



(11) (21) (C) **2,002,540**
(22) 1989/11/08
(43) 1990/05/09
(45) 2000/04/04

(72) Meulien, Pierre, FR

(73) Transgene S.A., FR

(51) Int.Cl.⁵ C12N 15/57, C12N 15/86, C12N 9/64, C12N 5/10

(30) 1988/11/09 (88 14635) FR

(54) **SEQUENCE D'ADN CODANT POUR LE FACTEUR IX HUMAIN
OU UNE PROTEINE ANALOGUE, VECTEUR D'EXPRESSION,
CELLULES TRANSFORMEES PROCEDE DE PREPARATION
DU FACTEUR IX ET PRODUITS OBTENUS
CORRESPONDANTS**

(54) **DNA SEQUENCE CODING FOR THE HUMAN IX FACTOR OR A
SIMILAR PROTEIN, EXPRESSION VECTOR,
TRANSFORMED CELLS, PROCESS FOR THE
PREPARATION OF IX FACTOR AND PRODUCTS OBTAINED**

(57) La présente invention concerne une nouvelle séquence d'ADN codant pour le facteur IX ou une protéine analogue, correspondant à une proséquence et au facteur IX ou à la protéine analogue mature. Selon l'invention, la position (-3) dans la proséquence est occupée par un codon codant pour la valine, l'arginine, la lysine, la thréonine ou la sérine et/ou le premier codon de la séquence codant pour la protéine mature code pour une alanine. Application à l'expression de facteur IX actif dans des cellules de mammifères.



2002540

BREVET D'INVENTION

SEQUENCE D'ADN CODANT POUR LE FACTEUR IX HUMAIN OU UNE PROTEINE ANALOGUE,
VECTEUR D'EXPRESSION, CELLULES TRANSFORMEES, PROCEDE DE PREPARATION DU
FACTEUR IX ET PRODUITS OBTENUS CORRESPONDANTS

Invention de : Pierre MEULIEN

Déposant : TRANSGENE S.A.

ABREGE DESCRIPTIF

La présente invention concerne une nouvelle séquence d'ADN codant pour le facteur IX ou une protéine analogue, correspondant à une proséquence et au facteur IX ou à la protéine analogue mature. Selon l'invention, la position (-3) dans la proséquence est occupée par un codon codant pour la valine, l'arginine, la lysine, la thréonine ou la sérine et/ou le premier codon de la séquence codant pour la protéine mature code pour une alanine.

Application à l'expression de facteur IX actif dans des cellules de mammifères.

**SEQUENCE D'ADN CODANT POUR LE FACTEUR IX HUMAIN OU UNE PROTEINE ANALOGUE,
VECTEUR D'EXPRESSION, CELLULES TRANSFORMEES, PROCEDE DE PREPARATION DU
FACTEUR IX ET PRODUITS OBTENUS CORRESPONDANTS**

La présente invention concerne une nouvelle séquence d'ADN codant pour le facteur IX humain ou une protéine analogue, utilisable pour son expression dans une cellule hôte, en particulier une cellule de vertébrés, notamment de mammifères.

5

Le Facteur IX est une protéine dépendante de la vitamine K, qui intervient au cours de la coagulation du sang. Il est synthétisé sous forme d'un zymogène et subit trois types de modifications post-traductionnelles avant d'être secrété dans le sang : la
10 conversion des acides glutamiques en acides carboxyglutamiques, dépendant de la vitamine K, l'addition de chaînes hydrocarbonées et la B hydroxylation d'un acide aspartique. C'est le foie qui chez l'homme est le site de synthèse du facteur IX. Cette protéine intervient au cours du cycle de la coagulation du sang et est
15 utilisée pour le traitement des hémophiles B. A l'heure actuelle, la seule source commercialement disponible de facteur IX est le plasma humain.

Toutefois, les préparations de facteur IX obtenues par extraction
20 à partir du plasma peuvent être pyrogènes et comportent également des risques de contamination par des agents pathogènes ou des virus notamment le virus de l'hépatite ou les agents vecteurs du Sida.

C'est pourquoi il est particulièrement intéressant de développer
25 des moyens de préparation du facteur IX avec une très haute pureté et ne mettant pas en jeu l'extraction à partir du plasma humain ou animal.

Depuis quelques années, des tentatives ont donc été faites pour préparer du facteur IX en utilisant les techniques de l'ADN recombinant.

5

En particulier, la Demanderesse a décrit dans des demandes de brevet antérieures, les publications européennes de brevet EP 0167420, EP 0162782 et EP 0251874, des procédés permettant de transformer des cellules hôtes afin de les rendre capables de
10 produire le Facteur IX.

Parmi toutes les cellules hôtes envisagées, les cellules de mammifères ont donné les résultats les plus intéressants, conformément à ce qu'on pouvait attendre des résultats déjà obtenus
15 pour l'expression d'autres protéines dépendantes de la vitamine K. Par exemple, l'expression du facteur VII ou de la protéine C dans des cellules de mammifères a été un succès, conduisant à l'obtention de protéines parfaitement actives. (Berkner K. et al Cold Spring Harbor: Symposia on quantitative Biology vol LI 1986)

20

On a toutefois rapidement constaté la spécificité du facteur IX et la difficulté à obtenir un produit à la fois actif et avec un rendement suffisant pour envisager un développement industriel à un coût qui ne soit pas dissuasif.

25

Une publication récente (Rees DJG et al, Embo J. ; 1988 7, 2053) décrit ainsi l'obtention de facteur IX très actif à partir de cellules de reins de chiens (MDCK), mais le niveau d'expression est extrêmement bas, de l'ordre de 0.2 à 0.3 ug / 10⁶ cellules / 24
30 heures. On a pu constater qu'à ces faibles niveaux d'expression, la réaction de carboxylation, indispensable pour conférer son activité au facteur IX, n'est pas saturée, ce qui explique la très grande activité spécifique observée.

On connaît par ailleurs bien la structure du produit primaire de traduction du cDNA du facteur IX et on peut la décomposer en 3 domaines : à l'extrémité N-terminale se trouve une séquence signal de 28 acides aminés qui est clivée lorsque le produit de traduction
5 primaire traverse la membrane du réticulum endoplasmique. Ensuite se trouve une proséquence de 18 acides aminés qui dirige la carboxylation des 12 acides glutamiques, puis la séquence codant pour le facteur IX mature. Des travaux récents ont démontré que deux
10 éléments étaient essentiels pour conférer au facteur IX son activité biologique : d'une part, la carboxylation dépendante de la vitamine K, d'autre part, le clivage de la proséquence lorsque le facteur IX est secrété hors de la cellule.

La présente invention, compte tenu des données scientifiques
15 récentes sur les mécanismes de maturation du facteur IX dans les cellules du foie, vise donc à résoudre les problèmes rencontrés dans les précédentes tentatives de préparation du facteur IX par génie génétique et en particulier, à fournir des moyens de préparer, à un niveau d'expression compatible avec une exploitation
20 industrielle, du facteur IX humain, ou une protéine analogue qui soit biologiquement actif.

La présente invention concerne une séquence d'ADN codant pour le facteur IX humain ou une protéine analogue, comprenant au moins deux
25 parties, l'une codant pour une proséquence et l'autre pour le facteur IX mature ou la protéine analogue mature, caractérisé en ce que dans la partie codant pour la proséquence, le codon (-3) code pour la valine, l'arginine, la lysine, la thréonine ou la sérine.

30 Dans un premier aspect l'invention fournit un analogue du facteur IX humain de formule $(Ala)_1FIX$ présentant une alanine à son extrémité N-terminale en remplacement de la tyrosine qui se trouve normalement à l'extrémité N-terminale du facteur IX humain dont la séquence est donnée figure 1.

Dans la suite de la description, les codons numérotés négativement correspondent à la proséquence et le premier codon codant pour un acide aminé du facteur IX mature est désigné par +1.

En particulier, la structure préférée au voisinage du codon (-3) correspond à la séquence suivante d'acides aminés :

- X - Lys - Arg -
5 (-3) (-2) (-1)

où X est choisi parmi Val, Arg, Lys, Thr et Ser

De façon générale, on entendra désigner par "protéine analogue au facteur IX humain" dans la description une protéine de structure
10 analogue tout en ayant le même type d'activité biologique in vivo, c'est à dire par exemple, une protéine ayant la même structure primaire que le facteur IX avec éventuellement quelques modifications au niveau d'un nombre réduit d'acides aminés, ou encore une protéine
ne présentant pas exactement les mêmes modifications
15 post-traductionnelles que le facteur IX ou bien le même type de protéine comportant des délétions dans les parties non essentielles.

L'invention a notamment pour objet une nouvelle séquence d'ADN codant pour le facteur IX humain ou une protéine analogue telle que
20 décrite précédemment, caractérisée en ce que par rapport à la séquence de nucléotides du cADN du facteur IX représentée à la figure 1, elle comporte la mutation d'au moins un nucléotide de sorte que dans la séquence d'acides aminés correspondante la proline (-3) est changée en valine, arginine, lysine, thréonine ou sérine dans la
25 proséquence.

Cette séquence d'ADN est utile pour l'expression du facteur IX ou de la protéine analogue dans une cellule hôte. Pour les raisons indiquées précédemment, les cellules hôtes préférées sont les
30 cellules de vertébrés, et notamment les cellules de mammifères.

Le produit primaire de traduction du cDNA du facteur IX comporte en fait 3 domaines comme indiqué précédemment. La séquence d'ADN selon l'invention comporte de préférence également une partie codant pour une séquence signal dont la présence peut favoriser l'expression du facteur IX. Il n'est toutefois pas indispensable que cette partie corresponde à la séquence signal naturelle du facteur IX. On peut éventuellement la remplacer par la séquence signal d'autres protéines vitamine K dépendantes, comme le facteur VII ou la protéine C.

10

Plus précisément la séquence selon l'invention comporte, à la place du codon CCA codant pour la proline en position (-3) les codons GTG ou GTA codant pour la valine.

15 Selon un autre aspect, l'invention a pour objet de nouveaux analogues du facteur IX ainsi qu'une nouvelle séquence d'ADN codant pour ces nouveaux analogues. Il s'agit des analogues (Ala¹) FIX dans lequel FIX représente le facteur IX naturel ou recombinant ou une protéine analogue tel que défini précédemment.

20

De même, l'invention concerne la séquence d'ADN codant pour ces nouveaux analogues, caractérisé en ce que l'extrémité 5' de la séquence en cause code pour l'alanine. En particulier, il s'agit d'une séquence d'ADN caractérisée en ce que par rapport à la séquence de nucléotides du cADN du facteur IX représenté à la figure 1, elle comporte la mutation d'au moins un nucléotide de sorte que dans la séquence d'acides aminés correspondante la tyrosine (+1) est changée en alanine.

25

30 Plus précisément, la séquence selon l'invention comporte, à la place du codon TAT codant pour la tyrosine en position (+1) les codons GCC ou GCT codant pour l'alanine.

Enfin, sous un troisième aspect, l'invention a pour objet une séquence d'ADN codant pour le facteur IX humain ou une protéine analogue, où le codon (+1) code pour l'alanine, et le codon (-3) code pour la valine, l'arginine, la lysine, la thréonine ou la sérine.

5

Ainsi, de préférence, la séquence d'ADN comporte une séquence codant pour :

- X - Lys - Arg - Ala -

10 (-3) (-2) (-1) (+1)

où X est choisi parmi Val, Arg, Lys, Thr, Ser.

En particulier, l'invention a pour objet une nouvelle séquence d'ADN codant pour le facteur IX humain ou une protéine analogue, caractérisé en ce que par rapport à la séquence de nucléotides représentée à la figure 1, elle comporte des mutations de sorte que dans la proséquence correspondante la proline (-3) est changée en valine, arginine, lysine, thréonine ou sérine, et dans la séquence codant pour le facteur IX ou la protéine analogue mature, la tyrosine (+1) est changée en alanine.

20

Le procédé permettant la préparation d'un clone porteur du gène du facteur IX ne sera pas redécrit en détail ; on pourra se reporter aux publications de brevets déjà mentionnées.

25

L'invention a également pour objet un vecteur d'expression du facteur IX ou d'une protéine analogue dans une cellule hôte, ce vecteur comportant au moins la séquence d'ADN selon l'invention et les éléments assurant l'expresssion de ladite séquence dans ladite cellule.

30

Parmi les vecteurs utilisables, on peut citer les virus de la famille des Poxvirus, en particulier le virus de la vaccine ou le virus du Cowpox, ou encore des vecteurs plasmidiques, en particulier des vecteurs intégratifs. Les différentes alternatives ont été
5 décrite en détail dans 10 des demandes de brevet citées, en particulier EP0162782 et EP0251874.

Les cellules hôtes peuvent être variées tout en étant adaptées au vecteur mis en oeuvre, notamment suivant qu'il s'agit d'un vecteur
10 viral ou d'un vecteur plasmidique. On utilise plus particulièrement les cellules de mammifères, et notamment les cellules de reins telles que les cellules VERO ou les cellules BHK 21. Pour infecter les cellules CHO, on utilise un vecteur dérivé du virus du Cowpox.

20 Les cellules sont cultivées sur un milieu approprié assurant leur croissance. Après transformation ou infection, les cellules ou les milieux de culture sont récoltés et la protéine du facteur IX ou son analogue actif peut être isolée par des techniques connues de purification des protéines.

25 Dans la plupart des cas, il est important que la mise en culture se fasse sur un milieu comportant de la vitamine K, dont la quantité peut varier en fonction des cultures cellulaires, mais sera de préférence en quantité assurant la saturation du milieu, par exemple
30 entre 5 et 50 ug/ml de milieu de culture et en général sera de l'ordre de 10 ug/ml.

La présente invention concerne pour finir le facteur IX obtenu par la mise en oeuvre du procédé décrit. En particulier, elle a pour
35 objet l'analogue du Facteur IX humain caractérisé en ce que la tyrosine (+1) est changée en alanine.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront
40 au cours de la description ci-après, illustrée par les figures 1 et 2, parmi lesquelles :

- la figure 1 représente la séquence de nucléotides du Facteur IX humain et la séquence d'acides aminés correspondante
- la figure 2 représente schématiquement les différents domaines de la structure du produit primaire de traduction du cDNA de la figure 1.

Exemple 1 : Construction des cDNA du Facteur IX

10 Le cDNA du Facteur IX a été cloné sous forme d'un fragment Bam HI dans le plasmide pTG 381. La construction pTG 381 a été réalisée pour rendre plus conforme l'extrémité 5' non codante aux règles de Kozak. La construction du plasmide pTG 381 est indiquée dans la publication de brevet EP-A-0251874 déjà citée. Le fragment Bam HI est recloné
15 dans le phage M13TG127, qui est identique au phage M13TG131 décrit dans Kieny et al 1983 gene, sauf que les sites de restriction dans le polylinker sont Bgl II, Pst I, Hind III, SmaI, Bam HI et EcoRI. La nouvelle construction dans laquelle l'extrémité 5' du cDNA du Facteur IX est adjacente au site Sma I est appelée M13TG1938.

20

A partir du phage M13TG1938, on prépare l'ADN simple brin et on fait les mutations sur l'ADNc du Facteur IX en utilisant la technique bien connue de mutagenèse par site dirigé (Zoller et Smith).

- 25 a) construction de l'ADNc correspondant à une séquence d'acides aminés dans laquelle la proline (-3) est changée en valine.

On utilise un oligonucléotide de synthèse désigné par TG1771 :
5'-ATACTCCTCACCCGATTCAG-3'.

30

Cet oligonucléotide est rapidement hybridé au fragment d'ADN simple brin à 50°C pendant 30 minutes. On prépare alors la molécule double brin en traitant le mélange hybridé avec le fragment Klenow de
35 polymérase en présence de déoxynucléotide triphosphate. Après transformation, les molécules ayant effectivement subi les mutations souhaitées sont identifiées par hybridation en utilisant comme sonde l'oligonucléotide TG1771 marqué radioactivement.

Pour vérifier que les mutations souhaitées ont bien été introduites, on détermine la séquence d'ADN de l'extrémité 5' du nouveau cDNA du Facteur IX. Le codon CCA codant par la proline est remplacé par le codon GTG codant pour la valine.

5

b) Construction de l'ADNc correspondant à une séquence d'acides aminés dans laquelle la tyrosine (+1) est changée en alanine.

10 On utilise un oligonucléotide de synthèse désigné par TG1770 :
5'-CTGAATTAGCCCTCTTTACCCGATTC-3'.

Dans ce cas, le codon TAT codant pour la tyrosine est remplacé par le codon GCC codant pour l'alanine. Les conditions sont
15 identiques à celle décrites en a).

c) Construction de l'ADNc correspondant à une séquence d'acides aminés dans laquelle la tyrosine (+1) est changée en alanine et la proline (-3) est changée en valine.

20

On utilise un oligonucléotide de synthèse désigné par TG1327 :
5'-CTGAATTAGCCCTCTTACCCGATTC-3'.

25 Le codon CCA codant pour la proline (-3) est remplacé par le codon GTA codant pour la valine, et le codon TAT codant pour la tyrosine (+1) est remplacé par le codon GCT codant pour l'alanine.

Exemple 2 : obtention des virus de la vaccine recombinants et
infection des cellules BHK21

Les nouveaux cDNA ainsi préparés sont excisés du vecteur M13 en
5 utilisant l'enzyme de restriction Bam HI, les fragments sont isolés
par électrophorèse sur gel d'agarose et insérés dans le vecteur
plasmidique pTG186 poly, digéré par Bam HI. Le pTG186 poly est un
dérivé du pTG186, dont la construction est décrite dans la
publication de brevet EP0162782 déjà citée, qui contient en outre le
10 fragment BglII-EcoRI du polylinker du phage M13TG131 déjà cité.

Les trois plasmides obtenus :

pTG 3533 correspondant à FIX - 3 val/+1 ala (oligonucléotide TG 1327)
15 pTG 3536 correspondant à FIX - 3 val (oligonucléotide TG 1771)
pTG 3537 correspondant à FIX +1 ala (oligonucléotide TG 1770)
sont respectivement insérés dans le génome du virus de la vaccine,
dans les conditions décrites dans la publication de brevet
EP-0162782.

20

Les virus de la vaccine recombinants, où les séquences codant pour
le facteur IX sont sous le contrôle du promoteur 7.5 K de la vaccine,
sont sélectionnés pour le phénotype TK⁻ en utilisant le 5 bromo
deoxyuridine.

25

Les cellules sont mises en culture dans le milieu MEM Glasgow
supplémenté avec 5 % de sérum de veau foetal inactivé par chauffage à
56°C pendant 30 minutes, en présence de 10 ug/ml de vitamine K.
L'infection avec les virus recombinants est effectuée à un taux
30 d'infection de 1 pfu. Les cellules sont lavées 3 fois avec le milieu
seul puis mises en présence de milieu complet. 24 heures après, on
teste dans les surnageants de culture la présence du facteur IX de
deux façons :

35 - la quantité d'antigène Facteur IX est estimée avec un test
Elisa (commercialisé par Diagnostica Stago).

- l'activité du Facteur IX est calculée en mesurant le temps de coagulation d'un plasma d'hémophile supplémenté avec les extraits (kit commercialisé par Stago).

5 Les résultats sont fournis dans le tableau joint. La quantité d'antigène Facteur IX est exprimée en ug par ml d'échantillon.

L'activité est exprimée sous forme d'activité spécifique. Pour cela la mesure de l'activité est comparée à celle obtenue en
10 utilisant un mélange de plasmas humain normaux.

L'exemple comparatif indiqué dans le tableau est le virus recombinant VVTG CII dont la construction a été décrite dans la publication de brevet EP-A-0162782, pour l'expression du cDNA du
15 Facteur IX.

On constate que pour un niveau d'expression comparable, l'activité spécifique est fortement augmentée, en particulier avec les virus de la vaccine recombinants VVTG 3533 et VVTG 3537. Le virus VVTG 3537
20 est particulièrement avantageux puisque l'activité du Facteur IX produit est pratiquement 100 %. Le témoin est un plasma normal, actif à 100 % pour 5 ug/ml de FIX.

Les souches suivantes ont été déposées le 8 novembre 1988 à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur (Paris) :

- E. coli pTG3537 sous le n° I-810
- E. coli pTG3536 sous le n° I-811
- E. coli pTG3533 sous le n° I-812

TABLEAU

QUANTITE DE FACTEUR IX DETECTE DANS LES CELLULES BHK 21
INFECTEES PAR LES VIRUS DE LA VACCINE RECOMBINANTS

Virus de la vaccine recombinant	FIX Ag (ug/ml)	activité spécifique (%) FIX activité / FIX Ag	Molécule obtenue
VV TG C II	2.5	45 - 55	F IX naturel
VV TG 3536	2.0	50 - 55	F IX naturel
VV TG 3533	1.9	70-85	(A1a ¹) FIX
VV TG 3537	2.3	80-100	(A1a ¹) FIX

REVENDEICATIONS:

1. Analogue du facteur IX humain de formule $(Ala)_1FIX$ présentant une alanine à son extrémité N - terminale en remplacement de la tyrosine qui se trouve normalement à l'extrémité N - terminale du facteur IX humain dont la séquence est donnée à la figure 1.
2. Fragment d'ADN comprenant une séquence codant pour l'analogue du facteur IX humain de la revendication 1.
3. Fragment d'ADN selon la revendication 2, comprenant au moins deux parties:
- la première codant pour une proséquence dont le codon en position (-3) code pour la valine, l'arginine, la lysine, la thréonine ou la sérine,
 - la seconde comprenant une séquence codant pour l'analogue du facteur IX humain de la revendication 1.
4. Fragment d'ADN selon la revendication 3 comprenant une séquence codant pour:
- X - Lys - Arg - Ala -
(-3) (-2) (-1) (1)
- X étant choisi parmi Val, Arg, Lys, Thr, Ser.
5. Fragment d'ADN selon l'une des revendications 3 à 4, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une troisième partie comprenant une séquence codant pour un peptide signal.
6. Fragment d'ADN selon la revendication 5, caractérisé en ce que le peptide signal est le peptide signal naturel du facteur IX.
7. Fragment d'ADN selon la revendication 5, caractérisé en ce que le peptide signal est un peptide signal vitamine K dépendant.

8. Vecteur d'expression, caractérisé en ce qu'il comprend un fragment d'ADN selon les revendications 2 à 7, et les éléments assurant l'expression dudit fragment.
- 5 9. Vecteur selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il est constitué du génome d'un virus de la famille des Poxvirus.
10. Vecteur selon la revendication 9, caractérisé en ce que le Poxvirus est choisi parmi le virus de la Vaccine et le virus Cowpox.
11. Vecteur selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un plasmide, éventuellement intégratif.
- 10 12. Cellule hôte transformée par un vecteur selon l'une des revendications 8 à 11.
13. Cellule selon la revendication 12, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule de mammifère.
- 15 14. Cellule selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi les cellules des lignées VERO, BHK, CHO et les sous classes de ces lignées.
15. Procédé de préparation de l'analogue selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'on cultive une cellule selon l'une des revendications 12 à 14 et on récupère l'analogue ainsi formé.
- 20 16. Procédé de préparation selon la revendication 15, caractérisé en ce que l'on cultive les cellules sur un milieu comportant de la vitamine K.

FIG. 1

-46

TATGCAGCGCGTGAACATGATCATGGCAGAATCACCAGGCCTCATCACCATCTGCCTTTT
 m q r v n m i m a e s p g l i t i c l l

AGGATATCTACTCAGTGCTGAATGTACAGTTTTTCTTGATCATGAAAACGCCAACAAAAT
 g y l l s a e c t v f l d h e n a n k i

TCTGAATCGGCCAAAGAGGTATAATTCAGGTAAATTGGAAGAGTTTGTTC AAGGGAACCT
 l n r p k r y n s g k l e e f v q g n l

TGAGAGAGAATGTATGGAAGAAAAGTGTAGTTTTGAAGAAGCACGAGAAGTTTTTGAAAA
 e r e c m e e k c s f e e a r e v f e n

CACTGAAAGAACA ACTGAATTTTGAAGCAGTATGTTGATGGAGATCAGTGTGAGTCCAA
 t e r t t e f w k q y v d g d q c e s n

TCCATGTTTAAATGGCGGCAGTTGCAAGGATGACATTAATTCCTATGAATGTTGGTGTCC
 p c l n g g s c k d d i n s y e c w c p

CTTTGGATTTGAAGGAAAGA ACTGTGAATTAGATGTAACATGTAACATTAAGAATGGCAG
 f g f e g k n c e l d v t c n i k n g r

ATGCCGAGCAGTTTTGTAAAAATAGTGCTGATAACAAGGTGGTTTTGCTCCTGTACTGAGGG
 c e q f c k n s a d n k v v c s c t e g

ATATCGACTTGCAGAAAACCAGAAGTCCTGTGAACCAGCAGTGCCATTTCCATGTGGAAG
 y r l a e n q k s c e p a v p f p c g r

AGTTTCTGTTTCACAAACTTCTAAGCTCACCCGTGCTGAGACTGTTTTTCTGATGTGGA
 v s v s q t s k l t r a e t v f p d v d

CTATGTAAATTCTACTGAAGCTGAAACCATTTTGGATAACATCACTCAAAGCACCCAATC
 y v n s t e a e t i l d n i t q s t q s

ATTTAATGACTTCACTCGGGTTGTTGGTGGAGAAGATGCCAAACCAGGTCAATTCCCTTG
 f n d f t r v v g g e d a k p g q f p w

GCAGGTTGTTTTGAATGGTAAAGTTGATGCATTCTGTGGAGGCTCTATCGTTAATGAAAA
 q v v l n g k v d a f c g g s i v n e k

2002540

ATGGATTGTAAGTCTGCTGCCCCTGTGTTGAACTGGTGTAAAATTACAGTTGTCGCAGG
w i v t a a h c v e t g v k i t v v a g

TGAACATAATATTGAGGAGACAGAACATACAGAGCAAAGCGAAATGTGATTCTGAATTAT
e h n i e e t e h t e q k r n v i r i i

TCCTCACCACAAGTACAATGCAGCTATTAATAAGTACAACCATGACATTGCCCTTCTGGA
p h h n y n a a i n k y n h d i a l l e

ACTGGACGAACCCTTAGTGCTAAACAGCTACGTTACACCTATTTGCATTGCTGACAAGGA
l d e p l v l n s y v t p i c i a d k e

ATACACGAACATCTTCCTCAAATTTGGATCTGGCTATGTAAGTGGCTGGGGAAGAGTCTT
y t n i f l k f g s g y v s g w g r v f

CCACAAAGGGAGATCAGCTTTAGTTCTTCAGTACCTTAGAGTTCCACTTGTGACCGAGC
h k g r s a l v l q y l r v p l v d r a

CACATGTCTTCGATCTACAAAGTTCACCATCTATAACAACATGTTCTGTGCTGGCTTCCA
t c l r s t k f t i y n n m f c a g f h

TGAAGGAGGTAGAGATTCATGTCAAGGAGATAGTGGGGGACCCCATGTTACTGAAGTGA
e g g r d s c q g d s g g p h v t e v e

AGGGACCAGTTTCTTAACTGGAATTATTAGCTGGGGTGAAGAGTGTGCAATGAAAGGCAA
g t s f l t g i i s w g e e c a m k g k

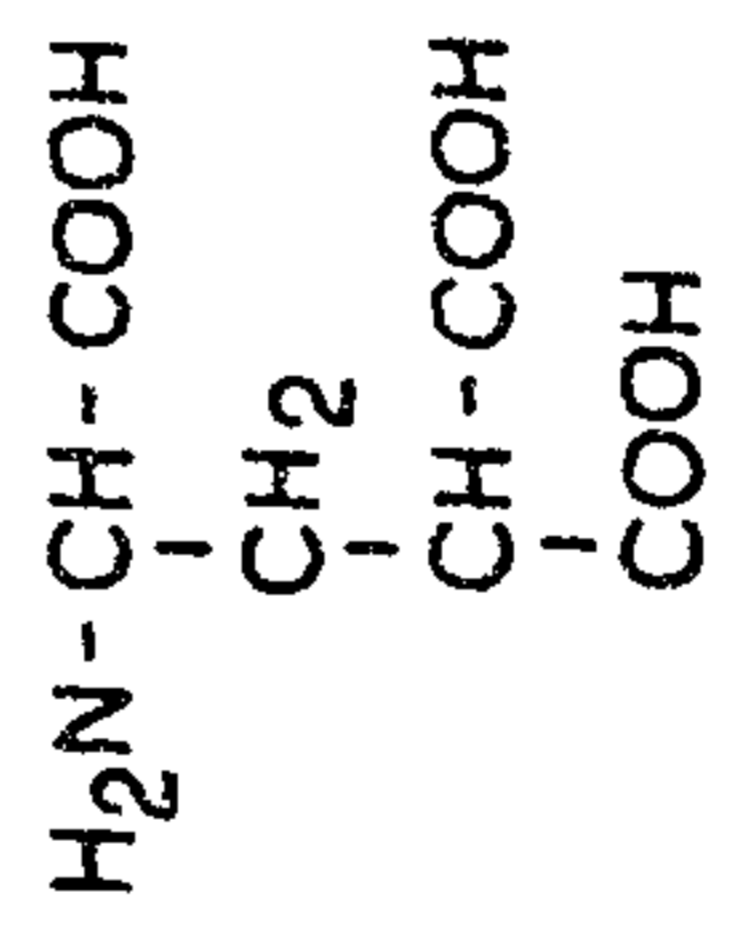
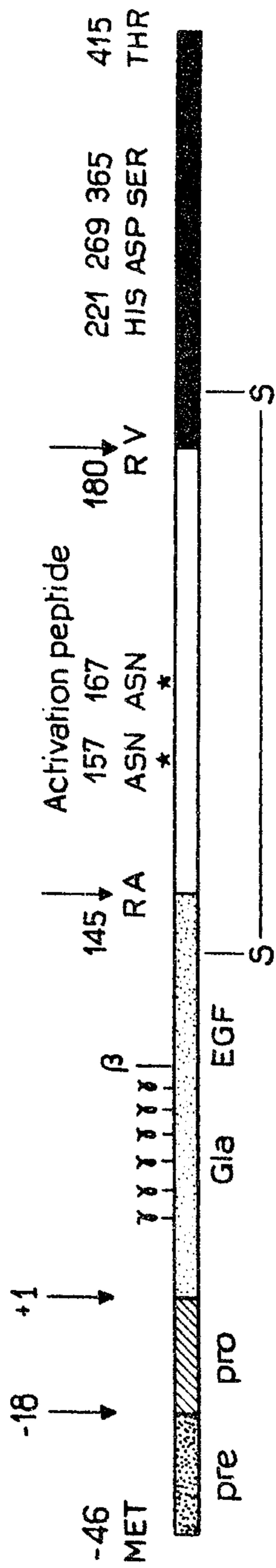
ATATGGAATATATACCAAGGTATCCCGGTATGTCAACTGGATTAAGGAAAAACAAGCT
y g i y t k v s r y v n w i k e k t k l

CACTTAATG

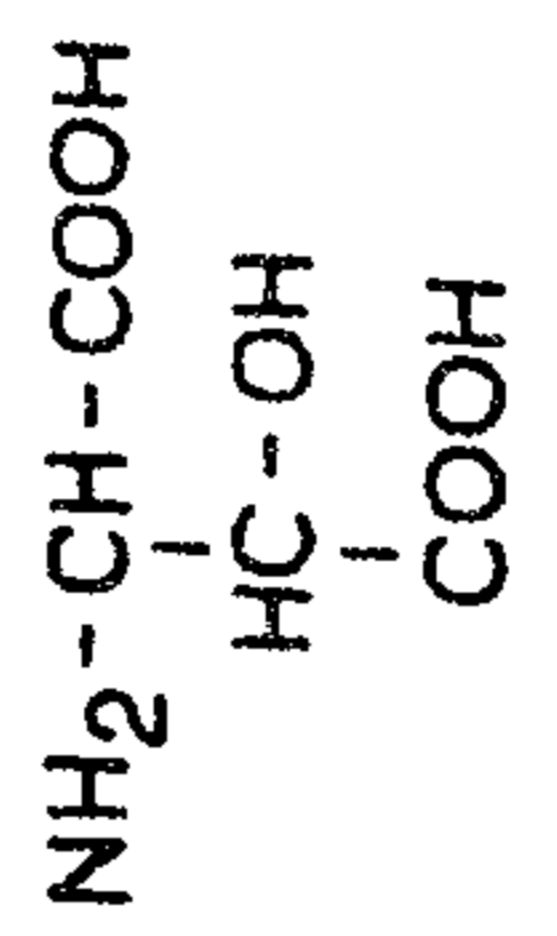
t . .
stop

FIG.1

FIG. 2



γ = acide γ -carboxyglutamique



β = acide β -hydroxyaspartique

* = carbohydrates

Kelly, Endicott, Gale, Baker et al.