



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2009139151/10, 23.10.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
23.10.2009

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 23.10.2009

(43) Дата публикации заявки: 27.04.2011 Бюл. № 12

(45) Опубликовано: 20.09.2011 Бюл. № 26

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: КОВНИР С.В. и др. Оптимизация
экспрессии рекомбинантного фактора
свертываемости крови VIII в стабильной
линии животных клеток-продуцентов. -
Цитология, 2008, т.50, №9, с.808. ВОРОБЬЕВ
И.И. и др. Методы получения
рекомбинантного фактора свертываемости
крови VIII. Тезисы конференции GNZ-2008,
материалы найдены в Интернет 08.07.2010 по
адресу: (см. прод.)

Адрес для переписки:

117997, Москва, ГСП-7, В-437, ул. Миклухо-
Маклая, 16/10, ИБХ РАН, патентный отдел

(72) Автор(ы):

Орлова Надежда Александровна (RU),
Ковнир Сергей Владимирович (RU),
Воробьев Иван Иванович (RU),
Юрьев Андрей Серафимович (RU),
Мирошников Анатолий Иванович (RU),
Воробьев Андрей Иванович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

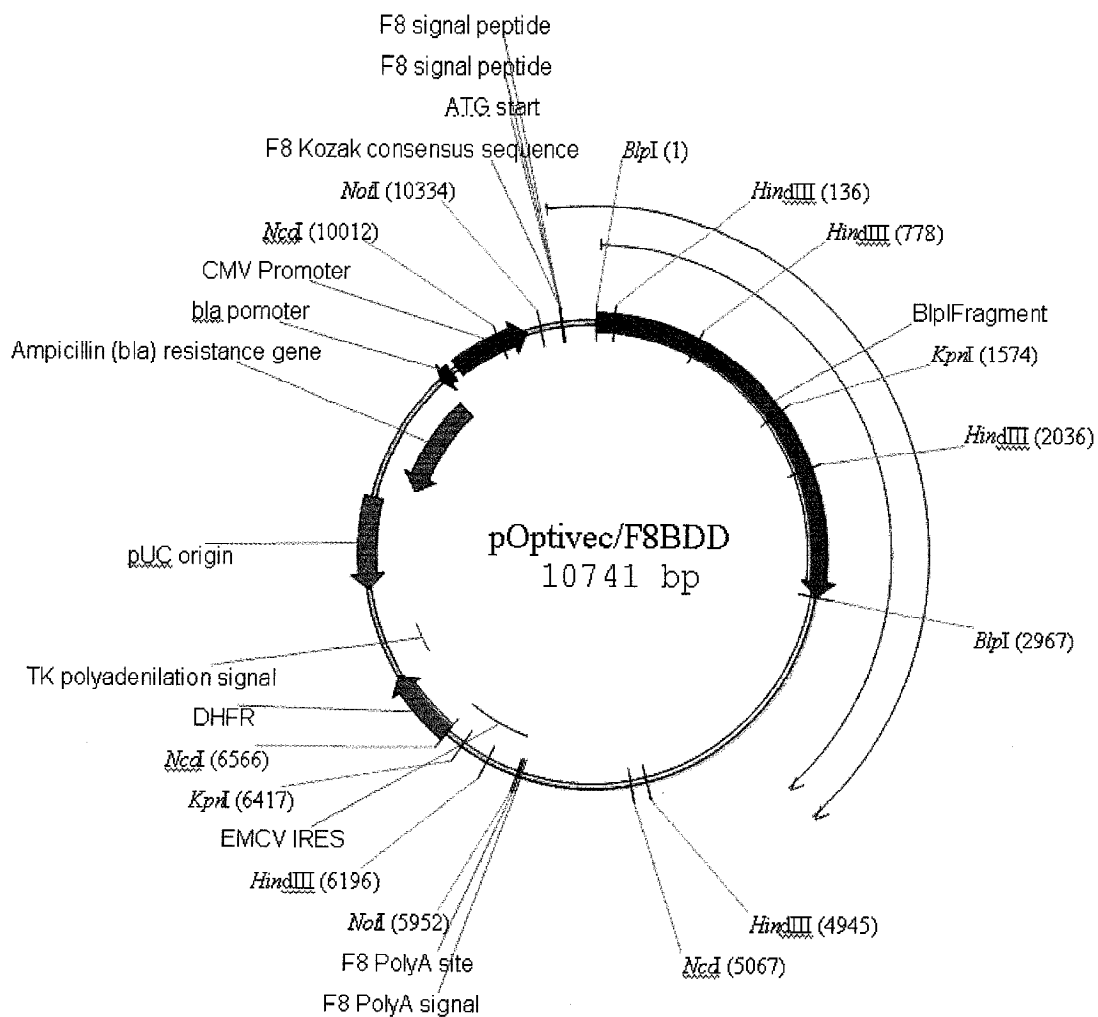
Учреждение Российской академии наук
Институт биоорганической химии им.
академиков М.М. Шемякина и Ю.А.
Овчинникова РАН (RU),
Учреждение Российской академии
медицинских наук Гематологический
научный центр РАМН (RU)

(54) ЭКСПРЕССИОННАЯ ГЕНЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ рOptivec/F8BDD, КОДИРУЮЩАЯ
РЕКОМБИНАНТНЫЙ ФАКТОР СВЕРТЫВАЕМОСТИ КРОВИ VIII ЧЕЛОВЕКА С ДЕЛЕЦИЕЙ
В-ДОМЕНА, И КЛЕТОЧНАЯ ЛИНИЯ DG-OV-F8BDD-18, ПРОДУЦИРУЮЩАЯ
РЕКОМБИНАНТНЫЙ ФАКТОР СВЕРТЫВАЕМОСТИ КРОВИ VIII ЧЕЛОВЕКА С ДЕЛЕЦИЕЙ
В-ДОМЕНА

(57) Реферат:

Изобретение относится к области
биотехнологии, конкретно к получению
рекомбинантного фактора свертываемости
крови VIII, и может быть использовано в
медицине. Конструируют экспрессионную
плазмидную ДНК рOptivec/F8BDD,
кодирующую рекомбинантный фактор

свертываемости крови VIII с делецией В-
домена, которой трансформируют клетки
линии DG-OV-F8BDD-18 для продуцирования.
Изобретение обеспечивает высокий уровень
секреции рекомбинантного фактора
свертываемости крови VIII с делецией В-домена
в бессывороточную культуральную среду. 2
н.п. ф-лы, 1 ил.



(56) (продолжение):

<http://www.lmbt.ru/#publications> Инструкция к набору pOptiVEC TOPO TA Cloning Kit от 27.11.2006, с.1-27.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

C12N 15/12 (2006.01)*C12N 15/79* (2006.01)*C12N 15/06* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2009139151/10, 23.10.2009**(24) Effective date for property rights:
23.10.2009

Priority:

(22) Date of filing: **23.10.2009**(43) Application published: **27.04.2011 Bull. 12**(45) Date of publication: **20.09.2011 Bull. 26**

Mail address:

117997, Moskva, GSP-7, V-437, ul. Miklukho-Maklaja, 16/10, IBKh RAN, patentnyj otdel

(72) Inventor(s):

**Orlova Nadezhda Aleksandrovna (RU),
Kovnir Sergej Vladimirovich (RU),
Vorob'ev Ivan Ivanovich (RU),
Jur'ev Andrej Serafimovich (RU),
Miroshnikov Anatolij Ivanovich (RU),
Vorob'ev Andrej Ivanovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Uchrezhdenie Rossijskoj akademii nauk Institut
bioorganicheskoy khimii im. akademikov M.M.
Shemjakina i Ju.A. Ovchinnikova RAN (RU),
Uchrezhdenie Rossijskoj akademii meditsinskikh
nauk Gematologicheskij nauchnyj tsentr RAMN
(RU)**

(54) EXPRESSION GENETIC MAKER pOptivec/F8BDD CODING HUMAN RECOMBINANT BLOOD COAGULABILITY FACTOR VIII WITH DELETION OF B-DOMAIN AND CELL LINE DG-OV-F8BDD-18 PRODUCING HUMAN RECOMBINANT BLOOD COAGULABILITY FACTOR VIII WITH DELETION OF B-DOMAIN

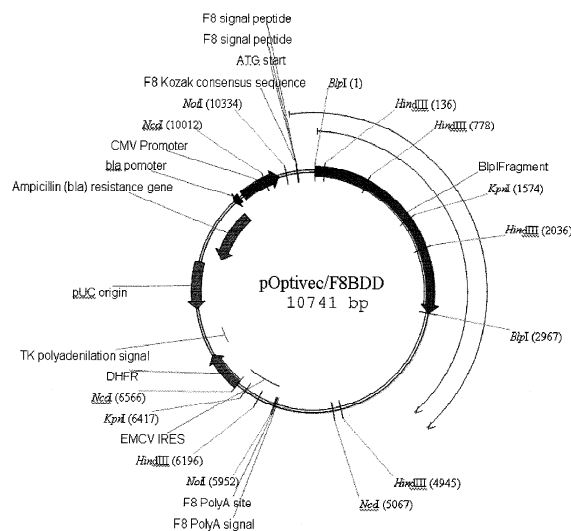
(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: expression plasmid DNA pOptivec/FSBDD coding the human recombinant blood coagulability factor VIII with deletion of B-domain which is used to transform cells of DG-OV-F8BDD-18 line for producing.

EFFECT: invention provides high secretion level of the human recombinant blood coagulability factor VIII with deletion of B-domain in a serum-free culture medium.

2 cl, 1 dwg, 2 ex



Изобретение относится к области биотехнологии, а именно к технологии получения биологически активных веществ (БАВ) методами генной инженерии, точнее, к методам получения фактора свертываемости крови VIII с делецией В-домена (BDD-rfVIII).

Структура гена фактора VIII (fVIII) и его связь с генетикой гемофилии были установлены в 1984-85 годах (Vehar G. A. and R. M. Lawn (1986). "The cloning of factor VIII and the genetics of hemophilia A". *Hosp Pract (Off Ed)*, 21(5): 111-116). Ген фактора VIII локализован на большом плече X-хромосомы, на участке длиной порядка 186 Кб, состоит из 26 экзонов размером от 69 п.о. до 3106 п.о. и интронов, достигающих до 32,4 Кб. Область, кодирующая фактор VIII, занимает до 1% длины X-хромосомы.

Экспрессия гена фактора VIII преимущественно происходит в гепатоцитах (Zelechowska M.G., J.A. van Mourik, et al. (1985). "Ultrastructural localization of factor VIII procoagulant antigen in human liver hepatocytes". *Nature*, 317(6039): 729-730), где обнаруживается его мРНК, а также полипептид в эндоплазматическом ретикулуме. Кроме того, показано, что промоторная область фактора VIII содержит регуляторные последовательности, специфичные для гепатоцитов.

Исходный полипептид фактора VIII транслоцируется в люмен эндоплазматического ретикулума (ЭР), где происходит N-гликозилирование. В ЭР fVIII взаимодействует с рядом шаперонов, включая кальретикулин, кальнексин, BiP. Транспорт в аппарат Гольджи (АГ) до сих пор описан не полностью, есть данные, что в нем принимает участие взаимодействие с внутриклеточным мембранным лектином, ERGIC-53 (Endoplasmatic Reticule Golgi Intermediate Compartment). Внутри АГ происходит N- и O-гликозилирование, сульфатирование остатков тирозина, а также ограниченный протеолиз. Критическая аминокислота для процессинга в АГ - Arg 2307, ее замена на Glu или Leu ведет к значительному увеличению секреции зрелого белка (Gitschier J., W.I. Wood, et al. (1986). "Identification of a missense mutation in the factor VIII gene of a mild hemophiliac". *Science*, 232(4756): 1415-1416).

Зрелый природный fVIII представлен в плазме крови серией форм с массами, лежащими в пределах от 170 до 280 кДа. В норме он экспрессируется *in vivo* как одноцепочечный полипептид, длиной 2332 аминокислоты, включающий структурные домены A1(1-336)-A2(372-710)-B(741-1648)-A3(1896-2019)-C1(2020-2172)-C2(2173-2332), в физиологических концентрациях представленный мономерной формой. Физиологически активный в кровотоке фактор VIII представляет собой гетеродимер, состоящий из легкой цепи (домены A3-C1-C2; молекулярная масса (ММ) 80 кДа) и различных вариантов тяжелой цепи (домены A1-A2-B; ММ 90-200 кДа). Легкая и тяжелая цепи фактора VIII удерживаются за счет координирования иона меди и стабилизируются в кровотоке шапероном - фактором фон Виллебранда (vWF), выделяющимся клетками эндотелия сосудов. Двухцепочечная форма образуется в результате протелитического расщепления предшественника (Lenting P. J., J. A. van Mourik, et al. (1998). "The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function". *Blood*, 92(11): 3983-3996), гетерогенность длины тяжелых цепей обусловлена ограниченным протеолизом (С)-конца В-домена.

В терапии гемофилии применяются: 1) препараты природного фактора VIII, 2) препараты рекомбинантного полноразмерного фактора VIII, 3) препараты на основе рекомбинантного фактора VIII с делецией В-домена (BDD-rfVIII). Препараты природного фактора VIII традиционно получают из фракции криопреципитата пулированной донорской плазмы. В целом количество извлекаемого из плазмы донорской крови фактора VIII физически ограничено объемом полученной плазмы с

учетом потерь фактора при получении криопреципитата и очистке и не может быть увеличено никакими методами. Необходимо отметить, что около четверти больных гемофилией А развивают так называемую ингибиторную форму болезни, то есть в их организме начинают вырабатываться антитела к фактору VIII, вследствие чего таким больным необходимо вводить большее количество фактора. Частота возникновения ингибиторной формы гемофилии значительно увеличилась за последние 20 лет, что, возможно, связано с использованием очищенного фактора VIII. Тем не менее необходимость вирусной инактивации природного фактора VIII не позволяет продолжать использовать неочищенный слабоиммуногенный криопреципитат. Естественным выходом из сложившейся ситуации было создание рекомбинантных (генно-инженерных) вариантов фактора VIII. Фактор VIII представляет собой полипептид (>200 кДа), имеющий множество разнообразных посттрансляционных модификаций и *in vivo* циркулирующий только в комплексе с шапероном - фактором фон Виллебрандта. Вследствие этого промышленно пригодные способы получения полноразмерного рекомбинантного фактора VIII были основаны на его экспрессии в животных клетках при одновременной коэкспрессии моноклональных антител, стабилизирующих продукт в культуральной среде, либо коэкспрессии фактора фон Виллебрандта, либо введении в культуральную среду белков плазмы человека. Последний способ фактически приводит к тому, что рекомбинантный фактор VIII обладает большинством недостатков природного.

На протяжении последних 20 лет в мире активно проводят исследования влияния мутаций на активность, стабильность и иммуногенность препаратов фактора VIII, целью которых было получить экспрессирующийся с большей продуктивностью и более стабильный в среде аналог природного фактора, сохраняющий прокоагулянтную активность и не иммуногенный. В основном работы сосредоточены в области удаления участка кДНК, кодирующего В-домен (D. D. Pittman, E. M. Alderman, et al. (1993). "Biochemical, immunological, and *in vivo* functional characterization of B-domain-deleted factor VIII". Blood, 81(11): 2925-2935). Наилучшие результаты по получению линий продуцентов делеционных форм фактора VIII с определенной аминокислотной последовательностью были получены исследовательским подразделением компании Pharmacia (Lind P., K. Larsson, et al. (1995). "Novel forms of B-domain-deleted recombinant factor VIII molecules. Construction and biochemical characterization". Eur J Biochem, 232(1): 19-27).

На настоящий момент существует лишь одна одобренная для клинического использования мутантная форма - делеционный мутант фактора VIII, вариант SQ.

Известен способ создания эукариотических продуцентов рекомбинантного фактора свертываемости крови VIII с делецией В-домена в клетках млекопитающих (патент США US 4868112). Он состоит в конструировании плазмиды, содержащей целевой ген и ген дигидрофолатредуктазы (DHFR), трансфекции данной плазмиды, в клетки млекопитающих линий COS-1, CHO (DUKX-B11), получении колоний стабильно трансфицированных клеток и их селекции в среде, содержащей метотрексат. При использовании данного способа уровень секреции целевого белка в культуральную среду составляет 2 ЕД/мл/сутки при плотности клеток 1 млн/мл. При этом культивацию производят в присутствии сыворотки крупного рогатого скота, содержащей фактор фон Виллебрандта, плотно связывающийся с фактором VIII.

Способов получения продуцентов для промышленного производства целевого белка без использования белковых препаратов природного происхождения не известно.

Для увеличения уровня секреции продуцентов BDD-rfVIII известны различные способы, основой которых является оптимизация доменной структуры и аминокислотного состава целевого белка. Так, в патентах США US 6376463, US 7122634 помимо делетирования В-домена применяют внесение точечных мутаций в домены А и создание слитных белков на основе генов фактора VIII свиньи и человека. Данный способ имеет ограниченную практическую пригодность, поскольку, как и при использовании природного свиного фактора VIII для больных ингибиторной формой гемофилии А, присутствует риск развития вторичной резистентности к фактору VIII из-за иммуногенности препарата (Parker E. T., H. N. Craddock, et al. (2004). "Comparative immunogenicity of recombinant B domain-deleted porcine factor VIII and Hyate:C in hemophilia A mice presensitized to human factor VIII". J Thromb Haemost, 2(4): 605-611).

Известен также способ увеличения продуктивности систем экспрессии, основанный на введении в геном культивируемых клеток бицистронных генетических конструкций с последующей амплификацией гена целевого белка (патент США US 6114146). Клетки линий 293 и SK-HEP1 трансфецируют плазмидой pCMVF/EDHPro, содержащей ген DHFR и искусственный ген фактора VIII с делецией В-домена, соединенные участком, содержащим сайт внутреннего связывания рибосомы (IRES). При последующем культивировании в присутствии увеличивающихся концентраций метотрексата получают клеточные линии-продуценты, секретирующие BDD-rfVIII в культуральную среду с уровнем от 0,1 до 3 ЕД/млн клеток в сутки. Однако получение продуцентов по предлагаемой способу требует использования эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота в составе культуральной среды, что приводит к образованию плотного комплекса фактора VIII и бычьего фактора фон Виллебрандта.

Наиболее близким по технической реализации аналогом изобретения является описанная в патенте США US 6358703 гетерологическая система экспрессии, полученная трансфекцией бицистронного плазмидного вектора pCIS25DTR в клетки линии НКВ11. Использование данного продуцента в масштабе 15-литрового перфузионного биореактора позволяет достичь суммарной продуктивности 4 млн МЕ/сутки, вероятный уровень продуктивности при стандартных параметрах культивирования клеток должен находиться в диапазоне 10-30 МЕ/млн клеток в сутки. Недостатком известного технического решения является использование гибридной линии клеток, полученной слиянием клеток линии 293 S и раковых клеток лимфомы Беркитта, культивируемых в присутствии эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота в составе культуральной среды. Сыворотка также применяется при селекции мастер-клона конечной линии продуцента и только при получении банка рабочих продуцентов производится ее замена на препараты фракционированной плазмы человека. Кроме того, применимость использования раковых клеток человека для создания клеточных линий продуцентов имеет ряд ограничений по соображениям безопасности (Yallop C.A., P.L. Norby, et al. (2003). "Characterisation of G418-induced metabolic load in recombinant CHO and BHK cells: effect on the activity and expression of central metabolic enzymes". Cytotechnology, 42(2): 87-99); патентная заявка США US 2006/0099685 A1, п.0058).

Технической задачей изобретения является создание высокопродуктивной и свободной от использования продуктов животного происхождения линии клеток яичника китайского хомячка для получения рекомбинантного фактора свертываемости крови VIII с делецией В-домена для биофармацевтического производства.

Поставленная задача решается за счет создания экспрессионной плазмидной

ДНК рOptivec/F8BDD, включающей область ДНК, последовательность которой приведена в SEQ ID 2, и кодирующей полипептид, приведенный в SEQ ID 1, содержащий последовательность фактора свертываемости крови VIII с делегированным В-доменом;

а также за счет создания линии клеток яичника китайского хомячка DG-OV-F8BDD-18, в геноме которой содержится последовательность плазмидной ДНК рOptivec/F8BDD, - продуцента рекомбинантного фактора свертываемости крови VIII с делегированным В-доменом.

Технический результат заключается в повышении выхода целевого белка в культуральную среду определенного химического состава, то есть не содержащую продуктов животного или растительного происхождения или гидролизаты таких продуктов, и проведении работ по созданию линии-продуцента без использования продуктов животного происхождения, что позволяет минимизировать риск присутствия в продукте патогенных вирусов и прионов.

Экспрессионная плазмидная ДНК рOptivec/F8BDD состоит из фрагмента ДНК, длиной 6359 п.о., содержащего последовательность кДНК гена человеческого фактора свертываемости крови VIII с делецией В-домена SQ, и фрагмента 4382 п.о.

плазмиды рOptivec, содержащего

- регуляторные элементы, обеспечивающие экспрессию фактора VIII: конститутивный промотор вируса CMV, последовательность Козак (сайт связывания рибосом), и сигнал полиаденилирования вируса простого герпеса (HSV);

- последовательность фактора устойчивости трансфицированных клеток к воздействию метотрексата - дигидрофолатредуктазы (DHFR) - и регуляторные элементы для экспрессии DHFR - последовательность IRES вируса энцефаломиокардита (EMCV), обеспечивающая бицистронную экспрессию в животных клетках и сигнал полиаденилирования;

- ген устойчивости к антибиотику ампициллин и бактериальный промотор гена устойчивости к ампициллину, позволяющие проводить препаративную наработку плазмиды в E.coli.

Плазмида рOptivec/F8BDD содержит уникальные сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции - FspI (8918); MfeI (4940); PsiI (1039); PvuI (9065); RleAI (2281); SapI (7686); SnaBI (9995); SphI (3663); SwaI (3650). Имеет молекулярную массу 6,64 мДа. Плазмиду вводят в клетки CHO DG-44 методом липосомальной трансфекции (Straus S.E., T. Wilson, et al. (1981). "Transfection of KB cells by liposomes containing adenovirus type 2 DNA". J Virol, 39(1): 290-294), получают пул стабильно трансфицированных клеток при помощи культивирования в среде химически определенного состава, не содержащей гипоксантина и тимидина. Амплификацию кассеты в геноме клеток проводят путем последовательных культивирований в присутствии возрастающих концентраций метотрексата от 25 нМ до 500 нМ. Получают пул клеток, устойчивых к высокой концентрации метотрексата, и используют для клонирования методом предельного разведения. Полученные клоны клеток-продуцентов анализируют методом иммуноферментного анализа и отбирают клоны, дающие максимальный уровень экспрессии целевого белка. Среди них выбирают клон DG-OV-F8BDD-18, при культивировании которого в суспензионной форме в бессывороточной среде уровень секреции В-домен делегированного фактора свертываемости крови VIII в норме составляет не менее 500 МЕ/л. Особенности созданной плазмиды приведены на чертеже.

На чертеже показана схематическая карта рOptivec/F8BDD.

Обозначения

Стрелками → обозначены области, кодирующие полипептид фактора свертывания крови VIII (включая и не включая область лидерного пептида).

Курсивом обозначены характеристические сайты рестрикции, в скобках указана позиция разрезания. NotI - рестриктазы, фланкирующие область вставки фрагмента кДНК фактора VIII в материнский вектор pOptives.

Ampicillin (bla) resistance gene - ген устойчивости к ампициллину.

bla promoter - бактериальный промотор гена устойчивости к ампициллину.

CMV Promoter - конститутивный эукариотический промотор цитомегаловируса.

Kozak - сайт связывания рибосом - последовательность Козак.

Start ATG - первый кодон рамки считывания полипептида фактора VIII.

polyA - область, соответствующая поли-А тракту кДНК фактора VIII.

ECMV IRES - сайт связывания рибосом - последовательность IRES энцефаломиокардита, обеспечивающая бицистронную экспрессию в животных клетках.

DHFR - последовательность фактора устойчивости трансфицированных клеток к воздействию метотрексата - дигидрофолатредуктазы (DHFR).

TK polyA signal - сигнал полиаденилирования.

pUC origin - область начала репликации (ориджин) плазмид семейства pUC.

Изобретение иллюстрируют примеры.

Пример 1. Получение плазмидной ДНК pOptives/F8BDD, кодирующей белок человеческого фактора свертываемости крови VIII с делецией В-домена, для трансфекции линии клеток CHO-DG-44.

В качестве акцепторной плазмиды для клонирования делеционного варианта гена BDD- rfVIII используют экспрессионный вектор pOptives, ранее полученный в лаборатории медицинской биотехнологии ГУ ГНЦ РАМН на основе коммерчески доступной линейаризованной плазмидной ДНК pOptives-ТОРО при инкубации в деионизованной воде 30 минут с последующим лигированием ДНК-лигазой фага T4 (Fermentas, Литва), проводившемся в стандартном буферном растворе по методике производителя фермента. Полученной лигазной смесью трансформируют клетки E.coli штамма DH5 α , с генотипом F- ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (r_k^- , m_k^+) phoA supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1. Для этого к 200 мкл замороженной суспензии клеток E.coli добавляют 5 мкл лигазной смеси, инкубируют на льду 30 минут для сорбции плазмидной ДНК, нагревают до 42°C на 60 секунд и инкубируют на льду 5 минут. После чего добавляют 800 мкл питательного бульона SOC (20 г/л триптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 0,5 г/л NaCl, 250 mM KCl, 10 mM MgCl₂) и инкубируют при 37°C 60 минут. После инкубации переносят суспензию на чашку Петри с твердой агаризованной средой 2xYT-агар (16 г/л триптона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л NaCl, 18 г/л агара), содержащей ампициллин в концентрации 100 мкг/мл, и помещают в термостат на 37°C 18 часов. Отдельные клоны трансформантов инокулируют в 5 мл питательного бульона LB с добавлением ампициллина в концентрации 50 мкг/мл, наращивают 18 часов при 37°C и проводят выделение плазмидной ДНК с использованием набора реактивов "Wizard Plus SV Minipreps" («Promega», США) по стандартному протоколу фирмы-производителя.

В качестве матрицы для получения вставки используют плазмиду pCMV6-XL4/NM_000132 (Origene, США), содержащую полную последовательность полноразмерной кДНК fVIII, совпадающую с теоретически определенной кДНК fVIII, опубликованной в базе данных GenBank. Методом ПЦР со специфических

праймеров O1KpnIfor (5'GCTGGTACCTCACAGAGAATATACA3'), O1Hindrev (5'GGAGAAGCTTCTTGGTTCAATG3'), O2Hindfor (5'CCAAGCTTCTCCCAAAACCCACCAGTCTTGAAAC3'), O2B1prev (5'CTGCCCATGCTGAGCAGATAC3'), содержащих сайты узнавания специфических эндонуклеаз, получают два ПЦР-продукта F1 и F2, фланкирующие делегируемый участок кодирующий В-домен, общая длина которых не превышает полутора тысяч пар оснований, то есть при условии проведения амплификации смесью высокоточных полимераз - вероятность мутации будет минимальной. ПЦР-продукты клонируют в Т-вектор и определяют первичную нуклеотидную последовательность по обеим цепям. Для секвенирования 350 нг плазмидной ДНК смешивают с праймером (3,2 pmol) и упаривают пробы при 65°C. Секвенирование проводится с помощью набора реактивов ABI PRISM BigDye™ Terminator v. 3.1, с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3100-Avant. Анализ хроматограмм проводят при помощи программы Chromas v 2.13 или пакета VNT Suite.

Фрагмент F3, соответствующий N-концевому участку тяжелой цепи fVIII, получают без использования ПЦР, путем препаративной рестрикции плазмиды pCMV6-XL4/NM_000132 эндонуклеазами рестрикции NotI и KpnI. Продукты рестрикции разделяют в 1% агарозном геле, буферный раствор TBE, с добавлением бромистого этидия (0,4 мкг/мл). Для выделения ДНК полосу, соответствующую продукту амплификации, визуализируют при помощи УФ-облучения, вырезают из агарозного геля, помещают в пробирку объемом 1,5 мл и проводят экстракцию ДНК, используя набор реактивов "Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System" («Promega», США) согласно протоколу фирмы-производителя.

Сборку трех фрагментов F1, F2, F3 ведут в плазмидном векторе pAL-TA (Евроген, РФ), что обеспечивает ряд методических преимуществ по сравнению со сборкой в векторе большего размера.

Отбор позитивных клонов E.coli проводят методом ПЦР с клонов с использованием праймера Odelf (5'GCCACAACCTCAGACTTTTCG3') и стандартных праймеров к последовательности вектора: M13for и M13rev. Амплификацию проводят при помощи прибора "Терцик" (ДНК-технология, РФ) по следующей схеме: инкубационную смесь из расчета 25 мкл на одну реакцию (2,5 мкл 10х буферного раствора для Taq-полимеразы; по 10 пМ прямого и обратного праймера; по 2 мМ каждого дезоксирибонуклеотидтрифосфата; воды до 24 мкл). Полученную смесь разносят по пробиркам по 22 мкл, в каждую пробирку помещают кусочек парафина. Бактериальные колонии переносят петлей в пробирки и одновременно делают штрихи на свежей, размеченной чашке Петри с твердой питательной средой (которую затем помещают в воздушный термостат на 37°C). Помещают пробирки в прибор, проводят денатурацию при 94°C 3 мин, добавляют в остававшуюся инкубационную смесь по 0,5 ЕД Taq-полимеразы и разносят по пробиркам на последней минуте первого цикла денатурации. Проводят 25 циклов ПЦР (денатурация: 94°C 30 с, отжиг праймера X= 2°C × n (А/Т) + 4°C × n (Г/Ц) -5°C 30 с, элонгация 72°C 30-90 с). Продукты полимеразной цепной реакции анализируют электрофорезом в 1% агарозном геле. Для отобранных позитивных клонов проводят выделение плазмиды и ее секвенирование. После подтверждения корректности сборки фрагментов дают выбранной плазмиде обозначение pAL-TA/F123.

Переносят фрагмент NotI-NotI из плазмиды pCMV6-XL4/NM_000132 в плазмиду pOptives, линейаризованную NotI при помощи процедур, изложенных выше. После подтверждения идентичности последовательности гена фактора VIII в составе

полученной плазмиды рOptivec/F8 методом полного секвенирования обеих цепей в области вставки, фрагмент BlnI-BlnI в рOptivec/F8 заменяют на фрагмент BlnI-BlnI из рAL-TA/F123.

Для этого полученный искусственный фрагмент гена В-домен делетированного фактора VIII лигируют с рестрицированным по сайту BlnI и дефосфорилированным вектором рOptivec/F8 и продуктом лигирования трансформируют клетки E.coli штамма TOP10. Первичный анализ полученных клонов ведут при помощи метода ПЦР с колоний с использованием праймеров 8sq4f (5'TGTATTTGATGAGAACCGAAGC3') и 8sq5r (5'GCCACTCTGAGCCCTGTT3') или CMVfor (Invitrogen, США) и 8sq15r (5'GAGTTCTTTGTTTCTGAGTGCC3'). Последовательность полученных плазмидных конструкций рOptivec/F8BDD верифицируют методом секвенирования по обеим цепям кодирующей области на протяжении всего вставленного участка. Данные определения первичной нуклеотидной последовательности области плазмиды, кодирующей рекомбинантный фактор VIII человека с делетированным В-доменом, полученные с прибора для автоматического капиллярного электрофореза, анализируют в приложении ContigExpress программного пакета VectorNTI Suite (Invitrogen, США). С использованием стандартного алгоритма проводят тримминг 5'-концевых и/или 3'-концевых областей фрагментов. После этого проводят сборку контига с использованием стандартных настроек. Проводят понуклеотидное сравнение полученной консенсусной последовательности с теоретически предсказанной последовательностью BDD-rfVIII, проверяют отсутствие нуклеотидных замен. Помимо кодирующей области, по аналогичному алгоритму проводят также секвенирование областей рестриктных сайтов, по которым производят клонирование фрагмента кДНК, а также области промотора CMV и участка внутреннего связывания рибосомы (IRES) экспрессионного вектора рOptivec, проверяют отсутствие точечных мутаций.

Полученная экспрессионная плазмидная ДНК рOptivec/F8BDD кодирует фактор свертываемости VIII человека с делетированным В-доменом, имеет размер 10741 пара нуклеотидных оснований и содержит уникальные сайты рестрикции FspI (8918); MfeI (4940); PsiI (1039); PvuI (9065); RleAI (2281); SapI (7686); SnaBI (9995); SphI (3663); SmaI (3650). Данная конструкция предназначена для конститутивной трансфекции эукариотических клеток геном фактора свертываемости VIII человека с делетированным В-доменом с последующим отбором и амплификацией по сцепленному признаку DHFR⁺.

Сообщает клеткам-реципиентам следующие фенотипические признаки: при трансформации прокариот - устойчивость к ампициллину; при трансфекции клеток эукариот - ограниченная устойчивость к метотрексату, увеличивающаяся при селективном отборе, потеря ауксотрофности по гипоксантину и тимидину, экспрессия белка BDD-rfVIII в ростовую среду.

Созданную плазмидную ДНК используют для получения линии-продуцента.

Пример 2. Получение клональной линии эукариотических продуцентов рекомбинантного фактора свертываемости крови VIII с делецией В-домена DG-OV-F8BDD-18, производного линии клеток яичника китайского хомячка DG-44

Экспрессионную плазмидную ДНК рOptivec/F8BDD, кодирующую рекомбинантный фактор свертываемости крови VIII с делецией В-домена, сконструированную по методке, приведенной в Примере 1, амплифицируют в клетках бактерий в препаративных количествах. Для этого клетки штамма E.coli TOP10,

трансформированные верифицированной плазмидной ДНК, культивируют в 0,5 л жидкой среды LB в течение 14 часов. Выделение плазмидной ДНК проводят методом щелочного лизиса бактерий набором для препаративного выделения ДНК (EndoFree Plasmid MaxiKit, Qiagen) по методике производителя. Концентрация высокоочищенной плазмидной ДНК, не содержащей пирогенов, составляет при этом 190 мкг/мл. Для проведения конститутивной трансфекции эукариотических клеток выделенной плазмидной ДНК ее дополнительно переводят в линейную форму, рестрицировав количественно эндонуклеазой PvuI, что приводит к разрушению гена бета-лактамазы (устойчивости к ампициллину). Затем плазмидную ДНК очищают от рестриктазы, осаждая 70% этанолом. Выделенную плазмиду, предназначенную для транзientной трансфекции, рестрикции не подвергают. Полученные формы плазмиды растворяют в фосфатно-солевом буфере и стерилизуют при помощи фильтра 0,22 мкм.

Клетки линии CHO DG-44 (Invitrogen, США) получают от производителя в криопробирках по 1 мл, содержащих замороженную суспензию клеток плотностью приблизительно 10 млн клеток на мл в среде CD DG-44 (Gibco, США) с 10% диметилсульфоксида (DMSO). Содержимое сосуда размораживают при 37°C и добавляют к 30 мл полной среды CD DG-44. Полная среда состоит из CD DG-44, 8 мМ L-глутамина и 1,8 мл/л сурфактанта Pluronic F-68 (BASF Inc., США) и содержит достаточные для роста DHFR-отрицательных клеток количества гипоксантина и тимидина. Клетки культивируют в колбах Эрленмеера на орбитальной качалке при 130 об/мин в атмосфере, содержащей 8% углекислого газа, при температуре 37°C. Подсчет плотности клеточной суспензии и доли живых клеток проводят в счетной камере Горяева, при окрашивании трипановым синим. Субкультивируют с частотой 1 раз в 24-48 часов по достижении концентрации живых клеток 1,2 млн кл./мл. Для этого удаляют кондиционированную среду центрифугированием в течение 5 минут на скорости 1200 об/мин, ресуспендируют клеточный осадок свежей средой и распределяют в новые колбы Эрленмеера с отношением субкультивирования 1:6.

За 48 часов до трансфекции клетки высевают по описанной методике в количестве 9 млн клеток на 1 колбу. Из этих клеток за 24 часа до трансфекции также высевают 9 млн клеток на 1 колбу. В день трансфекции доля живых клеток должна составлять не менее 95%. Клетки в день трансфекции, не центрифугируя, разводят до конечной концентрации 0,5 млн кл./мл в среде DG-44 в колбах Эрленмеера. Стерильную, осажденную этанолом плазмидную ДНК растворяют в фосфатно-солевом растворе и используют для получения трансфекционной смеси.

Трансфекцию полученной плазмиды pOptivec/F8BDD в клетки линии CHO DG-44 проводят при помощи липосомного реагента FreeStyle MAX (Invitrogen) в бессывороточной среде OptiPro SFM (Invitrogen). Клетки в день трансфекции, не центрифугируя, разводят до конечной концентрации 0,5 млн кл./мл в среде DG-44 в колбах Эрленмеера. Стерильную, осажденную этанолом плазмидную ДНК растворяют в PBS буфере и используют для получения трансфекционной смеси, содержащей 18 мкг плазмидной ДНК, 15 мкл трансфекционного агента.

Плазмидная ДНК, используемая для трансфекции, представляет собой смешанные в соотношении 20:1 по массе плазмиды pOptivec/F8BDD, линеаризованную эндонуклеазой рестрикции PvuI, и сверхспирализованную контрольную плазмиду pEGFP (Clontech, США). Трансфекционную смесь осторожно перемешивают и инкубируют от 10 до 20 минут, а затем осторожно добавляют во вращающуюся колбу, содержащую клетки CHO DG-44, в указанном выше количестве. Экспрессируемый в трансфицированных клетках флуоресцентный белок используется

для оценки эффективности трансфекции. Для этого через 12 часов после трансфекции в пробе клеток определяют долю флуоресцирующих при анализе с помощью пары оптических фильтров EGFP. Полученное соотношение характеризует интенсивность транзистентной экспрессии в трансфицированных клетках.

Для отбора стабильных трансформантов с включением в хромосомную последовательность плазмидной ДНК рOptivec/F8BDD трансфицированные клетки CHO DG-44 пересаживают в среду CD OptiCHO (Invitrogen), не содержащую гипоксантин и тимидин, и культивируют по следующей методике.

Проводят подсчет плотности клеточной суспензии и доли живых клеток в счетной камере Горяева при окрашивании трипановым синим. Затем удаляют старую среду центрифугированием в течение 5 минут на скорости 1200 об/мин, ресуспенсируют клеточный осадок свежей средой CD OptiCHO (Invitrogen), с добавлением L-глутамина в конечной концентрации 8 мМ, и распределяют в новые колбы Эрленмеера по 9×10^6 клеток на колбу. Клетки культивируют в колбах Эрленмеера на орбитальной качалке при 130 об/мин в атмосфере, содержащей 8% углекислого газа, при температуре 37°C. Субкультивируют с частотой 1 раз в 2 дня в течение 10-14 дней до достижения доли живых клеток более 90%. По достижении доли живых клеток 90% и более замораживают промежуточный клеточный банк с образцами, содержащими по 10^7 клеток в 1 мл среды CD OptiCHO с добавлением 10% DMSO. Полученный по приведенной методике пул трансфицированных клеток в форме суспензионной культуры обогащают путем культивации в ростовой среде, не содержащей гипоксантина и тимидина, в течение 14 дней.

Для амплификации целевого гена BDD- rfVIII проводят селекционное культивирование в присутствии нарастающих доз метотрексата путем последовательных пассажей в ростовой среде, дополнительно содержащей 50, 100, 250, 500 нМ метотрексата. Для этого образцы из промежуточного банка размораживают по описанному выше протоколу, с теми изменениями, что в качестве культивационной среды используется CD OptiCHO (Invitrogen), с добавлением L-глутамина в конечной концентрации 8 мМ. Затем в культивационную среду добавляют метотрексат в диапазоне концентраций от 50 нМ до 500 нМ с удвоением рабочей концентрации метотрексата на каждом шаге амплификации. Переход к следующему шагу амплификации осуществляют каждые 14-21 день по достижении доли живых клеток более 90%.

Обогащенную культуру трансфицированных клеток используют для создания первичного криобанка и для получения клонов трансфицированных клеток.

На каждом шаге амплификации уровень экспрессии целевого белка в культуре клеток определяют иммуноферментным анализом. Клетки продуценты последнего шага амплификации клонируются методом предельных разведений, в расчете конечной концентрации 2 клетки на лунку в условиях адгерентной культивации.

Получают 22 жизнеспособных клон клеток, секретирующих В-домен делегированный фактор свертываемости крови VIII человека в ростовую среду. Среди них отбирают 4 клон, дающих наибольшую концентрацию рекомбинантного белка в пересчете на число клеток в лунке.

Отобранные клоны культивируют в течение четырех последовательных пассажей и подвергают криопрезервации для создания мастер-банка клеток-продуцентов. Затем эти клоны реадаптируют к суспензионному культивированию еще в течение трех пассажей для получения кондиционированной ростовой среды, содержащей целевой белок. Для отобранных клонов проводят анализ контаминации микоплазмой,

проверяют, что ни один из клонов не содержит ДНК микоплазмы.

Измерение концентрации рекомбинантного фактора свертываемости крови VIII с делецией В-домена в кондиционированной ростовой среде, проведенное при помощи ИФА, показало, что продуктивность гетерологической системы экспрессии, созданной

на основе наилучшего клона, составляет около 0,5 ЕД/млн клеток/сутки. Продуктивность системы была приблизительно постоянна в течение трех последовательных пассажей, что указывает на стабильность всех или большинства геномных копий ДНК BDD-rfVIII. Выбранный клон (код DG-OV-F8BDD-18)

последовательно культивируют в 3, 15, 100 и 200 мл ростовой среды CD OptiCHO до достижения клеточной плотности 3 млн/мл. Культивирование в объеме ростовой среды дополнительно проводят в течение 3 дней, ежедневно добавляя глютамин до 4 мМ и глюкозу до 3 мМ.

Кондиционированную ростовую среду отделяют от клеточной массы, концентрируют, обессоливают и замораживают. Содержание целевого рекомбинантного белка определяют при помощи ИФА. Было показано, что концентрация целевого белка составляет не менее 500 ЕД/л/сутки при концентрации клеток в суспензии 1 млн/мл. При проведении всех работ не используются материалы животного происхождения, что позволяет избежать контаминации создаваемой линии клеток вирусами животных, включая не охарактеризованные на настоящий момент, и прионами. Созданная линия клеток получена на основе широко распространенной в биофармацевтической промышленности линии CHO DG-44 и обеспечивает максимально возможную вирусную и прионную безопасность продукта.

Формула изобретения

1. Плазмидная ДНК pOptivec/F8BDD, имеющая молекулярную массу 6,64 мДа и уникальные сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции - FspI (8918); MfeI (4940); PsiI (1039); PvuI (9065); RleAI (2281); SapI (7686); SnaBI (9995); SphI (3663); SwaI (3650); состоящая из фрагмента ДНК с SEQ ID NO:2 длиной 6359 п.о., содержащего последовательность кДНК гена человеческого фактора свертываемости крови VIII с делецией В-домена, аминокислотная последовательность которого приведена в SEQ ID NO:1, и фрагмента 4382 п.о. плазмиды pOptivec, содержащего:

- регуляторные элементы, обеспечивающие экспрессию гена фактора свертываемости крови VIII с делецией В-домена: конститутивный промотор вируса CMV, последовательность Козак (сайт связывания рибосом) и сигнал полиаденилирования вируса простого герпеса (HSV);

- последовательность фактора устойчивости трансфицированных клеток к воздействию метотрексата - дигидрофолатредуктазы (DHFR) и регуляторные элементы для экспрессии DHFR - последовательность IRES вируса энцефаломиокардита (EMCV), обеспечивающая бицистронную экспрессию в животных клетках и сигнал полиаденилирования;

- ген устойчивости к антибиотику ампициллин и бактериальный промотор гена устойчивости к ампициллину, позволяющие проводить препаративную наработку плазмиды в E.coli;

2. Линия клеток яичника китайского хомячка DG-OV-F8BDD-18 - продуцент рекомбинантного фактора свертываемости крови VIII с делегированным В-доменом, обладающая продуктивностью 0,5 ЕД/млн клеток/сутки, полученная путем липосомальной трансфекции клеток яичника китайского хомячка линии CHO DG-44 плазмидой по п.1 и последующего селективного культивирования в присутствии

возрастающих концентраций метотрексата от 25 до 500 нМ.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

Нуклеотидные и аминокислотные последовательности, иллюстрирующие изобретение:

SEQ ID 1

Met	Gln	Ile	Glu	Leu	Ser	Thr	Cys	Phe	Phe	Leu	Cys	Leu	Leu	Arg	Phe	1	5	10	15
Cys	Phe	Ala	Thr	Arg	Arg	Tyr	Tyr	Leu	Gly	Ala	Val	Glu	Leu	Ser	Trp	20	25	30	
Asp	Tyr	Met	Gln	Ser	Asp	Leu	Gly	Glu	Leu	Pro	Val	Asp	Ala	Arg	Phe	35	40	45	
Pro	Pro	Arg	Val	Pro	Lys	Ser	Phe	Pro	Phe	Asn	Thr	Ser	Val	Val	Tyr	50	55	60	
Lys	Lys	Thr	Leu	Phe	Val	Glu	Phe	Thr	Asp	His	Leu	Phe	Asn	Ile	Ala	65	70	75	80
Lys	Pro	Arg	Pro	Pro	Trp	Met	Gly	Leu	Leu	Gly	Pro	Thr	Ile	Gln	Ala	85	90	95	
Glu	Val	Tyr	Asp	Thr	Val	Val	Ile	Thr	Leu	Lys	Asn	Met	Ala	Ser	His	100	105	110	
Pro	Val	Ser	Leu	His	Ala	Val	Gly	Val	Ser	Tyr	Trp	Lys	Ala	Ser	Glu	115	120	125	
Gly	Ala	Glu	Tyr	Asp	Asp	Gln	Thr	Ser	Gln	Arg	Glu	Lys	Glu	Asp	Asp	130	135	140	
Lys	Val	Phe	Pro	Gly	Gly	Ser	His	Thr	Tyr	Val	Trp	Gln	Val	Leu	Lys	145	150	155	160
Glu	Asn	Gly	Pro	Met	Ala	Ser	Asp	Pro	Leu	Cys	Leu	Thr	Tyr	Ser	Tyr	165	170	175	
Leu	Ser	His	Val	Asp	Leu	Val	Lys	Asp	Leu	Asn	Ser	Gly	Leu	Ile	Gly	180	185	190	
Ala	Leu	Leu	Val	Cys	Arg	Glu	Gly	Ser	Leu	Ala	Lys	Glu	Lys	Thr	Gln	195	200	205	
Thr	Leu	His	Lys	Phe	Ile	Leu	Leu	Phe	Ala	Val	Phe	Asp	Glu	Gly	Lys	210	215	220	
Ser	Trp	His	Ser	Glu	Thr	Lys	Asn	Ser	Leu	Met	Gln	Asp	Arg	Asp	Ala	225	230	235	240
Ala	Ser	Ala	Arg	Ala	Trp	Pro	Lys	Met	His	Thr	Val	Asn	Gly	Tyr	Val	245	250	255	
Asn	Arg	Ser	Leu	Pro	Gly	Leu	Ile	Gly	Cys	His	Arg	Lys	Ser	Val	Tyr	260	265	270	
Trp	His	Val	Ile	Gly	Met	Gly	Thr	Thr	Pro	Glu	Val	His	Ser	Ile	Phe	275	280	285	

Leu	Glu	Gly	His	Thr	Phe	Leu	Val	Arg	Asn	His	Arg	Gln	Ala	Ser	Leu	290	295	300	
Glu	Ile	Ser	Pro	Ile	Thr	Phe	Leu	Thr	Ala	Gln	Thr	Leu	Leu	Met	Asp	305	310	315	320
Leu	Gly	Gln	Phe	Leu	Leu	Phe	Cys	His	Ile	Ser	Ser	His	Gln	His	Asp	325	330	335	
Gly	Met	Glu	Ala	Tyr	Val	Lys	Val	Asp	Ser	Cys	Pro	Glu	Glu	Pro	Gln	340	345	350	
Leu	Arg	Met	Lys	Asn	Asn	Glu	Glu	Ala	Glu	Asp	Tyr	Asp	Asp	Asp	Leu	355	360	365	
Thr	Asp	Ser	Glu	Met	Asp	Val	Val	Arg	Phe	Asp	Asp	Asp	Asn	Ser	Pro	370	375	380	
Ser	Phe	Ile	Gln	Ile	Arg	Ser	Val	Ala	Lys	Lys	His	Pro	Lys	Thr	Trp	385	390	395	400
Val	His	Tyr	Ile	Ala	Ala	Glu	Glu	Glu	Asp	Trp	Asp	Tyr	Ala	Pro	Leu	405	410	415	
Val	Leu	Ala	Pro	Asp	Asp	Arg	Ser	Tyr	Lys	Ser	Gln	Tyr	Leu	Asn	Asn	420	425	430	
Gly	Pro	Gln	Arg	Ile	Gly	Arg	Lys	Tyr	Lys	Lys	Val	Arg	Phe	Met	Ala	435	440	445	
Tyr	Thr	Asp	Glu	Thr	Phe	Lys	Thr	Arg	Glu	Ala	Ile	Gln	His	Glu	Ser	450	455	460	
Gly	Ile	Leu	Gly	Pro	Leu	Leu	Tyr	Gly	Glu	Val	Gly	Asp	Thr	Leu	Leu	465	470	475	480
Ile	Ile	Phe	Lys	Asn	Gln	Ala	Ser	Arg	Pro	Tyr	Asn	Ile	Tyr	Pro	His	485	490	495	
Gly	Ile	Thr	Asp	Val	Arg	Pro	Leu	Tyr	Ser	Arg	Arg	Leu	Pro	Lys	Gly	500	505	510	
Val	Lys	His	Leu	Lys	Asp	Phe	Pro	Ile	Leu	Pro	Gly	Glu	Ile	Phe	Lys	515	520	525	
Tyr	Lys	Trp	Thr	Val	Thr	Val	Glu	Asp	Gly	Pro	Thr	Lys	Ser	Asp	Pro	530	535	540	
Arg	Cys	Leu	Thr	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Phe	Val	Asn	Met	Glu	Arg	Asp	545	550	555	560
Leu	Ala	Ser	Gly	Leu	Ile	Gly	Pro	Leu	Leu	Ile	Cys	Tyr	Lys	Glu	Ser	565	570	575	
Val	Asp	Gln	Arg	Gly	Asn	Gln	Ile	Met	Ser	Asp	Lys	Arg	Asn	Val	Ile	580	585	590	
Leu	Phe	Ser	Val	Phe	Asp	Glu	Asn	Arg	Ser	Trp	Tyr	Leu	Thr	Glu	Asn	595	600	605	

RU 2 429 294 C2

Ile	Gln	Arg	Phe	Leu	Pro	Asn	Pro	Ala	Gly	Val	Gln	Leu	Glu	Asp	Pro
610						615					620				
Glu	Phe	Gln	Ala	Ser	Asn	Ile	Met	His	Ser	Ile	Asn	Gly	Tyr	Val	Phe
625					630					635					640
Asp	Ser	Leu	Gln	Leu	Ser	Val	Cys	Leu	His	Glu	Val	Ala	Tyr	Trp	Tyr
				645					650					655	
Ile	Leu	Ser	Ile	Gly	Ala	Gln	Thr	Asp	Phe	Leu	Ser	Val	Phe	Phe	Ser
			660					665					670		
Gly	Tyr	Thr	Phe	Lys	His	Lys	Met	Val	Tyr	Glu	Asp	Thr	Leu	Thr	Leu
		675					680					685			
Phe	Pro	Phe	Ser	Gly	Glu	Thr	Val	Phe	Met	Ser	Met	Glu	Asn	Pro	Gly
	690					695					700				
Leu	Trp	Ile	Leu	Gly	Cys	His	Asn	Ser	Asp	Phe	Arg	Asn	Arg	Gly	Met
705					710					715					720
Thr	Ala	Leu	Leu	Lys	Val	Ser	Ser	Cys	Asp	Lys	Asn	Thr	Gly	Asp	Tyr
				725					730					735	
Tyr	Glu	Asp	Ser	Tyr	Glu	Asp	Ile	Ser	Ala	Tyr	Leu	Leu	Ser	Lys	Asn
			740					745					750		
Asn	Ala	Ile	Glu	Pro	Arg	Ser	Phe	Ser	Gln	Asn	Pro	Pro	Val	Leu	Lys
		755					760					765			
Arg	His	Gln	Arg	Glu	Ile	Thr	Arg	Thr	Thr	Leu	Gln	Ser	Asp	Gln	Glu
		770				775					780				
Glu	Ile	Asp	Tyr	Asp	Asp	Thr	Ile	Ser	Val	Glu	Met	Lys	Lys	Glu	Asp
785					790					795					800
Phe	Asp	Ile	Tyr	Asp	Glu	Asp	Glu	Asn	Gln	Ser	Pro	Arg	Ser	Phe	Gln
				805					810					815	
Lys	Lys	Thr	Arg	His	Tyr	Phe	Ile	Ala	Ala	Val	Glu	Arg	Leu	Trp	Asp
			820					825					830		
Tyr	Gly	Met	Ser	Ser	Ser	Pro	His	Val	Leu	Arg	Asn	Arg	Ala	Gln	Ser
		835					840					845			
Gly	Ser	Val	Pro	Gln	Phe	Lys	Lys	Val	Val	Phe	Gln	Glu	Phe	Thr	Asp
		850				855					860				
Gly	Ser	Phe	Thr	Gln	Pro	Leu	Tyr	Arg	Gly	Glu	Leu	Asn	Glu	His	Leu
865					870					875					880
Gly	Leu	Leu	Gly	Pro	Tyr	Ile	Arg	Ala	Glu	Val	Glu	Asp	Asn	Ile	Met
				885					890					895	
Val	Thr	Phe	Arg	Asn	Gln	Ala	Ser	Arg	Pro	Tyr	Ser	Phe	Tyr	Ser	Ser
			900					905					910		

Leu	Ile	Ser	Tyr	Glu	Glu	Asp	Gln	Arg	Gln	Gly	Ala	Glu	Pro	Arg	Lys	915	920	925	
Asn	Phe	Val	Lys	Pro	Asn	Glu	Thr	Lys	Thr	Tyr	Phe	Trp	Lys	Val	Gln	930	935	940	
His	His	Met	Ala	Pro	Thr	Lys	Asp	Glu	Phe	Asp	Cys	Lys	Ala	Trp	Ala	945	950	955	960
Tyr	Phe	Ser	Asp	Val	Asp	Leu	Glu	Lys	Asp	Val	His	Ser	Gly	Leu	Ile	965	970	975	
Gly	Pro	Leu	Leu	Val	Cys	His	Thr	Asn	Thr	Leu	Asn	Pro	Ala	His	Gly	980	985	990	
Arg	Gln	Val	Thr	Val	Gln	Glu	Phe	Ala	Leu	Phe	Phe	Thr	Ile	Phe	Asp	995	1000	1005	
Glu	Thr	Lys	Ser	Trp	Tyr	Phe	Thr	Glu	Asn	Met	Glu	Arg	Asn	Cys		1010	1015	1020	
Arg	Ala	Pro	Cys	Asn	Ile	Gln	Met	Glu	Asp	Pro	Thr	Phe	Lys	Glu		1025	1030	1035	
Asn	Tyr	Arg	Phe	His	Ala	Ile	Asn	Gly	Tyr	Ile	Met	Asp	Thr	Leu		1040	1045	1050	
Pro	Gly	Leu	Val	Met	Ala	Gln	Asp	Gln	Arg	Ile	Arg	Trp	Tyr	Leu		1055	1060	1065	
Leu	Ser	Met	Gly	Ser	Asn	Glu	Asn	Ile	His	Ser	Ile	His	Phe	Ser		1070	1075	1080	
Gly	His	Val	Phe	Thr	Val	Arg	Lys	Lys	Glu	Glu	Tyr	Lys	Met	Ala		1085	1090	1095	
Leu	Tyr	Asn	Leu	Tyr	Pro	Gly	Val	Phe	Glu	Thr	Val	Glu	Met	Leu		1100	1105	1110	
Pro	Ser	Lys	Ala	Gly	Ile	Trp	Arg	Val	Glu	Cys	Leu	Ile	Gly	Glu		1115	1120	1125	
His	Leu	His	Ala	Gly	Met	Ser	Thr	Leu	Phe	Leu	Val	Tyr	Ser	Asn		1130	1135	1140	
Lys	Cys	Gln	Thr	Pro	Leu	Gly	Met	Ala	Ser	Gly	His	Ile	Arg	Asp		1145	1150	1155	
Phe	Gln	Ile	Thr	Ala	Ser	Gly	Gln	Tyr	Gly	Gln	Trp	Ala	Pro	Lys		1160	1165	1170	
Leu	Ala	Arg	Leu	His	Tyr	Ser	Gly	Ser	Ile	Asn	Ala	Trp	Ser	Thr		1175	1180	1185	
Lys	Glu	Pro	Phe	Ser	Trp	Ile	Lys	Val	Asp	Leu	Leu	Ala	Pro	Met		1190	1195	1200	

Ile	Ile	His	Gly	Ile	Lys	Thr	Gln	Gly	Ala	Arg	Gln	Lys	Phe	Ser
1205						1210					1215			
Ser	Leu	Tyr	Ile	Ser	Gln	Phe	Ile	Ile	Met	Tyr	Ser	Leu	Asp	Gly
1220						1225					1230			
Lys	Lys	Trp	Gln	Thr	Tyr	Arg	Gly	Asn	Ser	Thr	Gly	Thr	Leu	Met
1235						1240					1245			
Val	Phe	Phe	Gly	Asn	Val	Asp	Ser	Ser	Gly	Ile	Lys	His	Asn	Ile
1250						1255					1260			
Phe	Asn	Pro	Pro	Ile	Ile	Ala	Arg	Tyr	Ile	Arg	Leu	His	Pro	Thr
1265						1270					1275			
His	Tyr	Ser	Ile	Arg	Ser	Thr	Leu	Arg	Met	Glu	Leu	Met	Gly	Cys
1280						1285					1290			
Asp	Leu	Asn	Ser	Cys	Ser	Met	Pro	Leu	Gly	Met	Glu	Ser	Lys	Ala
1295						1300					1305			
Ile	Ser	Asp	Ala	Gln	Ile	Thr	Ala	Ser	Ser	Tyr	Phe	Thr	Asn	Met
1310						1315					1320			
Phe	Ala	Thr	Trp	Ser	Pro	Ser	Lys	Ala	Arg	Leu	His	Leu	Gln	Gly
1325						1330					1335			
Arg	Ser	Asn	Ala	Trp	Arg	Pro	Gln	Val	Asn	Asn	Pro	Lys	Glu	Trp
1340						1345					1350			
Leu	Gln	Val	Asp	Phe	Gln	Lys	Thr	Met	Lys	Val	Thr	Gly	Val	Thr
1355						1360					1365			
Thr	Gln	Gly	Val	Lys	Ser	Leu	Leu	Thr	Ser	Met	Tyr	Val	Lys	Glu
1370						1375					1380			
Phe	Leu	Ile	Ser	Ser	Ser	Gln	Asp	Gly	His	Gln	Trp	Thr	Leu	Phe
1385						1390					1395			
Phe	Gln	Asn	Gly	Lys	Val	Lys	Val	Phe	Gln	Gly	Asn	Gln	Asp	Ser
1400						1405					1410			
Phe	Thr	Pro	Val	Val	Asn	Ser	Leu	Asp	Pro	Pro	Leu	Leu	Thr	Arg
1415						1420					1425			
Tyr	Leu	Arg	Ile	His	Pro	Gln	Ser	Trp	Val	His	Gln	Ile	Ala	Leu
1430						1435					1440			
Arg	Met	Glu	Val	Leu	Gly	Cys	Glu	Ala	Gln	Asp	Leu	Tyr		
1445						1450					1455			

SEQ ID 2

ggccgcgaat	tcggcacgag	gtaaagtcc	ttaaaatgct	ctgcaaagaa	attgggactt	60
ttcattaaat	cagaaatfff	acttttttcc	cctcctggga	gctaaagata	ttttagagaa	120
gaattaacct	tttgcttctc	cagttgaaca	ttttagtagcaa	taagtcatgc	aaatagagct	180
ctccacctgc	ttcttttctgt	gcctttttgcg	attctgcttt	agtgccacca	gaagatacta	240
cctgggtgca	gtggaactgt	catgggacta	tatgcaaagt	gatctcgggtg	agctgcctgt	300
ggacgcaaga	tttctctcta	gagtgccaaa	atctttttcca	ttcaacacct	cagtcgtgta	360
caaaaagact	ctgttttag	aattcacgga	tcaccttttc	aacatcgtcta	agccaaggcc	420
accctggatg	ggtctgctag	gtcctaccat	ccaggctgag	gtttatgata	cagtggatcat	480
tacacttaag	aacatggctt	cccatctgt	cagtcctcat	gctgttggtg	tatcctactg	540
gaaagcttct	gagggagctg	aatatgatga	tcagaccagt	caaagggaga	aagaagatga	600
taaagtcttc	cctggtgga	gccatacata	tgtctggcag	gtcctgaaag	agaatggtcc	660
aatggcctct	gacctactgt	gccttaccta	ctcatatctt	tctcatgtgg	acctggtaaa	720
agacttgaat	tcaggcctca	ttggagccct	actagtatgt	agagaaggga	gtctggccaa	780
ggaaaagaca	cagaccttgc	acaaatttat	actacttttt	gctgtatttg	atgaagggaa	840
aagttggcac	tcagaaacaa	agaactcctt	gatgcaggat	agggatgctg	catctgctcg	900
ggcctggcct	aaaatgcaca	cagtcaatgg	ttatgtaaac	aggtctctgc	caggtctgat	960
tggatgccac	aggaaatcag	tctattggca	tgtgattgga	atgggcacca	ctcctgaagt	1020
gcactcaata	ttcctcgaag	gtcacacatt	tcttgtgagg	aacctcgc	aggcgtcctt	1080
ggaaatctcg	ccaataactt	tccttactgc	tcaaacactc	ttgatggacc	ttggacagtt	1140
tctactgttt	tgtcatatct	cttcccacca	acatgatggc	atggaagctt	atgtcaaagt	1200
agacagctgt	ccagaggaac	cccaactacg	aatgaaaaat	aatgaagaag	cggaagacta	1260
tgatgatgat	cttactgatt	ctgaaatgga	tgtggtcagg	tttgatgatg	acaactctcc	1320
ttccttttate	caaattcgct	cagttgcca	gaagcatcct	aaaacttggg	tacattacat	1380
tgtgctgaa	gaggaggact	gggactatgc	tcccttagtc	ctcgccccg	atgacagaag	1440
ttataaaaagt	caatatattga	acaatggccc	tcagcggatt	ggtagggaagt	acaaaaaagt	1500
ccgattttatg	gcatacacag	atgaaacctt	taagactcgt	gaagctattc	agcatgaatc	1560
aggaatcttg	ggacctttac	tttatgggga	agttggagac	acactgttga	ttatatattaa	1620
gaatcaagca	agcagaccat	ataacatcta	ccctcacgga	atcactgatg	tccgtccttt	1680
gtattcaagg	agattaccaa	aaggtgtaaa	acatttgaag	gatttttcaa	ttctgccagg	1740
agaaatatct	aaatataaat	ggacagtgc	tgtagaagat	gggccaacta	aatcagatcc	1800
tcgggtgcctg	acccgctatt	actctagttt	cgttaatatg	gagagagatc	tagcttcagg	1860
actcattggc	cctctcctca	tctgctacaa	agaatctgta	gatcaaagag	gaaaccagat	1920
aatgtcagac	aagaggaaatg	tcactcctgtt	ttctgtattt	gatgagaacc	gaagctggta	1980
cctcacagag	aatatacaac	gctttctccc	caatccagct	ggagtgcagc	ttgaggatcc	2040
agagttccaa	gcctccaaca	tcactgcacag	catcaatggc	tatgtttttg	atagtttgca	2100
gttgtcagtt	tgtttgcag	aggtggcata	ctggtacatt	ctaagcattg	gagcacagac	2160
tgacttcctt	tctgtcttct	tctctggata	taccttcaaa	cacaaaatgg	tctatgaaga	2220
cacactcacc	ctattcccat	tctcaggaga	aactgtcttc	atgtcgatgg	aaaaccacagg	2280
tctatggatt	ctggggtgcc	acaactcaga	ctttcggaac	agaggcatga	ccgccttact	2340
gaagggttct	agtgtgaca	agaacactgg	tgattattac	gaggacagtt	atgaagatat	2400
ttcagcatac	ttgctgagta	aaaacaatgc	cattgaacca	agaagcttct	cccaaaaccc	2460
accagtcttg	aaacgccatc	aacgggaaat	aactcgtact	actcttcagt	cagatcaaga	2520
ggaaattgac	tatgatgata	ccatatacagt	tgaaatgaag	aaggaagatt	ttgacattta	2580
tgatgaggat	gaaaatcaga	gccccgcag	ctttcaaaag	aaaacacgac	actattttat	2640
tgctgcagtg	gagaggctct	gggattatgg	gatgagtagc	tccccacatg	ttctaagaaa	2700
cagggctcag	agtggcagtg	tccctcagtt	caagaaagtt	gttttccagg	aattttactga	2760
tggctccttt	actcagccct	tataccgtgg	agaactaaat	gaacatttgg	gactcctggg	2820
gccatatata	agagcagaag	ttgaagataa	tatcatggta	actttcagaa	atcaggcctc	2880
tcgtccctat	tccttctatt	ctagccttat	ttcttatgag	gaagatcaga	ggcaaggagc	2940
agaacctaga	aaaaactttg	tcaagcctaa	tgaaaccaa	acttactttt	ggaaagtgc	3000
acatcatatg	gcacccacta	aagatgagtt	tgactgcaa	gcctgggctt	atttctctga	3060
tgttgacctg	gaaaaagatg	tgcactcagg	cctgattgga	cccttcttg	tctgccacac	3120
taacacactg	aaccctgctc	atgggagaca	agtgcagta	caggaatttg	ctctgttttt	3180
caccatcttt	gatgagacca	aaagctggta	cttactgaa	aatatggaaa	gaaactgcag	3240
ggctccctgc	aatatccaga	tggaagatcc	cacttttaaa	gagaattatc	gcttccatgc	3300
aatcaatggc	tacataatgg	atacactacc	tggcttagta	atggctcagg	atcaaaggat	3360

tcgatggtat	ctgctcagca	tgggcagcaa	tgaaaacatc	cattctattc	atttcagtgg	3420
acatgtgttc	actgtacgaa	aaaaagagga	gtataaaatg	gcactgtaca	atctctatcc	3480
aggtgttttt	gagacagtgg	aaatgttacc	atccaaagct	ggaatttggc	gggtggaatg	3540
ccttattggc	gagcatctac	atgctgggat	gagcacactt	tttctggtgt	acagcaataa	3600
gtgtcagact	cccctgggaa	tggcttcttg	acacattaga	gattttcaga	ttacagcttc	3660
aggacaatat	ggacagtggg	ccccaaagct	ggccagactt	cattattccg	gatcaatcaa	3720
tgcctggagc	accaaggagc	ccttttcttg	gatcaagggtg	gatctgttgg	caccaatgat	3780
tattcacggc	atcaagacct	agggtgcccc	tcagaagttc	tccagcctct	acatctctca	3840
gtttatcatc	atgtatagtc	ttgatgggaa	gaagtggcag	acttatcgag	gaaattccac	3900
tggaaacctta	atggctcttct	ttggcaatgt	ggattcatct	gggataaaac	acaatatttt	3960
taacctctca	attattgtct	gatacatccg	tttgacacca	actcattata	gcattcgcag	4020
cactcttcgc	atggagttga	tgggctgtga	tttaaatagt	tgcagcatgc	cattgggaat	4080
ggagagtaaa	gcaatatcag	atgcacagat	tactgcttca	tcctacttta	ccaatatgtt	4140
tgccacctgg	tctccttcaa	aagctcgact	tcacctccaa	gggaggagta	atgcctggag	4200
acctcaggtg	aataatccaa	aagagtggct	gcaagtggac	ttccagaaga	caatgaaagt	4260
cacaggagta	actactcagg	gagtaaaatc	tctgcttacc	agcatgtatg	tgaaggagtt	4320
cctcatctcc	agcagtcaag	atggccatca	gtggactctc	ttttttcaga	atggc aaagt	4380
aaaggttttt	cagggaaatc	aagactcctt	cacacctgtg	gtgaactctc	tagaccacc	4440
gttactgact	cgctaccttc	gaattcacc	ccagagttgg	gtgcaccaga	ttgccttgag	4500
gatggaggtt	ctgggctgcg	aggcacagga	cctctactga	gggtggccac	tgcagcacct	4560
gccactggcg	tcacctctcc	ctcctcagct	ccagggcagt	gtccctccct	ggcttgccct	4620
ctacctttgt	gctaatacct	agcagacact	gccttgaagc	ctcctgaatt	aactatcatc	4680
agtcctgcat	ttctttgggtg	gggggcccag	agggtgcata	caatttaact	taactcttac	4740
ctattttctg	cagctgctcc	cagattactc	cttccttcca	atataactag	gcaaaaagaa	4800
gtgaggagaa	acctgcatga	aagcattctt	ccctgaaaag	ttaggcctct	cagagtcacc	4860
acttctctctg	ttgtagaaaa	actatgtgat	gaaactttga	aaaagatatt	tatgatgtta	4920
acatttcagg	ttaagcctca	tacgttttaa	ataaaactct	cagttgttta	ttatcctgat	4980
caagcatgga	acaaagcatg	tttcaggatc	agatcaatac	aatcttggag	tcaaaaggca	5040
aatcatttgg	acaatctgca	aaatggagag	aatacaataa	ctactacagt	aaagtctgtt	5100
tctgcttctc	tacacataga	tataattatg	ttatttagtc	attatgaggg	gcacattctt	5160
atctccaaaa	ctagcattct	taaactgaga	attatagatg	gggttcaaga	atccctaagt	5220
cccctgaaat	tatataaggc	attctgtata	aatgcaaatg	tgcatttttc	tgacgagtgt	5280
ccatagatat	aaagccattt	ggtcttaatt	ctgaccaata	aaaaaataag	tcaggaggat	5340
gcaattgtttg	aaagctttga	aataaaaataa	caatgtcttc	ttgaaatttg	tgatggccaa	5400
gaaagaaaaat	gatgatgaca	ttaggcttct	aaaggacata	cattttaatat	ttctgtggaa	5460
atatgaggaa	aatccatggt	tatctgagat	aggagataca	aactttgtaa	ttctaataat	5520
gcactcagtt	tactctctcc	ctctactaat	ttcctgctga	aaataacaca	acaaaaatgt	5580
aacaggggaa	attatatacc	gtgactgaaa	actagagtcc	tacttacata	gttgaaatat	5640
caaggagggtc	agaagaaaat	tggactgggtg	aaaacagaaa	aaacactcca	gtctgccata	5700
tcaccacaca	ataggatccc	ccttcttgcc	ctccaccccc	ataagattgt	gaagggttta	5760
ctgctccttc	catctgcctg	acccttccac	tatgactaca	cagaatctcc	tgatagtata	5820
gggggctgga	ggcaaggata	agttatagag	cagttggagg	aagcatccaa	agattgcaac	5880
ccagggcaaa	tggaaaacag	gagatcctaa	tatgaaagaa	aaatggatcc	caatctgaga	5940
aaaggcaaaa	gaatggctac	ttttttctat	gctggagtat	tttctaataa	tcctgcttga	6000
cccttatctg	acctcttttg	aaactataac	atagctgtca	cagtatagtc	acaatccaca	6060
aatgatgcag	gtgcaaatgg	tttatagccc	tgtgaagttc	ttaaagttta	gaggctaact	6120
tacagaaatg	aataagttgt	tttgttttat	agcccggtag	aggagttaac	cccaaagggtg	6180
atatggtttt	atttctgttt	atgttttaact	tgataatctt	atthttggcat	tcttttccca	6240
ttgactatat	acatctctat	ttctcaaatg	ttcatggaac	tagctctttt	atthttctgc	6300
tggtttcttc	agtaatgagt	taaataaaac	attgacacat	acagtcgact	ctagattgc	6359