительным этапом по получению предлагаемого протеазо-дефицитного штамма бактерий *Bacillus pumilus* является трансформация клеток бактерий *Bacillus pumilus* 3-19 полученной тройной рекомбинирующей конструкцией. Трансформацию проводят по методу [8], при этом используют синтетические минимальные среды Спецайзена I/II. Солевая основа среды Спецайзена (%):  $K_2HPO_4 \times 3H_2O$  - 18,34;  $KH_2PO_4$  (безводный) - 6,0;  $(NH_4)_2SO_4$  - 2,0; цитрат - Na - 1,2. Отдельно готовят растворы: глюкоза - 40%; казаминовые кислоты - 200 mg/ml;  $Mg_2SO_4$  - 0,2 g/ml. Среда Спецайзена I: на 100 ml  $H_2O$ : глюкоза - 2 ml; казаминовые кислоты - 2 ml; дрожжевой экстракт - 2 ml;  $Mg_2SO_4$  - 0,1 ml; солевая основа - 10 ml. Среда Спецайзена II: на 100 ml  $H_2O$ : глюкоза - 2 ml; казаминовые кислоты - 1 ml;  $Mg_2SO_4$  - 8 μl; солевая основа - 10 ml).

Суспензию содержащих тройную рекомбинирующую конструкцию компетентных клеток *Bacillus pumilus* 3-19 рассеивают на чашки с агаризованной средой с антибиотиком эритромицином, например, в концентрации 20 Hg/ml. После инкубации в течение от 24 до 48 часов при +37°C отбирают, например, три независимых клон, растущих на среде с эритромицином. Дополнительную проверку наличия (или отсутствия) гена протеазы выполняют с применением ПЦР. Выявленное в результате ПЦР наличие вставки гена *erm* (внутри гена протеазы *aprVp*) подтверждает разрушение функционального гена, т.е. достижение цели изобретения - получение имеющих генотип *aprVp::erm* модифицированного штамма бактерий, именуемых как *Bacillus pumilus* МК-10.

Описание предлагаемого штамма

Штамм бактерий *Bacillus pumilus* МК-10 депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ФГУП ГосНИИГенетика под регистрационным номером ВКПМ В-10742. Предлагаемый штамм является производным от штамма

*Bacillus pumilus* 3-19 и содержит гены минорных протеаз, например глутамилэндопептидазы, адамализиноподобной металлопротеазы.

Генетические особенности штамма

Предлагаемый штамм бактерий *Bacillus pumilus* МК-10 несет ген резистентности к антибиотик эритромицину, фланкированный участками гена субтилизиноподобной протеазы *Bacillus pumilus* 3-19. Ген *argVp* инактивирован посредством гомологичной рекомбинации (Фиг.2).

Культурально-морфологические особенности штамма

Предлагаемый штамм бактерий *Bacillus pumilus* МК10 - аэробные, грамположительные бактерии. Клетки палочковидные, прямые или изогнутые, располагаются скоплениями или обособленно. Размер выращенных на агаризованной среде клеток односуточной культуры составляет 14-15 мкм. Свободные споры появляются на сороковые часы роста (не более 5%), далее их количество нарастает и достигает максимального значения (до 80%) в поздней стационарной фазе роста. При росте на агаризованной среде Лурия-Бертани (далее по тексту - LB) колонии имеют более шероховатую поверхность и неровные края по сравнению с более гладкими и ровными колониями исходного штамма *Bacillus pumilus* 3-19.

Физиолого-биохимические свойства

Среда для выращивания, например LB: триптон - 10 г/л, дрожжевой экстракт - 5 г/л, NaCl - 10 г/л, pH 8.5 с антибиотиком эритромицином, например, в конечной концентрации 20 µg/ml. Для создания твердой питательной среды дополнительно вносят 2% агар. Оптимальная температура роста +37°C.

Протеолитическая активность предлагаемого штамма

Активность штамма определяют, например, следующим способом.

Определение протеолитической активности протеазо-дефицитного штамма *Bacillus pumilus* МК-10 проводят на среде, содержащей 2% молочного агара. Наличие протеолитической активности при этом определяют по появлению области просветления на молочном агаре (зоны расщепления белков молока). В результате селекции (отбора), например, трех колоний, которые не имеют зон просветления на молочной среде, получают предлагаемый штамм.

Выраженные зоны протеолиза на молочном агаре (2% агара и 1% молоко) наблюдают только у исходного штамма бактерий *Bacillus pumilus* 3-19. У предлагаемого штамма *Bacillus pumilus* МК-10 просветление менее выражено по сравнению с исходным штаммом *Bacillus pumilus* 3-19 (Фиг.3), что указывает на инактивацию гена секретируемой субтилизиноподобной протеазы. Наличие остаточных зон лизиса объясняется присутствием активности других секретируемых протеаз, например металлопротеазы. Таким образом, предлагаемый штамм бактерий *Bacillus pumilus* МК-10 обладает низкой протеолитической активностью.

Пример применения предлагаемого штамма бактерий *Bacillus pumilus* МК-10 приведен далее.

**ПРИМЕР.** Использование предлагаемого штамма для производства и синтеза рекомбинантных гомо- и гетерологичных белков р.*Bacillus*, применяемых для создания лекарственных препаратов.

Отличительным свойством исходного штамма *Bacillus pumilus* 3-19, из которого получен предлагаемый штамм, является наличие в хромосоме гена одной мажорной сериновой субтилизиноподобной протеазы. То есть у предлагаемого штамма, в отличие от прототипа, отсутствует вторая мажорная секретируемая протеаза, наличие которой приводило бы к деградации рекомбинантных белков и снижало эффективность (уровень

синтеза и качество целевого белка) получаемой продукции. Инактивация гена единственного мажорного фермента (субтилизиноподобной протеазы) позволяет получить штамм *Bacillus pumilus* МК-10 с низкой, по сравнению с прототипом, протеолитической активностью. В результате общая протеолитическая активность штамма снижена в 2,5 раза по сравнению с активностью исходного штамма. Таким образом, предлагаемый штамм *Bacillus pumilus* МК-10 обеспечивает его использование в качестве реципиента для экспрессии гомологичных генов из бактерий рода *Bacillus pumilus*. Данное свойство связано с отсутствием вариаций последовательностей Shine Dalgarno (Шайна Дальгарно) в промоторах генов, выделенных из штаммов *Bacillus pumilus*. Поэтому предлагаемый штамм является наиболее эффективным при производстве промышленно важных ферментов, например, субтилизиноподобной протеазы *Bacillus pumilus*, имеющей потенциал в создании тромболитических лекарственных препаратов [9]. То есть предлагаемый штамм позволяет избавиться от присущих прототипу возможных изменений эффективности трансляции белков и тем самым добиться стабильности свойств продуктов, получаемых как результат жизнедеятельности этих микроорганизмов и реализуемых в биотехнологиях производства препаратов, например, применяемых в медицине, ветеринарии, сельскохозяйственном производстве и производстве продуктов питания.

Предлагаемый штамм в качестве хозяина применяют, например, нижеописанным методом для экспрессии гомологичных генов *Bacillus pumilus*.

1. Клетки бактерий предлагаемого штамма *Bacillus pumilus* МК-10 трансформируют плазмидой, содержащей ген рекомбинантного белка (например, гена субтилизиноподобной протеазы argVp штамма *Bacillus pumilus* 3-19) под контролем индуцибельного или конститутивного промотора. Полученные трансформированные клетки подращивают на питательной среде, например LB, при температуре инкубации +37°C. Индукцию синтеза белка осуществляют в соответствии с выбранным промотором.

2. Пробы для анализа белков отбирают из КЖ путем отделения супернатанта от клеточной массы, например, через 1 ч и 16 ч после индукции.

3. Внеклеточные белки в пробе (культуральной жидкости или КЖ) характеризуют с помощью электрофореза в полиакриламидном геле по Лэммли [10].

4. Рекомбинантные белки далее очищают различными методами, например с помощью аффинной хроматографии, гель-фильтрации, ионно-обменной хроматографии, высаливания.

Таким образом, пример показывает, что предлагаемый штамм бактерий *Bacillus pumilus* МК-10 за счет снижения деградации белкового продукта позволяет получать рекомбинантные белки, например, для применения в медицине, ветеринарии, в сельском хозяйстве для растениеводства.

Кроме того, предлагаемый штамм применяют для экспрессии гетерологичных генов *p.Bacillus* по приведенному выше методу.

Пример применения предлагаемого штамма бактерий показывает его полезность в биотехнологии при промышленном производстве рекомбинантных белков. Использование предлагаемого штамма также способствует выявлению регуляторных свойств инактивированного фермента ArgVp, что вносит свой вклад в фундаментальную молекулярную биологию. Предлагаемый штамм имеет изобретательский уровень, поскольку в опубликованной литературе не выявлены протеазо-дефицитные штаммы вида *Bacillus pumilus*.

#### ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ ИСТОЧНИКИ

1. Kajino T., Kato K., Miyazaki C., Asami O., Hirai M., Yamada Y., Udaka S. Isolation of a

protease-deficient mutant of *Bacillus brevis* and efficient secretion of a fungal protein disulfide isomerase by the mutant / *J Biosci Bioeng.* 1999. 87(1): 37-42.

2. Plotnikova T.O., Selivanova G.N., Iomantas Iu.V., Kozlov IuI. Isolation and analysis of protease-deficient mutants of *Bacillus amyloliquefaciens* I *Genetika.* - 1992. 28(5):66-72.

5 3. Fahnestock S.R., Fisher K.E. Protease-deficient *Bacillus subtilis* host strains for production of Staphylococcal protein A / *Appl. Environ. Microbiol.* 1987. 53(2):379-84.

4. <http://www.basic.northwestern.edu/biotoools/oligocalc.html>

5. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование // - М.: «Мир», 1984.

10 6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

7. Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual / J.Sambrook, E.F.Fritsch, T.Maniatis. - 2<sup>nd</sup> ed. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

8. Harwood, C.R., S.M.Cutting. 1990. Molecular biological methods for *Bacillus*. John Wiley & Sons, Chichester, England.

15 9. Ицкович Е.Л., Лютова Л.И., Балабан Н.П., Марданова А.М., Шакиров Е.В., Шарипова М.Р., Лещинская И.Б., Руденская Г.Н. Тромболитические и антикоагулянтные свойства тиолзависимой сериновой протеиназы *Bacillus intermedms 3-19* / *Вопросы медицинской химии*, 1999, №5.

20 10. Laemmli, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 [Text] / U.K.Laemmli // *Nature.* - 1970. - V.227. - P.680-685.

#### Формула изобретения

1. Штамм бактерий *Bacillus pumilus* МК-10 ВКПМ В-10742 - реципиент с низкой протеолитической активностью.

25 2. Штамм бактерий по п.1 применяют для производства гомологичных белков *Bacillus pumilus*.

3. Штамм бактерий по п.1 применяют для производства гетерологичных белков рода *Bacillus*.

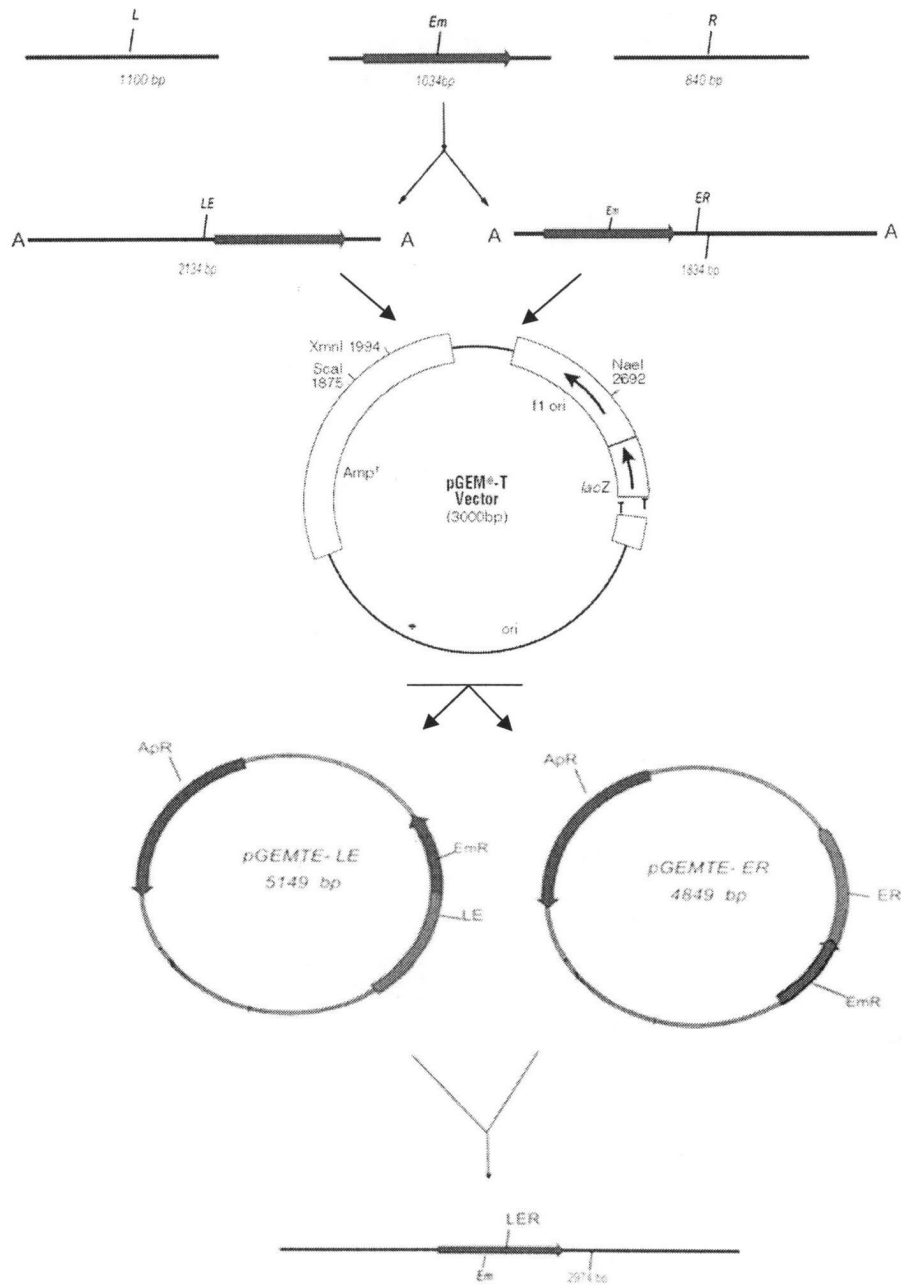
30

35

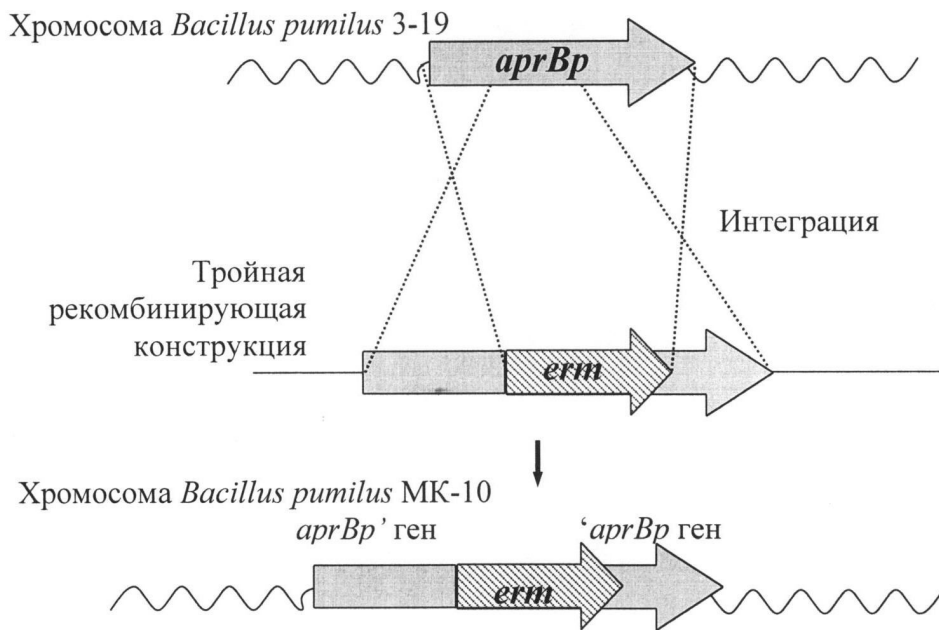
40

45

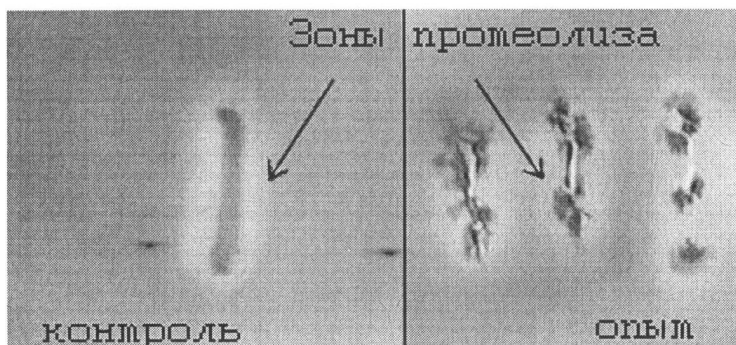




Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3